

【명세서】

【발명의 명칭】

CD66c에 특이적으로 결합하는 항체 및 그의 용도

5 【기술분야】

본 발명은 항-CD66c 항체 및 그의 암 치료 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 CD66c를 특이적으로 인식하는 항체를 이용하여 T-세포 활성화, 또는 체액성 면역 반응을 유도할 수 있으며, CD66c를 인식하고 결합하는 항체, 상기 항체 또는 항원결합단편을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 및 숙주세포 및 상기 항체 또는 항원결합단편의 CD66c 관련 질병, 예를 들면 고형암 경감, 예방, 치료 또는 진단 용도에 관한 것이다.

【배경기술】

CD66c는 CEACAM6(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) 또는 NCA(non-specific cross-reacting glycoprotein antigen)-90으로도 알려져 있으며, 폐암, 췌장암, 유방암, 직장암, 간암 등의 환자에서 혈액내의 CD66c의 양이 높게 나타나는 것으로 알려져 있다. 상기 CD66c는 세포 접착(cell adhesion)과 연관된 중요한 단백질로 호중성 백혈구(neutrophils)의 경우 사이토카인(cytokine)에 의해 활성화된 내피세포(endothelial cell)와의 접착에 관여하는 것으로 알려져 있다.

또한 정상세포의 경우 세포 접착이 이뤄지지 않을 경우 세포 자멸이 이뤄지는데 이런 작용을 아노이키스(anoikis)라 한다. 그러나 종양세포의 경우 이러한 아노이키스에 대해 저항력을 갖고 있으며 이로 인해 암발생과 암전이가 촉진된다. 상기 CD66c는 아노이키스를 억제한다는 보고가 있으며, CD66c의 발현을 조절함으로써 암세포의 악성 표현형(malignant phenotype)이 변한다는 보고도 있다.

또한 CD66c 유전자를 small interfering RNA를 이용해 silencing시켜 단백질의 발현을 억제했을 경우 아노이키스가 증가되어 in vivo상에서 암전이가 억제된다는 실험결과도 보고되고 있다. 결국 CD66c의 기능을 억제하는 것이 암전이를 억제하는데 중요한 작용을 할 수 있다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 일예는 CD66c에 결합하는 항체 및 이의 항원결합단편에 관한 것이다.

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

본 발명의 일예는, 상기 항체, 핵산분자, 벡터, 및/또는 숙주세포를 포함하는 CD66c 관련 질환의 탐지 또는 진단 방법, 또는 진단 키트에 관한 것이다.

- 10 본 발명의 일예는, 상기 항체, 핵산분자, 벡터, 및/또는 숙주세포를 포함하는 CD66c 관련 질환의 예방, 치료, 또는 경감용 조성물 또는 용도에 관한 것이다.

- 본 발명의 일예는, 상기 항체, 핵산분자, 벡터, 및/또는 숙주세포를 포함하는 조성물을 CD66c 관련 질환을 갖는 대상에게 투여하는 단계를
15 포함하는, CD66c 관련 질환의 예방, 치료, 또는 경감방법에 관한 것이다.

본 발명의 일예는, 상기 항체, 핵산분자, 벡터, 및/또는 숙주세포를 포함하는 암 및 암전이 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 또는 방법에 관한 것이다.

20 【기술적 해결방법】

본 발명은 CD66c를 인식하고 결합하는 항체, 상기 항체 또는 항원결합단편을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 및 숙주세포 및 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 CD66c 양성인 고형암의
경감, 예방, 치료 또는 진단 용도에 관한 것이다.

- 25 CD66c(Cluster of Differentiation 66c)는 CEACAM 6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) 또는 NCA(non-specific cross-reacting glycoprotein antigen)-90으로도 알려진 단백질로, 세포 접착(cell adhesion)과 연관된 중요한 단백질로 알려져 있으며 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산
30 서열(Genebank Protein No. AAH05008)로 표시될 수 있다.

일 예는 CD66c을 특이적으로 인지하는 항 CD66c 항체를 제공한다. 본

발명에 따른 항-CD66c 항체는, 체액성 및 세포-매개 면역 반응을 유도한다. 본 발명에 따른 항 CD66c 항체는 CD66c(Cluster of Differentiation 66c)의 에피토프(epitope)를 특이적으로 인식하여, CD66c 항원을 효과적으로 검출할 수 있다.

- 5 본 명세서에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 상기 항체는 비자연적으로 생성된 것, 예컨대, 재조합적 또는 합성적으로 생성된 것일 수 있다. 상기 항체는 동물 항체 (예컨대, 마우스 항체 등), 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 상기
- 10 항체는 단클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있다.

- 또한 본 명세서에서 항체는, 특별한 언급이 없는 한, 항원 결합능을 보유한 항체의 항원 결합 단편도 포함하는 것으로 이해될 수 있다. 본 명세서에서 "상보성 결정부위 (Complementarity-determining regions, CDR)"라 함은, 항체의 가변 부위 중에서 항원과의 결합 특이성을 부여하는
- 15 부위를 의미한다. 앞서 설명한 항체의 항원 결합 단편은 상기 상보성 결정부위를 하나 이상 포함하는 항체 단편일 수 있다.

본 발명의 일 예는 CD66c를 특이적으로 인식 또는 CD66c에 특이적으로 결합하는 항 CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

- 본 발명에 따른 항-CD66c는 CD66c를 특이적으로 인식 및/또는
- 20 결합하고 항체는 마우스 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체를 포함한다. 본 발명에서 키메라 항체는 가변 영역 서열들이 하나의 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 다른 종으로부터 유래된 항체들, 예를 들어, 가변 영역 서열들이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 인간 항체로부터 유래된 항체를 의미한다. 본 발명에서 인간화 항체란 인간에서
- 25 면역성이 적으면서 비인간 항체의 활성을 보유하는 항체를 의미한다. 이는, 예를 들어, 비인간 CDR 영역을 유지시키고, 항체의 나머지 부분을 인간 대응부(counterparts)로 치환함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 하기 문헌들이 참조된다: Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen
- 30 et al, Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994).

본 발명에서 항체 절편은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)를 포함하여 CD66c 에피토프를 선택적으로 인식할 수는 것이면 이에 제한이 없으나, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv 및 CDR로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 특히, 상기 scFv는 상기 중쇄 5 가변부위(VH) 및 경쇄 가변부위(VL)를 링커 폴리펩타이드로 연결하여 단쇄(single chain)로 만든 항체 절편이다.

본 발명에 따른 마우스 항체 또는 키메라 항체의 일예는 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역의 CDR를 결정하는 아미노산 10 서열 및 서열번호 4 내지 6의 아미노산 서열을 포함하는 VL영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 상기 마우스 항체 또는 키메라 항체의 일예에 따른 CDR 서열과 가변영역 서열을 하기 표 1에 정리한다.

15 구체적으로, 본 발명의 항체의 일예는 VH 영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열로서 서열번호 1(CDR1), 서열번호 2(CDR2) 및 서열번호 3(CDR3) 및/또는 VL 영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열인 서열번호 4(CDR1), 서열번호 5(CDR2) 및 서열번호 6(CDR3)의 아미노산 서열을 포함한다.

20 상기 마우스 항체 또는 키메라 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL영역을 포함하는 것일 수 있다.

본 발명에 따른 마우스 항체 또는 키메라 항체를 유효성분으로 포함하는 암 및 암전이에서 선택된 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 25 키트 또는 치료방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 마우스 항체 또는 키메라 항체, 예를 들면 기탁번호 KCLRF-BP-00230 의 하이브리도마로부터 생산된 항-CD66c 항체의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3를 포함하는 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 및 암전이에서 선택된 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 30 상기 하이브리도마 세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Research

Foundation, KCLRF)에 '8F5'로 2010년 2월 22일자로 기탁번호 KCLRF-BP-00230로 기탁된 것이며, KR 10-1214177 등록공보에 자세히 기재되어 있다.

상기 암은 CD66c 양성인 고행암일 수 있으며, 예를 들면, CD66c 양성인 폐암, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 또는 전립선암일 수 있으며, 바람직하게는 대장암, 위암 또는 간암일 수 있다. 상기 암 및 암전이의 예방, 억제, 또는 치료 용도는 예를 들면, 고행암 또는 고행암 세포의 크기를 감소시키거나 종양 퇴화를 유도 또는 촉진할 수 있다.

본 발명은 상기 마우스 항체 또는 키메라 항체를 이용하여 항-CD66c 항체 8F5의 아미노산 서열과 사람 항체 서열을 프레임 워크 서열에 기초하여 제조한다. 인간화 재조합 항체 후보 중에서 발현 정도와 aggregation 유무, 세포결합 정도를 기준으로 인간화 후보항체 중에서 발현이 정상적으로 이뤄지며, 단백질 자체의 불안정성으로 형성되는 aggregation 이 적으며, 또한 타겟 항원 양성의 세포에 결합하는 능력이 키메라 항체와 유사한 인간화 항체 후보를 선별한다. 구체적으로 세포결합 양상은 키메라 항체와 비슷한 수준으로서 항체 양성률 (% gated)과 형광 평균값(mean)을 곱하고 이를 키메라 항체와 상대 비교하여 $\pm 20\%$ 범위 내 포함되는 후보 항체를 선별한다(실시예 2). 따라서, 본 발명에서 선정된 항체군은 통상 인간화 항체 생성 시, 인간화 항체의 framework region 에 마우스 항체 CDR 부위 서열을 삽입하였을 때 원래 단백질 구조의 변경으로 항체 결합력이 급격히 저하된다는 결과를 고려하였을 때, 매우 우수한 인간화 항체를 선별하였다 할 수 있다.

바람직하게는, 키메라 항체 대비하여 세포결합력을 기준으로 높은 결합력을 나타내는 다섯 종류의 인간화 재조합 항체를 선택하고, 이들을 ELISA 방법으로 CD66c 항원 및 유사 CD66 항원들에 대한 결합력 분석을 실시한다.

또한, 본원 발명에 따른 인간화 항체는 키메라 항체에 비해 우수한 안정성을 나타내며, 예를 들면 ANS 반응성 변이%가 200% 미만으로 안정한 항체이며, 200% 미만은 변화가 매우 미미한 것으로 간주되고, 그 이상은 의미 있는 단백질 구조 변경이 이뤄져 ANS 반응성이 관찰된 것으로 해석될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 인간화 항체는 키메라 항체 대비 유사한

항원 결합력 및 세포 결합력을 가지며, 항체 단백질 자체의 물리적 안정성이 증가하였으며, 이러한 사실은 치료용 항체의 druggability 측면에서 매우 우수한 특징이라 할 수 있다.

ANS 시약에 대한 항체의 형광값 변이율은 저온 조건(예, 4℃)에서 측정된 형광값과, 고온 조건(예, 62℃)에서 측정된 형광값의 차(difference)를, 저온 조건에서 측정된 형광값으로 나눈 값을 의미한다.

[수학식]

형광값 변이율 = (고온 조건에서 측정된 형광값 - 저온 조건에서 측정된 형광값) / (저온 조건에서 측정된 형광값)

구체적인 항체 형광값 변이율을 얻는 방법으로서, 냉장조건(4℃) 및 62℃ 온도에서 각각 4시간 방치한 후에 ANS 시약 반응성을 형광 리더기로 분석하여 형광값으로 표시하고, 상기 수학식을 이용하여 형광값 변이율을 측정할 수 있다.

본 발명에 따른 인간화 항체의 일예는 서열번호 9 내지 13의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 또는 경쇄 가변영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 추가로 마우스 항체 또는 키메라 항체의 일예는 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열 및 서열번호 4 내지 6의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체일 수 있다.

구체적으로, 인간화 항체의 일예는 서열번호 1 또는 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역의 CDR1을 결정하는 아미노산 서열, 서열번호 2 또는 10의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역의 CDR2를 결정하는 아미노산 서열, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역의 CDR3을 결정하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역일 수 있다.

또한 인간화 항체의 일예는 서열번호 4, 11 또는 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역의 CDR1을 결정하는 아미노산 서열, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역의 CDR2를 결정하는 아미노산 서열, 서열번호 6 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역의

CDR3을 결정하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역일 수 있다.

인간화 항체의 일예는 서열번호 7 및 서열번호 14 내지 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역로 이루어지는 군에 선택된 중쇄 가변영역과, 서열번호 8 및 서열번호 19 내지 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역로 이루어지는 군에서 선택된 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으며, 단 서열번호 7 및 서열번호 8을 포함하는 항체는 제외된다.

상기 인간화 항체의 일예에 따른 CDR 서열과 가변영역 서열을 하기 표 1에 정리한다.

