

명세서

발명의 명칭: ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 항체

기술분야

- [1] 본 발명은 ASM(acid sphingomyelinase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 스핑고지질 대사는 정상적인 세포 신호전달을 조절하며, 스핑고지질 대사의 비정상적 변화는 알츠하이머 질환을 포함하는 다양한 신경퇴행성 질환에 영향을 미친다. 스핑고지질 대사를 조절하는 효소인 ASM(acid sphingomyelinase) 단백질은 거의 모든 종류의 세포에서 발현되는 단백질로서, 스핑고지질 대사 및 세포막 턴오버(turnover)에 중요한 역할을 한다.
- [4] 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성 질환 환자의 뇌에서는 정상인에 비해 ASM 단백질의 활성이 현저히 증가되어 있다. 이와 관련하여, 대한민국 특허등록 제10-1521117호는 과발현된 ASM 단백질의 활성을 저해하거나, ASM 단백질로의 발현을 억제하면 β -아밀로이드의 축적이 억제되고 학습능력 및 기억력이 개선되어 신경퇴행성 질환을 치료할 수 있음을 개시하고 있다. 또한, 최근 우울증과 같은 신경 질환에서도 ASM 단백질의 활성이 증가되어 있어, 상기 ASM 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 우울증을 개선하는 효과가 있음이 알려졌다.
- [5] 그러나, ASM 단백질의 발현 또는 활성을 직접 억제하는 물질은 개발되지 않았으며, 다만 ASM 단백질의 발현을 간접적으로 억제하는 몇 종류의 억제제가 동정되었다. 예를 들어, 우울증의 치료에 사용되고 있는 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressant)가 있으며, 여기에는 아미트리프틸린(amitriptyline), 데시프라민(desipramine), 미프라민(mipramine) 등이 포함된다. 이들 삼환계 항우울제는 ASM 단백질 억제제로서 개발된 것은 아니나, 다양한 연구결과에 의해 ASM 단백질 억제 효과를 나타내는 것이 증명되었다. 삼환계 항우울제의 주요 약리기전은 신경세포에서 신경전달물질의 재흡수를 억제하여 이들의 활성을 증가시키는 것이며, ASM 억제제로서의 작용은 부수적인 작용으로 확인되었다. 그러나, 삼환계 항우울제는 신경계 및 신경세포에 작용하여 시야흐림, 빛 감수성 증가, 구토 등의 부작용을 유발할 수 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원

결합 단편을 제공하는 것이다.

- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 ASM 단백질 검출 용도를 제공하는 것이다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ASM(acid sphingomyelinase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 핵산 또는 발현벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 숙주세포를 배양하여 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 단계를 포함하는 ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생산 방법을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 ASM 단백질 검출용 조성물 및 키트를 제공한다.
- [17] 나아가, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 치료와 반응시키는 단계를 포함하는 ASM 단백질 검출 방법을 제공한다.
- [18]

발명의 효과

- [19] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 ASM 단백질에 특이적으로 높은 결합력으로 결합함으로써, ASM 단백질의 검출이나, ASM 단백질의 과발현으로 인해 발생하는 질환의 진단 등에 유용하게 사용될 수 있다.
- [20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 제조된 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역 아미노산 서열을 나타내는 모식도이다.
- [22] 도 2는 본 발명의 일 실시예에서 제조된 항체의 ASM 단백질과의 결합을 ELISA 분석 방법으로 확인한 결과 그래프이다.
- [23] 도 3은 본 발명의 일 실시예에서 제조된 항체가 결합하는 항원 결합 부위를 ASM 단백질 구조 모델에 표시한 모식도이다.
- [24] 도 4는 본 발명의 일 실시예에서 제조된 항체에 의한 ASM 단백질 사포신(saposin) 도메인에서의 중수소 치환 히트맵을 나타낸 결과 도면이다.
- [25]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [27] 본 발명은 ASM(acid sphingomyelinase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [28] 본 명세서에서 사용된 용어, 'ASM(acid sphingomyelinase) 단백질'은 스핑고지질 대사를 조절하는 SMase(sphingomyelinase) 패밀리 중 하나인 효소를 의미한다. 상기 ASM 단백질은 스핑고미엘린(sphingomyelin)을 세라마이드(ceramide) 및 포스포릴콜린(phosphorylcholine)으로 분해하는 과정을 촉매하며, 최적의 효소 활성을 나타내는 pH에 따라 알칼리성, 중성 또는 산성으로 구분할 수 있다.
- [29] 상기 ASM 단백질은 통상의 기술분야에 알려진 모든 종류의 ASM 단백질을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 ASM 단백질은 포유동물 유래일 수 있고, 더욱 구체적으로는 인간, 원숭이, 랫트 또는 마우스 유래일 수 있다. 또한, 상기 ASM 단백질은 통상의 기술분야에 ASM 단백질로 알려진 모든 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일례로, 상기 ASM 단백질은 서열번호 66 및 67로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드 또는 이를 암호화하는 핵산일 수 있다.
- [30] 상기 ASM 단백질은 이와 동일하거나 이에 상응하는 생물학적 활성을 유지하는 한, 서열번호 66 또는 67로 기재된 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 첨가, 결실 또는 치환된 것일 수 있다. 이때, 아미노산의 치환은 전체 단백질의 전하, 즉, 극성 또는 소수성에 영향을 주지 않거나 약하게 주는 범위 내에서 수행되는 보존적 치환일 수 있다. 또한, 상기 ASM 단백질은 서열번호 66 및 67로 각각 기재된 아미노산 서열과 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 또한, 상기 ASM 단백질은 이와 동일하거나 이에 상응하는 생물학적 활성을 유지하는 한, ASM 단백질의 일부만을 포함할 수 있다.
- [31] 본 명세서에 사용된 용어, '항체(antibody)'는 항원과 결합하여 항원의 작용을 방해하거나, 항원을 제거하는 면역 단백질을 의미한다. 상기 항체는 통상의 기술분야에 포함되는 모든 종류의 항체를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 항체는 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 중쇄 불변영역을 암호화하는 유전자인 μ , δ , γ , α 및 ϵ 으로부터 만들어진 중쇄를 포함할 수 있다. 통상적으로 항체기술에서는 주로 IgG가 사용되는데, 이는 다시 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 동종(isotype)으로 구성되며, 이들 각각의 구조 및 기능적 특성은 상이할 수 있다. 상기 항체는 비-인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 포함하는 인간화 항체, 인간으로부터 유래된 서열로 구성된 인간 항체, 또는 서로 다른 종으로부터 유래된 서열이 혼합된 키메라 항체를 모두 포함할 수 있다.
- [32] 상기 IgG는 약 50 kDa의 중쇄(heavy chain) 단백질 2개와 약 25 kDa의 경쇄(light chain) 단백질 2개로 만들어진 Y자 모양의 매우 안정된 구조(약 150 kDa)를 형성할 수 있다. 항체를 구성하는 경쇄 및 중쇄는 항체 사이에서 아미노산 서열이 다른 가변영역(variable region) 및 아미노산 서열이 같은

