

【명세서】

【발명의 명칭】

항-CD43 항체 및 이의 암 치료 용도

【기술분야】

CD43의 세포외 영역에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편, 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 조성물, CD43의 세포외 영역에 결합하는 항-CD43 항체를 유효성분으로 포함하는 암줄기세포 저해용 조성물, 및 암줄기세포 저해제의 스크리닝 방법이 제공된다.

【배경 기술】

CD43은 적혈구를 제외한 많은 조혈세포에서 발현하는 세포표면 단백질이다. 인간 CD43, sialophorin 또는 leukosialin으로 알려져 있음, 은 235개 아미노산으로 구성된 mucine-like 세포외 도메인, 23개 아미노산으로 이루어진 막투과 도메인 그리고 123개의 아미노산으로 구성된 세포질내 도메인으로 이루어져 있으며, 관련 유전정보는 하나의 엑손에 암호화 되어 있다. 인간 CD43 세포외 도메인에는 많은 세린(46 잔기)과 트레오닌(47 잔기) 아미노산이 있으며, 그 아미노산 중 대부분이 O-linked 당쇄 (O-당쇄)를 보유하고 있다. 부가적으로, CD43에 N-당쇄도 연결되어 있다. O-당쇄의 구조는 세포 유형에 따라 차이가 많다고 알려졌다. CD43은 378개 염기쌍으로 이루어진 인트론으로 엑손을 둘로 구분할 수 있으며, 두 번째 엑손에 전체 전사 물질 정보가 암호화 되어있다.

CD43은 하나의 N-당쇄를 포함하여 약 40kDa에 달하는 전구 물질로 합성되고, 연속적인 성숙 당화과정을 거쳐 115kDa 내지 200kDa에 달하는 물질로 전환된다. 엄격하게 조절되는 전사 후 당화과정은 유형에 따라 특징적인 분자량 동형 단백질을 형성하게 되며, 이는 세포 유형에 따라 다르게 발현될 수 있다.

CD43 당화 항원결정부위는 최근 백혈구에 제한된 특이적 표지자로 알려졌다며 혈액암종 표지자로서의 특이적인 유용성이 밝혀졌다. 그러한 이유로, 많은 연구들에서 CD43 당화 항원결정부위에 결합하는 항체의 진단 또는 치료 목적의 사용 가능성이 탐구되었다. CD43을 인지하는 설치류 단클론항체는 CD34

과발현 계통표지자음성 골수조혈 간세포(Bazil *et al.* (1996) *Blood*, 87(4):1272-81)와 인간 T-림프아구성 세포(Brown *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271:27686-95)에서 세포자멸사를 유도한다고 알려졌다. 그러나 이러한 항체들은 대부분 성숙한(비암종) 조혈 세포에서 발현하는 CD43 세포의 도메인에 위치한 당쇄 항원결정부위와 반응하기 때문에 암세포의 검출 또는 치료에 효과적이지 않다. 따라서 혈액 암종의 진단, 추적, 치료를 위하여 보다 개선된 CD43 당화 항원결정부위 결합 물질의 개발이 필요하다.

한편, 암의 발생과 재발에 비정상적 줄기세포가 위계적으로 (hierarchical model) 관여한다는 암줄기세포(cancer stem cell) 가설이 알려져 있다.

인체의 모든 조직은 기관 특유 줄기세포(organ-specific stem cells)에서 기원한다. 기관 특유 줄기세포는 자가재생(self-renewal)을 할 수 있고, 각 기관을 구성하는 모든 세포로 분화(differentiation)하는 능력을 가지고 있다. 이런 기관 특유 줄기세포는 분화의 형태가 주로 정해진 기관 내의 세포형태로만 분화될 수 있다는 점에서 배아 줄기세포와 구별된다.

암줄기세포 가설은 크게 두 개의 구성요소로 이루어져 있는데, 첫째, 종양은 조직의 줄기세포에서 발생한다는 것과, 둘째, 그 세포로부터 발생하여 구성된 종양은 줄기세포의 기본 특성을 가지고 있어야 한다는 것이다.

암줄기세포는 무제한 재생능력을 가진 암 세포로서, 면역억제 쥐에 주입하였을 때 고효율적으로 종양을 생성할 수 있으며, 그 형성된 종양에서는 원발 종양이 가지고 있던 고유의 이질성(heterogeneity)이 잘 표현되는 세포로 정의될 수 있다.

암줄기세포 가설은 최근 줄기세포 생물학이 발달하게 되면서 보다 구체화되기 시작하였다. 1997년 급성 골수성 백혈병에서 암줄기세포가 될 수 있는 일단의 세포를 면역억제 쥐에 이식하여 사람의 백혈병이 쥐에서 재현됨이 발표되면서 암줄기세포 가설은 진일보하게 되었다(Bonnet D, Dick JE; Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-7).

악성 종양이 보이는 다양한 이질성이 줄기세포의 다양한 분화성과 일치하며, 많은 표적치료에도 불구하고 끊임없이 발현되는 암세포의 약물 저항성

또한 줄기세포의 기본 특성과 일치한다. 암줄기세포는 자가복제능력(self-renewal)에 의해 새로운 암종괴를 형성할 수 있기 때문에, 암줄기세포가 아닌 종양 세포들을 수술로 완전히 제거하고 항암화학치료를 시행해도 암줄기세포가 남아있으면 암은 다시 재발하게 된다.

따라서, 암을 완전하게 치료하기 위해서는 암줄기세포를 저해하거나 제거하는 기술의 개발이 요구된다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위(epitope)에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 유효성분으로 포함하는 고형암의 치료용 약학 조성물을 제공한다.

다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 고형암의 치료를 필요로 하는 대상 (환자)에게 투여하는 단계를 포함하는 고형암의 치료 방법을 제공한다.

다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 고형암 치료를 위한 용도를 제공한다.

상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하는 CD43의 세포외 영역 내의 연속하는 6 내지 9개의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 앞서 설명한 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 포함할 수 있다.

상기 고형암의 치료를 위한 약학 조성물, 방법, 및 용도는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포의 저해 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 고형암은 위암일 수 있고, 상기 혈액암은 백혈병일 수 있다.

다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 유효성분으로 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해용 약학 조성물을 제공한다.

다른 예는 CD43의 세포의 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 암 환자, 예컨대 고형암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해 방법을 제공한다.

다른 예는 CD43의 세포의 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해를 위한 용도를 제공한다.

상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하는 CD43의 세포의 영역 내의 연속하는 6 내지 9개의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 앞서 설명한 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 포함할 수 있다. 일 예에서, 상기 고형암은 위암일 수 있다.

다른 예는 CD43의 세포의 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편과 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포가 결합된 접합체를 제공한다. 다른 예는 예는 CD43의 세포의 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 암 시료, 예컨대 고형암 시료 또는 암 환자, 예컨대, 고형암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편과 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포가 결합된 접합체를 생성하는 방법을 제공한다. 상기 접합체 또는 이를 생성하는 방법은 암 치료뿐 아니라 다양한 임상적, 진단적, 및/또는 실험적 목적으로 사용 가능하다.

다른 예는 상기 CD43의 세포의 영역에 위치하는 항원결정부위를 포함하는 고형암 치료제의 스크리닝을 위한 제제를 제공한다. 다른 예는 상기 CD43의 세포의 영역에 위치하는 항원결정부위를 이용하는 고형암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 다른 예는 다른 예는 상기 CD43의 세포의 영역에 위치하는 항원결정부위의 고형암 치료제의 스크리닝을 위한 용도를 제공한다. 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하는 CD43의 세포의 영역 내의 연속하는 6 내지 9개의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기와 같이 스크리닝된 고형암 치료제는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는

고형암의 암줄기세포의 저해 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 것이 수 있다. 일 예에서, 상기 고형암은 위암일 수 있다.

다른 예는 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위를 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해제의 스크리닝을 위한 제제를 제공한다. 다른 예는 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위를 이용하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해제 스크리닝 방법을 제공한다. 다른 예는 다른 예는 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위의 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해제의 스크리닝을 위한 용도를 제공한다. 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하는 CD43의 세포외 영역 내의 연속하는 6 내지 9개의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 일 예에서, 상기 고형암은 위암일 수 있다.

다른 예는 신규한 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 제공한다. 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위(epitope)에 결합하는 것일 수 있다. 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하는 CD43의 세포외 영역 내의 연속하는 6 내지 9개의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다.

상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 중쇄가변영역 (Heavy chain variable region; VH) 및 경쇄가변영역 (Light chain variable region; VL)을 포함한다.

상기 중쇄가변영역은, N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로, 첫 번째 상보성결정부위 (complementarity determining region; CDR) (CDR1H), 두 번째 CDR (CDR2H), 및 세 번째 CDR (CDR3H)를 포함할 수 있다.

일 예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은, 중쇄가변영역의 필수성분으로서, GYX₁MN (SEQ ID NO: 110; X₁은 모든 아미노산 중에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대, F 또는 Y일 수 있음)의 아미노산 서열 (예컨대, GYFMN (SEQ ID NO: 111) 또는 GYYMN(SEQ ID NO: 112))을 포함하는 CDR1H, RINPNX₂GDSFYNQKFX₃G (SEQ ID NO: 113; X₂ 및 X₃은 각각 독립적으로 모든 아미노산 중에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대, X₂는 N 또는 S이고, X₃은 Q 또는 K임)의 아미노산 서열 (예컨대, RINPNNGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 114),

RINPNSGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 115), RINPNNGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 116), 또는 RINPNSGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 117))을 포함하는 CDR2H, 및 EGYYGGRGYALDY (SEQ ID NO: 118)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3H를 포함할 수 있다.

상기 경쇄가변영역은, N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로, 첫 번째 CDR(CDR1L), 두 번째 CDR(CDR2L), 및 세 번째 CDR (CDR3L)를 포함할 수 있다.

일 예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은, 경쇄가변영역의 필수성분으로서, RTSQDISNYLN (SEQ ID NO: 119)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1L; X₄TX₅RLHS (SEQ ID NO: 120; X₄ 및 X₅는 각각 독립적으로 모든 아미노산 중에서 선택될 수 있으며, 예컨대, X₄는 N, Q, 또는 A이고, X₅는 S 또는 A임)의 아미노산 서열 (예컨대, NTSRLHS (SEQ ID NO: 121, NTARLHS (SEQ ID NO: 122), QTSRLHS (SEQ ID NO: 123), 또는 ATSLRLHS (SEQ ID NO: 124))의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2L; 및 QQSNMFPY (SEQ ID NO: 125)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3L을 포함할 수 있다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 치료적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 암의 예방 및/또는 치료, 또는 항암제 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.

일 구체예에서, 상기 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물, 방법, 및 용도에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 단독 유효성분으로 제공되거나, 항암제 등의 세포독성 물질과 병용 투여 되거나, 항암제 등의 세포 독성 물질과 접합된 접합체 (antibody-drug conjugate; ADC) 형태로 제공될 수 있다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 이용하여 시료에서의 암세포 검출 방법을 제공한다, 상기 검출 방법은 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 시료에 접촉시키는 단계 및 상기 시료에서의 항원-항체 반응을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.

다른 예는 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 상기 핵산 분자를 숙주세포에서 발현시키기 위한 발현 벡터로 사용될 수 있다.

다른 예는 상기 핵산 분자 또는 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포를 제공한다. 상기 재조합 세포는 상기 핵산 분자 또는 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜서 얻어진 것일 수 있다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 제조 방법을 제공한다. 상기 제조 방법은 상기 핵산 분자를 숙주세포에서 발현시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 발현시키는 단계는 상기 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있으며, 임의로, 상기 얻어진 세포 배양물로부터 항체를 분리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

일 구체예에서, 상기 제조 방법은,

- (a) 상기 핵산 분자 또는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 세포를 준비하는 단계;
- (b) 상기 핵산 분자의 충분한 발현을 위한 조건 및/또는 기간에서 상기 재조합 세포를 배양하는 단계; 및
- (c) 상기 (c) 단계에서 얻어진 배양물로부터 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 분리 및/또는 정제하는 단계.

【과제의 해결 수단】

상기한 바와 같이, 암을 완전하게 치료하기 위해서는 암줄기세포를 저해하거나 제거하는 기술의 개발이 필요하며, 이를 위해서는 암줄기세포를 다른 세포들로부터 분리 할 수 있는 암줄기세포 표지자를 선정하는 과정이 필요하다.

본 발명에서 CD43이 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포의 표면에 발현함이 최초로 제안된다. CD43은 적혈구를 제외한 대부분의 백혈구와 조혈 줄기세포, 혈소판에 제한적인 특정 백혈구 마커로 알려져 있었지만, 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포에 발현한다는

사실은 아직 알려진 바가 없다.

또한, CD43의 세포외 영역 중 특정 부위를 특이적으로 인식 및/또는 결합하는 항-CD43 항체가 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해 효능을 가짐이 제안된다.

CD43(cluster of differentiation 43)은 Leukosialin 또는 sialophorin이라고도 불리며, 적혈구를 제외한 대부분의 조혈세포 표면에 발현되는 주요 막통과단백질(transmembrane protein)이다. 상기 CD43은 인간(*Homo sapiens*) 등의 영장류, 마우스(*Mus musculus*) 등의 설치류 등을 포함하는 포유류로부터 유래하는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 CD43은 인간 CD43 (예컨대, NCBI Accession No. AAA51949.1 (유전자(mRNA): M61827.1), NP_001025459.1 (유전자(mRNA): NM_001030288.1), NP_003114.1 (유전자: NM_003123.3) 등), 마우스 CD43 (예컨대, NCBI Accession No. NP_001032899.1 (유전자: NM_001037810.1), NP_033285.1(유전자: NM_009259.4) 등) 동일 수 있다. 이 예에서, 상기 CD43은 인간 CD43 (단백질: NCBI Accession No. AAA51949.1(SEQ ID NO: 130); 유전자(mRNA): M61827.1)일 수 있다.

본 발명의 일 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위(epitope)에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 유효성분으로 포함하는 고형암의 치료용 약학 조성물을 제공한다.

다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 고형암의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 고형암의 치료 방법을 제공한다.

다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 고형암 치료를 위한 용도를 제공한다.

상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

따라서, 본 발명의 다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 유효성분으로 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해용 약학

조성물을 제공한다.

다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 암 환자, 예컨대, 고형암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해 방법을 제공한다.

다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해를 위한 용도를 제공한다.

본 명세서에서, 별도의 정의가 없는 한, 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위(epitope)는 SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하는 CD43의 세포외 영역 내의 연속하는 6 내지 9개의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 의미하는 것일 수 있다.

SEQ ID NO: 131: Pro Leu Trp Thr Ser Ile

상기 항원결정부위는 CD43 단백질의 세포외 영역에 위치하면서 정상 상태에서는 외부 환경에 노출되어 있지 않지만, 세포가 암세포화되거나 암줄기세포화되면 외부에 노출되는 것일 수 있다. 따라서, 상기 항원결정부위를 특이적으로 인식하거나 및/또는 이에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원결합단편은 암세포 및/또는 암줄기세포를 특이적으로 표적화 및/또는 저해하는 것일 수 있다.

상기 항원결정부위가 위치하는 CD43의 세포외 영역은 CD43 (AAA51949.1; SEQ ID NO: 130)의 73번째부터 81번째까지의 아미노산 부위 (SEQ ID NO: 134)일 수 있다. 따라서, 상기 항원결정부위는 CD43 (AAA51949.1) 중의 SEQ ID NO: 134 내의 SEQ ID NO: 131을 포함하는 연속하는 6개 내지 9개 아미노산 서열 부위일 수 있다.

상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131 내지 134로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있으며, 예컨대, SEQ ID NO: 134의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다:

SEQ ID NO: 132: Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile

SEQ ID NO: 133: Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile

SEQ ID NO: 134: Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile

본 발명의 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 앞서 설명한 항원결합부위를 인식하거나 여기에 특이적으로 결합하는 모든 항체 또는 항원결합단편으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

본 명세서에서, 용어 "JL-1"은 CD43 또는 상기한 바와 같은 CD43의 항원결정부위를 의미하기 위하여 사용된다.

본 발명에서 항체 또는 이의 항원결합단편은 동물 유래 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 및 이들의 항원결합단편으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 항체는 재조합적 또는 합성적으로 생산된 것일 수 있다.

원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여 시 면역거부반응이 일어날 수 있으며, 이러한 면역거부반응을 억제하고자 키메라 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메라 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환한 것이다. 키메라 항체는 동물 유래 항체에 비하여 항-아이소타입 반응에 있어서 상당 부분 개선되었으나, 여전히 동물 유래 아미노산들이 가변 영역에 존재하고 있어 잠재적인 항-이디오타입(anti-idiotypic) 반응에 대한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 부작용을 개선하고자 개발된 것이 인간화 항체(humanized antibody)이다. 이는 키메라 항체의 가변 영역 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementarity determining regions) 부위를 인간 항체 골격(framework)에 이식하여 제작된다.

인간화 항체를 제작하기 위한 CDR 이식(grafting) 기술에 있어서 가장 중요한 것은 동물 유래 항체의 CDR 부위를 가장 잘 받아들일 수 있는 최적화된 인간 항체를 선정하는 것이며, 이를 위하여 항체 데이터베이스의 활용, 결정구조(crystal structure)의 분석, 분자모델링 기술 등이 활용된다. 그러나, 최적화된 인간 항체 골격에 동물 유래 항체의 CDR 부위를 이식할지라도 동물 유래 항체의 골격에 위치하면서 항원 결합에 영향을 미치는 아미노산이 존재하는 경우가 있기 때문에, 항원 결합력이 보존되지 못하는 경우가 상당수 존재하므로, 항원 결합력을 복원하기 위한 추가적인 항체 공학 기술의 적용은 필수적이라고 할 수 있다.

상기 항체 또는 항원결합단편은 생체에서 분리된 (생체에 존재하지 않는) 것 또는 비자연적으로 생산(non-naturally occurring)된 것일 수 있으며, 예컨대, 합성적 또는 재조합적으로 생산된 것일 수 있다.

본 발명에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서, 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 자연적 또는 비자연적(예컨대, 합성적 또는 재조합적)으로 얻어질 수 있다. 항체는 생체 외뿐 아니라 생체 내에서도 매우 안정하고 반감기가 길기 때문에 대량 발현 및 생산에 유리하다. 또한, 항체는 본질적으로 다이머(dimer) 구조를 가지므로 접착능(avidity)이 매우 높다.

완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1($\gamma 1$), 감마2($\gamma 2$), 감마3($\gamma 3$), 감마4($\gamma 4$), 알파1($\alpha 1$) 및 알파2($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.

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 항원결정부위에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다. 한편, 본 명세서에 있어서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적

반응을 하는 것을 의미한다.

용어, "항원결합단편"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 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 항원결합단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH₁)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH₁ 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있으며, 당업계에 적절한 서열이 알려져 있다. 상기 항원결합단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

용어 "힌지 영역(hinge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, CH₁ 및 CH₂ 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)을 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다. 예컨대, 상기 힌지는 인간 항체로부터 유래한 것일 수 있으며, 구체적으로, IgA, IgE, 또는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG 3, 또는 IgG4로부터 유래한 것일 수 있다.

항-CD43 항체는 다클론 항체 또는 단클론 항체일 수 있으며, 예컨대, 단클론 항체일 수 있다. 단클론 항체는 당 업계에 널리 알려진 방법대로 제조될 수 있다. 예컨대, phage display 기법을 이용해서 제조될 수 있다.

한편, 전형적인 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 포맷을 이용하여 CD43과의 결합능에 기초하여 개별 단클론 항체들을 스크리닝할 수 있다. 결합체들에 대해 분자적 상호작용을 검정하기 위한 경쟁적 ELISA(Competitive ELISA), 세포-기반 분석(cell-based assay), Scatchard analysis, 또는 surface plasmon resonance 등과 같은 기능성 분석을 통해 저해 활성에 대해 검정할 수 있다. 그런 다음 강한 저해 활성에 기초하여 선택된 단클론항체 멤버들에 대해 CD43에 대한 각각의 친화도(Kd values)를 검정할 수 있다.

예컨대, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 CD43 (예컨대, 인간 CD43, 마우스 CD43 등) 또는 CD43의 세포의 영역에 위치하는 항원결정부위에 대한 결합 친화도(Kd; 예컨대 Scatchard analysis로 측정)가 1mM 이하, 100nM 이하, 10nM 이하, 5nM 이하, 또는 3nM 이하일 수 있으며, 예컨대, 1pM 내지 1mM, 1pM 내지 100nM, 1pM 내지 10nM, 1pM 내지 5nM, 1pM 내지 3nM, 10pM 내지 1mM, 10pM 내지 100nM, 10pM 내지 10nM, 10pM 내지 5nM, 10pM 내지 3nM, 100pM 내지 1mM, 100pM 내지 100nM, 100pM 내지 10nM, 100pM 내지 5nM, 100pM 내지 3nM, 1nM 내지 1mM, 1nM 내지 100nM, 1nM 내지 10nM, 1nM 내지 5nM, 또는 1nM 내지 3nM일 수 있다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체의 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다. 상기 하이브리도마 세포주는 수탁번호 KCLRF-BP-00010인 H-JL1 세포주일 수 있다.

상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상과 함께 적용될 수 있다.

따라서, 상기 약학 조성물은 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편에 더하여, 세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 치료, 또는 저해 방법은 약학 조성물은 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 투여하는 단계에 더하여 세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

구체적으로, 본 발명의 다른 예는 (1) CD43의 세포의 영역에 위치하는 항원결정부위(epitope)에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편 및 (2)

세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 고형암의 치료용 약학 조성물을 제공한다.

다른 예는 (1) CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 고형암의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계 및 (2) 세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 약학적 유효량을 고형암의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 고형암의 치료 방법을 제공한다.

다른 예는 (i) CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편 및 (ii) 세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해용 약학 조성물을 제공한다.

다른 예는 (i) CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 암 환자, 예컨대 고형암 환자에게 투여하는 단계 및 (ii) 세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 암 환자, 예컨대, 고형암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해용 약학 조성물을 제공한다.

상기 약학 조성물에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편과 세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상은 서로 접합(conjugate)되거나 혼합되어 하나의 제제로 제형화되거나, 각각 별개의 제제로 제형화되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 방법에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 투여하는 단계와 세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 투여하는 단계는 동시 또는 순서에 상관없이 순차적으로 수행될 수 있다.

상기 세포독성물질은 암세포, 특히 고형암세포에 대하여 독성을 갖는 모든 물질일 수 있으며, 방사선동위원소, 세포 독소 화합물(small molecule), 세포 독성 단백질, 항암제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 세포 독소 단백질은 리신(ricin), 사포린(saporin), 젤로닌(gelonin), 모로딘(momordin), 데보가닌 (debouganin), 디프테리아독소,

녹농균독소(pseudomonas toxin) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 방사선동위원소로는 ^{131}I , ^{188}Rh , ^{90}Y 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 세포 독소 화합물은 듀오카마이신(duocarmycin), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F; MMAF), N2'-디아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)메이탄신(N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxo propyl)maytansine; DM1), PBD (Pyrrolobenzodiazepine) dimer 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편과 상기 세포독성물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상은 서로 결합 (예컨대, 공유결합, 펩타이드 결합 등에 의함)되어 접합체 (conjugate) 또는 융합 단백질 (세포독성물질 및/또는 표지물질이 단백질인 경우)의 형태로 사용될 수 있다. 상기 항체 (또는 항원결합단편)과 세포독성물질의 결합은 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 기술에 따른 것일 수 있다.

상기 유효성분 (항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편, 및/또는 세포독성물질 및/또는 표지물질)은 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 적용 (투여)될 수 있으며, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는, 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 항-CD43 항체는 상기 성분들 이외에 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

상기 유효성분 또는 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피

투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 또는 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

본 명세서에 있어서 "약학적 유효량"은 약물이 약학적으로 의미있는 효과를 나타낼 수 있는 양을 의미한다. 1회 투여를 위한 유효성분의 약학적 유효량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 따라서 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 1회 투여를 위한 유효성분 (예컨대, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편)의 약학적 유효량은 0.001 내지 100mg/kg, 또는 0.02 내지 10mg/kg 범위일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 1회 투여를 위한 약학적 유효량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

상기 고형암은 혈액암 이외의 모든 비혈액암을 의미하는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 고형암은 폐암 (예컨대, 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암), 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 위장암, 위암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 담낭암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁암, 자궁내막암, 자궁경부암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 골육종 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 상기 고형암은 위암, 유방암, 폐암, 대장암, 간암, 담낭암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 난소암, 자궁경부암, 전립선암, 또는 방광암일 수 있다. 상기 암은 원발성 암뿐 아니라 전이성 암도 포함한다. 또한 상기 고형암은 기존의 항암제 (e.g., 소분자 항암제 (anticancer chemical), 항대사제, 알킬화제, 항생제, 비카알카로이드, 효소, 호르몬제, 표적치료제, 및/또는 항체 치료제 등)에 대하여 저항성을 갖는 암일 수 있고, 기존의 항암제 (e.g., 소분자 항암제 (anticancer chemical), 항대사제, 알킬화제, 항생제, 비카알카로이드, 효소, 호르몬제, 표적치료제, 및/또는 항체 치료제 등)

치료 후 재발한 암일 수 있다.