10 【표 1】

명명	서열	서열 번호
8F5-chimeric V _H -CDR1	ASGYSFTDYTMN	1
8F5-chimeric V _H -CDR2	LINPFHGGTVSNQRFKV	2
8F5-chimeric V _H -CDR3	VRGDPVRHYALAY	3
8F5-chimeric V _L -CDR1	GASENVYGTLN	4
8F5-chimeric V _L -CDR2	GATNLAD	5
8F5-chimeric V _L -CDR3	VATYYCQNVLSAPYT	6
8F5-chimeric V _H	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTMNWWVKQSHGKNLEWIGLINPFHGGTVSNQRFKVKATLTVDVSSNTAYMELLSLTSDDSAVYYCVRGDPVRHYALAYWGQGTSTVTVSS	7
8F5-chimeric V _L	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENVYGTLNWYQRKQKSPQLLIYGATNLA DGMSSRFSGSGRQYSLKISSLPDDVATYYCQNVLSAPYTFGGGTKLEII	8
8F5-human V _H -CDR1	ASGYSFTDYTMN	1
8F5-human V _H -CDR1	ASGYSFTDYTMH	9
8F5-human V _H -CDR2	INPFHGGTVSNQRFKV	2
8F5-human V _H -CDR2	LINPFGGSTSYAQKFKG	10
8F5-human V _H -CDR3	VRGDPVRHYALAY	3

8F5-human V _L -CDR1	GAENVYGTLN	4
8F5-human V _L -CDR1	GAENVYGT <u>L</u> A	11
8F5-human V _L -CDR1	<u>R</u> ASENVYGTLN	12
8F5-human V _L -CDR2	GATNLAD	5
8F5-human V _L -CDR3	VATYYCQNVLSAPYT	6
8F5-human V _L -CDR3	<u>F</u> ATYYCQNVLSAPYT	13
8F5-human-VH5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTDYTEMNWVRQAHGQNLWIGLINPFH GGTVSNQRFKVKATLTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYALAY WGQGTLVTVSS	14
8F5-human-VH6	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCKASGYSFTDYTEMNWVKQAPGQNLWIGLINPFH GGTVSNQRFKVKATLTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYALAY WGQGTLVTVSS	15
8F5-human-VH7	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCKASGYSFTDYTEMNWVRQAPGQNLWIGLINPFH GGTVSNQRFKVKATLTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYALAY WGQGTLVTVSS	16
8F5-human-VH10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYTEMNWVKQAPGQNLWIGLINPFH GGTVSNQRFKVKATMTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYALAY WGQGTLVTVSS	17
8F5-human-VH11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTDYTEMHWVKQAPGQNLWIGLINPFG GSTSYAQKFGRVTMTTRDTSTNTAYMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYALAY WGQGTLVTVSS	18
8F5-human-VK5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCGASENVYGT ^L AWYQRKPGKAPKLLIYGATNLA DGVPSRFSGSGSGREYTLTISSLQPDDFATYYCQNVLSAPYTFGGGTGLEIK	19
8F5-human-VK7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCGASENVYGT ^L NWYQRKPGKAPKLLIYGATNLA DGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQNVLSAPYTFGGGTGLEIK	20
8F5-human-VK8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASENVYGT ^L NWYQRKPGKAPKLLIYGATNLA DGMPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQNVLSAPYTFGGGTGLEIK	21

본 발명에 따른 인간화 항체의 일예의 프레임 워크 서열을 하기 표 3 및 4에 나타내며, 상기 항체는 중쇄 가변영역의 프레임 워크 1 내지 4, 및 경쇄 가변영역의 프레임 워크 1 내지 4으로 이루어지는 군에서 선택된 5 1종 이상의 프레임 워크를 포함하는 항체일 수 있다.

구체적으로, 중쇄 가변영역에서 프레임 워크 1의 아미노산 서열은 서열번호 23 내지 27을 포함할 수 있으며, 프레임 워크 2의 아미노산 서열은 서열번호 32 내지 37을 포함할 수 있으며, 프레임 워크 3의

아미노산 서열은 서열번호 43 내지 47을 포함할 수 있으며, 및 프레임 워크 4의 아미노산 서열은 서열번호 53 내지 57을 포함할 수 있다.

경쇄 가변영역에서 프레임 워크 1의 아미노산 서열은 서열번호 29 내지 31을 포함할 수 있으며, 프레임 워크 2의 아미노산 서열은 서열번호 5 39 내지 41을 포함할 수 있으며, 프레임 워크 3의 아미노산 서열은 서열번호 49 내지 51을 포함할 수 있으며, 및 프레임 워크 4의 아미노산 서열은 서열번호 59 내지 61을 포함할 수 있다. 상기 인간화 항체의 일예에 따른 프레임워크 서열을 하기 표에 나타낸다.

【표 2】

명명	FR1	서열 번호	FR2	서열 번호
V _H -Chimeric	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCK	22	WVKQSHGKNLEWIG	32
VH5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCK	23	WVRQAHGQ Q NLEWIG	33
VH6	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK	24	WVKQAPGQ Q NLEWIG	34
VH7	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK	25	WVRQA P GG Q NLEWIG	35
VH10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK	26	WVKQAPGQ Q NLEWIG	36
VH11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCK	27	WVKQAPGQ Q NLEWIG	37
V _L -Chimeric	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	28	WYQRKQ G KSPQLLIY	38
VK5	DIQMTQSPSTLSASVGD R VTITC	29	WYQRKPGKAP K LLIY	39
VK7	DIQMTQSPSTLSASVGD R VTITC	30	WYQRKPGKAP K LLIY	40
VK8	DIQMTQSPSTLSASVGD R VTITC	31	WYQRKPGKAP K LLIY	41

10

【표 3】

명명	FR3	서열 번호	FR4	서열 번호
V _H -Chimeric	NQRFKVKATLTVDVSSNTAYMELLSLT SDDSAVYYCVR	42	WGQGTSTVTVSS	52
VH5	NQRFKVKATLTVDVSTNTAYMEL SRLR SDDTAVYYCVR	43	WGQGT L TVTVSS	23
VH6	NQRFKVKATLTVDVSTNTAYMEL SRLR SDDTAVYYCVR	44	WGQGT L TVTVSS	24
VH7	NQRFKVKATLTVDVSTNTAYMEL SRLR SDDTAVYYCVR	45	WGQGT L TVTVSS	55

VH10	NQRFKVKATMTVDVSTNTAYMEL <u>SRLR</u> SDDTAVYYCVR	46	WGQGT <u>L</u> VTVSS	56
VH11	AQKF <u>KGRVT</u> MTTRDTSNTAYMEL <u>SRLR</u> SDDTAVYYCVR	47	WGQGT <u>L</u> VTVSS	57
V _L -Chimeric	GMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDD	48	FGGGTKLE <u>I</u>	58
VK5	G <u>V</u> PSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDD	49	FGGGTKLE <u>I</u> <u>K</u>	59
VK7	G <u>V</u> PSRFSGSGSGTEY <u>TLT</u> ISSL <u>Q</u> PDD	50	FGGGTKLE <u>I</u> <u>K</u>	60
VK8	G <u>M</u> PSRFSGSGSGTEY <u>TLT</u> ISSL <u>Q</u> PDD	51	FGGGTKLE <u>I</u> <u>K</u>	61

상기 인간화 항체는 서열번호 14 내지 18의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 VH영역 및 서열번호 19 내지 21의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 것일 수 있다.

- 5 구체적으로, 상기 인간화 항체의 예는, 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk8+VH6), 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk8+VH11), 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk5+VH7), 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk7+VH6), 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk7+VH10), 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk7+VH7), 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk7+VH5), 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk8+VH7)일 수 있다. 상기 항체의 구체적인 조합 및 아미노산 서열은 하기 표 6에 나타낸다. 상기 항체의 바람직한 일예는, 열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL영역을 포함하는 항체(Vk8+VH6),

서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk8+VH11), 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk5+VH7), 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk7+VH6), 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VH영역 및 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 VL영역을 포함하는 항체(Vk7+VH10)일 수 있다.

10

상기 인간화 항체는 마우스 항체나 키메라 항체와 달리 인체 투여 시, 면역원성의 원인을 대폭 줄이는 차별성 외에도 안정성 측면에서 키메라 8F5 항체보다 10배 이상의 높은 안정성을 보였다. 구체적으로는, 높은 온도, 예를 들면 온도 62℃에서 ANS 결합에 의한 형광값 변화율이 200% 미만으로 안정성이 높다.

구체적인 가혹 조건에서 항체 물성의 변이로 인해 키메라 8F5 항체는 1.406 %의 ANS 반응성 변화를 보인 반면, 인간화 항체는 114%, 133% 정도의 상대적으로 미미한 변화를 보여 상당히 단백질 측면에서 안정화되었음을 알 수 있다.

상기 키메라 8F5 및 인간화 항체는 T 세포의 활성화를 증가시키며, 이는 T 세포 활성화인자에 의한 활성화 증대 및 서로 다른 사람의 동종 수지상세포와 T 세포 혼합으로 인한 T 세포 활성 조건에서도 활성 증대를 보이는 경우를 들 수 있다. 이러한 T 세포 활성화 유도는 암세포와의 공동 배양 시 암세포의 사멸을 유도하였으며, 다양한 암세포와 공동 배양 조건에서 T 세포 활성화 유도하는 경우를 들 수 있다.

본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편은, 종양 퇴화 (tumor regression) 활성 및 종양 세포주에 대해 직접적인 억제 효과를 갖는 것이다. 본 명세서에서 종양의 퇴화는 종양 크기의 감소 및/또는 종양 세포의 성장 저해, 중단 또는 감소 등을 유도 또는 촉진하는 것을 포함한다. 종양의 크기 감소는 예를 들면, 본 발명의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물을 처리하기 전을 100%를 기준으로, 상기 항체 또는 이의 단편을

포함하는 조성물을 투여한 경우에 얻어진 종양의 크기가 97%이하, 95%이하, 90%이하, 85%이하, 80%이하, 75% 이하의 크기를 갖는 경우 등을 들 수 있다.

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

용어, "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다(CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에
10 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다. 한편, 본 명세서에 있어서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.

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

CD66C 항체 또는 항체 절편은 다양한 표지기(labeling agent), 독성 물질 또는 항종양제와 결합할 수 있다. 당해 기술 분야에 있어서 주지
20 방법에 의해 본 발명의 항체는 상기 표지기, 독소, 또는 항종양제와 결합될 수 있는 것은 당업자에게 분명하다. 이러한 결합은 항체 또는 항원의 발현 후, 부착부위에 화학적으로 수행하는 것도 가능하고, 혹은 DNA 레벨로 본 발명의 항체 또는 항원 내에 결합 산물을 조작해 넣어도 괜찮다. 이어서 본 명세서에 있어서 이하로 기재하는 적절한 숙주계에 있어서 DNA를
25 발현시키고 그리고 발현시킨 단백질을 회수해, 필요에 따라 재생시킨다. 결합은 당해 기술 수준에 있어서 알려진 링커를 통해 달성해도 괜찮다. 특히 이 기술과 함께 산성 조건 혹은 환원 조건 하에서 또는 특정 프로테아제에 대한 노출시에 독소 또는 항종양제를 방출하는, 다양한 링커를 이용할 수 있다. 특정 양태에 있어서는 표지기, 독소, 또는
30 항종양제를 다양한 길이의 스페이서 암에 의해 결합시키고 잠재적인 입체 장애를 감소시키는 것이 바람직한 경우도 있다.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 생산하는데 이용될 수 있는, 본
30 발명의 1 이상의 핵산 분자를 포함한 유전자이식 비인간 동물에도 관한다. 염소, 소, 말, 래트, 마우스, 토끼, 햄스터 또는 기타 포유동물의 조직,

또는 우유, 혈액 혹은 소변 등의 체액에 있어서 항체를 생산해, 이들에서 회수하는 것도 가능하다.

또한, 본 발명은 CD66C를 선택적으로 인지하는 물질을 생산하는 방법과, 항체를 생산하는 생산주를 제공한다. CD66C의 항원결정부위에 대한 항체 또는 항체 절편은 CD66C 단백질, CD66C의 항원결정부위, CD66C의 항원결정부위를 포함하는 CD66C 단백질 일부, 또는 CD66C의 항원결정부위를 발현하는 세포를 항원으로 이용하여 통상의 방법으로 제조가능 하다. 일례로, CD66C 항체 제조방법은, (a) CD66C 단백질, CD66C의 항원결정부위, CD66C의 항원결정부위를 포함하는 CD66C 단백질 일부, 또는 CD66C의 항원결정부위를 발현하는 세포를 동물에 주입하여 면역화 시키는 단계, (b) CD66C에 특이적인 항체를 생산하는 비장세포를 수득하는 단계 및 (c) 상기 비장세포를 골수종세포와 융합시켜, CD66C에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선별하는 단계를 포함하는 CD66C 항체를 생산하는 생산주 제조방법으로 통하여 실시가능 하다. 상기 생산주는 생체외(in vitro)에서 배양하거나, 생체내 주입하여 항체를 분리할 수 있다. 일례로, 마우스의 복강내에 삽입하고 복수로부터 분리, 정제한다. 단클론 항체의 분리 및 정제는 배양 상층액 또는 복수를 이온교환 크로마토그래피(DEAE 또는 DE52 등), 항 면역글로불린 칼럼 또는 프로테인 A 컬럼 등의 친화성 크로마토그래피를 이용하여 실시할 수가 있다.

본 발명에 따른 항체가 결합하는 항원결정부위는 고형암 특이적인 발현을 나타낸다. 따라서, 항-CD66C 항체는 종양세포의 검출에 유용하게 사용할 수 있을 뿐만 아니라 독성물질을 포함시켜 종양세포만 특이적으로 세포살상(cytotoxicity)시킬 수 있다.

