

명세서

발명의 명칭: 항-TM4SF4 인간화 항체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 TM4SF4(TransMembrane 4 Superfamily Member 4)에 높은 친화도로 특이적 결합할 수 있으며, 인간에게서 낮은 면역원성을 나타내는 인간화 항체 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] TM4SF4(TransMembrane 4 Superfamily Member 4)는 테트라스판닌(tetraspanin) 단백질의 일종으로, 이 분류의 다른 단백질인 TM4SF1 및 TM4SF5는 다수의 종양에서 발현이 상향 조절되고, 상피-간엽 전이 및 세포 이동에 관여함이 보고되었고 암세포 관련 연구가 다수 진행되었다. TM4SF4는 암세포에서 세포 사멸과 분화 그리고 세포의 침투 능력에 관여한다고 일부 보고되었으며, 최근 본 발명의 연구진은 인간 폐암세포에서 TM4SF4 단백질이 암 줄기세포 생장, 자가 복제(Self-renewal)능력 및 전이/침윤을 촉진시킨다고 보고하였으며, TM4SF4가 암 발생에 중요한 신호전달 시스템인 IGF1R β /AKT/NF κ B 또는 JAK2(또는 FAK)/STAT3 활성화를 촉진시키고 그로 인해 촉진되는 사이토카인 분비에 의해 암 줄기세포 특성을 강화시켜 종양을 더욱 악성화 시키는 것을 제시하였다(Choi SI *et al.*, *Oncotarget*. 2014; 5 (20):9823-9837, Choi SI *et al.*, *Oncotarget*. 2017; 8 (60):101284-101297).
- [3] 항체는 타겟 항원에 대한 높은 결합특이성과 인체 내 안정성으로 인해 치료제로서 활용되고 있다. 특히 항암 기능의 항체들은 항체공학기술의 발전에 기반을 두고 인간화 항체, 단일쇄 항체, 이중 항체, 약물융합 항체 등으로 개선하여 암 치료 효능을 크게 향상시켜 활용되고 있다. 그러나, 암 특성의 다양성과 새로운 항원 발현에 의한 치료 저항성 유도 등으로 인해 기존에 암세포 타겟팅을 위해 활용되고 있는 항원의 종류에 한계성이 지적되고 있으며, 신규 암 특이 항원을 탐색하고 이에 대한 항체를 도출하는 연구가 지속되고 있다.
- [4] 특히 기존 암 치료법에 활용되고 있는 표적약물이나 방사선치료를 저항성을 보이고 재발하는 암의 경우, 암 줄기세포의 특성이 중요하게 작용하는 것이 보고되고 있어서 암 줄기세포 타겟팅에 활용할 수 있는 항원 발굴 및 특이 항체 확보가 중요하게 부각되고 있다.
- [5] 한편, 특정 항원에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 개발하기 위해, 인간 이외의 동물을 대상으로 항원을 주입시켜 동물의 면역 시스템을 통해 만들어지는 항체를 이용하는 방법이 주로 이용되고 있다. 그런데, 상기 방법을 통해 만들어지는 항체는, 인간 이외의 동물로부터 유래하는 항체라는 점에서 인간의 단백질이 아니므로, 인체에 투여하였을 때 면역원성(immunogenicity)의 문제점이 발생할 수 있다. 즉, 인간 이외의 종으로부터 유래하는 항체가 인체에

투여될 경우, HAMA(Human Anti-Mouse Antibody)의 발생을 유도할 수 있으며, 상기 이중 유래 항체에 의한 치료 효능이 감소될 수 있다.

- [6] 이에, 상기 인간 이외의 종으로부터 유래하는 항체를 구성하는 아미노산 서열 중에서, 항원과의 결합에 중요한 역할을 하는 서열을 얻고, 나머지 부분은 인간 항체의 서열로 대체함으로써, 앞서 설명한 문제점을 해결하고자 하는 방법이 제시된다. 그런데, 이러한 방법을 통해 제조되는 키메라 항체(chimeric antibody)나 인간화 항체(humanized antibody)는, 서로 다른 두 단백질 영역을 융합시킨 것이라는 점에서, 항체로서 기능하지 못하거나 항원에 대한 결합 친화도가 감소할 가능성이 발생한다. 따라서, 인체에서 HAMA의 발생을 유도하지 않으면서도, 항원에 대한 높은 특이성과 친화도를 나타내는 인간화 항체를 개발하는 것에는 여전히 어려움이 따르는 것이 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 암세포의 표면에 과발현되어 나타나는 TM4SF4(TransMembrane 4 Superfamily Member 4) 단백질에 높은 친화도로 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 인체에 투여되었을 때 낮은 면역원성을 나타낼 수 있는 신규한 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [8] 또한, 본 발명은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하여 이를 발현시킬 수 있는 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 숙주 세포, 그리고 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 상기 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 TM4SF4를 검출하기 위한 용도의 조성물, 키트, 그리고 TM4SF4를 검출하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [10] 또한, 본 발명은 암을 예방하거나 치료하기 위한 약학적 조성물, 암 줄기세포의 성장 억제용 조성물, 그리고 방사선 항암 치료 보조용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [11] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 FR-H1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 FR-H2, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 FR-H3 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 FR-H4를 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 FR-L1, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 FR-L2, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 FR-L3 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 FR-L4를 포함하는 경쇄가변영역;을 포함하고, TM4SF4(TransMembrane 4 Superfamily Member 4)에 특이적으로 결합하는, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [12] 본 발명의 다른 측면은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을

- 암호화하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 그리고 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [13] 본 발명의 다른 측면은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 TM4SF4 검출용 조성물 및 상기 TM4SF4 검출용 조성물을 포함하는 TM4SF4 검출용 키트를 제공한다.
- [14] 본 발명의 다른 측면은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 TM4SF4가 포함되어 있을 것으로 예상되는 검출 대상 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 TM4SF4 검출하는 방법을 제공한다.
- [15] 본 발명의 다른 측면은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 암 줄기세포 성장 억제용 조성물 및 방사선 항암 치료 보조용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [16] 본 발명의 인간화 항체는 BSA와 같은 물질에는 결합하지 않으면서 TM4SF4에 특이적으로 결합할 수 있으므로, TM4SF4를 검출하거나 TM4SF4를 과발현하는 암 세포, 암 줄기세포를 표적으로 유용하게 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 인간화 항체는 생쥐 유래의 항체와 유사하거나, 키메라 항체에 비해 결합친화도가 현저하게 높은 특징이 있어 우수한 효과를 나타낸다.
- [17] 또한, 본 발명의 인간화 항체는 대부분의 CDR 서열을 제외한 나머지 서열들이 인간 항체 유래의 아미노산 서열을 이용하거나 이의 일부를 변형한 것이므로, 인체에 투여하였을 때에도 HAMA(Human Anti-Mouse Antibody)를 유도할 가능성이 낮아 면역원성(immunogenicity) 역시 낮다는 효과가 있다. 이에 따라, 본 발명의 인간화 항체는, 생쥐 유래의 항체를 이용함에 따라 발생할 수 있는 면역 반응의 문제점을 해결할 수 있다는 장점이 있다.
- [18] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 본 발명의 인간화 항체 중 Hz2B7-1.0으로 지칭되는 중쇄가변영역을 암호화하는 유전자 서열을 제조하기 위한 재조합 PCR 과정에 대해 설명하고 있는 모식도이다.
- [20] 도 2는 상기 Hz2B7-1.0 중쇄가변영역 유전자의 제조 결과를 나타낸 것으로, A는 T1, T2, T3 절편에 대한 아가로오스 젤 전기영동 결과를 나타내고, B는 T, T2, T3를 연결한 최종 완성된 Hz2B7-1.0 중쇄가변영역 유전자가 포함된 DNA의 전기영동 결과를 나타낸다.
- [21] 도 3은 본 발명의 인간화 항체 중 Hz2B7-0.1로 지칭되는 경쇄가변영역을 암호화하는 유전자가 포함된 DNA의 아가로오스 젤 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

- [22] 도 4는 본 발명의 인간화 항체인 Hz2B7-1.1 항체의 아미노산 서열과 항원인 TM4SF4의 에피토프 서열을 바탕으로, 도킹 시뮬레이션을 통해 이들의 상호작용을 분석한 결과로, 에피토프와 상호작용하는 항체의 주요한 아미노산 잔기와 결합 자유 에너지 값을 표시하였다. 표시한 항체 원자들 중에 핑크색은 탄소, 파란색은 질소, 빨간색은 산소를 가리킨다. 에피토프의 탄소원자는 녹색으로 표시하였다.
- [23] 도 5는 본 발명의 인간화 항체인 Hz2B7 항체를 제조하는 과정에서 원래 생쥐 항체(2B7) 및 이와 유사한 인간항체(human-3QRG) 중쇄(A) 경쇄(B) 아미노산 서열과 새롭게 제조한 인간화 항체 Hz2B7 중쇄 4종, 경쇄 3종의 아미노산 서열을 서로 비교한 그림이다. 하이픈(-)은 원래 생쥐 항체 아미노산과 동일한 것을 의미하고 박스로 표시한 것은 이 발명에서 에피토프와 결합에 중요하게 발굴한 아미노산의 위치이다.
- [24] 도 6의 A는 본 발명의 인간화 항체들 중에서, Hz2B7-2.0으로 지칭되는 중쇄가변영역(Hz2B7 HC V46A), Hz2B7-3.0으로 지칭되는 중쇄가변영역(Hz2B7 HC W55Y), Hz2B7-4.0으로 지칭되는 중쇄가변영역(Hz2B7 HC W55S) 유전자를 포함하는 DNA의 아가로오스 젤 전기영동 결과를 나타낸 것이고, B는 Hz2B7-0.2로 지칭되는 경쇄가변영역(Hz2B7 LC N31V), Hz2B7-0.3으로 지칭되는 경쇄가변영역(Hz2B7 LC N31F) 유전자를 포함하는 DNA의 아가로오스 젤 전기영동 결과를 나타낸 것이다.
- [25] 도 7은 비교예로 사용된 키메라 항체의 중쇄 및 경쇄 유전자의 아가로오스 젤 전기영동 결과(A), 상기 중쇄 유전자가 포함된 벡터의 전기영동 결과(B), 상기 경쇄 유전자가 포함된 벡터의 전기영동 결과(C)를 나타낸 것이다.
- [26] 도 8은 상기 키메라 항체의 유전자를 포함하는 벡터의 구조를 나타낸 것이다.
- [27] 도 9의 A는 본 발명의 인간화 항체들과 키메라 항체, 생쥐 유래 2B7 항체, 그리고 인간 항체인 IgG를 대상으로 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색을 수행한 결과를 나타낸 것이다. B는 상기 항체들을 대상으로 웨스턴 블랏팅을 수행한 결과를 나타낸 것으로, 2차 항체는 인간 항체의 IgG 감마 사슬과 카파 사슬에 결합하는 것을 이용하였다.
- [28] 도 10은 본 발명의 10종의 인간화 항체, 키메라 항체(Chi2B7), 그리고 인간 IgG(Isotype hIgG)를 이용하여, 간접 ELISA(Indirect ELISA)를 수행한 결과를 나타낸 것으로, A는 TM4SF4-BSA 항원에 대한 모든 항체들의 결합친화도를, B는 인간화 항체중에서도 보다 높은 결합친화도를 보여주는 Hz2B7-1.1, Hz2B7-1.2, Hz2B7-1.3의 결합친화도를, C는 BSA에 대한 모든 항체들의 결합친화도를 나타내는 그래프이다.
- [29] 도 11은 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance, SPR) 분석을 이용하여 항-TM4SF4 인간화 항체 5종의 TM4SF4 단백질 에피토프에 대한 항체 친화도를 비교 분석한 것으로 먼저 바이오틴 결합된 TM4SF4 펩타이드를 센서칩에 붙이고 5종의 인간화 항체를 흘려주면서 항체의 결합율(Association rate, Ka)과

해리율(Dissociation rate, K_d) 및 평형해리상수(KD , K_d/K_a) 값을 산출한 것을 나타낸 것이다.