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

본 명세서에서, "암줄기세포 저해"는 암줄기세포의 성장 억제 (양적 감소), 사멸 (apoptosis) 등의 모든 암줄기세포의 양적 및/또는 기능적 저해 및/또는 이를 통하여 상기 암줄기세포가 관여하는 암의 치료 및/또는 개선을 의미한다.

본 명세서에서, "환자"는 암 (예컨대, 고형암 또는 혈액암)의 치료, 및/또는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포의 저해를 필요로 하는 환자를 의미하는 것으로, 모든 포유류, 예컨대 인간일 수 있고, 암을 앓고 있거나 암의 증상을 갖거나, 암 발병의 위험이 있는 환자, 또는 이로부터 분리된 세포, 조직, 체액 또는 이의 배양물일 수 있다.

다른 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편과 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포가 결합된 접합체를 제공한다. 다른 예는 예는 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 생체에서 분리된 암시료, 예컨대 고형암 시료에 접촉시키거나 또는 암 환자, 예컨대 고형암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편과 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포가 결합된 접합체를 생성하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 생체 내 또는 생체 외에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 접합체 또는 이를 생성하는 방법은 고형암 치료뿐 아니라 다양한 임상적, 진단적, 및/또는 실험적 목적으로 사용 가능하다. 예컨대, 암 시료에 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 접촉 시 접합체 생성 여부를 검출하여 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포의 존재 여부를 확인 및/또는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 가시화를 위한 용도로 가용 가능하다. 이 때, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 표지물질을 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 표지 물질은 방사선동위원소, 형광 물질, 크로모젠(chromogen), 염색 물질 등으로

이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 형광물질은 통상적으로 사용가능한 모든 형광물질일 수 있으며, 예컨대, 플루오레센 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate: FITC), 피코에리트린(phycoerythrin: PE), 알로피코사이아닌 (allophycocyanin, APC) 또는 바이오틴(biotin) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 표지물질은 상기 항체 또는 항원결합단편에 통상적인 방법(예컨대, 공유결합, 배위결합, 이온결합 등의 화학결합)으로 결합(연결)된 것일 수 있다. 상기 항체 (또는 항원결합단편)과 표지물질의 결합은 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 기술에 따른 것일 수 있다.

상기 암 시료는 암 세포주, 또는 암 환자로부터 분리되거나 인공적으로 배양된 세포, 조직, 체액 등일 수 있다. 상기 고형암 시료는 고형암 세포주, 또는 고형암 환자로부터 분리되거나 인공적으로 배양된 세포, 조직, 체액 등일 수 있다.

다른 예는 CD43, 구체적으로 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위의 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 검출을 위한 마커로서의 용도를 제공한다. 구체적으로, 일 예는 CD43, 구체적으로 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위와 상호작용하는 물질을 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 검출용 조성물을 제공한다. 다른 예는 세포 시료에 CD43, 구체적으로 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위와 상호작용하는 물질을 접촉시키는 단계 및 상기 CD43, 구체적으로 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위와 상호작용하는 물질 간의 상호작용 여부 또는 정도를 측정하는 단계를 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 검출 방법을 제공한다. 이 경우 CD43, 구체적으로 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위와 상호작용하는 물질 간의 상호작용이 존재하거나 그 수준이 높은 경우, 상기 세포 시료는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포를 포함하는 것으로 결정(확인)할 수 있다. 상기 상호작용하는 물질은 CD43, 구체적으로 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위와 상호작용 가능한 모든 물질, 예컨대, 화학물질(small molecular chemical), 항체, 항체의 항원결합단편, 앵타머 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 상호작용 여부는 상기 상호작용하는 물질을

이용하는 통상적인 단백질 분석 방법, 예컨대, 면역크로마토그래피(Immunochromatography), 면역조직화학염색, 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Fluorescence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting), FISH(fluorescent in situ hybridization), Flow cytometer, 마이크로어레이법, 등을 이용하여 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 세포 시료는 표유류, 예컨대 인간으로부터 분리된 세포, 조직, 또는 이의 배양물일 수 있으며, 예컨대, 암 환자, 예컨대, 고형암 환자로부터 분리된 암세포, 암조직, 또는 이의 배양물일 수 있다.

다른 예는 다른 예는 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위의 고형암 치료제의 스크리닝을 위한 용도를 제공한다.

다른 예는 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위를 포함하는 고형암 치료제의 스크리닝을 위한 제제를 제공한다.

다른 예는 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 후보 화합물을 접촉시키는 단계, 및 상기 항원결정부위에 결합하는 후보 화합물을 선택하여 고형암 치료제 후보물질로 결정하는 단계를 포함하는, 고형암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

상기와 같이 스크리닝된 고형암 치료제는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포의 저해 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 것이 수 있다.

따라서, 다른 예는 다른 예는 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위의 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해제의 스크리닝을 위한 용도를 제공한다.

다른 예는 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위를 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해제의 스크리닝을 위한 제제를 제공한다.

다른 예는 상기 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위에 후보 화합물을 접촉시키는 단계, 및 상기 항원결정부위에 결합하는 후보 화합물을 선택하여 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해제

후보물질로 결정하는 단계를 포함하는, 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해제 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 항원결정부위에 결합하는 후보 화합물은 상기 항원결정부위에 대한 결합 친화도(Kd; 예컨대 Scatchard analysis로 측정)가 1mM 이하, 100nM 이하, 10nM 이하, 5nM 이하, 또는 3nM 이하일 수 있으며, 예컨대, 1pM 내지 1mM, 1pM 내지 100nM, 1pM 내지 10nM, 1pM 내지 5nM, 1pM 내지 3nM, 10pM 내지 1mM, 10pM 내지 100nM, 10pM 내지 10nM, 10pM 내지 5nM, 10pM 내지 3nM, 100pM 내지 1mM, 100pM 내지 100nM, 100pM 내지 10nM, 100pM 내지 5nM, 100pM 내지 3nM, 1nM 내지 1mM, 1nM 내지 100nM, 1nM 내지 10nM, 1nM 내지 5nM, 또는 1nM 내지 3nM일 수 있다.

상기 항원결정부위는 앞서 설명한 바와 같으며, SEQ ID NO: 131 내지 134 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 항원결정부위는 CD43 단백질의 전체 또는 상기 항원결정부위를 포함하는 일부로서 제공되거나, 화학적으로 합성 또는 재조합적으로 생산된 것일 수 있다.

상기 후보 화합물은 인공적으로 합성되거나 천연의 각종 화합물, 폴리펩타이드, 올리고펩타이드, 펩타이드 구조체 또는 단백질 구조체 (예컨대, 항체, 항체의 항원결합단편, 펩티바디, 나노바디, 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.

일 예에서, 상기와 같이 스크리닝된 고형암 치료제 또는 암줄기세포 저해제는 항체, 항체의 항원결합단편, 항체 유사 단백질 구조체 (예컨대, 펩티바디, 나노바디) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

다른 예에서, 상기와 같이 스크리닝된 고형암 치료제를 유효성분으로 포함하는 고형암의 치료용 약학 조성물을 제공한다. 다른 예는 상기와 같이 스크리닝된 고형암 치료제의 약학적 유효량을 고형암의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 고형암의 치료 방법을 제공한다. 일 예에서, 상기 고형암은 위암일 수 있다.

다른 예는 상기와 같이 스크리닝된 암줄기세포 저해제를 유효성분으로 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해용 약학 조성물을 제공한다. 다른 예는 상기와 같이 스크리닝된 암줄기세포 저해제의 약학적 유효량을 암 환자, 예컨대, 고형암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암줄기세포, 예컨대, 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포 저해 방법을 제공한다. 일 예에서, 상기 고형암은 위암일 수 있다.

다른 예는 신규한 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 제공한다. 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 앞서 설명한 바와 같은 CD43의 세포외 영역에 위치하는 항원결정부위(epitope)에 결합하는 것일 수 있다. 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하는 CD43의 세포외 영역 내의 연속하는 6 내지 9개의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다.

상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 중쇄가변영역 (Heavy chain variable region; VH) 및 경쇄가변영역 (Light chain variable region; VL)을 포함한다. 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 동물 유래 항체 (예컨대, 마우스 항체), 키메라 항체, 또는 인간화 항체일 수 있고, 단클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있으며, 비자연적 (예컨대, 화학적 또는 생물학적 합성, 재조합적 방법 등)으로 생산된 것일 수 있다.

상기 중쇄가변영역은, N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로, 첫 번째

상보성결정부위 (complementarity determining region; CDR) (CDR1H), 두 번째 CDR (CDR2H), 및 세 번째 CDR (CDR3H)를 포함할 수 있다.

일 예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은, 중쇄가변영역의 필수성분으로서, GYX₁MN (SEQ ID NO: 110; X₁은 모든 아미노산 중에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대, F 또는 Y일 수 있음)의 아미노산 서열 (예컨대, GYFMN (SEQ ID NO: 111) 또는 GYYMN (SEQ ID NO: 112))을 포함하는 CDR1H, RINPNX₂GDSFYNQKFX₃G (SEQ ID NO: 113; X₂ 및 X₃은 각각 독립적으로 모든 아미노산 중에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대, X₂는 N 또는 S이고, X₃은 Q 또는 K임)의 아미노산 서열 (예컨대, RINPNNGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 114), RINPNSGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 115), RINPNNGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 116), 또는 RINPNSGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 117))을 포함하는 CDR2H, 및 EGYGGRGYALDY (SEQ ID NO: 118)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3H를 포함할 수 있다.

상기 중쇄가변영역은 상기한 상보성결정부위(CDR)들의 N-말단쪽 및/또는 C-말단쪽에 면역글로불린의 골격 부위(framework)를 추가로 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 중쇄가변영역은, N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로, 첫 번째 framework (FR1H), 첫 번째 상보성결정부위 (complementarity determining region; CDR) (CDR1H), 두 번째 framework (FR2H), 두 번째 CDR (CDR2H), 세 번째 framework (FR3H), 세 번째 CDR (CDR3H), 및 네 번째 framework (FR4H)를 포함할 수 있다.

일 구체예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 인간화된 것이며,

(i) FRIH는 SEQ ID NO: 83 내지 SEQ ID NO: 94 중 어느 하나의 1번부터 30번까지 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다;

(ii) CDR1H는 GYX₁MN (SEQ ID NO: 110; X₁은 모든 아미노산 중에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대, F 또는 Y일 수 있음)의 아미노산 서열을 포함하는 것일

수 있으며, 예컨대, GYFMN (SEQ ID NO: 111) 또는 GYYMN (SEQ ID NO: 112)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다;

(iii) FR2H는 SEQ ID NO: 83 내지 SEQ ID NO: 94 중 어느 하나의 36번부터 49번까지 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다;

(iv) CDR2H는 RINPNX₂GDSFYNQKFX₃G (SEQ ID NO: 113; X₂ 및 X₃은 각각 독립적으로 모든 아미노산 중에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대, X₂는 N 또는 S이고, X₃은 Q 또는 K임)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예컨대, RINPNNGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 114), RINPNSGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 115), RINPNNGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 116), 또는 RINPNSGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 117)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다;

(v) FR3H는 SEQ ID NO: 83 내지 SEQ ID NO: 94 중 어느 하나의 67번부터 98번까지의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다;

(vi) CDR3H는 EGYYGGRGYALDY (SEQ ID NO: 118)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다;

(vii) FR4H는 SEQ ID NO: 83 내지 SEQ ID NO: 94 중 어느 하나의 112번부터 122번까지의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

상기 경쇄가변영역은, N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로, 첫 번째 CDR(CDR1L), 두 번째 CDR(CDR2L), 및 세 번째 CDR (CDR3L)를 포함할 수 있다.

일 예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은, 경쇄가변영역의 필수성분으로서, RTSQDISNYLN (SEQ ID NO: 119)의 아미노산 서열을 포함하는

CDR1L; X₄TX₅RLHS (SEQ ID NO: 120; X₄ 및 X₅는 각각 독립적으로 모든 아미노산 중에서 선택될 수 있으며, 예컨대, X₄는 N, Q, 또는 A이고, X₅는 S 또는 A임)의 아미노산 서열 (예컨대, NTSRLHS (SEQ ID NO: 121, NTARLHS (SEQ ID NO: 122), QTSRLHS (SEQ ID NO: 123), 또는 ATSLHS (SEQ ID NO: 124))의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2L; 및 QQSNMFPY (SEQ ID NO: 125)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3L을 포함할 수 있다.

상기 중쇄가변영역은 상기한 상보성결정부위(CDR)의 N-말단쪽 및/또는 C-말단쪽에 면역글로불린의 골격 부위(framework)를 추가로 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 중쇄가변영역은, N-말단에서 C-말단 방향으로 순차적으로, 첫 번째 framework (FR1L), 첫 번째 CDR(CDR1L), 두 번째 framework (FR2L), 두 번째 CDR(CDR2L), 세 번째 framework (FR3L), 세 번째 CDR (CDR3L), 및 네 번째 framework (FR4L)를 포함할 수 있다.

일 구체예에서,

(viii) FR1L은 SEQ ID NO: 95 내지 SEQ ID NO: 109 중 어느 하나의 1번부터 23번까지 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다;

(ix) CDR1L은 RTSQDISNYLN (SEQ ID NO: 119)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다;

(x) FR2L은 SEQ ID NO: 95 내지 SEQ ID NO: 109 중 어느 하나의 35번부터 49번까지 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다;

(xi) CDR2L은 X₄TX₅RLHS (SEQ ID NO: 120; X₄ 및 X₅는 각각 독립적으로 모든 아미노산 중에서 선택될 수 있으며, 예컨대, X₄는 N, Q, 또는 A이고, X₅는 S 또는 A임)의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 예컨대, NTSRLHS (SEQ ID NO: 121, NTARLHS (SEQ ID NO: 122), QTSRLHS (SEQ ID NO: 123), 또는 ATSLHS ((SEQ

ID NO: 124)를 포함하는 것일 수 있다.

(xii) FR3L은 SEQ ID NO: 95 내지 SEQ ID NO: 109 중 어느 하나의 57번부터 88번까지의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

(xiii) CDR3L은 QQSNMFPY (SEQ ID NO: 125)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다;

(xiv) FR4L은 SEQ ID NO: 95 내지 SEQ ID NO: 109 중 어느 하나의 97번부터 108번까지의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

일 구체예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄가변영역은 SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 또는 94의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 경쇄가변영역은 SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 또는 109의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

예컨대, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 인간화된 것일 수 있으며, 다음으로 정의되는 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 포함하는 것으로 예시될 수 있다:

(a) SEQ ID NO: 83의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 95의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역;

(b) SEQ ID NO: 84의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 96의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역;

(c) SEQ ID NO: 85의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역;

(d) SEQ ID NO: 86의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID

NO: 98의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(e) SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 99의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역;

(f) SEQ ID NO: 88의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 100의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(g) SEQ ID NO: 89의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 101의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(h) SEQ ID NO: 90의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(i) SEQ ID NO: 91의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 103의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(j) SEQ ID NO: 93의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 103의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(k) SEQ ID NO: 94의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 106의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(l) SEQ ID NO: 91의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 97의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(m) SEQ ID NO: 85의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 103의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(n) SEQ ID NO: 93의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역;

(o) SEQ ID NO: 93의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 108의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역; 또는

(p) SEQ ID NO: 93의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역 및 SEQ ID NO: 109의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역.

일 구체예에서, 상기 인간화된 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편에 포함된 프레임워크의 아미노산 서열은 다음과 같이 예시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

(i) FR1H는 SEQ ID NOs: 83 내지 94 중 어느 하나의 1번부터 30번까지의

아미노산 잔기를 포함할 수 있다;

(ii) FR2H는 SEQ ID NOs: 83 내지 94 중 어느 하나의 36번부터 49까지의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다;

(iii) FR3H는 SEQ ID NOs: 83 내지 94 중 어느 하나의 67번부터 98번까지의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다;

(iv) FR4H는 SEQ ID NOs: 83 내지 94 중 어느 하나의 112번부터 122번까지의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다;

(v) FR1L는 SEQ ID NOs: 95 내지 109 중 어느 하나의 1번부터 23번까지의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다;

(vi) FR2L는 SEQ ID NOs: 95 내지 109 중 어느 하나의 35번부터 49번까지의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다;

(vii) FR3L는 SEQ ID NOs: 95 내지 109 중 어느 하나의 57번부터 88번까지의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다;

(viii) FR4L는 SEQ ID NOs: 95 내지 109 중 어느 하나의 97번부터 108번까지의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

다른 실시 예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 인간 면역글로불린으로부터 유도된 인간 중쇄불변영역 및/또는 인간 경쇄불변영역을 추가로 포함할 수 있다. 상기 인간 면역글로불린은 IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 예컨대, 상기 인간 중쇄불변영역은 SEQ ID NO: 40의 123-452번째의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며; 상기 인간 경쇄불변영역은 SEQ ID NO: 48의 108-214번째의 아미노산 또는 상기 아미노산 서열과 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 99.6% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상, 99.9% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

다른 예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 아미노산

잔기가 당화되지 않은 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 이를 위하여, 항체, 특히 중쇄가변영역 및/또는 경쇄가변영역에 당화 모티프, 예컨대, N-glycosylation 모티프 (e.g., “N-X-S/T” (X는 모든 아미노산 잔기일 수 있음))가 포함된 경우, 상기 모티프를 변형시킬 수 있다. 예컨대, 상기 N-glycosylation 모티프가 “N-X-S/T” (X는 모든 아미노산 잔기일 수 있음)인 경우, 상기 모티프 내의 “N”, “S/T” 또는 이들 모두를 각각 원래와 상이한 아미노산으로 치환시킬 수 있다. 일 예에서, 상기 당화되지 않은 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 CDR2L로서 NTARLHS (SEQ ID NO: 122), QTSRLHS (SEQ ID NO: 123), 또는 ATSLHS (SEQ ID NO: 124)를 포함하는 것일 수 있다. 다른 예로서 상기 당화되지 않은 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 경쇄가변영역으로서 SEQ ID NO: 107, 108, 또는 109의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

상기 항-CD43 항체 또는 항원결합단편은 앞서 설명한 CD43의 특정 항원결정부위에 특이적으로 결합하는 것으로, 동물 항체 (예컨대, 마우스 항체), 키메라 항체, 인간화 항체, 및 이들의 항원결합단편들로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 동물 항체는 인간 이외의 동물 종으로부터 유래된 것일 수 있으며, 예컨대, 쥐, 생쥐, 염소, 기니피그, 당나귀, 토끼, 말, 라마, 낙타, 조류 (예컨대, 닭, 오리 등) 등으로부터 유래된 것일 수 있으나 이에 한정되는 아니다. 이와 같은 동물 항체로부터 키메라 항체 및/또는 인간화 항체를 제작하는 기술은 관련 기술 분야에 잘 알려져 있다. 인간화 항체는 IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD, IgE 또는 임의의 subclass 같은 임의의 적합한 아이소타입 일 수 있다.

본 명세서에서, 항체의 CD43에 대한 결합 특이성은 항체가 비-CD43 펩타이드에 비하여 CD43에 대하여 보다 높은 친화력을 가지거나, CD43의 다른 부위 또는 다른 세포의 영역과 비교하여 앞서 설명한 CD43의 항원결정부위에 대하여 보다 높은 친화력을 가지는 것을 의미할 수 있다.

항체와 항원(보다 구체적으로, 항원결합부위)와의 결합 (항원-항체 결합)은 관련 기술 분야에 알려진 모든 방법들에 의해 측정될 수 있다. 예컨대, 항원-항체 결합은 ELISA, 유세포분석기, 면역화학염색, BIAcore 광학 바이오센서 등으로 이루어진 군에서 선택된 한 가지 이상의 방법에 의하여 측정될 수 있으나,

이에 제한되는 것은 아니다.

본 명세서에서 사용된 항원결합단편이란 용어는 항원 (CD43) 또는 앞서 설명한 CD43의 항원결정부위를 특이적으로 인식 및/또는 이에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 항체의 일부분(단편)을 의미한다. 예컨대, 항원결합단편은 Fab, F(ab)2, Fv, scFv, scFv-Fc 단편 등으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

일 예에서 항-CD43 항체의 항원결합단편은 항-CD43 scFv일 수 있다. 상기 항-CD43 scFv는 앞서 설명한 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3를 포함하거나, 앞서 설명한 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 포함하는 것일 수 있다.

상기 항-CD43 scFv에 있어서, 앞서 설명한 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역은 적절한 링커를 통하여 연결된 것일 수 있다. 상기 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있으며, 당업계에 적절한 서열이 알려져 있다. 일 예에서, 상기 펩타이드 링커는 (GGGX₆S; X₆은 G 또는 A; SEQ ID NO: 126) 또는 (GGGX₆S)_n (n은 1 내지 5의 정수로, 각 반복단위에 포함된 X₆은 각각 독립적으로 G 또는 A임)로 표현될 수 있으며, 예컨대 GGGASGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 127) 또는 GGGGSGGGGSGGGAS (SEQ ID NO: 128)의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

일 예에서, 상기 항-CD43 scFv는 SEQ ID NOS: 50, 52, 54, 56, 또는 58의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

일 예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 세포사멸 (예컨대, 세포자살(apoptosis)와 같은 프로그램화된 세포 사멸을 포함)을 유도할 수 있는 세포독성 물질과 접합되어 표적 세포에 세포독성을 나타낼 수 있다. 상기 세포 독성 물질은 관련 기술분야에서 세포, 특히 암세포에 대하여 독성을 나타내는 것으로 알려진 모든 화합물 (small molecular compound; 항암제 등), 단백질, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예컨대, 방사선동위원소, 세포 독소 화합물(small molecule), 세포 독성 단백질, 항암제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 세포 독소 단백질은 리신(ricin), 사포린(saporin),

젤로닌(gelonin), 모로딘(momordin), 데보가닌 (debouganin), 디프테리아독소, 녹농균독소(pseudomonas toxin) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 방사선동위원소로는 ^{131}I , ^{188}Rh , ^{90}Y 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 세포 독소 화합물은 듀오카마이신(duocarmycin), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F; MMAF), N2'-디아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)메이탄신(N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxo propyl)maytansine; DM1), PBD (Pyrrolobenzodiazepine) dimer 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

다른 예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 검출 가능한 표지가 접합된 접합체 형태로 제공될 수 있다. 상기 접합체는 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 CD43 또는 앞서 설명한 CD43의 항원결정부위의 존재를 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는 관련 기술분야에 통상적으로 알려진 모든 표지물질 중에서 선택될 수 있으며, 예컨대, 방사선표지 (예컨대, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm 등), 효소, 형광표지, 발광표지, 생물발광표지, 자성표지, 바이오틴 같은 화학적 물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 항체 또는 항원결합단편의 용도에 따라서 적절한 표지를 선택하는 것은 관련 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확한 사항이다.

다른 예는 상기 항 CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 다른 예는 상기 항 CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 유효성분으로 포함하는 암줄기세포 저해용 약학 조성물을 제공한다. 다른 예는 상기 항 CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다. 다른 예는 상기 항 CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암줄기세포 저해 방법을 제공한다. 상기 약학적 유효량은 상기 투여 대상에서 소망하는

항암효과, 예컨대 치료적 효과 (예컨대, 암세포 사멸률 증가, 암 조직 감소, 암전이 억제 등)를 얻기에 효과적인 양을 의미한다. 상기 약학 조성물 및 방법에 있어서, 상기 항 CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 단독 또는 세포독성 물질과 접합된 접합체 형태로 사용될 수 있다. 세포독성물질은 앞서 설명된 바와 같다.