다른 예는 본 발명에 따른 항체의 CD66c을 포함하는 고형암의 검출을 위한 마커로서의 용도를 제공한다. 항원결정부위와 상호작용하는 물질을 포함하는 고형암의 암줄기세포 검출용 조성물을 제공한다. 상기 상호작용하는 물질은 CD66C에 위치하는 항원결정부위와 상호작용 가능한 모든 물질, 예컨대, 화학물질(small molecular chemical), 항체, 항체의 항원결합단편, 앵타머 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

다른 실시 형태에 있어서 본 발명은 본 발명의 항체, 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 숙주를 포함한 진단 조성물에 관한다.

본 명세서에 있어서 이용되는 조성물이라 함은 본 발명의 적어도 하나의 항체, 핵산 분자, 벡터 및/또는 숙주를 포함한 조성물을 정의하는 것이다.

본 발명 진단 조성물은 다양한 세포, 조직 또는 다른 적절한 시료에 있어서의, CD66C의 바람직하지 않은 발현 또는 과잉 발현의 검출로서, 시료를 본 발명의 항체와 접촉시키는 것 및 시료에 있어서 CD66C의 존재를 검출하는 것을 포함한 검출에 유용하다. 따라서, 본 발명 진단 조성물은 이하로 정의하는 발병 또는 질환상태를 평가하기 위해 이용해도 괜찮다. 특히 CD66C를 발현하는, 암 세포 등의 악성 세포를 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 유도체로 타겟팅해도 괜찮다. 본 발명의 항체가 결합한 세포는 그러므로 보체계 등의 면역계 기능에 의해 또는 세포 매개성 세포 독성에 의해 공격되고 따라서, CD66C의 바람직하지 않은 발현 또는 과잉 발현을 나타내는 세포의 수가 감소하거나 또는 이러한 세포가 근절된다.

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

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

종양세포 검사방법은 (a) CD66C 항체를 종양세포를 포함하는 시료에 반응시키고, (b) 상기 항체에 대하여 양성반응을 나타내는 시료를 종양으로 판단하는 것이다. 상기 시료는 림프액, 골수, 혈액 또는 혈구일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 종양세포는 바람직하기로는 유방암, 폐암, 대장암, 위암, 전립선암, 또는 간암 세포일 수 있다.

상기 CD66C 항체를 이용하여 종양세포를 검사하는 경우, 상기 CD66C 항체는 항원-항체 반응성을 확인할 수 있는 물질로 표지된 것일 수 있다. 사용가능한 상기 물질로는 방사성동위원소, 형광물질, 발광물질, 크로모젠(chromogen), 또는 기타 염색 물질 등이 있다.

또한 본 발명의 CD66C 항체는 고형암을 진단하기 위한 진단키트로 제공될 수 있다. 상기 진단키트는 CD66C 항체이외에, 항원-항체반응 검출수단을 포함할 수 있다. 상기 검출수단은 유세포측정, 면역조직화학염색, 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소

면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Floresence immunoassay: FIA) 및 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법을 실시하기 위한 통상의 물질 일 수 있다. 즉, 표지수단으로는 효소의 경우 HRP(horse radish peroxidase)가 있으며, 5 형광물질로는 FITC(Fluoresceinthiocarbamyl ethylenediamine)가, 발광물질로는 루미놀(luminol), 이소루미놀 및 루시게닌(lucigenin)이, 방사선 동위원소로는 ^{125}I , ^3H , ^{14}C 및 ^{131}I 가 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 표지수단에 의한 표지여부는 효소의 기질이나, 형광, 발광 또는 방사선을 측정하기 위한 도구를 이용하여 확인가능하다. 일례로 10 CD66C 항체는 ELISA 키트 또는 스트립 키트로 제조될 수 있다.

일 실시예에서 본 발명은 본 발명의 항체, 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 숙주에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시 형태에 의하면 본 발명의 항체, 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 숙주는 암 또는 암전이, 예를 들면 고형암을 치료 또는 저해하는데 15 이용하기 위한 것이다. 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 숙주의 유효량을 투여의 필요가 있는 대상으로 투여함으로써 암 또는 암전이, 예를 들면 고형암을 치료 또는 저해하기 위한 방법이다.

본 발명에 의한 "고형암" 용어는 낭포 또는 액체 영역을 통상은 함유하지 않는 조직의 비정상인 덩어리를 정의하는 것이다. 고형암은 20 양성(암이 아니다) 또는 악성(자주 당해 기술 분야에 있어서 암이라고 칭해진다)를 모두 포함한다. 본 발명에 따른 항체를 적용 가능한 고형암의 예는 육종, 신경교종, 암종양, 중피종, 임파종, 신장 종양, 폐종양, 유방 종양, 자궁 경부 종양, 난소 종양, 결장 직장 종양, 간장 종양, 전립선 종양, 췌장 종양 및 머리 경부 종양에서 선택되며, 바람직하게는 유방암, 25 폐암, 대장암, 위암, 전립선암, 또는 간암이다. 상기 유방암은 바람직하게는 삼중음성 유방암(Triple-negative breast cancers (TNBC))도 포함하며, 상기 삼중음성 유방암은 HER2, estrogen receptor (ER), 및 progesterone receptor (PR)을 포함하는 3가지 유방암 진단 마커에 의해서도 모두 음성으로 검출되는 유방암으로서 검출이 매우 어려운 30 문제점이 있다.

상기 고형암의 치료 효과는 암세포 (특히, 암줄기세포) 또는 이를

포함하는 암조직의 성장 억제 (양적 감소), 사멸 (apoptosis) 효과뿐 아니라, 이동(migration), 침습(invasion), 전이(metastasis) 등을 억제하여 이로 인한 암의 악화를 억제하는 효과를 포함한다.

본 발명에 따른 항체는 PD-1 또는 PD-L1의 결합 고리를 막는 억제제와 병용 처리하여 효과를 극대화 하고자, 실시예 7과 같이 암세포와 면역세포 공동배양 시 T 세포 활성화를 유도하여 사이토카인을 분비시키며, 암세포 및 면역세포 표면의 PD-L1 단백질 수준을 증가시켰다. 이는 PD-1 또는 PD-L1 결합 억제제와 본 발명의 항체와 병용 처리 시 보다 높은 항암 효과를 얻을 것으로 기대할 수 있다. 면역체크포인트 억제제로서 PD-1 및 PD-L1에 대한 항체치료제가 승인이 되어 임상에 적용되고 있다. 상기 조성물을 PD-1 또는 PD-L1 결합 억제제를 추가로 포함할 수 있다.

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

본 발명에 따른 항체 혹은 항체 절편의 투여는 허용된 모든 약물 투여방법에 의해 시행될 수 있다. 구체적으로 예를 들면, CD66C 항체를 유효성분으로 포함하는 치료제를 종양세포를 갖는 대상, 즉 인간 또는 동물에 경구 또는 비경구, 바람직하기로는 비경구로 투여하는 것이다. 상기 치료제는 약리학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있으며, 이의 투여량은 환자의 상태에 따라 적절히 조절하는 것이 바람직하나, 일례로 1일 3 mg 내지 6,000 mg 일 수 있다. 치료제의 제형은 액제, 산제, 유제, 현탁제 또는 주사제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명은 CD66c 항원결정부위에 대한 항체, 항체 절편(F(ab')₂, Fab 및 Fv 등), 및 리간드 이뤄진 군에서 선택된 항체를 이용하여 급성 백혈병, 모세포 위기가 발생한 만성 백혈병 및 림프모구 림프종을 치료하는 방법을 제공한다.

항체 혹은 항체 절편은 바람직하기로는 단클론 또는 다클론 항체로 이루어진 군에서 선택되며, 바람직하기로는 사람과 동물에서 기원한 것이다. 상기 CD66C 항체 또는 항체 절편은 상기에서 언급한 독소물질이 더욱

포함된 것일 수 있다. 독소물질은 항체에 융합, 접합, 결합, 또는 링크될 수 있으며, 이는 공지된 기술로 실시가능 하다.

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

10 다른 예는 CD66C, 구체적으로 CD66C의 비촉매적 영역에 위치하는 항원결정부위 항원결정부위에 후보 화합물을 접촉시키는 단계, 및 상기 항원결정부위에 결합하는 후보 화합물을 선택하여 고형암 치료제 후보물질로 결정하는 단계를 포함하는, 고형암 치료제 또는 저해제의 스크리닝 방법을 제공한다. 다른 예에서, 상기와 같이 스크리닝된 고형암
15 치료제를 유효성분으로 포함하는 고형암의 치료용 약학 조성물을 제공한다.

상기 후보 화합물은 인공적으로 합성되거나 천연의 각종 화합물, 폴리펩타이드, 올리고펩타이드, 펩타이드 구조체 또는 단백질 구조체 (예컨대, 항체, 항체의 항원 결합 단편, 펩티마디, 나노마디, 등), 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, shRNA(short
20 hairpin RNA), siRNA(small interference RNA), 압타머, 천연물 추출물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

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

방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【발명의 효과】

본 발명은 CD66c 를 인식하고 결합하는 항체, 상기 항체 또는
5 항원결합단편을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 및
숙주세포 및 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 CD66c 관련 질병, 예를
들면 고형암 경감, 예방, 치료 또는 진단 용도에 관한 것이다.

【도면의 간단한 설명】

10 도 1은 마우스 8F5 항체로부터 항체 유전자를 클로닝하여 키메릭
재조합 항체로 발현시켜, CD66c 항원 양성인 A549 세포 표면에 결합함을
보여주는 결과이다.

도 2a 내지 도 2c는 96종의 인간화 재조합 항체 중에서 1차 선정된
8종의 인간화 재조합 항체에 대한 HPLC 분석 결과로서, 각 항체 별로 왼쪽
15 OD 220 nm, 오른쪽 OD 280 nm 분석한 결과를 나타내고 있다. 항체의
aggregation 및 절편 등의 항체 유래 불순물 포함 여부를 나타내는
결과이다.

도 3a 내지 도 3e는 96종의 인간화 재조합 항체 중에서 1차 선정된
8종의 인간화 재조합 항체에 대한 CD66c 항원 양성 세포 표면 결합을
20 확인한 결과로서, 키메릭 항체와 비교하여 유사한 정도의 세포 표면 결합을
나타낸다.

도 4a 및 도 4b는 96종의 인간화 재조합 항체 중에서 선정된 5종의
인간화 재조합 항체에 대한 CD66c 항원에 대한 결합력을 ELISA 통해 확인한
결과로서, 도 4a는 CECACAM6 (CD66c) 항원에 대한 결과이며, 도 4b는
25 CEACAM1 (CD66a) 항원에 대한 결과이다.

도 5a 및 도 5b는 96종의 인간화 재조합 항체 중에서 선정된 5종의
인간화 재조합 항체에 대한 가혹 온도 조건에서의 항체 안정성을 확인한
결과이다.

도 6a 내지 도 6d는 CHO에서 발현시킨 인간화 재조합 항체의 CD66c
30 항원 양성 세포 A549의 세포표면 결합을 나타낸 결과이다.

도 7a는 대장암 세포 LS174T 세포와 사람 CD8+ T 세포를 공동 배양한

조건에서 키메릭 8F5 항체를 처리하였을 때, CD8+ T 세포가 활성화되어 IFN γ 와 perforin을 분비시키는 결과이고, 도 7b는 도 7a와 같은 조건에서 대장암 세포 LS174T가 키메릭 8F5 항체 처리 시 세포사멸이 증가함을 나타내는 결과이다.

- 5 도 8은 CD8+ T 세포와 다양한 암세포와의 공동 배양 조건에서 키메릭 8F5 항체를 처리할 경우에만 선택적으로 IFN γ 분비가 증가함을 나타내는 결과로서, 위암 세포인 NCI-N87 세포, SNU-719 세포와 간암 세포인 PLC/PRF/5 세포에 대한 결과이다.

- 10 도 9a 내지 도 9c는 CD66c 항원이 T 세포 활성을 억제할 수 있음을 보이는 결과로서, 도 9a는 T 세포 활성화에 대한 인자로서 IFN γ 의 세포질 내 양을 Flow cytometer로 측정한 결과이며, 도 9b와 도 9c는 ELISPOT으로 IFN γ 의 분비를 측정한 결과이다. 도 9b와 도 9c의 경우, 서로 다른 공급원의 CD66c 항원을 사용했을 경우에도 마찬가지로 T 세포 활성을 억제함을 동일하게 보이는 결과이다.

- 15 도 10a 및 도 10b는 부착된 OKT3 항체에 의한 T 세포 활성화 조건에서 키메릭 8F5 항체가 활성화를 증가시켜 CD69, CD107, CD25 등의 여러 가지 활성화 세포 표면 마커 단백질을 증가시킴을 나타내는 결과이다.

- 20 도 11a 및 도 11b는 서로 다른 사람의 수지상 세포와 PBMC를 섞어주는 MLR (Mixed Lymphocytes Reaction) 조건에서 키메릭 8F5 항체가 CD4, CD8 양성세포를 활성화 시킴을 나타내는 결과이다.

- 25 도 12a는 실제 위암 환자의 복수로부터 위암 세포를 분리하여 사람 PBMC와 공동 배양 시 키메릭 8F5 항체를 처리하면 IFN γ 분비가 증가함을 ELISPOT으로 측정한 결과이다. 도 12b와 도 12c는 CD66c 항원 양성인 위암 환자 3명에 대한 추가적인 ELISPOT 실험을 수행하여 유사한 결과를 나타냄을 보이고 있다.