- [30] 도 12는 본 발명의 인간화 항체(Hz2B7-1.1, Hz2B7-1.2, Hz2B7-1.3), 키메라 항체(Chi2B7), 그리고 인간 IgG를 이용하여 폐암, 인간 일차 간세포, 간암세포주들을 대상으로 유세포 분석기를 이용해 FACS 분석을 수행한 결과를 나타낸다. A는 폐암세포주인 A549 세포와 Calu-3 세포주에서의 항체들의 결합능을 비교한 그래프이고, B는 Hz2B7-1.1 과 Hz2B7-1.2 항체의 결합능을 인간 일차 간 세포(hPH), 간암세포주인 Huh-7, SNU-387, SNU-449 세포주에서 확인한 그래프이다.
- [31] 도 13은 CHO-DG44 세포에 본 발명의 인간화 항체를 암호화하는 유전자를 도입시켜 형질전환시킨 후 G418 저항성을 가지는 클론을 선별하여, ELISA를 통해 각 클론의 항체 생산량을 OD값을 측정하여 비교한 것이다. 양성대조군으로는 1 μ g의 인간 IgG를 이용하였다.
- [32] 도 14는 MTX를 통해 항체 유전자를 증폭시킨 Hz2B7-1.1-4H12 클론 및 Hz2B7-1.2-4A12 클론을 대상으로 샌드위치 ELISA(sandwich ELISA)를 통해 항체 생산량을 비교한 것으로, A는 Hz2B7-1.1-4H12 클론 중 MTX를 처리하지 않은 클론과 0.08 μ M의 MTX를 처리한 클론의 항체생산량을 비교하였으며 B는 Hz2B7-1.2-4A12 클론들의 항체생산량을 비교하여 나타낸 것이다.
- [33] 도 15는 0.08 μ M의 MTX를 처리하여 항체 유전자를 증폭시킨 Hz2B7-1.1-4H12 클론 및 Hz2B7-1.2-4A12 클론의 항체 생산량(μ g/10⁶cell/24hr)을 샌드위치 ELISA를 통해 측정하여 비교한 것이다.
- [34] 도 16은 인간 혈청 내에서의 생쥐 및 인간화 항체의 안정성을 측정, 비교한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [35] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [36] **1. TM4SF4에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 및 이의 항원 결합 단편**
- [37] 본 발명의 일 측면은 TM4SF4에 특이적으로 결합하며 인체에서 낮은 면역원성을 나타내는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [38] 본 발명에서 용어 "항체(antibody)"는 면역학적으로 항원의 에피토프(epitope)와 특이적 결합하여 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 의미한다. 상기 항체는 단일클론항체, 다클론항체, 전체 길이의 사슬 구조를 가진 항체(전장항체, full-length antibody), 적어도 항원 결합 기능을 갖는 기능적인 단편(항원 결합 단편) 및 재조합 항체를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로 본 발명의 항체는 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 상기 단일클론항체는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 상기 전장 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체

길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결될 수 있다. 상기 항체는 중쇄(heavy chain, HC) 및 경쇄(light chain, LC) 폴리펩타이드를 포함하며, 상기 중쇄 및 경쇄는 가변영역 및 불변영역을 포함할 수 있다.

- [39] 상기 불변영역은 면역계의 다양한 종류의 세포(T-세포 등), 보체계의 성분을 포함하는 숙주 조직 등에, 상기 항체가 결합할 수 있도록 매개하는 부위이다. 상기 불변영역은, 같은 종으로부터 유래하는 같은 종류의 항체라면 항원의 종류와 무관하게 동일한 기능을 하며, 이를 이루는 아미노산 서열 역시 항체마다 동일하거나 높은 유사도를 갖는다. 상기 불변영역은 중쇄의 불변영역(CH로 약칭될 수 있음)과 경쇄 불변영역(CL로 약칭될 수 있음)으로 나뉠 수 있다. 상기 중쇄불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및/또는 엡실론(ϵ) 타입을 가지며, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및/또는 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다. IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.
- [40] 상기 가변영역은 항원에 대해 특이성을 가지는 항체 부위로, 중쇄의 가변영역(VH로 약칭될 수 있음)과 경쇄의 가변영역(VL로 약칭될 수 있음)으로 나뉠 수 있다. 상기 가변영역에는 3개의 CDR(complementary-determining regions, 또는 상보성 결정 영역)과 4개의 FR(framework regions)이 포함될 수 있다. 상기 CDR은 항원의 인식에 관여하는 고리 형태의 부위일 수 있으며, 상기 CDR의 아미노산 서열에 따라 항원에 대한 특이성이 결정될 수 있다. 상기 CDR은 그 순서에 따라 CDR1, CDR2, CDR3로 지칭될 수 있으며, 중쇄 및 경쇄 중 어느 폴리펩타이드의 CDR인지 여부에 따라, 중쇄가변영역의 경우 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3로, 경쇄가변영역의 경우 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3로 지칭될 수 있다. FR도 마찬가지로, 중쇄가변영역의 경우 FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4로, 경쇄가변영역의 경우 FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4로 지칭될 수 있다. 또한, 상기 CDR 및 FR은 각각의 가변영역에서 다음과 같은 순서로 배열될 수 있다. 순서는 N-말단(아미노-말단)에서 C-말단(카복시-말단) 방향: 중쇄가변영역의 경우 FR-H1, CDR-H1, FR-H2, CDR-H2, FR-H3, CDR-H3, FR-H4, 경쇄가변영역의 경우 FR-L1, CDR-L1, FR-L2, CDR-L2, FR-L3, CDR-L3, FR-L4.
- [41] 본 발명에서 용어 "항원 결합 단편"은, 항체의 항원 결합 기능을 보유하는, 본 발명 인간화 항체의 임의의 단편을 의미한다. 상기 항원 결합 단편은 "단편", "항체 단편" 등의 용어와 호환되어 지칭될 수 있으며, 상기 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 등일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1 개의 항원 결합 부위를 가진다. 상기 Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 상기 Fab와 차이가 있다. 상기 F(ab')₂는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다.

상기 Fv는 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체 조각을 의미한다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄가변영역과 경쇄가변영역이 연결되어 있고, 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통해 중쇄가변영역과 경쇄가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 항원 결합 단편은, 단백질 가수분해 효소를 이용하거나(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다.), 또는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [43] 본 발명에서 용어 "인간화 항체(humanized antibody)"는 인간에게 감소된 면역원성(immunogenicity)을 나타내거나 비-면역원성(non-immunogenicity)인 항체를 의미한다. 상기 인간화 항체는 예컨대 인간 이외의 개체(비-인간 종)로부터 유래하는 CDR(complementarity determining regions)을, 인간 항체 유래의 불변영역, 인간 항체 유래의 가변영역 중 FR(framework regions)과 결합하여 제조되는 것일 수 있다. 상기 인간화 항체는 CDR-이식(CDR-grafting) 방법을 통해 비-인간 종 항체의 CDR이 인간 항체의 FR 서열 사이에 이식되어 제조될 수 있다.
- [44] 본 발명에서 용어 "FR(framework regions)"는 면역 글로불린 분자의 가변 영역 중 상보성 결정 영역 이외의 부분을 말한다. 프레임워크 영역은 경쇄, 중쇄 각각 4 개의 프레임워크 영역(프레임워크 영역 1, 프레임워크 영역 2, 프레임워크 영역 3 및 프레임워크 영역 4)이 있다.
- [45] 본 발명에서 용어 "인간항체"는 경쇄, 중쇄 모두 인간 유래인 항체를 말한다. 인간 항체는 중쇄의 불변 영역의 차이에 따라, γ 사슬의 중쇄를 갖는 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 를 포함), μ 사슬의 중쇄를 갖는 IgM, α 사슬의 중쇄를 갖는 IgA(IgA1, IgA2 포함), δ 사슬의 중쇄를 갖는 IgD 또는 ϵ 사슬의 중쇄를 갖는 IgE 를 포함한다. 또한 원칙적으로 경쇄는 κ 사슬 및 λ 사슬 중 하나 이상을 포함한다.
- [46] 본 발명에서 용어 "키메라 항체(chimeric antibody)"는 항체의 가변영역이 인간 이외의 개체(비-인간 종)으로부터 유래하고, 불변영역이 상기 개체와 다른 종, 예를 들어 인간으로부터 유래하는 항체를 의미한다.
- [47] 상기 인간화 항체 및 키메라 항체에 대해 보다 자세하게 설명하면, 생쥐 유래의 항체와 인간 항체를 대상으로 비교할 때, 생쥐 항체 - 키메라 항체 - 인간화 항체 - 인간 항체 순으로 인간 항체와 서열 상의 유사성을 가지게 된다. 따라서, 인간화 항체는 생쥐 항체나 키메라 항체와 비교할 때, 인간 항체와 유사성이 더 높아 인체에 투여되었을 때 면역원성이 낮다는 특징이 있다.
- [48] 본 발명에서 용어, "에피토프(epitope)"는 면역글로불린, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 특이적으로 인식하고 결합할 수 있는 항원 상의 특정 부위를 의미한다. 상기 에피토프는 연속 아미노산으로부터 또는 단백질의 3차 접힘에 의해 병치된 불연속 아미노산으로부터 형성될 수 있다

- [49] 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 FR-H1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 FR-H2, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 FR-H3, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 FR-H4를 포함하는 중쇄가변영역을 포함하고, 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 FR-L1, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 FR-L2, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 FR-L3, 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 FR-L4를 포함하는 경쇄가변영역을 포함하고, TM4SF4(TransMembrane 4 Superfamily Member 4)에 특이적으로 결합한다.
- [50] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 FR-H1은 본 발명에서 'Hz2B7-1.0', 'Hz2B7-2.0', 'Hz2B7-3.0', 'Hz2B7-4.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 FR1 서열일 수 있다. 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 FR-H2는 본 발명에서 'Hz2B7-1.0', 'Hz2B7-3.0', 'Hz2B7-4.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 FR2 서열일 수 있고, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 FR-H2는 본 발명에서 'Hz2B7-2.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 FR2 서열일 수 있다. 상기 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 FR-H3는 본 발명에서 'Hz2B7-1.0', 'Hz2B7-2.0', 'Hz2B7-3.0', 'Hz2B7-4.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 FR3 서열일 수 있다. 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 FR-H4는 본 발명에서 'Hz2B7-1.0', 'Hz2B7-2.0', 'Hz2B7-3.0', 'Hz2B7-4.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 FR4 서열일 수 있다.
- [51] 상기 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 FR-L1은 본 발명에서 'Hz2B7-0.1', 'Hz2B7-0.2', 'Hz2B7-0.3'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 FR1 서열일 수 있다. 상기 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 FR-L2는 본 발명에서 'Hz2B7-0.1', 'Hz2B7-0.2', 'Hz2B7-0.3'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 FR2 서열일 수 있다. 상기 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 FR-L3는 본 발명에서 'Hz2B7-0.1', 'Hz2B7-0.2', 'Hz2B7-0.3'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 FR3 서열일 수 있다. 상기 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 FR-L4는 본 발명에서 'Hz2B7-0.1', 'Hz2B7-0.2', 'Hz2B7-0.3'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 FR4 서열일 수 있다.
- [52] 상기 TM4SF4는 tetraspanin 단백질의 일종으로, 암세포에서 세포사멸과 분화, 그리고 세포의 침투 능력에 관여하는 것으로 알려진 단백질이다. 또한, 상기 TM4SF4는 암 줄기세포의 성장, 전이 등을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 암 줄기세포의 특성을 강화시켜 종양을 더욱 악성화시킬 수 있다. 상기 TM4SF4 단백질은 세포의 막에 존재하는 막단백질일 수 있으며, TM4SF4의 일부가 세포 외부로 노출되어 있을 수 있다. 상기 노출 부위는 2개의 루프 구조를 포함할 수 있으며, 상기 TM4SF4의 세포 외 노출 부위 중 일부 아미노산 서열이, 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 특이적으로 인식하여 결합할 수 있는 에피토프가 될 수 있다. 상기 TM4SF4의 에피토프는 예컨대 'TWGYPFHDGDYLNDE'(N-말단에서 C-말단 방향 순서)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

- [53] 상기 중쇄가변영역은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열번호 77의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 더 포함하는 것일 수 있다. 특히, 상기 CDR-H2는 서열번호 78의 아미노산 서열을 가지는 것일 수 있고, 구체적으로 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13으로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [54] 상기 경쇄가변영역은 서열번호 79의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 18의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 80의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 더 포함하는 것일 수 있다. 특히, 상기 CDR-L1은 서열번호 15, 서열번호 16 및 서열번호 17로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것일 수 있고, 상기 CDR-L3는 서열번호 19의 아미노산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [55] 상기 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1은 본 발명에서 'Hz2B7-1.0', 'Hz2B7-2.0', 'Hz2B7-3.0', 'Hz2B7-4.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 CDR1 서열일 수 있다. 상기 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2는 본 발명에서 'Hz2B7-1.0', 'Hz2B7-2.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 CDR2 서열일 수 있고, 상기 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2는 본 발명에서 'Hz2B7-3.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 CDR2 서열일 수 있고, 상기 서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2는 본 발명에서 'Hz2B7-4.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 CDR2 서열일 수 있다. 상기 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3는 본 발명에서 'Hz2B7-1.0', 'Hz2B7-2.0', 'Hz2B7-3.0', 'Hz2B7-4.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 CDR3 서열일 수 있다.
- [56] 상기 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1은 본 발명에서 'Hz2B7-0.1'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 CDR1 서열일 수 있고, 상기 서열번호 16의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1은 본 발명에서 'Hz2B7-0.2'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 CDR1 서열일 수 있고, 상기 서열번호 17의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1은 본 발명에서 'Hz2B7-0.3'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 CDR1 서열일 수 있다. 상기 서열번호 18의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2는 본 발명에서 'Hz2B7-1.0', 'Hz2B7-2.0', 'Hz2B7-0.3'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 CDR2 서열일 수 있다. 상기 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3는 본 발명에서 'Hz2B7-1.0', 'Hz2B7-2.0', 'Hz2B7-0.3'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 CDR3 서열일 수 있다.
- [57] 상기 중쇄가변영역은 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호 23으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [58] 상기 경쇄가변영역은 서열번호 24, 서열번호 25 및 서열번호 26으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