상기 암은 CD43, 구체적으로 앞서 설명한 CD43의 항원결정부위를 발현하는 모든 암일 수 있다. 일 예에서, 상기 암은 혈액암(hematopoietic malignancy)일 수 있으며, 예컨대, 급성골수구성백혈병(acute myeloid leukemia), 급성림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia), 급성단구성백혈병(acute monocytic leukemia), 호지킨림프종(Hodgkin's lymphoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 다른 예에서, 상기 암은 후술하는 고형암들 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

상기 항체 또는 항원결합단편은 세포 표면에 CD43, 특히 앞서 설명한 CD43의 항원결정부위를 발현하는 종양 세포 상의 CD43 또는 CD43 항원결정부위에 결합하기에 충분한 양으로 투여 될 수 있으며, 그 양은 관련 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 곤란함 없이 결정될 수 있다.

상기 언급된 약학적 유효량 또는 충분한 양은 투여 대상에서 기대되는 효과를 제공하기 위한 양을 의미한다. 기대되는 효과는 세포표면에 발현되는 CD43 (또는 CD43의 항원결정부위)에 대한 항체의 결합을 수반할 것이고 상기 결합은 항체, 항원결합단편 또는 상기 항체 또는 단편에 접합된 세포독성 물질을 통한 세포독성(예컨대, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) 또는 complement-dependent cytotoxicity (CDC))의 발휘일 수 있다. 다른 예에서, 상기 기대되는 효과는 세포독성이 적거나 없는 세포의 표면에서 발현되는 CD43에 대한 항체의 결합을 이끌어 내고, 이에 의하여 상기된 결합은 CD43+ 세포 그리고 환자로부터 상기 CD43+세포 (예컨대, 항체 또는 단편은 검출 가능한 마커로 표지되어 있는 곳) 검출 하고 선택적으로 제거 (예컨대, 백혈구분리반출법) 하기 위해 숙련된 수취인이 수행 할 수 있을 것이다. 요구되는 항체 분자의 양은 환자에서 환자, 인종, 나이 그리고 환자의 일반적인 상태, 특정화합물의 투여, 투여의 방법등에 의존으로부터 달라질 수 있을 것이다. 따라서 그것은 “정확한

충분량"을 지정하는 것이 가능하지 않을 수 있다. 그러나 임의의 개별적인 경우에서 적당한 양은 규칙적인 실험을 이용하여 한가지의 일상적 기술에 의해 결정 될 수 있다. 용량은 또한 상황의 위급성에 맞게 조정될 수 있고 최적의 투여량을 도출해 낼 수 있도록 조정할 수 있다. 예를 들면 몇몇 용량은 매일, 매주, 매달 또는 다른 적정한 시간 간격으로 제공될 수 있다.

상기 언급된 약학적 유효량 또는 충분한 양은 항체 또는 이의 항원결합단편이 투여되었거나 투여 예정인 환자로부터 얻어진 생물학적 샘플 (예컨대, 체액 샘플 (예컨대, 혈액 샘플 등), 세포/조직 샘플 (예컨대 종양 세포/조직 샘플 등) 등)에서 세포에 항체가 결합하는 것을 모니터링 함으로써 결정될 수 있다. 상기 생물학적 샘플은 항체 또는 단편의 투여 후 특정시간(예컨대, 투여 후 약 5, 10, 5 또는 20분)에 환자로부터 취할 수 있다. 관련 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 샘플 내 세포표면상의 항체 또는 단편의 존재 (즉, 세포 표면의 CD43 또는 이의 항원결정부위와 항원-항체 반응에 의하여 결합한 항체 또는 이의 항원결합단편)에 대해 분석할 수 있다. 또는, 상기 얻어진 생물학적 샘플은 샘플 내 살아있는 세포의 생존률 또는 수를 측정하기 위한 통상적 분석에 사용될 수 있다. 항체 또는 단편의 투여 후 CD43-양성세포의 수가 감소한다는 사실 (예컨대, 항체 또는 단편을 투여하기 전 얻은 샘플 등과 같은 대조군 샘플과 비교했을 때 항체 또는 단편을 투여한 샘플 내 살아 있는 세포의 수 감소)에 기반하여, 항체 매개 세포독성을 측정할 수 있다. 상기 세포독성은 항체 단독 (예컨대, 세포독성 물질과 접합하지 않은 비-접합 항체 또는 이의 항원결합단편)에 의해 매개 되거나 및/또는 항체 또는 단편에 접합된 세포독성 물질에 매개 될 수 있다.

본 명세서에서 제공된 CD43 항원결정부위에 특이적으로 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 투여된 환자의 샘플에서의 표적 CD43-양성 세포의 수준을 대조군 샘플 (예컨대, 항체 또는 단편의 투여 전 환자로부터 얻은 샘플)의 CD43-양성세포의 수준과 비교하여 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상 감소 시킬 수 있다. 일 예에서, CD43 양성세포는 암세포, 예컨대, 악성조혈세포 (예컨대, 백혈병 세포), 및/또는 암줄기세포일 수 있다.

다른 예에서, 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 투여량 (약학적 유효량)은 체외 세포 기반 독성 실험 (in vitro cell-based assay)을 통해 추정하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체 또는 단편의 표적인 CD43 양성 세포의 수를 줄이기 위한 항체 또는 단편의 농도를 결정하기 위하여, CD43 양성 세포 (예, CEM7 세포주)를 이용한 체외 세포 기반 실험을 수행할 수 있다. 시험관 내 (in vitro)에서의 세포의 수를 감소 (예컨대, 상기 항체 또는 단편의 부재 시 세포 수와 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 감소) 시키기 위해 결정되는 항체 또는 단편의 농도는 생체 내 실험 (in vivo) 에서 필요로 하는 CD43 양성 세포수를 감소시키기에 충분한 투여량을 결정하는 근거로 채택될 수 있다. 이 외에도, 상기 투여량은 환자의 체중, 혈액량, 클리어런스 율 (clearance rate) 등과 같은 요소들을 고려하여 결정될 수 있다.

본 명세서에 사용된 용어 "대상 또는 환자 (subject)"는 인간, 고릴라, 침팬치 등의 포유류를 포함한 동물들 중에서 선택되거나, 상기 동물로부터 분리된 세포, 조직, 체액 또는 이의 배양물일 수 있다. 상기 포유류는 인간을 포함할 수 있다. 본 명세서에 제공된 발명은 사람 또는 수의학 분야에서 CD43 양성세포의 특이적 표적화를 위하여 응용이 가능하며, 이는 관련 기술분야의 당업자들이 명확하게 이해할 수 있는 내용이다. 통상적으로 "동물"은 사람, 원숭이 등의 영장류뿐 아니라, 소, 말, 양, 돼지, 낙타, 염소, 당나귀, 개, 고양이 등의 가축과 반려동물, 및 마우스, 래트 등의 실험용 동물을 통칭하기 위하여 사용될 수 있다. 말의 경우 오락 또는 가축 산업에 사용되는 말 뿐 아니라 경주용 산업에 이용되는 말도 포함될 수 있다.

필요에 따라, 본 명세서에서 제공되는 방법은 제2의 치료 수단 (예컨대, 치료제)을 수행하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 방법은 다른 화학요법 화합물 (제2 유효성분)을 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 제2 유효성분의 투여는 본 명세서에서 제공되는 항체 또는 이의 항원결합단편의 투여와 동시에 수행되거나, 순서에 상관없이 (항체 등 투여 전 또는 후) 순차적으로 수행될 수 있다.

또 다른 측면에서, 본 명세서에서 제공되는 항 CD43항체 또는 이의 항원결합단편의 암 치료; 항암제 제조; 암줄기세포 저해; 및/또는 암줄기세포

저해제 제조를 위한 용도가 제공된다.

본 명세서에 기재된 약학 조성물, 방법, 및 용도에 있어서, 상기 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있으며, 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다. 일 예에서, 상기 암은 조혈성 악성종양 (hematopoietic malignancy)일 수 있다. 상기 조혈성 악성종양은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 또는 호치킨 림프종일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 혈액암은 암줄기세포를 포함하는 암일 수 있다.

다른 예에서, 상기 암은 고형암일 수 있다. 상기 고형암은 폐암 (예컨대, 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암), 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 위장암, 위암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 담낭암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁암, 자궁내막암, 자궁경부암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 골육종 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 상기 고형암은 위암, 유방암, 폐암, 대장암, 간암, 담낭암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 난소암, 자궁경부암, 전립선암, 또는 방광암일 수 있다. 상기 암은 원발성 암뿐 아니라 전이성 암도 포함한다. 또한 상기 고형암은 기존의 항암제 (e.g., 소분자 항암제 (anticancer chemical), 항대사제, 알킬화제, 항생제, 비카알카로이드, 효소, 호르몬제, 표적치료제, 및/또는 항체 치료제 등)에 대하여 저항성을 갖는 암일 수 있고, 기존의 항암제 (e.g., 소분자 항암제 (anticancer chemical), 항대사제, 알킬화제, 항생제, 비카알카로이드, 효소, 호르몬제, 표적치료제, 및/또는 항체 치료제 등) 치료 후 재발한 암일 수 있다. 상기 고형암은 암줄기세포를 포함하는 암일 수 있다.

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

본 명세서에서 제공되는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 경구 또는 비경구적 경로로 투여될 수 있다. 예컨대,

적절한 투여 경로의 예로서 정맥, 동맥, 근육 내 주사 또는 주입 등이 있으며, 일 예에서 정맥 주사로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

일 예에서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 단독 또는 제2 치료 화합물 (예, 화학치료 화합물)과 함께 투여되기 위한 형태로 제형화될 수 있다.

또 다른 측면에서, 본 명세서에 제공된 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 및 부형제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 일 예에서, 상기 약학 조성물에 포함된 항체는 세포 독성물질이 연결 또는 접합된 형태인 것을 포함된다. 적절한 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 및 부형제는 관련 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있는 사항이며, 그 예로서, 식염수, 용제 (예컨대, 주사용제), 분산매(dispersion media), 항진균성 및/또는 항균성 제제, 계면활성제, 등장성 제제, 흡수성 제제 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

일 예에서, 상기 약학 조성물은 다양한 용량 단위 형태의 주사가 가능한 제제 등과 같은 다양한 형태의 제제로 제제화 될 수 있다.

상기 약학 조성물의 제형과 후속 투여는 관련 기술분야의 통상의 기술에 따를 수 있다. 투약은 치료에 대한 대상의 상태, 약물 반응성 등에 의존하나, 바람직한 효과가 계속된다면 지속되는 것이 바람직하다. 상기 약학 조성물의 투여량, 투여 방법 그리고 반복빈도를 투여 대상의 연령, 성별, 병적 상태, 약물 반응성 등을 고려하여 결정될 수 있으며, 이는 관련 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확한 사항이다.

또 다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 생산방법을 제공한다. 상기 제조 방법은 상기 핵산 분자를 숙주세포에서 발현시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 발현시키는 단계는 상기 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있으며, 임의로, 상기 얻어진 세포 배양물로부터 항체를 분리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

일 구체예에서, 상기 제조 방법은,

상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 암호화하는 핵산 분자 또는

이를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 세포를 상기 핵산 분자의 충분한 발현을 위한 조건 및/또는 기간에서 배양하는 단계; 및

상기 배양된 세포 또는 얻어진 배양물로부터 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 분리 및/또는 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

상기 재조합 세포는 숙주세포를 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 암호화하는 핵산 분자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환시켜 얻어진 것일 수 있다.

다른 예는 상기 분리 및/또는 정제하는 단계로부터 얻어진 정제된 항-CD43 항체 또는 항원결합단편을 제공한다. 상기 얻어진 항체 또는 항원결합단편은 세포에서 발현 또는 세포 외로 분비시 연결되어 있던 다른 성분들로부터 분리된 재조합 분자일 수 있다. 일 예에서, 상기 분리 및/또는 정제된 항체 또는 항원결합단편은 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 순도를 갖는 것일 수 있다. 관련 기술분야의 당업자는 분리 및/또는 정제 정도는 항체 또는 항원결합단편의 사용목적 및/또는 사용형태에 의존함을 명확하게 이해할 것이다. 예컨대, 동물, 특히 인간의 체내에 투여를 목적으로 하는 경우에 상기 항체 또는 항원결합단편의 정제 순도는 비교적 높은 수준이 요구될 것이며, 체외 실험에 사용되는 경우 허용 가능한 불순물 (예컨대, 숙주세포 및/또는 배양물 유래의 성분 (단백질 등) 등)이 포함될 수 있다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 일 구체예에서, 상기 핵산 분자는 상기 항체 또는 항원결합단편의 중쇄가변부위(VH binding domain)를 암호화하는 핵산 분자, 경쇄가변부위(VL binding domain)를 암호화하는 핵산분자, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 중쇄가변부위를 암호화하는 핵산 분자는 SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 및 29로 이루어진 군에서 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 상기 경쇄가변부위를 암호화하는 핵산 분자는 SEQ ID NOs: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 및 31로 이루어진 군에서 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

상기 핵산 분자는 적절한 발현 벡터에 포함될 수 있다. 상기 발현 벡터는 숙주세포에서 외래유전자를 발현시키기 위하여 통상적으로 사용되는 모든 벡터일 수 있으며, 예컨대 pTT5, pAPEX3p, pcDNA3.2(-) 등으로 예시될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 암호화하는 핵산 분자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터 (또는 발현 벡터)를 포함하는 재조합 세포를 제공한다. 상기 재조합 세포는 상기 핵산 분자 또는 재조합 벡터를 숙주세포에 도입시켜서 얻어진 것으로, 상기 핵산 분자를 발현시킬 수 있는 세포이다. 상기 숙주세포의 예로서, 원핵세포 (예, *E. Coli* 등) 또는 원생세포, 동물세포 (예, CHO, COS, HEK-293E, HEK-293T 세포, 이들의 특정 유전자 변형 (예컨대, 결실) 세포, 등), 식물세포, 진균세포 (예, *Saccharomyces cerevisiae* 등) 곤충세포 (예, Sf9 세포 등)와 같은 진핵세포를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 모든 세포들 중에서 선택될 수 있다.

다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 세포 시료에 접촉시키는 단계 및 상기 시료 내의 항원-항체 결합 여부를 확인하는 단계를 포함하는, CD43 검출 방법 또는 CD43 양성 세포의 검출 방법을 제공한다. 상기 방법에 의하면 상기 세포 시료 내에 포함된 세포 표면에서의 CD43의 발현 여부를 확인할 수 있으며, 따라서, 상기 방법은 CD43의 발현과 관련된 질병의 진단에 적용될 수 있다. 따라서, 다른 예는 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 세포 시료에 접촉시키는 단계 및 상기 시료 내의 항원-항체 결합 여부를 확인하는 단계를 포함하는, CD43 관련 질병의 진단 방법 또는 CD43 관련 질병의 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 CD43 관련 질병은 CD43의 검출 또는 CD43의 증가와 관련된 질병으로, 암일 수 있으며, 상기 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있고, 특히 CD43의 증가와 관련된 조혈성 악성종양 (예컨대, 급성림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병)일 수 있다. 다른 구체예에서, CD43 관련 질병은 암줄기세포를 포함하는 암일 수 있다.

상기 방법에 있어서, 항원-항체 결합은 상기 항체 (또는 이의 항원결합단편)과 CD43 단백질 간의 복합체 형성 여부를 검출함으로써 확인할 수 있다 (즉, 상기 항체-CD43 단백질 복합체 형성이 검출되면 항원-항체 결합이

존재하는 것으로 확인함). 이 때, 상대적인 비교를 위하여, 대조 세포 시료에 대하여 동일한 시험을 수행하여 시험 세포 시료로부터 얻어진 결과와 비교할 수 있다. 상기 대조 세포 시료는 잘 알려진 CD43 음성 세포, 또는 정상 세포 (non-cancer or non-tumor cells)들 중에서 선택된 것일 수 있다.

일 예에서, 상기 검출 방법 또는 진단 방법은,

(1) 시험 세포 시료 및 대조 세포 시료에 상기 항체 또는 이의 항원결합단편을 각각 접촉시키는 단계; 및

(2) 상기 항체 또는 항원결합단편과 상기 세포 간의 복합체 형성 여부 또는 수준을 측정하는 단계

를 포함할 수 있다. 이 때, 시험 세포 시료에서의 복합체의 존재 또는 대조 세포 시료와 비교하여 상대적으로 높은 복합체 수준이 측정되는 경우, 상기 시험 세포 시료 내 CD43이 존재함 또는 상기 세포가 CD43을 발현하는 세포(즉, CD43 양성세포)임을 확인할 수 있다. 상기 세포 시료는 생체로부터 분리된 것일 수 있고, 상기 방법은 *in vitro*에서 수행되는 것일 수 있다.

다른 예는 상기 항 CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 포함하는 CD43 검출 또는 가시화 (이미징)를 위한 조성물을 제공한다. 또 다른 예는 상기 항 CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 사용하는 CD43 검출 또는 가시화 (이미징) 방법을 제공한다. 상기 조성물 및 방법은 생체외(*in vitro*)뿐 아니라 생체내(*in vivo*)에서의 CD43 검출 및/또는 가시화에 적용될 수 있다. 상기 조성물 및 방법에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원결합단편은 검출 가능한 표지와 접합된 형태일 수 있으며, 예컨대 상기 검출 가능한 표지는 방사선표지 (예컨대, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm 등), 효소, 형광표지, 발광표지, 생물발광표지, 자성표지, 바이오틴 같은 화학적 물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 관련 기술분야에 명확하게 알려진 통상적인 검출 수단에 의하여 검출 가능한 모든 표지일 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 상기과 같은 생체외 및/또는 생체내에서의 CD43 검출 및/또는 가시화는 CD43 양성세포수의 증가와 관련된 질병, 예컨대, 암, 보다 구체적으로 암줄세포를 포함하는 암 또는 조혈성 악성종양의 진단에 사용될 수 있다.

상기 CD43 검출 및/또는 가시화 방법 (*in vivo*)은 다음을 포함할 수 있다:

(i) 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 시험 대상에게 투여하는 단계; 및

(ii) 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 복합체 형성 여부 또는 복합체 형성 정도 (수준)을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

상기 복합체는 상기 항체 또는 이의 항원결합단편과 시험 대상의 체내의 세포 표면에 발현된 CD43과의 복합체 또는 CD43을 발현하는 세포 (CD43 양성 세포) 사이의 항원-항체 결합에 의하여 형성된 복합체일 수 있다. 상기 항체 또는 이의 항원결합단편은 앞서 설명한 바와 같은 검출 가능한 표지 (특히, 생체 적합성 표지)와 접합된 형태로 사용될 수 있다. 상기 가시화 방법은 CD43 발현을 특징으로 하는 세포, 예컨대 암줄기세포의 가시화에 적용될 수 있다.

상기 투여 대상에서의 항체 또는 항원결합단편의 복합체 형성 여부 또는 형성 정도는 대조 대상 (예컨대, CD43 관련 질병을 갖지 않는 대상 또는 CD43 (과)발현 세포를 포함하지 않는 대상)에서의 합체 형성 여부 또는 형성 정도와 비교하여 상대적으로 평가될 수 있다. 이와 같은 비교를 위하여, 상기 방법은

(i-1) 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 시험 대상 및 대조 대상에게 각각 투여하는 단계;

(ii-1) 상기 시험 대상 및 대조 대상에서의 항체 또는 이의 항원결합단편의 복합체 형성 여부 또는 복합체 형성 정도 (수준)을 각각 측정하는 단계; 및

(iii) 시험 대상에서 측정된 결과를 대조 대상에서의 결과와 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

상기 방법은 시험 대상의 CD43 관련 질병의 진단 또는 CD43의 발현을 특징으로 하는 암줄기세포의 확인 (검출)에 적용될 수 있다. 이 경우, 상기 단계 (ii) 또는 (ii-1)에서 복합체 형성 또는 대조 대상과 비교하여 복합체 형성 수준의 증가가 측정되는 경우, 상기 시험 대상을 CD43 관련 질병 환자로서 판단하거나 상기 시험 대상이 암줄기세포를 갖는 것으로 판단할 수 있다.

생체 내 또는 생체 외 항원(또는 항원을 표면에 발현하는 세포)-항체 복합체의 형성은 관련 기술분야의 통상의 수단에 의하여 측정될 수 있으며, 이러한 통상적인 수단은 관련 기술분야의 당업자에게 명확한 내용이다. 예컨대,

상기 복합체는 항체 또는 항원결합단편을 적절한 검출 가능한 표지로 표지하고 상기 표지의 신호를 측정하거나 적절한 검출 방법에 의하여 확인할 수 있다. 상기 적절한 검출 방법은 관련 기술분야의 통상적인 모든 방법일 수 있으며, 에컨대, ELISA, 유세포측정 (Flow activated cytometry system; FACS), 면역조직화학염색 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

관련 기술분야의 통상의 전문가라면 본 명세서에 기재된 발명이 설명된 사항 이외의 변형 및/또는 수정의 여지가 있음을 명확하게 이해할 수 있다. 본 명세서에 제공된 발명은 기재된 사상 및/또는 범위 내에서 모든 변형 및/또는 수정을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한 본 명세서에 제공된 발명은 본 명세서에 명시되거나 참조된 모든 단계, 특징, 조성물 및/또는 화합물을 각각 또는 종합적으로 포함할 수 있다.

특정 구체예를 다음의 실시예를 참조하여 설명할 것이나, 이들 실시예는 예시만의 목적을 위해 설계 되었으며, 앞서 언급된 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

이해 하는 바와 같이, 본 발명에서의 개발하고 기술된 염기서열은 예를 들면 친화도 성숙이나 MHC class 2의 결합력의 모티브를 예측하고 제거하여 면역원성을 감소하여 결합력을 증가시키는 이 기술 분야 잘 알려진 방법으로 수정되었다. 이 문서에서 개발하고 기술한 염기서열의 치료제의 유용성은 항체 의존적 세포매개독성(ADCC), 보체 의존성 세포상해작용(CDC), 혈청 반감기, 생물분류, Fc 수용체 결합력 또는 이 작용들의 조합에 의한 기능적 특성을 조절함으로써 향상 될 수 있다. 이러한 변형은 단백질 공학, 당쇄 공학 또는 화학적 방법에 의해 수행 할 수 있습니다. 요구된 치료제의 적용에 따라, 이러한 활동의 증가 또는 감소는 유리하게 될 수 있다.

항체의 친화도 성숙에 대한 수 많은 방법은 업계에서 알고 있다. 이들의 대부분은 친화력을 증가시키기 위하여 돌연변이 패널 또는 변형 단백질의 라이브러리 생성하고 스크리닝 및 선택하는 일반적인 전략에 기초를 두고 있다. 돌연변이는 유발은 예를 들면 PCR 오류 유발과 유전자 셔플링, 돌연변이 유발 물질인 방사선 또는 화학물질을 사용, 오류가 발생하기 쉬운 복제 기계를 이용하여 돌연변이 유전자 종류를 사용, 자연 친화도 성숙 기계를 활용하여

체세포초돌연변이의 접근에 의하여 DNA 수준에서 종종 일어난다. 또, 돌연변이 유발은 레플리카아제를 사용하여 RNA 수준에서도 일어난다. 개선된 변형 단백질에 의한 라이브러리를 기초한 스크리닝 방법은 파지, 효모, 리보솜, 박테리아 또는 포유동물 세포와 같은 다양한 디스플레이 기술에 기초되어 있고, 업계에 잘 알려져 있다. 친화도 성숙은 3D 단백질에서 발견된 부위 특위적 변이 또는 유전자 합성의 의하여 명확하고 예측이 가능해 졌다. ADCC 또는 CDC 증가시키는 방법은 업계에 숙련된 기술자들에게 알려져 있다.

항체의 혈청 반감기 및 생체 분포도를 변조하는 다수의 방법은 항체 및 신생아 Fc 수용체, 이화작용으로부터 IgG의 보호에 중요한 역할의 수용체의 상호작용을 바꾸고, 높은 혈청 항체 농도 유지를 시킨다. 예를 들어 U.S. Pat. Nos 6,277,375; 6,821,505; 7,083,784, U.S. Pat. No 7,217,797 와 WO 2000/42072의 특허를 참조할 수 있다. Fc 수용체와 이들의 수용체에 매개 기능의 결합력을 조절하는 불변 영역의 아미노산 치환의 다른 예는, FcRn에 결합력과 혈청 반감기를 포함하고, 특허에 U.S. Pat. Application Nos 20090142340; 20090068175; 와 20090092599; 에 설명되어 있다.

항체 분자에 연결되어 있는 당쇄는 Fc 수용체와 당쇄 수용체의 상호작용에 영향을 미쳐 혈청반감기를 포함한 항체의 활성화에 영향을 준다. 따라서, 항체의 활성을 조절하는 당쇄 형태는 치료제의 유리한 점을 부여할 수 있다. 조작된 당쇄 형태를 생성하는 방법은 업계에 잘 알려져 있지만, U.S. Pat. Nos 6,602,684; 7,326,681; 7,388,081; and WO 2008/006554. 기재되어 있는 것에 한정되어 있지는 않다.

폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 첨가하여 반감기를 연장하는 방법은 단백질의 혈청 반감기를 연장하는 데 사용하고 있다.

본 명세서에 사용된 바로서, "서열 상동성" 또는 "% 동일성"은 두 개의 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열 간 동일한 순서로 배열된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 개수의 전체 뉴클레오타이드 또는 아미노산 개수에 대한 비율을 나타낸다.

어느 한 폴리펩타이드에 대한 다른 폴리펩타이드의 %동일성은 공백의 생성에 대한 불이익 =5와 공백의 증가에 대한 불이익=0.3인 GAP 분석법에 의해

결정될 수 있다. 퀴리염기서열은 길이가 적어도 50개 아미노산 이며, GAP 분석은 적어도 50개의 아미노산의 영역에 두 염기서열의 영역을 맞춘다. 더 바람직하게는, 퀴리 염기서열의 길이는 적어도 100개 아미노산이며, GAP 분석법은 적어도 100개의 아미노산의 영역 위에 두 염기서열의 영역을 맞춘다. 더 바람직하게는, 퀴리 염기서열의 길이는 적어도 100개 아미노산이며, GAP 분석법은 적어도 100개의 아미노산의 영역 위에 두 염기서열의 영역을 맞춘다. 보다 더 바람직하게는 퀴리 염기서열의 길이는 적어도 250개 아미노산으로, GAP 분석법은 적어도 250개 아미노산 영역 위에 두 염기서열을 정렬한다. 보다 더 바람직하게는 퀴리 염기서열의 길이는 적어도 250개 아미노산으로, GAP 분석법은 적어도 250개 아미노산 영역 위에 두 염기서열을 정렬한다. 가장 바람직하게는 논의가 되고 있는 두 폴리펩타이드의 전체 길이의 아미노산 염기서열을 정렬하는 것이다.

동정된 폴리펩타이드에 대하여, %동일성이 높을수록 바람직함은 용이하게 이해될 것이다. 따라서, 적용이 가능하다면, 최소한 %동일성 수치에 비추어 폴리펩타이드는 바람직하게 적어도 95%이상, 더 바람직하게는 적어도 97%, 좀 더 바람직하게는 적어도 98%이상, 더욱 바람직하게는 적어도 99%이상, 더욱 바람직하게는 99.1%이상, 더욱 바람직하게는 99.2% 이상, 더욱 바람직하게는 99.3%이상, 더욱 바람직하게는 99.4% 이상, 더욱 바람직하게는 99.5% 이상, 더욱 바람직하게는 99.6% 이상, 더욱 바람직하게는 99.7%, 더욱 바람직하게는 99.8%, 조금 더 더욱 바람직하게는 99.9% 의 아미노산 서열의 동일성은 SEQ ID NO과 연관된 아미노산 서열을 포함하고 있는 것이 바람직하다.

본 명세서에서의 폴리펩타이드의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열 변이는 화학적 또는 방사선 처리에 의해 생체 내에서 핵산의 돌연변이에 의해 뉴클레오타이드의 변화를 통해 도입되어 생성된 것일 수 있다. 이러한 돌연변이의 예는 결실, 삽입 또는 아미노산 서열의 잔기의 치환을 포함한다. 1988 Harayama에 의해 설명되는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 서플링 기술에 속해 있고 또한 시험관 내에 다른 방법은 인코딩 폴리펩타이드 변형으로부터 폴리 뉴클레오타이드를 생성한다. 이러한 DNA 서플링 기술은 밀 이외의 식물 종으로부터 Rht-B1과 같은 본 발명과 관련된 유전자 서열을 사용할 수 있다. 돌연변이/ 변형 DNA로부터 얻어진 생산품은 예를 들어 과증식 표현형을 가지고

있는지 확인하기 위해 본 문서에서 기술된 기법을 사용하여 스크리닝을 할 수 있다.

예컨대, 아미노산 서열의 결실은 일반적으로 대략 1~15개의 아미노산 잔기의 범위, 예컨대 1~10개의 아미노산 잔기 또는 연속하는 1~5개의 아미노산 잔기의 결실을 포함할 수 있다.

예컨대, 아미노산 서열의 치환은 폴리펩타이드 내의 아미노산 잔기들 중에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실되고 그 자리에 원래 아미노산 잔기와 상이한 하나 이상의 아미노산 잔기가 삽입된 것을 포함할 수 있다.

본 명세서에 사용된 바로서, "포함하다 (comprise, comprises, 또는 comprising)"은 기재된 성분, 단계, 수치 등을 포함하는 개방형 의미로 사용될 수 있으며, 이를 제외한 성분, 단계, 수치 등을 배제하기 위한 의도로 해석되지 않으며, 경우에 따라서, "consisting essentially of"를 의미하는 것이 배제되지 않을 수 있다.

본 명세서에서 언급된 모든 문헌은 참조로서 본 명세서에 포함된다.

【발명의 효과】

본 발명은 혈액암 또는 고형암 세포뿐 아니라 암줄기세포까지 치료 가능한 항체 및 상기 항체가 인지하는 항원결정부위 및 이를 인지하는 항체 또는 이의 항원결합단편을 제공함으로써, 암의 보다 강력하고 근본적인 치료가 가능하고, 효과적인 암 치료제의 개발에 기여할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 사람 위암 세포주 NCI-N87(좌)과 AGS(우)에서의 CD43의 발현을 immunostaining법으로 확인한 결과이다 (X축: CD43 발현율, Y축: Reading cell numbers).

도 2a-2c는 다양한 고형암 세포주에서의 CD43의 발현을 immunostaining법으로 확인한 결과이다 (2a: 위암 세포주; 2b: 대장암 세포주; 2c: 간암 세포주).

도 3은 사람 위암 세포주 NCI-N87, SNU-719, AGS에 대한 (항-CD43

항체)-MMAE 접합체의 세포독성을 확인한 결과이다.

도 4는 사람 위암 세포주 NCI-N87, SNU-719, AGS에 대한 (항-CD43 항체)-DM1 접합체의 세포독성을 확인한 결과이다.

도 5는 사람 위암 세포주 NCI-N87, AGS에 대한 (항-CD43 항체)-Duocarmycin 접합체의 세포독성을 확인한 결과이다.

도 6은 사람 위암 세포주 이식된 위암 동물 모델에서의 항-CD43 항체 단독 및 항-CD43 항체-Duocarmycin 접합체의 항암 효과를 확인 한 결과이다.

도 7은 사람 기원의 다양한 고형암 조직에서 CD43 항원결정부위의 발현을 immunohistochemistry법으로 확인 한 결과이다 (M; medulla(수질), C; cortex(피질)).

도 8은 사람 기원의 다양한 고형암의 질환별 CD43 항원결정부위의 발현을 immunohistochemistry법으로 확인 한 결과이다 (A; signet ring cell 위암 (Stomach signet ring cell carcinoma), B; 유방관 침윤 선암 (Breast infiltrating duct adenocarcinoma), C; 췌장암(Pancreas adenocarcinoma), D; 신장암(Kidney renal cell carcinoma), E; 폐암(lung Adenocarcinoma), F; 편평세포암(Larynx squamous cell carcinoma), G; 방광암(Gall bladder carcinoma), H; 자궁편평세포암(Cervix squamous cell carcinoma), I; 자궁경부편평세포암(Uterus squamous cell carcinoma), J; 방광암(Urinary bladder cancer), K; 폐편평세포암(Lung squamous cell carcinoma), L; 과립성육종(Ear granulocytic sarcoma)).

도 9는 사람의 위암 세포주 NCI-N87의 암 줄기 세포에서 CD43, CD44, 및 CD133의 발현을 immunostaining법으로 확인 한 결과이다.

도 10은 가슴샘 조직을 항-CD43 단클론 항체(YG5)으로 면역조직화학염색한 결과이다.

도 11는 가슴샘세포에 대한 항-CD43 단클론 항체(YG5)의 반응성을 측정한 유세포 측정 그래프이다.

도 12는 11종의 CD43 결손형돌연변이(deletion mutant)를 도식적으로 나타낸 그림이다.

도 13는 11종의 CD43 결손형돌연변이에 대한 항-CD43(EB-1) 단클론 항체의 반응성을 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 14는 항-CD43 항체의 중쇄 및 경쇄 발현 플라스미드 제작 과정을

예시적으로 보여주는 모식도이다.

도 15는 정상 혈액세포에 뉴라미니데이즈 처리 후, 항-CD43 항체의 CD43 epitope에 대한 결합력을 보여주는 그래프이다.

도 16은 항-CD43 항체들의 재조합 CEACAM5와 CEACAM6에 대한 교차 반응성을 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 17은 종양 줄기 세포(tumor sphere)에서의 CD43 epitope의 발현 정도를 보여주는 그래프이다.

도 18은 CEM7 또는 CCRF-CEM 세포(낮은 CD43 항원결정부위 발현)에 대한 항-CD43 항체의 세포독성을 보여주는 그래프로서, 항-CD43 항체가 직접적인 세포독성이 없음을 보여준다.

도 19는 독소(saporin)가 접착된 항-JL-1 항체 (saporin 접합 항-JL-1항체)를 처리한 목적 세포의 생존률을 보여주는 그래프로서, saporin 접합 항-JL-1항체에 의하여 세포자멸사가 일어남을 보여준다.

도 20은 도 19에서 설명한 세포 사멸 시험에서 항-JL-1항체 (항-CD43 항체)(설치류, 인간항체 모두)의 internalization 현상을 보여주는 그래프로서, 마우스 JL-1 항체를 30분 동안 냉장상태에서 세포에 처리한 뒤 37°C 조건으로 옮긴 후, 그래프의 x축에 표시된 각각의 시간 때에 10^6 세포를 취하여 냉장온도에서 anti-mouse IgG-PE 이차항체를 10분간 처리하고, 세포를 세척하고 고정한 뒤, 유세포분석기로 분석하여 얻어진 결과이다.

도 21은 항원을 발현하는 세포에서 항-JL-1 항체에 의하여 유도되는 동종 세포응집 현상을 보여주는 이미지로, 각각 300,000개 세포에 항-JL-1 항체 40 ug/mL 시작 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양한 후, 정해진 시간에 따라 현미경 사진을 찍어서 이미지를 얻었으며, 본 도면은 항체 처리 2시간 경과시점에 얻어진 이미지이다.

도 22는 정상 골수 세포에서의 낮고 이질적인 JL-1 항원 발현을 보여주는 결과로서, 정상 골수의 단핵구를 mouse anti-JL1으로 염색한 후, 뒤를 이어 Goat-anti-mouse IgG F(ab)₂-PE로 염색하여 관찰하였으며, Histogram overlay는 림프구로 국한하여 표현한 것이다.

도 23은 말초혈액세포에서의 JL-1 항원의 발현율을 보여주는 것으로, 낮은

발현율을 확인할 수 있으며, 상기 결과는 두 개의 정상 인간 PBMC 샘플을 마우스 항-인간 JL-1(파란색선: (d))으로 염색하여 측정하였다.

도 24는 정상 골수세포에 saporin을 결합시킨 항-JL-1 항체를 미리 처리한 경우 (JL1+)와 미리 처리하지 않은 경우 (JL1-)의 골수하위집합(subset)의 콜로니 형성 정도를 측정한 결과를 보여주는 그래프로서, saporin을 결합시킨 항-JL-1 항체를 미리 처리한 경우 (JL1+)에 골수하위집합(subset)의 콜로니를 형성하지 않은 것을 확인할 수 있으며, 상기 결과는 골수를 분리하고 백혈구를 수확하고, CD34+ 세포는 JL-1양성과 음성으로 나누어 분리수확하고, 수확한 세포를 cytokine과 함께 Methocult에 넣어준 후 측정하였다.

도 25는 세포주를 이용한 백혈병 ALL 이종이식모델에서 항-JL1항체 자체와 결합된 독소와 항-JL1항체의 치료 효과를 보여주는 그래프로서, (A)는 CEM7 leukemia model에서의 결과를, (B)는 NALM-6 model (Cell line: NALM6 (B-ALL))에서의 결과를 각각 보여주며, 시험은 다음의 조건 하에서 수행하였다: Mice: NOD-SCID (8/group); 접종: 0일차 10^7 cells; 투여: 15ug/injection + 100ug bulk IgG i.v. 1x/week starting day 8; 종료시점: 마비상태.

도 26은 주요 AML blast와 하위 집합물(subset)에서의 JL-1의 발현 정도를 보여준다.

도 27는 키메라 인간화 JL1에 의한 세포 사멸효과(ADCC and CDC)를 보여주는 그래프로서, A는 CEM7 세포주를 효과기 세포(PBMC)와 JL1키메라 항체 또는 대조군과 동안 배양한 후, 세포독성을 Cell Titer Glo를 사용하여 측정한 결과이며, B는 CEM7 세포주를 배양배지와 JL1키메라 항체를 토끼 보체와 함께 배양한 후, 세포독성을 Cell Titer Glo를 사용하여 측정한 결과이다. 이 때, 대조군은 실험과 무관한 IgG1 이소 타입 항체를 사용하였다.

도 28은 탈푸코실화 되었을 때 JL-1키메라 항체의 ADCC 활성이 증가함을 보이는 결과이다.

도 29는 in vivo에서 아무것도 결합하지 않은 키메라 항체 자체의 CEM7 세포주에서의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 30은 백혈병 줄기세포(Leukemia stem cell; LSC) 하위집합(subset)에서 JL1의 발현을 보여주는 결과이다.

도 31은 in vitro에서 독소(사포린: SAP)와 접합한 항-JL1 항체(CCC)를 이용한 콜로니 분석 결과 (콜로니 평균 개수)를 보여주는 그래프로서, 항원-양성 AML의 세포사멸효과를 보여주며, 세포는 JL1-사포린 또는 마우스IgG1-사포린과 함께 줄기세포 콜로니 matrix에 넣어주어 관찰하였다.

도 32는 in vitro에서 독소(사포린: SAP)를 접합시킨 항-JL1 항체(CCC)가 항원양성인 주요 AML의 증식에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 33은 NSG 마우스에서 독소가 결합된 항체에 의한 주요 AML 암세포 성장의 억제 효과 (in vivo)를 보여주는 그래프로서, JL-1+ AML 환자로부터 5×10^7 개의 골수세포를 수확하고, 방사선 조사를 받은 NSG 마우스 30마리에 정맥주사하고 8주후에 상기 마우스에 JL1-debouganan (DB), hIgG1-DB, 또는 PBS를 4주간 45ug 용량으로 매주 투여한 후, 골수와 비장을 수확하고, 생착과 종양생성을 관찰하였다.

도 34 및 35는 다양한 인간화/최적화된 변형 항체가 원형(마우스) JL-1 항체와 비교했을 때 동등한 바인딩 프로파일을 나타냄을 확인한 결과로서, 34는 CEM7 세포를 부모 원형 JL-1 항체와 3종류 인간화로 변형시킨 항체로 염색하여 관찰한 결과이며, 변형된 "Combo A"가 가장 좋은 프로파일을 보이지만, 이 외의 다른 시험 항체들도 모두 CEM7 세포에서 세포 독성을 유의미한 정도로 나타냄이 확인되며; 35는 최종 3개의 변형 항체를 내재화 세포독성 분석방법으로 시험한 결과를 보여주는 것으로, 항체를 antihuman IgG-saporin과 미리 혼합한 후 세포에 처리하여 3일 후에 세포독성을 측정한 결과이다.

도 36은 최고 2라운드와 3라운드 클론의 아미노산 서열 정렬 결과를 보여주는 것으로, 각각 부모 클론과 보다 인간화된 클론의 아미노산 서열을 비교한 것이다. 이 중에서, 153-28이 36-10 Q6R로부터 유래하였고, 257-10은 45-37로부터 유래하였다. CDRs은 굵고 밑줄친 글꼴로 표시하였다.

도 37a는 유동 세포 계측법에 의해 JL-1 양성 CEM7 세포에서 ART140 리드 후보의 IgG와의 결합 정도를 보여주는 그래프이고, 37b는 음성 대조군인 U937 세포에서의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 38a는 세포기반 ELISA(현탁액에 살아있는 세포)에 의해 JL-1 양성 CEM7 세포에서 ART140 리드 후보와 IgG와의 결합 정도를 보여주는 그래프이고,

38b는 음성 대조군인 U937 세포에서의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 39a는 유동세포 계측법에 의해 리드 후보군과 퀵 체인지(Quickchange) 돌연변이의 IgG가 JL-1 양성 CEM에 결합하는 정도를 보여주는 그래프이며, 39b는 음성 대조군인 U937 세포에서의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 40a-40c는 유동세포 계측법에 의해 퀵 체인지(Quickchange) 돌연변이의 IgG가 JL-1 양성 CEM에 결합하는 정도를 보여주는 그래프이다.

도 41a-41c는 세포기반 ELISA(현탁액에 살아있는 세포)에 의해 JL-1 양성 CEM7과 결합하는 퀵 체인지(Quickchange) 돌연변이의 IgG의 확인한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 42는 키메릭 항체 DNP001의 에피토프 결합 활성을 보여주는 그래프이다.

도 43은 인간화 항체의 당화부위 아미노산 잔기 제거 변이 항체를 제조하기 위하여 치환될 경쇄가변영역의 당화 부위 아미노산을 예시적으로 보여준다.

도 44는 인간화 항체의 당화부위 아미노산 잔기 제거 변이 항체에 대한 당화부위에 결합하는 콩카나발린 에이 (Concanavalin A)-HRP를 이용한 웨스턴 블롯팅 결과이다.

도 45는 인간화 항체의 당화부위 아미노산 잔기 제거 변이 항체의 항원(CD43) 양성 세포인 CEM7 세포와의 결합력을 보여주는 그래프이다.

도 46은 키메릭 항-CD43 항체와 당화부위 아미노산 잔기 제거된 인간화 항-CD43 항체의 항원(CD43) 양성 세포인 CEM7 세포와의 결합력을 보여주는 그래프이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하에서는 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 아래 기재된 실시예들은 발명의 본질적인 요지를 벗어나지 않는 범위에서 변형될 수 있음은 당 업자들에게 있어 자명하다.

실시에 1. 항-CD43 항체의 제조

1-1. 마우스 항체 제조

1-1-1. 단일클론항체 생산 세포 제조

사람 가슴샘세포를 항원으로 주입한 Balb/c 흰쥐의 비장세포와 8-아자구아닌(8-azaguanine) 내성 (resistant) 마우스의 골수종세포주 SP2/0-Ag14 (ATCC, CRL-1581)의 융합을 통하여 만들었다.

Balb/c 흰쥐에 6주간 2주 간격으로 10^7 개의 사람 가슴샘세포 (서울대학교병원)를 복강내 주사하여 면역반응을 유도하였고, 마지막 추가 접종 후 3일째에 비장을 적출하여 세포부유액을 만들었다. 켈러와 밀스테인(Koeler & Milstein 1975)의 방법에 따라, DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 10^8 개의 비장세포와 10^7 개의 골수종 세포를 50% 폴리에틸렌글라이콜 400을 사용하여 세포 융합하였다. 융합된 세포는 세척한 후, 20% 우태아혈청, 100uM 하이포크산틴(hypoxanthine), 0.44uM 아미노프테린(aminopterin) 및 16uM 티미딘(thymidine)이 보충된 DMEM 배양액(HAT 배양액)에 재부유시키고, 세포들은 96-웰 플레이트(96-well plate)에 분주하고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 배양하였다.

2주후 집락의 형성이 관찰되면 상청액을 취하여 항체역가를 면역조직화학염색(immunohistochemistry) 및 유세포 측정(flowcytometry)을 이용하여 측정하였다.

양성집단은 웰(well)당 10^5 개 이상의 세포가 단일로 형성된 경우로 하였다. 상청액의 항체 역가가 높은 군락이 형성된 웰에서 세포를 취하여 제한희석시험(limiting dilution assay) 방법에 따라 서브클로닝하여 항체역가가 높은 단일클론세포를 수득하였다. 단일클론세포의 배양액은 상청액을 취하여 추후 실험을 위하여 보관하였다.

1-1-2. 가슴샘세포의 세포 표면 단백질에 대한 항체를 생산하는 단일클론 세포 선별

가슴샘의 동결 조직 (서울대학교병원) 및 파라핀 포매조직 (서울대학교병원)을 4마이크로미터 두께로 박절하여 사용하였다. 파라핀

포매조직은 파라핀 제거 과정을 거친 후 정상 염소 혈청(BioGenex사 제품)을 가한 후 실온에서 1시간 방치하였다. 상기 조직에 각각 일차항체 (다이노나(주), Dinona)를 도포한 후 4℃ 저온실에 하룻밤 동안 두어 반응시킨 후, 다음날 인산염완충식염수로 3회 세척하였다. 이차항체로 바이오틴결합 염소 항-마우스 면역 글로블린(biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin; 2방울, DAKO)을 사용하여 1시간 실온에 방치한 후 인산염완충식염수로 3회 세척하고, 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP 접합체를 처리하였다. 여기에 H₂O₂-아미노에틸카바졸(H₂O₂-aminoethyl carbazole) 용액을 도포한 후 20분간 처리하고 인산염완충식염수로 3회 수세한 후, 광학현미경에서 발색을 관찰하였다.

그 결과, 사람 가슴샘 세포에만 특이하게 반응하는 항체를 생산하는 단일클론 세포주 H-JL1을 선별할 수 있었다. 상기 얻어진 세포주는 1997년 1월 13일자로 대한민국 서울시 종로구 연건동에 소재하는 한국세포주연구재단 (Korean Cell Line Research Foundation; KCLRF)에 기탁하여, accession number KCLRF-BP-00010을 부여 받았다.

상기 선별한 단일클론 세포주의 상청액으로 흉선조직을 면역조직화학염색 하였으며, 가슴샘세포가 양성으로 염색됨을 확인하였다(도 10). 또한 양성으로 염색된 가슴샘세포는 세포의 주변부에 강하게 염색되는 양상을 보여, 상기 단일클론 세포주는 세포 표면 단백질에 대한 항체를 생산함을 알 수 있었다.

가슴샘세포의 발달 단계에서 상기 항체의 반응을 확인하기 위하여 유세포측정을 시행하였다. 심장수술을 위하여 적출한 사람의 흉선을 작은 조각으로 자르고, 유리슬라이드로 갈아서 가슴샘세포를 채취하였다. 분리한 가슴샘세포에 상기 항체 (1×10^5 세포/항체 10ug/ml)를 30분간 4℃ 에서 반응시킨 후, 차가운 인산염완충식염수로 세척하고 FITC(Fluorescein Isothiocyanate)가 결합된 염소 항-마우스 면역글로블린 항체 (Jackson ImmunoResearch)를 30분간 4℃ 에서 반응시켰다. 차가운 인산염완충식염수로 세척하고 PE(phycoerythrin)가 결합된 항-CD8 항체 (BD Bioscience)와 APC가 결합된 항-CD4 항체 (BD Bioscience)를 5ul씩 넣고 30분간 4℃ 에서 반응시켰다 차가운 인산염완충식염수로 세척하고 FACScalibur(Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하여 유세포측정을 시행하였다. CD4와 CD8의 발현 양상에 따라서 가슴샘세포를 CD4-CD8-가슴샘세포

→ CD4+CD8+ 가슴샘세포 → CD4+CD8- 혹은 CD4-CD8+ 가슴샘세포로 구분하였으며, 상기 항체는 네 종류의 가슴샘세포에 모두 반응하였으나, 특히 CD4+CD8+ 가슴샘세포에 높게 반응하였다 (도 11 참조). 도 11에서 회색 영역은 음성대조군이며, 실선은 선별된 항체로 염색한 그래프이다.

1-1-3. 선별한 단클론 세포주로부터 단클론 항체 생산

10% 우태아혈청이 포함된 DMEM 배지에서 배양한 단클론 세포 10⁷개를 프리스탄(pristane) 0.5ml를 3주전에 미리 복강내에 주사한 Balb/c 마우스의 복강에 주사하고, 2-3주 후 마우스의 복수를 채취하였다. 상기 복수에서 5-10mg/ml의 고농도 항체를 얻을 수 있었다.

복수로부터 항체를 정제하기 위하여, Q-세파로즈(Pharmacia 제품) 크로마토그래피 및 하이드록실아파타이트(hydroxylapatite, Bio-gel HTP Gel, Pharmacia 제품) 크로마토그래피를 시행하였다. 복수 10ml 당 3.14g의 암모늄설페이트((NH₄)₂SO₄)를 가하여 얼음위에서 서서히 녹였다(50% (NH₄)₂SO₄침전). 이 혼합물을 15,000rpm에서 30분간 원심분리하고, 침전물을 탈이온수(deionized water)에 녹인 후 1L의 완충액(20mM phosphate, pH7.4)에 투석하였다.

