(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. 7
C07K 16/30

(11) 공개번호 특2002-0079888
(43) 공개일자 2002년10월19일

---

(21) 출원번호 10-2002-7010963
(22) 출원일자 2002년08월22일
번역문 제출일자 2002년08월22일
(86) 국제출원번호 PCT/SE2001/00395
(86) 국제출원출원일자 2001년02월23일
(87) 국제공개번호 WO 2001/62286
(87) 국제공개일자 2001년08월30일

---

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아(AT실용), 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코(CZ실용), 독일(DE실용), 덴마크(DK실용), 에스토니아(EE실용), 스페인, 핀랜드(FI실용), 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아(SK실용), 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구아바부다, 코스타리카, 도미니카연방, 알제리, 모로코, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 탄자니아, 그레나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 유고슬라비아, 짐바브웨,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스, 터어키,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘,

(30) 우선권주장 0000597-5 2000년02월24일 스웨덴(SE)

(71) 출원인 액티브 바이오테크 에이비
스웨덴 에스-220 07 룬드 피.오. 박스 724

(72) 발명자 브로딘,토마스,엔.
스웨덴에스-25271라리당스가탄10
칼스트롬,피아,제이.
스웨덴에스-22736룬드페리에바겐10아
닐슨,보,에이치.,케이.
스웨덴에스-22362룬드솔베가탄11
올손,렌나르트,지.
스웨덴에스-22655룬드루드복스바겐898
토드슨,엠.,제스퍼
스웨덴에스-22468룬드플로야트바겐20베

(74) 대리인 남상선

심사청구 : 없음

(54) 결장 암에 대해 특이성을 가지는 신규한 항체

요약

종양 세포에서 및 또는 종양 세포와 결합하는 결합 구조; 종양 세포의 표면에서 또는 표면 상에서 디스플레이되고/거나 발현되는 표적 구조; 표적 구조를 인지하고 차단하는 결합 구조; 표적 구조의 발현을 차단하기 위하여 결합하는 물질; 결합 구조, 표적 구조 또는 물질을 활성 주성분으로 포함하는 약제학적 조성물; 표적 구조를 활성 주성분으로 포함하는 백신 조성물; 파아지 선별을 위한 방법; 및 상기 청구 대상의 사용을 포함하는 인간 악성 질환의 체외 및 체내 진단 및 예후 방법, 및 치료 방법을 기술한다.

명세서

기술분야

본 발명은 종양 세포의 표면에서 및/또는 표면과 결합하는 결합 구조; 종양 세포의 표면에서 및/또는 표면으로 디스플레이되고/거나 발현되는 표적 구조; 표적 구조를 인지하고 차단하는 결합 구조; 표적 구조에 결합하거나 이의 발현을 차단하는 물질; 결합 구조, 표적 구조 또는 물질을 활성 주성분으로서 포함하는 약제학적 조성물; 표적 구조를 활성 주성분으로서 포함하는 백신 조성물, 파아지 선별 방법; 및 상기 청구 대상의 사용을 포함하는 인간 악성 질환의 체외 및 체내 진단 및 예후 (prognosis), 및 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

정상 세포의 암 세포로의 형질 전환은 증식중인 종양의 형질 전환 세포 및/또는 미세 환경의 유전자형 및 표현형 변경과 관련있다 (Kerbel RS, 1995). 원칙적으로, 상기 변경의 일부는 종양 특이적 항원 (TSAs)과 같은 면역 시스템에 의해 인지되고, 따라서 종양 특이적 면역치료법을 위한 기초를 형성한다. 종양 초회 감작 및 종양 형성의 기초를 이루는 돌연변이는 그 자체로 TSAs의 발현을 유도하지만, 정상 항원의 조절 곤란 발현 및 번역후 수식과 같은 2차적인 변화는 면역치료법을 위한 표적으로서 유용한 종양 관련 항원의 대다수를 포함한다.

분자 수식 및 변경된 발현 수준의 동정을 위한 표적과 직접적으로 관련되는 유전체학 및 단백질체학의 현대 기술을 사용하여 종양 표현형과 관련된 분자를 동정된다 (참고 문헌: William KL, 1999). 보다 더 간접적으로, 종양 형질의 특성을 나타내는 종양 관련 항원 (TAAs)은 또한 단클론 항체 유래된 하이브리도마를 사용하여 동정된다 (참고 문헌: Kohler G., Milstein C, 1976).

파아지 디스플레이 기술은 하이브리도마 기술에 대한 확립된 대안이고, 몇몇 출원에 대해서는 순수 스크리닝에 의한 것이 아닌 항원 작동 선별 원칙에 의한 단클론 항체의 발생을 위한 선택 방법이다 (Hoogenboom HR et al., 1998). 상기 기술은 유전자 패키지로서 인코딩 DNA 및 파아지의 선별을 가능하게 하는 파아지의 게놈내에서 인코딩되는 특정 항체 단편을 표면에 디스플레이하는 항체의 변이가 쉬운 중쇄 (heavy chain) 및 경쇄 (light chain)에 상보적인 프라이머를 획득할 수 있는 경우에, 파아지 벡터에 삽입된 항체 유전자는 임의의 종의 면역 또는 비면역 동물로부터 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭될 수 있고, 큰 파아지 항체 라이브러리가 구축된다.

세포, 조직 부분 및 다른 생물학적 물질에 대한 파아지 라이브러리의 선별은 사용된 복합 항원 물질내의 구성 요소와 결합하는 단클론 항체 또는 펩티드를 생산한다 (참고 문헌: Hoogenboom HR et al, 1998, Tordsson J et al 1997). 복합 항원을 사용한 직접적인 양성 선별의 결과는 많이 발현되고 면역지배적인 항원 및 고친화성 상호작용으로 편향된 전체 조직 반응 레파토리의 특이성의 분류이다. 특이적 표현형의 예로서 별도로 발현된 항원을 동정하기 위하여 서브트렉티브 접근법(subtractive approch)을 사용하였다.

발명의 상세한 설명

발명의 간략한 개요

본 발명에 따르면, 종양 세포, 특히 상피 종양 세포, 예를 들어 결장직장 암종, 췌장 암종, 유방 암종 및 폐 암종 세포와 결합하는 결합 구조, 예를 들어 항체를 제공한다. 또한, 상기 종양 세포의 표면에 및/또는 표면상에 디스플레이되고/거나 발현된 표적 구조를 제공한다.

또한, 조직 부분 또는 파아지 선별을 위한 물질과 같은 조직 부분 및 세포의 혼합을 사용한 신규의 서브트렉티브 선별 방법을 제공한다.

따라서, 본 발명의 한 면에서, 본 발명은 종양 세포의 세포 표면에서 또는 표면과 결합하는 결합 구조에 관한 것으로서, 결합 구조는 SEQ ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 160 - 165 (CDR1), 180 - 195 (CDR2), 228 - 238 (CDR3)에 의하여 필수적으로 규정된 중쇄 CDR 구조에 의해 우세하게 결정되고, 추가적인 결합 특이성은 SEQ ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 23 - 36 (CDR 1), 52 - 58 (CDR 2), 91 - 100 (CDR 3)에 의하여 필수적으로 규정된 하나 이상의 경쇄 CDR에 의해 제공된다.

또 다른 면에서, 본 발명은 종양 세포의 세포 표면에서 및/또는 세포 표면과 결합하는 결합 구조에 관한 것으로서, 상기 결합 구조가 서열 목록 ID NO: 2에 도시된 아미노산 목록의 아미노산 번호 23 - 36 (CDR1), 52 - 58 (CDR2), 91 - 100 (CDR3)를 필수적으로 포함하는 경쇄 및 서열 목록 ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 160 - 165 (CDR1), 180 - 195 (CDR2), 228 - 238 (CDR3)를 필수적으로 포함하는 중쇄의 상보성 결정 부위 (CDR) 서열을 하나 이상 포함하는 포함한다.

하나의 구체예에서, 결합 구조는 상기 CDR 서열 모두를 포함한다.

다른 구체예에서, 결합 구조는 항체 및/또는 이들의 단편이고, 이는 다른 구체예에서, 서열 목록 ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 1 - 110을 특히 포함하는 경쇄의 가변 부위, 및 서열 목록 ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 130 - 249를 특히 포함하는 중쇄의 가변 부위를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 항원은 서열 목록 ID NO: 2에 도시된 전체 아미노산 서열을 포함한다.

하나의 구체예에서, 결합 구조는 원발성 및/또는 전이성 결장직장암종, 췌장암종, 유방암종 및 폐암종 세포를 포함하는 군에서 선별된 상피 종양 세포의 세포 표면에서 및/또는 표면과 강하고/거나 균일하게 결합한다. 다른 구체예에서, 상기 결합 구조는 신장암종, 전립선암종 및/또는 악성 흑색종 세포와 약하고/거나 불균일하게 결합하고/거나 결합하지 않는다. 또 다른 구체예에서, 결합 구조는 결장 표면 상피 및 소장 상피의 근첨단 부분 (apical parts)과 강하게 결합한다. 다른 구체예에서, 상기 결합 구조는 결장 표층 상피 세포의 미세융모 및/또는 솔변연 (brush border)의 세포 표면의 근첨단 부분과 결합한다. 또 다른 추가예에서, 상기 결합 구조는 포유동물 선상피 및/또는 이의 주변 결합 조직과 약하게 내지 보통으로 결합한다.

다른 구체예에서, 결합 구조는 비장, 신장, 간, 허파, 피부, 췌장, 갑상선, 심장근 및/또는 CNS를 포함하는 정상 조직에 약하고/거나 불균일하게 결합하고/거나 결합하지 않는다.

일 구체예에서, 결합 구조는 파아지 선별에 의해 제공되고, 다른 구체예에서, 파아지 선별은 파아지 입자상에 디스플레이된 결합 구조의 체내 면역성에 의해 사전 선별된 레파토리 및 다른 표현형의 여러 쌍의 조직의 사용에 의한 파아지 입자의 서브트렉티브 선별의 조합을 포함한다. 다른 구체예에서, 서열은 마카나 파스시큐라리스 (Macana Fascicularis)로부터 유래되고, 이 서열은 인간 유래의 해당 서열과 78% (Vl) 및 86% (Vh) 이상의 아미노산 동일성을 가진다.

또 다른 구체예에서, 결합 구조는 인간에서 낮은 면역원성 또는 비 - 면역원성을 가진다.

일 구체예에서, 결합 구조는 폴리펩티드로의 유전적 연결 및/또는 유기 또는 비유기 화학분자에의 화학적 결합 (conjugation) 및/또는 디 - , 올리고 - , 멀티머화 (multimerisation)에 의하여 유도된다.

다른 구체예에서, 결합 구조는 세포 독성 폴리펩티드 또는 세포 독성 유기 또는 비유기 화학 분자; 생물학적 활성 분자 ; 또는 면역 활성 분자에 유전학적으로 연결되거나 화학적으로 결합된다.

다른 구체예에서, 결합구조를 변화시켜 이들의 결합성 및 친화력을 증가시키거나 감소시키고, 이들의 생산 수율을 증가시키고; 이들의 약력학적 특성에 영향을 미치고; 또는 이들에 신규한 약력학적 특성을 부가한다.

또 다른 구체예에서, 결합 구조를 표지하고, 이들의 결합은 특이적이고, 결합구조의 표지되지 않은 형태에 의해 저해될 수 있고 다른 결합 구조에 의해서는 저해될 수 없으며, 다른 특이성을 가지는 다른 결합 구조의 결합을 저해할 수 없다.

다른 면에서, 본 발명은 서열 목록 ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열을 포함하는, 상기 정의된 항체를 코딩하는 DNA 서열에 관한 것으로, DNA 서열은 서열 목록 ID NO: 1에 도시된 서열을 포함한다.

또 다른 면에서, 본 발명은 종양 세포의 표면에서 또는 표면상에서 디스플레이되고/거나 표현되는 표적 구조에 관한 것으로, 이 표적 구조는 상기 정의된 결합 구조 및 유사한 결합 특성을 가지는 다른 결합 구조와 특이적으로 결합하고, 이들에 의하여 특이적으로 결합되는 능력을 가진다.

일 구체예에서, 상기 표적 구조는 상기 결합 구조를 특이적으로 차단하고 이에 의하여 특이적으로 차단되는 능력을 가진다.

다른 구체예에서, 상기 결합 구조는 원발성 및/또는 전이성 결장직장 암종, 췌장 암종, 유방 암종 및 폐 암종 세포를 포함하는 군에서 선별된 상피 종양 세포의 세포 표면에서 및/또는 이들의 세포 표면상에서 강하고/거나 균일하게 디스플레이되고/거나 발현된다.

또 다른 구체예에서, 표적 구조는 신장 암종, 전립선 암종 및/또는 악성 흑색종에서 약하고/거나 불균일하게 디스플레이되고/거나 발현되고/거나 그렇지 않다.

다른 구체예에서, 결합 구조는 결장 표면 상피 및 소장 상피의 근첨단 부분에서 강하게 디스플레이되고/거나 발현된다.

또 다른 구체예에서, 상기 결합 구조는 결장 표층 상피 세포의 미세융모 및/또는 솔변연의 세포 표면의 근첨단 부분과 관련하여 디스플레이되고/거나 발현된다.

또 다른 구체예에서, 상기 결합 구조는 동물 선상피 세포 및/또는 이의 주변 결합 조직에서 약하게 내지 보통으로 디스플레이되고/거나 발현된다.

다른 구체예에서, 상기 결합 구조는 비장, 신장, 간, 허파, 피부, 췌장, 갑상선, 심장근 및/또는 CNS를 포함하는 정상 조직에서 약하고/거나 불균일하게 디스플레이되고/거나 발현되고/거나 그렇지 않다.

또 다른 구체예에서, 상기 표적 구조의 디스플레이 및/또는 발현은 상피 조직과 관련된다.

다른 구체예에서, 표적 구조는 비환원된 형태로 90 및/또는 220 킬로달톤의 정확한 분자량을 가진다.

다른 면에서, 본 발명은 상기 정의된 표적 구조의 항-이디오타입 (idiotype)에 관한 것이고, 이 항-이디오타입은 상기 표적 구조에 유사한 결합 특이성을 가지는 결합 구조와 특이적으로 결합하고, 이에 의하여 특이적으로 결합된다.