- [59] 상기 서열번호 20의 아미노산 서열을 가지는 중쇄가변영역은 본 발명에서 'Hz2B7-1.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 서열일 수 있고, 상기 서열번호 21의 아미노산 서열을 가지는 중쇄가변영역은 본 발명에서 'Hz2B7-2.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 서열일 수 있고, 상기 서열번호 22의 아미노산 서열을 가지는 중쇄가변영역은 본 발명에서 'Hz2B7-3.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 서열일 수 있고, 상기 서열번호 23의 아미노산 서열을 가지는 중쇄가변영역은 본 발명에서 'Hz2B7-4.0'으로 지칭되는 중쇄가변영역의 서열일 수 있다.
- [60] 상기 서열번호 24의 아미노산 서열을 가지는 경쇄가변영역은 본 발명에서 'Hz2B7-0.1'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 서열일 수 있고, 상기 서열번호 25의 아미노산 서열을 가지는 경쇄가변영역은 본 발명에서 'Hz2B7-0.2'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 서열일 수 있고, 상기 서열번호 26의 아미노산 서열을 가지는 경쇄가변영역은 본 발명에서 'Hz2B7-0.3'으로 지칭되는 경쇄가변영역의 서열일 수 있다.
- [61] 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 인간으로부터 유래하는 항체의 중쇄불변영역 및/또는 경쇄불변영역을 포함할 수 있으며, 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 TM4SF4에 대해 특이적으로 결합하는 특성을 지녔는지 않는 것이라면, 상기 인간으로부터 유래하는 항체의 중쇄불변영역 및/또는 경쇄불변영역은 제한없이 이용될 수 있다. 예를 들어, 상기 중쇄불변영역은 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 중쇄불변영역일 수 있으며, 상기 경쇄불변영역은 서열번호 28의 아미노산 서열을 갖는 경쇄불변영역일 수 있다.
- [62] 앞서 설명한 아미노산 서열들은, 이를 포함하는 폴리펩타이드의 구조, 기능, 활성 등에 영향을 미치지 않는 범위 내에서, 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의해 상이한 서열을 가지는 변이체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 아미노산 서열들은 당업계에 알려진 통상적인 변형이 일어난 아미노산을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 아미노산 변형은 예컨대 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등일 수 있다. 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 앞서 설명한 아미노산 서열들을 포함하는 것뿐만 아니라, 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 것이나 이의 변이체를 포함한다. 상기 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 것의 의미는, 앞서 설명한 아미노산 서열과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [63] 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 평형해리상수(KD)가 3.0×10^{-8} M 이하일 수 있고, 예컨대 2.9×10^{-8} M 이하, 2.8×10^{-8} M 이하, 2.7×10^{-8} M 이하, 2.6×10^{-8} M 이하 또는 2.5×10^{-8} M 이하일 수 있고, 구체적으로 2.4×10^{-8} M 이하일 수 있다.

- [64] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명의 인간화 항체를 이용한 간접 ELISA를 통해 TM4SF4에 대한 결합능을 측정하여 비교한 결과, 본 발명의 인간화 항체들은, 키메라 항체(생쥐 유래의 ECL-2B7 항체의 가변영역과 인간 항체의 불변영역을 조합한 항체)와 비교할 때, 현저하게 높은 결합력을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 10의 A, B). 특히, 경쇄가변영역과 중쇄가변영역의 다양한 조합 인간화 항체들 중에서도 Hz2B7-1.2로 지칭되는 인간화 항체의 결합능이 가장 우수한 것으로 나타났다(도 10, 도 11). 또한, 본 발명의 인간화 항체는 BSA를 대상으로 수행한 상기 간접 ELISA 실험에서는 결합력이 나타나지 않은 바, TM4SF4에 대해서만 특이적으로 결합하는 항체라는 것도 확인할 수 있었다(도 10).
- [65] 본 발명의 다른 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명의 인간화 항체를 이용한 FACS 실험 결과, 본 발명의 인간화 항체들은 TM4SF4를 세포 표면에 과 발현하는 폐암세포주인 Calu-3 및 A549 세포에 대하여 우수한 결합능이 있는 것을 확인할 수 있었다(도 12). 상기 키메라 항체를 이용한 FACS 실험 결과와 비교할 때에도 본 발명의 인간화 항체를 이용하는 경우 폐암세포들과의 결합력이 더 높게 측정되었으며, 상기 간접 ELISA 실험과 마찬가지로 Hz2B7-1.2로 지칭되는 인간화 항체의 효과가 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다(도 10 내지 도 12).
- [66] **2. TM4SF4 특이적 인간화 항체를 발현하기 위한 기술**
- [67] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하여 제조하기 위해 사용될 수 있는, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 숙주 세포 및 생산 방법을 제공한다.
- [68] 상기 인간화 항체, 이의 항원 결합 단편, TM4SF4 등에 관한 설명은 '1. TM4SF4에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 및 이의 항원 결합 단편'에서 이들에 대해 설명한 것과 동일하므로, 반복 설명을 피하기 위해 기재를 생략하며, 이하에서는 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 및 숙주 세포와 관련된 내용에 대해서만 설명한다.
- [69] 본 발명에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 DNA 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드의 기본 구성단위인 뉴클레오티드는 자연계에 존재하는 뉴클레오티드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함될 수 있다.
- [70] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 염기서열을 포함한다.
- [71] 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화한다는 것은, 상기 폴리뉴클레오티드가 전사, 번역 등의 통상적인 단백질 발현 과정을 거쳐, 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 아미노산 서열을 갖는 단백질이 합성될 수 있는 유전 정보가 암호화되어 있다는 것을 의미한다. 이 때 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 완전히 동일한 아미노산 서열을 갖는

단백질뿐만 아니라, 앞서 설명한 것과 같이 상기 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질이나, 상기 단백질과 동일 및/또는 유사한 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드까지 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

- [72] 상기 폴리뉴클레오티드는 이를 도입시켜 발현시키고자 하는 생물의 종류와 상기 생물의 전사, 번역 등 발현 시스템에 따라, 최적화된 염기서열을 포함할 수 있다.
- [73] 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55 및 서열번호 56으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [74] 상기 서열번호 29의 염기서열은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 30의 염기서열은 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 31의 염기서열은 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 32의 염기서열은 상기 서열번호 4의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 33의 염기서열은 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 34의 염기서열은 상기 서열번호 6의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 35의 염기서열은 상기 서열번호 7의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 36의 염기서열은 상기 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 37의 염기서열은 상기 서열번호 9의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 38의 염기서열은 상기 서열번호 10의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 39의 염기서열은 상기 서열번호 11의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 40의 염기서열은 상기 서열번호 12의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 41의 염기서열은 상기 서열번호 13의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 42의 염기서열은 상기 서열번호 14의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 43의 염기서열은 상기 서열번호 15의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 44의 염기서열은 상기 서열번호 16의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 45의 염기서열은 상기 서열번호 17의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 46의 염기서열은 상기 서열번호 18의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 47의 염기서열은 상기 서열번호 19의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 48의 염기서열은 상기 서열번호 20의 아미노산

서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 49의 염기서열은 상기 서열번호 21의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 50의 염기서열은 상기 서열번호 22의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 51의 염기서열은 상기 서열번호 23의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 52의 염기서열은 상기 서열번호 24의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 53의 염기서열은 상기 서열번호 25의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 54의 염기서열은 상기 서열번호 26의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 55의 염기서열은 상기 서열번호 27의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 56의 염기서열은 상기 서열번호 28의 아미노산 서열을 암호화하는 것일 수 있다.

- [75] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 나열된 염기서열과 실질적으로 동일한 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 실질적으로 동일한 염기서열이란, 예컨대 전사 및 번역되었을 때 동일한 아미노산이 합성될 수 있는 경우를 포함하며, 상기 나열된 염기서열들과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성을 가지는 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [76] 본 발명의 발현 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [77] 본 발명에서 용어 "발현 벡터"는 숙주 세포에서 특정 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미하며, 구체적으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 그리고 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [78] 상기 발현 벡터는 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 염기서열 이외에도, 프로모터, 터미네이터 등의 조절서열을 더 포함할 수 있으며, 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 염기서열이 프로모터에 작동 가능하게 연결된(operatively linked) 것일 수 있다. 상기 작동가능하게 연결된 것은 조절 서열(예컨대, 프로모터, 시그널 서열, 전사조절인자 결합 위치의 어레이 등)과 다른 염기서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 염기서열의 전사 및/또는 번역을 조절할 수 있다.
- [79] 본 발명의 발현 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [80] 상기 발현 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.
- [81] 예를 들어, 상기 발현 벡터가 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 번역의

개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/번역 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 E.coli(예를 들어, HB101, BL21, DH5 α 등)가 이용되는 경우, E coli 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C, J Bacteriol, (1984) 158:1018-1024), 그리고 파지 λ 의 좌향 프로모터(pL λ 프로모터, Herskowitz, I and Hagen, D, Ann Rev Genet, (1980) 14:399-445)가 조절부위로서 이용될 수 있다. 숙주 세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 쉼린젠시스(*B. subtilis*)의 독소단백질 유전자의 프로모터(Appl Environ Microbiol (1998) 64:3932-3938; Mol Gen Genet (1996) 250:734-741) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다. 상기 발현 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예를 들어, pCL, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예를 들어, λ gt4- λ B, λ -Charon, λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들어, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

- [82] 상기 발현 벡터가 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 75K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 물로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 가질 수 있다. 상기 발현 벡터는 CMV 프로모터를 갖는 것일 수 있다.
- [83] 또한, 상기 발현 벡터는, 이로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다. 또한, 본 발명의 발현 벡터에 의해 발현되는 단백질이 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이므로 이의 특성을 고려할 때, 정제를 위한 추가적인 서열 없이도 발현된 단백질을 단백질 A 컬럼 등을 통하여 용이하게 정제할 수도 있다.
- [84] 상기 발현 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자를 포함할 수 있다.
- [85] 상기 발현 벡터는, 경쇄와 중쇄가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 경쇄와 중쇄를 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템일 수 있다. 후자의 경우, 두 벡터는 예컨대 동시 형질전환(co-transformation) 또는

표적 형질전환(targeted transformation)을 통하여 숙주 세포로 도입될 수 있다. 동시 형질전환은 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 각각의 벡터 DNA를 동시에 숙주 세포로 도입한 뒤 경쇄와 중쇄를 모두 발현하는 세포를 선별하는 방법이다. 표적 형질전환은 경쇄(또는 중쇄)를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하고 선별된 세포를 중쇄(또는 경쇄)를 포함하는 벡터로 다시 형질전환하여 경쇄 및 중쇄 모두를 발현하는 세포를 최종적으로 선별하는 방법이다.

- [86] 본 발명의 숙주 세포는, 상기 발현 벡터를 포함한다.
- [87] 상기 숙주 세포는, 본 발명의 상기 발현 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포라면 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 바실러스 쉐린겐시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*), 예컨대, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*)와 같은 원핵 숙주 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [88] 상기 숙주 세포가 진핵 숙주 세포일 경우, 아스페르길러스 속(*Aspergillus species*)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등 진핵 세포, 곤충-유래 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포, 그리고 식물 또는 포유동물로부터 유래한 세포를 이용할 수 있다. 상기 숙주 세포는 COS7 세포(monkey kidney cells), NSO 세포, SP2/0, 차이니즈 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 또는 293 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [89] 상기 숙주 세포로의 형질전환 및/또는 형질감염은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법이든 이용될 수 있으며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개 형질전환 방법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다.
- [90] 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법은, 상기 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [91] 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법은, 상기 숙주 세포에서 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [92] 상기 숙주 세포의 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라

이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 세포 배양은, 세포의 성장방식에 따라 현탁배양과 부착배양, 배양방법에 따라 회분식, 유가식 및 연속배양식의 방법으로 구분된다. 배양에 사용되는 배지는 특정한 균주의 요구조건을 적절하게 만족시켜야 한다.

- [93] 동물 세포 배양에 있어, 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 사용될 수 있는 탄소원의 예는, 포도당, 자당, 유당, 과당, 말토오스, 전분 및 셀룰로오스와 같은 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유 및 코코넛유와 같은 지방, 팔미트산, 스테아린산 및 리놀레산과 같은 지방산, 글라이세롤 및 에탄올과 같은 알코올, 그리고 아세트산과 같은 유기산을 포함할 수 있으며, 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다.
- [94] 상기 질소원은, 예컨대 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액(CSL) 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원을 포함할 수 있으며, 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다.
- [95] 상기 배지에는 인원으로서는, 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에, 아미노산, 비타민, 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다.
- [96] 상기 배양하는 단계에서, 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예컨대, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20 °C 내지 45 °C 또는 25 °C 내지 40 °C일 수 있다.
- [97] 상기 생산방법은, 상기 숙주 세포에서 발현된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 형질 전환된 숙주 세포를 배양하여 수득한 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 정제하지 않은 상태로 사용될 수 있으며, 또는 추가로 다양한 통상의 방법, 예를 들면 투석, 염 침전 및 크로마토그래피 등을 이용하여 고순도로 정제하여 사용될 수 있다. 크로마토그래피를 이용하는 경우, 컬럼의 종류와 순서는 항체의 특성, 배양방법 등에 따라 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에서 선택할 수 있다.
- [98] **3. 본 발명 인간화 항체의 TM4SF4 검출 용도**
- [99] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 TM4SF4 검출 용도를 제공한다. 구체적으로, 본 발명에서는 TM4SF4 검출용 조성물, TM4SF4 검출용 키트 및 TM4SF4를 검출하는 방법을 제공한다.