상기 용액을 완충용액(20mM phosphate, pH 7.4)으로 미리 평형시킨 Q-세파로즈 칼럼에 통과시켜 흡착시킨 다음 완충용액 I (20mM phosphate, pH 7.4) 및 완충용액 II (20mM phosphate, 0.5M NaCl, pH 7.4)를 이용하여 NaCl의 농도구배를 0M부터 0.8M의 선형구배로 흘려주어, 용출물을 수득하였다. 각 분획은 15% SDS-PAGE하여 다량의 항체가 함유된 분획을 모았다. 상기 분획은 완충액(20mM phosphate, pH 6.8)으로 투석하고, 완충용액(20mM phosphate, pH 6.8)으로 미리 평형시킨 하이드록실아파타이트 컬럼에 통과시키면서 흡착시킨 다음, 완충용액 III(20mM phosphate, pH 6.8) 및 완충용액IV(300mM phosphate, pH 6.8)를 이용하여 인산의 농도구배가 0M부터 0.3M까지 되도록 선형구배로 흘려주어, 용출물을 수득하였다. 분획은 15% SDS-PAGE 하여 항체의 순도가 95% 이상되는 분획만을 모았다. 상기 실험으로, 복수 1ml당 5-10mg의 단클론 항체를 회수할 수 있었다.

상기 얻어진 항체를 YG5라 명명하였다.

1-1-4. CD43의 항원결정부위 분석

<CD43 일부 절편을 포함하는 구조체 구축>

도 12에 도시한 바와 같이, 각각의 CD43 결손형돌연변이를 제작하고, 상기 결손형돌연변이에 대한 YG5 항체의 반응성을 확인하여 CD43의 항원결정부위를 분석하였다. CD43 단백질(NCBI Accession No. M61827.1)은 총 400개의 아미노산으로 이루어지며 1에서 19번째 아미노산 서열은 신호서열이고, 20에서 254번째 아미노산 서열은 세포외 도메인이고, 255에서 277번째 아미노산 서열은 트랜스멤브레인 도메인이고, 278에서 400번째 아미노산 서열은 세포내 도메인이다.

결손형돌연변이 각각은 글루타티온-S-전이효소(Glutathione-S- transferase, GST)의 C 말단에 융합 발현되도록 DNA 구조체를 제작한 후 이를 pGEX-2T(Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) 벡터에 삽입하였다. 이하 CD43 단백질의 1에서 253번째 아미노산 서열을 포함하는 벡터를 pGEX1-253라 하고, 1에서 98번째 아미노산 서열을 포함하는 벡터를 pGEX1-98, 1에서 87번째 아미노산 서열을 포함하는 벡터를 pGEX1-87, 1에서 87번째 아미노산 서열을 포함하는 벡터를 pGEX1-81, 1에서 75번째 아미노산 서열을 포함하는 벡터를 pGEX1-75, 1에서 70번째 아미노산 서열을 포함하는 벡터를 pGEX1-70, 70에서 98번째 아미노산 서열을 포함하는 벡터를 pGEX70-98라 하였으며, 상기과 동일한 원리로 pGEX71-81, pGEX76-81, pGEX73-81, 그리고 pGEX73-80라 명하였다.

결손형돌연변이를 코딩하는 서열은 사람 CD43 cDNA로부터 증폭시켜 사용하였고, PCR 프라이머는 Genebank상의 서열로부터 제작하고 다만 BamHI/EcoRI 또는 BamHI/BglII 제한효소부위가 포함되도록 하였다. PCR 산물은 BamHI/EcoRI 또는 BamHI/BglII 로 절단한 후 동일 제한효소 부위의 pGEX-2T에 연결시킨 후 E. coli 컴피턴트 TOP10F' 세포[F' [lacIq, Tn10(TetR)], mcrA, D(mrr-hsdRMS-mcrBC), 80lacZDM15, lacX74, deoR, recA1, araD139 D(ara-leu)7697, galK, rpsL(StrR), endA1, nupG]에 형질도입하였다. 형질전환체의 염기서열은 분석하여 결손형돌연변이 서열을 재확인하였다.

<GST-CD43 결손형돌연변이체 융합단백질의 발현>

형질전환된 E. coli TOP10 세포는 50ug/ml의 암피실린이 첨가된 LB배지에서 37℃로 하룻밤 배양하고, 배양된 세포를 LB 배지로 20배 희석한 다음 OD 0.6이 되도록 3 내지 4시간 배양하였다. 배양물에 IPTG(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 최종농도 1mM로 첨가하여 4시간 더욱 배양한 후 6,000g에서 15분간 원심분리하였다. 세포만을 수득하고 세포 1g 당 3ml의 용해(lysis) 완충액(50mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA, 100mM NaCl)으로 현탁한 후 최종농도 0.2mM 페닐메틸설포닐 플로라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma Chemical Co.)를 가한 다음 30분간 얼음위에 두었다.

<CD43 항원결정부위 분석>

총 11종의 결손형돌연변이를 발현하는 각각의 형질전환체의 용해질(lysate)을 10% SDS-PAGE한 후, YG5 항체 및 항-GST 항체로 각각 웨스턴 블롯을 실시하였다.

도 13은 11종의 결손형돌연변이에 대한 YG5 항체의 반응성을 확인한 웨스턴 블롯으로, A는 YG5 항체를 사용한 것이고, B는 GST 항체를 사용한 것이다. 또한 레인1은 pGEX1-253이고, 레인2는 pGEX1-98이고, 레인3은 pGEX1-87이고, 레인4는 pGEX1-81이고, 레인5는 pGEX1-75이고, 레인6은 pGEX1-70이고, 레인7은 pGEX70-98이고, 레인8은 pGEX71-81이고, 레인9는 pGEX73-81이고, 레인10은 pGEX76-81이고, 레인11은 pGEX73-80이고, 레인12는 pGEX-2T이고, 레인13은 인간 가슴샘세포이다. 도 19에 나타난 바와 같이, YG5 항체에 대하여 반응성을 갖는 최소 단위의 결손형돌연변이는 pGEX73-81로 확인되어, CD43의 항원결정기는 73 내지 81번째 아미노산 서열(Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile; SEQ ID NO: 4)임을 알 수 있다.

상기 실시예들을 종합하면, YG5는 기존에 알려진 다른 항체들과는 달리 CD43 당단백질의 당성분이 아닌 73-81번째 아미노산 서열을 직접 인지하며, 이 서열은 조혈세포 발달단계중 주로 림프구 전구세포와 가슴샘세포에서는 노출되어 YG5 항체가 인지할 수 있고, 조혈줄기세포와 성숙 백혈구 및 혈소판에서는 78-81번째 아미노산 서열 주위의 당화나 구조 변화로 가려져서 YG5 항체가 인지하지 못 함을 알 수 있다.

1-2. 키메라 항체 제조

상기 제작된 항-CD43 마우스 항체 YG5의 아미노산 서열을 기초로, 항-CD43 키메라 항체를 제작하였다.

1-2-1. 플라스미드 제작

항-CD43 키메라 항체의 발현을 위하여, 중쇄 발현용 플라스미드와 경쇄 발현용 플라스미드를 각각 제작하였다. 중쇄 발현용 플라스미드는 pOptiVEC (Invitrogen 사) 벡터를 사용하였고, 경쇄 발현용 플라스미드는 pcDNA3.3 (Invitrogen 사) 벡터를 사용하였다. 항체 발현을 위한 중쇄 및 경쇄의 가변영역 코딩 cDNA는 Ig-Primer sets (Novagen 사)를 이용하여 클로닝하였으며, pGem-T 벡터(Promega 사)에 삽입한 후, 시퀀싱을 통해 DNA 염기서열을 확인하였으며, IMGT site (www.imgt.org)를 통해 마우스 항체 유전자를 확인하였다.

추가적인 아미노산 삽입 없이 항체 각각의 가변영역 코딩 cDNA와 불변영역 코딩 cDNA를 연속적인 아미노산 서열로서 발현되도록 하기 위하여, 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 pOptiVec 벡터에, 경쇄 유전자 조각은 pcDNA3.3 벡터에 각각 ligation 하여 완전한 항체 발현용 플라스미드를 제작하였다 (pcDNA3.3-anti-CD43 경쇄 발현 플라스미드 및 pOptiVEC-anti-CD43 중쇄 발현 플라스미드).

상기와 같은 중쇄 및 경쇄 발현 플라스미드 제작 과정을 도 14에 모식적으로 나타내었다.

2-1-2. 형질전환

상기 제작된 pcDNA3.3-anti-CD 경쇄 발현 플라스미드와 pOptiVEC-anti-CD43 중쇄 발현 플라스미드를 CHO세포 유래인 DG44세포(Invitrogen)에 transfection시켜 형질전환 과정을 수행하였다.

우선 transfection 3일전에 부유상태의 DG44 세포를 5%FBS가 포함된 MEMa 배지에 적응시킴으로서 부착상태 세포로 변환시켜 형질전환 효율을 높일 수 있게 적응시켰다. 형질전환은 Effectene transfection reagent(QIAGEN사)를 사용하여 6well plate에서 수행하였다. 형질전환 하루 전날 1×10^5 cells/well의 농도로 계대 배양하여 부착상태로 적응된 DG44세포를 준비하였고, 형질전환에 사용된 DNA의 양은 pcDNA3.3-anti-CD 경쇄 발현 플라스미드와 pOptiVEC-anti-CD43 중쇄 발현 플라스미드 각각 2ug씩 동량의 조합으로 사용하였다. 형질전환은 48시간동안 수행하였다. 형질전환된 세포군을 선별하기 위하여 유세포분석기(flow cytometer) 및 효소면역법(Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELIA)을 이용하여 E#4, E#5 2개 clone을 선정하였다. 이렇게 선별된 세포군은 30nM 메토크세이트(Methotrexate: MTX)와 400ug/ml의 G418 (Geneticin)이 함유된 5% Dialyzed Fetal Bovine Serum포함 MEMa (Minimum Essential Media Alpha) 선별배지에서 배양을 시작하여 점진적으로 MTX와 G418의 농도를 높여주면서 형질전환 세포군을 선별하였다.

2-1-3. 형질전환 세포 배양 및 항체 정제

상기 선별된 형질전환 세포군 (24.0×10^5 cells/mL이상, 생존율(%) 90%이상)을 power CHO2 CDM (Lonza; 최종 배지량 880L)에서 37°C 및 5% CO₂ 조건 하에서 발현량이 600mg/L (IPC(in-process control) 기준에 따름)에 도달할때까지 배양하였다.

상기와 같이 얻어진 배양액 800 L를 취하여 cell clarification (POD filter (1.1/0.2um) 이용) 과정을 거친 후 3단계 컬럼 공정 (Protein A affinity chromatography (고정상: ProteinA, 평형완충액: 50 mM Sodium phosphate, 50 mM sodium chloride, pH7.5, 용리완충액: 20 mM sodium citrate pH3.0); cation exchange chromatography (고정상: SP FF, 평형완충액: 20 mM sodium citrate pH5.5, 용리완충액: 20 mM Sodium citrate, 150 mM, sodium chloride, pH6.1); anion exchange chromatography(고정상: Q FF, 평형완충액: 20 mM Soidum citrate, pH6.5))을 통하여 항체를 정제하였다.

상기 크로마토그래피 조건은 아래와 같이 하였다:

	Protein A	Cation exchange	Anion exchange
Colum type	Mabselect sure	SP FF	Q FF
Colum controller	Bioprocess 6mm(CL-3271)	10 mm Bioprocess(CL-3201)	10 mm Bioprocess(CL-3201)

Column size	BPG 200	BPG 300	BPG 300
Column volume	6.5 L	14.0 L	14.0 L
Column Height	20 cm	20 cm	20 cm
Flow rate	62.8 L/hr	141 L/hr	141 L/hr

최종 원액의 formulation은 ultrafiltration/diafiltration (UF/DF) 공정을 통하여 버퍼 교환 및 농축과정을 동시에 수행하여 완성하였으며, 최종 단백질의 농도는 11.5 mg/mL로 조절하였다.

상기와 같은 공정으로 항-CD43 키메라 항체를 얻었으며, DNP001로 명명하였다.

2-1-4. 키메라 항체의 에피토프 부위 결합력 확인

상기 제작된 키메라 항체 DNP001 (마우스 항체와 같은 CDR 부위를 가짐)가 마우스 항체와 동일한 항원결정부위(에피토프)에 결합하는 지를 확인하기 위해, 항원결정부위 펩타이드를 합성하여 bovine serum albumin (BSA) 단백질에 화학적으로 결합한 후, ELISA를 수행하였다.

- 항원결정부위 펩타이드 합성 서열 (DN2로 명명)

EGSPLWTSIGASTGSC (SEQ ID NO: 129; 항원 결정부위는 밑줄로 표시함)

상기 합성된 DN2 펩타이드를 EDC 링커를 통해 BSA 단백질에 접합시켜 DN2 펩타이드-BSA 접합체를 제조하였다. 이 때, 펩타이드:BSA 단백질의 Molar ratio를 15:1로 사용하였다.

상기 제조된 DN2 펩타이드-BSA 접합체를 웰 당 50ug/ml 로 코팅한 후, 다양한 농도 구배로 키메라 항체 DNP001를 결합시켜 상기 접합체에 결합된 항체를 검출하여, 키메라 항체의 DN2 펩타이드-BSA 접합체에 대한 반응성을 측정하였다. 상기 결합된 항체는 항-인간 항체-HRP (anti-human Ig-HRP)를 사용하여 검출하였으며, 450nm에서의 OD값을 측정하여 아래의 표 및 도 42에 나타내었다.

Chi. Ab (ug/ml)	OD value
100	1.878
50	1.398
25	0.803

12.5	0.5
6.25	0.327
3.13	0.204
1.56	0.137
0	0.007

상기 표 및 도 42의 결과와 같이, 키메릭 항체 DNP001은 농도 의존적으로 항원결정부위 펩타이드에 결합함을 확인하였다.

실시예 2: 사람 고형암 세포주에서 CD43 항원결정부위의 발현도 조사

여러 고형암 세포주에서 CD43의 발현 정도를 알아보기 위해 면역염색(Immunostaining) 및 유세포 분석을 시행하였다.

분석에 사용된 세포주 정보는 다음과 같다:

Name	Origin	Histopathology	입수처 및 Accession NO.
SNU-1	stomach, gastric	adenocarcinoma	ATCC, CRL-5971
SNU-719	stomach	adenocarcinoma, primary	KCLB, No.00719
NCI-N87	stomach	carcinoma; metastatic to liver	ATCC, CRL-5822
AGS	stomach	adenocarcinoma	ATCC, CRL-1739
HT29	colon	adenocarcinoma	ATCC, HTB-38
LS174T	colon	Dukes' type B, colorectal adenocarcinoma	ATCC, CL-188
HCT116	colon	colorectal carcinoma	ATCC, CCL-247
C3A	liver	hepatocellular carcinoma	ATCC, CRL-10741
HepG2	liver	hepatoblastoma	ATCC, HB-8065
PLC/PRF/5	liver	hepatoma	ATCC, CRL-8024

구체적으로, 상기 각각의 세포주를 100 mm의 세포 배양용기에 접종 및 배양하고, 표면 70~80% 정도가 배양세포로 밀집되었을 때 배양 세포를 인산염완충용액으로 세척한 후 Trypsin-EDTA (Invitrogen)로 처리하여 해리시킨 뒤 원심 분리하였다. 침전 된 세포를 다시 완충액에 부유시켜 1×10^5 씩 분주하고, 상기 실시예 1-1에서 제조된 항 CD43 항체(YG5)-phycoerythrin (PE)를 $1.5 \mu\text{l}$ 씩 넣고 4℃ 냉장고에서 20분간 반응시켰다 4℃에서 20분간 반응시킨 세포를 완충액 (1 x Phosphate Buffered Saline, PBS buffer) 4ml로 다시 세척 후, Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하였다. 비교를 위하여,

항-CD43 항체 대신에 DFT-1 항체(2ul, Ancell corporation)를 사용하여 상기와 동일한 시험을 수행하였다.

상기 얻어진 결과를 도 1 및 도 2a-2c에 나타내었다. 도 1에서 X축은 제시된 세포주에서 항체 YG5에 반응하는 항원 CD43의 발현율을 나타낸 것이고, Y축은 Reading cell numbers(counts)를 의미한다. 도 1 및 도 2a-2c에 나타난 바와 같이, 대장암에서는 Duke's 유형 B 선암(LS174T)에서 약 60%의 발현율을 보였고, HCT116, HT29에서 약 50, 37%의 발현율을 보였으며, 그 외에도 여러 종류의 고형암 세포주에서 CD43 (항원결정부위)의 발현이 확인되었다.

실시예 3: 항 CD43 항체의 암세포에 대한 세포 독성 시험 (*in vitro*)

3-1. 항체-독소 접합체 제작

단클론항체의 사포린(Sigma, St. Louis, MO) 접합은 기존 방법에 따라 실시하였다(Polito et al., 2004). 항체(DNP001; 실시예 1-2에서 제조)와 사포린을 각각 2 mg/ml (항체 농도)과 8 mg/ml (사포린 농도)의 농도로 50 mM sodium borate buffer(pH 9.0)에 녹인 후 2-iminothiolane(Sigma)를 각각 0.4 mM과 1.0mM 농도로 처리하였다. 그 후, 항체와 사포린을 10:1의 비율로 혼합하여 실온에서 16시간 반응시키고 항체-사포린 접합체를 젤여과(gel filtration)로 정제하였다. 이하 준비된 접합체를 항-CD43-사포린 접합체라 기재한다

상기 방법을 참조하여, 항 CD43 항체 (DNP001; 실시예 1-2에서 제조)와 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE; Creative Biolabs)이 접합된 항-CD43-MMAE 접합체, 항 CD43 항체 (DNP001)와 N2'-디아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)메이탄신(DM1; The Chemistry Research Solution LLC)이 접합된 항-CD43-DM1 접합체, 및 CD43 항체 (DNP001)와 Duocarmycin(The Chemistry Research Solution LLC)이 접합된 항 CD43 항-CD43-Duocarmycin 접합체와 항 CD43 항체(DNP001)-DM1 접합체를 각각 준비하였다.

3-2. 위암 세포에 대한 항 CD43 항체-독소 접합체의 세포독성

상기 실시예 3-1에서 준비된 항체-독소 접합체 (항-CD43-사포린 접합체,

항-CD43-DM1 접합체, 항-CD43-MMAE 접합체, 및 항-CD43-Duocarmycin 접합체)의 위암세포에 대한 세포 독성을 시험하였다.

시험 전날, 위암세포주 NCI-N87, AGS, 및 SNU719를 각각 웰당 4×10^3 개씩 plating하였다. 상기 준비된 각각의 항체-독소 접합체를 10000ng/ml((항-CD43 항체)-MMAE 접합체 및 (항-CD43)-DM1 접합체의 경우) 또는 1000ng/ml((항-CD43)-Duocarmycin 접합체의 경우)의 농도로 각각의 위암 세포주에 처리하고 24시간, 48시간, 72시간 뒤에 각각의 웰에 EzCytex(Daeil lab, Korea)를 10ul씩 첨가하여 37°C CO₂ 배양기에서 한 시간 동안 배양 후 microspectrophotometry로 측정하였다.

상기 얻어진 각 접합체의 세포독성을 도 3 ((항-CD43 항체)-MMAE 접합체), 도 4 ((항-CD43)-DM1 접합체) 및 도 5 ((항-CD43)-Duocarmycin 접합체)에 나타내었다. 세포 독성은 다음의 수식으로 산정하였다:

$$\text{세포독성 (Cytotoxicity; \%)} = [1 - (\text{생존 세포개수} / \text{최초 세포개수})] \times 100$$

도 3, 4, 및 5에서 확인되는 바와 같이, 항-CD43-DM1 접합체 및 항-CD43-MMAE 접합체는 3종의 세포주 모두에서 세포독성을 보였고, 항-CD43-Duocarmycin 접합체는 NCI-N87과 AGS에서 세포독성을 보이는 것을 확인할 수 있다.

실시예 4: 항 CD43 항체의 동물모델에서의 항암 효과 시험 (*in vivo*)

4-1. 위암 동물 모델(Tumorigenesis) 준비

상기 실시예 2의 결과에서 CD43 발현이 확인된 세포주 (NCI-N87; ATCC, CRL-5822)를 이용하여 위암 동물 모델을 제작하였다. 먼저, NCI-N87 세포를 2.8×10^7 개 준비하였다. 상기 준비된 세포를 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 5×10^6 개/100ul(RPMI) 피하 접종하였다. 접종한 누드 마우스를 대조군(PBS 투여), 시험군으로 무작위 배정하고, 암 세포를 접종한 3일 뒤부터 상기 실시예 1-2에서 제작된 항 CD43 항체(DNP001)를 12mg/kg의 양으로 주 2회, 3주간, 꼬리정맥으로 주사하거나, 상기 실시예 3-1에서 준비된 항-CD43-듀오카마이신 접합체(DNP001-Duocarmycin) 0.2mg/kg를 주 1회, 3주간, 복강 내 주사하였다. 종양의 크기는 매주 2회씩 치료제를 투여하기 전에 측정하고, 종양의 크기는

다음식으로 계산하였다:

$$\text{종양 크기(mm}^3\text{)} = (\text{장축} \times \text{단축}^2)/2$$

상기 얻어진 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타난 바와 같이, 시험 시작 후 7일부터 대조군에 비해 DNP001-Duocarmycin 투여군(D-Duo)에서 종양의 성장이 억제되기 시작했고, 26일 뒤 DNP001-Duocarmycin, DNP001 단독, PBS를 투여한 마우스의 평균 종양 크기는 각각 447.2 mm³, 510.9 mm³, 784.6 mm³였고, 항-CD43-Duocarmycin 접합체와 항-CD43 항체를 투여한 군의 경우 대조군에 비해 각각 약 43% 및 34% 가량 종양의 성장이 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 항-CD43 항체 단독 및 항-CD43-Duocarmycin 접합체의 현저한 위암 성장 저해효과를 보여주는 것이다.

실시에 5: 사람 고형암 조직에서 CD43의 분포도 조사

위암에서만 뿐만 아니라 다양한 고형암에서 CD43의 발현을 확인하고 CD43을 표적으로 다양한 고형암(위암, signet ring cell 위암, 유방암, 유방암중 유방관 침윤 선암, 신장암, 췌장암, 담낭암, 자궁암, 자궁경부암, 방광암, 과립성 육종)에 대한 치료적 효능을 시험할 가능성을 확인하기 위해, 다양한 사람 기원 종양조직에 면역조직화학 염색(Immunohistochemistry)을 수행하였다.

면역조직화학염색은 다음과 같은 순서로 진행하였다. 고형암 조직은 파라핀 포매된 고형암 조직(충북대학교 병원)을 사용하였다. 먼저 파라핀 고형암 슬라이드를 자일렌 10분씩 3회, 100% 알코올 5분씩 2회, 80% 알코올 3분, 50% 알코올 1분, 20% 알코올 1분 동안 탈-파라핀 과정을 진행한 뒤 흐르는 물에 2회 세척하였다. 다음으로 1xTBS(Tris-buffered saline)에 10분간 담가두었다. 10mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pH8.0 buffer를 넣고 15분간 전자 레인지에서 항원 재생 과정을 진행하고, 항원 재생 과정이 끝난 뒤 흐르는 물에 빠르게 식힌 뒤 1xTBS에 20분간 담가두었다. 0.1% H₂O₂+100% 메탄올로 10분간 내재성 페르옥시다아제를 제거하고 흐르는 물에 2회 세척하였다. 다음으로 내재성 바이오틴과 항원-항체 비특이반응을 제거하기 위해 블로킹 과정을 진행하였다. 상기 블로킹과정은 avidin solution (VECTOR laboratories)을 상기 조직에 4 방울 떨어뜨려 15분간 상온에서 반응시킨 후 1xPBS로 수세한 뒤 biotin

solution을 4 방울 떨어뜨려 상온에서 15분간 반응시킴으로써 수행하였다.