일 구체예에서, 상기 항-이디오타입은 상기 결합 구조를 특이적으로 차단하고 이에 의하여 특이적으로 차된된다.

또 다른 면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 표적 구조를 인지하고 유기 화학적 성질을 가지는 결합 구조에 관한 것이다. 일 구체예에서, 본 결합 구조는 상기에서 정의된 결합 구조의 결합을 차단한다.

다른 면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 표적 구조의 발현을 차단하는 물질에 관한 것이다.

일 구체예에서, 상기 물질은 안티-센스 올리고뉴클레오티드 및/또는 라이보자임 분자이다.

다른 면에서, 본 발명은 상기에 정의된 표적 구조의 기능을 차단하는 물질에 관한 것이다.

또 다른 면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 하나 이상의 결합구조를 활성 주성분으로 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

다른 면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 표적 구조 또는 상기의 표적 구조의 항-이디오타입을 활성 주성분으로 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

또 다른 면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 물질을 활성 주성분으로 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

다른 면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 표적 구조 또는 상기에서 정의된 표적 구조의 항-이디오타입을 활성 주성분으로 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 파아지 입자에 디스플레이된 결합 구조의 체내에서 면역학적으로 사전 선별된 레파토리 및 다른 표현형의 여러 쌍의 조직의 사용에 의한 파아지 입자의 서브트렉티브 선별의 조합을 포함하는 파아지 선별의 방법에 관한 것이다.

상기 방법의 일 구체예에서, 결합 구조의 사전 선별된 레파토리는 영장류에서 유래된 항체이다.

상기 방법의 다른 구체예에서, 여러 쌍의 조직은 교차된다. 바람직하게는, 상기 교차된 여러 쌍의 조직은 동일한 개체로부터 유래된다.

다른 구체예에서, 상기 조직은 냉동 및/또는 포르말린-고정/파라핀 침지 조직 절편 및/또는 단편 및/또는 세포 현탁액의 형태로 사용된다.

다른 면에서, 본 발명은 시료를 상기 정의된 하나 이상의 결합 구조 및 지시제와 접촉시킴은 특징으로 하는 인간 악성 질환의 체내 조직병리적 진단 및 예후 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 시료는 절단전에 냉동 및/또는 포르말린 고정 및 파라핀 침지시킨 조직 시료이다.

일부 구체예에서, 상기 방법은 종양 타입핑 (typing), 종양 스크리닝, 종양 진단 및 예후, 암전단계의 모니터링을 포함한다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 상기에서 정의된 하나 이상의 결합 구조의 체내 농도를 분석함을 특징으로 하는 인간 악성 질환의 체내 진단 및 예후 방법에 관한 것이다.

또 다른 면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 표적 구조를 포함하는 항원 또는 상기 표적 구조의 항-이디오타입의 체액내 농도를 분석함을 특징으로 하는 인간 악성 질환의 체내 진단 및 예후 방법에 관한 것이다.

또 다른 면에서, 본 발명은 a) 상기에서 정의된 표적 구조 또는 상기 표적 구조의 항-이디오타입을 포함하는 항원, 및 b) 상기에서 정의된 하나 이상의 결합 구조의 복합체의 체액내 농도를 분석함을 특징으로 하는 인간 악성 질환의 체내 진단 및 예후 방법에 관한 것이다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 상기 정의된 하나 이상의 결합 구조의 인간 피검체의 종양 침착물로의 국소화를 측정함을 특징으로 하는 인간 악성 질환의 체내 진단 및 예후 방법에 관한 것이다. 다른 구체예에서, 상기 결합 구조는 종양 침착물에 축적된다. 또 다른 구체예에서, 상기 방법은 정량적이다.

다른 면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 하나 이상의 결합 구조가 인간 피검체에 투여됨을 특징으로 하는 인간 악성 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

상기 방법의 다른 구체예에서, 상기 결합 구조는 화합된 분자의 약력학적 특성을 변화시키는 분자에 유전적으로 연결되거나 유도됨에 의하여 변형된다.

다른 면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 표적 구조가 인간 피검체에 투여됨을 특징으로 하는 인간 악성 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법의 일 구체예에서, 표적 구조에 대한 면역 반응이 유발된다.

다른 구체예에서, 표적 구조는 화합된 분자의 약력학적 특성을 변화시키는 분자에 유전적 및/또느 화학적으로 연결됨에 의하여 변형되거나, 화합된 분자의 면역원성 및/또는 항원성 특성을 면형시키는 분자에 유전적 및/또는 화학적으로 연결되거나, 유도되거나, 유전적으로 수식됨에 의해서 변형된다. 상기 방법의 다른 구체예에서, 표적 구조는 혼합물의 면역원성 특성을 변형시키는 다른 분자와 혼합되거나, 애쥬번트와 혼합된다.

다른 구체예에서, 본 발명은 상기에서 정의된 물질이 인간 피검체에 투여됨을 특징으로 하는 인간 악성 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법의 다른 구체예에서, 물질은 화합된 분자의 약력학 특성을 변형시키는 분자에 유전적 및/또는 화학적으로 연결하거나, 유도함에 의하여 변형된다. 또 다른 구체예에서, 상기 물질은 혼합물의 면역원성 특성을 변형시키는 다른 분자와 혼합되거나, 애쥬번트와 혼합된다.

발명의 상세한 설명

본 발명에 따른 선별 방법에서, 조직 절편, 또는 조직 절편 및 세포의 배합물은 파아지 선별 재료로 사용된다. 가볍게 혼합된 조직 절편은 본래의 구조 및 고도로 보존된 형질을 가지는 생물학적 재료이다.

6명의 환자로부터 절단된, 교차된 여러 쌍의 자가 결장 및 결장 암 조직에 대한 서브트렉티브 선별에 대한 면역 결장 암

파아지 라이브러리를 사용하여 상기 방법을 개발하고 응용하였다. 본원에서 K293이라고 칭하는 선별된 특이성 중의 하나가 선별 방법에서 사용된 종양 모두와 균일하게 반응하지만 정상 결장과는 매우 제한적으로 반응한다. K293 특이성 형태를 가지는 클론은 마지막 회차의 선별에서 종종 발견되어 조직을 기초로 한 서브트렉티브 선별의 기능성을 제시한다.

체외에서 배양된 종양 세포주에 의해서라기 보다 환자에서 발달된 종양 표현형에 의한 K293으로 정의된 종양 관련 항원의 우선적인 발현은, 신규하고 치료적으로 적절한 종양 관련된 항원에 대한 반응물의 동정을 목적으로 하는 경우에 선별 물질로서 조직을 사용하는 것의 잇점과 적절함을 명확하게 나타낸다.

또한, K293 항체는 결장직장 암종, 췌장 암종, 폐 암종 및 유방 암종과의 강한 반응성, 및 정상 조직의 넓은 패널에서 시험된 경우에 매우 제한된 반응성을 증명한다. 세포 표면 반응성을 증명하고, 증명할 수 있는 순환중인 항원 수준의 부족과 함께, 종양을 표적하는 항원의 적절성을 제시한다. 또한, 이는 이종이식된 인간 종양 세포를 사용한 인체에 적응된 SCID 모델의 표적 치료 활성을 예비로 증명하는 K293 Fab-수퍼항원 SEA (D227A)에 의해 뒷받침된다.

마지막으로, 고정화 K293 항체 단편을 사용하여 친화성 크로마토그래피를 수행하여, 단백질 분획을 정제하였다. 비환원 SDS 겔 크로마토그래피, 펩티드 소화 및 시퀀싱 (sequencing)에 의해 MW 35-45 kDa 밴드로서 나타나는 분획은 GAPDH, 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게네이즈와 상동성을 가지는 3개의 펩티드 단편을 포함한다.

본 연구는 정상 및 질환 조직의 표현현의 차이를 동정하고, 다르게 발현되는 분자를 코딩하는 유전자를 간접적으로 동정하는 방법을 제시한다. 본 방법은 결장 암 관련 항원 및 이들 항원과 반응하는 항체를 동정하는데 적용된다. 보다 넓은 측면에서, 개발된 방법은 염증 질환 또는 발달 상태 마커 (marker) 및 표적의 동정을 위해 정상 조직 및 염증 조직 또는 성숙 조직과 비성숙 조직과 같은 여러 쌍의 조직을 사용하는 다른 연구 분야에도 동일하게 적용될 수 있다.

파아지 라이브러리를 위한 서브트렉션을 위한 항원 공급원으로서 조직 절편을 사용하는 효용성을 모델 시스템에서 평가한다. 하나의 결합 파아지 항체를 다른 하나로부터 명확하게 서브트렉션하는 것은 광범위-반응성 (C215) 및 종양-특이적 (1F) 특이성을 나타내는 scFv 항체를 코딩하는 파아지를 사용하여 수행된다. 후자는 1F 항원이 소장 조직에서 약하게 발현되고, 완전히 발현되지 않는 것은 아니기 때문에 다소 간이화된 것이다 (참고 문헌: Tordsson et al). 결과적으로, 1F 파아지의 보다 적은 서브트렉션은 또한 두 개의 특이적 파아지의 분리를 감소시킨다.

또한, SCID 마우스에서 증식된 콜로 (Colo) 205 종양의 아세톤 고정 조직 절편이 양성 선별 단계를 위하여 배양된 완전한 콜로 205 종양 세포 (및 음성 선별을 위한 자국 조직 절편) 대신에 사용된 경우에, 1F 파아지의 수율은 C125 파아지의 경우보다 12 내지 16배 더 감소하였다 (도 2, 결과는 도시되지 않음). 1F 항원이 고정에 민감하거나, 1F scFv 파아지의 결합이 조직-기초한 선별 방법에 사용된 거친 세척액에 민감하다는 것으로 해석된다.

자궁 절편을 사용한 음성 선별 단계의 추가는, 시스템의 특이성 및 상기 특이성을 사용하여 면역조직화학에 의해 사전에 발견되는 자궁과의 음성 반응만을 확인하는 양성 선별과 비교할 경우에 세포의 C215 및 1F 파아지의 상대적인 수율을 변화시키지 않는다 (참고 문헌: Tordsson et al).

결과적으로, 모델의 최적의 종양-특이성 파아지의 부족에도 불구하고, 조직-기초한 파아지 흡착의 효율 및 특이성이 증명되어, 서브트렉티브 발견 프로토콜을 위한 기초를 제공한다. 또한, (파아지 수율의 손실을 최소화하하면서) 각 선별단계내에서 또는 선별단계 사이에 흡착 단계를 반복하는 것은 흡착의 효율을 증가시킨다.

각 서브트렉티브 선별 과정의 반복된 음성 흡착 단계 보다 더 효율적이라는 것이 증명되기전에 라이브러리 선별을 수행하였기 때문에, 1회의 흡착만이 모든 7회의 선별 과정에서 사용된다. 이는 결점이 아니다. 각 선별 과정에서 수회의 흡착을 수행함에 의한 음성 선별의 다른 강도는 조율기 (tuner)처럼 작용한다. 이에 의하여, 선별 결과는 많이 (널리) 발현된 항원에 대한 항체 (음성 흡착 없음)로부터 완전하게 차이를 나타내며 발현된 항원에 대한 항체 (반복된 음성 선별)

쪽으로 편향된다.

그러나, 모델 실험으로부터의 결과는 양성 선별의 능력이 음성 선별을 크게 능가한다는 것을 증명한다. 또한, 일부 특이성은 1 내지 2회의 선별과정의 작은 차이로 저빈도로 발견되고, 그 후에 계속된 선별과정은 선별 필터를 포화시키고, 특이성의 조성물보다 광범위한 반응성 항체쪽으로 변화된다.

서브트렉티브 라이브러리 선별과정 동안, 많은 선별과정이 높은 퍼센트의 결합 파아지를 수득할 필요가 있음을 알 수 있다. 이는 세포 또는 조직 절편에 대해 양성적으로 선별하는 경우에 보통 충분한 2-3회의 과정과 비교된다. 이는 선별과정이 라이브러리의 다수의 특이성에 대해 유효한 필터의 역활을 하고 최적의 선별 과정을 설계하기 위한 기초를 제공함을 의미한다. 예를 들어, 보다 작은 강화 요인은 많은 종양이 최적의 선별 과정에 도달하기 전에 사용되도록 한다. 이는 공통적으로 발현되는 종양-한정 항원의 동정쪽으로 선별을 편향시킨다.

다수의 종양 관련 항원에 대한 단클론 항체는 하이브리도마 기술에 의해 생산된 쥐과의 항체이다. 그러나, 동종항원과 같은 정상 인간 항원의 소수의 변이체를 구별하는 항체 반응이 인간 및 인간 유사 종에서 성공적으로 유도된다.

빈도가 높은 TAA만이 실질적으로 광범한 환자군의 면역치료를 위한 유용한 표적이 된다. 이들이 정말로 종양 특이적인 항원을 나타내는데도 불구하고, 이는 유일한 개체-종양 특이적 돌연변이를 배제한다. 대다수의 높은 빈도로 발현되는 종양-관련 항원은 정상 또는 최소로 변경된 (예를 들어, 번역후 수식된) 항원이기 때문에, 인간 종양으로 면역화된 영장류는 종양 관련된 항원에 대한 항체의 우수한 공급원이다.

각 레파토리와 서브트렉티브 파아지 선별과의 조합에 의하여 레파토리의 추가의 정밀 분석이 용이하고 특이성의 결과가 보다 잘 조절될 수 있다. 직접적인 양성 선별 (참고 문헌: Trdsson et al)과 비교할 때 본 발명에 따른 서브트렉티브 조직 기초 선별을 사용하는 경우의 면역 결장 암 라이브러리의 항-종양 항체의 완전히 다른 세트의 동정은 상기 추측을 지지한다.

K293 특이성에 의한 선별된 클론은 선별 프로토콜에 포함된 모든 결장직장 종양 조직의 매우 균일한 염색 및 정상 결장 상피와의 매우 제한된 반응성의 증거가 된다. 서브트렉티브 선별 필터는 각각이 교차된 여러쌍의 조직이 유래된 환자, 6명의 개체에 공통된 정상 및 악성 결장 상피간의 작은 차이로 발견된, 허용 계대를 위한 좁은 범위의 형질 특이성을 규정한다. 필터를 위하여 구축된 기준이 특이성의 K293 타입에 의해 거의 완벽하게 수행됨은 특이성 분석으로부터 명백하다.