도 13a 및 도 13b는 사람 PBMC와 A549 비소세포폐암 세포와 공동 배양하고 키메릭 8F5 항체를 처리하면, PBMC와 A549 암세포 각각의 표면에서 PD-L1 항원의 발현이 증가함을 보이는 결과이다.

- 30 도 14a 및 도 14b는 인간화 재조합 항체들도 키메릭 8F5 항체와 유사한 패턴으로 A549 암세포와 사람 PBMC 공동 배양 시, IFN γ 분비를 증가시킴으로써, 유사한 정도의 항체 기능이 있음을 나타내는 결과이다.

도 15a 및 도 15b는 인간화 8F5 항체가 LS-174-T 대장암 세포 또는 A549 비소세포폐암 세포와 사람 PBMC 공동 배양 시, 암세포 사멸 기능이 있음을 나타내는 결과이다.

도 16a 내지 도 16g는 키메라 8F5 항체를 이용한 NOD/SCID 마우스 동물모델을 이용한 In Vivo 항암 효능을 나타내는 결과이며, 도 16c는 인간화 8F5 항체를 이용한 NOD/SCID 마우스 동물모델을 이용한 In Vivo 항암 효능을 나타내는 결과이다. 도 16d 와 도 16e 내지 도 16g는 NSG 면역결핍마우스에서 서로 다른 사람 PBMC 를 효능세포로 하여 인간화 8F5 항체의 In Vivo 항암 효능을 나타내는 결과이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하에서는 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다.

<실시예 1> 항-CD66c 키메라 항체의 제조

1.1. 항-CD66c 항체 유전자 서열 클로닝

8F5 항체 유전자는 Mouse Ig-Primer Set (Millipore, Cat. #: 69831)을 이용하여 클로닝하였다. 8F5 하이브리도마로부터 분리한 RNA로부터 Mouse Ig-Primer Set을 이용하여 PCR을 수행하고, 이를 pGem-T 벡터(Promega, Cat. #: A3600)에 삽입한 후, 시퀀싱을 통해 DNA 염기서열을 확인하였으며, IMGT site (www.imgt.org)를 통해 마우스 항체 유전자를 확인하였다. 분석된 8F5 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역 서열은 다음과 같다.

【표 4】

명명	서열	서열 번호
8F5-chimeric V _H -CDR1	ASGYSFTDVTMN	1
8F5-chimeric V _H -CDR2	LINPFHGGTVSNQRFKV	2
8F5-chimeric V _H -CDR3	VRGDPVRHYALAY	3
8F5-chimeric V _L -CDR1	GASENVYGTLN	4
8F5-chimeric V _L -CDR2	GATNLAD	5

8F5-chimeric V _L -CDR3	VATYYCQNVLSAPYT	6
8F5-chimeric V _H	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTEMNWVKQSHGKNLEWIGLINPF HGGTVSNQRFKVKATLTVDVSSNTAYMELLSLTSDDSAVYYCVRGDPVRHYIAL AYWGQGTSTVSS	7
8F5-chimeric V _L	DIQNTQSPASLSASVGETVTITCGASENVYGTNLNYYQRKQKSPQLLIYGATNL ADGMSSRFSGSGSGRQYSLKISLHPDDVATYYCQNVLSAPYTFGGGKLEII	8
8F5-chimeric V _H	Gaggtccagctgcaacagctctggacctgaactggtgaagcctggagcttcaatg aagatatcctgcaaggcttctggttactcattcactgactacacatgaactgg gtgaagcagagccatggaaagaaccttgagtggattggacttattaatcctttc catggtggtactgtctccaaccagaggttcaaggtcaaggccacattaaactgta gacaagtcacccaacacagcctacatggagctcctcagctctgacatctgacgac tctgcggtctattactgtgtgaagaggtgaccgggtccgccattactatgctttg gcctactggggtcagggaaacctcagtcaccgtctcctca	62
8F5-chimeric V _L	gacatccagatgactcagctctccagcttcaactgtctgcatctgtgggagaaact gtcaccatcacatgtggagcaagtgagaatgtttacggtactttaattggtat cagcggaaacagggaataatctcctcagctcctgatctatggtgcaaccaacttg gcagatggcatgtcatcgaggttcagtggcagtggttctggtagacagtattct c	63

1-2. 키메라 항체 제조

상기 제작된 항-CD66c 마우스 항체 8F5의 아미노산 서열을 기초로, 항-CD66c 키메라 항체를 제작하였다.

5

1-2-1. 플라스미드 제작

항-CD66c 키메라 항체의 발현을 위하여, 중쇄 발현용 플라스미드와 경쇄 발현용 플라스미드를 각각 제작하였다. 경쇄 발현용 플라스미드는 pOptiVEC (Invitrogen 사) 벡터를 사용하였고, 중쇄 발현용 플라스미드는 pcDNA3.3 (Invitrogen 사) 벡터를 사용하였다.

10

추가적인 아미노산 삽입 없이 항체 각각의 가변영역 코딩 cDNA와 불변영역 코딩 cDNA를 연속적인 아미노산 서열로서 발현되도록 하기 위하여, 상기 클로닝한 가변영역의 코딩 염기서열과 알려진 human IgG1 불변영역(중쇄) 및 kappa 불변영역(경쇄) 코딩 염기서열을 연결한 유전자 조각 각각을 합성(Bioneer 사)하였다. 이와 같이 합성한 중쇄 및 경쇄

15

발현 유전자는 제한 효소 Xho I 과 Sal I으로 자른 후, 경쇄 유전자 조각은 pOptiVec 벡터에, 중쇄 유전자 조각은 pcDNA3.3 벡터에 각각 ligation 하여 완전한 항체 발현용 플라스미드를 제작하였다 (pcDNA3.3-anti-CD66c 중쇄 발현 플라스미드 및 pOptiVEC-anti-CD66c 경쇄 발현 플라스미드).

5

1-2-2. 형질전환

상기 제작된 pcDNA3.3-anti-CD66c 중쇄 발현 플라스미드와 pOptiVEC-anti-CD66c 경쇄 발현 플라스미드를 CHO세포 유래인 DG44세포(Invitrogen)에 transfection시켜 형질전환 과정을 수행하였다.

- 10 우선 transfection 3일전에 부유상태의 DG44 세포를 5%FBS가 포함된 MEMa 배지에 적응시킴으로서 부착상태 세포로 변환시켜 형질전환 효율을 높일 수 있게 적응시켰다. 형질전환은 ViaFect transfection reagent(Promega, Cat.#: E4981)를 사용하여 6well plate에서 수행하였다. 형질전환 하루 전날 1×10^5 cells/well의 농도로 계대 배양하여
- 15 부착상태로 적응된 DG44세포를 준비하였고, 형질전환에 사용된 DNA의 양은 pcDNA3.3-anti-CD66c 중쇄 발현 플라스미드와 pOptiVEC-anti-CD66c 경쇄 발현 플라스미드 각각 2 μ g, 1.5 μ g 씩 1.5 : 1 비율의 조합으로 사용하였다. 형질전환은 48시간 동안 수행하였다. 형질전환된 세포군을 분석하기 위하여 유세포분석기(flow cytometer)을 이용하였다. 도 1과 같이 키메릭
- 20 항체의 발현은 A549 비소세포페암 세포주로 확인하였다. 도 1은 마우스 8F5 항체로부터 항체 유전자를 클로닝하여 키메릭 재조합 항체로 발현시켜, CD66c 항원 양성인 A549 세포 표면에 결합함을 보여주는 결과이다.

<실시예 2> 인간화 항-CD66c 단클론 항체의 제작

25 2.1 In silico Humanization에 의한 재조합 항체 서열 선정

- 마우스 CD66c 항체. 8F5 (중쇄 아미노산 서열:7 중쇄 코딩 DNA: SEQ ID NO: 62; 경쇄 아미노산 서열: SEQ ID NO: 8; 경쇄 코딩 DNA: SEQ ID NO: 63) 의 중쇄, 경쇄 각각의 CDR 부위 서열(CDRH1: ASGYSFTDYTMN) SEQ ID NO:1, CDRH2: SEQ ID NO: 2 (LINPFHGGTVSNQRFKV); CDRH3: SEQ ID NO: 3 (VRGDPVRHYALAY); CDRL1: SEQ ID NO: 4 (GASENVYGT); CDRL2: SEQ ID NO: 5 (GATNLAD); CDRL3: SEQ ID NO: 6 (VATYYCQNVLSAPYT)을 최대한 유사하게
- 30

- 유지하여 항원 결합력이 동등하거나 우수하면, 사람 항체 유전자를 코딩하고 있는 germline의 서열을 기반으로 Framework region 에 대한 부위 서열을 재조합한 인간화 항체 서열을 in silico 방법으로 선별하였다. 마우스 CD66c 항체 8F5 의 중쇄, 경쇄 각각 서열과 가장 유사성이 높아
- 5 인간화 재조합 항체 서열의 backbone으로 사용한 사람 항체 Germline 유전자는 아래 표 5와 같다. 상기 마우스 CD66c 항체의 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역의 아미노산 서열과 핵산 서열, 그리고 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역의 CDR 서열을 하기 표 6에 나타낸다.

【표 5】

Human Ab Germline	
Heavy chain	Light chain
IGHV1-69-2*01	IGKV1-27*01
IGHV1-2*02	IGKV1-5*01 Homo sapiens
IGHV1-46*01	IGKV1-39*01 Homo sapiens

10

- 위의 사람 항체 Germline 유전자 서열을 이용하여 선정된 인간화 8F5 항체 서열로서, 중쇄 가변영역 12중, 경쇄 가변영역 8종을 선별하였으며, 해당 서열은 아래 표 3과 같으며, 상기 선별된 인간화 항체의 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역의 아미노산 서열, CDR 서열 및 프레임워크
- 15 서열을 하기 표 6 내지 표 8에 나타내고 chimeric 항체와 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역의 아미노산 서열을 표 1에 나타냈다. 마우스 항체와 인간화 항체는 중쇄 CDR3와 경쇄 CDR2 서열이 동일한 것이 바람직하다. 하기 표 6에서 진하게 밑줄을 그어 표시한 부분은 CDR 항체서열이다. 표 7에서 진하게 밑줄을 그어 표시한 부분은 변경된
- 20 아미노산을 나타낸다.

【표 6】

항체 번호	조합	명명	아미노산 서열
3043	Vk8+ VH6	VH6	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTDYTM</u> NVVKAPGQNLEWIGL <u>INPFHGGTVSNQRF</u> <u>KVKATLTVDVSTNTAYMELSR</u> LRSDTAVYYCVR <u>GDPVRHYALAY</u> WGQGTLLTVSS
		Vk8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR <u>ASENVYGT</u> LNWYQRPKGAPKLLIY <u>GATNLAD</u> GMPSRFSG SGSGTEYTLTISSLQPDDE <u>FATYYCQNVLSAPY</u> TFGGGTKLEIK

3058	Vk8+	VH11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>TMH</u> HWVKQAPGQNLIEWIGL <u>INPFHGGSTSYAQKF</u> <u>KGRVT</u> MTTRDTSTNTAYMELSRLSDDTAVYYCVRG <u>DPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
	VH11	Vk8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>RASENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLIY <u>GATNLAD</u> GMPSRFSG SGSGTEYTLTISSLQPD <u>DFATYYCQNVLSAPYTF</u> GGGKLEIK
2938	Vk5+	VH7	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>TMN</u> WVRQAPGQGLEWIGL <u>INPFHGGTVSNQRF</u> <u>KVKATL</u> TVDVSTNTAYMELSRLSDDTAVYYCVRG <u>DPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
	VH7	Vk5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>GASENVYGT</u> <u>LA</u> WYQRKPGKAPKLLIY <u>GATNLAD</u> GVPSRFSG SGSGREYTLTISSLQPD <u>DFATYYCQNVLSAPYTF</u> GGGKLEIK
3007	Vk7+	VH6	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>TMN</u> WVKQAPGQNLIEWIGL <u>INPFHGGTVSNQRF</u> <u>KVKATL</u> TVDVSTNTAYMELSRLSDDTAVYYCVRG <u>DPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
	VH6	Vk7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>GASENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLIY <u>GATNLAD</u> GVPSRFSG SGSGTEYTLTISSLQPD <u>DFATYYCQNVLSAPYTF</u> GGGKLEIK
3019	Vk7+	VH10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC <u>ASGYSFTD</u> <u>TMN</u> WVKQAPGQNLIEWIGL <u>INPFHGGTVSNQRF</u> <u>KVKATMT</u> VDVSTNTAYMELSRLSDDTAVYYCVRG <u>DPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
	VH10	Vk7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>GASENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLIY <u>GATNLAD</u> GVPSRFSG SGSGTEYTLTISSLQPD <u>DFATYYCQNVLSAPYTF</u> GGGKLEIK
3010	Vk7+	VH7	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>TMN</u> WVRQAPGQGLEWIGL <u>INPFHGGTVSNQRF</u> <u>KVKATL</u> TVDVSTNTAYMELSRLSDDTAVYYCVRG <u>DPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
	VH7	Vk7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>GASENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLIY <u>GATNLAD</u> GVPSRFSG SGSGTEYTLTISSLQPD <u>DFATYYCQNVLSAPYTF</u> GGGKLEIK
3004	Vk7+	VH5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>TMN</u> WVRQAHGQNLIEWIGL <u>INPFHGGTVSNQRF</u> <u>KVKATL</u> TVDVSTNTAYMELSRLSDDTAVYYCVRG <u>DPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
	VH5	Vk7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>GASENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLIY <u>GATNLAD</u> GVPSRFSG SGSGTEYTLTISSLQPD <u>DFATYYCQNVLSAPYTF</u> GGGKLEIK
3046	Vk8+	VH7	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>TMN</u> WVRQAPGQGLEWIGL <u>INPFHGGTVSNQRF</u> <u>KVKATL</u> TVDVSTNTAYMELSRLSDDTAVYYCVRG <u>DPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
	VH7	Vk8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>RASENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLIY <u>GATNLAD</u> GMPSRFSG SGSGTEYTLTISSLQPD <u>DFATYYCQNVLSAPYTF</u> GGGKLEIK

