발명의 설명

발명의 명칭: 항 CEACAM5 항체 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 항 CEACAM5 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 암배아항원 (CEA) 은 세포 부착과 관련된 당단백질이다. CEA 패밀리는 면역 글로불린 수퍼패밀리에 속한다. 18개의 유전자로 이루어지는 CEA 패밀리는 암배아항원 관련 세포 부착 단백질 (CEACAM) 하위 군과 임신 특이적인 당단백질 하위 군의 두 가지 하위 단백질 군으로 세분된다(Kammerer & Zimmermann, BMC Biology 2010, 8:12).

[3] CEACAM 패밀리 구성원들의 세포외 도메인은 서열 상동성에 따라 A, B 및 N의 3가지 유형으로 분류된, 반복된 면역 글로불린 유사(Ig 유사) 도메인으로 이루어진다. CEACAM5 는 7개의 이러한 도메인, 즉, N, A1, B1, A2, B2, A3 및 B3을 함유한다. CEACAM 는 다양한 세포 기능을 수반하며, 세포간의 부착 기능에 기반한 신호 전달을 통해 세포 성장 및 분화를 조절하고, 인슐린 항상성, 혈관형성 및 면역 조절에 중요한 역할을 한다. CEACAM 패밀리의 구성원은 미생물 병원체에 대한 수용체로서의 역할을 포함하여, 다양한 병태생리학적 역할에 관련된다. 이들은 발암현상, 특히 암 검출, 진행 및 전이에 중요한 역할을 한다.

[4] 한편, CEACAM5 (CEA로서 지칭되며, 또한 CD66e로서 공지되어 있다) 는 약 180 kDa의 분자량을 갖는 당단백질이다. 7개의 도메인을 함유하는 CEACAM5 는 글리코실-포스파티딜-이노시톨 (GPI)을 통해 세포막상에 고정된다. 7개의 도메인은 단일의 N-말단 Ig 가변 도메인, 및 Ig 불변 도메인에 상동 성인 6개의 도메인 (A1-B1-A2-B2-A3-B3)을 포함한다. CEACAM5 는 처음에는 태아 조직에서 발현되는 단백질인 것으로 생각되었으나 최근에는, 다수의 정상적인 성인 조직에서 확인되었다. 또한 다수 유형의 암에서 CEACAM5 의 과발현이 관찰되었으며, 추가 연구를 통해 이의 과발현이 다수의 악성 종양과 연관되며, 종종 불량한 예후와 상관있음이 밝혀졌다.

[5] 또한, CEACAM5 가 다양한 악성 종양, 예를 들어 유방, 췌장, 난소, 결장, 폐 및 위샘 종양에서 과발현되는 것으로 밝혀졌으며, 종양 침범 및 전이와 관련되어 있음이 밝혀졌다. 이에 CEACAM5 는 표적 요법에 유용한 종양 관련 항원으로서 중요성이 더욱 부각되고 있다.

[6] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

발명의 내용

기술적 과제

[7] 한편, 면역요법 분야에 있어서 진보가 이루어져 왔지만, 보다 효과적이고, 보다 장기간 지속되며, 신규한 표적을 포함하고, 단일 작용제로서 또는 궁극적으로는 암 환자에서 장기간 지속되는 반응을 생성하기 위해 공지된 요법 과 조합하여 작용할 수 있는 새로운 치료법이 여전히 계속해서 요구되고 있다.

[8] 더욱 안전하고, 더욱 큰 효능을 가지고 있으며, 종양 특이적 단백질 발현 또는 활성화를 포함하는 질환에서 진단학적으로 및 치료학적으로 사용될 수 있는, 특이 종양 특이적 단백질을 인식하는 인간화 항체를 제공하는 요구는 여전히 충족되지 못하고 있다.

[9] 한편, CEACAM5 (배아 항원-관련 세포 부착 분자 5 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5) 는 대장암, 췌장암, 폐암, 위암, 간세포종양, 유방암 및 갑상선암과 같은 일부 고형암에서 우선적으로 과발현되며, 특히 결장, 위, 폐 및 자궁 종양 세포의 표면 상에서 고도로 발현된다.

[10] 이에, 본 발명의 발명자들은 전술한 한계를 해결하기 위하여, CEACAM5 를 주목하였다. 보다 구체적으로, CEACAM5 는 암배아 항원 (carcinoembryonic antigen: CEA) 유전자 패밀리의 구성원으로 면역글로불린 (Ig) 슈퍼패밀리에 속하며, 분화 클러스터 66e (CD66e) 로도 알려져 있다.

[11] 또한, 세포 표면에 발현되는 CEACAM5 의 상당양은 세포 표면으로부터 떨어져 나와 혈액안에 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 형태로 존재하며, 혈청 내에 sCEACAM5 의 농도는 암환자에서 급격히 증가하여 최고 2 μg/ml에 달하기도 한다. 이에 항-CEACAM5 에 대한 항체치료제는 오랜 동안 꾸준히 연구가 진행되어 왔지만, 혈액내에 존재하는 sCEACAM5 가 투여된 항체를 중화시켜 고형암 종양조직으로 전달되는 항체의 양을 감소시키고 결과적으로 항-CEACAM5 항체 치료제의 임상효과를 저해하는 요소로 여겨지고 있다.

[12] 이에, 본 발명의 발명자들은 항체 스크리닝 시 세포 표면으로부터 떨어져 나가지 않고 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 개발함으로서 CEACAM5 를 발현하는 암세포를 타겟하는 치료제의 가능성을 확인하였다.

[13] 보다 구체적으로, 본 발명의 발명자들은 본 발명의 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 이용함으로서, 세포 표면으로부터 떨어져 나와 혈액안에 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 형태로 존재하는 sCEACAM5 에 실질적으로 결합하지 않고 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 에피토프에 특이적으로 결합하여 고형암 종양조직으로 전달되는 항체의 양을 증가시킴으로서 CEACAM5 를 발현하는 암세포를 타겟하는 치료제의 가능성을 확인하였다.

[14] 결국, 본 발명의 발명자들은 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 형태로 존재하는 sCEACAM5 에 실질적으로 결합하지 않고 전술한 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 에피토프에 결합하는 항체를 개발하였다.

[15] 이때, 본 발명의 항체는 CEACAM5 의 A3 도메인 및/또는 B3 domain 외에 다른 에피토프에도 결합이 가능하다.

[16] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[17] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해 본 발명의 일 실시예에 따른 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.

[18] 본 발명의 특징에 따르면, 본 발명의 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된 항체로써, 본 발명의 항체는 서열번호 48 로 표시되는 CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인에 결합가능하다. 다만, 본 발명의 항체가 CEACAM5의 다른 도메인에는 결합하지 않는 것이라고 이해되어서는 안된다.

[19] 구체적으로, 본 발명의 항체는 세포 표면으로부터 떨어져 나와 혈액안에 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 형태로 존재하는 sCEACAM5 에 결합하지 않고 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 에피토프, 더욱 구체적으로는 CEACAM5 가 절단되고 막단백질에 남은 부분으로 예측되는, 서열번호 48 로 표시되는 CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인에 특이적으로 결합할 수 있으나, CEACAM5 의 다른 도메인에 결합하지 않아야 하는 것은 아니다.

[20] 따라서, 본 발명의 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이용하는 경우, 항체 스크리닝 시 세포 표면으로부터 떨어져 나가지 않고 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 결합함으로써, CEACAM5 를 발현하는 암세포를 타겟하는 치료제로서 활용이 가능하다.

[21] 또한, 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CEACAM5 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공되며, 이와 더불어 항암보조제, CEACAM5 발현 종양세포의 증식 억제용 조성물, 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate), 항체-약물 접합체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공될 수 있다.

[22] 또한, 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CEACAM5 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 암을 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다.

[23] 기타 실시예의 구체적인 사항들은 상세한 설명 및 도면들에 포함되어 있다.

발명의 효과

[24] 본 발명은, 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 제공함으로서, 고형암 종양조직으로 전달되는 항체의 양을 증가시킬 수 있다.

[25] 보다 구체적으로, 본 발명은, 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 제공함으로서, 혈액내에 존재하는 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 에 의해 항체가 중화되지 않고, 고형암 종양조직으로 전달되는 항체의 양을 증가시킴으로서 항-CEACAM5 항체 치료제의 임상효과를 보다 향상시킬 수 있다.

[26] 나아가, 본 발명의 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 이용할 경우, 혈액내에 존재하는 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 에 의해 항체가 중화되지 않음에 따라, 이를 이용한 치료 효과를 보다 장시간으로 유지시킬 수 있으며, 이에 따라 더 많은 면역 효과를 가져올 수 있다.

[27] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 CHO-K1 세포에 형질전환 (transfection) 시킨 후, 세포에서 생산된 CEACAM5 재조합 단백질 (full length) 을 정제하여 취득한 결과를 나타낸 도이다.

[29] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 재조합 단백질 (full length) 을 마우스에 immunization 하는 과정을 나타낸 도이다.

[30] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 재조합 단백질 (full length) 을 마우스에 immunization 한 결과를 나타낸 도이다.

[31] 도 4a는 CEACAM5 full length 단백질에 결합하는 모클론 선별 결과를 나타낸 도이다.

[32] 도 4b는 CEACAM5 full length 단백질에 결합하는 서브클론 선별 결과를 나타낸 도이다.

[33] 도 5는 CHO-K1, CHO-K1-CEACAM5 (full) 및 CHO-K1-CEACAM5 (A3-B3) 세포와 6가지 단일항체 클론 (hybridoma 세포) 에서 정제된 항체의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[34] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 CHO-K1 세포에 형질전환 (transfection) 시킨 후, 세포에서 생산된 CEACAM5 재조합 단백질 (A3 도메인 및 B3 도메인) 을 정제하여 취득한 결과를 나타낸 도이다.

[35] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 재조합 단백질 (A3 도메인 및 B3 도메인) 을 마우스에 immunization 한 결과를 나타낸 도이다.

[36] 도 8a는 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 모클론 선별 결과를 나타낸 도이다.

[37] 도 8b는 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 서브클론 선별 결과를 나타낸 도이다.

[38] 도 9a 및 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 클론으로 정제한 CEACAM5 항체의 CEACAM5 full length 단백질에의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[39] 도 10a 및 10b는 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 클론으로 정제한 CEACAM5 항체의 CEACAM5를 발현하는 A549 세포주와의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[40] 도 11a 및 11b는 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 항체의 soluble CEACAM5로 인한 blocking 효과를 확인하여 나타낸 도이다.