과거에는 진핵세포가 세포 표면 항원을 동정하기 위한 서브트렉티브 선별을 위하여 사용되었다. 그러나, 파아지 선별을 위하여 세포를 사용한 경우와 비교하여 볼 때, 조직 절편은 체외에서 복제되기 어렵거나 불가능한 조직 환경 인자 또는 구조에 의하여 조절되는 항원를 포함하여, 체내에서 발현되는 모든 조직 구성성분에 대한 반응물의 동정을 가능하게 한다.

네 개의 시험된 결장직장 암 세포주중의 두 개는 체외 배양된 세포 또는 SCID 마우스에서 체내 증식된 경우에 검출되지 않는 K293 항원을 발현한다. 또한, 체외에서 배양된 추가의 5개의 세포주는 항원 발현에 음성반응을 보인다 (결과는 도시되지 않음).

환자 유래된 종양의 K293 항원에 대한 높은 빈도의 균질한 발현은 결장 암 세포가 체외에서 배양된 경우에 크게 손실되는 것으로 보인다. 또한, 발현은 이종 숙주의 체내에서 세포를 증식시킴에 의해서 유도될 수 없다.

K293FabSEA/E11 융합 단백질은 민감도를 증가시키고 배경을 감소시키는 확대된 K293 특이성 분석을 위한 형태이다.

상기 구조물은 다수의 결장 암종, 유방 암종 및 폐 암종과 반응하는 것으로 보인다. 상기 종양의 다수에서, K293FabSEA/E11은 악성 세포의 90% 이상에서 양성이었다. 결장암 전이의 높은 빈도 또한 강한 반응성을 보이기 때문에 반응은 1차 종양에 제한되지 않는다. 다른 한 편으로, 전립선 또는 신장 세포 암에서 반응이 나타나지 않고, 단지 제한된 반응만이 악성 흑색종에서 나타난다.

정상 조직 반응성은 결장 및 소장 상피의 근첨단 부분, 및 정상 유방의 선상피 및 이의 주변 기질에서 발견된다.

전자현미경을 통해 K293FabSEA/E11이 정상 세포 및 악성 세포의 세포 표면에서 발현되는 항원에 결합하는 것을 알 수 있다. 정상 결장 점막에서는, 표층 상피 세포의 미세융모의 윤곽을 나타내는 근첨단 세포 표면에서 반응이 일어난다. 또한, 저-중간 종양이 세포 표면의 모든 면에서 균일한 양성 반응을 보이는 데 반해, 근첨단 염색은 매우 분화된 종양에서 두드러진다.

K293FabSEA/E11이 신생물성 선 형성물에서 뮤신-유사 물질과 반응하는데도 불구하고, 항원은 결장 암 환자의 혈장 풀 (pool)에서 검출되지 않는다. 상기 풀에는 환자의 높은 종양 부하를 가리키는 높은 수준의 CA242 결장 암 항원이 관찰된다. K293FabSEA/E11가 12개의 검사된 1차 종양중에서 12개 및 3/4 결장 암 전이에서 강한 양성 반응을 보이기 때문에, 이는 에피토프가 순환중인 항원에서 그다지 발현되지 않음을 의미한다.

K293FabSEA/E11은 종양 표적을 위한 후보로서 흥미를 끄는 하기의 몇가지 특성을 보인다: 1) 이는 높은 빈도의 양성의 1차 종양 및 전이를 인지하고, 2) 제한된 정상 조직 반응성의 증거가 되며, 3) 종양 세포의 표면에서 발현되는 항원과 결합하고, 4) 암 환자의 말초혈에서 검출되지 않는 항원에 결합한다.

또한, 종양 표적을 위한 K293FabSEA/E11의 잠재적인 용도는 인체 적합화된 종양을 함유하는 SCID 마우스를 사용하는 치료법 실험에 의하여 지지된다. 비-표적 대조군 FabSEA 융합단백질과 비교할 경우에, K293FabSEA/E11은 복막강에서 증식하는 LS174T 종양의 80%를 초과하는 감소율을 보인다. SCID 마우스에서 증식하는 처리되지 않은 LS174T 종양의 면역조직화학적 검사는 악성 세포의 50%만이 K293FabSEA/E11에 대해 양성임을 보인다 (결과는 도시되지 않음). 이는 K293Fab 음성 종양 세포의 일부가 부수 효과, 예를 들어 T 림프구의 시토카인 분비에 의하여 죽는다는 것을 의미한다. 이와 같이, 보다 높은 퍼센티지의 양성 세포를 보이는 결장직장 암 환자로부터 절단된 종양에서, 치료적 유효량은 잠재적으로 증가해야 한다.

K293 항원은 정상 조직에 존재하고, 면역 시스템에 노출되지 않은 정상 환경하에 언제나 존재하는 " 격리된" 항원의 군과 조화된다. 결장 및 소장에서, 항원은 순환하는 세포 및 면역적격성 세포에 노출된 세포의 기부 표면에 존재하지 않는다. 그러나, 많은 종양 시료에서, K293 항원은 전체 세포 표면에 분포되어 있어 순환 혈액에 노출된다.

K293FabSEA/E11은 종래에 자주 사용된 결장 암 결함 항체의 특이성 프로파일과 다른 것으로 보인다. 따라서, 이것이 이들 공지의 표적 분자에 결합하지 않는 것으로 보인다. K293FabSEA/E11에 의한 정상 결장의 근첨단 염색은 항-CEA에서 보인 반응과 유사하다. 그러나, CEA에 대한 항체는 과립구 및/또는 마크로파아지와 반응한다고 보고된 바 있다. 또한, CEA에 대한 항원은 순환 혈액에서 용이하게 검출되고, 결장-직장 암의 혈청-표지로서 사용된다. 결장암 반응성 항체 B3, 19-9 및 B72.3 모두는 정상 결장에서 제한된 불균일한 반응성을 가지고, K293의 특이성과 다른 것으로 보인다. 또한, 이는 K293에 의해 인지되는 항원과 비교할 경우에, 정상 결장에서 다른 분포를 가지는 MUC-1, -2, -3, -4 항원에도 동일하다.

본 발명에 따른 개발된 서브트렉티브 조직-기초 파아지 선별 방법은 표적 발견 기술에 새로운 특성을 부과한다. 유전체학 및 단백질체학은 다르게 발현된 유전자 및 단백질의 동정에 기초한 것이다. 이들 방법은 그들 자신이 직접적으로 표적의 디스플레이를 포함하는 반면에, 본 발명의 기술은 세포 및 조직 발현된 표적을 절개하기 위하여 파아지 디스플레이된 반응물의 라이브러리를 사용한다.

신규한 표적에 대한 반응물의 동정은 에피토프의 조직 분포의 분석 및 이의 대응 항원의 정제 및 특성 규명을 위한 유효한 수단을 제공한다. K293 항체에 추정 표적 항원의 성공적인 친화성 정제 및 서열 분석에 의한 특성 규명의 증명은 유효하고 신속한 표적 동정을 위한 항체 탐침자로서의 높은 가능성을 예증한다. 세개의 10 아미노산 길이 펩티드는 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게네이즈 분자와 동일성을 가지고, 이는 이것이 K293에 대한 표적임을 제시한다.

유전체학이 표적 유전자의 동정을 목적으로 하는데도 불구하고, 이 기술은 단백질 수준에서 부가된 번역후 수식과정에서의 변경을 확인할 수 없다. 다양한 조직에서의 유전적 발현의 유용한 정보는 유전자 발현 데이타베이스를 조사함에 의하여 제공되는 반면에 [전자 노던 블랏 (electronic Northern blot)], 직접적인 증명을 위해서는 인시튜 하이브리드형성 (in situ hybridization)을 사용하여야 한다.

단백질체학이 일부 타입의 번역후 수식의 검출을 위하여 사용될 수 있다. 그러나, 동정된 단백질의 조직 분포의 분석은 단백질에 대한 항체 반응물의 생산 또는 인시튜 하이브리드형성을 위하여 사용하기 위하여 이의 아미노산 서열에 기초한 DNA 탐침자의 생산을 필요로 한다.

유전체학 및 단백질체학 모두 탄수화물, 지질 및 비단백질 특성을 가지는 다른 생물학적 분자를 포괄하지 못한다. 단백질체학을 파아지 디스플레이 기술과 연결하는 강력한 자동화된 기술이 나타나지 않았고, 즉 보다 상세하게는 이는 2차원 겔 (CaT, 캠브리지, 영국이 제공)상의 단백질 스팟에 대한 항체 파아지의 선별을 의미한다. 이는 명백하게 신규한 항원에 대한 반응물을 생산하지만, 변성된 단백질상에 노출된 많은 에피토프가 체내에서는 노출되지 않는다는 사실 및 단백질체학의 한계를 포함하여, 체내에서 폴딩 (folding)된 단백질에 노출된 많은 에피토프는 검출되지 않을 것이다. 물론, 상기 기술은 표적 동정을 위한 질량 분광법 및 시퀀싱 후에 표적 단백질 스팟을 검출하기 위하여, 서브트렉티브 파아지 선별 접근법에 의해 생산된 반응물을 사용하여 역방향으로 사용될 수 있다.

선별된 항체, 특히 K293 특이성은 종양 표적 부분의 용도로서 몇몇 유리한 특성을 가진다. 이는 결장직장암종의 종양의 상당한 분획에 대한 상당히 균질한 결합 유형의 종양 반응성을 포함하고, 잠재적으로 다른 일반적인 종양 타입에 대해서도 그렇다. 중요하게는, 정상 조직 반응성은 상당히 제한되고, 표적 항원은 표준 방법을 사용하여 암 환자의 순환 혈액에서 검출될 수 없다. 또한, 인간 면역글로불린 서열에 상당히 상동성을 가지는 영장류 항체는 인간에서 (면역 복합체 형성 및 제거에 이르는) 강한 이종-항체 반응을 유도하지 않는 것으로 보인다.

파아지 선별을 위한 본 방법은 서브트렉티브 선별을 위한 정밀한 필터와 함께 영장류의 결합 구조 (항체)의 체내에서 사전 선별된 레파토리의 사용을 기초로 한다.

본 발명의 추가로 고려될 수 있는 적용예는 면역 우성과 같은 면역화 편향을 피하기 위하여 큰 비면역 라이브러리의 사용과 관련되고, 이는 설계된 선별 방법의 절개능을 요구한다. 이들은 형질의 " 공통 요소" 를 나타내는 항원을 촉진하기 위하여 배경 항원성 환경을 변화시키면서 조직 절편에 의해 나타나는 본래의 체내 형질 및 자주 동정된 에피토프의 특이적 차단 (클론된 항체를 사용하여)을 사용하는 서브트렉티브 선별을 포함한다.

본 작업은 파아지 선별이 규정된 표적-지향 방법을 위한 발견 도구로서 사용될 수 있고, 선별 설계 표준이 이의 결과의 성공에 중요하다는 것을 증명한다.

본 발명은 도면과 함께 하기의 실시예에 의해 설명되고, 이에 한정되지 않는다.

실시예

실시예 1

유효한 서브트렉티브 모델 선별

본 발명에 따른 파아지미드 라이브러리의 서브트렉티브 선별의 원칙이 도 1에 도시된다. 서브트렉티브 선별 (종양 관련된 항원을 동정하기 위한 목적의 선별)에 의한 라이브러리 풀의 개개 파아지는 이들의 코딩된 항체의 특이성 유형, 즉 1) 광범한 조직 반응성 유형, 2) 종양에 제한된 유형 및 3) 비특이성 유형에 따라 이상적으로 분류될 수 있다. 또한, 파아지미드 라이브러리는 이들의 코딩된 항체를 디스플레이하지 않는 파아지의 큰 분획을 가진다. 상기 파아지는 음성 선별 단계에서 특이적으로 흡착되지 않지만, 박테리아에서의 파아지 증식전에 양성 선별 단계에서 세척되어 제거된다.

상피 세포 부착 분자, Ep-CAM 및 보다 더 종양 제한적인 파아지 특이성과 반응하는 광범한 반응성 파아지 C215 scFv, 1F scFv (파아지 라이브러리로부터 종래에 동정됨)을 혼합하여 (2.5×10^{7} C215 및 1.3×10^{6} 1F scFv 파아지), 도 2의 A에서 도시된 모델 실험에서 사용하였다. 이들 파아지 특이성을 C215 발현 조직, 소장의 절편, 또는 두 항원 모두에 음성인 조직, 자궁에서 인규베이션하였다. 조직 절편 흡착후에, 상등액에 존재하는 특이적 파아지를 콜로 205 세포를 사용하여 양성적으로 선별하였다.

비선별된 파아지 풀 및 선별된 파아지 풀의 다른 항생제 저항성이 형질도입된 단위의 상대적인 조성물 (다른 파아지 클론)을 콜로니 적정을 사용하여 분석하였고, 파아지 수율은 파아지 특이성 각각에 대하여 보여주었다. 결과는 소장의 절편에의 부착이 자궁 흡착과 비교할 경우에 광범한 반응성 C215 파아지의 수율을 33배 감소시킨다는 것을 증명하였다.

다른 특이성, 1F에 대한 대응하는 감소는 단지 1.2배였다. 최초 혼합물과 비교할 경우에, 파아지의 비율 (1F/C215)는 소장 절편을 사용하여 선별한 후에 50배 변화하였다 (자궁 절편을 사용한 경우에 1.8배).

반복된 실험에서 파아지 비율은 소장 절편을 사용하는 경우에 17배 변화하였다. 두 개의 선별 단계에 대한 조직 절편의 사용은 서브트렉션 효율의 감소를 증명하였다. 소장/콜로205 SCID 종양 및 소장/ 1차 결장암종의 절편의 혼합 사용은 흡착을 위하여 자궁을 사용하는 세팅 (setting)과 비교할 경우에, 각각 4배 및 3배 C215 특이성 파아지 수율을 감소시켰다. 그러나, 흡착 단계를 2회 반복함에 의하여 흡착 효율을 15배까지 증가시켰다 (결과는 도시되지 않음). 많은 특이성 파아지를, 6.1×10^{10} 비특이성 D1.3 파아지를 배경으로 하여 3.8×10^{9} 및 1.2×10^{10} C215 및 1F 파아지를 소장 조직 절편의 고흡착능을 증명하는 실험에 사용하였다.