【표 7】

명명	CDR1	서열 번호	CDR2	서열 번호	CDR3	서열 번호
V _H - Chimeric	ASGYSFTD <u>TMN</u>	1	LINPFHGGTVSNQRFKV	2	GDPVRHYYALAY	3
VH5, 6, 7, 10	ASGYSFTD <u>TMN</u>	1	LINPFHGGTVSNQRFKV	2	GDPVRHYYALAY	3
VH11	ASGYSFTD <u>TMH</u>	9	LINPF <u>GGSTSYAQKF</u> <u>KG</u>	10	GDPVRHYYALAY	3

V _L -Chimeric	GASENVYGT <u>L</u> N	4	GATNLAD	5	VATYYCQNVLSAPYT	6
VK5	GASENVYGT <u>L</u> <u>A</u>	11	GATNLAD	5	<u>F</u> ATYYCQNVLSAPYT	13
VK7	GASENVYGT <u>L</u> N	4	GATNLAD	5	<u>F</u> ATYYCQNVLSAPYT	13
VK8	<u>R</u> ASENVYGT <u>L</u> N	12	GATNLAD	5	<u>F</u> ATYYCQNVLSAPYT	13

【표 8】

명명	FR1	서열 번호	FR2	서열 번호	FR3	서열 번호	FR4	서열 번호
V _H - Chimeric	EVQLQQSGPELVKP GASMKISCK	22	WVKQSHGKNL EWIG	32	NQRFKVKATLTVDV SSNTAYMELLSLTS DDSAVYYCVR	42	WGQGTSVTVS S	52
VH5	<u>Q</u> VQLVQSG <u>A</u> E <u>V</u> KKP GASV <u>K</u> ISCK	23	<u>W</u> V <u>R</u> Q <u>A</u> H <u>G</u> QNL EWIG	33	NQRFKVKATLTVDV S <u>T</u> NAYMEL <u>SRLRS</u> DD <u>T</u> AVYYCVR	43	WGQGT <u>L</u> TVTS S	53
VH6	<u>Q</u> VQLVQSG <u>A</u> E <u>V</u> KKP GASMKISCK	24	<u>W</u> VKQ <u>A</u> PGQNL EWIG	34	NQRFKVKATLTVDV S <u>T</u> NAYMEL <u>SRLRS</u> DD <u>T</u> AVYYCVR	44	WGQGT <u>L</u> TVTS S	54
VH7	<u>Q</u> VQLVQSG <u>A</u> E <u>V</u> KKP GASMKISCK	25	<u>W</u> V <u>R</u> Q <u>A</u> PG <u>Q</u> GL EWIG	35	NQRFKVKATLTVDV S <u>T</u> NAYMEL <u>SRLRS</u> DD <u>T</u> AVYYCVR	45	WGQGT <u>L</u> TVTS S	55
VH10	<u>Q</u> VQLVQSG <u>A</u> E <u>V</u> KKP GASV <u>K</u> VSCK	26	<u>W</u> VKQ <u>A</u> PGQNL EWIG	36	NQRFKVKAT <u>M</u> TVDV S <u>T</u> NAYMEL <u>SRLRS</u> DD <u>T</u> AVYYCVR	46	WGQGT <u>L</u> TVTS S	56
VH11	<u>Q</u> VQLVQSG <u>A</u> E <u>V</u> KKP GASV <u>K</u> ISCK	27	<u>W</u> VKQ <u>A</u> PGQNL EWIG	<u>37</u>	<u>A</u> QKFKGRVT <u>M</u> TRDT S <u>T</u> NAYMEL <u>SRLRS</u> DD <u>T</u> AVYYCVR	47	WGQGT <u>L</u> TVTS S	57
V _L - Chimeric	DIQMTQSPASLSAS VGETVTITC	28	WYQRKQGKSP QLLIY	38	GMSSRFSGSGSGRQ YSLKISSLPDD	48	FGGGTKLEI <u>I</u>	58
VK5	DIQMTQSP <u>S</u> TLSAS VG <u>D</u> RVTITC	29	WYQRK <u>P</u> GK <u>A</u> P <u>K</u> LLIY	39	<u>G</u> VPSRFSGSGSGRQ YSLKISSLPDD	49	FGGGTKLEI <u>K</u>	59
VK7	DIQMTQSP <u>S</u> TLSAS VG <u>D</u> RVTITC	30	WYQRK <u>P</u> GK <u>A</u> P <u>K</u> LLIY	40	<u>G</u> VPSRFSGSGSG <u>T</u> E Y <u>T</u> L <u>T</u> ISS <u>L</u> QPD	50	FGGGTKLEI <u>K</u>	60
VK8	DIQMTQSP <u>S</u> TLSAS VG <u>D</u> RVTITC	31	WYQRK <u>P</u> GK <u>A</u> P <u>K</u> LLIY	41	<u>G</u> M <u>P</u> SRFSGSGSG <u>T</u> E Y <u>T</u> L <u>T</u> ISS <u>L</u> QPD	51	FGGGTKLEI <u>K</u>	61

2.2 인간화 재조합 항체의 발현 및 분석

선별된 항체 서열들은 각각 사람 IgG1 중쇄 불변영역과 kappa 경쇄 불변영역과 연결하여 사람 IgG1 형태로 293 세포에서 발현시켰다.

- 5 Transfection 한 후, 7일 뒤에 배양액은 KanCap A resin (Kaneca 사)을 이용하여 인간화 재조합 항체를 정제하였다.

정제한 항체는 OD280 nm 측정으로 정량하였으며, SDS-PAGE 를 수행하였다. 또한, Sepax Zenix-C SEC-300 size exclusion column (Sepax technologies 사)으로 HPLC 를 수행하여 280nm 와 220nm 로 분석함으로써,
10 항체의 순도 및 aggregation 여부를 분석하였다(도 2a 내지 도 2c)

2.3 인간화 재조합 항체의 세포 결합 및 항원 결합 분석

2-3-1 세포결합 분석

- 발현시킨 96종의 인간화 재조합 항체를 각각 동일 양 (1ug)을 CD66c
15 양성 세포인 A549 비소세포폐암 세포주가 담긴 시험관에 넣어 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고, FITC-conjugated goat anti-Huma IgG (DiNona Inc. Korea)를 넣어 4℃에서 15분간 배양하였다. 다시 PBS로 수세한 후 유세포분석기 (Stratedigm, S1000EXi)로 분석하여 그 결과를 아래에 기재하였다.

- 20 96종의 인간화 재조합 항체 후보 중에서 발현 정도와 aggregation 유무, 세포결합 정도를 기준으로 8종을 1차로 선정하였다(표 9 및 표 10, 도 3a 내지 도 3e). 하기 표 9 및 표 10은 1차 선정된 항 CD66c 인간화 항체 및 키메릭 8F5 의 분석 결과로서 표 10은 Flow cytometer 분석 결과를 나타낸다.

25 【표 9】

No.	#71	#86	#93	#43	#51	#45	#41	#74
Protein ID	3043	3058	2938	3007	3019	3010	3004	3046
H & L 조합	Vk8+VH6	Vk8+VH1 1	Vk5+VH7	Vk7+VH6	Vk7+VH1 0	Vk7+VH7	Vk7+VH5	Vk8+VH7
Well	F11	H2	H9	D7	E3	D9	D5	G2

OD 280nm	3.54	3.86	3.32	4.01	4.03	3.5	3.56	3.54
Volume (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Conc. (mg/ml)	2.52	2.71	2.36	2.85	2.86	2.49	2.53	2.52
Yield(mg)	0.66	0.71	0.61	0.74	0.74	0.65	0.66	0.66
extinction coefficient	102190	103680	102190	102190	102190	102190	102190	102190
MW(Da)	72750	72691	72616	72633	72521	72604	72669	7272

【표 10】

No.	Protein ID	H & L조합	% gated	Mean	% (%gated X mean)
Chimeric antibody	**	**	73	619	100.0
#71	3043	Vk8+VH6	69	686	104.8
#86	3058	Vk8+VH11	72	645	102.8
#93	2938	Vk5+VH7	71	611	96.0
#43	3007	Vk7+VH6	71	565	88.8
#51	3019	Vk7+VH10	70	561	86.9
#45	3010	Vk7+VH7	70	554	85.8
#41	3004	Vk7+VH5	71	541	85.0
#74	3046	Vk8+VH7	71	523	82.2

상기 선정된 8종의 항체는 발현 정도와 aggregation 유무, 세포결합 정도를 표 9에 나타냈으며, 구체적으로 1차 선정된 8종 항체에 대한 발현 정도와 분자량을 정리한 것이다. 또한, 표 10의 유세포 분석 결과를

살펴보면, 8종의 인간화 재조합 항체가 키메릭 항체 대비 $\pm 20\%$ 의 세포 결합력을 나타내어 키메릭 항체와 매우 유사한 세포 결합력을 나타냄을 확인하였다. 이로써 96종의 인간화 후보항체 중에서 발현이 정상적으로 이뤄지며, 단백질 자체의 불안정성으로 형성되는 aggregation 이 적으며, 또한 타겟 항원 양성의 세포에 결합하는 능력이 키메릭 항체와 유사한 인간화 항체 8종을 1차 선별하였다.

특히 세포주 결합력은 수치상으로는 차이가 있어 보이나, 도 3과 같이 실제 세포결합 양상은 키메릭 항체와 비슷한 수준으로서 항체 양성률 (% gated)과 형광 평균값(mean)을 곱하고 이를 키메릭 항체와 상대 비교하여 $\pm 20\%$ 범위 내 포함되는 8종을 선별한 것으로서, 통상 인간화 항체 생성 시, 인간화 항체의 framework region 에 마우스 항체 CDR 부위 서열을 삽입하였을 때 원래 단백질 구조의 변경으로 항체 결합력이 급격히 저하된다는 결과를 고려하였을 때, 매우 우수한 인간화 항체를 선별하였다 할 수 있다.

15

2-3-2 항원 결합 분석

상기와 같이 선정한 8종 인간화 재조합 항체 중에서, 키메릭 항체 대비하여 세포결합력을 기준으로 높은 결합력을 나타내는 다섯 종류의 인간화 재조합 항체를 선택하고, 이들을 ELISA 방법으로 CD66c 항원 및 유사 CD66 항원들에 대한 결합력 분석을 실시하였다.

20

【표 11】

Protein ID	HC & LC combination
3043	Vk8+VH6
3058	Vk8+VH11
2938	Vk5+VH7
3007	Vk7+VH6
3019	Vk7+VH10

항원 CD66c (CEACAM6; SinoBiological 사) 와 CEACAM1 항원 (SinoBiological 사)을 96 well plate에 웰 당 100 ng씩 코팅한 후, blocking하였다. 일차항체 양은 10ug/ml 부터 3 배씩 희석하여 37 °C

25

온도에서 1시간 결합시켰으며, 이차항체로서 goat anti-Human Ig -HRP 접합체(Jackson ImmunoResearch 사)를 1:10000으로 희석하여 37 °C 온도에서 30분간 결합시켰다. 각 단계 사이는 3번씩 수세과정을 거치고 TMB 반응하였다. 1N H₂SO₄ 용액으로 TMB 용액과 동량 (100ul) 처리하여 반응 중지한 후, 450nm 로 OD 값을 측정하였다.

상기 실험결과로서 96종의 인간화 재조합 항체 중에서 선정된 5종의 인간화 재조합 항체에 대한 CD66c 항원에 대한 결합력을 도 4a, 표12 및 도 4b, 표13 에 나타냈으며, 도 4a와 표12 는 CECACAM6 (CD66c) 항원에 대한 결과이며, 도 4b와 표 13 은 CECAM1 (CD66a) 항원에 대한 결과이다.

도 4a, 표 12 및 도 4b, 표 13의 항원에 대한 결합력 결과로부터, CECAM6에 대해서는 모든 항체들이 키메라 항체와 유사한 결합 양상을 보였으며, CECAM1에 대해서는 약한 결합과 결합하지 않은 그룹으로 양분되었다.