[41] 도 12a는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 결합력을 분석하여 나타낸 도이다.

[42] 도 12b은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주와 CEACAM8을 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM8) 세포주에 대한 결합능을 비교하여 나타낸 도이다.

[43] 도 12c 는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 CEACAM5를 발현하는 H3122, KATO III, MKN45 세포주와의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[44] 도 13a 및 13b는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (45A2E10) 의 결합력을 분석하여 나타낸 도이다.

[45] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (45A2E10) 의 CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주와의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[46] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 다양한 클론 항체 (94E12E2) 의 결합력을 ELISA 분석법으로 확인하여 나타낸 도이다.

[47] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 다양한 클론 항체 (94E12E2) 의 결합력을 유세포 분석법으로 확인하여 나타낸 도이다.

[48] 도 17a 및 17b는 본 발명의 일 실시예에 따른 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 에 해당하는 서열을 변형한 항체 (36B5H8) 클론들의 결합력을 분석하여 나타낸 도이다.

[49] 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 및 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 작업 후 CHO-K1-CEACAM5 세포를 이용하여 선택된 항체들의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[50] 도 19a는 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 (full length) 항원의 구조를 나타낸 도이다.

[51] 도 19b는 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 항원의 A3 도메인 및 B3 도메인을 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[52] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[53] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는, 통상적인 항체 및 이의 단편뿐만 아니라, 단일 도메인 항체 및 이의 단편, 특히, 단일 도메인 항체의 가변 중쇄 및 키메라, 인간화, 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 의미한다. 항체에는 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE의 5종류가 있으며, 각각 중쇄 불변영역 유전자 μ, δγα, ε로부터 만들어진 중쇄를 포함한다. 항체기술에서는 주로 IgG가 사용되는데 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 4종류의 동종(isotype)이 있으며, 각각의 구조 및 기능적 특성은 상이할 수 있다. 또한, 상기 IgG는 중쇄(heavy chain, 약 50 kDa) 단백질 2개와 경쇄(light chain, 약 25 kDa) 단백질 2개로만 들어진 Y자 모양의 매우 안정된 구조(분자량, 약 150 kDa)를 형성하고 있다. 항체의 경쇄와 중쇄는 아미노산 서열이 항체들마다 서로 다른 가변영역(variable region)과 아미노산 서열이 같은 불변영역(constant region)으로 나뉘어져 있다. 중쇄 불변영역에는 CH1, H(hinge), CH2, CH3 도메인이 존재한다. 각 도메인은 두 개의 β시트 (sheet)로 구성되어 있고 분자 내 이황화결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 중쇄와 경쇄의 가변영역 두 개가 합쳐져 항원 결합 부위(antigen binding site)가 형성된다. 상기 부위는 Y자 모양의 두 개의 팔에 각각 한 개씩 존재하는데, 이러한 항원과 결합할 수 있는 부분을 Fab(antibody binding fragment)이라 하고, 항원과 결합하지 못하는 부분을 Fc(crystalizable fragment)라고 한다. Fab과 Fc은 유연한 경첩 부위(hinge region)로 연결되어 있다.

[54] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간화 항체"는, 전체적으로 또는 부분적으로 비 인간 기원이고, 인간에서 면역 반응을 회피하거나 최소화하기 위하여 예를 들어, VH 및 VL 도메인의 프레임워크 부위의, 특정 아미노산을 교체하도록 변형된 항체를 지칭한다. 인간화 항체의 불변 도메인은 대부분의 경우 인간 CH 및 CL 도메인이다.

[55] 이때, 본 명세서에서 사용되는 용어 "중쇄"는, 항체와 관련하여 사용될 때, 이는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 임의의 별개의 유형, 예를 들어, 알파 (α), 델타 (δ엡실론 (ε감마 (γ및 뮤 (μ)를 지칭할 수 있고, 이는 IgG의 하위부류, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하여, 각각 항체의 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 부류를 생성한다.

[56] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경쇄"는, 항체와 관련하여 사용될 때, 이는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 임의의 별개의 유형, 예를 들어, 카파 (κ또는

람다 (λ를 지칭할 수 있다. 경쇄 아미노산 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 구체적 실시양태에서, 경쇄는 인간 경쇄이다.

[57] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이뮤노글로불린"은, IgA, 분비형 IgA, IgG 및 IgM을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 통상 적으로 공지된 이소형 중 임의의 것으로부터의 면역 분자를 의미한다. IgG 하위부류가 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 기재된 많은 분자는 이뮤노글로불린이다. 본원에 사용된 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코 딩되는 항체 부류 또는 하위부류 (예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 의미한다. 나아가, 이뮤노글로불린은 통상적으로 2개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 쇄로 구성되고 각각의 쌍은 1개의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 1개의 "중쇄" (약 50-70 kDa)를 갖는 것인 사량체 분자이다.

[58] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원 결합 단편"은, 항체의 전장 사슬과 비교하여 일부 아미노산이 결여되었지만, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 일부를 포함하는 것으로서, 항원 결합 부분이 항원 결합 분자가 항원에 결합하는 것을 촉진하는 입체형태를 채택하게 하는, 항원 또는 표적 단백질 및, 임의로, 스캐폴드 또는 프레임워크 부분에 결합하는 부분을 포함하는 단백질을 의미한다. 항원 결합 분자의 대표적인 유형의 예는 scFv, 인간, 마우스 또는 토끼 항체; 인간화 항체; 키메라 항체; 재조합 항체; 단일 쇄 항체; 단일 도메인 항체 (예컨대 VHH); 디아바디; 트리아바디; 테트라바디; Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편; IgD 항체; IgE 항체; IgM 항체; IgG1 항체; IgG2 항체; IgG3 항체; 또는 IgG4 항체 및 그의 단편을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한, 항원 결합 분자는, 예를 들어, 그라프트된 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 CDR 유도체를 갖는, 대안적 단백질 스캐폴드 또는 인공 스캐폴드를 포함할 수 있다. 이때, 스캐폴드는, 예를 들어, 항원 결합 분자의 3차원 구조를 안정화하기 위해 도입된 돌연변이를 포함하는 항체-유래 스캐폴드, 뿐만 아니라, 예를 들어, 생체적합성 중합체를 포함하는 완전 합성 스캐폴드를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 나아가, 항원 결합 분자는 1개 이상의 결합 부위를 가질 수 있다. 1개 초과의 결합 부위가 존재하는 경우에, 결합 부위는 서로 동일할 수 있거나 또는 상이할 수 있다. 즉, 본 명세서 내의 항체는 항원 결합능을 가지며, 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 상동성 또는 유사성인 아미노산 서열을 포함하는 단일 쇄 복합 폴리펩티드, 즉, 연결된 VH-VL 또는 단일 쇄 Fv (scFv)일 수 있다.

[59] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fab 단편"은, VL, VH, CL 및 CH 도메인을 갖는 1가 단편이고; "F(ab')2 단편"은 힌지 영역에서 디술피드 (disulfide) 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 갖는 2가 단편이고; "Fv 단편"은 항체의 단일 아암의 VH 및 VL 도메인을 갖고; "dAb 단편"은 VH 도메인, VL 도메인, 또는 VH 또는 VL 도메인의 항원-결합 단편을 갖는다.

[60] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단일-쇄 항체" 및 "단일 쇄 가변 단편 (scFv)"은, 상호교환가능하게 사용되고, 링커를 통해 VL 및 VH 영역이 연결되어 연속 단백

질 쇄를 형성한 항원 결합 분자를 의미하며, 여기서 링커는 단백질 쇄 그 자체가 폴딩되게 하고 1가 항원 결합 부위를 형성하게 하기에 충분히 길다. 보다 구체적으로, scFv는 단쇄 (보통 세린, 글리신) 링커와 함께 연결된, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 융합물을 의미한다. 단일 쇄 항체는 항원 결합능을 가지며, 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 상동성 또는 유사성인 아미노산 서열을 포함하는 단일 쇄 복합 폴리펩티드 (연결된 VH-VL 또는 단일 쇄 Fv (scFv))일 수 있다. VH 및 VL 둘 모두 단일클론 항체 서열을 카피할 수 있거나, 또는 상기 쇄 중 하나, 또는 그 둘 모두는 CDR-FR 구축물을 포함할 수 있다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 유사한 별개의 폴리펩티드는 폴리펩 티드 링커에 의해 결합된다

[61] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CDR "은 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역 안에 항체마다 다른 아미노산 서열을 가지는 부위인 초가변영역 (hypervariable region) 으로서, 항원과 결합하는 부위를 의미한다. 항체의 입체구조를 살펴보면, CDR 은 항체의 표면에서 고리(loop) 모양을 하고 있고 고리 아래에는 이를 구조적으로 지지해주는 프레임워크 영역 (framework region, FR) 이 존재한다. 중쇄와 경쇄에는 각각 세 개씩의 고리구조가 존재하며, 이들 여섯 개의 고리 지역 구조는 서로 합쳐져서 항원과 직접적으로 접촉한다. 보다 구체적으로, 프레임워크 영역은 항원 결합 분자와 항원 사이의 결합을 촉진하도록 CDR 의 적절한 입체형태를 유지하는 것을 도울 수 있다. 중쇄 및 경쇄의 각각의 가변 영역에 3개의 CDR 이 존재하며, 이는 각각의 가변 영역에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3 으로 지정된다. CDR 의 정확한 경계는 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되어 있다.

[62] 본 명세서에서 사용되는 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 상호교환가능하게 사용되고, 항체의 부분, 일반적으로 경쇄 또는 중쇄의 부분, 전형적으로 항체의 아미노-말단 단부를 의미하며, 항체 사이에서 서열상 광범위하게 상이하고, 특정한 항원에 대한 특정한 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 서열의 가변성은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는 영역에서 집중되고, 한편 가변 도메인에서 보다 고도로 보존된 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 경쇄 및 중쇄의 CDR는 주로 항체의 항원와의 상호작용 및 특이성을 담당한다.

[63] 본 명세서에서 사용되는 용어 "결합력"은, 분자 (예를 들어, 항원 결합 분자 예컨대 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비-공유 상호작용의 총 합계의 강도를 의미한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합력"은 결합 쌍의 구성원 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합력을 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 결합력은 일반적으로 해리 상수 (KD)로 나타내어질 수 있다. 결합력은 평형 해리 상수 (KD) 및 평형 회합 상수 (KA)를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 관련 기술분야에 공지된 수많은 방식으로 측정되고/거나 표현될 수 있다. KD는 방정식 koff/kon으로부터 계산되는 반면에, KA는 방정식 kon/koff로부터 계산된다. kon은 예를 들어 항원에 대한 항체의 회합률 상수를 지칭하고, koff는 예를 들어 항원에 대한

항체의 해리율 상수를 지칭한다. kon 및 koff는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있는 표준 기술, 예컨대 비아코어(BIAcore)®또는 키넥사(KinExA) 또는 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정될 수 있다.