불변영역(constant region)으로 나뉠 수 있다. 이때, 중쇄 불변영역은 CH1, 힌지(hinge, H), CH2 및 CH3 도메인을 포함하며, 각 도메인은 두 개의 β -시트(β -sheet)로 구성되고, 분자 내 이황화결합(disulfide bond)으로 연결될 수 있다. 또한, 경쇄 불변영역은 CL 도메인을 포함할 수 있다. 한편, 중쇄 및 경쇄의 가변영역 두 개가 합쳐져 항원 결합 부위(antigen binding site)가 형성되며, 상기 항원 결합 부위는 Y자 모양의 두 개의 팔에 각각 한 개씩 존재할 수 있다. 전장의 항체에서 항원과 결합할 수 있는 부분을 Fab(antibody binding fragment), 항원과 결합하지 못하는 부분을 Fc(crystallizable fragment)라고 하며, Fab 및 Fc는 힌지로 연결될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 IgG는 마우스 유래의 IgG일 수 있고, 구체적으로 서열번호 74로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 마우스 IgG 중쇄 불변 영역 및 서열번호 76으로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 마우스 경쇄 λ 불변 영역을 포함할 수 있다. 또한, 상기 마우스 유래의 IgG는 서열번호 75로 기재된 염기서열로 구성되는 마우스 IgG 중쇄 불변 영역 및 서열번호 77로 기재된 염기서열로 구성되는 마우스 경쇄 λ 불변 영역을 포함할 수 있다.

- [33] 본 발명에 따른 항체는 전장의 항체뿐 아니라 이의 항원 결합 단편을 모두 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 항원 결합 단편은 항원과의 결합 자극을 세포나 보체 등에 전달하는 기능을 하는 Fc를 제외한 부분을 의미할 수 있다. 일례로, 항체의 항원 결합 단편은 Fab, scFv, F(ab)₂ 및 Fv를 모두 포함할 수 있고, 단일 도메인 항체(single domain antibody)나 소형 항체(minibody) 등과 같은 3세대 항체 절편도 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명의 일 측면에서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 ASM 단백질의 N-말단으로부터 53 내지 72번째 아미노산 단편, 101 내지 123번째 아미노산 단편, 135 내지 159번째 아미노산 단편, 135 내지 155번째 아미노산 단편, 218 내지 228번째 아미노산 단편 및 259 내지 269번째 아미노산 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있다. 이때, 상기 ASM 단백질은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 ASM 단백질의 N-말단으로부터 53 내지 72번째 아미노산 단편은 서열번호 68(TAINLGLKKEPNVARVGSVA)로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드일 수 있고, 101 내지 123번째 아미노산 단편은 서열번호 69(VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH)로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드일 수 있으며, 135 내지 159번째 아미노산 단편은 서열번호 70(PTVPKPPPKPPSPAPGAPVSRILF)으로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드일 수 있고, 135 내지 155번째 아미노산 단편은 서열번호 71(PTVPKPPPKPPSPAPGAPVS)로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드일 수 있으며, 218 내지 228번째 아미노산 단편은 서열번호 72(SGLGPAGPFDM)로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드일 수 있고, 259 내지 269번째 아미노산 단편은 서열번호 73(VRKFLGPVPVY)으로

기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드일 수 있다. 즉, 본 발명의 다른 측면에서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 68 내지 73으로 각각 기재된 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있다.

- [35] 상기 용어, "에피토프(epitope)"는 항체가 식별할 수 있는 항원의 특정 부위로서, 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 결정부위를 의미한다. 상기 에피토프는 항원결정부위(determinant, antigenic determinant)라는 용어와 동일한 의미로 통용된다. 상기 에피토프는 화학적으로 활성을 갖는 표면 분자군, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며, 일반적으로 특정한 3차원의 구조적 특징뿐 아니라 특정한 전하 특성을 갖는다.
- [36] 본 발명의 일 측면에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 61로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1(X_1YX_2MS), 서열번호 62로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR2($X_3IX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}YYADSVKG$), 및 서열번호 27, 30, 33, 36, 39 및 42로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 63으로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1($X_{11}GSSSNIGX_{12}NX_{13}VX_{14}$), 서열번호 64로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR2($X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RPS$), 및 서열번호 65로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR3($X_{19}X_{20}WDX_{21}SLX_{22}X_{23}YV$)을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [37] 상기 용어, 'CDR(complementarity determining region)'은 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역 내에 항체마다 다른 아미노산 서열을 갖는 부위인 초가변영역(hypervariable region)으로, 실제로 항원과 결합하는 부위를 의미한다. 항체의 입체구조에서 CDR은 고리(loop) 모양으로 항체의 표면에 위치하고, 고리 아래에는 이를 구조적으로 지지해주는 FR/framework region)이 존재할 수 있다. 중쇄 및 경쇄는 모두 각각 세 개씩 고리 구조가 존재하며, 이들 여섯 개의 고리 구조가 합쳐져서 항원과 직접 접촉할 수 있다. 상기 여섯 개의 고리 구조를 갖는 항원 결합 부위인 CDR을 각각 편의상 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 중쇄 CDR3, 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2 또는 경쇄 CDR3로 지칭할 수 있다.
- [38] 일례로, 상기 서열번호 61로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1(X_1YX_2MS)에서 X_1 및 X_2 는 각각 산성 및 중성 아미노산에서 선택될 수 있다. 구체적으로, 상기 X_1 은 산성 또는 중성 아미노산일 수 있고, X_2 는 중성 아미노산일 수 있다. 예를 들어, 상기 X_1 및 X_2 는 각각 아스파라긴(asparagine, Asn), 글리신(glycine, Gly), 세린(serine, Ser), 아스파르트산(aspartic acid, Asp), 알라닌(alanine, Ala) 및 티로신(tyrosine, Tyr)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 구체적으로, 상기 X_1 은 아스파라긴, 글리신, 세린 또는 아스파르트산일 수 있고, X_2 는 알라닌 또는 티로신일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 중쇄 CDR1은 서열번호 25, 28, 31, 34, 37 또는 40으로 기재된 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