【표 12】

항체농도 (ng/ml)	chi 8F5	hu 3043	hu 3058	hu 2938	hu 3007	hu 3019
10000.00	3.17	2.73	2.87	3.43	3.37	3.13
3333.33	3.41	2.95	3.18	3.27	3.24	3.26
1111.11	3.30	2.74	3.19	3.16	3.23	3.34
370.37	3.30	2.92	2.80	3.08	3.16	3.23
123.46	2.83	2.29	2.22	2.56	2.90	3.04
41.15	2.02	1.73	1.38	1.72	2.17	2.45
13.72	1.15	1.37	1.06	1.15	1.64	1.77
4.57	0.80	0.91	0.74	0.65	1.02	1.32
1.52	0.53	0.70	0.53	0.48	0.79	0.95
0.51	0.41	0.49	0.38	0.36	0.64	0.80
0.17	0.40	0.41	0.37	0.30	0.53	0.68

【표 13】

항체농도 (ng/ml)	chi 8F5	hu 3043	hu 3058	hu 2938	hu 3007	hu 3019
10000.00	1.21	0.91	0.42	0.32	1.01	0.99
3333.33	1.24	1.22	0.31	0.27	1.15	1.07

1111.11	1.21	1.17	0.19	0.21	1.06	1.02
370.37	1.13	0.80	0.12	0.14	0.92	0.89
123.46	0.95	0.70	0.07	0.10	0.82	0.79
41.15	0.82	0.61	0.07	0.07	0.66	0.58
13.72	0.51	0.43	0.05	0.06	0.46	0.41
4.57	0.28	0.27	0.05	0.05	0.27	0.24
1.52	0.16	0.16	0.05	0.05	0.18	0.16
0.51	0.10	0.10	0.04	0.05	0.11	0.11
0.17	0.08	0.08	0.04	0.04	0.09	0.08

2.4 인간화 재조합 항체의 안정성 분석

상기 항원 및 세포결합 양상을 통해 선정한, 상기 실시예 3.3의 5종의 인간화 재조합 항체를 높은 온도 조건에 방치하여 항체의 안정성 여부를 분석하는 실험을 수행하였다.

안정성 측정은 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (이하 ANS; Sigma 사)를 이용한 결합 실험을 통해 확인하였다. ANS는 단백질 변성 시 노출되는 소수성 부위에 결합할 때와 그렇지 않을 때의 형광 파장이 달라 이러한 파장 변화를 측정함으로써 단백질의 변성 유무를 확인할 수 있는 화합물이다.

인간화 재조합 항체를 PBS (phosphate buffered saline)를 이용해 0.2 mg/ml 농도로 모두 맞춘 후, 가혹 조건으로서 50 °C 온도에서 4시간 동안 방치하였다. 0.2 mg/ml ANS 용액을, 측정하기 위한 항체 희석액 500 ul 당 20 ul 넣어 섞어준 후, 5 분 후에 형광리더기로 360 nm excitation, 460 nm emission 조건에서 분석하였다. 추가적으로 70°C 온도에서 30분간 더 방치한 조건에서도 ANS 시약 반응을 측정하였다.

상기 표 11에 나타낸 5종의 인간화 재조합 항체에 대한 가혹 온도 조건에서의 항체 안정성을 확인한 결과를 도 5a 및 도 5b에 나타냈다. 즉 가혹 조건으로서 50 °C 온도에서 4시간 동안 항체를 방치한 후 ANS 시약 반응성을 형광으로 측정하고, 추가로 70°C 온도에서 30분간 더 방치한 조건에서도 ANS 시약 반응을 측정한 결과를 나타낸다. 도 5a 의 실험결과에 나타낸 바와 같이, 50°C 온도에서 4시간 방치 조건에서는 5 종의 항체 대부분이 ANS 반응이 미미했었으나, 70°C 온도에서 추가 30분 방치

조건에서는 대부분 항체의 형광값이 크게 증가하였다. 그 중에서는 protein ID: 3058 재조합 항체가 가장 낮은 형광값 증가세를 보여, 5 종류의 재조합 인간화 항체 중에서 가장 온도 변화에 대해 안정적인 결과를 보였다.

- 5 또한, ANS 시약 반응성 변화율을 측정하고자, 냉장조건($4 \pm 2^\circ\text{C}$) 및 62°C 온도에서 각각 4시간 방치한 후에 ANS 시약 반응성을 상기 동일한 방법으로 형광 리더기로 분석하였다. 또한, ANS 시약에 대한 항체의 형광값 변화율은 저온 조건(예, 4°C)에서 측정한 형광값과, 고온 조건(예, 62°C)에서 측정한 형광값의 차(difference)를, 저온 조건에서 측정한 형광값으로 나눈 값을 의미한다.

[수학식]

형광값 변화율 = (고온 조건에서 측정한 형광값 - 저온 조건에서 측정한 형광값) / (저온 조건에서 측정한 형광값)

- 도 5b 와 같이 가혹 조건의 온도(50°C)에서 온도를 좀 더 올린 62°C 온도에서 4시간 방치 후, ANS 시약 반응성을 확인하였다. 5종이 재조합 인간화 항체와 키메릭 항체 모두 냉장 조건에서는 ANS 반응 값이 미미했으나, 온도를 상승함에 따라 ANS 형광값이 증가하였다. 그러나, 키메릭 8F5는 62°C 온도조건 보관실험에 의하여 ANS 시약 반응성이 1,406%까지 증가하였으며, 동시에 침전물이 발생하여 불안정한 결과를 보였다. 그러나, 인간화 항체 5종은 키메릭 항체보다 ANS 시약 반응성 변화가 현저히 낮게 측정되었으며, 침전물이 발생되지 않았다. 특히, Protein ID 3019 인간화 항체와 Protein ID 3058 인간화 항체는 각각 114%, 133%로 ANS 반응성의 변화가 측정되어 가장 안정한 항체로 평가되었다. ANS 시약 반응성이 커진다는 의미는 단백질 구조 상 안쪽에 배치되어 있던 소수성 아미노산의 노출이 증가한다는 의미이고, 이는 단백질 구조의 변성과 이로 인한 단백질 aggregate 즉, 침전물 생성의 원인이 된다. 본 발명에 따른 인간화 항체는 ANS 반응성 변화%가 200% 미만으로 안정한 항체이며, 200% 미만은 변화가 매우 미미한 것으로 간주되고, 그 이상은 의미 있는 단백질 구조 변경이 이뤄져 ANS 반응성이 관찰된 것으로 해석될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 인간화 항체는 키메릭 항체 대비 유사한 항원 결합력 및 세포 결합력을 가지며, 항체

단백질 자체의 물리적 안정성이 증가하였으며, 이러한 사실은 치료용 항체의 druggability 측면에서 매우 우수한 특징이라 할 수 있다.

2.5 인간화 재조합 항체의 CHO 세포 발현 및 분석

- 5 상기 실시예 2.3에서 선정된 5종의 인간화 재조합 항체를 실제 대부분의 치료용 항체를 발현시키기 위해 사용하는 CHO 세포에 발현시켜 분석하였다. 선정된 5종의 인간화 재조합 항체를 구성하기 위한 경쇄 및 중쇄 가변영역 DNA 서열을 코도 최적화 과정을 거친 후, 합성하여 사람 IgG1 불변영역 유전자와 overlay PCR 방법으로 연결하고 XhoI 과 EcoRI
- 10 유전자 조각으로 pcDNA3.4 벡터 (Life Technology 사)에 클로닝하였다. 상기 표 11은 CHO 세포 발현을 위해 선별된 인간화 항체의 경쇄 및 중쇄 조합을 나타낸다.

가변-불변영역 유전자 PCR을 위해 사용한 DNA primer 서열은 아래 표 14와 같다.

15 【표 14】

Primer name	용도	증폭대상	sequences	서열 번호
8F01	1 st frag forward	VH6, VH7, VH10, VH11	ATTACTCGAGGCCACCATGAA	64
8F02	1 st frag reverse	VH6, VH10, VH11	AGTTGAAGCGCTGCTCACAGT CA	65
8F03	2 nd frag forward	VH6, VH10, VH11	GTGAGCAGCGCTTCAACTAAG GG	66
3E04	2 nd frag reverse	VH6, VH7, VH10, VH11	AGTCGAATTCTCATTTCCCAG GAGAG	67
8F04	1 st frag reverse	VH7	AGTTGAAGCAGAAGACACTGT CA	68
8F05	2 nd frag forward	VH7	GTGTCTTCTGCTTCAACTAAG GG	69
3E01	1 st frag forward	Vk5, Vk7, Vk8	ATTACTCGAGGCCACCATGAA GTGGG	70
8F06	1 st frag reverse	Vk5, Vk7, Vk8	AACAGTCCGCTTGATCTCCAG CT	71
3EL02(2)	2 nd frag forward	Vk5, Vk7, Vk8	GAGATCAAGCGGACTGTTGCT	72

			GC	
3E08	2 nd frag reverse	Vk5, Vk7, Vk8	ATTAGAATTCTCAGCACTCGC CGCGG	73

- 5 종의 인간화 재조합 항체는 ExpiCHO (trademark) Expression System Kit (ThermoFisher 사; Cat. No:A29133)을 이용하여 Transient transfection 시켰으며, 발현시킨 항체는 도 6a 내지 도 6c와 같이 CD66c
- 5 양성 세포인 A549 비소세포페암 세포주에 결합시켜 Flow cytometer로 분석하였다. 5종류 인간화 재조합 항체는 모두 키메릭 항체와 유사한 결합력을 보였다. 상기 측정한 Flow cytometer 형광값을 CHO 배양액의 항체 발현 양으로 나누어, 상대적인 항체 발현양에 대한 세포표면 결합력 (relative cell binding)을 표시한 것을 도식화하면 도 6d와 같았다.
- 10 따라서, 인간화 재조합 항체는 CHO 세포에서도 적절히 발현되는 것을 확인하였다. 항체의 세포 표면 결합력을 구하고 이를 100% 로 하여 상대적인 변화를 도시한 것이 도 6d이다.

<실시예 3> 키메릭 8F5 항체에 의한 T 세포 활성화 및 암세포 사멸

- 15 3.1. CD8+ T 세포와 암세포 LS174T 공동 배양에 의한 T 세포 활성화 사이토카인 분석 및 암세포 viability 분석

- CD8+ T 세포는 사람 혈액세포로부터 MagniSort (registered trademark ®) Human CD8 T cell Enrichment Kit (Ebioscience, cat.#: 8804-6812-74) 을 이용하여 분리하였다. 6 well plate의 각 well 에 CD8+ T
- 20 세포는 1×10^6 개의 세포를, 대장암 암세포인 LS174T는 2×10^5 개의 세포를 동시에 넣고, well 당 2 ml의 volume이 되도록 10% FBS/RPMI 배지로 맞춰 주어 배양하였다. 이 때 키메릭 8F5 항체는 20 ug/ml 이 되도록 처리하였다. 배양 후 3일과 5일 차에 배양액을 각 100 ul 씩 취하여 배양액의 IFNgamma 와 perforin 분비 양을 Human CD8+ T-Cell Magnetic
- 25 Bead Panel (Millipore, Cat. #: HCD8MAG-15K) 키트를 이용하여 측정하였다. 배양 7일 차에 대장암세포 LS174T를 분리하여 7-AAD로 염색 후 flow cytometer로 세포의 viability를 측정하였다. 도 7a는 대장암 세포주인 LS174T 세포와 사람 CD8+ T 세포를 공동 배양한 조건에서 키메릭 8F5

항체를 처리하였을 때, CD8+ T 세포가 활성화되어 IFN γ 와 perforin을 분비시키는 결과이고, 도 7b는 도 7a와 같은 조건에서 대장암 세포 LS174T가 키메릭 8F5 항체 처리 시, 세포사멸이 증가함을 나타내는 결과이다.

- 5 도 7a의 그래프에 나타난 바와 같이, 대장암 세포 LS174T 세포와 사람 CD8+ T 세포를 공동 배양한 조건에서 키메릭 8F5 항체를 처리하였을 때, CD8+ T 세포가 활성화되어 IFN γ 와 perforin의 분비가 증가하였으며, LS174T 세포는 세포사멸이 증가하였다.

10 3.2. CD8+ T 세포와 다양한 암세포 공동 배양에 의한 T 세포 활성 분석

 실시에 3.1 과 같이 CD8+ T 세포를 분리하여, 다양한 암세포와 공동배양 조건에서 키메릭 8F5 항체에 의한 T 세포 활성을 ELISPOT 방법으로 확인하였다. Human IFN γ ELISPOT Ready-SET-Go! (Ebioscience; Cat. #: 15 88-7386-21) 키트를 이용하여 IFN γ 를 분석하였다. 각 well 당 100 μ l volume으로 CD8+ T 세포는 2.5×10^4 , 암세포는 5×10^3 세포를 함께 넣어 3일간 배양 후, 키트에서 제시하는 방법으로 IFN γ 분비하는 세포 spots를 검출하였다.

 도 8은 CD8+ T 세포와 다양한 암세포와의 공동 배양 조건에서 키메릭 20 8F5 항체를 처리할 경우에만 선택적으로 IFN γ 분비가 증가함을 나타내는 결과로서, 위암 세포인 NCI-N87 세포, SNU-719 세포와 간암 세포인 PLC/PRF/5 세포에 대한 결과이다.