- [100] 상기 인간화 항체, 이의 항원 결합 단편, TM4SF4 등에 관한 설명은 '1. TM4SF4에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 및 이의 항원 결합 단편'에서 이들에 대해 설명한 것과 동일하므로, 반복 설명을 피하기 위해 기재를 생략한다.
- [101] 본 발명의 TM4SF4 검출용 조성물은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 본 발명의 TM4SF4 검출용 키트는 상기 TM4SF4 검출용 조성물을 포함한다.
- [102] 또한, 본 발명의 TM4SF4를 검출하는 방법은, 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 TM4SF4가 포함되어 있을 것으로 예상되는 검출 대상 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [103] 상기 TM4SF4 검출용 조성물, 이를 포함하는 키트는 TM4SF4에 특이적으로 결합하는 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 검출 대상 시료에 접촉시켜 항원-항체 복합체를 형성함으로써 효과적으로 TM4SF4를 검출할 수 있다.
- [104] 상기 항원-항체 복합체는, 시료 중의 TM4SF4를 발현하는 종양 또는 암 세포를 확인하기 위한, TM4SF4와 이를 인지하는 항체의 결합물을 의미한다.
- [105] TM4SF4 검출용 조성물, 이를 포함하는 키트 또는 상기 인간화 항체, 이의 항원 결합 단편을 이용한 TM4SF4 항원의 정량방법은 항원-항체 복합체의 형성을 확인하여 수행될 수 있으며, 상기 항원-항체 복합체의 형성 확인은 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블로팅(Western Blotting), 면역형광(Immunofluorescence), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry staining), 유세포분석법(Flow cytometry), 면역세포화학법(Immunocytochemistry), 방사능면역분석법(RIA), 면역침전분석법 Immunoprecipitation Assay), 면역확산분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 단백질 칩(Protein Chip) 등에 의해 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 효소면역분석법(ELISA)에는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2 차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다.
- [106] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하는 표지에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코오스

옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코오스 옥시다제와 루시퍼라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[107] **4. 본 발명 인간화 항체의 암의 예방 또는 치료 용도, 암 줄기세포 성장 억제 용도 및 방사선 항암 치료 보조 용도**

[108] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 암 줄기세포 성장 억제용 조성물 및 방사선 항암 치료 보조용 조성물을 제공한다.

[109] 상기 인간화 항체, 이의 항원 결합 단편, TM4SF4 등에 관한 설명은 '1. TM4SF4에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 및 이의 항원 결합 단편'에서 이들에 대해 설명한 것과 동일하므로, 반복 설명을 피하기 위해 기재를 생략한다.

[110] 다만, 본 발명의 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 2B7 항체의 CDR 서열과 동일하거나 이의 일부 서열을 변형시킨 CDR 서열을 포함할 수 있는데, 상기 2B7 항체의 특징 및 효과는, 한국 특허출원 제2020-0168467호를 참고할 수 있다.

[111] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은, 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[112] 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TM4SF4에 높은 친화도로 결합할 수 있으며, 상기 TM4SF4는 암 세포의 표면에 과발현되어 존재하는 것으로 알려져 있는바, 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 암 세포를 표적으로 이용될 수 있다.

[113] 상기 조성물은, 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편 단독으로 사용되거나 또는 통상의 약학적으로 허용되는 담체와 함께 암과 같은 과증식성 질환의 치료, 예방 및 진단에 사용할 수 있다.

[114] 상기 암은 구체적으로 폐암, 위암, 대장암, 직장암, 삼중음성유방암, 교모세포종, 췌장암, 두경부암, 유방암, 난소암, 신장암, 방광암, 전립선암, 자궁내막암, 침샘암 또는 갑상선암일 수 있으며, 보다 구체적으로는 폐암, 유방암, 간암, 신장암, 위암, 췌장암, 뇌암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 암은 특히 TM4SF4의 과발현, 증폭, 돌연변이 또는 활성화에 의한 암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 본 발명의 인간화 항체 또는 이의 결합 단편을 포함하는 조성물은 TM4SF4의 이상 발현 또는 돌연변이와 관계없이 모든 암종에 대해 증식 억제 효과를 가지므로, 본 발명의 의약품도가 TM4SF4의 발현 양태 또는 돌연변이 여부에 따라 제한되지 않는다.

[115] 상기 조성물은 약학적 조성물, 의약품 조성물, 건강식품용 조성물의 형태일 수 있다.

[116] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를

추가로 포함할 수 있다. 상기 '약학적으로 허용 가능한'의 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 것이며, 상기 '담체'는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가될 용이하게 하는 화합물로 정의된다.

- [117] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 단독으로 또는 어떤 편리한 담체 등과 함께 혼합하여 투여될 수 있고, 그러한 투여 제형은 단회 투여 또는 반복 투여 제형일 수 있다. 상기 약학 조성물은 고형 제제 또는 액상 제제일 수 있다. 고형 제제는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 좌제 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 고형 제제에는 담체, 착향제, 결합제, 방부제, 붕해제, 활택제, 충전제 등이 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 액상 제제로는 물, 프로필렌 글리콜 용액 같은 용액제, 현탁액제, 유제 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 적당한 착색제, 착향제, 안정화제, 점성화제 등을 첨가하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 산제는 본 발명의 유효 성분인 다중불포화지방산의 트리-하이드록시 유도체와 유당, 전분, 미결정셀룰로오스 등 약제학적으로 허용 가능한 적당한 담체를 단순 혼합함으로써 제조될 수 있다. 과립제는 본 발명의 상기 다중불포화지방산의 트리-하이드록시 유도체, 약학적으로 허용 가능한 적당한 담체 및 폴리비닐피롤리돈, 히드록시프로필셀룰로오스 등의 약학적으로 허용가능한 적당한 결합제를 혼합한 후, 물, 에탄올, 이소프로판올 등의 용매를 이용한 습식 과립법 또는 압축력을 이용한 건식 과립법을 이용하여 제조될 수 있다. 또한 정제는 상기 과립제를 마그네슘스테아레이트 등의 약학적으로 허용 가능한 적당한 활택제와 혼합한 후, 타정기를 이용하여 타정함으로써 제조될 수 있다.
- [118] 상기 약학적 조성물은 치료해야 할 질환 및 개체의 상태에 따라 경구제, 주사제(예를 들어, 근육주사, 복강주사, 정맥주사, 주입(infusion), 피하주사, 임플란트), 흡입제, 비강투여제, 질제, 직장투여제, 설하제, 트랜스더말제, 토피칼제 등으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여 경로에 따라 통상적으로 사용되고 비독성인, 약학적으로 허용 가능한 운반체, 첨가제, 비히클을 포함하는 적당한 투여 유닛 제형으로 제제화될 수 있다.
- [119] 상기 약학적 조성물은 매일 약 0.0001 mg/kg 내지 약 10 g/kg이 투여될 수 있으며, 약 0.001 mg/kg 내지 약 1 g/kg의 1일 투여 용량으로 투여될 수 있다. 그러나 상기 투여량은 상기 혼합물의 정제 정도, 환자의 상태(연령, 성별, 체중 등), 치료하고 있는 상태의 심각성 등에 따라 다양할 수 있다. 필요에 따라 편리성을 위하여 1일 총 투여량을 하루 동안 여러 번 나누어 투여될 수 있다.
- [120] 본 발명의 암 줄기세포 성장 억제용 조성물은, 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [121] 상기 암 줄기세포(cancer stem cell, CSC)는 다양한 암 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화 세포를 의미한다. 암 줄기세포는 악성종양 조직 내에 1~2% 정도로 존재하며 정상 줄기세포의 특성인 자가 복제 능력과 전분화능을 가지고 있으나 자가조절 기능에 이상이 있어 세포분열 활성화로 세포 수가 증가하게

되고 스스로 악성 종양세포로 분화한다. 이와 같은 암 줄기세포의 특징에 의하여 항암 치료를 통하여 일반 암세포는 제거되지만 암 줄기세포는 살아남으며, 살아남은 일부의 암 줄기세포에 의하여 암의 재발 및 전이가 이루어진다고 알려져 있다.

- [122] 구체적으로, 본 발명의 암 줄기세포는 암 줄기세포의 마커 중 하나인 ALDH1(aldehyde dehydrogenase 1) 단백질이 과발현되거나 단백질 활성이 양성인 암 세포 일 수 있다.
- [123] 본 발명의 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 암 줄기세포를 선택적으로 억제할 수 있으며, 특히 항암 치료 저항성이 높은 암 줄기세포가 포함된 암 세포군을 사멸시킴으로써 우수한 항암 효과를 얻을 수 있다. 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 암 줄기세포의 자가재생 능력, 침윤 능력 및 이주 능력을 감소시킴으로써 암 줄기세포의 성장을 억제할 수 있다.
- [124] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 암 줄기세포의 특성을 갖는 암을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 암 줄기세포의 특성을 갖는 암은 기존의 항암 치료에 대하여 저항성을 보여서 그 예후가 좋지 않기 때문에 기존의 항암 치료와는 다른 치료가 적용되어야 한다. 예컨대, 동일한 암종의 환자라고 하여도, 그 암종이 암 줄기세포의 비율이 높은 경우에 해당된다면, 이 환자는 항암제 투여 또는 방사선 치료와 같은 기존에 알려진 항암 치료로는 암 치료 효과를 얻을 수 없게 된다. 따라서, 동일한 종류의 암이라고 하더라도 암 병변 부위의 세포에서 암 줄기세포의 비율이 높은 경우에는, 기존의 항암 치료와 다른 새로운 치료법을 적용하는 것이 매우 중요하다.
- [125] 상기 암 줄기세포 특성을 갖는 암은 암을 구성하는 세포군에서 암 줄기세포의 비율이 높은 암일 수 있다. 일반적인 암 세포 중의 암 줄기세포의 비율이 약 1% 이상 5% 미만 정도인 것을 고려할 때, 예컨대 암을 구성하는 세포군에서 암 줄기세포의 비율이 5% 이상, 10% 이상, 30% 이상, 50% 이상, 70% 이상인 경우를 암 줄기세포 특성을 갖는 암으로 정의할 수 있으며, 상술한 바와 같이 기존의 항암 치료에 대하여 저항성을 나타내어 항암 치료 예후가 좋지 않은 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 상기 암 줄기세포 특성을 갖는 암은 ALDH1을 과발현하는 암 일 수 있다. 상기 ALDH1을 과발현 하는 암은 ALDH1를 발현하거나 그 활성이 양성인 암 줄기세포의 비율이 일반적인 암 보다 상대적으로 높은 암 일 수 있다.
- [126] 구체적으로, 상기 ALDH1을 과발현 하는 암은 폐암, 유방암, 간암, 신장암, 위암, 췌장암 및 뇌암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [127] 상기 암의 예방 또는 치료는 암 줄기세포의 재생능, 성장능, 침윤능 또는 이동능을 감소시키는 것을 통해 암 치료 도중 또는 암 치료 후의 암 화학 내성, 암 재발, 또는 암 전이를 예방 또는 치료하는 것일 수 있다.

- [128] 본 발명의 방사선 항암 치료 보조용 조성물은, 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [129] 상기 조성물은 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암 관련 세포의 방사선 민감성 향상을 위한 유효성분으로 포함한다.
- [130] 상기 암 관련 세포는 암을 구성하고 있는 세포로, 정상 세포에 비해 모양이 일정하지 않고, 무한정 증식을 하며, 주변 세포와의 결속력이 약한 특징을 가진 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 암 관련 세포는 암 세포 또는 암 줄기세포일 수 있고, 구체적으로 암 줄기세포 일 수 있다.
- [131] 상기 암 줄기세포는 다양한 암 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화 세포일 수 있고, 구체적으로 ALDH1을 발현하거나 활성이 양성인 암 세포일 수 있다. 본 발명에서 상기 암 줄기세포는 방사선 조사에 의해서도 세포 증식이 억제되지 않고, 자가재생능력이 저하되지 않으며 이동 및 침윤 능력이 억제되지 않는 특징을 가진 것일 수 있다.
- [132] 또한, 상기 암 관련 세포는 방사선에 대한 민감성이 낮은 것, 즉 방사선 치료에 대한 저항성이 높은 것일 수 있고, 실질적으로 방사선에 대한 민감성이 없어서 방사선 조사에 의한 항암 치료가 불가능한 것일 수 있다.
- [133] 상기 항암은 방사선 조사, 외과적 수술 및 화학 요법 등을 통해 암 관련 세포의 증식 억제, 전이 및 침윤 억제, 세포의 사멸을 유도하는 것일 수 있다. 본 발명에서 상기 항암은 방사선 조사와 함께 병용하여 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것일 수 있다. 이와 같이 인간화 항체 또는 항원 결합 단편을 방사선 조사와 함께 병용하여 투여하는 경우, 상기 항체 또는 항원 결합 단편에 의해 암 관련 세포의 방사선 민감성이 향상되어, 방사선 조사에 의한 항암 치료 효과를 극대화시킬 수 있고, 나아가 암의 재발 및 전이를 막을 수 있다.
- [134] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [135] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.
- [136] **[실시예 및 비교예]**
- [137] **[실시예 1]**
- [138] **TM4SF4에 특이적으로 결합하는 인간화 항체의 설계 및 발현 벡터 제조**
- [139] TM4SF4 단백질에 대해 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합할 수 있는 인간화 항체를 제조하였다. 이를 위해, TM4SF4와 특이적인 결합을 형성하기 위한 항체 부위 중 가변영역의 CDR(complementarity determining regions)의 아미노산 서열을 인간 항체의 불변영역의 아미노산 서열과 가변영역의 FR(framework regions)의 아미노산 서열을 이용하여, TM4SF4에 대한 특이적 결합성을 가지면서도 인체에 투여되었을 때 낮은 면역원성(immunogenicity)을 나타낼 수 있는 신규한 인간화 항체를 제조하였다.
- [140] 구체적으로, 본 발명의 인간화 항체의 CDR 서열은 TM4SF4에 특이적으로 결합 가능한 생쥐 유래 항체의 CDR 서열로 다음 서열을 이용하였다. 중쇄가변영역의