- [39] 또한, 상기 서열번호 62로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR2($X_3IX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}YYADSVKG$)에서 X_3 내지 X_{10} 은 각각 중성 및 염기성 아미노산에서 선택될 수 있다. 구체적으로, 상기 X_3 및 X_4 내지 X_9 는 각각 중성 아미노산일 수 있고, X_{10} 은 중성 또는 염기성 아미노산일 수 있다. 예를 들어, 상기 X_3 내지 X_{10} 은 각각 글리신, 류신(leucine, Leu), 알라닌, 세린, 티로신, 프롤린(proline, Pro), 아스파라긴, 리신(lysine, Lys) 및 이소류신(isoleucine, Ile)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 구체적으로, 상기 X_3 는 글리신, 류신, 알라닌 또는 세린일 수 있고, X_4 는 티로신 또는 세린일 수 있으며, X_5 는 프롤린 또는 티로신일 수 있고, X_6 은 아스파라긴 또는 글리신일 수 있으며, X_7 및 X_8 은 각각 글리신 또는 세린일 수 있고, X_9 는 아스파라긴 또는 세린일 수 있으며, X_{10} 은 리신 또는 이소류신일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 중쇄 CDR2는 서열번호 26, 29, 32, 35, 38 또는 41로 기재된 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [40] 또한, 상기 서열번호 63으로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1($X_{11}GSSNIGX_{12}NX_{13}VX_{14}$)에서 X_{11} 내지 X_{14} 는 각각 중성 아미노산에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 X_{11} 내지 X_{14} 는 각각 트레오닌(threonine, Thr), 세린, 아스파라긴, 알라닌, 프롤린 및 티로신으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 구체적으로, 상기 X_{11} 은 트레오닌 또는 세린일 수 있고, X_{12} 는 아스파라긴 또는 세린일 수 있으며, X_{13} 은 알라닌, 프롤린, 트레오닌 또는 티로신일 수 있고, X_{14} 는 아스파라긴, 티로신 또는 세린일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 경쇄 CDR1은 서열번호 43, 46, 49, 52, 55 또는 58로 기재된 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [41] 또한, 상기 서열번호 64로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR2($X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RPS$)에서 X_{15} 내지 X_{18} 은 각각 산성, 염기성 및 중성 아미노산에서 선택될 수 있다. 구체적으로, 상기 X_{15} 및 X_{16} 은 각각 산성 또는 중성 아미노산일 수 있고, X_{17} 은 중성 아미노산일 수 있으며, X_{18} 은 염기성 또는 중성 아미노산일 수 있다. 예를 들어, 상기 X_{15} 내지 X_{18} 은 각각 티로신, 알라닌, 아스파르트산, 세린, 아스파라긴, 히스티딘(histidine, His), 글루타민(glutamine, Gln) 및 리신으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 구체적으로, X_{15} 는 티로신, 알라닌, 아스파르트산 또는 세린일 수 있고, X_{16} 는 아스파르트산 또는 아스파라긴일 수 있으며, X_{17} 은 세린 또는 아스파라긴일 수 있고, X_{18} 은 히스티딘, 글루타민 또는 리신일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 상기 경쇄 CDR2는 서열번호 44, 47, 50, 53, 56 또는 59로 기재된 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [42] 또한, 상기 서열번호 65로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR3($X_{19}X_{20}WDX_{21}SLX_{22}X_{23}YV$)에서 X_{19} 내지 X_{23} 은 각각 중성 아미노산에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 X_{19} 내지 X_{23} 은 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 티로신, 아스파르트산 및 아스파라긴으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 구체적으로, X_{19} 는 글리신 또는 알라닌일 수 있고, X_{20} 은 알라닌, 세린 또는 트레오닌일 수 있으며, X_{21} 은 티로신, 세린, 알라닌 또는 아스파르트산일 수 있고,

X_{22} 는 세린 또는 아스파라긴일 수 있으며, X_{23} 은 알라닌 또는 글리신일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 경쇄 CDR3는 서열번호 45, 48, 51, 54, 57 또는 60으로 기재된 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

- [43] 본 발명의 다른 측면에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 25, 28, 31, 34, 37 및 40으로 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 CDR1, 서열번호 26, 29, 32, 35, 38 및 41로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 27, 30, 33, 36, 39 및 42로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 43, 46, 49, 52, 55 및 58로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄 CDR1, 서열번호 44, 47, 50, 53, 56 및 59로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 45, 48, 51, 54, 57 및 60으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [44] 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 28, 29 및 30으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 31, 32 및 33으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 34, 35 및 36으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 37, 38 및 39로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 40, 41 및 42로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 43, 44 및 45로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 서열번호 46, 47 및 48로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 서열번호 49, 50 및 51로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 서열번호 52, 53 및 54로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 서열번호 55, 56 및 57로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 및 서열번호 58, 59 및 60으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [45] 나아가, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 43, 44 및 45로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는

경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 28, 29 및 30으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 46, 47 및 48로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 31, 32 및 33으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 49, 50 및 51로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 34, 35 및 36으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 52, 53 및 54로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 37, 38 및 39로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 55, 56 및 57로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 40, 41 및 42로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 58, 59 및 60으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

- [46] 일례로, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9 또는 11로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드일 수 있고, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 13, 15, 17, 19, 21 또는 23으로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드일 수 있다.
- [47] 또한, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 필요에 따라 변형된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 접합(conjugation), 당화(glycosylation), 표지 부착 또는 이들의 조합으로 변형될 수 있다. 구체적으로, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HRP(horseradish peroxidase), 알칼린 포스파타아제, 햅텐(hapten), 비오틴, 스트렙타비딘, 형광 물질, 방사성 물질, 양자점, PEG(polyethylene glycol), 히스티딘 표지 등으로 변형될 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 필요에 따라 다른 약물이 접합될 수도 있다.
- [48] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 통상의 기술분야에 알려진 단일클론항체 제조 방법에 따라 제조될 수 있고, 상기 제조 방법은 통상의 기술자에 의해 적절히 변형될 수 있다. 일례로, 상기 항체는 항원으로 면역화된 동물로부터 수득된 B 림프구를 사용하여 하이브리도마를 제조함으로써 제조되거나, 파지 디스플레이 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [49]
- [50] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 제공한다.
- [51] 본 발명에 따른 핵산이 암호화하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 서술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합

단편을 구성하는 아미노산 서열이 공지된 한, 이를 암호화하는 핵산 서열 또한 통상의 기술자에게 자명하다. 또한, 상기 핵산 서열은 이로부터 번역되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 활성을 유지하는 한, 하나 또는 그 이상의 염기가 첨가, 결실 또는 치환된 것일 수 있다.