실시에 1-1에서 제작된 항-CD43(YG5) 항체와 DFT-1 항체(대조군; Ancell corporation)를 각각 10ug/ml, 5ug/ml을 150ul의 1 x TBS에 현탁하여 조직을 덮어주고 1시간 30분간 상온에서 반응시켰다. 1 x TBST (1 x TBS+ 0.1% tween 20)으로 15분씩 3회 수세한 뒤 이차 항체 (항-마우스/토끼 HRP; DAKO)를 2방울씩 조직에 덮고 30분간 상온에서 반응 시켰다. 이어서 1 x TBST (1 x TBS+ 0.1% tween 20)으로 15분씩 3회 세척한 뒤 DAB(Diaminobenzidine)으로 발색반응시켰다. 1 x TBS로 5분간 2회 수세하고 counter staining한 뒤 흐르는 물에 세척하였다. 다음으로 탈수과정을 진행한 후 mounting한다.

상기 얻어진 결과를 도 7 및 도 8, 및 표 1에 나타내었다. 각각의 조직에서 CD43 양성율을 판단하는 기준은 다음과 같다: 음성: 0, 양성: 종양부위에 YG5가 염색된 정도에 따라 1 내지 3 등급으로 구분

[표 1]

Table 1.Expression of CD43 in various cancer tissue section

Origin	Total(n)	Positive(n)	%, positivity
Stomach	213	179	84
Breast	231	90	39
Lung	28	13	46
Kidney	54	5	9
Pancreas	30	3	10
Thyroid	21	1	5
Gall bladder	4	1	25
Uterus	2	1	50
Urinary bladder	5	2	40
Cervix	4	1	25

(상기 표 1에서,

Positivity는 YG5가 염색되지 않은 음성인 조직을 제외한 양성 조직의 수를 해당암의 전체 조직수로 나눠서 얻어진 수치;

Total는 염색에 사용한 조직의 총 수;

Positive는 사용한 조직 중 YG5에 대해 양성반응을 보인 조직의 수를 각각 의미함)

표 1, 도 7 및 도 8에서 확인되는 바와 같이, 위암, signet ring cell 위암, 유방암, 유방암중 유방관 침윤 선암, 신장암, 췌장암, 담낭암, 자궁암, 자궁경부암, 방광암, 과립성 육종 등과 같이 주로 상피세포에 발생하는 종양에서 CD43이 발현되는 것을 확인할 수 있다.

실시예 6: 위암의 암 줄기 세포에서 CD43 발현

다양한 종양의 암줄기 세포에서 CD43의 발현 정도를 시험하였다. CD44와 CD133(Prominin-1)은 공지된 암줄기세포 표지자(Cancer stem cell marker)이다. 암줄기세포 표지자 CD44 및 CD133과 triple-staining 하여 CD43 발현을 확인함으로써, CD43이 CD44 또는 CD44⁺CD133⁺ 양성 그룹에서 발현됨을 확인하였다.

NCI-N87 세포를 100 mm의 세포 배양용기에 접종 및 배양하고, 배양용기 표면 70~80% 정도가 배양세포로 밀집되었을 때 배양 세포를 인산염완충용액으로 세척한 후 Trypsin-EDTA (Invitrogen)로 처리하여 해리시킨 뒤 원심 분리하였다. 침전된 세포를 다시 완충액에 부유시키고 항-CD44-allophycocyanin (APC) (10 μ l, Miltenyi Biotec), 항-CD133-fluorescein isothiocyanate(FITC) (10 μ l, Miltenyi Biotec), 및 항-CD43 항체(실시예 1에서 제작; YG5)-phycoerythrin (PE; 1.5 μ l, Dinona)와 4°C 냉장고에서 20분간 반응시킨 후 반응하지 않은 항체는 수세하고, 1% paraformaldehyde로 고정한 후, Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하였다. 음성대조군으로, 항-CD44 항체 및 항-CD133 항체를 대신하여 mouse IgG1을 이용하여 동일한 시험을 수행하였다.

상기 얻어진 결과를 도 9에 나타내었다.

도 9에서 확인되는 바와 같이, 위암의 암줄기세포에서 CD43의 발현을 확인한 결과, 위암의 암줄기세포를 감별할 수 있는 표지가 (CD44 또는 CD133)가 양성인 세포에서 CD43이 양성인 것이 확인되었다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 항 CD43 항체가 특유하게 위암의 암줄기세포 표면에 발현된 CD43과 결합할 수 있음을 보여주는 것이다.

실시예 7: 다양한 고형암 줄기세포에서 CD43의 발현 조사

상기 실시예 6에 제시된 동일한 방법으로, 실시예 5에 제시된 CD43 양성 고형암의 암 줄기 세포에서 CD43의 발현을 확인하였다.

실시예 5에 제시된 각각의 CD43 양성 조직에서 기원한 세포(유방암, 폐암, 대장암, 간암 및 담낭암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 방광암 기원 세포주)를 이용하였다. 각각의 세포를 100 mm의 세포 배양용기에 접종 및 배양한 후, 배양용기의 표면 70~80% 정도가 배양세포로 밀집되었을 때 배양 세포를 인산염완충용액으로 세척한 후 Trypsin-EDTA (Invitrogen)로 처리하여 해리시킨 뒤 원심 분리하였다. 침전된 세포괴를 다시 완충액에 부유시키고 100배로 희석된 항-CD44-allophycocyanin (APC), 항-CD44-allophycocyanin (APC), 항-CD326(EpCAM)-allophycocyanin (APC), 항-CD133-fluorescein isothiocyanate (FITC), 항-CD43항체-phycoerythrin (PE)와 4℃ 냉장고에서 20분간 반응시킨 후 반응하지 않은 항체는 수세한 후 1% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)로 고정된 후 Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하였다.

그 결과, 실시예 5에서 CD43 양성으로 나타난 조직기원 세포의 암줄기세포에서의 CD43 발현을 확인한 결과, 각각의 암 줄기세포를 감별할 수 있는 표지가 (CD44, CD133, 또는 EpCAM)가 양성인 세포에서 CD43도 양성인 것으로 확인되었다.

실시예 8: 환자의 fresh 암 조직의 암줄기세포에서 CD43 발현 시험

상기 실시예 5의 결과를 바탕으로 환자의 암 조직에서 암 줄기 세포 표지자를 이용해 분류 후 CD43의 발현을 확인하였다.

환자의 신선한 암 조직을 잘게 단일 세포화하였다. 단일화된 종양 세포는 1700 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액은 버리고 10% FBS가 포함된 배지 10ml로 재 부유한 뒤 1700 rpm에서 3분간 원심 분리하였다. 상층액은 버리고 10ml 1 X PBS로 재 부유한 뒤 계수한다. 세포를 FACS 튜브에 분배한 뒤 항-CD44-allophycocyanin (APC), 항-CD44-allophycocyanin (APC), 항-CD326(EpCAM)-allophycocyanin (APC), 항-CD133-fluorescein isothiocyanate (FITC), 항-CD43항체-phycoerythrin (PE)와 4℃ 냉장고에서 20분간 반응시킨 후 반응하지

않은 항체는 수세한 후 1 % paraformaldehyde로 고정한 후 Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하였다.

상기와 같이, 환자의 암조직의 암 줄기세포에서 CD43위암의 암 줄기 세포에서 CD43의 발현을 확인한 결과, 환자의 암 조직 기원 암 줄기 세포에서 CD43이 양성으로 확인되었다.

실시예 9: 항 CD43 항체에 의한 암줄기세포의 colony형성 저해 (*in vitro*)

상기 실시예 6에 제시된 동일한 방법으로, 실시예 5에 제시된 CD43 양성 고형암의 CD43이 양성인 암줄기세포의 항-CD43항체에 의한 colony 형성 저해를 확인하였다.

실시예 5에 제시된 각각의 CD43양성 조직에서 기원한 세포(유방암, 폐암, 대장암, 간암 및 담낭암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 방광암 기원 세포주)를 이용하였다. 각각의 세포를 100 mm의 세포 배양용기에 접종 및 배양한 후, 배양용기의 표면 70~80% 정도가 배양세포로 밀집되었을 때 배양 세포를 인산염완충용액으로 세척한 후 Trypsin-EDTA (Invitrogen)로 처리하여 해리시킨 뒤 원심 분리하였다. 침전 된 세포괴를 다시 완충액에 부유시키고 10^7 의 종양세포 당 20ug/ml의 농도로 항-CD43 항체를 넣고 4℃ 냉장고에서 30분간 반응시킨 후 반응하지 않은 항체는 1 x PBS로 수세한다. 이어 마그네틱 비드가 결합된 IgG를 20uL 첨가한 후 4℃ 냉장고에서 15분간 반응시킨 후 1 x PBS로 수세한 뒤 MACS sperating system으로 CD43 양성 세포를 분류한다.

분류한 CD43양성 세포와 음성세포를 항 CD44-allophycocyanin (APC), 항-CD326(EpCAM)-allophycocyanin (APC), 항-CD133-fluorescein isothiocyanate (FITC), 항-Magnetic Bead항체-phycoerythrin (PE, 20ul, Miltenyi Biotec)와 4℃ 냉장고에서 15분간 반응시킨 후 수세한 후 1 % 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)로 고정한 후 Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하였다.

상기 실시 예에서 얻어진 CD43 양성 세포와 음성 세포를 serum-free media(100IU/ml penicillin G, 100ug/ml streptomycin, 20 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (hrEGF), 10 ng/ml human recombinant basic fibroblast growth factor (hrbFGF), 2% B27 supplement without vitamin A, 1% N2 supplement (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA)가 포함)을 포함하는 well에 각 well 당 5,000개의 수로 ultra low attachment 6-well plates (Corning Inc., Corning, NY, USA)에 넣어준다. 다음으로 항-CD43 항체와 대조군 항체를 100ug/ml씩 넣고 배양한다. 이후 spheres를 관찰한다. 동일한 실험을 환자의 fresh한 암 조직에서 CD43 양성 세포를 분류하여 진행하였다.

그 결과, 여러 종양과 환자의 암 조직 중 CD43 양성 암줄기 세포에 항-CD43 항체를 투여한 결과 대조군에 비해 암 줄기 세포의 tumorigenesis를 저해하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 항-CD43 항체의 암 줄기 세포의 현저한 종양형성 저해 효과를 보여주는 것이다.

실시예 10: 여러 암 동물모델에서 항 CD43 항체의 항암 효과 시험 (in vivo)

상기 실시예 7, 8의 결과에서 CD43 발현이 확인된 세포주와 fresh한 암 조직을 이용하여 동물 모델을 제작하였고 방법은 상기 실시예 4와 동일하다. 대조군(PBS 투여)과 시험군으로 무작위로 마우스를 배정하고, 암 세포를 접종한 3일 뒤부터 상기 실시예 2에서 제작된 항 CD43 항체(DNP001 mAb) 8mg/kg을 주 2회, 3주간, 꼬리정맥으로 주사하거나, 상기 실시예 3-1에서 준비된 항-CD43-사포린, DM1, MMAE, Duocarmycin 접합체 0.2mg/kg, 0.5mg/kg, 1mg/kg, 5mg/kg을 주 1회, 3주간, 복강 내 주사하였다. 종양의 크기는 매주 2회씩 치료제를 투여하기 전에 측정하였다.

실시예 11: 뉴라미니데이즈(neuraminidase) 처리 후 정상 혈액세포에 대한 결합력 변화 시험

정상 혈액에 발현되는 CD43을 인지하는 항체(DFT-1)와 종양특이 CD43을 인지하는 항 CD43 항체 (YG5)가 뉴라미니데이즈 처리된 정상 림프구에 대하여 결합력에 변화가 있는지 확인 하였다.

건강한 사람으로부터 10ml의 혈액을 채혈하고, 적혈구 용해 용액 (RBC lysis solution; NH₄Cl, NaHCO₃, EDTA pH8.0) 40ml을 첨가하여 상온에서 10분간 용해 하였다. 적혈구가 용해된 혈액은 1700 rpm에서 5분간 원심 분리 후 상층액을

제거하고 10ml의 PBS로 2번 세척하였다. 3×10^6 개의 림프구를 상기 얻어진 적혈구 용해 용액 130ul에 현탁하고 뉴라미니데이즈(ELPIS, Korea) 50ul와 버퍼 20ul를 넣고 37℃에서 50분간 반응 시킨 뒤 PBS로 세척하였다. 뉴라미니데이즈에 의해 CD43을 인지하는 항체의 항원결정부위에 변화가 있는지를 확인하기 위해 FITC와 PE가 결합된 DFT-1 및 YG5 항체를 넣고 4℃에서 15분간 반응 시킨 후 PBS 4ml로 세척 후 유세포 분석기로 측정하여 정상 림프구에 대한 역가를 측정하였다.

상기 얻어진 CD43에 대한 두 항체 (DFT-1 및 YG5)의 역가를 유세포 분석기로 확인한 결과를 도 15에 나타내었다. 도 15에서 확인되는 바와 같이, DFT-1은 뉴라미니데이즈를 처리하기 전 높은 역가를 보였으나, 뉴라미니데이즈를 처리한 후에는 역가가 거의 나타나지 않은 반면, YG5는 뉴라미니데이즈를 처리하기 전에는 역가가 나타나지 않았지만, 뉴라미니데이즈를 처리한 후에는 16.16%의 역가가 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 항-CD43 항체(YG5)가 CD43 단백질의 sialylation된 항원결정부위를 인지하지 않음을 확인할 수 있으며, 이는 본 발명에 따른 항-CD43 항체가 정상 세포에는 결합하지 않고 암세포 특이적으로 결합하며, 특히 암 줄기세포 특이적으로 결합함을 보여주는 것이다.

실시예 12: CEACAM5와 CEACAM6에 대한 교차반응성 시험

CD43 단백질을 인지한다고 알려져 있는 5F1 클론은 CD43과 CEACAM6를 동시에 인지하고, 두 단백질의 fucosylation된 위치에 결합하는 것으로 알려져 있다. 항-CD43 항체가 CEACAM5와 CEACAM6 단백질과 교차반응을 보이는지 확인하고, 키푸넨신(kifunensine)과 푸코시데이즈(fucosidase)에 의한 CD43 항원결정부위의 glycosylation 변화에 의한 항-CD43 항체의 결합력의 변화를 확인하였다.

rCEACAM5-hFC(Sinobiologics, Cat. No: 11077-H03H-50)와 rCEACAM6-hFC (DinonA inc.) 재조합 단백질을 maxisrop ELISA plate에 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. rCEACAM5-hFC와 rCEACAM6-hFC 단백질이 코팅된 well에 IgG1, YG5, DFT-1, 9A6, 또는 8F5 단클론 항체(8F5:

Biomaterials, 2015 Oct, 67, 32-41, 9A6: SantaCruz Biotechnology, Cat. No: sc-59899)를 각각 well 당 100ng씩 넣어 주고 37℃에서 한 시간 반응 시킨 뒤 PBS로 수세하여 결합하지 않는 항원을 제거 하였다. 이후 Goat anti-Mouse IgG-HRP(Jackson)을 희석하여 넣어주고 30분 반응시킨 후 PBS로 수세한 뒤 TMB 용액을 well 당 50ul씩 넣어 10분간 반응시킨 후 황산 50ul를 넣어 반응을 중지시키고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

상기 얻어진 결과를 도 16에 나타내었다. 도 16에 나타난 바와 같이, 항-CD43 항체 (YG5)는 재조합 단백질 CEACAM5와 CEACAM6에 대한 반응성이 거의 없음 알 수 있다.

또한, CEM7 세포(ATCC에서 입수한 CCRF-CEM 세포 (CCL-119)를 single cell 배양하면서 CD43의 세포 표면 발현 수준이 original cell 대비 50% 이상 증가된 것으로 선별된 세포; 이하 동일함)에 fucosidase와 kifunensine을 처리한 후, 항-CD43 항체의 결합력의 변화를 시험한 결과, 결합력에 변화는 없음을 확인하였다. 이러한 결과는, 본 발명에서 제공되는 항체(예컨대, (항-CD43 항체 (YG5))가 CD43의 당 조건이 변화된 상태에서도 CD43과의 결합력을 유지함을 보이는 것이며, 이는 본 발명에서 제공되는 항체의 항원결합부위는 당에 비의존적임을 의미한다. 반면, 기존의 CD43 항체인 5F1은 당의존적인 에피토프 결합력을 보이는 것으로 알려져 있어서, 상기 결과로부터 본 발명에서 제공되는 항체가 기존 항체와 차별성을 가짐이 입증된다.

실시예 13: 위암세포 3차원 배양실험 (Tumor sphere assay)

위암 세포주인 NCI-N87세포를 실험하기 전에 150mm dish의 80~90%가 되게 준비한다. NCI-N87 세포는 1xTrypsin·EDTA를 처리하여 부유시킨 뒤 수세하였다. 준비된 NCI-N87세포를 media (DMEM/F12(GIBCO), B27(Invitrogen), EGF & bFGF (Invitrogen))로 재 부유한 뒤 6 well(ultra-low attached plate)에 1×10^5 /2ml로 분주한 후 37℃ CO₂ incubator에서 5일 동안 배양하였다. 광학현미경으로 각 well의 세포를 촬영하고, 1xTE 200ul single 세포화하여 PBS로 수세한 뒤, 정상 mouse 혈청을 1/50을 넣고 4℃에서 10분간 블로킹하였다. 이어서 세포를 100ul씩 유세포 분석 튜브에 분주하고 항-CD44 항체 (eBioscience, Cat. No: 17-0441-82)와

항-CD43 항체(YG5, DFT-1)를 각각 10ul, 1ul씩 넣어 4℃에서 15분간 반응시켰다. 상기와 동일한 방법으로 수세한 뒤 샘플당 1%(w/v) paraform aldehyde를 300ul의 양으로 넣어 세포를 고정한 뒤, 유세포 분석을 수행하였다.

상기 얻어진 결과를 도 18a (배양시 결과) 및 18b (5일간 배양 후의 결과)에 나타내었다. 각 도면의 상단은 현미경 촬영 이미지이고, 하단은 유세포 분석 결과를 나타낸 그래프이다. 도 18a 및 18b에서 보여지는 바와 같이, 5일 동안 tumor sphere 배양한 NCI-N87 세포를 유세포 분석한 결과 CD44와 CD43 더블 양성 세포의 증가가 확인 되었고, 시간이 지남에 따라 tumor colony를 형성하는 것이 확인되었다. 또한, tumor sphere를 형성함에 따라 CD43 발현이 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과는 종양 줄기세포에서 CD43 발현이 특이적으로 증가됨을 보여주는 것이다.

실시예 14: 현탁액 내 부유세포를 이용한 변형된 세포 결합력 측정 ELISA 프로토콜

이 분석법은 폴리-D-리신 plate에서 배경 신호 감소시키고 scFv 또는 IgG의 결합력을 평가하기 위한 ELISA 실험에 현탁액 내 부유 세포를 사용할 수 있는지 여부를 확인하기 위한 파일럿 연구로 설계되었다.

방법:

1. 세포 수집 단계.

- a. Cell을 50 mL falcon tube 에 담아 500xg에서 5분 동안 원심분리 하여 펠렛화시켰다 (pelleting);
- b. 상기 얻어진 cell pellet을 10ml PBS로 1회 씻어내고, 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다;
- c. 1ml PBS로 cells를 재현탁시킨 후, cell을 계수하였다 (counting cells);
- d. Blocking buffer (PBS+3%FCS) 로 세포를 희석시켰다 (세포 희석농도: 5×10^5 cell/well (10×10^6 cells/mL));
- e. V-bottomed 96-well plate에 well당 cell stock 50ul씩 첨가하였다.

2. Well 당 50uL의 주변 세포질 추출물(anti-CD43 scFv) 또는 IgG1 (원하는 최종 농도 x 2배 농축된 stock; 예를 들어, 최종 농도가 25ug/ml를 원하는 경우

50ug/ml stock 준비)를 넣었다 (Layout 분석법에 따라서, in duplicate 또는 triplicate로 준비함). 상기 샘플을 조심스럽게 4회 피펫팅하여 혼합하였다.

3. 실온에서 1시간 동안 배양하였다.

4. 500xg에서 5분동안 원심분리하여, cell을 펠렛화시켰다.

5. plate를 조심스럽게 뒤집거나 흡입(aspiration)을 통하여 상층액 (supernatant)을 제거하였다.

6. 200ul blocking buffer로 cell을 세척하고, 샘플을 4회 피펫팅하여 혼합하였다.

7. 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.

8. plate를 조심스럽게 뒤집거나 흡입을 통하여 상층액을 제거하였다.

9. Blocking buffer에 1:1,500 희석 희석시킨 anti-Flag HRP-conjugated 항체 100uL를 cell pellet에 첨가하여 조심스럽게 재현탁시키고, 실온에 30분 동안 배양하였다.

10. 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.

11. plate를 조심스럽게 뒤집거나 흡입을 통하여 상층액을 제거하였다.

12. 200ul blocking buffer를 넣어 조심스럽게 cell을 세척하고, 얻어진 샘플을 4회 피펫팅하여 혼합하였다.

13. 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.

14. plate를 조심스럽게 뒤집거나 흡입을 통하여 상층액을 제거하였다.

15. 200ul blocking buffer를 넣어 조심스럽게 cell을 세척하고, 얻어진 샘플을 4회 피펫팅하여 혼합하였다.

16. 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.

17. cell을 SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase substrate 80ul에 조심스럽게 재현탁시키고, 실온에서 5분동안 배양한 후, 1M HCl로 반응을 정지시켰다.

18. 표준 96-well plate에 샘플을 100ul씩 옮겼다.

19. 450nm에서 plate (흡광도)을 읽어주었다.

실시에 15: 현탁액 내의 부유 세포를 이용한 변형된 세포 결합력 측정

FACS 프로토콜

본 분석법은 폴리-D-리신 plate에서 배경 신호 감소시키고 scFv 또는 IgG의 결합력을 평가하기 위한 ELISA 실험에 현탁액 내 부유 세포를 사용할 수 있는지를 여부를 확인하기 위한 또 다른 방법으로 설계되었다.

방법:

1. 유세포 분석법 (Flow cytometry):

a. 세포 수집 단계:

i. 500xg에서 5분동안 원심분리하여 50ml 팔콘 튜브에 cell을 펠렛화시켰다 (pelleting);

ii. 상기 얻어진 cell pellet을 10ml PBS로 1회 씻어내고, 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다;

iii. 1ml PBS로 cells를 재현탁시킨 후, cell를 계수하였다 (counting cells);

iv. Blocking buffer (PBS+3%FCS) 로 세포를 희석시켰다 (세포 희석농도: 5×10^5 cell/well (10×10^6 cells/mL));

v. V-bottomed 96-well plates에 Cell을 well 당 50ul씩 첨가하였다.

2. Layout 분석 방법에 따라서, duplicate 혹은 triplicate로 well 당 50ul IgG를 넣어준 후 (원하는 최종 농도 x 2배 농축된 stock; 예를 들어, 최종 농도가 25ug/ml를 원하는 경우 50ug/ml stock 준비), 얻어진 샘플을 4회 피펫팅하여 혼합하였다.

3. 실온에서 30분 동안 인큐베이팅하였다.

4. Blocking buffer 200ul를 넣어주었다.

5. 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.

6. plate를 조심스럽게 뒤집거나 흡입(aspiration)을 통하여 상층액 (supernatant)를 제거하였다.

7. 200ul blocking buffer를 넣고 cell을 부드럽게 씻어낸 다음, 파이펫을 이용해 4번 정도 골고루 섞어주었다.

8. 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.

9. 배지를 제거해주었다.

10. Blocking buffer에 1:200으로 희석한 goat anti-human IgG Alexa Fluor 488 200ul를 Cell pellet에 넣고 조심스럽게 재현탁시키고, 빛이 차단된 곳에서 1시간

가량 ice에 놔두었다.

11. 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.
12. 배지를 제거해주었다.
13. 200ul blocking buffer를 넣고 cell을 부드럽게 씻어낸 다음, 파이펫을 이용해 4번 정도 골고루 섞어주었다.
14. 500xg에서 5분동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.
15. Blocking buffer 200ul를 넣고 cell pellet을 부드럽게 재현탁시켰다.
16. Flow cytometer를 이용해 plate를 읽어주었다.

실시예 16: soluble scFv preparations을 이용한 scFv flow cytometry

본 실시예는 CEM7 과 U937 cell (ATCC® CRL1593.2™)에 대한 scFv의 결합 정도를 시험한 것으로, *E. coli* periplasm에서 발현하는 soluble scFvs를 이용하였고, flow cytometry에 의한 scFv cell binding 분석을 위하여 디자인되었다.