CDR-H1(서열번호 10), CDR-H2(서열번호 11), CDR-H3(서열번호 14), 그리고 경쇄가변영역의 CDR-L1(서열번호 15), CDR-L2(서열번호 18), CDR-L3(서열번호 19)을 이용하였다. 또한, FR 서열로는 중쇄가변영역의 FR-H1(서열번호 1), FR-H2(서열번호 2), FR-H3(서열번호 4), FR-H4(서열번호 5), 그리고 FR-L1(서열번호 6), FR-L2(서열번호 7), FR-L3(서열번호 8), FR-L4(서열번호 9)를 이용하였다. 상기 CDR 서열들은 생쥐 유래의 TM4SF4 항체인 ECL-2B7 항체의 CDR 서열을 이용하였으며, 상기 FR 서열들은 인간 항체인 3QRG 항체의 FR 서열을 이용하였다. 상기 3QRG 항체는, 미국국립생물공학정보센터(NCBI)의 BLASTP 분석 프로그램을 이용하여 상기 ECL-2B7 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열과 유사한 인간 항체 후보군 중에서 선별해 낸 것이다. 상기 CDR 서열을 CDR-이식(CDR-grafting) 방법으로 상기 FR 서열에 이식하여 본 발명의 인간화 항체를 제조하였다. 먼저, 상기 CDR 서열들 중에서 중쇄가변영역의 CDR 서열들(서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 14)의 앞쪽에 신호 펩타이드 서열을 추가하여 얻은 CDR 서열의 아미노산 서열을 바탕으로 역번역(reverse translate) 프로그램(https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)을 이용해, 이를 암호화하는 염기서열로 변환하였다. 그런 다음, 제조합 PCR을 이용해, 상기 FR 서열들(서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 4 및 서열번호 5)과 연결하여 본 발명 인간화 항체의 중쇄가변영역을 암호화하는 유전자를 합성하였다. 약 450 bp 길이의 유전자를 3개의 구간으로 나누어, 도 1에 나타낸 것과 같이 ECL-2B7-S-H-5' 및 ECL-2B7-S-H-3' 프라이머를 이용하여 T1(164 bp)을, ECL-2B7-HC-1-5' 및 ECL-2B7-HC-1-3' 프라이머를 이용하여 T2(167 bp)를, 그리고 ECL-2B7-HC-2-5' 및 ECL-2B7-HC-2-3' 프라이머를 이용하여 T3(157 bp)에 해당하는 부위의 중쇄가변영역 유전자의 절편을 합성하였다. 그런 다음, T1 및 T2 절편을 제조합 PCR을 통해 연결하여 310 bp 크기의 절편으로 합성하였고, T1과 T2가 연결된 절편을 다시 T3 절편과 Ch57-H.C-5' 및 ECL-2B7-WH-3' 프라이머를 이용하여 연결함으로써, EcoRI과 ApaI 제한효소 절단부위를 양 말단에 가진 약 450bp의 본 발명 인간화 항체의 중쇄가변영역(Hz2B7-1.0) 유전자를 합성하였다. 상기 중쇄가변영역은 FR-H1, CDR-H1, FR-H2, CDR-H2, FR-H3, CDR-H3, FR-H4의 순서로 배열되도록 제작하였으며, 이를 아가로오스 겔에서 확인하였다(도 2). 이 과정에 사용된 상기 프라이머 서열들은 하기 표 1에 나타냈다. 그리고, 본 발명 인간화 항체의 경쇄가변영역(Hz2B7-0.1)의 유전자는, 유전자 합성 업체(Bionics, 한국)에 의뢰하여 FR-L1(서열번호 6), CDR-L1(서열번호 15), FR-L2(서열번호 7), CDR-L2(서열번호 18), FR-L3(서열번호 8), CDR-L3(서열번호 19), FR-L4(서열번호 9)의 순서로 배열되도록 하여 약 450 bp 길이의 경쇄가변영역(Hz2B7-0.1) 유전자를 합성하였고, 이를 아가로오스 겔에서 확인하였다(도 3). 그리고, T4 연결효소(T4 ligase, NEB, 미국)를 이용해 상기 중쇄가변영역 유전자를 pdCMV-dhfr 벡터의 EcoRI-ApaI 위치에, 상기 경쇄가변영역 유전자를 HindIII-BsiWI 위치에 T4

연결효소를 이용해 클로닝하여(도 8), 본 발명의 인간화 항체(Hz2B7-1.1)를 암호화하는 벡터 pdCMV-dhfrC-Hz2B7-1.1을 제조하였다.

[141] [표1]

명칭	서열 (5'→3')	서열번호
ECL-2B7-S-H-5' primer	GAC GAA TTC ACT CTA ACC ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACT ACA GGT GTC CAC TCC GAG ATC ACC CTG AA	서열번호 57
ECL-2B7-S-H-3' primer	CTC AGG CTG AAG CCG CTG AAG GTG CAG GTC AGG GTC AGG GTC TGG GTG GGC TTC ACC AGG GTG GGG CCG CTC TCC TTC AGG GTG ATC TCG GAG	서열번호 58
ECL-2B7-S-H-5' primer	CAG CGG CTT CAG CCT GAG CAC TTA TGG TAT AGG AGT AAG CTG GAT CAG GCA GCC CCC CGG CAA GGC CCT GGA GTG GCT GGC CCA CAT TTG	서열번호 59
ECL-2B7-S-H-5' primer	CCT GGT TCT TGC TGG TGT CCT TGG TGA TGG TCA GCC TGC TCT TCA GGG CTG TGT TAT AGT ACT TAT TAT CAT TCC ACC AAA TGT GGG CCA GCC AC	서열번호 60
ECL-2B7-S-H-5' primer	ACA CCA GCA AGA ACC AGG TGG TGC TGA CCA TGA CCA ACA TGG ACC CCG TGG ACA CCG CCA CCT ACT ACT GCG CCA GGA AGG AGG GCA GCT	서열번호 61
ECL-2B7-S-H-5' primer	GGG CCC TTG GTG GAG GCG CTG CTC ACG GTC ACC AGG GTG CCC TGG CCC CAG TAA GCA AAG GGG GCC GAG CTG CCC TCC TTC CTG G	서열번호 62
Ch57.H.C-5' primer	GAC GAA TTC ACT CTA ACC AT	서열번호 63
ECL-2B7-WH-3' primer	TTG GGC CCT TGG TGG AGG CGC TGC T	서열번호 64

- [142] [실시예 2] 본 발명 인간화 항체의 변이체 항체의 설계 및 발현 벡터 제조
- [143] [2-1] 본 발명 인간화 항체와 에피토프의 상호작용 분석 및 분자 모델링
- [144] 상기 실시예 1을 통해 설계한 본 발명의 인간화 항체의 아미노산 서열 중 일부 서열을 변형시킨 변이체 항체를 제조하기 위해, 먼저 상기 인간화 항체와 표적인 TM4SF4의 에피토프 사이의 상호작용을 확인하였다. 일반적으로 항원-항체의 결합력은 도킹 시뮬레이션(docking simulation)을 통해 정성적으로 예측할 수 있는데, 상기 실시예 1의 인간화 항체는 X-선 구조가 알려져 있지 않아 Homology 모델링을 통해 그 구조를 예측하였고 이를 바탕으로 상기 항체와 에피토프 사이의 결합력을 확인하였다. 이를 위해 MODELLER 프로그램의 8.2 버전을 사용하였으며, 상기 실시예 1의 인간화 항체와 아미노산 서열과의 유사도가 높은 마우스의 키메릭 항체 X836를 BLAST를 이용해 Homology 모델링의 템플릿으로 이용하였다. 상기 X836 항체의 235개 아미노산 중에서 실시예 1의 인간화 항체와 176개 아미노산이 일치하여 아미노산 서열 유사성이 75% 정도로 나타났으며, 이를 바탕으로 상기 실시예 1의 인간화 항체의 3차원 구조를 예측할 수 있었다(도 4).
- [145] 항원인 TM4SF4 단백질의 에피토프는 짧은 길이의 폴리펩타이드 사슬이므로 하나의 유기화합물로 간주하여 상기 실시예 1의 인간화 항체의 CDR 영역에서 도킹 시뮬레이션을 수행하였고, 결합 자유에너지와 결합 모드를 계산하였다. 구체적으로, TM4SF4 단백질의 126번에서 140번까지의 아미노산 서열 Thr-Trp-Gly-Tyr-Pro-Phe-His-Asp-Gly-Asp-Tyr-Leu-Asn-Asp-Glu로 구성된 15-mer 올리고펩티드를 전체 항원에 대한 단순화 모델로 삼아 계산을 수행하였다. 상기 인간화 항체에 대한 에피토프의 결합 자유에너지는 -11.6 kcal/mol로 산출되었으며 K_d 값으로 환산하면 3 nM 정도로 계산되었다. 이는 본 발명의 인간화 항체와 TM4SF4의 에피토프 사이에 매우 강한 항원-항체 결합이 형성될 것임을 의미한다. 도킹 프로그램으로는 미국 Scripps Research Institute에서 개발한 AutoDock version 4.2.6을 변형한 것을 사용하였고, 정확도 제고를 위해 단백질-리간드 결합자유에너지 함수의 일부 항을 개선하여 사용하였다. 구체적으로, 정전기적 상호작용 항과 수소결합 에너지 항 및 리간드의 수화에너지 항에 들어있는 파라미터들을 보다 정확하게 최적화하여 도킹 시뮬레이션에 사용하였다. 항체와 에피토프 사이의 정전기적 상호작용 부분에서는 항체 분자의 유전상수 값을 직접 계산하여 사용하였고, 수소결합 에너지 항에서는 각도와 거리의 상호의존성도 반영하기 위해 Morse 함수의 곱으로 표현함으로써 계산의 정확도를 제고하였다. 리간드 수화에너지 부분에서는 파라미터 수를 69개로 늘린 후에 유전 알고리즘을 통해 최적화하는 방법으로 정확도를 개선하였다. 반데르발스 결합, 수소결합, 정전기적 상호작용, 엔트로피, 그리고 수화에너지 항에 대한 weighting factor 값은 각각 0.1485, 0.0656, 0.1146, 0.3113, 및 0.1711로서 기존의 AutoDock 프로그램에 주어진 값을 그대로 사용하였다.

- [146] 상기와 같은 도킹 시뮬레이션으로 얻은 실시예 1의 인간화 항체와 에피토프의 복합체 구조 분석 결과를 통해, 결합에 중요한 역할을 하는 아미노산 부위를 확인할 수 있었다. 상기 인간화 항체 H2B7-1.1의 아미노산 중에서 경쇄 99번 아르기닌(Arg, R), 중쇄 58번 아스파라긴(Asn, N), heavy chain 60번 타이로신(Tyr, Y), 중쇄 102번 글리신(Gly, G), 중쇄 103번 세린(Ser, S) 등 다섯 개가 CDR 영역에 속하면서 에피토프와 수소결합을 형성하면서 항체의 기능에서 핵심역할을 수행하는 것으로 예상되었다(도 4, 도 5). 반데르발스 결합은 상대적으로 약한 것으로 나타났으며, 소수성 아미노산 중에 경쇄 38번 타이로신과 경쇄 98번 타이로신만 항체-에피토프 복합체의 경계면에서 관찰되었다(도 4, 도 5).
- [147] 에피토프와 수소결합 혹은 반데르발스 결합으로 직접 상호작용하는 아미노산들은 항체의 기능에 중요한 역할을 담당하므로 유지하고, 에피토프와의 결합력을 증대하기 위해서는 결합력이 약하거나 먼 거리에 있는 아미노산을 치환시킬 필요가 있다. 예를 들어, 도 4와 도 5에서 에피토프의 페닐알라닌 및 트립토판 잔기가 결합하는 부분인, 상기 인간화 항체 H2B7-1.1의 경쇄가변영역의 CDR1에 해당하는 31번 아스파라긴(Asn, N)을, 보다 소수성을 띠는 방향족성 아미노산으로 치환할 경우 에피토프와 항체 사이의 반데르발스 결합이 강화되면서 결합력이 증가할 것으로 예측되었다. 또한, 상기 인간화 항체 H2B7-1.1의 중쇄가변영역의 CDR2에 해당하는 55번 트립토판(Trp, W)은 에피토프의 아스파르트산과 인접한 위치에 있으므로, 수소결합을 보다 강하게 형성할 수 있는 아미노산으로 치환할 경우 결합력이 증가할 것으로 예측되었다. 따라서 경쇄가변영역의 CDR1에 해당하는 31번, 중쇄가변영역의 CDR2에 해당하는 55번 위치는 에피토프와 친화도를 증가시킬 수 있는 중요한 위치이다(도 4, 도 5). 또한, 경쇄가변영역의 CDR3에 해당하는 100번 트레오닌(Thr, T), 중쇄가변영역의 CDR2에 해당하는 54번 트립토판, 중쇄가변영역의 CDR2에 해당하는 56번 아스파라긴 등 세 아미노산도 에피토프와 비교적 가까운 거리에 위치하고 있으므로, 이들을 화학적 성질이 다른 아미노산으로 치환하면 에피토프와의 새로운 수소결합 또는 반데르발스 결합이 유도되어 항체의 효능을 증대시킬 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 경쇄가변영역의 CDR3에 해당하는 100번, 중쇄가변영역의 CDR2에 해당하는 54번, 56번 위치 역시 에피토프와 친화도를 증가시킬 수 있는 또 다른 중요한 위치이다(도 4, 도 5).
- [148] **[2-2] 변이체 인간화 항체 아미노산 서열의 설계 및 벡터의 제조**
- [149] 상기 실시예 2-1의 도킹 시뮬레이션 분석을 통해, 상기 실시예 1의 인간화 항체 중쇄가변영역의 46번 알라닌(Ala, A)을 발린(Val, V)으로 치환함으로써, 상기 실시예 1의 인간화 항체 서열 중에서 FR-H2를 서열번호 3의 아미노산 서열로 하여 중쇄가변영역 H2B7-2.0(HC A46V)을 설계하였다(도 5).
- [150] 또한, 상기 실시예 1의 인간화 항체 중쇄가변영역의 55번 트립토판(Trp, W)을 세린(Ser, S) 또는 타이로신(Tyr, Y)으로 각각 치환함으로써, 상기 실시예 1의