- [52] 일례로, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 포함되는 중쇄 가변영역을 암호화하는 핵산은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12로 기재된 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 경쇄 가변영역을 암호화하는 핵산은 서열번호 14, 16, 18, 20, 22 또는 24로 기재된 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [53]
- [54] 또한, 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [55] 본 발명에 따른 발현벡터에 포함되는 핵산은 상기 서술한 바와 같은 특징을 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 암호화된 것일 수 있다.
- [56] 본 명세서에서 사용된 용어, '발현벡터(expression vector)'는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 바이러스 벡터 등을 모두 포함할 수 있다. 상기 발현벡터는 이에 포함되는 핵산으로부터 펩티드를 생성하기 위해 필요한 요소를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 발현벡터는 신호서열, 복제기점, 마커 유전자, 프로모터, 전사 종결 서열 등을 포함할 수 있다. 이때, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 암호화된 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결될 수 있다.
- [57] 일례로, 원핵세포에 사용되는 발현벡터는 전사를 진행시키는 프로모터, 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리, 및 전사와 해독의 종결서열을 포함할 수 있다. 한편, 진핵세포에 사용되는 발현벡터는 포유동물 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다.
- [58] 또한, 상기 발현벡터에 포함되는 마커 유전자로는 통상의 기술분야에 알려진 것을 모두 사용할 수 있으며, 구체적으로 항생제 내성 유전자일 수 있다. 구체적으로, 상기 항생제 내성 유전자는 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 네오마이신, 테트라사이클린 등을 포함하는 항생제에 대해 내성을 나타내는 유전자일 수 있다.
- [59]
- [60] 또한, 본 발명은 상기 핵산 또는 발현벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [61] 본 발명에 따른 숙주세포에 포함되는 핵산 또는 발현벡터는 상기 서술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 일례로, 상기 핵산은 본 발명에 따른 ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화할 수 있고, 상기 발현벡터는 상술한 바와 같은 핵산이 포함될 수 있다.
- [62] 상기 숙주세포는 통상의 기술분야에 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하기 위해 사용될 수 있다고 알려진 모든 종류의 세포를 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 숙주세포는 원핵세포, 효모 또는 진핵세포일 수 있다. 상기

원핵세포는 대장균(*E. coli*), 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스 속 균주, 슈도모나스 속 균주, 스태필로코쿠스 속 균주 등을 포함할 수 있고, 상기 효모는 사카로마이세스 세레비지에 등을 포함할 수 있다. 한편, 상기 진핵세포는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, HEK293, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PERC6, SP2/0, NS-0, U20S 및 HT1080 등을 포함할 수 있다.

- [63] 또한, 상기 숙주세포는 통상의 기술분야에 알려진 방법에 따라 상술한 바와 같은 핵산 또는 발현벡터가 형질주입된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 형질주입은 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개 형질감염(DEAE dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법, 유전자 총(gene gun) 등의 방법으로 수행될 수 있다. 또한, 상기 방법은 통상의 기술자에 의해 적절히 변형될 수 있다.
- [64]
- [65] 나아가, 본 발명은 상기 숙주세포를 배양하여 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 단계를 포함하는 ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생산 방법을 제공한다.
- [66] 본 발명에 따른 생산 방법으로 생산되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 서술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다.
- [67] 상기 배양은 생산에 사용되는 숙주세포의 종류에 따라 적절한 배양배지를 사용하여 수행될 수 있고, 필요에 따라 적절한 보충물이 포함될 수 있다. 또한, 상기 배양은 숙주세포의 종류에 따라 적절한 환경에서 수행될 수 있다.
- [68] 본 발명에 따른 생산 방법은 숙주세포에서 생산된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 회수는 통상의 기술분야에 알려진 방법에 따라 수행될 수 있으며, 이는 필요에 따라 통상의 기술자에 의해 적절히 변형될 수 있다. 일례로, 상기 회수는 원심분리 또는 한외여과를 이용하여 불순물을 제거하고, 수득된 결과물을 크로마토그래피 등으로 추가 정제함으로써 수행될 수 있다. 상기 크로마토그래피는 친화 크로마토그래피, 양이온 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 등을 포함할 수 있다.
- [69]
- [70] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 ASM 단백질 검출용 조성물 및 키트를 제공한다.
- [71] 본 발명에 따른 ASM 단백질 검출용 조성물 및 키트에 포함되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 서술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다.
- [72] 또한, 상기 조성물은 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드를 포함할 수 있다. 상기 리간드는 발색효소,

형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체가 표지된 접합체, 및 스트렙타비딘 또는 아비딘이 처리된 리간드일 수 있다. 본 발명의 검출용 조성물은 상기 서술한 바와 같은 시약 외에도 이들의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 더 포함할 수 있다.

[73] 또한, 상기 키트는 이에 포함되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 세척이나 복합체의 분리 등과 같은 이후 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질에 결합될 수 있다. 이때, 고형 기질로는 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 또는 미세비드가 사용될 수 있다. 또한, 합성수지로는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 또는 나일론 등이 사용될 수 있다.

[74] 또한, 상기 키트는 당업자에게 알려진 종래의 제조방법에 의해 제조될 수 있으며, 완충액, 안정화제, 불활성 단백질 등을 더 포함할 수 있다.

[75]

[76] 나아가, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 시료와 반응시키는 단계를 포함하는 ASM 단백질 검출 방법을 제공한다.

[77] 본 발명에 따른 ASM 단백질 검출 방법에 사용되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 서술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다.

[78] 상기 시료는 ASM 단백질을 검출하고자 하는 시료라면 모든 종류의 시료를 포함할 수 있다. 또한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이용하여 표적 단백질을 검출하는 방법은 통상의 기술분야에 잘 알려져 있으며, 이는 필요에 따라 통상의 기술자에 의해 적절히 변형되어 수행될 수 있다.