방법:

1일차: 클론 접종

1. Starter culture plate:

- a. 200 ul 2YT (2x yeast extract) + 5%(w/v) 글루코스 + 엠포실린을 96-well culture plate에 채워주었다.
- b. 원하는 클론 (anti-CD43 (mJL1) scFv coding DNA: SEQ ID NO: 49; Sh741-112 scFv coding DNA: SEQ ID NO: 51; Sh145-112 scFv coding DNA: SEQ ID NO: 53; Sh146-112: SEQ ID NO: 55; 또는 Sh434-112 scFv coding DNA: SEQ ID NO: 57)과 함께 비교군이 될 수 있는 scFvs를 포함하여 well에 접종하였다.

2. 650rpm, 37°C 조건에서 shaking 하면서, 밤새도록 배양하였다.

2일차: scFvs의 발현

Periplasmic extract cultures:

3. Inoculate expression plates: periplasmic extract의 최종 용도에 따라서, 한 가지 샘플 당 한 개 이상의 well을 접종할 수 있다.

- a. 1.0mL /well of 2YT+Amp (no glucose)로 96 deep-well plate를 채워주었다.
- b. 종균 배양한 것을 OD₆₀₀에서 0.1값을 갖도록 희석한 뒤, 96well plate에

접종하였다. 650rpm, 30℃ 조건에서 2~4시간 동안 shaking 하면서 배양하였다. 주기적으로 OD plate에서 샘플을 채취하여 OD₆₀₀에서 혼탁도(turbidity)를 측정하였다. OD₆₀₀ 값이 0.7에서 1.0 사이가 되도록 세포를 키웠다.

4. 발현 Plates에서 scFv 발현의 유도:

a. periplasmic extract culture의 발현 유도를 위하여, IPTG(stock IPTG를 1:100으로 희석)를 첨가한 2YT+Amp을 발현 plate에 100ul씩 넣어준다.

b. 650rpm 및 22℃ 조건에서 shaking 하면서, 밤새도록 배양하였다.

3일차: periplasmic extract의 준비 및 flow cytometry

Periplasmic extractions:

5. periplasmic extract의 준비:

a. Cell을 2000xg에서 10분간 원심분리 하여 Pellet화시켰다.

b. 발현 plate에 있는 상층액을 표백제가 들어있는 용기에 털어내어 버리고, 페이퍼 타올 위에 올려 plate에 남아있는 배지를 제거해주었다.

c. 각각의 well에 75uL 차가운 PPB (Potassium Phosphate Buffer) + protease inhibitor (50mL당 1개 타블릿; cOmplete; Roche, Cat. No: 04693116001)을 넣어주고, 파이펫팅을 4번 정도 하여 재현탁시킨 후, 1000rpm 및 4℃ 조건에서 10분 동안 배양하였다.

d. 각각의 well에 225uL 차가운 H₂O + protease inhibitor (50mL당 1개 타블릿)을 넣어주고, 파이펫팅을 4번 정도 하여 재현탁시킨 후, 1000rpm 및 4℃ 조건에서 1시간 동안 shaking하면서 배양하였다.

e. Plate를 3000xg에서 10분동안 원심분리 해준다.

f. Periplasmic extracts (대략 270 uL)를 filter stack (ensure A1 orientation corresponds)에 옮겨 담아 주었다.

i. 윗 부분: 1.2um 96 well filter plate

ii. 중간 부분: 100K 96 well filter plate

iii. 밑 부분: 96-well, flat based standard plate.

g. Plate를 4000rpm에서 20분 동안 원심분리 해주었다.

h. (만약 필요하다면) flow cytometry 분석준비를 위해, 각각의 클론에 대한

샘플들을 모아준다.

6. Flow cytometry:

a. scFv samples: periplasmic extracts의 사용

b. 세포의 수집:

i. Cell을 50 mL falcon tube 에 담아 500xg에서 5분 동안 원심분리 하여 펠렛화시켰다 (pelletting).

ii. 10 mL PBS를 이용하여 cell pellet을 한 번 씻어주고, 500xg에서 5분 동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.

iii. 1 mL PBS에 cell을 재현탁시킨 후, cell을 계수하였다 (counting cells).

iv. Cell을 0.5×10^5 cells/well (2.5×10^6 cells/mL)로 희석하였다.

v. V-bottomed 96-well plates에 well 당 20ul cell stock을 넣어주었다.

c. periplasmic extract를 well 당 20ul씩 duplicate(scFv)로 넣어주었다.

그리고 파이프팅을 4번 정도 하여 샘플을 부드럽게 섞어주었다.

d. 실온에서 30분 동안 놔두었다.

e. 180 uL Blocking buffer를 넣어주었다.

f. 500xg에서 5분 동안 원심분리하여 cell을 펠렛화시켰다.

g. plate를 조심스럽게 뒤집거나 흡입(aspiration)을 통하여 상층액 (supernatant)을 제거하였다.

h. Cell에 200uL blocking buffer를 넣고 부드럽게 씻어 내어주고, 파이프팅을 4번 정도하여 샘플이 골고루 섞일 수 있도록 하였다.

i. Cell을 500xg에서 5분 동안 원심분리하여 펠렛화시켰다.

j. 배지를 제거하였다.

k. 미리 준비해 놓은 binding buffer에 5ug/mL anti-Flag PE-conjugated antibody(BioLegend, Cat. No: 637310)를 50ul를 넣어 cell을 부드럽게 재현탁시켰다. 이 항체는 빛에 민감하기 때문에, plate는 빛으로부터 최대한 보호되어야 한다. 빛으로부터 보호된 상태에서 30분 동안 ice에 놔두었다.

l. Cell을 500xg에서 5분 동안 원심분리하여 펠렛화시켰다.

m. 배지를 제거하였다.

n. Cell에 200uL blocking buffer를 넣고 부드럽게 씻어 내어주고, 파이프팅을

4번 정도하여 샘플이 골고루 섞일 수 있도록 하였다.

o. Cell을 500xg에서 5분 동안 원심분리하여 펠렛화시켰다.

p. Cell에 200 μ L blocking buffer를 넣고 부드럽게 재현탁시켰다.

q. Guava flow cytometer (//Merckmillipore)를 이용하여 plate를 읽어주었다.

노란색의 형광을 인지할 수 있도록 flow cytometer는 미리 준비되어야 한다.

실시에 17: 주형이 되는 murine anti-CD43 antibody의 기능적인 특징

본 실험은 항체 치료에 적합하 표적 epitope(JL-1)를 검증하기 위하여 수행되었다. 본 실험에서는 상기 에피토프에 결합하는 mouse anti-CD43 단클론 항체 (중쇄: SEQ ID NO: 34; 중쇄 코딩 DNA: SEQ ID NO: 33; 중쇄 발현벡터 (pTT5 based): SEQ ID NO: 35; 경쇄: SEQ ID NO: 37, 경쇄 코딩 DNA: SEQ ID NO: 36; 경쇄 발현벡터 (pTT5 based): SEQ ID NO: 37)가 사용되었다.

JL-1 항원(CD43)을 37°C에서 4시간 동안 배양했을 때, 세포로부터 유의미한 양의 항원이 누출되지 않는 것을 확인하였다. Western blot 분석법을 통해서 buffer에 섞여있는 anti-CD43 항체와 실제 Molt-4(CD43+ 급성 림프구성 백혈병 세포주; ATCC, CRL-1582) 또는 HL-60 (ATCC)의 상층액에 섞여있는 anti-CD43 항체를 비교해봤을 때, 크기 측면에 있어서 크게 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다 (//관련 데이터 제공이 가능한지 확인 부탁드립니다, 가능하다면 구체적인 실험 과정과 함께 알려주시기 바랍니다).

또한, 정상적인 사람의 혈청 내에서 순환하고 있는 JL-1 항원 (CD43)의 양이 항-CD43 항체가 표적에 결합하는 것을 유의미하게 방해할 정도로 충분하지 않다는 것을 확인하였다. 백혈병 세포에 결합하는 항-CD43 항체에 대한 50% 사람 혈청의 효과를 in vitro 상에서 평가하였다 (IF (immunofluorescence) reactivity 측정). 상기 얻어진 결과를 표 2에 나타내었다.

[표 2]

JL-1(CD43)이 백혈병 세포와 결합하는데 있어 정상적인 사람 혈청의 효과			
세포주	JL-1 (CD43) ug/ml	IF reactivity	
		No human serum	50% human serum
Molt-4	50	++	ND*
"	25	++	ND

"	12.5	++	++
"	6.25	+/++	+/++
HL-60	50	+	ND
"	25	+	ND
"	12.5	+	+/-
"	6.25	+/-	+/-

* ND, Not determined

상기 표 2에 나타난 바와 같이, 혈청이 항-CD43 항체가 Molt-4 세포 또는 HL-60 세포에 결합하는 것을 방해하지 않음을 확인할 수 있다.

또한, conjugation이 되지 않은 naked 항-CD43 항체가 분리된 표적 세포에 대하여 직접적인 세포독성 효과를 가지지 않는 것을 확인하였다. 이를 위하여, 96-well plate에 CD43+ CEM7 세포 (CEM7-high antigen로 표시) 및 CCRF-CEM 세포 (original CEM 세포 (ATCC); CEM7-medium antigen로 표시)를 각각 40,000 cells/well의 양으로 넣고 마우스 CD43 항체(앞서 준비된 mouse anti-CD43 단클론 항체)를 계열 희석하여 처리하였으며, 세포독성은 배양 3일차에 Cell Titer Glo (Promega™)를 사용하여 결정하였다. 비교를 위하여 CD43을 낮은 농도로 발현하는 H9K 세포 (H9K-low antigen)에 대하여 동일한 시험을 수행하였다.

상기 얻어진 결과를 도 18에 나타내었다. 도 18에 나타난 바와 같이, 마우스 CD43 항체는 CD43+ CEM7 (CEM7-high antigen) 이나 CCRF-CEM 세포(CEM-medium antigen; CEM7 세포에 비해 CD43이 덜 발현되어 있음)에 대해 세포독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있다.

CEM7, CCRF-CEM, Nalm6 (ATCC, CRL-3273) 및 HL-60 (ATCC, CCL-240)등의 세포주는 각기 다른 JL-1 항원(CD43) 발현 수준을 나타낸다 (기재된 순서대로 고발현부터 저발현순이다). 각 세포 (20,000개)에 saporin 접합 항-CD43 항체 (접합체 제작은 실시예 3-1 참조; 항-CD43 항체는 앞서 준비된 mouse anti-CD43 단클론 항체임) 또는 Isotype control을 20 ug/mL부터 희석된 농도로 처리 하고, 배양 3일차에 세포 생존률을 Cell Titer Glo를 사용하여 측정하였다. 상기 비교를 위하여 사용된 Isotype control로서 마우스 IgG1을 사용하였다.

상기 얻어진 결과를 도 19에 나타내었다. 도 19에 나타난 바와 같이, Saporin 접합 항-CD43 항체 (도 19에 mJL-1으로 표시) 처리시에, CEM7의 세포

생존률이 가장 크게 감소하는 것으로 관찰되었으며, CEM과 NALM6 세포가 그 뒤를 이었다. 표적을 발현하지 않는 HL-60에서는 가장 낮은 세포독성 (가장 낮은 세포 생존률 감소)이 관찰되었다. 도 19에서와 같이, 독소가 연결되어 있는 항-CD43 항체는 표적 세포의 사멸을 유도한다. Saporin이 연결되어 있는 항-CD43 항체를 처리한 CEM7, CCRF-CEM, Nalm-6 및 HL-60 세포는, 세포에 존재하는 항원의 발현량에 비해서 효과적으로 세포를 사멸시킬 수 있는 활성을 보여주고 있다. Saporin는 세포 내로 유입된 경우에만 세포 독성 효과를 발휘한다.

항-CD43 항체의 internalization을 시험하였다. 마우스 항-CD43 항체 (앞서 준비된 mouse anti-CD43 단클론 항체)를 30분 동안 냉장상태에서 세포 (CEM7)에 처리하고 37°C 조건으로 옮긴 후, 도 20의 x축에 표시된 각각의 시간 때에 10^6 세포를 취하여 냉장온도에서 anti-mouse IgG-PE 이차항체(Santa cruz biotechnology, Cat. No: SC3738)를 10분간 처리하고, 세포를 세척하고 고정한 뒤, 유세포분석기로 분석하였다 (실시에 15 참조).

상기 얻어진 결과를 도 20에 나타내었다. 도 20에 나타난 바와 같이, 항-CD43 항체는 항원에 결합하게 되면 세포 내부로 들어가게 되는데, 해당 데이터는 시간이 지남에 따라 세포 표면에 있는 항체가 세포 내부로 들어가 사라지는 정도를 측정하여 보여주고 있다. 데이터는 도 19에서 참조한 것과 같이, 세포사멸 분석에 있어서 항-CD43 항체 (mouse 항체와 humanized 항체 두 경우 모두)의 internalization을 증명하고 있다.

한편, 항원을 발현하는 세포에서 항-CD43 항체에 의하여 유도되는 동종 세포응집 현상을 시험하였다. 이를 위하여, 300,000개 세포(CEM7, CCRRF-CEM, 또는 HL-60)에 항-CD43 항체 (앞서 준비된 mouse anti-CD43 단클론 항체) 40 ug/mL 시작 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양한 후, 정해진 시간(항체 처리 2시간 경과시점)에 현미경 사진을 찍어서 이미지를 얻었다. 상기 얻어진 이미지를 도 21에 나타내었다. 도 21은 항-CD43 항체(항-JL-1 항체로 표시)에 의하여 유도되는 동종 세포응집 현상을 보여주는 이미지로, 항-CD43 항체가 in vitro에서 CD43 발현 cell의 homotypic aggregation을 유도하고, 그 정도는 항원(CD43)의 발현수준과 관련이 있음을 보여준다.

또한, 사람 정상 골수 세포에서의 CD43 발현 양상을 시험하였다. 정상 골수의 단핵구를 마우스 항-CD43 항체(앞서 준비된 mouse anti-CD43 단클론 항체)로 염색한 후, 뒤를 이어 Goat-anti-mouse IgG F(ab)2-PE(Jackson, Cat. No: 115-035-072)로 염색하여 실시예 15에 기재된 방법으로 관찰하였다.

상기 얻어진 결과를 도 22에 나타내었다. 도 22에서 Histogram overlay는 림프구로 국한하여 표현한 것이다. 도 22에서 보듯이, 다수의 normal bone marrow 시료에서 항-CD43 항체 (JL1로 표시) 염색으로 측정했을 때, 낮지만 heterogeneous한 CD43의 발현을 확인 할 수 있고, 몇몇의 peripheral blood cell에서도 확인 된다. 즉 상기 결과는 정상 골수 세포에서의 낮고 이질적인 CD43 발현을 보여주는 결과라 할 수 있다.

한편, 다수의 사람 normal bone marrow 시료(서울대병원)에서 flow cytometry로 CD34+CD38- cell (FACS로 시험하여 CD43 발현 및 CD38 비발현 세포로 선별된 조혈모세포; 이하 동일함)의 CD43 발현을 측정 함으로써, hematopoietic stem cell에서 식별되는 CD43 protein 발현이 결핍된 것을 확인하였고, bone marrow에서 군집을 형성한 precursor cell에서도 발현의 결핍을 확인하였다. 상기 확인 방법을 간단하게 기재하면 다음과 같다: 30 NSG mice(NOD/SCID x common g chain 결핍)에 0일째에 태줄 조혈모세포를 접종하였다. 12주 후에, 모든 mice의 PBL(Peripheral Blood Lymphocyte)이 최종 분화된 immune cell로 분석 되었다. 시험에 사용된 모든 mice는 면역체계가 환원되었고, 4주동안 항-CD43 항체(앞서 준비된 mouse anti-CD43 단클론 항체)-toxin(사포린) conjugate 또는 vehicle (PBS)을 투여하였다. 처리한지 4주 뒤에, 면역세포 존재 하에 면역동물들을 분석하였다. 비교를 위하여, 항-CD43 항체 대신에 mouse IgG1-toxin (사포린) 접합체를 사용하여 동일한 시험을 수행하였다.

상기 얻어진 결과를 아래의 표 3에 나타내었다:

[표 3]

16 weeks PBL	% of viable cells (SD)			
	B cells	T cells	Monocytes	PMNs
JL1-Toxin	32 (11)	16 (4)	2.9 (2)	1.7 (1.2)
Isotype-Toxin	31 (5)	17 (6)	4.5 (4)	2.1 (1.0)
Vehicle	28 (8)	20 (9)	2.8 (1)	1.4 (0.4)

16 weeks LN	% of viable cells (SD)			
	B cells	T cells	Monocytes	PMNs
JL1-Toxin	36 (15)	31 (11)	0.3 (0.8)	1.6 (1.0)
Isotype-Toxin	38 (10)	39 (10)	0.1 (0.2)	0.9 (0.4)
Vehicle	34 (13)	37 (15)	0.2 (0.3)	1.3 (1.6)

(상기 표에서, JL1은 CD43을 나타냄; PMN: polymorphonuclear leukocyte; LN: lymph node)

상기 표 3에서 보듯이, cord blood stem cell로부터 얻어진 normal human Hematopoietic stem cells (HSCs)로 NSG mice를 환원하고 4주 동안 항-CD43 항체-toxin(사포린) 접합체를 처리 했을 때, 조혈구획의 어떠한 손실도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 항-CD43 항체-toxin(사포린) 접합체가 조혈모세포나 중간전구체세포를 사멸시키지 않음을 보여준다.

다양한 사람 정상조직에서 마우스 항-CD43 항체를 사용하여 면역조직화학법(IHC)을 수행하였으며, 얻어진 결과를 아래의 표 4에 나타내었다.

[표 4]

Tissue type	# positive	Intensity
Cerebellum	0/3	
Adrenal gland	0/3	
Ovary	0/3	
Pancreas	0/3	
Parathyroid gland	0/3	
Pituitary gland	0/3	
Testis	0/3	
Thyroid	0/3	
Breast	0/3	
Spleen	0/3	
Tonsil	0/3	
Thymus gland	3/3	+++
Bone marrow	0/3	
Lung	0/3	
Heart	0/3	
Esophagus	0/3	
Stomach	0/3	
Sm. Intestine*	0/3	
Colon*	0/3	
Liver	0/3	
Salivary gland	0/3	
Kidney	0/3	
Prostate	0/3	
*mucin staining		

상기 표 4에서 보듯, 흉선 이외에 다른 어떤 조직에서도 CD43에 대해 특정적으로 염색되는 것을 찾을 수 없었다.

두 개의 정상 인간 PBMC (peripheral blood mononuclear cell) 샘플을 마우스 항-인간 CD43 (JL-1로 표시: (d))으로 염색하여, CD43 항원의 발현율을 측정하였다 (실시에 15 (FACS) 참조). 얻어진 결과를 도 23에 나타내었다. 도 23에 나타난 바와 같이, 낮은 발현율을 확인할 수 있다.

정상 골수세포에 saporin을 결합시킨 마우스 항-CD43 항체 (10ul/ml)를 미리 처리한 경우 (JL1+)와 미리 처리하지 않은 경우 (JL1-)의 골수하위집합(subset)의

콜로니 형성 정도를 측정하였다. 사람로부터 골수를 분리하고 백혈구를 수확하고, CD34+ 세포는 JL-1 (CD43) 양성과 음성으로 나누어 분리수확하고, 수확한 세포를 cytokine과 함께 Methocult에 넣어준 후 측정하였다. 상기 얻어진 결과를 도 24에 나타내었다. 도 24에 나타난 바와 같이, saporin을 결합시킨 항-CD43 항체를 미리 처리한 경우 (JL1+)에 골수하위집합(subset)의 콜로니를 형성하지 않은 것을 확인할 수 있다.

한편, 세포주를 이용한 백혈병 ALL xenograft 마우스 모델 (CEM7 세포를 마우스에 이식하여 얻어진 급성백혈병 마우스 모델)에서 항-CD43 항체 자체 (naked)와 독소가 결합된 항-CD43 항체-독소(debouganan) 접합체의 치료 효과를 시험하였다. 상기 항-CD43 항체로서 앞서 준비된 mouse anti-CD43 단클론 항체를 사용하였다. 상기 얻어진 결과를 도 25에 나타내었다. 도 25에서 항-CD43는 JL1로 표시하였다. 도 25에서, (A)는 CEM7 leukemia model에서의 결과를, (B)는 NALM-6 model (Cell line: NALM6 (B-ALL))에서의 결과를 각각 보여주며, 시험은 다음의 조건 하에서 수행하였다: Mice: NOD-SCID (8/group); 접종: 0일차 10^7 cells; 투여: 15ug/injection + 100ug bulk IgG i.v. 1x/week starting day 8; 종료시점: 마비상태. 도 25에서 보듯이, CEM7 또는 NALM-6 cell을 접종한 ALL xenograft 모델 mice에 naked(non-conjugate) anti-CD43 항체를 처리 하면, 병이 발생하지 않거나 지연된다.

한편, 주요 AML (Acute myeloid leukaemia) blast와 하위 집합물(subset)에서의 CD43 발현 정도를 측정하였다. 상기 결과를 도 26에 나타내었다. 도 26에서 보여지는 바와 같이, CD43 protein (JL1로 표시) 발현이 primary AML blast와 특정 부분집합의 prevalence에서 분석되었다. 대략 60%의 AML군에서 CD43이 발현되었다.

실시예 18: Humanized anti-CD43 monoclonal antibody의 제작

mouse CD43 항체 (중쇄: SEQ ID NO: 34; 중쇄 코딩 DNA: SEQ ID NO: 33; 중쇄발현벡터: SEQ ID NO: 35, 경쇄: SEQ ID NO: 37; 경쇄 코딩 DNA: SEQ ID NO: 36; 경쇄 발현벡터 (pTT5 based): SEQ ID NO: 38) 의 중쇄, 경쇄 각각의 CDR 부위 서열(CDRH1: SEQ ID NO: 111 (GYFMN); CDRH2: SEQ ID NO: 114 (RINPNNGDSFYNQKFQG); CDRH3: SEQ ID NO: 118 (EGYYGGRGYALDY); CDRL1:

SEQ ID NO: 119 (RTSQDISNYLN); CDRL2: SEQ ID NO: 121 (NTSRLHS); CDRL3: SEQ ID NO: 125 (QQSNMFPY))을 유지하고, 사람 항체 유전자를 코딩하고 있는 germline의 서열을 기반으로 Framework region 에 대한 부위 서열을 재조합한 scFv 형태의 재조합 휴머니이드 항체 라이브러리를 제작하였다.

제작된 scFv 항체 라이브러리는 통상적인 phage display 방법으로 발현시키고 스크리닝하였으며, 양성으로 검출된 클론으로 CDR 외 부위 또는 일부 CDR 내 부위 서열을 치환시킨 variants를 표현하는 서브-라이브러리(sub-library)를 제작하여 스크리닝을 반복하였다.

이러한 library 제작과 display 방법의 여러 사이클을 반복함으로써 모클론 항체와 매우 유사한 항원친화도를 보이는 휴머니이드 항체 variant 서열들을 확보하였다.

상기 확보된 인간화 항-CD43 항체의 중쇄 서열을 SEQ ID NOs: 40, 42, 44, 및 46에 나타내었으며, 경쇄 서열을 SEQ ID NO: 48에 나타내었으며, 중쇄가변영역과 경쇄가변영역을 각각 SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 및 83 (중쇄가변영역), 및 SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 및 83 (경쇄가변영역)에 나타내었다.

또한, 변형된 SEQ ID NO: 83 (중쇄가변영역) 및 SEQ ID NO: 95 (경쇄가변영역)으로부터 변이된 인간화 항-CD43 항체의 변이체의 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 각각 SEQ ID NOs: 84 내지 94 (중쇄가변영역) 및 SEQ ID NOs: 96 내지 106 (경쇄가변영역)에 나타내었다.

scFv 형태의 항체는 상기 얻어진 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 GGGASGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 127) 또는 GGGGSGGGGSGGGAS (SEQ ID NO: 128)로 연결시켜서 제조하였다.

실시예 19: Humanized 또는 chimeric anti-CD43 monoclonal antibody에 의한 항체의존세포독성(ADCC; Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity)과 보체의존독성(CDC; Complement-Dependent Cytotoxicity).