도 2의 B에서 도시된 실험에서, 많은 수의 파아지, 7.2×10^{9} C215, 2.2×10^{10} 1F 및 4.2×10^{10} D1.3 파아지를 자궁, 소장 또는 폐 절편을 사용하는 음성 조직 흡착 후의 콜로205 종양 절편을 사용하는 양성 선별의 2회 반복을 위하여 사용하였다. 소장 및 허파 절편 흡착은 자궁 흡착과 비교할 경우에 각각 11배 및 2.2배로 C215 파아지 강화 (C215/D1.3 파아지 수율)를 상당히 ($p< 0.05$, $n=4$) 감소시켰다 (도 2의 B). 대조적으로, 1F 파아지 강화 (D1.3 파아지에 비해 55-64배)는 흡착을 위한 조직의 선택에 의해 영향을 받지 않았다 (소장 및 자궁에 대해 각각 1.1 및 0.9배 감소).

결론적으로, C215 파아지의 음성 조직 절편 흡착은 Ep-CAM 조직 항원 의존적이고, 33배의 효율까지 증명하였다. 또한, 결과는 서브트렉티브 선별이 음성 및 양성 선별 단계 둘 모두의 효율에 의존하는 것을 나타낸다.

재료 및 방법

동물

마카카 파스큘라리스 (Macaca Fascularis) 원숭이는 스톡홀롬의 스웨덴 감염 질환 관리 기관 (Swedish Institute for Infectious Disease Control)에 보관되어 있다. 원숭이에 백반을 첨가하거나 첨가하지 않은 (각각 2개체) 인간 결장직장 종양의 미정제 현탁액을 피하 투여하여 면역화하였다. 21일, 35일 및 29일에 추가자극하였다.

복합 면역 결핍 (SCID) 암컷 마우스 (C.B-17)을 보미스 (Bommice, RY, Denmark)로부터 제공받았다. 마우스를 스페셜 다이어츠 서비스 (Special Diet Services, Essex, UK)의 멸균 펠릿된 설치류 음식, 가용 멸균수 및 리비툼으로 마크로론 케이지 (Macrolone cage) (Ⅲ)의 병원균 배제 조건에서 사육하였다. 8-12주령 마우스 (세포주당 1마리)의 옆구리에 1% Balb/c 혈청중에 현탁된 2×10^6결장 암 세포, 콜로205, WiDR, HT29 또는 LS174T를 피하주사하였다. 종양을 지름 4-5 mm의 크기로 증식시키고, 절개한 뒤 면역조직화학법을 위하여 냉동하였다.

모든 동물을 스웨덴 법률에 따라 사육하였고 실험을 관할 위원회로부터 승인받았다.

세포 및 조직

인간 결장직장 세포주, 콜로201, 콜로205, 콜로320DM, SW480, SW620, WiDr, HT29 및 LS174T는 아메리칸 타입 티슈 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection, Rockvill, MD)에서 제공받았고, 콜로137은 CanAg AB (Gothenburg, Sweden)에서 제공받았다. 세포를 10% 열 불활성화된 우태아 혈청 (FBS) (Gibco) 및 겐타마이신 설페이트 (바이오로지컬 인더스트리스, Kibbutz Beit Haemek) 0.1㎎/㎖이 보충된 RPMI 1640 배지 (Gibco)에서 배양하였다. 인간 종양 및 정상 조직을 스웨덴의 룬드 대학 병원 및 말모 종합 병원에서 제공받았다. 서브트렉티브 선별을 위하여, 1차 결장직장암종 및 (종양 병반에서 5㎝ 이상의 거리에 위치한) 정상 결장 상피 조직의 여러쌍을 6 개체에서 제공받아 사용하였다.

라이브러리 및 모델 파아지

라이브러리 및 모델 파아지를 위하여 사용된 파아지미드 벡터, 증폭을 위한 프라이머 및 파아지미드 벡터로 삽입된 람다 경쇄 및 중쇄 유전자의 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의한 scFv 유전자 조립은 종래에 기술된 바 있다 (참고 문헌: Tordson etal., 1997). 간략하게, cDNA를 PE 바이오시스템스 (스톡홀롬, 스웨덴)의 RNA PDR 키트 및 프로메가의 RNA 분리 키트를 사용하여 총 비장 RNA로부터 증폭하였다. 본 연구에서 사용된 D1.3, C215 및 1F scFv 모델 파아지는 각각 엠피실린, 클로람페니콜 및 테트라사이클린 항생제 저항성 유전자를 코딩하여, 다른 항생물질을 함유하는 한천 플레이트를 사용한 콜로니 적정에 의해 파아지 혼합물에서 개개 파아지 역가를 분석하였다. 디스플레이된 항체는 암탉 달걀 라이보자임 (D1.3), 항-상피 부착 분자 (C215) 및 지금까지 알려지지 않은 상피 종양 세포 표면 분자 (1F)와 반응하였다 (참고 문헌: Tordsson et al).

서브트렉티브 선별

음성 선별 조직 (결장, 소장 또는 자궁)의 절편을 슬라이드에서 공기로 말리고, 얼음으로 냉각된 아세톤에서 고정하고, TBS 중의 20% FBS에서 다시 수화하였다. 20% FBS중의 라이브러리 파아지, 10^{10} 또는 10^{11} , 또는 모델 파아지 클론 혼합물, " 미니 (mini)-라이브러리" 를 목적하지 않는 파아지 특이성을 흡착하기 위하여 습한 대기에서 15-24 시간동안 4℃로 절편과 인큐베이션하였다.

흡착된 파아지 용액을 옮겨서 결장 암 종양의 절편상에서 양성 선별을 위하여 상기와 같이 인큐베이션하였다. 절편을 TBS 완충액으로 10분동안 6회 세척하고 기네나제 (Genenase) 완충액, 1M NaCl, 10mM Tris-HCl, 6mM $CaCl_2$, 1mM EDTA, pH 8.0으로 5분동안 세척하였다. 파아지를 실온에서, 기네나제 완충액중의 33 ㎍/㎖ 기네나제 400 ㎍로 30분동안 용출하였다. 용출된 파아지를 10배 농축된 E.coli 균주 DH5aF' OD_{600} 1.0 1 ㎖을 사용하여 회수하였다. 감염된 박테리아를 엠피실린 0.1 ㎎/㎖ 및 클로람페니콜 50 ㎍/㎖이 보강된 2×YT로 희석하고 24-37℃에서 1-24시간동안 배양하였다 (OD_{600} 가 0.5가 될 때까지).

헬퍼 파아지 M13K07 (MOI 약 10)을 첨가하여 2시간동안 계속하여 인큐베이션하고, 그 후에 최종 농도가 70 ㎍/㎖가 되도록 가나마이신을 첨가하고, OD_{600} 가 2-3이 될 때까지 (약 1-2일) 250 rpm으로 28℃에서 교반하여 배양하였다. 박테리아를 원심분리에 의하여 펠릿으로 만들로 상등액의 파아지를 PEG/NaCl 침전 및 원심분리에 의하여 펠릿을 형성하였다. 파아지 펠릿을 TBS에서 희석하였다.

테트라마이신 및 클로람페니콜 모델 파아지를 위하여 37℃에서 45분 배양하고 콜로니 적정하였다. 클로람페니콜 저항성 라이브러리 파아지미드 구조물을 위하여, 이 저항성 발현 기간을 2시간으로 연장하였다.

조직 절편에 선택적으로, PBS 중의 1% BSA의 살아 있는 세포를 모델 실험에서 양성 선별을 위하여 사용하였다. 흡착된 파아지를 옮겨서 1시간동안 3백만 콜로205 세포에서 인큐베이션하였다. 세포를 10분동안 3회 세척하고 상기에 기술된 바와 같이 100 ㎕ 기네나아제로 희석하였다. 상기 실험에서, 감소된 감염능을 가지는 파아지 및 코딩된 항생제 저항성 유전자 (10^{12} /㎖)를 잠재적인 비특이성 결합 부위를 감소시키기 위하여 첨가하였다.

음성 및 양성 선별 단계를 위한 조직 절편을 사용한 모델 실험에서, 비특이성 파아지 D1.3 scFv를 특이성 파아지와 동일한 농도 범위에서 사용하였다.

실시예 2

라이브러리 특이성의 후기 강화가 관찰되고 최적 다양성이 2회 선별 후기에서 관찰되었다.

작은데도 불구하고, 체내 대조군 파아지 D1.3 scFv와 비교할 경우에, 라이브러리 파아지의 수율은 라이브러리의 조직 특이성 파아지의 강화를 의미하는 6회 및 7회 선별 과정 사이에 증가하였다.

scFv 항체를 4개의 선별 과정의 후기 (160-280 클론/선별 과정)에서 라이브러리 파아지로 감염된 박테리아 클론을 배양함에 의하여 생산하였다. 결장 암 및 결장의 조직 절편에 결합된 scFv 항체의 빈도 및 체내 대조군 파아지에 대한 라이브러리 파아지의 상대적인 수율 (라이브러리 강화)을 도3에 도시하였다. 조직 반응성 scFv 항체 (29/280)는 15회의 선별과정까지 증명되지 않는데, 이는 음성 흡착이 일반적인 광범한 반응성 특이성의 강화를 억제한다는 것을 의미한다.

결장 암 세포에 대한 양성 선별을 위한 동일한 라이브러리 (참고 문헌: Tordson et al)를 사용한 종래 연구에서, 흑색종 조직 절편에 대한 양성 선별 (참고 문헌: Todson et al., 1997), 및 다양한 종양 세포에 대한 양성 선별 (공개되지 않은 결과)을 위한 흑색종 라이브러리를 사용하여 특이적 파아지의 고빈도를 2회 또는 3회 선별 과정에서 이미 달성하였다.

또한, 결장 암 라이브러리로부터 종래에 선별되지 않은 신규한 특이성을 서브트렉티브 조직 절편 선별을 위해 개발된 방법을 사용하여 동정하였다. 6개의 동정된 특이성 군을 나타내는 scFv 항체 클론의 면역조직화학 염색 유형을 도 4에 도시하였다. 항체 K302 scFv는 결장 암 조직과 강하게 결합하지만 (A), 결장의 상피의 라미나 프로프리아 (lamina propria) 및 페이어 패치 (Peyer's patch) 세포와 광범하게 반응하였다 (B, C). K293 scFv는 종양 조직의 세포 및 침전된 물질 (예를 들어, 뮤신)과 반응하고, 정상 결장 상피 세포의 내강측과만 반응하고, 페이어 패치와는 반응하지 않았다 (E, F). K302 scFv 항체는 종양 세포 및 결장 암 조직내의 추정 침윤성 세포와 반응하였다 (G). 상기 항체는 소낭선으로 깊이 정상 콜론 상피세포와 강하게 반응하지만, 라미나 프로프리아의 세포와는 반응하지 않았다 (H). K294 scFv는 결장 (I) 및 결장 암 (도시되지 않음)에서 인식된 항원의 세포내 위치를 제시하는 유형으로 반응한다. 클론 ⅢD9 scFv는 결장 암 세포와 반응하지만, 침전된 물질 또는 침윤성 세포와 반응하지 않았다 (J). 이것은 K293 scFv보다 결장 소낭성으로 보다 더 깊이 반응하지만, K320 scFv보다 더 제한적으로 보인다 (K). 마지막 항체 특이성, ⅡD11scFv는 혈관안쪽에 나열된 표면 층 (대부분 내피 세포)을 염색하였다 (L).

특이성 유형의 조성은 마지막 3회의 선별에 걸쳐서 변화하였다 (표 1). 단지 두 개의 유형, 가장 종양-제한된 군 K293 및 보다 광범한 반응성 K302 군만이 15회의 선별과정에서 관찰되었다. K293 군의 고빈도가 감소하고 K302군은 마지막 회 후에 증가한 반면에, 이들의 빈도는 15회 및 16회 선별 과정사이에 비교적 증가하지 않았다. 4개의 추가의 특이성 유형은 16회 선별 과정에 나타난다. 이들 유형의 세개는 마지막 회에서 사라졌다.

결론적으로, 제 2회의 후기 선별과정은 라이브러리에서 다수의 특이성 대 비특이성 파아지를 가진 최적의 다양성의 특이성군을 증명한 반면에, 광범한 반응성의 K302 특이성 군은 마지막 회의 선별 과정후에 우위를 차지한다. 이는 광범한 다양성의 특이성을 발견하는 최적의 선별 과정의 스크리닝의 중요성을 증명하고, 음성 선별 필터가 16회의 선별에 달하여 유효하고, 그 후에 이것이 포화됨을 제시한다.

표 1. 1회의 선별과정 (R)에 대한 결합 scFv 특이성의 빈도(%)

[표 1]

특이성군	R5	R6	R7
K293	69	65	28
K302	31	31	71
K320	0	1.1	0
K294	0	1.1	1.7
IIID9	0	0.6	0
IIDII	0	0.6	0
바인더 (binder)의 총 빈도	10	65	89

실시예 3

높은 빈도의 균질한 종양 선별 항원 발현은 K293-수퍼항원 융합 단백질에 의해 증명되었다.

가장 종양 한정된 특이성 군에서 대표적인 K293은 면역 효과기 (effector) 분자, 수퍼항원 스태필로코커스 내독소 A (superantigen Staphylococcal Enterotoxin), SAE (D227A)의 D227A 돌연변이에 유전적으로 연결되도록 재클론닝하였다. 본 융합 단백질은 배양기에서 배양되고 정제되어, 사용된 5개의 종양과의 균일한 반응을 증명하는데 사용되었다. 융합 단백질 K293 scFv-SEA (D227A)의 반응성은 Ep-CAM 특이성 융합 단백질 C215 Fab-SEA (D227A)와 비교할 경우에 도 5에서 도시된 결장 암 종양의 균일한 염색을 증명한다. 종양 관 내부에 침전된 물질의 염색 및 표면 상피세포에 대한 제한된 결장 반응성을 K293 scFv SEA (D227A) 융합단백질을 사용하여 확인하였다.