인간화 항체 서열 중에서 CDR-H2를 각각 서열번호 12 또는 서열번호 13의 아미노산 서열로 하여 중쇄가변영역 Hz2B7-3.0(HC W55S)과 중쇄가변영역 Hz2B7-4.0(HC W55Y)을 설계하였다(도 5). 이를 위해, h2B7-H.C-W55S-5'와 h2B7-H.C-W55S-3' 프라이머, 그리고 h2B7-H.C-W55Y-5'와 h2B7-H.C-W55Y-3' 프라이머를 합성하였고, 인-퓨전 클로닝(in-fusion cloning)을 위해 h2B7-H.C-SLIC-3' 프라이머와 h2B7-H.C-SLIC-3' 프라이머를 이용하여 재조합 PCR을 시행하였다(도 6의 A). 합성된 유전자의 서열을 키트(EZ-Fusion™ HT Cloning Kit, Enzymomics, 한국)를 이용하여 EcoR1과 ApaI으로 자른 pdCMV-dhfr-h2B7 벡터에 클로닝하였다(도 8). 염기서열 분석으로 변이를 확인한 후에 상기 변이체 인간화 항체를 발현시킬 수 있는 pdCMV-dhfr-Hz2B7-3.0과 pdCMV-dhfr-Hz2B7-4.0을 제조하였다.

- [151] 또한, 상기 실시예 1의 인간화 항체 경쇄가변영역의 31번 아르파라긴(Asn, N)을 페닐알라닌(Phe, F) 또는 발린(Val, V)으로 각각 치환함으로써, 상기 실시예 1의 인간화 항체 서열 중에서 CDR-L1을 각각 서열번호 16 또는 서열번호 17의 아미노산 서열로 하여 경쇄가변영역 Hz2B7-0.2(LC N31F)와 경쇄가변영역 Hz2B7-0.3(LC N31V)을 설계하여 이를 아가로오스 젤에서 확인하였다(도 5). 이를 위해, h2B7-L.C-N31F-5'와 h2B7-L.C-N31F-3' 프라이머, 그리고 h2B7-L.C-N31V-5'와 h2B7-L.C-N31V-3' 프라이머를 합성하였고, 인-퓨전 클로닝(in-fusion cloning)을 위해 h2B7-L.C-SLIC-3' 프라이머와 h2B7-L.C-SLIC-3' 프라이머를 이용하여 재조합 PCR을 시행하였다(도 6의 B). 합성된 유전자의 서열을 키트(EZ-Fusion™ HT Cloning Kit, Enzymomics, 한국)를 이용하여 HindIII와 BsiWI으로 자른 pdCMV-dhfr-h2B7-1.1 벡터에 클로닝하였다(도 8). 염기서열 분석으로 변이를 확인한 후에 상기 변이체 인간화 항체를 발현시킬 수 있는 pdCMV-dhfr-Hz2B7-0.2와 pdCMV-dhfr-Hz2B7-0.3을 제조하였다.

- [152] 이 과정에 사용된 상기 프라이머 서열들은 하기 표 2에 나타냈다.

[153] [표2]

명칭	서열(5'→3')	서열번호
h2B7-H.C-W55Y-5` primer	TTT GGT ATA ATG ATA ATA AGT A	서열번호 65
h2B7-H.C-W55Y-3` primer	TCA TTA TAC CAA ATG TGG GCC A	서열번호 66
h2B7-H.C-W55S-5` primer	TTT GGT CGA ATG ATA ATA AGT A	서열번호 67
h2B7-H.C-W55S-3` primer	TCA TTC GAC CAA ATG TGG GCC A	서열번호 68
h2B7-H.C-SLIC-5` primer	GCC AGT GTG CTG GAA TTC ACT CTA ACC	서열번호 69
h2B7-H.C-SLIC-3 primer	AAG ACC GAT GGG CCC TTG GTG GAG	서열번호 70
h2B7-L.C-N31V-5` primer	TTT TAG TAA GTA GCA ATC AA	서열번호 71
h2B7-L.C-N31V-3` primer	CTA CTT ACT AAA AGG CTC TGA C	서열번호 72
h2B7-L.C-N31F-5` primer	TTT TAT TCA GTA GCA ATC AA	서열번호 73
h2B7-L.C-N31F-3` primer	CTA CTG AAT AAA AGG CTC TGA C	서열번호 74
h2B7-L.C-SLIC 5` primer	ATA GGG AGA CCC AAG CTT CGG CAC GAG CAG A	서열번호 75
h2B7-L.C-SLIC 3` primer	TGG TGC AGC CAC CGT ACG CTT GAT CTC CA	서열번호 76

[154] [비교예] TM4SF4를 표적으로 하는 키메라 항체의 설계 및 발현 벡터 제조

[155] 상기 실시예 1 및 2의 인간화 항체는, 항체의 중쇄/경쇄 가변영역 중에서 CDR 서열은 생쥐 항체의 CDR 서열을 이용하였고, 항체의 불변영역과 가변영역 중 FR 서열은 인간 항체의 서열을 이용하여 제조한 것이다. 이에, 본 발명의 인간화 항체와 비교하기 위해, 중쇄/경쇄 가변영역 전체는 생쥐 항체로부터 유래하고, 불변영역은 인간 항체로부터 유래하는 키메라 항체(chimeric antibody)를 제조하였다. 즉, 상기 키메라 항체는 인간 항체와의 유사도의 측면에서, 생쥐 항체와 인간화 항체의 중간에 해당하는 항체라고 볼 수 있다.

- [156] 먼저, 생쥐 유래의 상기 ECL-2B7 항체의 중쇄 및 경쇄 유전자를 대상으로, PCR을 수행하고 젤 추출 키트(gel extraction kit, FAVORGEN, 대만)을 이용하여 약 400 bp와 390 bp의 DNA를 분리하였다. 그리고 중쇄 유전자의 신호서열을 합성하기 위하여 pdCMV-dhfr 벡터를 주형으로 하여 5'-signal-EcoRI(5'-GAC GAA TTC ACT CTA ACC ATG GAA TGG A) 프라이머와 ECL-2B7-S-H-3'(CTT CAC CTC GGA GTG GAC ACC TGT AGT TA-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다(도 7의 A). 그리고 중쇄가변영역을 증폭하기 위해 중쇄가변영역의 DNA를 주형으로 하여 2B7-S-H-5'(5'-GTC CAC TCC GAG GTG AAG CTG GAG GAG TC) 프라이머와 ECL-2B7-HC-Chi-3'(TTG GGC CCT TGG TGG AGG CTG CAG AGA CAG TGA CCA G-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다(도 7의 A). 그런 다음, 상기 중쇄의 신호서열과 중쇄가변영역 유전자를 연결하기 위해, 5'-signal-EcoRI 프라이머와 ECL-2B7-HC-Chi-3' 프라이머를 이용하여 재조합 PCR을 수행하였다. 이를 통해 중쇄가변영역과 중쇄 신호서열이 연결된 유전자를 획득하여 1% 아가로스 젤에 전개시켜 확인하였으며, DNA 분리 키트(FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit, Farvorgen, 대만)를 이용해 약 450 bp에 해당하는 DNA를 분리하였다(도 7의 A). 상기 신호서열이 연결된 중쇄가변영역 유전자를 EcoRI 및 ApaI으로 처리한 후 상기 FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit를 이용하여 분리하였다(도 7의 B). 이렇게 얻은 중쇄가변영역 유전자를 인간 항체의 중쇄불변영역(IgG1) 유전자가 포함된 pdCMV-dhfr 벡터의 EcoRI 및 ApaI 자리에 T4 DNA 연결효소(T4 DNA ligase, NEB, 미국)를 이용하여 클로닝하였다(도 8). 경쇄 유전자의 경우에도 마찬가지로, 신호서열을 합성하기 위해 pdCMV-dhfr-ch57 벡터를 주형으로 하여, ch57-LC-whole 5'(5'-CTG CAA AGC TTC GGC ACG AGC A) 프라이머와 ECL-2B7-S-L-3'(CAC AAT ATC TCC TTC AAC ACC AGA CAA CC-3') 프라이머를 이용해 PCR을 수행하고 경쇄가변영역 유전자의 증폭을 위해 ECL-2B7-S-L-5'(5'-GTT GAA GGA GAT ATT GTG ATG ACC CAG TCT) 프라이머와 ECL-2B7-LC-chi-3'(CCA CCG TAC GTT TGA TTT CCA GCT T-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다(도 7의 A). 상기 신호서열과 경쇄가변영역의 연결을 위해, ch57-LC-whole 5' 프라이머와 ECL-2B7-LC-chi-3' 프라이머를 이용하여 재조합 PCR을 수행한 후, 1% 아가로스 젤에 전개시켜 확인하였으며, 중쇄가변영역 유전자와 동일한 방법으로 분리하였다(도 7의 A). 상기 경쇄가변영역 유전자를 HindIII 및 BsiwI으로 처리하여 분리한 다음, 인간 항체의 경쇄불변영역(Ck) 유전자를 포함하고 앞서 제작한 중쇄 유전자가 삽입된 pdCMV-dhfr-chi 2B7-HC 벡터의 HindIII 및 BisWI 자리에 클로닝함으로써(도 7의 C), 상기 키메라 항체를 발현시킬 수 있는 벡터를 제조하였다(pdCMV-dhfr-chi2B7, 도 8). 상기 벡터를 대장균 DH5α에 RbCl2 방법으로 형질 전환한 다음, 약 450bp 크기를 가진 대장균들을 선발하였다. 이 대장균들을 50μg/ml의 암피실린이 함유된 5ml의 LB배지에서 밤새 배양한 후 플라스미드 DNA 분리를 위한 키트(DNA-spin™ Plasmid DNA purification kit,

INTRON, 한국)을 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 염기서열을 확인하였다(Bionics, 한국). 그 결과, 상기 형질전환체로부터 분리된 cDNA의 염기서열은, 상기 ECL-2B7 항체의 가변영역 유전자와 동일하고, 인간 항체의 중쇄 및 경쇄불변영역 유전자와 바르게 연결되어 있음을 확인하였다.

[157] **[실례 1]**

[158] **인간화 항체 및 키메라 항체의 발현 및 정제**

[159] 상기 실시예 1, 2를 통해 제조한 본 발명 인간화 항체의 벡터와, 상기 비교예의 키메라 항체 벡터로부터 항체 단백질을 발현시켜 정제하였다.

[160] 먼저, 상기 키메라 항체('Chi2B7')를 발현시켜 정제하기 위해, 150 mm 배양 접시를 이용해 1×10^7 의 HEK293T 세포(인간 배아신장세포주)를 20 ml의 DMEM 배지(Biowest, 프랑스)에서 배양했다. 배양된 세포에 50 μ g의 상기 pdCMV-dhfr-chi2B7 발현 벡터와 75 μ l의 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, 1 mg/ml)과 섞어준 뒤, 트랜스펙션 최적화 배지 500 μ l와 섞어 골고루 세포 배양 배지 위에 뿌려주었다. 다음날 상층액을 수집하고, 새로운 배지를 채워 세포주로부터 발현되어 나온 키메라 항체를 수집하고 이의 상층액을 비드(Protein G agarose beads, Amicogen, 한국)가 Packing 되어 있는 컬럼에 넣어주어 항체가 상기 비드와 결합할 수 있게 하였다. 그런 다음, PBS(pH8.0)로 비드를 세척하고, 0.1M 글리신(pH2.8) 10 ml와 1M Tris-HCl(pH9.0)을 이용하여 항체를 비드로부터 용출하여, Chi2B7 키메라 항체를 정제하였으며, SDS-PAGE와 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색법을 통해 이를 확인하였다(도 9의 A). 또한, 상기 정제한 키메라 항체가 인간 항체의 불변영역을 가진 것인지 여부를 염소의 항체(goat- α -hIgG-gamma chain-HRP, Invitrogen, 미국, 그리고 goat- α -hIgG-kappa chain-HRP, Bethyl, 미국)를 2차 항체로 이용하여 웨스턴 블랏팅을 통해 검출한 결과, 상기 키메라 항체는 인간 항체의 불변영역을 포함하는 항체인 것을 확인할 수 있었다(도 9의 B).