[64] 본 명세서에서 사용되는 용어 "실질적으로 결합하지 않는다" 는, 본 발명의 결합 도메인인 세포 표면에 존재하는 CEACAM5 이외의 항원 또는 단백질, 및 표적 세포 표면 항원, 예를 들면 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 에 결합하지 않음을, 즉, 세포 표면에 존재하는 CEACAM5 및, 이외의 항원 또는 단백질, 및 표적 세포 표면 항원, 예를 들면 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 이 동시에 존재할 때, CEACAM5 항체들의 soluble CEACAM5로 인한 blocking 효과가 약 60% 미만, 약, 50% 이하, 약 20% 이하, 더 바람직하게는 약 15% 이하임을 의미할 수 있다.

[65] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 이중특이성 (bispesific) "은, 두 개의 서로 다른 항원 또는 에피토프를 인식하여 결합할 수 있는 것을 의미한다.

[66] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate) " 는, 치료제 또는 표지, 예를 들면, 세포독성제에 커플링된 항체 분자를 지칭한다. 항체 분자는 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들면, 링커를 통해 비-항체 모이어티에 커플링될 수 있다.본 명세서에서 본원의 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 CEACAM5 에 결합한다고 하는 것은 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 상의 에피토프에 결합하는 것을 의미할 수 있으며, 예를 들어 세포 표면으로부터 떨어져 나와 혈액안에 존재하는 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 의 에피토프에는 실질적으로 결합하지 않거나 또는 현저하게 더 낮은 수준으로 결합하며, 본 발명의 일 실시예에서 CEACAM5 가 절단되고 막단백질에 남은 부분으로 예상되는 A3 도메인 및 B3 도메인에는 높은 결합능으로 결합함으로서, soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 이 함께 존재하는 경우에도 본원의 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 종양 세포 표면에 위치하는 CEACAM 5 에 대한 결합력이 사실상 저해되지 않음을 의미할 수 있다. 또한 이에 제한되지 않고, 본 발명의 항체는 CEACAM5 의 A3 도메인 및 B3 도메인_외에 다른 에피토프에도 결합이 가능할 수 있다.

[67] 본 명세서에서 사용되는 용어 "보존적 아미노산 치환"은, 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 관련 기술분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항원 결합 분자 (또는 그의 단편)의 CDR(들) 내 또는 프 레임워크 영역(들) 내의 1개 이상의 아미노산 잔기는 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체될 수 있다

[68] 본 명세서에서 사용되는 용어 "불변 영역" 및 "불변 도메인"은, 상호교환가능하고, 관련 기술분야에서의 통상적인 의미를 갖는다. 불변 영역은 항체 부분, 예를 들어, 항체의 항원에 대한 결합에 직접 수반되지는 않지만 다양한 이펙터 기능, 예컨대 Fc 수용체와의 상호작용을 나타낼 수 있는 경쇄 및/또는 중쇄의 카르복실 말단 부분이다. 이뮤노글로불린 분자의 불변 영역은 일반적으로 이뮤노글로불린 가변 도메인에 비해 보다 보존된 아미노산 서열을 갖는다.

[69] 본 명세서에서 사용되는 용어 "에피토프"는, 특정 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 특정 항원 분자의 영역을 의미할 수 있다. 에피토프는 예를 들어 폴리펩티드의 인접 아미노산일 수 있거나 (선형 또는 인접 에피토프), 또는 에피토프는 예를 들어 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들의 2개 이상의 비-인접 영역으로부터 함께 모일 수 있다 (입체형태적, 비-선형, 불연속적, 또는 비-인접 에피토프). 특정 실시양태에서, 항체가 결합하는 에피토프는 예를 들어 NMR 분광분석법, X선 회절 결정학 연구, ELISA 검정, 질량 분광측정법과 커플링된 수소/중수소 교환 (예를 들어, 액체 크로마토그래피 전기분무 질량 분광측정법), 어레이-기반 올리고-펩티드 스캐닝 검정, 및/또는 돌연변이유발 맵핑 (예를 들어, 부위-지정 돌연변이유발 맵핑)에 의해 결정될 수 있다. X선 결정학의 경우에, 결정화는 관련 기술분야에 공지된 방법 중 임의의 것을 사용하여 달성될 수 있다. 나아가, 에피토프로부터 유도된 펩티드 서열은 동물을 면역화시키기 위해, 및 추가의 다중클론 또는 단일 클론 항체를 제조하기 위해 당업계에 공지된 방법을 적용시킴으로써 단독으로 또는 캐리어 모이어티와 함께 사용될 수 있다. 에피토프로부터 유도된 단리된 펩티드는 항체를 검출하는 진단학적 방법에서, 및 상기 항체의 억제가 필요한 경우, 치료제로서 사용될 수 있다.

[70] 본 발명의 일 실시예에서 본 발명의 항체는 서열번호 47 로 표시되는 CEACAM5 에 특이적으로 결합할 수 있으며, 더욱 구체적으로 본 발명의 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 특정 항원 분자의 영역은 서열번호 48 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[71] 서열번호 47 (CEACAM5)

[72] KLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVD
GNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQ
NDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNS
KPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLS
NGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVL
YGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVN
GTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVT
TITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTY
LWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLSVTRNDVGPYECG
IQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLS

LSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGL
YTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVE
DKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNR
TLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPD
TPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQ
QHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITV
SASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI

[73]

[74] 서열번호 48 (CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인)

[75] VSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWW
VNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQN
SVSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSC
HSASNPSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYAC
FVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS

[76] 또한 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 서열번호 48 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인에 특이적으로 결합하는 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (1) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 81E3A8 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있으며,

[77] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 서열번호 48 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인에 특이적으로 결합하는 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (2) 서열번호 13 으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 14 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 15 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상

동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 16 으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 17 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 18 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 을 포함하는 45A2E10 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있고,

[78] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 서열번호 48 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인에 특이적으로 결합하는 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (3) 서열번호 24 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 25 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 26 으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 27 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 28 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 29 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 을 포함하는 94E12E2 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있고,

[79] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 서열번호 48 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인에 특이적으로 결합하는 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (4) 서열번호 40 으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 41 또는 46으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 42 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 43 으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 44 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 45 로 표시되는 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95%

이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 36B5H8 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[80] 또한 본 발명의 또 다른 구체적인 일 실시예에서 상기 (1) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 중쇄영역에 서열번호 7 또는 11로 표시되는 프레임워크 서열 중 어느 하나를 포함하며, 경쇄영역에 서열번호 8, 9, 10 및 12로 표시되는 프레임워크 서열 중 어느 하나를 포함하는 것인 인간화된 항체일 수 있으며,

[81] 또 다른 일 실시예에서 상기 (2) 서열번호 13 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 14 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 15 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 16 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 17 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 18 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 을 포함하는 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 중쇄영역에 서열번호 19 또는 21로 표시되는 프레임워크 서열 중 어느 하나를 포함하며, 경쇄영역에 서열번호 20, 22 및 23 으로 표시되는 프레임워크 서열 중 어느 하나를 포함하는 인간화된 항체일 수 있으며,

[82] 또 다른 일 실시예에서 (3) 서열번호 24 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 25 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 26 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 27 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 28 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 29 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 을 포함하는 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 중쇄영역에 서열번호 30, 32, 34, 36 및 38 로 표시되는 프레임워크 서열 중 어느 하나를 포함하며, 경쇄영역에 서열번호 31, 33, 35, 37 및 39 로 표시되는 프레임워크 서열 중 어느 하나를 포함하는 인간화 된 항체일 수 있고,

[83] 또 다른 일 실시예에서 상기 (4) 서열번호 40 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 41 또는 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 42 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 43 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 44 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 45 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 을 포함하는 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서 중쇄 CDR2 이 서열번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 인 경우에는, 상기 서열번호 41 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2이 서열번호 46 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함

하는 중쇄 CDR2 로 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 에 해당하는 서열로 변형된 것인, 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[84] 본 명세서에서 사용되는 용어 "펩티드", "폴리펩티드", 및 "단백질"은, 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 펩티드 결합에 의해 공유 연결된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 의미한다. 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드는 적어도 2 개의 아미노산을 함유하여야 하지만, 단백질 또는 펩티드의 아미노산 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 수에 대해서는 어떠한 제한도 존재하지 않는다. 본원에 사용된 용어는, 통상적으로 또한 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 지칭되는 단쇄, 및 일반적으로 단백질로 지칭되는 보다 긴 쇄 둘다를 지칭한다. "폴리펩티드"는 특히, 예를 들어 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동인 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량 체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 용어 " 폴리펩티드"는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드, 또는 그의 조합을 포함한다.

[85] 본 명세서에서 사용되는 용어 "형질도입" 및 "형질도입된"은 외래 DNA를 바이러스 벡터를 통해 세포 내로 도입하는 방법을 지칭한다. 일부 실시예에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터, DNA 벡터, RNA 벡터, 아데노바이러스 벡터, 바큘로바이러스 벡터, 엡 스타인 바르 바이러스 벡터, 파포바바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터, 아데노 바이러스 연관 벡터, 렌티바이러스 벡터, 또는 그의 임의의 조합이다.

[86] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항암"은, '예방' 및 '치료'를 포함하며, 여기서 '예방'이란 상기 항암제 투여에 의해 암의 증식을 억제시키거나 암의 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, '치료'란 본 발명의 항체 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변하는 모든 행위를 의미한다.

[87] 본 명세서에서 사용되는 용어 "암"은 췌장암, 흑생종, 폐암 및 골수종 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, CEACAM5을 수용체로 갖고 면역체크포인트 경로가 비정상적으로 작동되는 암 또는 종양은 특별히 제한되지 않으며, 고형암 및 혈액암을 포함할 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 폐암일 수 있다.

[88] 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포치료제"는, 세포와 조직의 기능을 복원하기 위해 살아있는 자가 (autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식, 선별하여 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 일련의 행위를 통해 예방, 치료 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다. 보다 구체적으로, 세포 독성 T세포, 자연살해세포일 수 있다.