재료 및 방법

ScFv 항체 및 scFv-SEA(D227A) 생산

6회 및 7회의 라이브러리 선별 과정의 파아지로 형질 도입된 E.coli 비-억제자 균주 HB2151의 개개 클론을 37℃에서 17시간동안 엠피실린 100 ㎍/㎖로 보강된 2×YT 배지로 마이크로웰 플레이트 (Nunc)에서 배양하였다. 일정부분을 phoA 프로모터로부터 scFv를 발현하기 위한, 저인산 배지 및 항생제를 가진 마이크로웰 플레이트에 옮기고, 17시간동안 30℃에서 배양하였다. 7분동안 2200rpm으로 원심분리하여 세포를 펠릿으로 만들고, 상등액을 PBS 중의 1% 우태아혈청 알부민 (BSA)의 동일한 부피/웰을 함유하는 플레이트에 옮겼다. ScFv-SEA (D227A) 융합 단백질을 발효에 의하여 생산하고, 문헌 (Tordsson et al., 1997) 및 표준 방법에 따라 토끼 항-SEA 커플링된 친화성 칼럼을 사용하여 정제하였다. 정제된 융합 단백질을 캡처 (capture) 및 검출 항체로서 항-SEA 및 바이오티닐화된 항-SEA 항체를 사용하여 샌드위치 타입 ELISA에서 정량하였다. 융합 단백질의 완전성을 바이오티닐화된 토끼-항-SEA 항체를 사용하여 면역블랏팅 분석에 의하여 확인하였다.

면역조직화학

절편 (6-8 ㎛)을 얼음 냉각 아세톤으로 고정하고, 150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.6 (TBS)중의 20% FBS에서 재

수화하였다. 내인성 바이오틴을 아비딘 및 바이오틴으로 차단하였다 (Vector Laboratories, Burlinngame, CA). 제1의 scFvs (배양 상등액) 또는 scFv-SEA(D227A) 융합 단백질 5 μg/㎖을 1시간동안 절편과 함께 인큐베이션하였다. 바이오티닐화된 염소 항-토끼 항체 (DAKO A/S)에 의하여 후속되는 C-말단 태그에 대한 토끼 항혈청 1 μg/㎖을 scFvs를 검출하는데 사용하였다. 융합단백질을 친화성에 의하여 정제하고 바이오티닐화된 토끼 항-SEA 항체, 5μg/㎖를 사용하여 검출하였다.

상기 반응물 및 하기 50mM Tris pH 7.6에서 1/110으로 희석된 StreptABC복합체 HRP (DAKO A/S)를 30분동안 인큐베이션하였다. 모든 단계 사이에서 절편을 TBS로 3회 세척하였다. 염색 반응을 0.01% H_2O_2를 함유한 Tris pH 7.6중에 용해된 3,3'-디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드 (시그마) 0.5 μg/㎖ 중에서 8분동안 전개하였다. 0.5% 메틸 그린중에서 10분동안 대비염색한 후에, 슬라이드를 수도물로 10분동안 헹구고, DPX 배지 (시그마)에서 마운팅 (mounting)하기 전에 70-99% 에탄올 및 자일렌중에서 천천히 탈수하였다.

핑거 프린팅 scFvs

ScFv 유전자 (scFv 특이성의 대표물)를 중합효소연쇄반응에 의하여 증폭하였다. 마이크로웰 박테리아 배양물의 일정부분 5 μℓ 및 트랜스펙션된 박테리아의 파아지미드 벡터의 scFv 유전자의 5' 및 3' 부위 (phoA 프로모터 및 M13 유전자III 부위)에 상보적인 프라이머를 사용하였다. 증폭된 scFv 유전자의 Hinf I 절단 유형을 1% 아가로스 겔 전기영동에 의하여 분석하였다. 독특한 유형 또는 원형 (prototype) 유형을 가진 클론을 선택하고 각 면역조직화학적 특이성군의 대표물로서 보관하였다.

실시예 4

체외 K293 항원 발현의 부재 또는 하향 조절은 (본래의 체내 형질의 보전을 나타내는) 조직 기초된 선별 원칙의 잇점을 반영하였다

가볍게 혼합된, 환자로부터 잘라낸 종양의 조직 절편은 (배양된 종양 세포와 비교할 경우에) 원래의 종양 형질과 거의 유사한 (파아지 선별을 위한) 복합 항원의 공급원이다. 균일하고 빈도가 높은 환자 유래 종양과의 반응성과 대조를 이루어, K293 scFv-SEA (D227A) 항체는 2/9 (HT29 및 LS174T)와 약하게 반응시키고, C215 Fab-SEA (D227)와의 보통 내지 강한 반응과 대조한 경우에 플로우사이토메트리에 의하여 관찰한 결과, 7/9 (콜로201, 콜로205, 콜로137, 콜로320DM, SW480, SW 620 및 WiDr) 결장 암 세포주와 반응하지 않았다. 음성 세포주 두 개 (콜로205 및 WiDr) 및 두 개의 약한 반응성 세포주를 SCID 마우스에 피하로 주입하여 증식시켰다.

상기 종양과 K293 scFv-SEA(D227A)와의 반응성을 분석하기 위하여 면역조직화학법을 사용하였다. 콜로205 종양은 완전히 음성인 반면에, WiDr 종양의 종양 세포는 음성이지만 침착물은 양성이었다. HT 29는 세포의 소수 분획, 약 5-10% 및 침전 물질에 대해 양성이었다. LS174T 종양은 세포의 약 50%에 대해 불균일하게 양성이고, 침전 물질에 대해 양성이었다. 따라서, 1차 환자 종양의 K293 에피토프의 빈도가 높고 균일한 발현은 체외 배양된 종양 세포 및 이종 숙주에서 증식된 세포주 유래 종양에서 모두 관찰되지 않았다. 이것은 파아지 선별을 위한 항원 공급원으로서 조직 절편의 사용이 종양 제한된 K293 특이성을 발견하는데 기본적이라는 것을 증명한다.

플로우사이토메트리에 의해 검출되는 두 개의 세포주의 K293 에피토프의 약한 발현은 인식된 TAA가 종양 세포의 표면에 발현될 수 있음을 제시한다. 체내 표면 발현은, 종양을 세포 현탁액으로 분해하기 위하여 디스파제 (중성 단백질 분해효소) 및 콜라게나아제로 처리하여, 절단된 1차 결장암종에서 유래된 종양 세포에 수행된 프로우사이토메트리에

의하여 확인하였다. mAb C215에 의하여 검출된 바와 같이, EP - CAM+ 세포와 같은 다른 세포 (예를 들어, 섬유아세포, 혈액 세포 및 평활근세포)와 구별되는 종양세포를 K293scFv - SEA(D227A) 반응성에 대해서 이중염색하였다 (도 6). Ep - CAM 양성 종양 세포의 큰 분획을 세포를 추출하기 위하여 필요한 O. N. 효소 처리후에 K293과 반응시켰다 (약 60%).

다양한 세기이기는 하지만, K293scFv - SEA(D227A) 반응성을 절단된 1차 종양의 세포를 사용하여 3개의 추가 실험에서 증명하였고, 이는 K293 TAA가 자가 숙주의 종양 세포의 표면에 발현된다는 것을 지지한다.

표 2. K293 항체는 1차 결장암종을 균일하게 염색하지만, 체내 또는 이종 죽주에서, 예를 들어 SCID 마우스에 피하로 주입되어 배양된 결장 암 세포주를 약하고 불균일하게 염색한다.

세포주	플로우사이토메트리	SCID 마우스에서의 S. C 증식	1차 결장 암종
콜로205	음성	음성	5개의 1차 결장 암종의 균일한 염색이 선별을 위하여 사용됨*
WiDr	음성	음성*	
HT29	약한 양성	5-10% 양성 세포*	
LS174T	약한 양성	50% 불균일 양성*	

* 침전된 물질은 강한 양성이다.

재료 및 방법

플로우사이토메트리

배양된 종양 세포 또는 신선하게 준비된 종양 세포에 대한 스태필로코커스 내독소 A, SEA에 유전적으로 연결된 항체의 반응성을 바이오티닐화된 토끼 항 - SEA 항체 및 아비딘 - PE를 사용하여 증명하였다.

1차 인간 결장 암 세포는 같은 날에 절단된 결장직장 암 종양에서 유래되었고, 사용시까지 150 mM NaCl중에서 얼음중에서 보관하였다 (4시간 미만). 종양을 작은 조각으로 자르고, RPMI 1640 배지에 희석된 콜라게나아제 (시그마) 1 ㎎/㎖ , 후아루로니다제 (hualuronidase) (시그마) 0.1 ㎎/㎖, 디스파아제 (Boehringer Manhheim) 2.4 ㎎/㎖, 디옥시리보뉴클레아제 20 ㎍/㎖ (시그마)를 함유하는 용액중에서 밤새 실온에서 천천히 로킹 (rocking)하였다. 종양 세포를 여과에 의하여 조직 파편에서 분리하고 PBS/1% BSA로 1회 세척하고 난 후에, C215 mAb 5 ㎍/㎖ / 1/20으로 희석된 토끼 - 항 - 마우스 - FITC (Dakopatts), 및 K293scFv - SEA (D227A) 5 ㎍/㎖/ 1/1000으로 희석된 바이오티닐화된 폴리클로날 토끼 항 - SEA 항체/ 1/20으로 희석된 아비딘 - PE로 염색하였다.

실시예 5

K293FabSEA/E11은 상피 종양을 강하고 빈도가 높게 염색하였다.

다양한 인간 종양의 면역조직화학 반응을 표 3에 요약하였다. K293FabSEA/E11을 결장, 췌장, 허파 및 유방의 선암에서 강한 양성 반응을 보였다. 악성 세포 및 선 구조의 뮤신 - 유사/분출 물질에서 강한 반응이 관찰되었다. 신장 또는 전립선 암에서 어떤 반응도 관찰되지 않은 반면에, 두 개의 악성 흑색종 중 하나는 약한 반응 내지 보통 반응을 보였다. 결장 암에서 모든 12개의 관찰된 종양은 강한 양성반응을 보이며 염색되었다.

개체의 종양내의 양성 악성 세포의 빈도는 75 내지 100%로 다양하다. 6개의 유방 종양중 5개가 75 - 100%의 양성 악성 빈도로 강한 양성을 보였다. 결장암종 및 유방암종내의 양성 세포의 빈도는 75 내지 100%로 다양한데도 불구하고, 대다수의 종양은 90% 을 초과하여 양성 반응을 보였다. 또한, 2개의 검사된 췌장 종앵의 2개가 90%를 초과하는 악성 세포에서 강한 반응을 보였다.

비소세포성폐암종 (NSCLC) 중에 2개가 편평 세포 암종이고, 4개가 허파선암종이었다. 모두 강한 악성 세포의 염색을 보였다. 두개의 검사된 편평 세포 암종 양성 염색은 종양 세포의 90% 이상에서 관찰되었다. 선암종에서 2개가 90% 종양 세포 반응성을 나타냈고, 2개가 10% 미만에 대해서 양성이었다.

서로 다른 결장 암에 대한 K293FabSEA/E11의 반응성 유형은 종양의 분화정도와 관련되는 것으로 보인다. 고도로 분화된 종양에서, 악성 세포의 근첨단 염색이 우세하다. 일부의 상기 고도로 분화된 종양에서, 악성 세포의 바소-래터럴 (naso-lateral) 부분은 완전히 음성인데 반하여 근첨단 부분이 강한 양성을 보였다. 약하게 분화된 종양 및 보통으로 분화된 종양에서, 면역 반응은 일정 부분으로 분극화되지 않으나, 비교적 일정하게 악성 세포에 분배되었다.

표 3. 종양 조직 반응성, K293FabSEA/E11

[표 2]

결장암, 1차 종양	12/12 종양에서 강한 염색. 75-100% 종양 세포 반응성. 또한 뮤신-유사/분출 물질에서 관찰되었다.
결장암, 전이성	3/4 종양*에서 강한 염색. 75-100% 종양 세포 반응성.
췌장암	2/2 종양에서 강한 염색. 90% 종양 세포 반응성.
유방암	5/6 에서 강한 반응 (75-100% 종양 세포 반응성). 또한, 뮤신-유사/분출 물질에서 관찰되었다.
비소세포성폐암종 (NSCLC)	6/6에서 강한 반응. 2/6에서 < 10% 종양 세포 반응성. 또한, 뮤신-유사/분출 물질에서 관찰되었다.
악성 흑색종	1/2에서 약한-보통 반응 (90% 조양 세포 반응성). 1/2에서 음성.
전립선암	2/2에서 음성.
신장암	2/2에서 음성.

* 양성 전이중 하나를 포르말린에 고정하고 파라핀 침지시켰다.

실시예 6

K293FabSEA/E11는 매우 제한된 정상 조직 교차반응성을 보였다.

정상 조직 반응성은 연구된 기관의 패널중에서, 결장, 소장 및 유방에 제한외었다. 상피 세포의 근첨단 부분의 강한 염색을 결장에서 관찰하였다 (도 8). 또한, 이는 소장의 두개의 생체 검사 재료 중 하나에서 관찰되었다. 상기 생체 검사 재료는 서로 다른 부위에서 수집되었고, K293FabSEA/E11만이 소장의 일정부분과 반응함을 의미한다. 유방 조직에서 약한 반응 내지 보통 반응은 선상피 세포 및 주변 기질의 부분에서 관찰되었다 (도 8). 위, 비장, 신장, 간, 허파, 피부, 췌장, 갑상선, 심장근 또는 CNS 에서는 반응이 관찰되지 않았다 (표 4).

표 4. 정상 조직 반응성, K293FabSEA/E11

[표 3]

결장	상피 세포의 근첨단 부분에서 강한 반응. 5/5
소장	상피 세포에서 강한 반응. 1/2
위	음성. 2/2
유방	선 상피세포 및 주변 기질에서 약한 반응 내지 보통 반응. 2/2
비장	음성. 2/2
신장	음성. 2/2
간	음성. 2/2
허파	음성. 2/2
피부	음성. 2/2
췌장	음성. 2/2
갑상선	음성. 2/2
신장 근육	음성. 2/2
CNS	음성. 2/2

재료 및 방법

면역조직화학법

광학 현미경용 냉동절단

외과 (Lund University Hospital)에서 제공된 종양 및 정상 조직을 액체 질소에서 미리 냉각한 이소펜탄중에서 급속 냉각시키고, -70℃에서 저장하였다. 냉각절단 후에 절편을 밤새 공기 건조하였다. 절편을 냉각 아세톤중에서 고정하고 내인성 바이오틴에 대해 아비딘/바이오틴 (Vector, Burlingame CA)으로 차단하고, 1시간동안 1차 항체 K293FabSEA/E11과 함께 인큐베이션하였다.