[161] 또한, 상기 실시예 1, 2의 인간화 항체를 발현, 정제하였다. 상기 실시예 1 및 2를 통해, 본 발명 인간화 항체의 중쇄가변영역을 4가지 종류로, 경쇄가변영역을 3가지 종류로 제조하였는 바, 이들의 조합을 통해 다양한 형태의 인간화 항체를 제조할 수 있다. 이에 따라, 상기 실시예 1, 2의 발현벡터를 HEK293T 세포에 도입시키고 상기 키메라 항체와 동일한 방법을 통해 인간화 항체를 발현시키고, Protein G 비드 및 컬럼을 이용해 분리 및 정제하였다.

[162] 정제된 상기 키메라 항체와 본 발명의 인간화 항체, 그리고 생쥐 유래의 2B7 항체의 정제 순도를 확인하기 위해 10% SDS-PAGE를 실시하였다. 전체 10종의 인간화 항체중에서 대표적인 6종 (Hz2B7-1.1, Hz2B7-1.2, Hz2B7-1.3, Hz2B7-2.1, Hz2B7-3.2, Hz2B7-4.3)을 분석하였고, 이때 각 항체는 1 μ g씩 이용하여 SDS-PAGE 이후 쿠마시 블루 염색과 웨스턴 블랏팅 분석을 수행하였다(도 9). 쿠마시 블루 염색을 위한 용액(PageBlue staining solution, Thermo Scientific, 미국)을 처리해 염색을 수행한 결과, 각 항체의 중쇄 및 경쇄가 약 55 kDa, 25

kDa의 위치에서 확인되었다(도 9의 A). 이는 상기 키메라 항체 및 인간화 항체가 모두 IgG 타입의 항체이며 인간 항체의 일부 서열을 가지는 것임을 의미한다. 웨스턴 블랏팅을 위해서 2차 항체로 염소의 항체(goat- α -hIgG-gamma chain-HRP, Invitrogen, 미국, 그리고 goat- α -hIgG-kappa chain-HRP, Bethyl, 미국)를 이용하였으며, ECL 키트(Western Bright ECL kit, advansta, 미국)를 이용하여 밴드를 검출하였다. 그 결과 ECL-2B7 항체는 생쥐 항체이므로 웨스턴 블랏팅을 통해 검출되지 않았고, 다른 항체들(키메라 항체 및 인간화 항체)의 경우 SDS-PAGE 결과와 동일하게 각 항체의 중쇄 및 경쇄가 검출되어 이들이 인간 항체 서열을 가짐을 확인할 수 있었으며, 항체의 정제 순도를 확인할 수 있었다(도 9의 B).

[163] [실험예 2]

[164] ELISA를 통한 인간화 항체의 TM4SF4 항원 결합능 비교

[165] 본 발명의 인간화 항체, 그리고 키메라 항체를 이용하여 간접 ELISA(indirect ELISA)를 통해 TM4SF4에 대한 결합능을 확인하였다.

[166] 구체적으로, 상기 인간화 항체는, 상기 실시예 1, 2를 통해 설계한 중쇄가변영역 변이종 4가지와 경쇄가변영역 변이종 3가지를 조합하여, H₂B7-1.1, H₂B7-1.2, H₂B7-1.3, H₂B7-2.1, H₂B7-3.1, H₂B7-3.2, H₂B7-3.3, H₂B7-4.1, H₂B7-4.2 및 H₂B7-4.3의 10가지 형태로 제조하였다. 이를 위해 96-웰 플레이트의 각 웰의 바닥에 코팅 완충용액(100 mM carbonate/bicarbonate coating buffer, pH 9.6)으로 용해시킨 TM4SF4-BSA(1 μ g/ml) 또는 BSA용액(1 μ g/ml) 100 μ l를 가하여 4 °C에서 16시간 이상 흡착시켰다. 그 다음, 코팅된 항원을 세척 완충용액(wash buffer, 0.05% PBS-T, Tween-20)으로 3회 세척한 다음, 각 웰의 바닥에 항원이 흡착되지 않은 부분에 블록 완충용액(blocking buffer, 5% skim milk in wash buffer) 200 μ l를 가하여 4 °C에서 16시간 이상 반응시킨 후, 다시 세척 완충용액으로 3회 씻어냈다. 그런 다음, 상기 실험예 1을 통해 정제시킨 상기 10가지 조합의 인간화 항체와 키메라 항체를 블록 완충용액을 이용하여 다양한 농도로 희석하여 준비한 후, 농도 별로 각 웰에 100 μ l씩 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 3회 세척한 다음 이를 검출하기 위한 1 mg/ml의 항체(α -human IgG-Kappa chain-HRP, Bethyl, 미국)를 블록 완충용액을 이용하여 10,000배로 희석해 각 웰에 100 μ l를 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척 완충용액으로 3회 씻어내고 기질 용액(OPD solution, 30% H₂O₂ 4 μ l, 100 μ l OPD stock(40 mg/ml), phosphate citrate buffer로 10 ml로 맞춤)을 각 웰에 100 μ l씩 가하여 실온에서 반응시킨 후 2.5M H₂SO₄ 50 μ l를 가하여 반응을 종결시켰다. 마지막으로 고체상에 결합된 효소의 활성을 측정하기 위해, ELISA 리더를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 10).

[167] 그 결과 본 발명의 인간화 항체 10종은 모두 BSA에 결합하지 않았고, TM4SF4-BSA 항원에 대해서는 높은 특이성을 가지고 결합하는 것으로 나타났다(도 10). 따라서, 본 발명의 인간화 항체는 TM4SF4에 대한 결합력을

가질 뿐만 아니라 이에 대해 특이적으로 결합하는 특성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, TM4SF4-BSA에 대한 친화도를 비교하였을 때, 10종의 인간화 항체는 모두 키메라 항체 Chi2B7에 비해 현저하게 높은 TM4SF4 친화도를 나타냈다. 그리고 10종의 인간화 항체들은 각기 다른 결합 친화도(binding affinity)를 나타냈으며, 그 중에서 Hz2B7-1.2 인간화 항체의 경우 Hz2B7-1.1에 비해 명백히 증가된 결합친화도를 나타내, TM4SF4에 대한 결합력이 가장 우수함을 확인할 수 있었다(도 10의 A 및 B).

[168] [실례 3]

[169] SPR 분석을 통한 항-TM4SF4 인간화 단일클론 항체 민감도 비교

[170] 구축된 항-TM4SF4 인간화 단일클론 항체들의 인간

TM4SF4-펩타이드(hTM4SF4 aa 126-140) 항원에 대한 결합능력을 비교하기 위해 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance, SPR) 분석을 수행하였다.

[171] 애널리이트(Analyte)인 인간화 항체는 총 5종으로, 표 3과 같이 최초돌연변이형 1종(HzE2B7-1.1), 경쇄돌연변이형 2종 (HzE2B7-1.2(LC N31F), HzE2B7-1.3(LC N31V)), 중쇄/경쇄돌연변이형 2종 (HzE2B7-4.3(HC W55Y, LC N31V), HzE2B7-3.2(HC W55S, LC N31F))이 분석되었고, 인간 TM4SF4 단백질의 126번에서 140번까지의 아미노산 서열에 비오틴(biotin)이 결합된 형태인 합성 펩타이드(Biotin-GSAGGSTWGYPFHDGDYLNDE, GSAGGS: Biotin과 TM4SF4 aa126-140인 TWGYPFHDGDYLNDE 사이의 스페이스 서열)를 리간드(Ligand)로 사용하였다.

[172] [표3]

Antibody	Heavy Chain mutation	Light Chain mutation	KD (M)
HzE2B7-1.1(origin)	-	-	2.442 X 10 ⁻⁸
HzE2B7-4.3(HC W55Y, LC N31V)	W55Y	N31V	8.165 X 10 ⁻⁸
HzE2B7-1.2(LC N31F)	-	N31F	6.030 X 10 ⁻⁹
HzE2B7-1.3(LC N31V)	-	N31V	3.542 X 10 ⁻⁸
HzE2B7-3.2(HC W55S, LC N31F)	W55S	N31F	1.119 X 10 ⁻⁷

[173] 먼저, 스트렙타아비딘 접합 센서칩(Series S Sensor Chip SA, Cytiva社)을 Biacore T200(Cytiva 사)에 삽입하고 활성화 버퍼(1M NaCl, 50mM NaOH)를 30초간 흘려준 후, HBS-EP 버퍼(Cytiva社)를 흘려 센서칩 표면의 활성화와 안정화를 유도하였다. 안정된 센서칩에 리간드(Biotin-hTM4SF4 aa 126-140)를 1nM~128nM 농도로 흘려주어 리간드를 센서칩 표면에 고정시키고, 재생용액(Regeneration buffer, 20mM NaOH)을 흘려 바이오틴-펩타이드 리간드가 안정적으로 결합된

스트렙타아비딘 접합 센서칩을 구축하였다. 친화도 분석을 위한 애닐라이트 항체는 512nmole/L부터 1/2 순차 희석하여 16nmol/L 농도까지 준비하였고, 구축된 리간드 결합 스트렙타아비딘 접합 센서칩에 각 농도별 애닐라이트 항체를 480초 동안 30ul/min 속도로 흘려 결합을 유도한 후 HBS-EP 완충용액을 동일시간과 속도로 흘려 애닐라이트 항체가 리간드 펩타이드로부터 해리되는 정도를 반응값(Response unit)의 형태로 얻었고, 동일방법으로 얻어진 리간드 비결합 센서칩 반응값을 제외하는 방식으로 Biacore T200 평가 소프트웨어(Cytiva社)를 사용하여 결합율(Association rate, K_a)과 해리율(Dissociation rate, K_d) 및 평형해리상수(KD, K_d/K_a) 값을 산출하였다. 산출기준으로 리간드 펩타이드와 애닐라이트 항체의 상호작용에 대한 물질전달피팅 모델은 1:1 결합을 사용하여 분석되었다. 도 11에 표기된 평형 해리상수값(KD)을 기준으로 항-TM4SF4 인간화 단일클론 항체들의 인간TM4SF4-펩타이드 (hTM4SF4 aa 126-140) 항원에 대한 결합 능력은 HzE2B7-1.2(LC N31F) 항체가 6.03×10^{-9} M로 가장 낮았고, HzE2B7-1.1는 2.442×10^{-8} M, HzE2B7-1.3(LC N31V)는 3.542×10^{-8} M, HzE2B7-4.3(HC W55Y LC N31V)은 8.165×10^{-8} M, HzE2B7-3.2(HC W55S LC N31F)은 1.119×10^{-7} M로 평가되었다(표 3). 인간화 항체의 평형 해리상수(KD)값은 낮은 것이 보다 바람직하고 상업적으로 허가 받은 일반적인 인간화 항체에서 그 값이 보통 10^{-8} M 이하이며, 하한은 특별히 한정되지 않는다. 따라서 처음에 디자인한 인간화 항체 (HzE2B7-1.1)의 KD가 이미 유용한 2.442×10^{-8} M를 가졌으며, 도킹모델을 통해 얻은 정보를 바탕으로 경쇄 31번째 아스파라긴(Asparagine, N)을 페닐알라닌(Phenylalanine, F)으로 치환한 HzE2B7-1.2(LC N31F) 항체가 항원에 대한 결합력이 최초 디자인한 HzE2B7-1.1보다 약 4배 더 증가되어 평형 해리상수 (KD) 값이 6.03×10^{-9} M에 이르고 있음을 보여주며 상업적인 가치가 보다 높은 항체임을 알 수 있다.

[174] **[실험예 4]**

[175] **FACS를 통한 인간화 항체의 암세포 결합능 비교**

[176] 상기 실험예 2를 통해 본 발명 인간화 항체가 TM4SF4에 대해 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합함을 확인하였으므로, 상기 TM4SF4를 과발현하는 특징이 있는 암세포에 본 발명의 인간화 항체를 처리하여 결합 여부를 확인하였다.

[177] 구체적으로, 폐암세포주인 Calu-3, A549 세포주를 DMEM 배지(Biowest, 프랑스)에 10% 소태아혈청(WelGene)을 사용하여 배양하였다. 그리고 간암세포주인 Huh7, SNU-387, SNU-449 세포주들은 RPMI-1640 배지(Biowest)에 10% 소태아혈청을 사용하여 배양하였다. 이후 80% 정도 성장한 상기 세포들에 효소(TrypLE™ Express Enzyme, Gibco™)를 처리하여 떼어주고, 이 세포를 PBS(pH7.4)로 세척한 다음, 4% 파라포름알데하이드(PFA)로 4°C에서 15분 동안 고정시켰다. 이 후 PBA(0.1% BSA in PBS)로 2회 세척 후 항체 별로 5×10^5 개의

세포에 생쥐 유래의 2B7 항체($10\mu\text{g/ml}$), 키메라 항체 Chi2B7($10\mu\text{g/ml}$), 본 발명의 인간화 항체 Hz2B7-1.1($10\mu\text{g/ml}$), Hz2B7-1.2($10\mu\text{g/ml}$), Hz2B7-1.3($10\mu\text{g/ml}$), 생쥐와 인간의 Isotype 대조군 IgG1 항체($10\mu\text{g/ml}$)를 각각 포함하고 있는 PBA를 넣고 1시간 동안 4°C 에서 반응시켰다. 반응 후 PBA로 2회 세척 후, 생쥐 유래 2B7 항체 및 생쥐 Isotype IgG($2\mu\text{g/ml}$, Invitrogen)가 들어있는 그룹에는 FITC 형광이 결합되어 있고 생쥐 IgG에 특이적인 α -mouse IgG-FITC($2\mu\text{g/ml}$) 항체를 넣어 주었다. 그리고 인간 Isotype IgG, 키메라 항체 및 인간화 항체들이 들어있는 그룹에는 FITC 형광이 결합되어 있고 인간 IgG에 대해 특이적인 α -Human IgG-FITC($2\mu\text{g/ml}$, Invitrogen) 항체를 넣고 30분간 4°C 에서 반응시켰다. 반응 이후에 PBA로 세척 후 $500\mu\text{l}$ 의 PBA로 부유시킨 다음, 유세포 분석기(FACS Calibur, BD, 미국)를 이용해 상기 항체들이 항원에 대해 특이성을 가지는지 확인하였다.