[79]

발명의 실시를 위한 형태

[80] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다, 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 청구범위에 기재된 기술적 사상과 실질적으로 동일한 구성을 갖고 동일한 작용 효과를 이루는 것은 어떠한 것이라도 본 발명의 기술적 범위에 포함된다.

[81]

[82] 실시예 1. ASM(acid sphingomyelinase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 제작

[83] 인간 ASM 단백질(서열번호 66) 및 마우스 ASM 단백질(서열번호 67)에 특이적으로 결합하는 항체를 다음과 같은 방법으로 제작하였다.

[84] 구체적으로, 재조합 인간 및 마우스 ASM 단백질, 및 인간 합성 scFv-파아지 라이브러리를 이용하여 통상적인 방법으로 패닝(panning)을 수행하여 인간 ASM 단백질 또는 마우스 ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 scFv를 갖는 파아지를 선별하였다. 선별된 scFv를 암호화하는 핵산 서열을 분석하고, 이로부터

생성되는 아미노산 서열을 확인하였다. 확인된 scFv 서열의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역 각각의 카복시 말단(carboxy terminus)에, 서열번호 75 및 77로 각각 기재된 염기 서열로 구성되는 마우스 중쇄 불변영역(constant region) 및 마우스 경쇄 λ 불변영역이 연결된 형태로 발현되도록 발현벡터를 제작하였다. 이때, 제작된 발현벡터에 포함된 scFv를 구성하는 중쇄 가변영역의 아미노산 서열 및 핵산 서열을 하기 표 1에, 경쇄 가변영역의 아미노산 서열 및 핵산 서열을 하기 표 2에 나타내었다.

[85] [표1]

항제#	서열	서열번호
#9101	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVR QAPGKGLEWVSGIYPNGGNKYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAYRFDYWGQGLVT VSS	서열번호 1
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC CGGATTCACCTTTAGCAATTATGCTATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAG GGATCTATCCTAATGGTGGTAATAAATATTACGCTGA TTCTGTAAAAGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA GAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAAA TGCTTATCGTTTCGACTACTGGGGCCAGGGTACACTG GTCACCGTGAGCTCA	서열번호 2
#9102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYMSWVR QAPGKGLEWVSLISPGSGSIYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWHFDYWGQGLVTV SS	서열번호 3
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC CGGATTCACCTTTAGCGGTTATTATATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATT GATCTCTCCTGGTAGTGGTAGTATATATTACGCTGATT CTGTAAAAGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAATCTT GGCATCATTTTCGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGT CACCGTGAGCTCA	서열번호 4

#9104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVR QAPGKGLEWVSGIYYGSGNIYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTPGFDYWGQGLTVT SS	서열번호 5
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC CGGATTACCTTTAGCAATTATTATATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAG GGATCTATTATGGTAGTGGTAATATATATTACGCTGAT TCTGTAAAAGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT ACGCCTGGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGG TCACCGTGAGCTCA	서열번호 6
#9108	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVR QAPGKGLEWVSAIYPGGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVLGLTPKPFDYWGQG TLVTVSS	서열번호 7
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC CGGATTACCTTTAGCAATTATGCTATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAG CGATCTATCCTGGTGGTGGTAGTATATATTACGCTGAT TCTGTAAAAGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT GTTTTGGGTCTGACTCCTAAGCCGTTCGACTACTGGGG CCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA	서열번호 8

#9113	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYYMSWVR QAPGKGLEWVSSISPGGSSIYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGASLFDYWGQGLTVTS S	서열번호 9
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC CGGATTACCTTTAGCAGTTATTATATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATC GATCTCTCCTGGTGGTAGTAGTATATATTACGCTGATT CTGTAAAAGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGGGG CGTCTCTGTTTCGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGT CACCGTGAGCTCA	서열번호 10
#9123	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSDYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISYGGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGMCTRRQCYDYDYG MDVWGQGLTVTVSS	서열번호 11
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC CGGATTACCTTTAGCGATTATGCTATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAG CGATCTCTTATGGTGGTGGTAATATATATTACGCTGAT TCTGTAAAAGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTT GGTGGTATGTGTACTAGGCGTCAGTGTTATTATGATTA TGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACC GTGAGCTCA	서열번호 12

[86] [표2]

항 채#	서열	서열번호
#9101	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQ LPGTAPKLLIYADSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGL RSEDEADYYCGSWDYSLNAYVFGGGTKLTVL	서열번호 13
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGA CCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTC TTCATCCAATATTGGCAATAATTATGTCTCCTGGTACC AGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTA TGCTGATAGTAAGCGGCCAAGCGGGGTCCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCGCTGGC CATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTAT TACTGTGGTTCTTGGGATTATAGCCTGAATGCTTATGT CTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	서열번호 14
#9102	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNPVYWYQQ LPGTAPKLLIYANNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDSSLGYVFGGGTKLTVL	서열번호 15
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGA CCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTC TTCATCTAATATTGGCAATAATCCTGTCTACTGGTACC AGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTA TGCTAATAATCAGCGGCCAAGCGGGGTCCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGC CATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTAT TACTGTGCTGCTTGGGATTCTAGCCTGAGTGGTTATGT CTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	서열번호 16

#9104	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGNNAVNWYQQ LPGTAPKLLIYYDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCGAWDYSLSAYVFGGGTKLTVL	서열번호 17
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGA CCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTACTGGCTC TTCATCTAATATTGGCAATAATGCTGTCAACTGGTACC AGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTA TTATGATAGTCATCGGCCAAGCGGGGTCCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGC CATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTAT TACTGTGGTGCTTGGGATTATAGCCTGAGTGCTTATGT CTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	서열번호 18
#9108	QSVLTQPPSASGTPGQRTLSTGSSSNIGSNNTVYWYQQ LPGTAPKLLIYANSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCGSWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	서열번호 19
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGA CCCCCGGGCAGAGGGTCACCTCTCTTGTACTGGCTCT TCATCTAATATTGGCAGTAATACTGTCTACTGGTACCA GCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTAT GCTAATAGTCAGCGGCCAAGCGGGGTCCCTGACCGAT TCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCC ATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATT ACTGTGGTTCTTGGGATTATAGCCTGAGTGGTTATGTC TTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	서열번호 20
#9113	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNAVSWYQQ LPGTAPKLLIYSDNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCGTWDASLNAYVFGGGTKLTVL	서열번호 21
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGTGGGA CCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTC TTCATCTAATATTGGCAATAATGCTGTCTCCTGGTACC AGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTA TTCTGATAATAAGCGGCCAAGCGGGGTCCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGC CATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTAT TACTGTGGTACTTGGGATGCTAGCCTGAATGCTTATGT CTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	서열번호 22