[89] 또한 본 발명의 일 실시예에서 본 발명의 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편이 유효성분으로서 포함되는 세포치료제로서 사용되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 구체적으로, 일

실시예에서 본 발명의 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편이 입양 세포 요법(adaptive cell therapy, ACT)에 사용될 수 있으며, 이때 입양 세포 요법(adaptive cell therapy, ACT) 은 체내의 면역세포를 채집하여 강화시키거나 유전공학적으로 변형시켜 다시 넣어주는 세포치료 방식으로, 대표적으로 암세포에 대한 세포성 면역을 강화시키는 방법으로 종양침윤림프구(tumor infiltrating lymphocytes, TIL), T 세포 수용체(T cell receptor, TCR), 키메릭항원수용체(chimeric antigen receptor, CAR) 를 이용하는 세포치료제 등이 있다.

[90] 본 명세서에서 사용되는 용어 "개체"는 인간 또는 인간을 제외한 포유동물일 수 있으며, 본 발명의 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 투여하여 질환이 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태이거나 질환을 앓고 있는 개체를 의미한다.

[91] 본 명세서에서 사용되는 용어 "투여"는, 적절한 방법으로 개체에 유효량의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 항-CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물의 투여 경로는 목표 조직에 도달할 수 있는 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 구체적으로, 사용목적에 따라 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소 등에 투여하는 방법)로 할 수 있으며, 바람직하게는 정맥 투여일 수 있다. 경우에 따라 고형암에 대한 투여에서는 항체의 접근을 빠르고 용이하게 하기 위하여 국부적인 투여가 바람직할수도 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 1회 투여량은 약 0.001 내지 10 ㎎/kg의 양으로 일 단위 또는 주 단위로 투여될 수 있다. 상기 유효량은 상기 환자를 치료하는 의사의 소견에 따라 조절될 수 있다.

[92] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역특이적으로 결합하다", "면역특이적으로 인식하다", "특이적으로 결합하다" 및 "특이적으로 인식하다"는 유사 용어이고, 항원 결합 분자와 관련하여 상호교환가능하게 사용되고, 주어진 분자가 항원 (예를 들어, 에피토프 또는 면역 복합물)에 비특이적 결합에 비해 우선적으로 결합하는 것을 의미하되, 주어진 항원 또는 에피토프 외의 항원 또는 에피토프에 전혀 결합하지 않는 것을 의미하는 것은 아니다. 예를 들어, 본 명세서에서 “A3 도메인 및 B3 도메인에 특이적으로 결합”한다는 것은 해당 결합 분자(예: 항체)가 CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인에만 결합해야 한다는 것은 아니다.

[93] **실시예 1 : CEACAM5 (full length) 에 결합하는 항체 선별**

[94] **1-1. CEACAM5 (full length) 항원 서열 분석 및 단백질 정제**

[95] 이하에서는, 도 1을 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 항 CEACAM5 항체 생산을 위한 CEACAM5 항원 서열 분석 및 단백질 정제에 대하여 자세히 설명하도록 한다.

[96]

[97] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 CHO-K1 세포에 형질전환 (transfection) 시킨 후, 세포에서 생산된 CEACAM5 재조합 단백질 (full length) 을 정제하여 취득한 결과를 나타낸 도이다.

[98] 구체적으로 인간 CEACAM5 단백질의 Extracellular protein domain (ECD)의 아미노산 서열 및 DNA 서열을 (서열번호 47, CEACAM5 full length amino acid sequence, Genebank NM_001291484.3)을 확인하였고 이에 해당하는 DNA 유전자를 합성하였다 (GenscriptProbio).

[99] 단백질 아미노산 서열의 카보닐 말단 (carbonic-terminal)에 아미노산 His tag이 포함된 합성된 해당 뉴클레오티드 서열을 인간 태아 신장 (human embryonic kidney) 유래의 세포주인 Expi293 세포주에 제조사의 지침에 따라 일시적 형질전환 (transient transfection) 을 진행하였다 (Expi293 Expression System, ThermoFisher Scientific).

[100] 이후 발현된 배양 상층액으로부터 Ni Sepharose affinity chromatography 방법을 이용하여 제조사의 지침에 따라 CEACAM5 full length 재조합 단백질을 정제하였다 (GE Healthcare).

[101]

[102] **1-2. In vivo CEACAM5 (full length) 항체 생산 여부 확인**

[103] 이하에서는, 도 2 및 3을 통해 마우스 모델에서의 In vivo CEACAM5 항체 생산 과정을 자세히 설명하도록 한다.

[104]

[105] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 재조합 단백질 (full length) 을 마우스에 immunization 하는 과정을 나타낸 도이다.

[106] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 재조합 단백질 (full length) 을 마우스에 immunization 한 결과를 나타낸 도이다.

[107] 먼저 도 2를 참조하면, 상기와 같이 생산한 High binding 96-well 마이크로플레이트에 CEACAM5 full length 재조합 단백질을 0.5ul/ml의 농도로 100ul/well 코팅 후 4도에서 16시간동안 인큐베이션 하였다. 이후 코팅된 마이크로플레이트를 PBS-T (1x PBS, 0.5% Tween-20)로 네차례 세척한 후 3% BSA가 포함된 PBS-T를 넣고 상온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. PBS-T를 이용하여 네차례 세척한 후 마우스에서 채취한 혈청을 각 희석배수 (dilution factor) 로 희석하여 100ul/well로 마이크로플레이트에 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS-T를 이용하여 네차례 세척한 후 마우스 항체에 결합하는 HRP-anti-mouse IgG, FcR (Jackson Immuno Research)를 100ul/well로 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBS-T를 이용하여 네차례 세척하고 TMB substrate 용액을 100ul/ml 넣고 상온에서 10분간 반응시켰다. 마지막으로 스탑 솔루션 용액을 100ul/ml로 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[108] 그 결과, 도 3을 참조하면, 5마리 마우스에서 모두 CEACAM5 항체가 잘 생성된 것을 확인하였다.

[109]

[110] **1-3. CEACAM5 full length 단백질에 결합하는 모클론 선별**

[111] 이하에서는, 도 4a를 참조하여 CEACAM5 에 특이적으로 결합하는 항체 선별을 위한 모클론 선별에 대하여 자세히 설명한다.

[112]

[113] 도 4a는 CEACAM5 full length 단백질에 결합하는 모클론 선별 결과를 나타낸 도이다.

[114] 마우스 골수종 (myeloma) 세포인 SP2/0 세포와 마우스에서 얻은 B 세포를 융합시켜 하이브리도마 (hybridoma) 세포를 제작하고 96well plate (10 plates)에 나누어 배양하였다. 나누어 배양한 parental clone (모클론들) (1모클론/well) 에서 얻어진 배양액을 이용하여 CEACAM5 full length에 결합하는 클론들을 ELISA로 확인하고, 또한 상동성이 유사한 CEACAM1, CEACAM6에 비특이적으로 결합하는지 여부를 확인하였다. 다른 CEACAM 단백질에는 결합하지 않고 CEACAM5 full length 단백질에 결합하는 모클론들을 선별한 후, 서브클론들을 선별하였다.

[115] 구체적으로, High binding 96-well 마이크로플레이트에 CEACAM5, CEACAM1, CEACAM6 full length 재조합 단백질을 0.5ul/ml의 농도로 100ul/well 코팅 후 4도에서 16시간동안 인큐베이션 하였다. 이후 코팅된 마이크로플레이트를 PBS-T (1x PBS, 0.5% Tween-20)로 네차례 세척한 후 3% BSA가 포함된 PBS-T를 넣고 상온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다 (blocking). PBS-T를 이용하여 네차례 세척한 후 마우스에서 채취한 혈청을 각 희석배수 (dilution factor) 로 희석하여 100ul/well로 마이크로플레이트에 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS-T를 이용하여 네차례 세척한 후 마우스 항체에 결합하는 HRP-anti-mouse IgG, FcR (Jackson Immuno Research)를 100ul/well로 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS-T를 이용하여 네차례 세척하고 TMB substrate 용액을 100ul/ml로 넣고 상온에서 10분간 반응시켰다. 마지막으로 스탑 솔루션 용액을 100ul/ml로 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[116] 그 결과, 도 4a를 참조하면, 위와 같이 모클론들 중에서 CEACAM5 (full-length)에 높은 결합력을 보이며 CEACAM 1 및 CEACAM 6에는 낮은 결합력을 보이는 클론들을 선별한 결과, 36-B5, 81-E3 및 94-E12를 포함한 모클론들이 CEACAM5 (full-length) 특이적으로 높은 결합력을 보임을 확인하였다.

[117]

[118] **1-4. CEACAM5 full length 단백질에 결합하는 서브클론 선별**

[119] 이하에서는, 도 4b를 참조하여 CEACAM5 에 특이적으로 결합하는 항체 선별을 위한 서브클론 선별에 대하여 자세히 설명한다.

[120]

[121] 도 4b는 CEACAM5 full length 단백질에 결합하는 서브클론 선별 결과를 나타낸 도이다.

[122] 상기 실시예 1-3 에서와 같이 선별한 모클론들 (parental clone) 중 일부를 선별하여 단일클론들로 분리하여 96well plate에 배양하였다. 단일 클론들에서 얻어진 배양액을 이용하여 CEACAM5 full length에 결합하는 클론들을 ELISA로 확인하고, 또한 상동성이 유사한 CEACAM1, CEACAM6에 비특이적으로 결합하는지 여부를 확인하였다.

[123] CEACAM1 및 CEACAM6 단백질에는 결합하지 않고 CEACAM5 full length 단백질에 결합하는 클론들을 상기 실시예 1-3과 같은 방법으로 실험을 진행하여 선별하였다.

[124] 그 결과, 도 4b를 참조하면, 선별된 모클론으로부터 유래된 36B5H8, 81E3A8 및 94E12E2 를 포함한 서브클론들은 모두 CEACAM 1 및 CEACAM 6 단백질에는 결합하지 않고 CEACAM5 full length 단백질에 결합하는 것을 확인하였다.

[125]

[126] **1-5. CHO-K1, CHO-K1-CEACAM5 (full) 및 CHO-K1-CEACAM5 (A3-B3) 세포와 항체의 결합능 확인**

[127] 이하에서는 도 5를 참조하여 CHO-K1, CHO-K1-CEACAM5 (full) 및 CHO-K1-CEACAM5 (A3-B3) 세포와 6가지 단일항체 클론 (hybridoma 세포) 에서 정제된 항체의 결합능을 확인한 결과를 설명한다.