[178] 그 결과, 생쥐 유래의 2B7 항체와 마찬가지로, 본 발명의 인간화 항체와 비교예의 키메라 항체는, 표면에 TM4SF4를 발현하는 Calu-3와 A549 폐암세포에 특이적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 인간 일차 간세포(human primary hepatocyte, hPH)의 표면에는 결합하지 않았으나, 간암세포주인 Huh7, SNU-387 및 SNU-449 간암세포에도 특이적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 본 발명의 인간화 항체 Hz2B7-1.2의 경우, 분석 결과 특히 A549세포주에서 현저하게 높은 결합능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(도 12).

[179] [실험예 5]

[180] 본 발명 인간화 항체를 높은 생산성으로 생산할 수 있는 세포주의 제조

[181] 본 발명의 인간화 항체를 생산할 수 있는 세포주를 제조하기 위하여, CHO 세포(Chinese ovary hamster cells) 중에서 디하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase)를 암호화하는 유전자가 결손되어 있는 DG44 세포주를 이용하였다. 상기 DG44 세포는 IMDM 배지(Welgene, 한국)에 H.T.(hypoxanthine-thymidine, sigma, Germany) 및 Dialyzed FBS(Gibco, USA)를 첨가하여 배양하였고 트립신-EDTA(welgene, 한국)으로 세포주를 떼어낸 다음, 6웰 플레이트에 1×10^6 cells/well 만큼 분주하였다. 여기에 본 발명의 인간화 항체 중에서 Hz2B7-1.1 및 Hz2B7-1.2(LC N31F)를 암호화하는 발현백터를 형질전환(transfection)하기 위해, $15\mu\text{g}$ 의 PvuI 제한효소(Enzynomics, 한국)를 각각 처리해 선형화시킨 pdCMV-dhfr-hz2B7-1.1 및 pdCMV-dhfr-hz2B7-1.2를 TOM 배지(transfection optimized medium)에 잘 섞어서 준비한 다음, $15\mu\text{l}$ 의 리포펙타민(lipofectamine) 2000(Invitrogen, USA)을 TOM 배지에서 반응시킨 후 상기 백터가 함유된 배지와 혼합하여 20분간 반응시켰다. 그리고, 반응된 용액을 상기 DG44 세포에 방울로 떨어뜨려 형질전환을 수행하였다.

[182] 본 발명의 인간화 항체를 암호화하는 유전자가 도입된 상기 세포들은 $100\mu\text{g/ml}$ 농도의 G418이 함유된 배지에서 네오마이신(neomycin) 저항성 여부를 통해

스크리닝하여 콜로니가 형성된 세포의 상층액을 수득하였다. 상층액에 포함된 본 발명의 인간화 항체를 이용하여 샌드위치 ELISA(Sandwich ELISA)를 수행하여 항체의 생산을 확인하였다. 각각의 형질전환체 중에서 ELISA 결과 OD 값이 높은 결과를 보여 항체 발현량이 우수한 5개의 클론을 선발한 다음, MTX(methotrexate)를 처리하여 본 발명의 항체 유전자를 증폭시켰다. 0.02 μ M 농도로 MTX를 처리하여 1주 동안 상기 항체 유전자를 증폭시킨 다음, 다시 ELISA를 통해 항체 생산량을 측정하여 생산량이 증가한 클론을 다시 5개씩 선별해 0.08 μ M 농도로 MTX를 증가시켜 유전자를 2차 증폭시켰다.

[183] 이에 따라, H2B7-1.1 인간화 항체를 고생산하는 세포주로 3A12, H12, 4A12, 4B12 및 4H12의 총 5개 클론을 선발하였다. 그리고 H2B7-1.2 항체(LC N31F)를 고생산하는 세포주로 4A9, 4A12, 4B9, 4C7 및 4H12 클론을 선발하였고 추가적인 형질전환을 통해 얻은 7A8 및 6G10 클론을 포함해 총 7개의 클론을 선발하였다(도 13). 상기 12개 클론들의 세포 스탁을 만들고 이를 IMDM 배지에 10% Dialyzed FBS를 첨가하여 배양하여 세포가 50% 정도 자란 뒤 MTX를 2일마다 0.08 μ M의 농도로 처리하여 항체 유전자를 증폭시켰다. 약 30일 동안 MTX를 처리하며 배양한 결과 0.08 μ M 농도의 MTX에서 저항성을 가지는 세포주를 획득할 수 있었으며, H2B7-1.1 항체 고발현 세포주로 4H12클론을, H2B7-1.2 항체 고발현 세포주로는 4A12 클론을 선정하였다.

[184] 상기 0.08 μ M 농도의 MTX에서 살아남아 선정된 클론들을 단일클론 선별하기 위해 100 mm 디쉬에 3 $\times$ 10⁴ cells 만큼 분주하였다. 약 10일 후 형성된 각 콜로니를 이용해 스탁을 만들어 보관하고 남은 세포들은 샌드위치 ELISA를 통해 항체 생산량의 증가 여부를 확인하였다. 구체적으로, 96웰 플레이트의 각 웰의 바닥에 코팅 완충용액(100 mM carbonate/bicarbonate coating buffer, pH 9.6)으로 용해시킨 α -인간 IgG-Fc 특이적 항체(2 μ g/ml)를 100 μ l 가해 4°C에서 16시간 이상 흡착시켰다. 세척 및 블락킹을 수행한 다음, 상기 4H12 클론(H2B7-1.1-4H12), 4A12 클론(H2B7-1.2-4A12)과 MTX 0.08 μ M 농도에서 선별한 항체 유전자가 증폭된 각각의 단일클론들을 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 배양액을 수집하였다. 상기 배양액과 인간 IgG Isotype 대조군 항체를 다양한 농도로 희석하여 준비한 후 농도 별로 각 웰에 100 μ l씩 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, α -인간 IgG-Kappa 사슬-HRP(1mg/ml, Bethyl, 미국)를 블락킹 버퍼를 이용하여 10,000배로 희석해 각 웰에 100 μ l 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 기질인 OPD 용액(30% H₂O₂ 4 μ l, 100 μ l OPD stock(40mg/ml), phosphate citrate buffer로 10 ml 맞춤)을 각 웰에 100 μ l씩 가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 2.5 M H₂SO₄ 50 μ l를 가해 반응을 종결시켰다.

[185] ELISA 수행 결과, MTX에 의해 항체 유전자가 증폭된 H2B7-1.1-4H12-0.08 및 H2B7-1.2-4A12-0.08의 각 클론 중 MTX에 의해 증폭되기 전의 클론에 비해 보다 높은 흡광도를 나타낸 클론들을 확인하였다. 그리고 정량적 항체 생산량 분석을

통해 항체 농도를 계산하였다(도 14 및 도 15). 그 결과, Hz2B7-1.1-4H12 클론의 경우, MTX에 의해 항체 유전자가 증폭되기 전의 세포의 항체 생산량이 약 $2.8 \mu\text{g}/10^6\text{cell}/24\text{hr}$ 이었으나 MTX에 의해 항체 유전자가 증폭된 Hz2B7-1.1-4H12-0.08-#1 클론의 항체 생산량은 약 3.8배 증가하여 $10.8 \mu\text{g}/10^6\text{cell}/24\text{hr}$ 으로 나타났고, Hz2B7-1.2-4A12 클론의 경우, 증폭 전 항체 생산량이 $2.5 \mu\text{g}/10^6\text{cell}/24\text{hr}$ 이었으나 이 클론을 MTX 농도 $0.08 \mu\text{M}$ 로 증폭한 Hz2B7-1.2-4A12-0.08 클론의 경우, #9 클론은 약 $14.2 \mu\text{g}/10^6\text{cell}/24\text{hr}$, #20 클론은 $7.9 \mu\text{g}/10^6\text{cell}/24\text{hr}$ 의 항체 생산량을 나타내어, 유전자가 증폭되지 않은 클론과 비교하여 각 약 5.7배, 3.1배 증가된 항체 생산량을 나타내어 최대 5.7배 항체 생산성이 증가되었음을 알 수 있다(도 15).

- [186] 다음으로, 혈액내의 항체의 안정성을 측정하기 위해 혈청 안정성(serum stability) 실험을 진행하였다. 마우스 하이브리도마세포주에서 정제한 생쥐항체 2B7과 CHO세포주에서 정제한 인간화 항체 Hz2B7-1.1 및 Hz2B7-1.2를 각각 37°C 의 60% 인간 혈청(human serum)(Sigma-Aldrich)에 최대 4일간 배양한 후 0, 3, 24, 48, 72, 96시간에서의 항원결합능을 Indirect ELISA를 이용하여 측정하였다. 구체적으로 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 TM4SF4-BSA 항원을 코팅 완충용액(100mM carbonate/bicarbonate coating buffer, pH 9.6)을 이용하여 4°C 에서 16시간 이상 흡착시킨 후 세척 및 블락킹 과정을 수행하였다. 이후 인간 혈청에서 배양한 항체를 일차항체로 이용하여 이전과 동일하게 ELISA 과정을 진행하여 시간에 따라 항원결합능이 유지되는지를 확인하였다. 흡광도를 측정한 후 0 시간에서의 항원결합능을 100%로 가정하고 비교한 결과, 생쥐항체 2B7은 인간의 혈청내에서 96시간까지 동등한 항원결합능을 가지는 것을 확인하였다(도 16의 A). 또한 항체의 서열과 구조가 변화된 인간화항체 Hz2B7-1.1 및 Hz2B7-1.2도 인간의 혈청내에서 약 4일까지 분해되지 않고 일정한 항원결합능이 유지되는 것으로 확인되었다(도 16의 B 및 C).
- [187] 따라서 본 발명의 인간화 항체 유전자 형질전환된 CHO-DG44 세포에서 MTX를 이용해 항체 유전자를 특이적으로 증폭함으로써 본 발명의 항체를 생산하는 세포주로 Hz2B7-1.1-4H12-0.08-#1, Hz2B7-1.2-4A12-0.08-#9 세포주를 확립할 수 있었다.
- [188] 이상에서 본 발명은 기재된 실시예에 대해서만 상세히 설명되었지만 본 발명의 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 청구범위에 속함은 당연한 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 FR-H1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 FR-H2, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 FR-H3 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 FR-H4를 포함하는 중쇄가변영역; 및
서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 FR-L1, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 FR-L2, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 FR-L3 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 FR-L4를 포함하는 경쇄가변영역; 을 포함하고,
TM4SF4(TransMembrane 4 Superfamily Member 4)에 특이적으로 결합하는, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 중쇄가변영역은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열번호 77의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 더 포함하고,
상기 경쇄가변영역은 서열번호 79의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 18의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 80의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 더 포함하는 것인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서,
상기 CDR-H2는 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것이거나,
상기 CDR-L1은 서열번호 15, 서열번호 16 및 서열번호 17로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것이거나, 또는
상기 CDR-L3는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 것인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서,
상기 중쇄가변영역은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3를 더 포함하고,
상기 경쇄가변영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 18의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3를 더 포함하는 것인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 중쇄가변영역은 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호

- 23으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것이고,
 상기 경쇄가변영역은 서열번호 24, 서열번호 25 및 서열번호 26으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 6] 청구항 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서,
 상기 인간화 항체는 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 중쇄불변영역 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 갖는 경쇄불변영역으로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나를 더 포함하는 것인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 7] 청구항 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서,
 상기 항원 결합 단편은 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 8] 청구항 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서,
 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 평형해리상수(KD)가 2.4×10^{-8} M이하인 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 9] 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 10] 청구항 9의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.
- [청구항 11] 청구항 10의 발현 벡터를 포함하는, 숙주 세포.
- [청구항 12] 청구항 10의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법.
- [청구항 13] 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, TM4SF4 검출용 조성물.
- [청구항 14] 청구항 13의 TM4SF4 검출용 조성물을 포함하는, TM4SF4 검출용 키트.
- [청구항 15] 청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 TM4SF4가 포함되어 있을 것으로 예상되는 검출 대상 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는, TM4SF4를 검출하는 방법.
- [청구항 16] 청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 17] 청구항 16에 있어서,
 상기 암의 예방 또는 치료는, 암 치료 도중의 암 화학내성, 암 치료 후의 암 화학내성, 암 재발 및 암 전이로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 예방하거나 치료하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 18] 청구항 16에 있어서,
 상기 암은 폐암, 위암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 췌장암, 대장암, 결장암, 식도암, 피부암, 갑상선암, 신장암, 간암, 두경부암, 방광암, 전립선암, 혈액암, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 악성 림프종,

흉선암, 골육종, 섬유성 종양 및 뇌암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 19] 청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암 줄기세포 성장 억제용 조성물.

[청구항 20] 청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항의 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 방사선 항암 치료 보조용 조성물.

[청구항 21] 청구항 20에 있어서,
상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 암 줄기세포를 포함하는 암세포들의 방사선에 대한 민감도를 증진시키는 것인, 방사선 항암 치료 보조용 조성물.