#9123	QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNIGSNTVNWYQQL PGTAPKLLIYDNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCGTWDDSLSGYVFGGGKLTVL	서열번호 23
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGA CCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTC TTCATCTAATATTGGCAGTAATACTGTCAACTGGTACC AGCAGCTCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTA TGATAATAGTAAGCGGCCAAGCGGGGTCCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGC CATCAGTGGGCTCCGGTCCGAAGATGAGGCTGATTAT TACTGTGGTACTTGGGATGATAGCCTGAGTGGTTATG TCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	서열번호 24

[87]

[88] 이때, 발현벡터는 포유류 발현벡터(mammalian expression vector)를 사용하였다. 제작된 발현벡터를 CHO 또는 HEK293 세포주에 형질전환시켜 인간 ASM 단백질에 결합하거나, 인간 및 마우스의 ASM 단백질에 모두 결합하는 전장의 항체를 제조하였다.

[89]

[90] 실시예 2. 상보성 결정영역(complementarity determining region, CDR)의 결정

[91] 상기 제조된 scFv에서 상보성 결정영역을 통상적인 방법으로 확인하고, 그 결과, 중쇄 가변영역의 CDR 서열을 표 3에, 경쇄 가변영역의 CDR 서열을 표 4에 나타내었다.

[92] [표3]

항체#	CDR	서열	서열번호
#9101	CDR1	NYAMS	서열번호 25
	CDR2	GIYPNGGNKYYADSVKG	서열번호 26
	CDR3	NAYRFDY	서열번호 27
#9102	CDR1	GYYS	서열번호 28
	CDR2	LISPGSGSIYYADSVKG	서열번호 29
	CDR3	SWHHFDY	서열번호 30
#9104	CDR1	NYYS	서열번호 31
	CDR2	GIYYGSGNIYYADSVKG	서열번호 32
	CDR3	DTPGFDY	서열번호 33
#9108	CDR1	NYAMS	서열번호 34
	CDR2	AIYPGGGSIYYADSVKG	서열번호 35
	CDR3	DVLGLTPKPFDY	서열번호 36
#9113	CDR1	SYYS	서열번호 37
	CDR2	SISPGGSSIYYADSVKG	서열번호 38
	CDR3	GASLFDY	서열번호 39
#9123	CDR1	DYAMS	서열번호 40
	CDR2	AISYGGGNIYYADSVKG	서열번호 41
	CDR3	VGGMCTRRQCYYDYGMDV	서열번호 42

[93] [표4]

항체#	CDR	서열	서열번호
#9101	CDR1	SGSSSNIGNNYVS	서열번호 43
	CDR2	ADSKRPS	서열번호 44
	CDR3	GSWDYSLNAYV	서열번호 45
#9102	CDR1	SGSSSNIGNNPVY	서열번호 46
	CDR2	ANNQRPS	서열번호 47
	CDR3	AAWDSSLSGYV	서열번호 48
#9104	CDR1	TGSSSNIGNNAVN	서열번호 49
	CDR2	YDSHRPS	서열번호 50
	CDR3	GAWDYSLSAYV	서열번호 51
#9108	CDR1	TGSSSNIGSNTVY	서열번호 52
	CDR2	ANSQRPS	서열번호 53
	CDR3	GSWDYSLSGYV	서열번호 54
#9113	CDR1	SGSSSNIGNNAVS	서열번호 55
	CDR2	SDNKRPS	서열번호 56
	CDR3	GTWDASLNAYV	서열번호 57
#9123	CDR1	SGSSSNIGSNTVN	서열번호 58
	CDR2	DNSKRPS	서열번호 59
	CDR3	GTWDDSLSGYV	서열번호 60

[94]

[95] 실험예 1. ASM 단백질과의 결합 확인

[96] 상기에서 제조된 ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 ASM 단백질과의 결합을 ELISA 분석 방법으로 확인하였다.

[97] 먼저, 멀티-어레이 96-웰 플레이트(Thermo scientific)에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 제조한 인간 ASM 단백질(R&D systems)을 100 μl 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 방치하여 플레이트를 코팅하였다. 코팅된 플레이트에 5% BSA가 포함된 200 μl 의 PBS를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켜 전처리한 후, 0.05%의 트윈 20(Tween 20)이 포함된 PBS로 이를 3회 세척하였다. 여기에 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 또는 100 nM의 항-ASM 항체를 처리하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 플레이트를 0.05%의 트윈이 포함된 PBS로 3회 세척하고, 2차 항체로서 100 μl 의 염소-항-마우스 IgG-HRP(Jackson ImmunoResearch) 항체를 첨가하였다. 이를 다시 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, 0.05%의 트윈이 포함된 PBS로 3회

세척하였다. 여기에 100 μl 의 TMB 기질(tetramethylbenzidine)을 첨가하고, 상온에서 5분 동안 추가 반응시킨 후, 100 μl 의 2 N 황산용액으로 반응을 중단시키고, 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 측정된 흡광도를 도 2에, 흡광도 값으로부터 계산된 항체의 EC_{50} 값을 표 5에 나타내었다.

[98] [표5]

항체#	$\text{EC}_{50}(\text{nM})$
#9101	0.0815
#9102	0.0954
#9104	1.948
#9108	0.3269
#9123	0.7578

[99]

[100] 도 2에 나타난 바와 같이, 상기에서 제조된 5종류의 항체가 모두 농도 의존적으로 ASM 단백질에 결합하였다. 특히, 표 5에 나타난 바와 같이, #9101 항체가 가장 낮은 EC_{50} 값을 나타내어 ASM 단백질에 대한 결합력이 가장 높았다.

[101]

[102] 실험예 2. ASM 단백질과의 결합 친화성 확인

[103] 상기에서 제조된 ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 ASM 단백질과의 결합 친화성 및 상호작용 동역학을 Octet® QK384 시스템(Pall Life Sciences)을 사용하여 측정하였다.