융합 단백질을 K293 VH 및 VL 유전자 (라이브러리에서 선별된 scFv에서 수득)를 키노몰구스 (cynomolgus) CH1 및 C-람다 유전자에 유전적으로 융합하여 제조하였다. 화합된 Fab를 수퍼항원 스태필로코커스 내독소 AE 키메라 돌연변이 (D227A)에 연결하여 상당히 감소된 MHC 클라스 II 결합을 증명하였다. 상기 구조물, K293FabSEA/E11은 매우 낮은 수준의 비특이성 결합을 증명하고, 표준 방법에 의해 생산되고 바이오티닐화된 2차 항체 폴리클로날 토끼 항-SEA 항혈청에 의한 민감한 검출을 가능하게 하였다.

2차 항체를 30분동안 인큐베이션하고, 추가 30분동안 스트렙타비딘-바이오틴/HRP (Dakopatts, Copenhagen) 단계를 수행하였다. 모든 단계 사이에서, 0.05M Tris pH 7.6 및 0.15M NaCl로 3회 세척하였다. 디아미노벤지딘 (DAB)를 색소원으로 사용하고 절편을 0.5% 메틸 그린으로 대비염색하였다. 양성 대조군으로서, 팬(pan)-상피 반응성 융합 단백질, C215FabSEA (D227A)를 사용하였다. 음성 대조군으로서, 비조직 반응성 Fab 및 SEA-D227A 의 융합단백질을 사용하거나 1차 항체를 사용하지 않았다. 모든 항체를 5 ㎍/㎖의 농도로 사용하였다. 결과를 각각 음성 염색, 약한 염색, 보통 염색, 강한 염색으로 표현하였다.

광학 현미경용 파라핀 절편

림프 결장 암 전이의 종양 조직을 밤새 4℃에서 4% 포름알데히드 (시그마, ST. Lous MO)에 고정하였다. 조직을 PBS로 헹군후에, 조직을 탈수하고 파라핀 (Histolab AB, Gotherburg, Sweden)에 침지하였다. 파라핀 절편을 준비하고 밤새 37℃에서 건조하였다. 절편을 탈파라핀화하고 재수화하여 상기에 기술된 바와 같이 면역조직화학적으로 염색하였다.

실시예 7

K293FabSEA/E11/E11은 표면 발현된 항원을 인지하였다.

면역 반응의 세포이하의 국소화를 8 ㎛ 냉각 절편에 필적하는 얇은 절편상에서 보다 더 정확하게 증명하였다. 2 ㎛ 플라스틱 절편에서 결장 암 세포의 바소-래터럴 세포 막 및 근첨단을 증명하는 것이 가능하였다 (도 9a의 A). 또한, 상기 종양 표본을 전자 현미경을 위하여 처리하였다. 전자 현미경의 해상도에서, 면역 반응이 종양 세포의 외부 표면으로 국소화됨을 증명할 수 있었다. 염색후에 2 ㎛ 다소 얇은 절편 및 정상 결장의 전자현미경 관찰은 면역 반응이 내강 상피에서 미세 융모의 외부 표면의 수준에서 국소화됨을 증명하였다 (도 9a의 A 및 도 9b의 C).

재료 및 방법

광학 현미경 및 전자 현미경의 플라스틱 절편

종양 및 정상 조직 물질을 하기 기술한 바에 따라 처리하였다. 신선한 절편 물질을 4% 포름알데히드 (시그마, St. Louis MO) 및 0.25% 글루타르알데히드 (TAAB, Berkshire)의 혼합물중에 2시간동안 혼합하였다. PBS로 헹군 후에, 30% 수크로오즈를 함유하는 PBS로 헹구어서 냉동보호하고, 상기와 같이 이소펜탄/액체 질소로 급속 냉동시켰다. 50 ㎛ 부유된 냉동 절편을 광학 현미경을 위하여 기술된 바와 같이 동일한 항체로 인큐베이션하였고, 다만 인큐베이션 시간은 다르게 하였다. 1차 항체를 밤새 인큐베이션하고, 2차 항체를 3시간동안, 스트렙타비딘-바이오틴/HRP를 추가 3시간동안 인큐베이션하였다. DAB에서 반응시킨 후에, 절편을 1% OsO_4 (Standard supplies, Kallered)중에서 덧붙이고, 탈수하여 에폰 (Epon) (Agar Scientific Ltd, Stansted, U. K.)에 침지시켰다.

광학 현미경을 위한 박절편 (2 ㎛) 및 전자 현미경을 위한 초박절편 (50-60㎚)을 초마이크로톰 (LKB, Bromma, Sweden)상에서 준비하였다.

박절편을 1% 메틸렌블루로 대비염색하였다. 초박절편을 울트라스테인너 (LKB, Bromma)에서 2% 우라닐아세테이트 및 리드시트레이트로 염색하였다.

실시예 8

K293FabSEA/E11은 결장 암 환자의 혈청중의 순환하는 항원을 검출하지 못하였다.

도 10은 결장직장 암 환자 및 한 명의 건강한 인간의 혈장 시료로 각각 인큐베이션 한 후에 방사선표지된 SEA 융합단백질 구조물 및 순환하는 종양 항원의 분획의 크기를 도시한다.

K293Fab-SEA/E11에 대하여, 건강한 개체의 혈장으로 인큐베이션한 경우와 비교할 경우에, 종양 환자의 혈장으로 인큐베이션할 때 단백질 복합체가 1.5배미만으로 발견되었다. 다른 한편, C242-Fab-구조물 (양성 대조군)에 대해서, 종양 환자의 혈장을 인큐베이션한 경우에 복합체 형태가 8배 이상 발견되었다. 이와 같이, K293Fab-SEA/E11은 암 환자에서 순환하는 임의의 항원을 인지하지 못했다.

재료 및 방법

시험 화합물 조성

K293Fab-SEA/E11, C215Fab-$SEA_{mut.9}$ 및 C242-Fab-$SEA_{mut.9}$ 의 50 ㎍을 아이오도젠 사전코팅된 튜브 (Iodogen precoated tube) (Pharmacia-Amersham Biotech)을 사용하여 10 μCi/㎍의 특이적 활성으로 ^{125}I로 표지하였다. 표지된 시험 화합물을 단백질 농도 및 HPLC에 의한 특이적 반사능에 관하여 측정하였다 (하기 참조).

혈장 시료를 결장직장 암 환자 (n=12)로부터 수집하여, 상업적인 분석법에 의하여 높은 수준의 순환하는 CA242 항원을 증명하였고, 한 명의 건강한 인간으로부터 수집하여 낮은 수준의 혈장 CA242를 증명하였다.

혈장중의 시험 용액의 분석

희석되지 않은 혈장 시료 50 ㎕를 시험 화합물의 1 ㎍/㎖로 주변온도에서 60분동안, 인큐베이션 혼합물을 셰이킹 (shaking)하면서 인큐베이션하였다. 모든 시료를 HPLC에 의하여 분석하였다.

혈장 시료는 SEA에 대한 항체를 함유하고 잘못된 양성 상호작용 신호를 제공하기 때문에 이들을 단백질 A와 인큐베이션하여 면역글로불린을 제거한였다. 상기 제거 단계 후에, 항-SEA 용량은 < 10 pmol/㎖이었다. 암 환자로부터 풀링된 혈장중의 CA242의 혈장 용량은 479 U/㎖이고, 단백질 A로 인큐베이션 한 후에 건강한 제공자 시료의 경우에는 20 U/㎖이었다.

표지된 시험 물질 및 준비된 시료를 크기 배제 HPLC에 의하여 분석하였다. 시료 50 ㎕를 주입하여 (Waters 717 Auto Sampler), TSK G3000 SW 칼럼 (7.5×600 mm, Toso Haas)상에서 분리하였다. 시료를 주변온도에서 10 mM PBS, pH=7.4, 용출속도 1.0 ㎖/min으로 용출하였다. 연속하여 연결된 UV 검출기 (A280 nm, Waters 486) 및 방사능 검출기 (Flo-One, A-515-AX)로 검출하였고, 결과를 시료에 따라 35 내지 60분동안 수집하였다. 결합된 시험 복합 화합물을 함유하는 분획은 시험 화합물보다 크로마토그램에서 보다 먼저 나타나는 고분자량 피크로서 나타났다. 유리 요오드 및 요오드 표식 단편을 함유하는 분획은 저분자량 피크로서 관찰되었다. 방사능 크로마토그램을 적분하여 복합 시험 화합물 및 저분자량 피크의 면적을 전체 면적의 %로 표현하였다.

실시예 9

결장 암 반응성 항체 K293에 의하여 인지되는 종양 관련 항원의 정제

종양 추출물을 인간 결장 암 조직으로부터 준비하였다. 추출물을 두개의 칼럼, C215Fab-SEAm9가 결합된 대조군 및 전처리칼럼, 및 K293Fab-SEAm9로 결합된 칼럼에 적용하였다. 조직 추출물을 칼럼에 적용할 경우에는 칼럼을 연속하여 연결하였으나, 결합된 단백질의 알카리성 용출시에는 분리하였다.

C215Fab-SEAm9가 결합된 칼럼으로부터 용출된 분획을 수집하고, 중화하여 농축한 후에 비환원조건에서 SDS-PAGE에 의하여 분석하였다 (도 11). 주요 밴드 (도 11에서 A로 표지)는 높은 pH에서 용출된 분획에서 약 35-45kDa로 나타났다. 주요 밴드를 잘라 트립신으로 단백질 분해성 소화를 수행하였다. 생산된 트립신 처리 펩티드 단편을 분리하여 N-말단 아미노산 잔기의 앞에서 10개의 서열을 이들 분리된 펩티드의 세개에 대하여 결정하였다 (도 12). 결정된 세개의 짧은 N-말단 펩티드 서열 (서열 목록 ID NO 3-5)는 인간 단백질 글리세르알데히드 3-포스페이트 디하이드로게네이즈 (GADPH)의 일부와 완전한 상동성을 보였다 (도 13).

재료 및 방법

종양 조직의 용해

K293 항원을 발현하는 인간 결장 암 조직은 스웨덴의 병원에서 제공받았고, ABR의 조직 은행에서 -70℃에서 냉도 보관하였다. 냉동 결장 암 조직을 외과용 메스로 자르고, 1% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40) 및 프로티아제 억제제 (Complete^{TM} Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Boeringer Mannheim)를 함유하는 4℃의 냉각처리된 등장 수크로오스 완충액 (0.25M 수크로오스, 10mM KCl, 1.5 mM MgCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 25℃)이 들은 튜브로 옮겼다. 조직 슬라이스를 울트라-투락스 호모게나이저 (Ultra-Turrax homogeniger)로 균질화하고 0℃에서 용해시켰다. 용해된 용액을 11000 rpm에서 원심분리하고 (Hettich centrifuge, Universal 30RF rotor) 세포 파편의 대부분을 제거하였다. 상등액을 4℃에서 108000으로 추가로 원심분리하고 (Beckman ultracentrifuge, Ti-60 rotor) 최종적으로 0.2㎛ 미니사르트 플러스 필터 (Minisart plus filter, Satorius A G, Gottingen, Germany)로 최종적으로 여과하였다.

조직 항원의 흡착 크로마토그래피

항체, K293Fab-SEAm9 및 C215Fab-SEAm9를 제조자의 지시에 따라 HHS-활성화된 HiTrap?칼럼 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 결합하였다. C215Fab-SEAm9와 결합된 대조군 및 전처리 칼럼 및 K293Fab-SEAm9와 결합된 칼럼을 연속하여 연결하여, 출발 완충액 (0.2% NP-40을 함유하는 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 4℃)으로 사전 세척하였다. 그 다음에, 추출물을 0.1 ㎖/min으로 칼럼에 로딩 (loading)하고, 전체 유출량을 재순환시켰다. 각 칼럼에 결합된 항원을 디에틸아민을 농도구배로 pH7로부터 pH 11까지 20분에 걸쳐서 용출하였다. 분획 0.5 ㎖을 수집하고 1M Tris-HCl 0.1㎖, pH 6.7로 중화하고, -20℃에서 보관하였다. AKTA FPLC 시스템 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 사용하여 4℃에서 정제하였다. 용출된 분획을 풀링하고 농축하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 동정된 단백질 밴드를 잘라 4℃에서 저장하였다. 그 다음에, 단백질을 트립신으로 소화하여 N-터미날 펩티드 서열을 단백질 분석 센타 (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden)에서 개개 펩티드를 위하여 결정하였다.

실시예 10

K293FabSEA/E11은 복합 면역결핍 (SCID) 마우스에서 종양 증식을 억제할 수 있다.

수퍼항원 SEA는 시토카인 생산 및 세포독성에 대해서 T 림프구를 활성화할 수 있는 능력을 가진다. 수퍼항원이 종양 반응성 항체와 융합된 경우에 이는 종양 세포를 표적으로 한다. 종양 부위의 수퍼항원의 국소화는 종양 세포를 선택적으로 사멸하게 한다.

시험의 결과를 도 14에 도시하였고, 이는 K293FabSEA/E11로 처리된 동물이 비-표적된 NRML-05 (항-흑색종) FabSEA (D227A)로 처리된 대조군 동물과 대조할 경우에, 종양 질량의 80%가 감소되었음을 가리킨다.

재료 및 방법

복합 면역 결핍 (SCID) 마우스 (Bommice, Ry, Denmark)에 5×10^{6} LS174T 결장암 세포 (ATCC, Rockville, MD)를 피하로 0.2 ㎖ 브히클 (vehicle) (PBS-1%Balb/c 혈청) 주사하였다. 24시간 후에, 병원 (the University hospital of Lund Sweden)에서 혈액 제공자로부터 획득한 연층 (buffy coat)의 피콜-하이파크 분리 (Ficoll-Hypaque seperation)에 의하여 제조된 인간 말초혈 단핵 세포 20×10^{6}을 마우스에 피하로 주사하였다. 종양 주사후 1, 3 및 6째일에, 동물을 NRML-05FabSEA/D227A 100㎍ (동물 6마리) 및 K293FabSEA/E11 100㎍ (동물 7마리)으로 처리하였다. 51일째에, 동물을 죽여서 종양 소결절을 제거하고 질량을 측정하였다.