[128]

[129] 도 5는 CHO-K1, CHO-K1-CEACAM5 (full) 및 CHO-K1-CEACAM5 (A3-B3) 세포와 6가지 단일항체 클론 (hybridoma 세포) 에서 정제된 항체의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[130] CEACAM5 가 절단되고 막단백질에 남을 것으로 예상되는 도메인인, CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인 (도 19b) 에 결합하는 서브클론 선별을 위해, CHO-K1, CHO-K1-CEACAM5 (full), CHO-K1-CEACAM5 (A3-B3) 세포에 6가지 단일항체 클론 (hybridoma 세포)에서 정제된 항체들을 1μg/100μl씩 넣고 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이때, negative control 로 마우스 IgG, positive control로 R&D 제품[FAB41281P]을 사용하였다. 1X PBS, 2ml로 세척한 후, PE-anti-mouse IgG를 각 샘플당 1μl/100μl씩 넣고 빛이 차단된 상태에서 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 1X PBS, 2ml로 세척한 후, 샘플당 PBS 300μl씩 넣고 유세포 분석기로 항체들의 결합 여부를 확인하였다.

[131] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 서브클론 98F8G11, 94E12E2, 83G8D11, 82H3A8, 81E3A8 및 36B5H8 중 94E12E2, 83G8D11, 82H3A8, 81E3A8 및 36B5H8 는 CEACAM5 full length 단백질과의 결합력이 높은 것으로 확인되었으며, 이중에서도 82H3A8, 81E3A8 및 36B5H8 는 CEACAM5 의 A3 도메인 및 B3 도메인에도 높은 결합력을 가짐을 확인하였다.

[132]

[133] **실시예 2 : CEACAM5 (A3 도메인 및 B3 도메인) 에 결합하는 항체 선별**

[134] **2-1. In vivo CEACAM5 (A3 도메인 및 B3 도메인) 항원 서열 분석 및 단백질 정제**

[135] 이하에서는, 도 6 을 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 항 CEACAM5 항체 생산을 위한 CEACAM5 항원 서열 분석 및 단백질 정제에 대하여 자세히 설명하도록 한다.

[136]

[137] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 CHO-K1 세포에 형질전환 (transfection) 시킨 후, 세포에서 생산된 CEACAM5 재조합 단백질 (A3 도메인 및 B3 도메인) 을 정제하여 취득한 결과를 나타낸 도이다.

[138] CEACAM5 재조합 단백질 (A3 도메인 및 B3 도메인) 을 취득하기 위하여 CEACAM5의 절단되어 세포막 표면에 남아있는 막단백질을 인지하는 항체를 개발하기 위해 인간 CEACAM5 단백질의 Extracellular protein domain (ECD)의 아미노산 서열 및 DNA 서열 중 A3 도메인 및 B3 도메인만을 포함하는 (서열번호 48, CEACAM5 A3-B3 amino acid sequence) 유전자를 합성하였다 (GenscriptProbio).

[139] 단백질 아미노산 서열의 카보닐 말단 (carbonic-terminal)에 아미노산 His tag 이 포함된 합성된 해당 뉴클레오티드 서열을 인간 태아 신장 (human embryonic kidney) 유래의 세포주인 Expi293 세포주에 제조사의 지침에 따라 일시적 형질전환 (transient transfection) 을 진행하였다 (Expi293 Expression System, ThermoFisher Scientific).

[140] 발현된 배양 상층액으로부터 Ni Sepharose affinity chromatography 방법을 이용하여 제조사의 지침에 따라 CEACAM5 (A3-B3) 단백질을 정제하였다 (GE Healthcare).

[141]

[142] **2-2. In vivo CEACAM5 (A3 도메인 및 B3 도메인) 항체 생산 여부 확인**

[143] 이하에서는, 도 2 및 7을 참조하여 마우스 모델에서의 In vivo CEACAM5 (A3 도메인 및 B3 도메인) 항체 생산 과정을 자세히 설명하도록 한다.

[144]

[145] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 재조합 단백질 (full length) 을 마우스에 immunization 하는 과정을 나타낸 도이다.

[146] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 재조합 단백질 (A3 도메인 및 B3 도메인) 을 마우스에 immunization 한 결과를 나타낸 도이다.

[147]

[148] 도 2를 다시 참조하면, 도 2에 나타낸 CEACAM5 재조합 단백질 (full length) 을 마우스에 immunization 하는 과정과 동일하게 CEACAM5 재조합 단백질 (A3 도메인 및 B3 도메인) 을 마우스에 immunization 을 진행하였다.

[149] 구체적으로는 상기와 같이 생산한 CEACAM5 (A3-B3) 단백질을 마우스에 14일 간격으로 3회 immunization을 진행하였으며 마지막 immunization 진행 후 일주일 후 마우스 생체 내 CEACAM5 (A3-B3)에 대한 항체 생성 여부를 확인하기 위해

혈청 (serum) 을 채취하였다. 채취한 마우스 혈청 (serum) 을 PBS로 1,000~512,000 배 희석을 통하여 CEACAM5 항체 생성 정도를 ELISA를 통해서 확인하였다 (ELISA antigen : CEACAM5 (496-685aa)/ Coating Concentration : 0.5ug/ml, 100ul/ well/ Coating buffer : Phosphate buffered saline).

[150] 도 7을 참조하면, immunization 를 진행한 5마리 마우스에서 모두 CEACAM5 항체가 잘 생성된 것을 확인하였다.

[151]

[152] **2-3. CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 모클론 선별**

[153] 이하에서는, 도 8a를 참조하여 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 모클론 선별에 대하여 자세히 설명한다.

[154]

[155] 도 8a는 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 모클론 선별 결과를 나타낸 도이다.

[156] CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 모클론 선별을 위해 먼저, 마우스 골수종 (myeloma) 세포인 SP2/0 세포와 마우스에서 얻은 B 세포를 융합시켜 하이브리도마 세포를 제작하고 96well plate (10 plates)에 나누어 배양하였다. 나누어 배양한 parental clone (모클론들) (1모클론/well)에서 얻어진 배양액을 이용하여 CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인에 결합하는 클론들을 ELISA로 확인하고, 또한 상동성이 유사한 CEACAM1, CEACAM6에 비특이적으로 결합하는지 여부를 확인하여 CEACAM 1 및 CEACAM 6 단백질에는 결합하지 않고 CEACAM5 A3-B3 단백질에 결합하는 모클론들을 선별하였다.

[157] 구체적으로는, High binding 96-well 마이크로플레이트에 CEACAM5, CEACAM1, CEACAM6 full length 재조합 단백질을 0.5ul/ml의 농도로 100ul/well 코팅 후 4도에서 16시간동안 인큐베이션 하였다. 이후 코팅된 마이크로플레이트를 PBS-T (1x PBS, 0.5% Tween-20)로 네차례 세척한 후 3% BSA가 포함된 PBS-T를 넣고 상온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다 (blocking). PBS-T를 이용하여 네차례 세척한 후 마우스에서 채취한 혈청을 각 희석배수 (dilution factor) 로 희석하여 100ul/well로 마이크로플레이트에 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS-T를 이용하여 네차례 세척한 후 마우스 항체에 결합하는 HRP-anti-mouse IgG, FcR (Jackson Immuno Research)를 100ul/well로 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS-T를 이용하여 네차례 세척하고 TMB substrate 용액을 100ul/ml로 넣고 상온에서 10분간 반응시킨 후, 스탑 솔루션 용액을 100ul/ml로 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[158] 그 결과, 도 8a를 참조하면, 45-A2 를 포함한 모클론들은 CEACAM5 A3-B3 단백질에 특이적으로 높은 결합력이 보이며, CEACAM 1 및 CEACAM 6 단백질에는 낮은 결합력을 보임을 확인하였다.

[159]

[160] **2-4. CEACAM5 단백질에 결합하는 서브클론 선별**

[161] 이하에서는, 도 8b를 참조하여 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 서브클론 선별에 대하여 자세히 설명한다.

[162]

[163] 도 8b는 CEACAM 5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 서브클론 선별 결과를 나타낸 도이다.

[164] 상기 실시예 2-3 에서와 같이 선별한 모클론들 (parental clone) 중 일부를 선별하여 단일클론들로 분리하여 96well plate에 배양하였다. 단일 클론들에서 얻어진 배양액을 이용하여 CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 클론들을 ELISA로 확인하고, 또한 상동성이 유사한 CEACAM1, CEACAM6에 비특이적으로 결합하는지 여부를 확인하였다.

[165] CEACAM1 및 CEACAM6 단백질에는 결합하지 않고 CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 결합하는 클론들을 상기 실시예 2-3과 같은 방법으로 실험을 진행하여 선별하였다.

[166] 그 결과, 도 8b를 참조하면, 선별된 모클론으로부터 유래된 45A2E10 을 포함한 서브클론들은 모두 CEACAM 1 및 CEACAM 6 단백질에는 결합하지 않고 CEACAM5 A3 도메인 및 B3 도메인 단백질에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[167]

[168] **2-5. 단일 클론으로 정제한 CEACAM5 항체의 CEACAM5 full length 단백질에의 결합능 확인**

[169] 이하에서는, 도 9a 및 9b를 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 클론으로 정제한 CEACAM5 항체의 CEACAM5 full length 단백질에의 결합능을 자세히 설명한다.

[170]

[171] 도 9a 및 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 클론으로 정제한 CEACAM5 항체의 CEACAM5 full length 단백질에의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[172]

[173] 단일 클론으로 정제한 CEACAM5 항체의 CEACAM5 full length 단백질에의 결합능을 확인하기 위하여, 먼저 CEACAM5 protein (Acrobiosystems) 을 0.5ug/ml의 농도로 384-well 마이크로플레이트 (Corning) 의 각 웰 당 30ul 씩 분주한 후 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션 한 후 PBST(DPBS + 0.05% Tween 20, Teknova) 100 μL/well로 4회 세척하였다. 이후 3% FBS가 포함된 1X PBS 버퍼를 80 μL/well 첨가하고 상온에서 2.5시간 동안 인큐베이션한 후 위와 동일하게 PBST 100 μL/well로 4회 세척하였다. 이때 항체는 0.5% Fetal Bovin Serum (FBS, Cytiva)를 함유한 DPBS(Bining buffer)로 200 nM 내지 0.0004 nM 범위의 농도로 3배수 희석하여 준비하였다. 이와 같이 준비된 항체들을 CEACAM5 coated plate에 30 μL/well씩 첨가한 후 상온에서 1시간 인큐베이션 하였다. 이후 플레이트를 셀척한 뒤 HRP (horseradish peroxidase) anti-

mouse IgG Fcγantibody, Jackson ImmunoResearch)를 바인딩 버퍼에 0.16 μg/mL (1:5000)의 농도로 희석하여 플레이트에 30 μL/well씩 첨가한 후 상온에서 1시간 인큐베이션하였다. 이후 동일하게 플레이트 세척 후 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Invitrogen) substrate를 플레이트에 30 μL/well씩 첨가한 후 상온에서 10분간 암실에서 인큐베이션 하였다. 마지막으로 0.16 M sulfuric acid (stop solution, Invitrogen) 용액 30 μL/well를 첨가 후 10분간 암실에서 인큐베이션하여 반응을 중지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Synergyhtx multimode reader, Biotek).