 도 8에 나타난 바와 같이, CD8+ T 세포와 다양한 암세포와의 공동 25 배양 조건에서 키메릭 8F5 항체를 처리할 경우에만 선택적으로 IFN γ 분비가 증가함을 나타내었다.

<실시에 4> CD66c 항원에 의한 T 세포 활성 억제

 암세포와 CD8+ T 세포 공동 배양 시, 8F5 항체에 의한 T 세포 활성이 실제 8F5 항체의 항원인 CD66c 항원에 의한 것인지 확인하기 위하여, 사람 30 PBMC 를 분리하여 OKT3 항체에 의한 T 세포 활성이 CD66c 항원에 의하여 억제될 수 있는지 확인하였다.

구체적으로, T 세포의 세포 내 IFN γ (intracytosolic staining)를 염색하여 Flow cytometer로 확인하는 방법과 ELISPOT으로 IFN γ 를 분석하는 두 가지 방법으로 확인하였다. 항체 처리는 OKT3 일 경우 1 μ g/ml 로 하였으며, CD66c 항원은 10 μ g/ml로 처리하였다. T 세포 내 IFN γ 를 염색하기 위해 Brefeldin A Solution (1000X) (EBioscience, Cat.#: 00-4506-51)를 1 X 되게 희석하여 염색하기 3시간 전에 사전 처리하고, Anti-Human IFN γ PE (EBioscience, Cat.#: 12-7319-41)와 FITC Mouse Anti-Human TCR- α/β (BD Biosciences; Cat.#: 347773)로 염색하여 Flow cytometer로 분석하였다.

도 9a 내지 도 9c는 CD66c 항원이 T 세포 활성을 억제할 수 있음을 보이는 결과로서, 도 9a는 T 세포 활성화에 대한 인자로서 IFN γ 의 세포질 내 양을 Flow cytometer로 측정한 결과이며, 도 9b와 도 9c는 ELISPOT으로 IFN γ 의 분비를 측정한 결과이다. 도 9b와 도 9c의 경우, 서로 다른 공급원의 CD66c 항원을 사용했을 경우에도 마찬가지로 T 세포 활성을 억제함을 동일하게 보이는 결과이다.

도 9a와 같이, CD66c 항원을 동시 처리할 경우 IFN γ 양성 T 세포가 15.55%에서 8.87%로 감소함으로써, CD66 항원에 의해 T 세포의 활성이 억제되는 결과를 나타내었다.

실시에 3.2 와 같이 ELISPOT 방법으로 사람 PBMC의 IFN γ 생성 증가 또는 억제를 추가적으로 확인하였으며, CD66c 항원은 다이노나 내부적으로 제작 및 생산한 항원과 외부에서 구입한 항원 (Sino Biological Inc., Cat. #: 10823-H08H-50)를 10 μ g/ml를 투여하였다. 이 실험에서도 역시 CD66c 항원을 처리한 두 경우 모두 IFN γ 양성 spot 수를 현저히 떨어뜨리는 결과를 나타내었다(도 9b, 9c).

25

<실시에 5> 키메릭 8F5 항체에 의한 T 세포의 활성화 유도

5.1. T 세포 활성화의 증가

OKT3 항체에 의한 T 세포의 활성화를 키메릭 8F5 항체가 어떤 영향을 미치는 지 확인하기 위해, 0.3 mg/ml 농도로 OKT3 항체를 부착시킨 35-mm dish 조건에서 사람 PBMC를 2×10^6 세포를 넣고 3일간 배양하였다. 이 때 키메릭 8F5 항체는 20 μ g/ml 이 되도록 처리하였으며, 3일 후 CD4+ T

세포와 CD8⁺ T 세포를 Anti-Human CD69 PE (Ebioscience, Cat.#: 12-0699-41), Anti-Human CD107a (LAMP-1) PE (Ebioscience, Cat.#: 12-1079-41), Anti-Human CD25 APC (Ebioscience, Cat.#: 17-0259-41)로 염색하였다. Anti-CD4-APC 및 Anti-CD8-FITC는 다이노나에서 제조한 시약으로 염색하여

5 각 CD4 및 CD8 그룹을 flow cytometer 상에서 gating 하여 분석하였다. 도 10a 및 도 10b는 부착된 OKT3 항체에 의한 T 세포 활성화 조건에서 키메릭 8F5 항체가 활성화를 증가시켜 CD69, CD107, CD25 등의 여러 가지 활성화 세포 표면 마커 단백질을 증가시킴을 나타내는 결과이다.

도 10a의 결과에 나타난 바와 같이, CD4 및 CD8 양성세포에서 모두

10 키메릭 8F5 항체 투여 시, 활성화 표지 마커인 CD69 양성 비율이 증가하였으며, 도 10b의 결과와 같이 CD8 양성 세포들에서는 또 다른 활성화 마커인 CD107과 CD25 양성 비율이 증가하였다. 이러한 T 세포 활성화 조건에서 키메릭 8F5 항체가 T 세포 활성화를 증가시킨 결과는, 실시예 3에서 기술하고 있는 결과가 T 세포 자체의 활성화 증가에 의한

15 결과로서 반영되었음을 의미하며, 또한 실시예 4에서 기술하듯, CD66c 항원의 T 세포 활성 억제 현상을 항 CD66c 항체로서 되돌릴 수 있으며, 이로서 T 세포 활성을 유지 또는 강화하여 암세포 사멸로 초래할 수 있음을 나타낸다.

20 5.2. MLR 에서의 T 세포 활성화 증가

키메릭 8F5 항체 처리에 의한 T 세포 활성화를 추가로 확인하기 위해 MLR (Mixed Lymphocyte Reaction) 실험을 수행하였다. 먼저 사람 PBMC를 분리하여 배양 접시에 부착된 세포들만 IL-4 (5×10^3 unit/ml, JWCeagene)와 GM-CSF (5×10^3 unit/ml, JWCeagene)를 3 일 간격으로 두

25 번 처리하여 수지상세포(Dendritic cell)로 분화시켰다. 그런 후, 다른 사람의 PBMC와 함께 PBMC : DC 비율이 5:1 이 되도록 섞어서 5일간 배양하였다. PBMC 세포 수는 12 well plate 경우 well 당 1.4×10^6 세포를 사용하였다. 5일 후, 세포들은 분리하여 CD4-FITC/ CD107-PE/CD25-APC 또는 CD8-FITC/CD107-PE/CD25-APC 로 염색하여 flow cytometer 분석을 하였다.

30 도 11a 및 도 11b는 서로 다른 사람의 수지상 세포와 PBMC를 섞어주는 MLR (Mixed Lymphocytes Reaction) 조건에서 키메릭 8F5 항체가 CD4, CD8

양성세포를 활성화 시킴을 나타내는 결과이다.

도 11a 및 도 11b 과 같이 MLR 조건에서도 키메릭 8F5 항체 투여에 의해, CD4 및 CD8 양성 세포에서 CD25 또는 CD107의 양성 비율이 현저히 증가하였다.

- 5 결과적으로, 이는 OKT3 에 의한 T 세포 활성화 및 동종 면역 세포에 의한 T 세포 활성화 조건 모두에서 키메릭 8F5 항체가 T 세포 활성화 자체를 증가시킬 수 있다는 결과를 나타내며, 이로서 T 세포가 암세포를 사멸시키도록 키메릭 8F5 항체가 작용한다는 점을 추가적으로 알 수 있다.

10 <실시예 6> 키메릭 8F5 항체에 의한 위암 환자 PBMC 활성화

- 위암 환자와 PBMC 공동배양 시 키메릭 8F5 항체에 의한 PBMC 활성화를 평가하고자 하였다. 실험실에서 배양하고 있는 암세포가 아닌 실제 위암 환자의 복수로부터 암세포를 분리하여, 키메릭 8F5 항체 투여 시 면역세포 활성화 여부를 확인하였다. 위암 환자의 복수 샘플은
- 15 서울아산병원에서 획득하였으며, 복수 샘플로부터 CD66c 양성인 확인된 샘플의 위암세포와 동일 환자의 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 실시예 3.2와 같이 ELISPOT 시험을 수행하였다.

- 도 12a는 실제 위암 환자의 복수로부터 위암 세포를 분리하여 사람 PBMC와 공동 배양 시 키메릭 8F5 항체를 처리하면 IFNgamma 분비가
- 20 증가함을 ELISPOT으로 측정한 결과이다. 도 12b와 도 12c는 CD66c 항원 양성인 위암 환자 3명에 대한 추가적인 ELISPOT 실험을 수행하여 유사한 결과를 나타냄을 보이고 있다.

- 키메릭 8F5 항체를 투여한 경우, 양성 대조군으로 처리한 T 세포 활성화 유도 항체인 OKT 항체 투여한 수준과 유사하게 IFNgamma 양성
- 25 spot이 증가하였다(도 12a). 이는 키메릭 8F5 항체의 처리가 자가 면역세포의 활성화를 유도하였음을 나타내는 결과이다.

- 서로 다른 위암 환자의 복수로부터 CD66c 양성인 위암세포를 추가적으로 분리하여, 정상인의 혈액으로부터 분리한 PBMC 와 혼합하여 동일한 조건으로 실시예 3.2와 같이 ELISPOT 시험을 수행하였다. 도 12b의
- 30 결과와 같이, 정도의 차이는 있지만 키메릭 8F5 항체 처리 시, IFNgamma 양성이 증가하였다.

<실시예 7> 키메릭 8F5 항체에 의해 PD-L1 발현양 증가

암세포와 PBMC 공동배양 시 키메릭 8F5 항체에 의해 PD-L1 발현양 증가를 평가하고자 하였다. 암세포 LS-174-T (대장암 세포주), NCI-N87 (위암 세포주) A549 (비소세포폐암 세포주)와 PBMC 공동 배양 시, 키메릭 8F5 항체에 의한 면역체크포인트 관련 단백질의 변화를 확인하기 위해 PD-L1 의 세포 표면 변화를 관찰하였다. 6 well plate 상에서 각 well 당 암세포 : PBMC = 1 : 3의 비율로 (0.5×10^6 cells : 1.5×10^6 cells) 섞어서 24시간 동안 배양하였으며, 이때 항체는 20ug/ml로 처리하였다.

10 암세포 및 PBMC 세포 표면의 PD-L1은 Anti-Human CD274 (PD-L1, B7-H1) PE(Ebioscience, Cat. #: 12-5983-41) 로 염색하였으며, 암세포와 PBMC를 구분하기 위해 CD45-FITC (다이노나)를 동시 염색하였다.

도 13a 및 사람 PBMC와 A549 비소세포폐암 세포와 공동 배양하고 키메릭 8F5 항체를 처리하면, PBMC와 A549 암세포 각각의 표면에서 PD-L1

15 항원의 발현이 증가함을 보이는 결과이며, 도 13b는 A549, NCI-N87, LS-174-T 세포주의 PD-L1 항원 발현 증가를 표로 나타낸 결과이다.

도 13a 및 도 13b과 같이, 키메릭 8F5 항체 투여에 의해 암세포 및 PBMC 모두에서 PD-L1 세포 표면 수준이 증가하였음을 알 수 있다. 이는 키메릭 8F5 항체에 의해 면역세포들이 활성화되었음을 간접적으로 증명하는

20 것이며, 향후, PD-1/PD-L1 에 대한 억제제와 병용 치료가 가능함을 나타낸다.

<실시예 8> 인간화 8F5 항체에 의한 PBMC 활성화

암세포와 PBMC 공동배양 시 인간화 8F5 항체에 의한 PBMC 활성화를

25 평가하고자 하였다. 즉, 표 11에서와 같이 선정된 인간화 8F5 항체 중에서 5 종류를 선정하여, 실시예 3.2 와 같이 ELISPOT 시험을 수행하였다. 동시 배양한 암세포는 A549 비소세포암 세포주(lung adenocarcinoma 세포주)를 사용하였으며, 투여한 항체의 농도는 20 ug/ml이다. 3일 후, IFNgamma 양성 spot을 확인하였을 때, 도 14 와 같이 시험한 5종류 모두의 인간화 8F5

30 항체가 키메릭 8F5 항체와 같은 수준으로 IFNgamma 양성 spot을 증가시켰음을 알 수 있었으며, 일부는 키메릭 8F5 항체보다 더 많은 정도의

증가세를 보였다. 따라서, 기능적으로 인간화 8F5 항체들은 키메릭 8F5 항체와 매우 유사함을 확인할 수 있었다.

도 14a 및 도 14b는 인간화 재조합 항체들도 키메릭 8F5 항체와 유사한 패턴으로 A549 암세포와 사람 PBMC 공동 배양 시, IFN γ 분비를 증가시킴으로써, 유사한 정도의 항체 기능이 있음을 나타내는 결과이다.

<실시예 9> 인간화 8F5 항체에 의한 암세포의 사멸화

9-1: 암세포와 CD3+ T 세포의 공동배양

암세포와 CD3 양성 T 세포와 공동배양 시 인간화 8F5 항체에 의한 암세포의 사멸화를 평가하고자 하였다. 대장암 세포주(Colon cancer cell line)인 LS-174-T 세포와 사람의 CD3 양성 T 세포를 공동 배양하는 조건에서 항체 처리 시, 활성화된 T 세포에 의해 암세포가 사멸되는 지를 in vitro 상에서 확인하였다.