참고문헌

- Hoogenboom HR, de Burine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC, Antibody phage display technology and its applications, Immunotechnology 4:1, 1998

- Kerbel RS, Significance of tumor-host interactions in cancer growth and metastases, Cancer Metastasis Rev 14: 259, 1995

- Kohler G, Milstein C, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, Eur J Immunol 6: 511, 1976

- Tordsson J, Abrahmsen L, Kalland T, Ljung C, Ingvar C, Brodin T, Efficient selection of scFv antibody phage by adsorption to in situ expressed antigen in tissue sections, J Immunol Methods 210: 11, 1997

- Tordsson J, Lavasani S, Ohlsson L, Karlstrom P, Svedberg H, Abrahsen L and Brodin T, A3 - a novel colon and pancreatic cancer reactive antibody from a primate phage library selected using intact tumor cells, submitted to Int J Cancer

- Williams KL, Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology, Electrophoresis 20: 678, 1999

도면 범례

도 1. 서브트렉티브 선별의 원칙. 광범한 반응성 파아지 (흑색)의 특이적 부착 및 양성 선별 과정동안 세척에 의한 비-디스플레이되고 비특이적인 파아지 (백색)의 감소. 다음에 종양 제한된 파아지 (표지됨)를 용출하였다.

도 2. 유효한 서브트렉티브 선별. 콜로205 세포에 대한 양성 선별후에 자궁 또는 소장 조직 절편에 대한 음성 흡착 (A). 자궁, 소장 또는 허파 조직 절편에 대한 2회의 반복된 흡착 및 콜로205 종양 조직 절편 (B)에 대한 양성 선별.

도 3. 서브트렉티브하게 선별된 라이브러리의 조직 특이적 파아지의 패널의 후기 강화.

도 4. 라이브러리 선별된 scFvs의 면역조직화학 염색 유형 (A). 결장암종 (B) 및 K302 scFv로 염색된 페이어 패치 (C) 및 K293 scFv로 염색된 페이어 패치 (D-F). K320 scFv로 염색된 결장 암종 (G) 및 결장 상피 (H) 및 IIID9 scFv로 염색된 결장 암종 및 결장 상피 (J, K). K294 scFv (I)로 염색된 결장 상피 및 IID11scFv (L)로 염색된 결장 혈관.

도 5. 100nM의 결장암 (A) 및 결장 (B)에 대한 K293 scFv-SEA (D227A)의 면역조직화학 반응성 및 결장 암 (C) 및 결장 (D)에 대한 C215 Fab-SEA (D227A)의 면역조직화학 반응성. (A)의 바 (bar)는 100㎛이다.

도 6. 절단된 1차 인간 결장 암종으로부터 신선하게 준비된 결장 암 세포에 대한 플로우사이토메트리. 크기, 과립성 (A, B) 및 상피 세포에 대한 표지로서의 Ep-CAM 발현에 대한 게이트된 (gated) 세포를 5㎍/㎖ K293scFv-SEA (D227A) (회색선)으로 염색하거나 1차 항체 융합 단백질 음성 대조군 (흑색선) (C)

도 7. 서로 다른 종양의 K293FabSEA/E11 염색. A. 선 구조에서 악성 세포 및 뮤신 유사 물질 (m)의 강한 염색을 나타내는 보통으로 분화된 결장암. B. 악성 세포의 강한 근첨단 (화살표)을 나타내는 고도로 분화된 결장 암의 염색, 반면에 신생물성 선의 기저부분은 무반응성이다. C. 유방 종양의 악성 세포의 강한 염색 (화살표). D. 허파 선암종의 악성 세포의 강한 염색 (화살표). A의 바는 50㎛를 나타내고 B-D에도 유효하다.

도 8. A. 정상 결장의 K293FabSEA/E11. 상피 세포의 근첨단 염색 (화살표). 결장의 내강과 접해있는 상피 세포에서 면역 반응이 관찰되는 반면에, 소낭선 (c)는 음성이다. B. 정상 유방의 K293FabSEA/E11 염색. 약한 염색 내지 보통 염색을 선상피에서 관찰된다. C. 팬-상피세포 표지 C215 및 SEAD (227A)간의 FabSEA 융합단백질 (FabC215SEA-D227A)로 염색된 정상 유방. 선상피 세포 (g)의 강한 표지 (g). 간질 부분 (s)에서는 반응이 관찰되지 않는다. D. 정상 유방 음성 대조군 (1차 항체 없음)은 선상피 세포 (g) 및 간질 부분 (s)에서 반응을 나타내지 않는다. A의 바는 50㎛이다. B의 바도 50㎛이고, C 및 D에 유효하다.

도 9. K293FabSEA/E11로 염색한 결장 암 (A) 및 정상 결장 (B)의 박절편. 결장 암 절편에서, 종양 세포의 기저 (화살표 b), 근첨단 (화살표 a) 및 측면 부분이 양성으로 염색된다. 정상 결장에서 상피세포의 근첨단 표면 (화살표)에서 관찰된다. 전자 현미경은 면역반응이 정상 결장 상피 세포 (C, 화살표)에서 미세 융모의 표면에 국소화됨을 도시한다. A의 바는 30㎛이고 B에 대해서도 유효하다.

도 10. 결장 암 환자 및 건강한 인간의 혈장 성분에 대한 항체 SEA 융합 단백질의 복합체 형성의 분석. 고분자량 부분에서 용출된 방사능의 백분율을 도표로 나타낸다. 결장 암 환자의 혈장에 대한 C242FabSEA의 높은 결합 정도를 알 수 있다.

도 11. K293-결합된 친화성 칼럼에 의해 용출된 분획의 비환원 SDS-PAGE 분석 (레인 1). A로 표시된 주밴드를 아미노산 서열 분석을 위하여 잘라낸다. 분자량 기준 물질의 위치를 도시한다.

도 12. K293-친화성 정제에 의하여 분리된 34-45 kDa 단백질 밴드 (A로 표지)의 세개의 트립신 소화된 펩티드 단편의 서열 목록 ID NOS: 3-5의 N-말단 서열 (도 1 참조).

도 13. 서열목록 ID NO 2: 1, 2, 및 3의 펩티드 서열을 글리세르알데히드 3-포스페이트 디하이드로게네이즈와 비교 나열하였다.

도 14. 인간 말초혈 단핵 세포 (PBMC)로 보강된 SCID 마우스의 LS-174T 종양 세포의 증식에 대한 FabSEA 융합 단백질의 면역치료 효과. K293FabSEA/E11로 처리후에 종양 질량 (㎎) 감소를 알 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

결합 구조가 SEQ ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 160-165 (CDR1), 180-195 (CDR2), 228-238 (CDR3)에 의하여 필수적으로 정의되는 중쇄 CDR 구조에 의해 주로 결정되고, 추가의 결합 특이성이 SEQ ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 23-36 (CDR1), 52-58 (CDR2), 91-100 (CDR3)에 의하여 필수적으로 정의된 하나 이상의 경쇄 CDR 구조에 의해서 제공되는, 종양 세포의 세포 표면에서 및/또는 세포 표면과 결합하는 결합 구조.

청구항 2.

SEQ ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 23-36 (CDR1), 52-58 (CDR2), 91-100 (CDR3)를 필수적으로 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 160-165 (CDR1), 180-195 (CDR2), 228-238 (CDR3)를 필수적으로 포함하는 중쇄에 하나 이상의 항체의 상보성 결정 부위 (CDR) 서열을 포함하는, 종양 세포의 세포 표면에서 및/또는 세포 표면과 결합하는 결합 구조.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, CDR 서열 모두를 포함함을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 4.

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 및/또는 이들의 단편임을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 5.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, SEQ ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 1-110을 필수적으로 포함하는 경쇄의 가변 부위 및 SEQ ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 번호 130-249를 필수적으로 포함하는 중쇄의 변위 부위를 포함하는, 항체 및/또는 이들의 단편임을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 항체가 SEQ ID NO: 2에 도시된 아미노산 서열을 포함함을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 7.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 원발성 및/또는 전이성 결장직장 암종, 췌장 암종, 유방 암종 및/또는 폐 암종 세포를 포함하는 군으로부터 선택된 상피 종양 세포의 세포 표면에서 및/또는 세포 표면과 강하고/거나 균일하게 결합함을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 8.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 신장 및/또는 전립성 암종 및/또는 악성 흑색종 세포와 약하고/거나 불균일하게 결합하거나/고 결합하지 않음을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 9.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 결장 표면 상피 및 소장의 상피의 근첨단 부분과 강하게 결합함을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 10.

제 9항에 있어서, 결장 표층 상피 세포의 융모 및/또는 솔변연 (brush border)의 세포 표면의 근첨단 부분에 결합함을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 11.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 포유동물 선 상피 및/또는 이의 주변 결합 조직과 약하게 내지 보통으로 결합함을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 12.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 비장, 신장, 간, 허파, 피부, 췌장, 갑상선, 심장근 및/또는 CNS와 약하고/거나 불균일하게 결합하고/거나 결합하지 않음을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 13.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 파아지 선별에 의해 제공되는 결합 구조.

청구항 14.

제 13항에 있어서, 파아지 선별이 파아지 입자에 디스플레이된 결합 구조의 체내에서 면역학적으로 사전 선별된 레파토리 및 서로 다른 표현형의 여러 쌍의 조직의 사용에 의한 파아지 입자의 서브트렉티브 선별의 조합을 포함함을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 15.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 서열이 마카카 파스큘라리스 (Macaca Fascularis) 유래임을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 16.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 서열이 인간 기원의 대응하는 서열과 78% (Vl) 및 86% (Vh)의 아미노산 동일성을 가짐을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 17.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 인간에서 낮은 수준의 면역원성을 가지거나 면역원성을 가지지 않음을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 18.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 폴리펩티드로의 유전적 연결, 및/또는 유기 또는 비유기 화학 분자에 의한 화학적 결합 (conjugation), 및/또는 다이머화, 올리고머화 또는 멀티머화 (multimerization)에 의하여 유도됨을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 19.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 세포독성 폴리펩티드 또는 세포독성 유기 또는 비유기 화학 분자에 유전적으로 연결되거나 화학적으로 결합됨을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 20.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 생물학적 활성 분자에 유전적으로 연결되거나 화학적으로 결합됨을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 21.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 면역 활성 분자에 유전적으로 연결되거나 화학적으로 결합됨을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 22.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 결합성 (avidity) 및/또는 친화성이 증가되거나 감소되도록 변형됨을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 23.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 생산 수율이 증가되도록 변형됨을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 24.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 약력학 특성에 영향을 주기 위하여 변형됨을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 25.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 신규한 약력학적 특성을 부과하기 위하여 변형됨을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 26.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 결합 구조의 결합이 특이적이고 결합구조의 표지되지 않은 형태에 의하여 저해되고, 다른 결합 구조에 의하여 저해되지 않으며, 다른 특이성을 가지는 다른 결합 구조에 의한 결합을 저해하지 않음을 특징으로 하는 표지된 결합 구조.

청구항 27.

제 6항에서 정의된 항체를 코딩하는, DNA 서열이 SEQ ID NO: 1에 도시된 서열을 포함함을 특징으로 하는 DNA 서열.

청구항 28.

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에서 정의된 결합 구조 및 유사한 결합 특성을 가지는 다른 결합 구조와 특이적으로 결합하고, 이들에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 능력을 가지는, 종양 세포의 표면에서 또는 표면 상에서 디스플레이되고/거나 발현되는 표적 구조.

청구항 29.

제 28항에 있어서, 결합 구조를 특이적으로 차단하고 이에 의하여 특이적으로 차단되는 능력을 가짐을 특징으로 하는 표적 구조.

청구항 30.

제 28항에 있어서, 원발성 및/또는 전이성 결장직장암종, 췌장암종, 유방암종 및 폐암종 세포를 포함하는 군으로부터 선택된 상피 세포의 세포 표면에서 및/또는 표면상에 강하고/거나 균일하게 디스플레이되고/거나 발현됨을 특징으로 하는 표적 구조.

청구항 31.

제 28항에 있어서, 신장 및/또는 전립선 암종 및/또는 악성 흑색종에서 약하고/거나 불균일하게 디스플레이되고, 발현되고/거나 디스플레이되고/거나 발현되지 않음을 특징으로 하는 표적 구조.

청구항 32.

제 28항에 있어서, 결장 표면 상피 및 소장 상피의 근첨단 부분에서 강하게 디스플레이되고/거나 발현됨을 특징으로 하는 표적 구조.

청구항 33.

제 32항에 있어서, 결장 표층 상피 세포의 미세 융모 및/또는 솔변연의 세포 표면의 근첨단 면과 관련하여 디스플레이되고/거나 발현됨을 특징으로 하는 표적 구조.

청구항 34.

제 28항에 있어서, 포유동물 선 상피 및/또는 이의 주변 결합 조직에서 약하게 내지 보통으로 디스플레이되고/거나 발현됨을 특징으로 하는 표적 구조.

청구항 35.

제 28항에 있어서, 비장, 신장, 간, 폐, 피부, 췌장, 갑상선, 심장근 및/또는 CNS를 포함하는 정상 조직에서 약하고/거나 불균일하게 디스플레이되고, 발현되고/거나 디스플레이되고/거나 발현되지 않음을 특징으로 하는 표적 구조.

청구항 36.

제 28항에 있어서, 상피 조직과 관련하여 디스플레이되고/거나 발현되는 표적 구조.

청구항 37.

제 28항에 있어서, 비환원된 형태로 90 및/또는 220 킬로달톤의 명확한 분자량을 가짐을 특징으로 하는 표적 구조.

청구항 38.

표적 구조에 대해 유사한 결합 특이성을 가지는 결합 구조에 특이적으로 결합 하거나 이에 의해 특이적으로 결합되는, 제 28항 내지 제 37항 중 어느 한 항에서 정의된 표적 구조의 항-이디오타입.

청구항 39.

제 38항에 있어서, 결합 구조를 특이적으로 차단하고 이에 의하여 특이적으로 차단됨을 특징으로 하는 항-이디오타입.

청구항 40.

제 28항 내지 제 37항 중 어느 한 항에서 정의된 표적 구조를 인지하고 유기화학적 성질을 가지는 결합구조.