[174] 그 결과, 도 9a 및 9b에 나타낸 바와 같이 본 발명의 단일 클론으로 정제한 CEACAM5 항체들 중 특히 36B5H8, 45A2E10 및 81E3A8 항체의 결합능이 높은 것을 확인하였다.

[175]

[176] **2-6. 선별된 CEACAM5항체의 CEACAM5를 발현하는 A549 세포주와의 결합능 확인**

[177] 이하에서는, 도 10a 및 10b를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 클론으로 정제한 CEACAM5 항체의 CEACAM5를 발현하는 A549 세포주와의 결합능에 대해 자세히 설명한다.

[178]

[179] 도 10a 및 10b는 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 클론으로 정제한 CEACAM5 항체의 CEACAM5를 발현하는 A549 세포주와의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[180] 먼저 CEACAM5를 발현하는 A549 세포주 (A549-CEACAM5)를 다양한 농도 (0.008nM - 100nM)의 마우스 항체들과 3% FBS가 포함되어 있는 1X PBS와 혼합한 후 4℃에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 이후 1X PBS에서 두차례 세척한 후 Alexa Flour 488이 접합된 goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch)의 2차 항체를 5ug/ml의 농도로 3% FBS 가 포함되어 있는 1X PBS에서 혼합한 후 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. Cold PBS를 이용하여 두차례 세척한 후 유세포분석기 (BD FACS Verse II)에서 형광을 측정하고 Flowjo 소프트웨어를 이용하여 MFI를 분석하였다.

[181] 그 결과, 도 10a 및 10b 를 참조하면, 81E3A8 및 45A2E10 항체의 A549 세포주와의 결합능이 특히 우수함을 확인하였다.

[182]

[183] **2-7. 선별된 CEACAM5항체의 soluble CEACAM5로 인한 blocking 효과 확인**

[184] 이하에서는, 도 11a 및 11b를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 항체의 soluble CEACAM5로 인한 blocking 효과에 대해 자세히 설명한다.

[185]

[186] 도 11a 및 11b는 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 항체의 soluble CEACAM5로 인한 blocking 효과를 확인하여 나타낸 도이다.

[187] CEACAM5 항체의 soluble CEACAM5로 인한 blocking 효과를 확인하기 위하여 먼저, CEACAM5를 발현하는 A549 세포주 (A549-CEACAM5)를 다양한 농도 (0.008nM - 100nM)의 마우스 항체들과 3% FBS가 포함되어 있는 1X PBS에서 혼합한 후, 100ng/ml 농도로 soluble CEACAM5가 포함된 암환자 혈청을 첨가하고 4℃에서 2시간 동안 인큐베이션 하고 1X PBS에서 두차례 세척하였다. 이후 Alexa Flour 488이 접합된 goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch)의 2차 항체를 5ug/ml의 농도로 3% FBS 가 포함되어 있는 1X PBS에서 혼합한 후 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션 한 뒤 Cold PBS를 이용하여 두차례 세척한 후 유세포분석기 (BD FACS Verse II)에서 형광을 측정하고 Flowjo 소프트웨어를 이용하여 MFI를 분석하였다. 이 값은 세포 표면 상에 CEACAM5가 발현된 A549 세포주의 표면에 실험한 항체가 얼마나 결합하는지를 보여준다. Soluble CEACAM5가 포함된 암환자 혈청이 포함된 샘플 (Sceacam5+) 과 포함되지 않은 샘플 (None) 의 MFI 값을 비교하여 soluble CEACAM5로 인한 blocking 효과를 % 비율로 표시하여 나타내었다.

[188] 도 11a 및 11b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 항체들은 soluble CEACAM5가 포함된 샘플에서 soluble CEACAM5로 인한 blocking 효과가 50% 미만인 것으로 나타났으며, 특히 81E3A8 항체의 경우 soluble CEACAM5로 인한 blocking 효과에 대한 % 비율이 11.88 로 나타나 soluble CEACAM5 가 포함된 샘플에서도 CEACAM5를 발현하는 A549 세포주에 높은 결합능을 보임을 확인하였다.

[189] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 CEACAM5 항체들은 soluble CEACAM5가 포함된 샘플에서도 상기 항체가 종양세포 상에 위치하는 CEACAM5 에 대한 결합력이 사실상 저해되지 않음을 확인한 바, soluble CEACAM5 에 실질적으로 결합하지 않고 종양 세포 표면에 존재하는 CEACAM5 에 특이적으로 결합함을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 CEACAM5 항체들이 종양 치료에 보다 효과적이고 효율적인 방식으로 사용될 수 있음을 보여주는 것으로서, 이는 CEACAM5 항체를 이용한 암 치료 방법에 있어 중요한 이점을 제공한다.

[190]

[191] **3-1. 항체 (81E3A8) 의 인간화 작업**

[192] 이하에서는, 도 12a 를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 에 대해 자세히 설명한다.

[193]

[194] 도 12a는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 결합력을 분석하여 나타낸 도이다.

[195] 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 결합력을 분석을 위하여, 81E3A8 클론의 인간화 작업을 진행하여 인간화 항체를 생산 하였고, 그 중 결합력이 우수한 5종의 항체 (81E3A8-02, 81E3A8-06, 81E3A8-10, 81E3A8-12 및 81E3A8-14) 를 도 12a 에 나타낸 바와 같이 선별하였다. 이때 81E3A8-01은 대조

군으로 마우스 서열로 제작된 항체에 해당하며, 클론 항체들의 인간화 항체는 하기 표 1 내지 6 에 나타낸 바와 같이 클론 항체들의 CDR 1 내지 3 서열은 동일하며, Frame work 서열을 달리 조합하여 생산하였다.

[196] [표1]

인간화된 81E3A8 항체의 CDR 서열

Antibody	Chain type		sequence	Seq no.
humanized 81E3A8 antibody	VH	CDR 1	NFGMN	1
		CDR 2	WINTYTGKPTYDDDFKG	2
		CDR 3	EAGKDYAMDY	3
	VL	CDR 1	SASSSVTFMH	4
		CDR 2	DTSKLAS	5
		CDR 3	QQWNNYPWT	6

[197] [표2]

인간화된 81E3A8-02 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 81E3A8-02 antibody	VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGY TFTNFGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN TYTGKPTYDDDFKGRFVFSLDTSVSTA YLQISSLKAEDTAVYYCAREAGKDYA MDYWGQGTLVTVSS	7
	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSV TFMHWYQQKPGQAPRRLIYDTSKLASG IPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVY YCQQWNNYPWTFGGGTKVEIK	8

[198] [표3]

인간화된 81E3A8-06 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 81E3A8-06 antibody	VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGY TFTNFGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN TYTGKPTYDDDFKGRFVFSLDTSVSTA YLQISSLKAEDTAVYYCAREAGKDYA MDYWGQGTLVTVSS	7
	VL	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSSV TFMHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDAATY YCQQWNNYPWTFGGGTKVEIK	9

[199] [표4]

인간화된 81E3A8-10 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 81E3A8-10 antibody	VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGY TFTNFGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN TYTGKPTYDDDFKGRFVFSLDTSVSTA YLQISSLKAEDTAVYYCAREAGKDYA MDYWGQGTLVTVSS	7
	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCSASSSV TFMHWYQQKPGQAPRRLIYDTSKLASG IPARFSGSGSGTEYTLTISSMQSEDAAV YYCQQWNNYPWTFGGGTKVEIK	10

[200] [표5]

인간화된 81E3A8-12 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 81E3A8-12 antibody	VH	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTNFGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN TYTGKPTYDDDFKGRVTMTLDTSTSTA YMELRSLRSDDMAVYYCAREAGKDYA MDYWGQGTLVTVSS	11
	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCSASSSV TFMHWYQQKPGQAPRRLIYDTSKLASG	10

		IPARFSGSGSGTEYTLTISSMQSEDAAV YYCQQWNNYPWTFGGGTKVEIK	

[201] [표6]

인간화된 81E3A8-14 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 81E3A8-14 antibody	VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGY TFTNFGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN TYTGKPTYDDDFKGRFVFSLDTSVSTA YLQISSLKAEDTAVYYCAREAGKDYA MDYWGQGTLVTVSS	7
	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSV TFMHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATY YCQQWNNYPWTFGGGTKVEIK	12

[202] 인간화 항체의 결합력 분석은 Biacore 8K 장비를 이용하여 진행하였다. 우선 protein A chip에 항체를 0.5μg/ml 농도로 결합을 시킨 후, CEACAM5 재조합 단백질을 1.5625~200nM의 다양한 농도로 반응을 시켜 위의 항체들의 결합력을 분석하여 도 12a 와 같이 나타내었다.

[203]

[204] **3-1. 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 결합능 확인**

[205] 이하에서는, 도 12b 및 12c를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주와 CEACAM8을 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM8) 세포주에 대한 결합능에 대해 자세히 설명한다.

[206]

[207] 도 12b은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주와 CEACAM8을 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM8) 세포주에 대한 결합능을 비교하여 나타낸 도이다.

[208] 도 12c 는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 CEACAM5를 발현하는 H3122, KATO III, MKN45 세포주와의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[209]

[210] 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8) 의 CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주와 CEACAM8을 발

현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM8) 세포주에 대한 결합능 확인을 위하여 먼저, CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주와 CEACAM8을 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM8) 세포주를 96-well plate에 3x10^6 cells/well으로 분주한다. 이후 다양한 농도(0.025nM - 500nM)의 humanized mAb들을 DPBS 용액으로 희석하여 CHO-CEACAM5 cell plate에 50 μL/well 씩 분주한 후 4℃에서 20분 동안 인큐베이션 하였다. Cold DPBS 250 μL/well으로 2회 세척하였다. (1500RPM, 4℃, 3분간 원심분리) 그 다음, Alexa Flour 647이 접합된 goat anti-human IgG Fcγ 2차 항체(Jackson ImmunoResearch)를 15 μg/ml의 농도로 DPBS 희석한 용액을 세포에 50 μL/well씩 분주한 후 플레이트를 호일로 감싸 차광하여 4℃에서 20분동안 인큐베이션 하고, Cold DPBS를 250 μL/well으로 2회 세척하였다. (1500RPM, 4℃, 3분간 원심분리) 마지막으로 250 μL/well씩 Cold DPBS 분주하여 유세포분석기 (MACSQuant®Analyzer 10, Miltenyi Biotec) 로 형광을 측정하고 BD Flowjo를 이용하여 MFI(geometric mean)를 분석하였다.