상기 제조된 키메라 항-CD43 항체 (DNP001; 실시예 2-1-3)에 의한 세포 사멸효과(ADCC and CDC)를 시험하였다. 우선 CEM7 세포주를 효과기

세포(PBMC; peripheral blood mononuclear cell)와 항-CD43 키메라 항체 또는 대조군(human IgG1)과 함께 4시간 동안 배양한 후, 세포독성을 Cell Titer Glo를 사용하여 측정하여, 그 결과를 도 27의 A에 나타내었다. 결과이며, B는 CEM7 세포주를 배양배지와 항-CD43 키메라 항체를 토끼 보체(cedarlane, Cat. No: CL3051)와 함께 배양한 후, 세포독성을 Cell Titer Glo를 사용하여 측정하여, 그 결과를 도 27의 B에 나타내었다. 도 27에서 항-CD43 키메라 항체를 JL-1로 표시하였다. 도 27에서 보듯이, chimeric anti-CD43 antibody가 human IgG1 대조군 항체와 비교 해서 effector-mediated killing(ADCC와 CDC)를 in vitro수준에서 유도함을 확인할 수 있다.

도 28은 탈푸코실화 (항체에 Kifunensine을 처리하여탈푸코실화시킴) 되었을 때 chimeric anti-CD43 antibody (JL-1로 표시)가 in vitro수준에서 CEM7에 대한 ADCC활성이 강화됨을 보여준다.

도 29는 in vivo에서 아무것과도 결합하지 않은 키메라 항체 자체의 CEM7 세포주에서의 효과를 나타낸 그래프이다. 도 29에서 보듯이, naked(non-conjugated)와 debouganin-conjugated chimeric anti-CD43 항체가 CEM7 cell이 접종된 동물(ALL (acute lymphocytic leukemia) 백혈병 모델)의 생존을 향상시키는 것이 확인되었다.

백혈병 줄기세포(Leukemia stem cell; LSC) 하위집합(subset)에서의 CD43 발현을 시험하였다. AML (Acute myeloid leukemia) 환자 골수는 CD45 항체(BD), CD34 항체(BD), CD38 항체(BD), CD43 항체(DNP001), 또는 mIgG1 (control)을 Alexa488로 염색하여 관찰하였고, CD34+CD38- 백혈병 줄기세포를 구획화하여 CD43 발현정도를 평가하고, 대조군과 비교하여 나타내었다. 상기 결과를 도 30에 나타내었다 (JL1: CD43). 도 30에서 보듯이, CD43 항원이 leukemia-initiating cell(LSC) 부분 집합(CD34+/CD38-)에서 발현된다.

in vitro에서 독소(사포린: SAP)와 접합한 chimeric 항-CD43 항체(CCC)를 이용한 콜로니 평균 개수를 측정하여 도 31에 나타내었다. 상기 결과는 항원-양성 AML의 세포사멸효과를 보여주며, 세포는 CD43 항체-사포린 접합체 또는 마우스 IgG1-사포린 접합체와 함께 줄기세포 콜로니 matrix에 넣어주어 관찰하였다.

또한 in vitro에서 독소(사포린: SAP)를 접합시킨 chimeric 항-CD43 항체(CCC)가 항원양성인 주요 AML의 증식에 미치는 영향을 측정하여 도 32에

나타내었다. 상기 결과는, 상기 CCC가 주요 AML의 증식을 감소시킴을 보여준다. 상기 결과는 주요 AML 아세포(blast)를 CD43 항체-사포린 접합체 또는 마우스 IgG1-사포린 접합체가 포함된 배양배지에 넣고, 3일후에 세포 증식 정도를 측정하여 얻어진 것이며, 상기 결과로부터 JL1-사포린을 포함한 배지에서 배양시 세포 성장이 느려지고 (A), 사멸세포의 비율이 증가함 (B)을 확인할 수 있다.

상기 도 31 및 32에서 보듯이, in vitro에서 colony assay(도 31)와 proliferation assay(도 32)로 확인 해 보면, toxin-conjugated humanized chimeric 항체는 CD43-positive primary AML에 대하여 세포독성이 있다.

NSG 마우스에서 독소가 결합된 항체에 의한 주요 AML 암세포 성장의 억제 효과 (in vivo)를 시험하였다. CD43+ AML 환자로부터 5×10^7 개의 골수세포를 수확하고, 방사선 조사를 받은 NSG 마우스 30마리에 정맥주사하고 8주후에 상기 마우스에 chimeric CD43 항체-debougananin (DB) 접합체 (JL1-DB로 표시), hIgG1-DB 접합체 (Isotype-DB로 표시), 또는 PBS(vehicle)를 4주간 45ug 용량으로 매주 투여한 후, 혈액과 골수와 비장을 취하여, 생착과 종양생성을 관찰하였다. 상기 얻어진 결과를 도 33에 나타내었다. 도 33에서 보듯이, primary AML 암세포의 성장은 in vivo수준의 NSG mice에서 toxin-conjugated anti-CD43 humanized chimeric antibody에 의해 저해한다.

도 34 및 35는 다양한 인간화/최적화된 변형 항체가 주형(마우스) CD43 항체와 비교했을 때 동등한 바인딩 프로파일을 나타냄을 확인하였다. CEM7 세포를 부모 주형 CD43 항체(ART140 JL1; mouse anti-CD43 항체; 중쇄: SEQ ID NO: 34; 경쇄: SEQ ID NO: 37)와 3종류 인간화로 변형시킨 항체 (257-10 (SEQ ID NO: 93 & 105); 456-D10 (SEQ ID NO: 94 & 106); ComboA(SEQ ID NO: 2 & 4))로 염색하여 형광세기를 측정하여, 그 결과를 도 34에 나타내었다. 도 34에서 보여지는 바와 같이, 변형된 "Combo A"가 가장 좋은 프로파일을 보이지만, 이 외의 다른 시험 항체들도 모두 CEM7 세포에서 세포 독성을 유의미한 정도로 나타냄이 확인되었다. 세포 독성물질과 접합된 항체의 세포 내재화를 시험하기 위하여, 분석최종 3종의 변형 항체와 사포린과의 접합체를 anti-human IgG-saporin과 미리 혼합한 후, CEM7 세포에 처리하여 3일 후에 세포독성을 측정하여, 도 35에 나타내었다. 도 35에 나타낸 바와 같이 3종의 변형 항체와 사포린과의 접합체를

사용한 경우 세포 독성이 현저하게 높은 것으로 나타났다.

도 34 및 35에서 보듯이, 다양한 humanized anti-CD43 antibody variant들의 binding 수준과 in vitro에서 세포독성 수준은 murine CD43 항체(ART140 JL1)과 비교했을 때 동등하였다. RSV F protein의 A antigenic site에 있는 항원 결정기에 대한 humanized monoclonal antibody(IgG)인 Synagis는 대조군으로 사용되었다.

도 37a와 37b는 다수의 humanized anti-CD43 항체 variant들 (도 36 참조)은 murine CD43 항체(ART140 JL1)와 비교했을 때, cell 표면에 있는 CD43 항원에 결합함을 flow cytometry를 통하여 보여준다. U937 세포는 표면에 CD43 항원의 발현이 결핍된 negative control로 사용되었다.

도 38a와 37b는 다수의 humanized anti-J CD43 항체 variant 들 (도 36 참조)은 murine CD43 항체(ART140 JL1)와 비교했을 때, cell 표면에 있는 CD43 항원에 결합하는 것을 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)를 통해 보여준다. U937 세포는 표면에 CD43 항원의 발현이 결핍된 negative control로 사용되었다.

도 39a 및 39b는 Quickchange mutant humanized anti-CD43 항체 variant (Combo A (SEQ ID NO: 91 (중쇄가변영역); SEQ ID NO: 103 (경쇄가변영역)), Combo B (SEQ ID NO: 91 (중쇄가변영역); SEQ ID NO: 103 (경쇄가변영역)), Combo C(SEQ ID NO: 85 (중쇄가변영역); SEQ ID NO: 97 (경쇄가변영역))), murine CD43 항체(ART140 JL1)와 round 3 parental framework와 비교했을 때, cell 표면에 있는 CD43에 결합하는 것을 flow cytometry를 통해 보여준다.

도 41a-41c는 Quickchange mutant humanized anti-CD43 항체 variant (Combo A, Combo B, Combo C)들은 murine CD43 항체(ART140 JL1)와 round 3 parental framework와 비교했을 때, cell 표면에 있는 JL1 항원에 결합하는 것을 ELISA를 통해 보여준다.

실시예 20: 인간화 항체의 당화부위 아미노산 잔기 제거 변이 항체 제조

실시예 18에서 얻어진 인간화 항-CD43 항체(257-10; SEQ ID NO: 93 (중쇄가변영역) + SEQ ID NO: 105 (경쇄가변영역) 포함)의 경쇄가변영역 (SEQ ID NO: 105)에 당화(glycosylation) 가능성 있는 아미노산 서열이 있음을 발견하고, 이를 제거하기 위한 변이 (mutant) 항체를 제조하였다.

경쇄항원결합부위 (경쇄가변영역)의 당화는 항체의 항원 결합능력 및 항체 물성에 부정적인 영향을 초래할 가능성이 높으며, 추후 대량 생산 시 생산성 저하에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 잠재적인 당화 가능성이 있는 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써 치료제로서의 항체 개발 가능성을 높일 수 있다.

인간화 항-CD43 항체의 경쇄가변영역 (SEQ ID NO: 105)의 당화(glycosylation) 가능성 있는 아미노산으로서 50번째 위치의 아미노산 잔기 아스파라진(Asn, N)과 52번째 위치의 아미노산 잔기 세린(Ser, S)를 선택하였다 (도 43 참조). 상기 변이 항체는 SEQ ID NO: 8의 50번째 위치의 아미노산 잔기 아스파라진(Asn, N)을 글루타민 (Gln, Q) 또는 알라닌 (Ala, A)으로 치환, 및/또는 52번째 위치의 아미노산 잔기 세린(Ser, S)을 알라닌 (Ala, A)으로 치환하여 제조하였으며, 이와 같이 얻어진 변이 항체의 경쇄가변영역을 SEQ ID NOs: 107 (S52A), 108 (N50Q), 및 109 (N50A)에 나타내었다.

[SEQ ID NO 107 (S52A)]

DTQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRTSQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYNTA
RLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNMFPYTFGQGTKLEIK

[SEQ ID NO 108 (N50Q)]

DTQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRTSQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYQTSR
LHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNMFPYTFGQGTKLEIK

[SEQ ID NO 109 (N50A)]

DTQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRTSQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYA^ATSR
LHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNMFPYTFGQGTKLEIK

중쇄가변영역 (SEQ ID NO: 93)과 상기 얻어진 변이항체의 경쇄가변영역을 포함하는 IgG1 형태 항체를 제작하고, 당화부위에 결합하는 콩카나발린 에이 (Concanavalin A)-HRP (Sigma-Aldrich)를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

상기 얻어진 결과를 도 44에 나타내었다. 도 44에 나타난 바와 같이, 당화 부위 아미노산에 변이시키지 않은 항체 (SEQ ID NO: 93 및 SEQ ID NO: 105 포함; wild type)에서는 경쇄 부위 및 중쇄 부위 모두 콩카나발린 에이 (Concanavalin A)이 결합하였으나, 상기 세 종류의 변이 항체 (scFv)에서는 경쇄 부위에서 결합이 일어나지 않음을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 항체의 경쇄 부위의 당화가 제거되었음을 의미한다.

또한, 상기 변이항체의 CD43 양성 세포인 CEM7 세포와의 결합력을 측정하여, 항원 결합력을 분석하였다. 상기 얻어진 결과를 도 45에 나타내었다. 도 45에 나타난 바와 같이, 상기 변이항체는 wild type과 동등 정도의 항원 결합력을 보인다.

키메릭 항체(DNP001)와 당화 제거한 변이 인간화 항체 (중쇄가변영역; SEQ ID NO: 93; 경쇄가변영역: SEQ ID NO: 109)을 항원(CD43) 양성 세포인 CEM7 세포에 결합시키고 Flow cytometer로 분석하였다. 상기 얻어진 결과를 도 46에 나타내었다. 도 46에 나타난 바와 같이, 변이 인간화 항체가 키메릭 항체보다 더욱 향상된 CD43 발현 세포 결합력을 보임을 확인할 수 있다.

특허절차상 미생물 기탁의
승인에 관한 부다페스트 조약

국제용 양식

수 신: 박 승 혜

대한민국 서울 종로구 연건동 28
서울대학병원 병리학과
(우) 110-799

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

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: H-JL1	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCLRF-BP-00010
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
<p>상기 I 에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다.</p> <p>[X] 과학적 성질</p> <p>[X] 분류학상 위치</p> <p>(적용대상에 체크할 것)</p>	
III. 수령 및 수탁	
<p>본 국제기탁기관은 상기 I .에 표시된 미생물을 수탁받고 1997년 1월 13일 (원기탁 일자)¹ 수령하였다.</p>	
IV. 국제기탁기관	
<p>명칭: 한국 세포주연구재단</p> <p>주소: 대한민국 서울시 종로구 연건동 28 서울의과대학교 (우) 110-744</p>	<p>국제기탁기관을 대표하는 권한을 가지거나 권한을 부여받은 담당자의 날인:</p> <p>날짜: 1997년 1월 14일</p>

¹조약 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.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하며, SEQ ID NO: 134의 아미노산 서열 내의 연속하는 6 내지 9개 아미노산으로 이루어진 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 포함하는, 고형암치료용 약학 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131 내지 134 중에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 고형암 치료용 약학 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 110의 CDR1H, SEQ ID NO: 113의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 120의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 고형암 치료용 약학 조성물.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 121, 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 고형암 치료용 약학 조성물.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 가변영역의 당화 모티프가 변형된 것인, 고형암 치료용 약학 조성물.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 고형암 치료용 약학 조성물.

【청구항 7】

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고형암은 위암, 유방암, 폐암, 대장암, 간암 및 담낭암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 또는 방광암인, 고형암 치료용 약학 조성물.

【청구항 8】

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성물질 및 표지물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는, 고형암 치료용 약학 조성물.

【청구항 9】

제8항에 있어서, 상기 세포독성물질은 리신(ricin), 사포린(saporin), 젤로닌(gelonin), 모로딘(momordin), 데보가닌 (debouganin), 디프테리아독소, 녹농균독소(pseudomonas toxin), 방사선동위원소, 듀오카마이신(duocarmycin), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F; MMAF), N2'-디아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)메이탄신(N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxo propyl)maytansine; DM1), 및 PBD (Pyrrolobenzodiazepine) dimer로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 고형암 치료용 약학 조성물.

【청구항 10】

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 고형암의 암줄기세포 저해 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 고형암 치료용 약학 조성물.

【청구항 11】

SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하며, SEQ ID NO: 134의 아미노산 서열 내의 연속하는 6 내지 9개 아미노산으로 이루어진 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 포함하는, 암줄기세포 저해용 약학 조성물.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131 내지 134 중에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 암줄기세포 저해용 약학 조성물.

【청구항 13】

제11항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID

NO: 110의 CDR1H, SEQ ID NO: 113의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 120의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 암줄기세포 저해용 약학 조성물.

【청구항 14】

제11항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 121, 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 암줄기세포 저해용 약학 조성물.

【청구항 15】

제11항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 경쇄가변영역의 당화 가능한 아미노산 잔기가 당화되지 않는 아미노산 잔기로 치환된 것인, 암줄기세포 저해용 약학 조성물.

【청구항 16】

제15항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 암줄기세포 저해용 약학 조성물.

【청구항 17】

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성물질 및 표지물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는, 암줄기세포 저해용 약학 조성물.

【청구항 18】

제17항에 있어서, 상기 세포독성물질은 리신(ricin), 사포린(saporin), 젤로닌(gelonin), 모로딘(momordin), 데보가닌 (debouganin), 디프테리아독소, 녹농균독소(pseudomonas toxin), 방사선동위원소, 듀오카마이신(duocarmycin), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F; MMAF),

N2'-디아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)메이탄신(N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxo propyl)maytansine; DM1), 및 PBD (Pyrrolobenzodiazepine) dimer로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 암줄기세포 저해용 약학 조성물.

【청구항 19】

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암줄기세포는 혈액암 또는 고형암의 암줄기세포인, 암줄기세포 저해용 약학 조성물.

【청구항 20】

SEQ ID NO: 131을 포함하는 SEQ ID NO: 134 내의 연속하는 6 내지 9개 아미노산으로 이루어진 항원결정부위에 후보 화합물을 접촉시키는 단계, 및

상기 항원결정부위에 결합하는 후보 화합물을 선택하여 고형암 치료제 후보물질로 결정하는 단계

를 포함하는, 고형암 치료제 스크리닝 방법.

【청구항 21】

제20에 있어서, 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131 내지 134 중에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 고형암 치료제 스크리닝 방법.

【청구항 22】

SEQ ID NO: 131을 포함하는 SEQ ID NO: 134 내의 연속하는 6 내지 9개 아미노산으로 이루어진 항원결정부위에 후보 화합물을 접촉시키는 단계, 및

상기 항원결정부위에 결합하는 후보 화합물을 선택하여 고형암의 암줄기세포 저해제 후보물질로 결정하는 단계

를 포함하는, 암줄기세포 저해제 스크리닝 방법.

【청구항 23】

제22에 있어서, 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131 내지 134 중에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 암줄기세포 저해제 스크리닝 방법.

【청구항 24】

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 암줄기세포는 고형암의 암줄기세포인, 고형암의 암줄기세포 저해제 스크리닝 방법.

【청구항 25】

SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하며, SEQ ID NO: 134의 아미노산

서열 내의 연속하는 6 내지 9개 아미노산으로 이루어진 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 고형암의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 고형암의 치료 방법.

【청구항 26】

제25항에 있어서, 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131 내지 134 중에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 고형암의 치료 방법.

【청구항 27】

제25항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 110의 CDR1H, SEQ ID NO: 113의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 120의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 고형암의 치료 방법.

【청구항 28】

제25항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 121, 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 고형암의 치료 방법.

【청구항 29】

제25항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 경쇄가변영역의 당화 가능한 아미노산 잔기가 당화되지 않는 아미노산 잔기로 치환된 것인, 고형암의 치료 방법.

【청구항 30】

제29항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 고형암의 치료 방법.

【청구항 31】

제25항에 있어서, 상기 고형암은 위암, 유방암, 폐암, 대장암, 간암 및 담낭암, 신장암, 췌장암, 갑상선암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 또는 방광암인, 고형암의 치료 방법.

【청구항 32】

제25항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 세포독성물질 및 표지물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것인, 고형암의 치료 방법.

【청구항 33】

제32항에 있어서, 상기 세포독성물질은 리신(ricin), 사포린(saporin), 젤로닌(gelonin), 모로딘(momordin), 데보가닌 (debouganin), 디프테리아독소, 녹농균독소(pseudomonas toxin), 방사선동위원소, 듀오카마이신(duocarmycin), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F; MMAF), N2'-디아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)메이탄신(N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxo propyl)maytansine; DM1), 및 PBD (Pyrrolobenzodiazepine) dimer로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 고형암의 치료 방법.

【청구항 34】

제25항에 있어서, 고형암의 암줄기세포 저해 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 고형암의 치료 방법.

【청구항 35】

SEQ ID NO: 131의 아미노산 서열을 포함하며, SEQ ID NO: 134의 아미노산 서열 내의 연속하는 6 내지 9개 아미노산으로 이루어진 항원결정부위에 결합하는 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 약학적 유효량을 암줄기세포 저해를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암줄기세포 저해 방법.

【청구항 36】

제35항에 있어서, 상기 항원결정부위는 SEQ ID NO: 131 내지 134 중에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 암줄기세포 저해 방법.

【청구항 37】

제35항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 110의 CDR1H, SEQ ID NO: 113의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 120의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 암줄기세포 저해 방법.

【청구항 38】

제35항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 121, 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 암줄기세포 저해 방법.

【청구항 39】

제35항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 경쇄가변영역의 당화 가능한 아미노산 잔기가 당화되지 않는 아미노산 잔기로 치환된 것인, 암줄기세포 저해 방법.

【청구항 40】

제39항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 암줄기세포 저해 방법.

【청구항 41】

제35항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 세포독성물질 및 표지물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것인, 암줄기세포 저해 방법.

【청구항 42】

제41항에 있어서, 상기 세포독성물질은 리신(ricin), 사포린(saporin), 젤로닌(gelonin), 모로딘(momordin), 데보가닌 (debouganin), 디프테리아독소, 녹농균독소(pseudomonas toxin), 방사선동위원소, 듀오카마이신(duocarmycin), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F; MMAF), N2'-디아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)메이탄신(N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxo propyl)maytansine; DM1), 및 PBD (Pyrrolobenzodiazepine) dimer로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 암줄기세포 저해 방법.

【청구항 43】

SEQ ID NO: 110의 CDR1H, SEQ ID NO: 113의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의

CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 120의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는, 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편.

【청구항 44】

제43항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 121, 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편.

【청구항 45】

제43항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 경쇄가변영역의 당화 가능한 아미노산 잔기가 당화되지 않는 아미노산 잔기로 치환된 것인, 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편.

【청구항 46】

제45항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 111 또는 112의 CDR1H, SEQ ID NO: 114, 115, 116, 또는 117의 CDR2H, SEQ ID NO: 118의 CDR3H, SEQ ID NO: 119의 CDR1L, SEQ ID NO: 122, 123, 또는 124의 CDR2L, 및 SEQ ID NO: 125의 CDR3L을 포함하는 것인, 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편.

【청구항 47】

제43항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 또는 94의 중쇄가변영역; 및 SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 또는 109의 경쇄가변영역을 포함하는 것인, 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편.

【청구항 48】

제43항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편은 동물 유래 항체, 키메라 항체, 또는 인간화 항체인, 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편.

【청구항 49】

제43항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원결합단편은 항원의 Fab, F(ab)2, Fv, scFv, 및 scFv-Fc 단편 중에서 선택된 것인, 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편.

【청구항 50】

제43항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편; 및

세포독성물질 및 표지물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 접합체.

【청구항 51】

제50항에 있어서, 상기 세포독성물질은 리신(ricin), 사포린(saporin), 젤로닌(gelonin), 모로딘(momordin), 데보가닌 (debouganin), 디프테리아독소, 녹농균독소(pseudomonas toxin), 방사선동위원소, 듀오카마이신(duocarmycin), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F; MMAF), N2'-디아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)메이탄신(N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxo propyl)maytansine; DM1), 및 PBD (Pyrrolobenzodiazepine) dimer로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 접합체.

【청구항 52】

제43항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

【청구항 53】

제52항에 있어서, 상기 약학 조성물은 항암제인 약학 조성물.

【청구항 54】

제53항에 있어서, 상기 항암제는 혈액암(hematopoietic malignancy)에 대한 항암 활성을 갖는 것인, 약학 조성물.

【청구항 55】

제55항에 있어서, 상기 혈액암은 급성골수구성백혈병(acute myeloid leukemia), 급성림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia), 급성단구성백혈병(acute monocytic leukemia), 또는 호지킨림프종(Hodgkin's lymphoma),

비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)인, 약학 조성물.

【청구항 56】

제51항의 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

【청구항 57】

제56항에 있어서, 상기 약학 조성물은 항암제인 약학 조성물.

【청구항 58】

제57항에 있어서, 상기 항암제는 혈액암(hematopoietic malignancy)에 대한 항암 활성을 갖는 것인, 약학 조성물.

【청구항 59】

제58항에 있어서, 상기 혈액암은 급성골수구성백혈병(acute myeloid leukemia), 급성림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia), 급성단구성백혈병(acute monocytic leukemia), 또는 호지킨림프종(Hodgkin's lymphoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)인, 약학 조성물.

【청구항 60】

제43항의 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법.

【청구항 61】

제60항에 있어서, 상기 암 환자는 혈액암(hematopoietic malignancy) 환자인, 암의 예방 또는 치료 방법.

【청구항 62】

제61항에 있어서, 상기 혈액암은 급성골수구성백혈병(acute myeloid leukemia), 급성림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia), 급성단구성백혈병(acute monocytic leukemia), 또는 호지킨림프종(Hodgkin's lymphoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)인, 암의 예방 또는 치료 방법.

【청구항 63】

제51항의 접합체를 암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법.

【청구항 64】

제63항에 있어서, 상기 암 환자는 혈액암(hematopoietic malignancy) 환자인, 암의 예방 또는 치료 방법.

【청구항 65】

제64항에 있어서, 상기 혈액암은 급성골수구성백혈병(acute myeloid leukemia), 급성림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia), 급성단구성백혈병(acute monocytic leukemia), 또는 호지킨림프종(Hodgkin's lymphoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)인, 암의 예방 또는 치료 방법.

【청구항 66】

제43항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편을 암호화하는 핵산 분자.

【청구항 67】

제66항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 68】

제67항의 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포.

【청구항 69】

제68항의 재조합 벡터를 배양하는 단계를 포함하는, 제43항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항-CD43 항체 또는 이의 항원결합단편의 제조 방법.