[104] 먼저, AR2G 센서(ForteBio)에 20 mM의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보다이미드 히드로클로라이드(EDC) 및 40 mM의 N-히드록시술포숙신이미드(술포-NHS) 용액을 처리하여 카르복시기를 활성화시켰다. 한편, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 재조합 인간 ASM 단백질 또는 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 재조합 마우스 ASM 단백질은 10 mM의 소듐 아세테이트(pH 5.0)(ForteBio) 용액에 희석하여 준비하였다. 상기 ASM 단백질이 희석된 용액을 카르복시기가 활성화된 AR2G 센서에 가하여 재조합 인간 또는 마우스 ASM 단백질이 고정된 AR2G 센서를 획득하였다. 획득된 ASM 단백질이 고정된 센서에 1 M의 에탄올아민(ForteBio)을 첨가하여 미반응의 잔여 카르복시기를 불활성화시켰다. 여기에 0.4, 2 또는 10 nM 농도의 실시예 1에서 제조된 항체를 첨가하고 약 900초까지 반응물의 결합상을 관찰하였다. 이후, 1x 동역학 완충액(kinetics buffer)(ForteBio)을 첨가하고, 약 1,200초 동안 반응물의 분리상을 관찰하였다. Octet® 분석 소프트웨어(Pall Life Sciences)를 사용하여 각 항체에 대한 흡착율 상수(association constant: K_{on}), 분리율 상수(dissociation constant: K_{dis}) 및 평형분리상수(equilibrium dissociation constant: KD)를 결정하였다. 그 결과, 재조합 인간 ASM 단백질에 대한 분석 결과를 표 6에, 재조합 마우스 ASM

단백질에 대한 분석 결과를 표 7에 나타내었다.

[105] [표6]

항체#	KD(M)	Kon(1/Ms)	Kdis(1/s)	RMax	Full R ²
#9101	1.16E-09	6.26E+05	7.28E-04	0.4527	0.9861
#9102	2.52E-10	4.16E+05	1.05E-04	0.8652	0.997
#9104	2.09E-10	3.92E+05	8.18E-05	0.3324	0.9759
#9108	1.19E-10	2.49E+05	2.96E-05	0.45	0.999
#9113	5.64E-10	1.16E+06	6.56E-04	0.2868	0.9635

[106] [표7]

항체#	KD(M)	Kon(1/Ms)	Kdis(1/s)	RMax	Full R ²
#9101	4.25E-11	3.76E+06	1.59E-04	0.0185	0.5527
#9102	4.98E-10	4.89E+05	2.43E-04	0.4281	0.9944
#9104	6.38E-10	3.10E+05	1.98E-04	0.7027	0.9971
#9108	3.39E-09	4.59E+05	1.56E-03	0.3921	0.9865
#9113	<1.0E-12	1.00E+06	<1.0E-07	0	0

[107]

[108] 표 6에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조된 5종류의 항체가 10^{-10} 내지 10^{-9} M 수준의 결합력으로 인간 ASM 단백질과 결합하였다. 한편, 표 7에 나타난 바와 같이, 마우스 ASM 단백질에 대해서는 #9102, #9104 또는 #9108의 항체만 10^{-10} 내지 10^{-9} M 수준의 결합력을 보였다.

[109]

[110] **실험예 3. ASM 단백질의 항원 결정부위 확인**

[111] 본 발명에 따른 항체가 ASM 단백질에 결합하는 부위인, 항원 결정부위를 HDX-MS(hydrogen deuterium exchange mass spectrometry) 방법으로 확인하였다.

[112] 먼저, $1,000 \mu\text{g/ml}$ 의 ASM 단백질, $1,000 \mu\text{g/ml}$ 의 #9101 mIgG1, $1,250 \mu\text{g/ml}$ 의 #9102 mIgG2, $1,000 \mu\text{g/ml}$ 의 #9104 mIgG4, $1,000 \mu\text{g/ml}$ 의 #9108 mIgG1, $3,300 \mu\text{g/ml}$ 의 #9113 mIgG1 또는 $2,932 \mu\text{g/ml}$ 의 #9123 mIgG1 항체를 연속으로 2배수씩 희석하여 128배 희석액까지 준비하였다. 준비된 희석액을 $1 \mu\text{l}$ 씩 취하여 동량의 10 mg/ml 의 시나핀산 매트릭스(K200 MALDI kit, CovalX)와 혼합하고, 상기 혼합물의 $1 \mu\text{l}$ 를 SCOUT 384 MALDI 플레이트에 분주하고 상온에서 결정화시켰다. 이후, 상기 결정을 MALDI 질량분석기(mass spectrometer)를 사용하여 측정하였다. 한편, 비공유 상호작용 분석을 위한 크로스-링크(cross-link) 데이터를 위해 $1 \mu\text{l}$ 의 128배 희석액을 동량의 2 mg/ml 의 K200 안정화 용액(K200 stabilizer reagent, K200 MALDI kit, CovalX)과 혼합하고,

이를 3시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 1 μ l의 혼합액을 이용하여, 상기와 동일하게 MALDI 질량분석기를 사용하여 측정하고, 측정된 결과는 하이-매스 MALDI MS(high-mass MALDI MS) 모드로 분석하였다. 그 결과, ASM 단백질 내 중수소 삽입에서 현저한 차이를 갖는 것으로 확인된 부위의 아미노산 서열을 하기 표 8에, 인간 ASM 단백질 구조 모델에 각 항체의 결합 위치를 표시한 결과를 도 3에 나타내었다. 또한, ASM 단백질 중, 사포신(saposin) 도메인에 대한 각 항체의 중수소 치환율 히트맵을 도 4에 나타내었다.

[113] [표8]

#항체	펩타이드 영역	아미노산 서열
#9101	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
#9102	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
	218-228	SGLGPAGPFDM
#9104	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
#9108	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	135-155	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS
	259-269	VRKFLGPVPVY
#9113	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	101-123	VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH
	135-155	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS
	259-269	VRKFLGPVPVY
#9123	259-269	VRKFLGPVPVY

[114]

[115] 표 8 및 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 항체는 ASM 단백질의 N-말단으로부터 53 내지 72번째 아미노산 단편(서열번호 68: TAINLGLKKEPNVARVGSVA), 101 내지 123번째 아미노산 단편(서열번호 69: VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH), 135 내지 159번째 아미노산 단편(서열번호 70: PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF), 135 내지 155번째 아미노산 단편(서열번호 71: PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS), 218 내지 228번째 아미노산 단편(서열번호 72: SGLGPAGPFDM) 또는 259 내지 269번째 아미노산 단편(서열번호 73: VRKFLGPVPVY)에 결합하였다. 특히, 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 항체는 사포신 도메인 중 α -헬릭스 1 및 α -헬릭스 2 부위에 주로 결합하였다.