[211]

[212] 그 결과, 도 12b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 5종의 항체 (81E3A8-02, 81E3A8-06, 81E3A8-10, 81E3A8-12 및 81E3A8-14) 모두 CEACAM8 을 발현하는 세포주에는 결합능이 낮으며, CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주에는 높은 결합능을 보임을 확인하였다.

[213]

[214] 또한 위와 같은 방법으로 CEACAM5를 발현하는 H3122, KATO III, MKN45 세포주에 대한 결합능을 확인한 결과, 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (81E3A8-02, 81E3A8-06, 81E3A8-12 및 81E3A8-14) 모두 높은 결합능을 보임을 확인하였다

[215]

[216] **3-2. 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (45A2E10) 의 결합능 확인**

[217] 이하에서는, 도 13a 및 13b를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (45A2E10) 의 결합능에 대해 자세히 설명한다.

[218]

[219] 도 13a 및 13b는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (45A2E10) 의 결합력을 분석하여 나타낸 도이다.

[220]

[221] 인간화 작업을 진행하여 생산한 다양한 45A2E10 클론 항체의 결합력 분석을 위해 먼저, 45A2E10 클론의 인간화 작업을 진행하여 생산하였고, 그 중 결합력을 보이는 7종의 항체 (45A2E10-02, 45A2E10-03, 45A2E10-05, 45A2E10-06, 45A2E10-08, 45A2E10-09) 를 선별하였다. 이때 45A2E10-01은 대조군으로 마우스 서열로 제작한 항체에 해당하며, 클론 항체들의 인간화 항체는 하기 표 7 내

지 13 에 나타낸 바와 같이 클론 항체들의 CDR 1 내지 3 서열은 동일하며, Frame work 서열을 달리 조합하여 생산하였다.

[222]

[223] [표7]

인간화된 45A2E10 항체의 CDR 서열

Antibody	Chain type		sequence	Seq no.
humanized 45A2E10 antibody	VH	CDR 1	NYGVH	13
		CDR 2	LIWAGGHTNYNSALMS	14
		CDR 3	EVRRDWYFDV	15
	VL	CDR 1	RASENIYSYLT	16
		CDR 2	NAKILAE	17
		CDR 3	QHHFGTPFT	18

[224] [표8]

인간화된 45A2E10-02 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 45A2E10-02 antibody	VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNYGVHWIRQPPGKGLEWIGLIWAGGHTNYNSALMSRVTISKDNSKSQISLKLSSVTAADTAVYYCAREVRRDWYFDVWGQGTMVTVSS	19
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLTWYQQKPGKAPKLLIYNAKILAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIK	20

[225] [표9]

인간화된 45A2E10-03 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 45A2E10-03 antibody	VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSNYGVHWIRQPPGKGLEWIGLIWAGGHTNYNSALMSRVTISKDNSKSQISLKLSSVTAADTAVYYCAREVRRDWYFDVWGQGTMVTVSS	21

	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENI YSYLTWYQQKPGKAPKLLIYNAKILAE GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIK	20

[226] [표10]

인간화된 45A2E10-05 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 45A2E10-05 antibody	VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGS ISNYGVHWIRQPPGKGLEWIGLIWAGG HTNYNSALMSRVTISKDNSKSQISLKLS SVTAADTAVYYCAREVRRDWYFDVW GQGTMVTVSS	19
	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASENI YSYLTWYQQKPGKAPKLLIYNAKILAE GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFAT YYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIK	22

[227] [표11]

인간화된 45A2E10-06 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 45A2E10-06 antibody	VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGG SFSNYGVHWIRQPPGKGLEWIGLIWAG GHTNYNSALMSRVTISKDNSKSQISLKL SSVTAADTAVYYCAREVRRDWYFDVW GQGTMVTVSS	21
	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASENI YSYLTWYQQKPGKAPKLLIYNAKILAE GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFAT YYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIK	22

[228] [표12]

인간화된 45A2E10-08 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.

humanized 4 5A2E10-08 antibody	VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGS ISNYGVHWIRQPPGKGLEWIGLIWAGG HTNYNSALMSRVTISKDNSKSQISLKLS SVTAADTAVYYCAREVRRDWYFDVW GQGTMVTVSS	19
	VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASENI YSYLTWYQQKPGQAPRLLIYNAKILAE GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIK	23

[229] [표13]

인간화된 45A2E10-09 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 4 5A2E10-09 antibody	VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGG SFSNYGVHWIRQPPGKGLEWIGLIWAG GHTNYNSALMSRVTISKDNSKSQISLKL SSVTAADTAVYYCAREVRRDWYFDVW GQGTMVTVSS	21
	VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASENI YSYLTWYQQKPGQAPRLLIYNAKILAE GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIK	23

[230] 인간화 항체의 결합력 분석은 Biacore 8K 장비를 이용하여 진행하였다. 먼저 protein A chip에 항체를 1μg/ml 농도로 결합을 시킨 후, CEACAM5 재조합 단백질을 200nM 농도로 반응을 시켜 이 항체들의 결합력을 분석하여 도 13a 및 13b 와 같이 나타내었다.

[231]

[232] **3-3. 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (45A2E10) 의 결합능 확인**

[233] 이하에서는, 도 14를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (45A2E10) 의 CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주와의 결합능에 대해 자세히 설명한다.

[234]

[235] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (45A2E10) 의 CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주와의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[236] 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (45A2E10)의 CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주에 대한 결합능 확인을 위하여 먼저, CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주를 96-well plate에 3x10^6 cells/well으로 분주한다. 이후 다양한 농도(0.025nM - 500nM)의 humanized mAb들을 DPBS 용액으로 희석하여 CHO-CEACAM5 cell plate에 50 μL/well 씩 분주한 후 4℃에서 20분 동안 인큐베이션 하였다. Cold DPBS 250 μL/well으로 2회 세척하였다. (1500RPM, 4℃, 3분간 원심분리) 그 다음, Alexa Flour 647이 접합된 goat anti-human IgG Fcγ 2차 항체(Jackson ImmunoResearch)를 15 μg/ml의 농도로 DPBS 희석한 용액을 세포에 50 μL/well씩 분주한 후 플레이트를 호일로 감싸 차광하여 4℃에서 20분동안 인큐베이션 하고, Cold DPBS를 250 μL/well으로 2회 세척하였다. (1500RPM, 4℃, 3분간 원심분리) 마지막으로 250 μL/well씩 Cold DPBS 분주하여 유세포분석기 (MACSQuant®Analyzer 10, Miltenyi Biotec) 로 형광을 측정하고 BD Flowjo를 이용하여 MFI(geometric mean)를 분석하였다.

[237]

[238] 그 결과, 도 14를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 6종의 항체 중, 45A2E10-08 항체가 특히 높은 결합능을 보임을 확인할 수 있었다.

[239]

[240] **3-4. 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (94E12E2) 의 결합능 확인**

[241] 이하에서는, 도 15를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 다양한 클론 항체 (94E12E2) 의 결합능에 대해 자세히 설명한다.

[242]

[243] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 다양한 클론 항체 (94E12E2) 의 결합력을 ELISA 분석법으로 확인하여 나타낸 도이다.

[244] 먼저, 94E12E2 클론의 인간화 작업을 진행하여 5종의 인간화 항체 (94E12E2-02, 94E12E2-03, 94E12E2-04, 94E12E2-05, 94E12E2-06) 를 생산 하였고, CEACAM5 재조합 단백질에 대한 결합력을 확인하였다. 이때 94E12E2-01은 대조군으로 마우스 서열로 제작한 항체에 해당한다.

[245]

[246] [표14]

인간화된 94E12E2 항체의 CDR 서열

Antibody	Chain type		sequence	Seq no.
humanized 94E12E2 antibody	VH	CDR 1	DNYMH	24
		CDR 2	WIDPENGDTEYDPKFQG	25
		CDR 3	ITMATPYPMDY	26

	VL	CDR 1	SASTSVIYMH	27
		CDR 2	STSNLAS	28
		CDR 3	QQRSSYPLT	29

[247] [표15]

인간화된 94E12E2-02 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 94E12E2-02 antibody	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDNYMHWVRQAPGKGLEWVAWIDPENGDTEYDPKFQGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRITMATPYPMDYWGQGTLVTVSS	30
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASTSVIYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGQGTKVEIKR	31

[248] [표16]

인간화된 94E12E2-03 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 94E12E2-03 antibody	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDNYMHWVRQAPGKGLEWVAWIDPENGDTEYDPKFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCNIITMATPYPMDYWGQGTLVTVSS	32
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASTSVIYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGQGTKVEIKR	33

[249] [표17]

인간화된 94E12E2-04 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.

humanized 94E12E2-04 antibody	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDNYMHWVRQAPGKGLEWIGWIDPENGDTEYDPKFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCNIITMATPYPMDYWGQGTLVTVSS	34
	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASTSVIYMHWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGQGTKVEIKR	35

[250] [표18]

인간화된 94E12E2-05 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 94E12E2-05 antibody	VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDNYMHWVQQAPGKGLEWIGWIDPENGDTEYDPKFQGRATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCNIITMATPYPMDYWGQGTLVTVSS	36
	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASTSVIYMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGTKLEIKR	37

[251] [표19]

인간화된 94E12E2-06 클론 항체의 Frame work 서열

Antibody	Chain type	sequence	Seq no.
humanized 94E12E2-06 antibody	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDNYMHWVRQAPGQGLEWIGWIDPENGDTEYDPKFQGRATMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCNIITMATPYPMDYWGQGTLVTVSS	38
	VL	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASTSVIYMHWFQQKPDQSPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTINSLEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGQGTKLEIKR	39

[252] 이후 인간화된 94E12E2 항체의 결합능을 확인하기 위하여, 먼저 CEACAM5 protein (Acrobiosystems) 을 0.5ug/ml의 농도로 384-well 마이크로플레이트 (Corning) 의 각 웰 당 30ul 씩 분주한 후 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션 한 후 PBST(DPBS + 0.05% Tween 20, Teknova) 100 μL/well로 4회 세척하였다. 이후 3% FBS가 포함된 1X PBS 버퍼를 80 μL/well 첨가하고 상온에서 2.5시간 동안 인큐베이션한 후 위와 동일하게 PBST 100 μL/well로 4회 세척하였다. 이때 항체는 0.5% Fetal Bovin Serum (FBS, Cytiva)를 함유한 DPBS(Bining buffer)로 200 nM 내지 0.0004 nM 범위의 농도로 3배수 희석하여 준비하였다. 이와 같이 준비된 항체들을 CEACAM5 coated plate에 30 μL/well씩 첨가한 후 상온에서 1시간 인큐베이션 하였다. 이후 플레이트를 셀척한 뒤 HRP (horseradish peroxidase) anti-mouse IgG Fcγantibody, Jackson ImmunoResearch)를 바인딩 버퍼에 0.16 μg/mL (1:5000)의 농도로 희석하여 플레이트에 30 μL/well씩 첨가한 후 상온에서 1시간 인큐베이션하였다. 이후 동일하게 플레이트 세척 후 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Invitrogen) substrate를 플레이트에 30 μL/well씩 첨가한 후 상온에서 10분간 암실에서 인큐베이션 하였다. 마지막으로 0.16 M sulfuric acid (stop solution, Invitrogen) 용액 30 μL/well를 첨가 후 10분간 암실에서 인큐베이션하여 반응을 중지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Synergyhtx multimode reader, Biotek).