구체적으로, 96 웰 플레이트 조건에서 암세포: T 세포 (또는 PBMC)를 1 X 10⁴ cells: 1 X 10⁵ cells의 비율로 웰당 100 μ l의 부피로 공동 배양하였으며, 10 μ g/ml 의 각 항체를 처리하여 3 일 뒤에 암세포 사멸화 정도를 Ez-Cytox (대일바이오텍, EZ-1000) assay kit를 이용해 측정하였다. 항체는 인간화 8F5 항체 (protein ID : 3019 (표 11, E3), PD-1 (pembrolizumab 동일 서열 항체), PD-L1 (atezolizumab 동일 서열 항체), CEACAM6 (Bayer 사의 항 CEACAM6 항체와 동일 서열 항체)를 각각 처리하여 측정하였다. 도 15a 는 상기 사멸화 실험의 결과이며, 본 발명에 따른 인간화 8F5 항체가 가장 높은 암세포 사멸 효과를 나타내었다.

9-2: 암세포와 PBMC의 공동배양

암세포와 PBMC 공동배양 시 인간화 8F5 (protein ID : 3019) 항체에 의한 암세포의 사멸화를 평가하고자 하였다.

구체적으로, 상기 실시예 9-1과 실질적으로 동일한 방법으로 평가를 수행하되, 다만 대장암 세포주(Colon cancer cell line)인 LS-174-T 세포와 사람의 CD3 양성 T 세포를 공동 배양하는 조건을 대신하여, A549 (lung adenocarcinoma 세포주) 세포주와 서로 다른 두 사람의 PBMC(Donor 1, Donor 2)를 사용하여 상기 같은 조건의 실험을 수행하였다. 도 15b의

실험결과에서 나타난 바와 같이, 인간화 8F5 항체(protein ID : 3019; E3, IgG1)를 처리한 웰의 암세포가 두 종류의 PBMC 조건에서 모두 가장 높은 암세포 사멸효과를 나타내었다 (도 15b).

5 <실시예 10> 마우스 동물 모델을 이용한 항암 효능 평가

10-1: NOD/SCID 마우스 모델을 이용한 키메릭 8F5 항체의 항암 효능 평가

키메릭 8F5 항체의 In vivo 면역항암 효과를 확인하기 위해, 면역결핍 마우스인 NOD/SCID 마우스를 이용하였다. 종전의 선행 특허(대한민국: 10-1214177; 미국: 8404812)에서는 Nude 마우스를 이용하여 항암효과를 보였으나, Nude 마우스를 이용한 동물실험 세트에는 항암효과를 나타내는 면역세포가 사람 유래가 아닌 마우스 면역세포로 기능세포로 이용한 것으로서, 실제 사람에게서 후보 항체가 치료적 효능을 나타낼 수 있음을 입증하는 데 한계가 있다. 따라서, 실질적인 사람 면역세포에 의한 동물실험 내 암세포 사멸에 대한 항체의 항암 효과를 평가하기 위하여, 마우스 T세포를 비롯한 면역세포가 결핍되어 있는 NOD/SCID 마우스를 동물실험에 사용하였다.

NOD/SCID 마우스 면역세포에 의한 Asialo GM1 항체를 마우스에 암세포 및 사람 PBMC 투여 하루 전날 투여하여 마우스 내에 잔류하는 마우스 자연사(NK) 세포를 제거하였으며, 그 다음날 암세포와 PBMC를 마우스에 주사하였다. 대장암 세포인 LS-174-T 세포는 마우스 당 5×10^6 세포수를 피하 (Subcutaneous)에 주입하였으며, PBMC는 1×10^7 세포수를 복강 (intraperitoneal)에 주입하였다. 세포 주입 후, 4일 뒤에 10 mg/kg의 용량으로 항체를 정맥주사하였으며, 이후 피하 주입 암세포의 암 덩어리(tumor mass)의 크기를 관찰 및 측정하였다.

도 16a는 대장암 세포인 LS-174-T 세포를, 도 16b는 비소세포폐암 세포인 A549 세포를 이용한 NOD-SCID 마우스 이식모델과 키메릭 8F5 항체를 사용하였다.

도 16a는 키메릭 8F5 항체를 이용한 사람 PBMC를 주입한 인간화 조건의 마우스 동물모델을 이용한 In Vivo 항암 효능을 나타내는 결과이다. 서로 다른 사람의PBMC 를 투여하였을 때, 모두 같은 경향으로 키메릭 8F5

항체 투여군이 가장 높은 항암 효과(Tumor growth inhibition; TGI)를 보였으며, 첫 번째 실험 세트의 경우 40%의 항암효과를, 두 번째 실험 세트의 경우 46%의 항암효과를 보였다. 도 16a는 대장암 세포인 LS-174-T 세포를, 도 16b는 비소세포폐암 세포인 A549 세포를 이용한 이식모델을
5 사용하였다. 두 경우 모두에서 키메릭 8F5 항체 투여군이 가장 높은 항암효과를 보였다. PD-1 항체 (Nivolumab 항체 서열 동일 항체) 투여군은 항암효과는 없거나 매우 미미했는데, 이는 암세포 표면의 PD-L1 항원 발현 수준이 매우 약하여 반응하지 않은 것으로 판단된다.

결과적으로, 사람 면역세포와 키메릭 8F5 항체에 의해 생체 내
10 항암효과를 나타낼 수 있음을 대장암 및 폐암 동물모델에서 확인하였다.

10-2: NOD/SCID 마우스 LS-174-T 모델을 이용한 인간화 8F5 항체의 항암 효능 평가

실시에 10-1과 실질적으로 동일한 방법으로 동물모델을 이용한 항암
15 효능을 평가하였으나, 다만 대장암 세포인 LS-174-T 세포를 이용한 NOD-SCID 마우스 이식모델과 인간화 8F5 항체(protein ID: 3019, 표 11)를 사용하였으며, 실험결과를 도 16c에 나타냈다.

동일 NOD-SCID 마우스에 대장암 세포인 LS-174-T 세포주 이식
모델에서 인간화 8F5 항체(protein ID : 3019)를 투여한 실험
20 세트에서도 같은 유형의 항암효과를 확인하였다 (도 16c).

10-3: NSG 마우스 LS-174-T 모델을 이용한 인간화 8F5 항체의 항암 효능 평가

실시에 10-1과 10-2 에서 사용한 NOD/SCID 마우스보다 면역결핍
25 정도가 더 심한 NSG 마우스를 이용한 동물실험을 수행하였다. NSG 마우스는 NOD/SCID 마우스 에서 IL2 리셉터 감마 (IL2R γ) 유전자에 돌연변이를 유도하여 NOD/SCID 마우스에 잔류하는 NK 세포의 활성을 완전히 제거한 마우스로서, 이는 미량 잔류하는 마우스 면역세포에 의한 영향을 완전히 제거하고 오로지 사람 유래 면역세포에 의한 영향을 평가하기 위함이다.

30 대장암 세포인 LS-174-T 세포를 이용한 NSG 마우스 이식모델과 인간화 8F5 항체(protein ID : 3019, 표 11), Bayer 사의 CEACAM6 항체,

Merck 사의 CEACAM1 항체를 사용하였으며, 실험결과를 도 16d 및 16e에 나타냈다. 도 16d 와 도 16g는 NSG 면역결핍마우스에서 서로 다른 사람 PBMC 를 효능세포로 하여 인간화 8F5 항체의 In Vivo 항암 효능을 나타내는 결과이다.

- 5 NSG 마우스 LS-174-T 모델에서 투여한 항체들은, 인간화 8F5 항체(protein ID : 3019), Bayer 사의 CEACAM6 항체, Merck 사의 CEACAM1 항체로서 이들에 대한 항암 효과를 서로 비교하였다. 인간화 8F5 와 유사한 타겟에 대한 다른 항체들을 비교하였을 때, 인간화 8F5 항체가 가장 우수한 항암 효과를 나타내었다.
- 10 도 16d는 서로 다른 5명의 사람 PBMC을 효능 세포로 사용한 실험에 대한 평균값을 나타낸 실험결과로서, 인간화 8F5 항체(protein ID : 3019) 투여군이 비교군 대비 가장 높은 종양성장 억제 효과를 보였다. 도 16e 내지 도 16g는 실험에 서로 다른 사람(3명) PBMC 주입에 따른 각 항체의 항암 효과를 한 명의 PBMC 별로 그래프화 한 것으로, 인간화 8F5 항체
- 15 투여군(protein ID : 3019; P+E3)이 가장 높은 항암 효과를 보임을 세 명의 서로 다른 PBMC 투여군에서 확인하였으며, 나머지 2 명의 실험세트에서도 유사한 결과를 확인하였다.

(번 역 문)

원기탁에 의한 수탁증

수 신: 다이노나(주)
전북 익산시 금마면 동고도리 253-6번지
(우) 570-912

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: 8F5	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCLRF-BP-00230
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 I에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. [x] 과학적 성질 [x] 분류학상 위치	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I.에 표시된 미생물을 수탁받고 2010년 2월 22일 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명 칭 : 한국세포주은행 주 소 : 서울시 종로구 연건동 28 서울 대학교 암연구소 (우) 110-744	대표자 서명 2010년 2월 26일

위 번역문 원본과 상위없음



【청구의 범위】

【청구항 1】

다음의 상보성 결정부위 (complementarity determining region; CDRs)를 포함하는, 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- 5 서열번호 1 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
서열번호 2 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2,
서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3,
서열번호 4, 서열번호 11 또는 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
10 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
서열번호 6 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3이며,

- 단, 서열번호 1의 아미노산 서열, 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 3의 아미노산 서열, 서열번호 4의 아미노산 서열, 서열번호 5의
15 아미노산 서열 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 상보성 결정 부위를 포함하는 항체는 제외함.

【청구항 2】

- 제1항에 있어서, 상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 23, 24, 25, 26 또는 27의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크(V-FR1), 서열번호 33,
20 34, 35, 36 또는 37의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크(V-FR2), 서열번호 43, 44, 45, 46 또는 47의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크(V-FR3), 및 서열번호 53, 54, 55, 56 또는 57의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크(V-FR4)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 프레임 워크를 포함하는 것인 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합
25 단편.

【청구항 3】

- 제1항에 있어서, 상기 항체의 경쇄 가변영역은, 서열번호 29, 30 또는 31의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크(L-FR1), 서열번호 39, 40 또는 41의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크(L-FR2), 서열번호 49, 50,
30 또는 51의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크(L-FR3), 및 서열번호 59, 60 또는 61의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크(L-FR4)로 이루어지는

군에서 선택된 적어도 하나의 프레임 워크를 포함하는 것인 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 서열번호 14, 15, 16, 17 또는 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 19, 20, 또는 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 온도 62°C에서 ANS 결합에 의한 형광값 변화율이 200% 미만인 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 상기 항 CD40 항체의 scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂인, 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

15 【청구항 7】

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암 및 암전이에서 선택된 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 8】

20 제7항에 있어서, 상기 암은 CD66c 양성인 고형암인 약학 조성물.

【청구항 9】

제8항에 있어서, 상기 고형암은 CD66c 양성인 폐암, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 또는 전립선암인 약학 조성물.

【청구항 10】

25 제7항에 있어서, 상기 조성물을 PD-1 또는 PD-L1 결합 억제제를 추가로 포함하는 것인 약학 조성물.

【청구항 11】

서열번호 14, 15, 16, 17 또는 18의 아미노산 서열
서열번호 19, 20, 또는 21의 아미노산 서열; 또는
30 이들 모두
를 암호화하는 핵산.

【청구항 12】

제11의 핵산을 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 13】

제11항의 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포.

5 【청구항 14】 마우스 /키메라 항체에 관한 것 추후 국가 진입시 분할예정

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 서열번호 6의 아미노산 서열을
10 포함하는 CDR-L3의 상보성 결정부위 (complementarity determining region; CDRs)를 포함하는, 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암 및 암전이에서 선택된 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 15】

제14항에 있어서, 상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 22, 서열번호 32, 서열번호 42, 및 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크 서열로 이루어지는 군에 선택된 1종 이상의 프레임워크 서열을
15 포함하는 것인, 약학 조성물.

【청구항 16】

제14항에 있어서, 상기 항체의 경쇄 가변영역은 서열번호 28, 서열번호 38, 서열번호 48, 및 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크 서열로 이루어지는 군에 선택된 1종 이상의 프레임워크 서열을
20 포함하는 것인, 약학 조성물.

【청구항 17】

제14항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역과 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것인 약학 조성물.

【청구항 18】

제14항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 상기 항 CD40 항체의 scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂인, 약학 조성물.

30 【청구항 19】

기탁번호 KCLRF-BP-00230 의 하이브리도마로부터 생산된 항-CD66c

항체의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3를 포함하는 항-CD66c 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 및 암전이에서 선택된 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 20】

- 5 제19항에 있어서, 기탁번호 KCLRF-BP-00230 의 하이브리도마로부터 생산된 항 항-CD66c 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 항-CD66c 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물.

【청구항 21】

- 10 제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 CD66c 양성인 폐암, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 또는 전립선암 인 약학 조성물.

【청구항 22】

제21항에 있어서, 상기 조성물을 PD-1 또는 PD-L1 결합 억제제를 추가로 포함하는 것인 약학 조성물.