청구범위

- [청구항 1] ASM(acid sphingomyelinase) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 ASM 단백질의 N-말단으로부터 53 내지 72번째 아미노산 단편, 101 내지 123번째 아미노산 단편, 135 내지 159번째 아미노산 단편, 135 내지 155번째 아미노산 단편, 218 내지 228번째 아미노산 단편 및 259 내지 269번째 아미노산 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 68 내지 73으로 각각 기재된 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,
서열번호 61로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1(X_1YX_2MS),
서열번호 62로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR2($X_3IX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}YYADSVKG$), 및 서열번호 27, 30, 33, 36, 39 및 42로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및
서열번호 63으로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1($X_{11}GSSSNIGX_{12}NX_{13}VX_{14}$), 서열번호 64로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR2($X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RPS$), 및 서열번호 65로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR3($X_{19}X_{20}WDX_{21}SLX_{22}X_{23}YV$)을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 X_1 및 X_2 는 각각 아스파라긴(asparagine, Asn), 글리신(glycine, Gly), 세린(serine, Ser), 아스파르트산(aspartic acid, Asp), 알라닌(alanine, Ala) 및 티로신(tyrosine, Tyr)으로 구성된 군으로부터 선택,
상기 X_3 내지 X_{10} 은 각각 글리신, 류신(leucine, Leu), 알라닌, 세린, 티로신, 프롤린(proline, Pro), 아스파라긴, 리신(lysine, Lys) 및 이소류신(isoleucine, Ile)으로 구성된 군으로부터 선택,
상기 X_{11} 내지 X_{14} 는 각각 트레오닌(threonine, Thr), 세린, 아스파라긴, 알라닌, 프롤린 및 티로신으로 구성된 군으로부터 선택,
상기 X_{15} 내지 X_{18} 은 각각 티로신, 알라닌, 아스파르트산, 세린, 아스파라긴, 히스티딘(histidine, His), 글루타민(glutamine, Gln) 및 리신으로 구성된 군으로부터 선택, 및
상기 X_{19} 내지 X_{23} 은 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 티로신, 아스파르트산 및 아스파라긴으로 구성된 군으로부터 선택되는, 항체

- 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
 상기 X_1 은 아스파라긴, 글리신, 세린 또는 아스파르트산,
 상기 X_2 는 알라닌 또는 티로신,
 상기 X_3 는 글리신, 류신, 알라닌 또는 세린,
 상기 X_4 는 티로신 또는 세린,
 상기 X_5 는 프롤린 또는 티로신,
 상기 X_6 은 아스파라긴 또는 글리신,
 상기 X_7 및 X_8 은 각각 글리신 또는 세린,
 상기 X_9 는 아스파라긴 또는 세린,
 상기 X_{10} 은 리신 또는 이소류신,
 상기 X_{11} 은 트레오닌 또는 세린,
 상기 X_{12} 는 아스파라긴 또는 세린,
 상기 X_{13} 은 알라닌, 프롤린, 트레오닌 또는 티로신,
 상기 X_{14} 는 아스파라긴, 티로신 또는 세린,
 상기 X_{15} 는 티로신, 알라닌, 아스파르트산 또는 세린,
 상기 X_{16} 는 아스파르트산 또는 아스파라긴,
 상기 X_{17} 은 세린 또는 아스파라긴,
 상기 X_{18} 은 히스티딘, 글루타민 또는 리신,
 상기 X_{19} 는 글리신 또는 알라닌,
 상기 X_{20} 은 알라닌, 세린 또는 트레오닌,
 상기 X_{21} 은 티로신, 세린, 알라닌 또는 아스파르트산,
 상기 X_{22} 는 세린 또는 아스파라긴, 및
 상기 X_{23} 은 알라닌 또는 글리신인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,
 서열번호 25, 28, 31, 34, 37 및 40으로 기재된 아미노산 서열로 구성된
 군으로부터 선택되는 중쇄 CDR1,
 서열번호 26, 29, 32, 35, 38 및 41로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된
 군으로부터 선택되는 중쇄 CDR2, 및
 서열번호 27, 30, 33, 36, 39 및 42로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된
 군으로부터 선택되는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및
 서열번호 43, 46, 49, 52, 55 및 58로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된
 군으로부터 선택되는 경쇄 CDR1,
 서열번호 44, 47, 50, 53, 56 및 59로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성된
 군으로부터 선택되는 경쇄 CDR2, 및
 서열번호 45, 48, 51, 54, 57 및 60으로 각각 기재된 아미노산 서열로
 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을
 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,
 서열번호 25, 26 및 27로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역,
 서열번호 28, 29 및 30으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역,
 서열번호 31, 32 및 33으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역,
 서열번호 34, 35 및 36으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역,
 서열번호 37, 38 및 39로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및
 서열번호 40, 41 및 42로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역; 및
 서열번호 43, 44 및 45로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
 서열번호 46, 47 및 48로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
 서열번호 49, 50 및 51로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
 서열번호 52, 53 및 54로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
 서열번호 55, 56 및 57로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 및
 서열번호 58, 59 및 60으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,
 서열번호 25, 26 및 27로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 43, 44 및 45로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
 서열번호 28, 29 및 30으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 46, 47 및 48로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
 서열번호 31, 32 및 33으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 49, 50 및

51로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
 서열번호 34, 35 및 36으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 52, 53 및 54로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;
 서열번호 37, 38 및 39로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 55, 56 및 57로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 또는
 서열번호 40, 41 및 42로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 58, 59 및 60으로 각각 기재된 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 ASM 단백질은 포유동물 유래인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 ASM 단백질은 서열번호 66 또는 67로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드인, 항체 또는 이의 결합 단편.
- [청구항 12] 제1항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산.
- [청구항 13] 제12항의 핵산을 포함하는 발현벡터.
- [청구항 14] 제12항의 핵산 또는 제13항의 발현벡터를 포함하는 숙주세포.
- [청구항 15] 제14항의 숙주세포를 배양하여 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 단계를 포함하는 ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생산 방법.
- [청구항 16] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 ASM 단백질 검출용 조성물.
- [청구항 17] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 ASM 단백질 검출용 키트.
- [청구항 18] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 시료와 반응시키는 단계를 포함하는 ASM 단백질 검출 방법.