[253] 그 결과, 도 15 에 나타낸 바와 같이, 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 중에서도 94E12E2-04 및 94E12E2-06 항체의 경우 특히 더 높은 결합능을 보임을 확인하였다.

[254]

[255] **3-5. 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (94E12E2) 의 결합능 확인**

[256] 이하에서는, 도 16을 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 다양한 클론 항체 (94E12E2) 의 결합능에 대해 자세히 설명한다.

[257]

[258] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 다양한 클론 항체 (94E12E2) 의 결합력을 유세포 분석법으로 확인하여 나타낸 도이다.

[259] 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 (94E12E2) 의 CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주에 대한 결합능 확인을 위하여 먼저, CEACAM5를 발현하는 CHO-k1(CHO-CEACAM5) 세포주를 96-well plate에 3x10^6 cells/well으로 분주하였다. 이후 다양한 농도(0.025nM - 500nM)의 humanized mAb들을 DPBS 용액으로 희석하여 CHO-CEACAM5 cell plate에 50 μL/well 씩 분주한 후 4℃에서 20분 동안 인큐베이션 하였다. Cold DPBS 250 μL/well으로 2회 세척하였다. (1500RPM, 4℃, 3분간 원심분리) 그 다음, Alexa Flour 647이 접합된 goat anti-human IgG Fcγ 2차 항체(Jackson ImmunoResearch)를 15 μg/ml의 농도로 DPBS 희석한 용액을 세포에 50 μL/well씩 분주한 후 플레이트를 호일로 감싸 차광하여 4℃에서 20분동안 인큐베이션 하고, Cold DPBS를 250 μL/

well으로 2회 세척하였다. (1500RPM, 4℃, 3분간 원심분리) 마지막으로 250 μL/well씩 Cold DPBS 분주하여 유세포분석기 (MACSQuant®Analyzer 10, Miltenyi Biotec) 로 형광을 측정하고 BD Flowjo를 이용하여 MFI(geometric mean)를 분석하였다.

[260] 그 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이, 인간화 작업을 진행하여 생산한 항체 중에서도 94E12E2-04 항체의 경우 특히 더 높은 결합능을 보임을 확인하였다.

[261]

[262] **4-1. 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 에 해당하는 서열을 변형한 항체 (36B5H8) 클론들의 결합능 확인**

[263] 이하에서는, 도 17a 및 17b를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 번역 후 변형 (Post translational modification, PTM) 에 해당하는 서열을 변형한 항체 (36B5H8) 클론들의 결합능에 대해 자세히 설명한다.

[264]

[265] 도 17a 및 17b는 본 발명의 일 실시예에 따른 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 에 해당하는 서열을 변형한 항체 (36B5H8) 클론들의 결합력을 분석하여 나타낸 도이다.

[266] 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 부분을 수정한 36B5H8 클론 항체들의 결합력 분석을 위해 먼저 선택한 인간화 36B5H8 클론 항체들 안에 번역 후 변형이 일어날 것으로 예측되는 부분을 수정하여 항체를 생산하였고, 이 항체는 Biacore 8K 장비를 이용하여 결합력 분석을 하였다. 먼저, CM5 chip에 항체를 결합을 시킨 후, CEACAM5 재조합 단백질을 12.5 내지 800nM까지 다양한 농도로 반응을 시켜 이 항체들의 결합력을 분석하였다. 이때 36B5H8-VH-3(4GS)-VL은 대조군으로 마우스 서열로 제작한 항체에 해당하며, 36B5H8-VH-DA-VL은 대조군으로 마우스 서열에 번역 후 변형 부분을 수정하여 제작한 항체에 해당한다. 인간화 및 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 된 36B5H8 항체의 서열은 인간화된 36B5H8 항체의 서열과 VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3 는 동일하며 VH CDR2 의 아미노산 서열 일부를 달리하여 제작하였다.

[267]

[268] [표20]

인간화된 36B5H8 항체의 CDR 서열

Antibody	Chain type		sequence	Seq no.
humanized 36B5H8 antibody	VH	CDR 1	GITFSRYAMS	40
		CDR 2	SISSDAITYYLDSVKG	41
		CDR 3	IYYYGSPFFDY	42
	VL	CDR 1	KASQNVYTNVA	43

		CDR 2	SASNRYS	44
		CDR 3	QQYNNYPLFT	45

[269] [표21]

인간화 및 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 된 36B5H8 항체의 서열

Antibody	Chain type		sequence	Seq no.
humanized 36B5H8 antibody	VH	CDR 1	GITFSRYAMS	40
		CDR 2	SISSDAITYYLDAVKG	46
		CDR 3	IYYYGSPFFDY	42
	VL	CDR 1	KASQNVYTNVA	43
		CDR 2	SASNRYS	44
		CDR 3	QQYNNYPLFT	45

[270] **4-2. 인간화 및 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 된 항체의 결합능 확인**

[271] 이하에서는, 도 16을 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 및 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 작업 후 CHO-K1-CEACAM5 세포를 이용하여 선택된 항체들의 결합능에 대해 자세히 설명한다.

[272]

[273] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간화 및 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 작업 후 CHO-K1-CEACAM5 세포를 이용하여 선택된 항체들의 결합능을 확인하여 나타낸 도이다.

[274] 인간화 및 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 작업 후 CHO-K1-CEACAM5 세포를 이용하여 선택된 항체들의 결합을 확인을 위하여 먼저 CHO-K1-CEACAM5 세포를 1X PBS 100μl에 각 항체들을 0~45μg/ml 농도로 섞어 4℃에서 30분 동안 반응켰다. 이후 1X PBS 2ml을 넣고 1500rpm, 3분 동안 원심분리하고 상층액은 버린 후, 1차로 반응시킨 항체를 확인 할 수 있는 AF647-anti-human IgG, Fcr fragment 결합 항체를 1X PBS 100μl에 1μg/ml 농도로 섞어서 세포와 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 마지막으로 세포에 1X PBS 2ml을 넣고 1500rpm, 3분 동안 원심분리한 후 상층액을 버리고 1X PBS 300μl씩 넣어 유세포 분석기로 측정하였다.

[275] 그 결과, 도 16에 나타낸 바와, 본 발명의 같이 인간화 및 번역 후 변형(Post translational modification, PTM) 작업을 한 항체 모두 대조군으로 마우스 서열에 번역 후 변형 부분을 수정하여 제작한 항체 36B5H8-VH-DA-VL 에 비해 높은 결합능을 보임을 확인하였다.

[276]

[277] 이상의 결과에 따라, 본 발명의 일 실시에에 따른 항체는 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5을 타겟으로 하는 항체는 soluble CEACAM5 에는 결합하지 않으면서도 세포 표면에 잔존하는 CEACAM5 에 특이적으로 결합하여 종양 미세환경에서의 종양세포 인지능력이 우수할 수 있으며, 이에 따라, 항암 효과가 향상될 수 있다.

[278]

[279]

[280] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시 예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] (1) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
서열번호 2으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,
서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및
서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3;
(2) 서열번호 13 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
서열번호 14 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,
서열번호 15 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
서열번호 16 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
서열번호 17 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및
서열번호 18 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3;
(3) 서열번호 24 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
서열번호 25 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,
서열번호 26 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
서열번호 27 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
서열번호 28 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및
서열번호 29 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3; 또는,
(4) 서열번호 40 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
서열번호 41 또는 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,
서열번호 42 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
서열번호 43 으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
서열번호 44 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및
서열번호 45 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 을 포함하고,
CEACAM5 에 특이적으로 결합하는,
항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 2] 제1 항에 있어서,
상기 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편은,
세포 표면에 결합되어 있지 않은 soluble CEACAM5 (sCEACAM5) 에 실질적으로 결합하지 않고, 세포 표면에 존재하는 CEACAM 5 에 특이적으로 결합하는,
항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편.

[청구항 3] 제1 항 또는 제2 항에 있어서,
상기 항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

인간화된 항체인 것을 특징으로 하는,
항 CEACAM5 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 4] 제1 항 또는 제2 항에 기재된 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 항체 약물 컨쥬게이트.

[청구항 5] 제1 항 또는 제2 항 중 어느 한 항에 기재된 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 6] 제5 항에 있어서,
상기 암은 고형암인 것을 특징으로 하는,
암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 7] 제6 항에 있어서,
상기 고형암은 대장암, 췌장암, 폐암, 위암, 간세포종양, 유방암 및 갑상선암 중 어느 하나인 것인,
암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 8] 제5 항에 있어서,
상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편이 입양 세포 요법(adaptive cell therapy, ACT)을 위한 세포치료제로서 사용되는 것인,
암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 9] 제1 항 또는 제2 항에 기재된 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편을 포함하는, CEACAM5 발현 종양세포의 증식 억제용 조성물.

[청구항 10] 제1 항 또는 제2 항에 기재된 항-CEACAM5 항체 또는 이의 결합 단편을 코딩하는 핵산.

[청구항 11] 제10 항에 기재된 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터.

[청구항 12] 제11 항에 기재된 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포.

[청구항 13] 제5 항의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 암을 예방 또는 치료하는 방법.