청구항 41.

제 1항 내지 제 26항에서 정의된 결합 구조의 결합을 차단함을 특징으로 하는 결합 구조.

청구항 42.

제 28항 내지 37항 중 어느 한 항에서 정의된 표적 구조의 발현을 차단하는 물질.

청구항 43.

제 42항에 있어서, 안티-센스 올리고뉴클레오티드 및/또는 라이보자임 분자임을 특징으로 하는 물질.

청구항 44.

제 28항 내지 제 37항 중 어느 한 항에서 정의된 표적 구조의 기능을 차단하는 물질.

청구항 45.

제 1항 내지 제 26항, 제 40항 및 제 41항에서 정의된 결합 구조를 활성 주성물으로서 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 46.

제 28항 내지 제 37항 중 어느 한 항에서 정의된 표적 구조 및 제 38항 또는 제 39항에서 정의된 항-이디오타입을 활성 주성분으로 포함함을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 47.

제 42항 내지 제 44항 중 어느 한 항에서 정의된 물질을 활성 주성분으로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 48.

제 18항 내지 제 37항 중 어느 한 항에서 정의된 표적 구조 또는 제 38항 또는 제 39항에서 정의된 표적 구조의 항-이디오타입을 활성 주성분으로 포함하는 백신 조성물.

청구항 49.

파아지 입자에 디스플레이된 결합 구조의 체내에서 면역적으로 사전 선별된 레파토리의 조합 단계 및 서로 다른 형질의 여러 쌍의 조직에 의한 서브트렉티브 (subtractive) 선별 단계를 포함하는 파아지 선별을 위한 방법.

청구항 50.

제 49항에 있어서, 결합 구조의 사전 선별된 레파토리가 영장류로부터 유래된 항체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 51.

제 49항에 있어서, 여러 쌍의 조직이 교차됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 52.

제 51항에 있어서, 조직의 교차된 쌍이 동일한 개체로부터 유래됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 53.

제 49항에 있어서, 조직이 냉동 및/또는 포르말린-고정/파라핀 침지된 조직 절편 및/또는 세포 현탁액의 형태로 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 54.

제 1항 내지 제 26항, 제 40항 및 제 41항중에 어느 한 항에서 정의된 결합 구조 또는 지시제와 시료를 접촉시키는 인간 악성 질환의 체외 조직병리학적 진단 및 예후 방법.

청구항 55.

제 54항에 있어서, 시료가 절단 전에 냉동 및/또는 포르말린-고정 및/또는 파라핀 침지된 조직 시료임을 특징으로 하는 방법.

청구항 56.

제 54항에 있어서, 종양 타이핑 (typing)을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 57.

제 54항에 있어서, 종양 스크리닝을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 58.

제 54항에 있어서, 종양 진단 및 예후를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 59.

제 54항에 있어서, 암전단계를 모니터링하는 것을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 60.

제 1항 내지 제 26항, 제 40항 및 제 41항 중 어느 한 항에서 정의된 결합구조의 체액내 농도를 분석하는 체외 진단 및 예후 방법.

청구항 61.

제 28항 내지 제 37항 중 어느 한 항에서 정의된 표적 구조, 또는 제 38항 또는 제 39항에서 정의된 표적 구조의 항-이디오타입을 포함하는 항원의 체액내 농도를 분석하는 인간 악성 질환의 체외 진단 및 예후 방법.

청구항 62.

a) 제 28항 내지 37항 중 어느 한 항에서 정의된 표적 구조 또는 제 38항 또는 제 39항에서 정의된 표적 구조의 항-이디오타입을 포함하는 항원 및 b) 제 1항 내지 제 26항, 제 40항 또는 제 40항 중 어느 한 항에서 정의된 결합 구조의 복합체의 체액내 농도를 분석하는 인간 악성 질환의 체외 진단 및 예후 방법.

청구항 63.

제 1항 내지 26항, 제 40항 및 제 41항 중 어느 한 항에서 정의된 결합 구조의 인간 피검체의 종양 침착물로의 국소화를 측정하는 인간 악성 질환의 체외 진단 및 예후 방법.

청구항 64.

제 63항에 있어서, 결합 구조를 측정전에 피검체에 투여함을 특징으로 하는 방법.

청구항 65.

제 64항에 있어서, 결합구조가 종양 침착물에 축적됨을특징으로 하는 방법.

청구항 66.

제 63항 내지 제 65항 중 어느 한 항에 있어서, 정량적임을 특징으로 하는 방법.

청구항 67.

제 1항 내지 제 26항, 제 40항 및 제 41항 중 어느 한 항에서 정의된 결합 구조를 인간 피검체에 투여하는 인간 악성 질환의 치료 방법.

청구항 68.

제 67항에 있어서, 결합 구조가 화합된 분자의 약력학적 특성을 변화시키는 분자에 유전적으로 연결되어 변형됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 69.

제 67항에 있어서, 결합 구조가 유도되어 변형됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 70.

제 28항 내지 제 37항 중 어느 한 항에서 정의된 표적 구조를 인간 피검체에 투여함을 특징으로 하는 인간 악성 질환의 치료 방법.

청구항 71.

제 70항에 있어서, 표적 구조에 대한 면역 반응이 유도됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 72.

제 70항에 있어서, 표적 구조가 분자에 유전적 및/또는 화학적으로 연결되어 화합된 분자의 약력학적 특성이 변화됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 73.

제 70항에 있어서, 표적 구조가 분자에 유전적 및/또는 화학적으로 연결되어 화합된 분자의 면역원성 및/또는 항원성 특성이 변화됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 74.

제 70항에 있어서, 표적 구조가 유도됨에 의해서 변형됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 75.

제 70항에 있어서, 표적 구조가 유전적으로 수식되어 변형됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 76.

제 70항에 있어서, 표적 구조가 다른 분자와 혼합되어 혼합물의 면역원성 특징을 변화시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 77.

제 70항에 있어서, 표적 구조를 애쥬번트와 혼합함을 특징으로 하는 방법.

청구항 78.

제 42항 내지 제 44항 중 어느 한 항에서 정의된 물질을 인간 피검체에 투여함을 특징으로 하는 인간 악성 질환의 치료 방법.

청구항 79.

제 78항에 있어서, 물질을 화합된 분자의 약력학적 특성을 변화시키는 분자에 유전적 및/또는 화학적으로 연결됨에 의해 변형됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 80.

제 78항에 있어서, 물질이 유도됨에 의해서 변형됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 81.

제 78항에 있어서, 물질에 대한 면역 반응이 유도됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 82.

제 78항에 있어서, 물질이 분자에 유전적 및/또는 화학적으로 연결되어 화합된 분자의 면역원성 및/또는 항원성 특성이 변화됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 83.

제 78항에 있어서, 물질이 유전적으로 수식되어 변형됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 84.

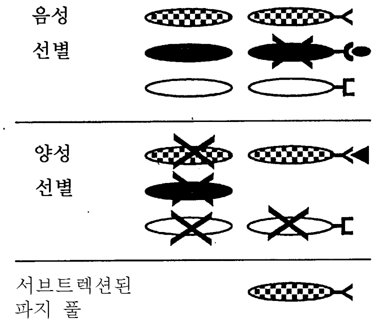
제 78항에 있어서, 물질을 혼합물의 면역원성 특성을 변화시키는 다른 분자와 혼합함을 특징으로 하는 방법.

청구항 85.

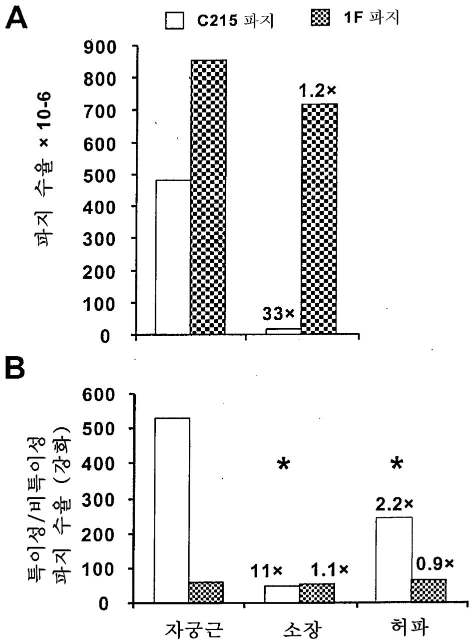
제 78항에 있어서, 물질을 애쥬번트와 혼합함을 특징으로 하는 방법

도면

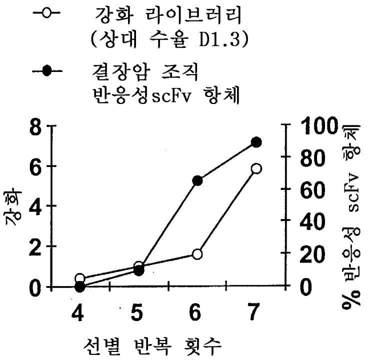
도면 1



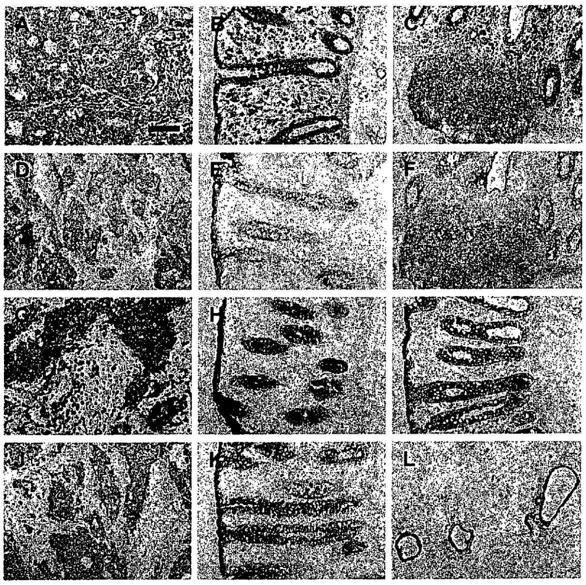
도면 2


A
☐ C215 파지
▨ 1F 파지
파지 수율 × 10-6
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
1.2×
33×
B
특이성/비특이성 파지 수율 (강화)
600
500
400
300
200
100
0
*
*
2.2×
11×
1.1×
0.9×
자궁근
소장
허파

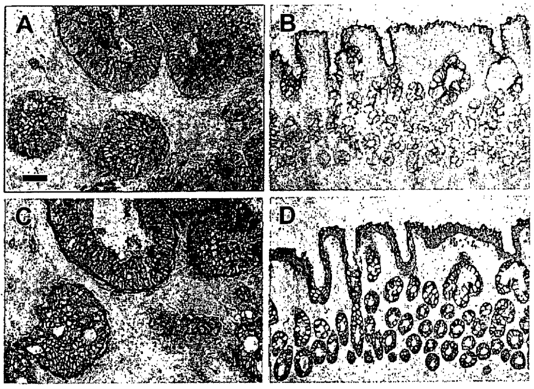
도면 3


-○- 강화 라이브러리 (상대 수율 D1.3)
-●- 결장암 조직 반응성scFv 항체
8
6
4
2
0
강화
100
80
60
40
20
0
% 반응성 scFv 항체
4
5
6
7
선별 반복 횟수

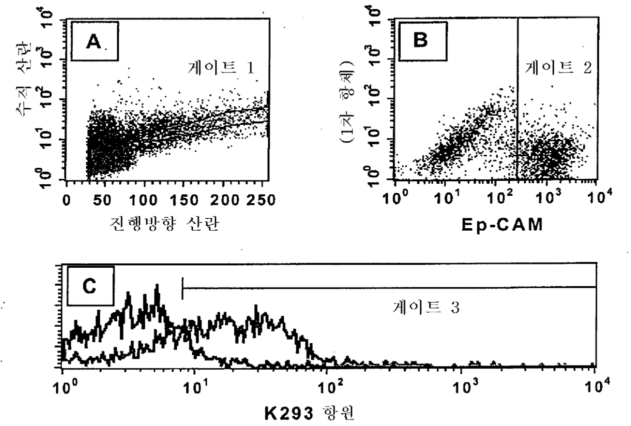
도면 4



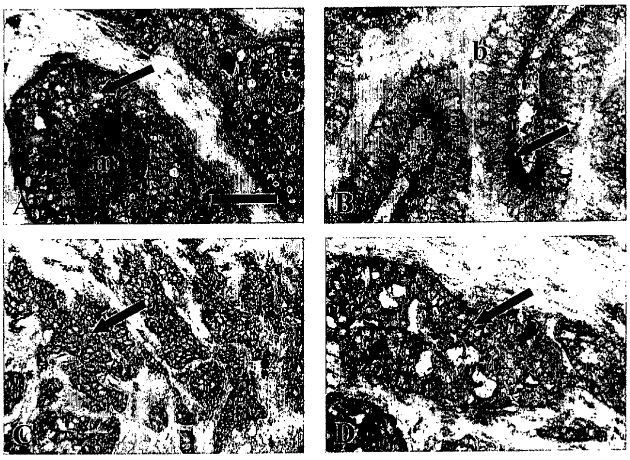
도면 5



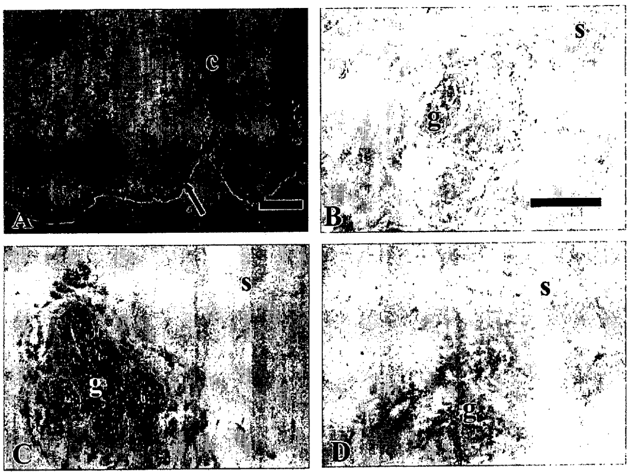
도면 6


A
게이트 1
수직 산란
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
0
50
100
150
200
250
진행방향 산란
B
게이트 2
(1차 항체)
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Ep-CAM
C
게이트 3
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
K293 항원

도면 7

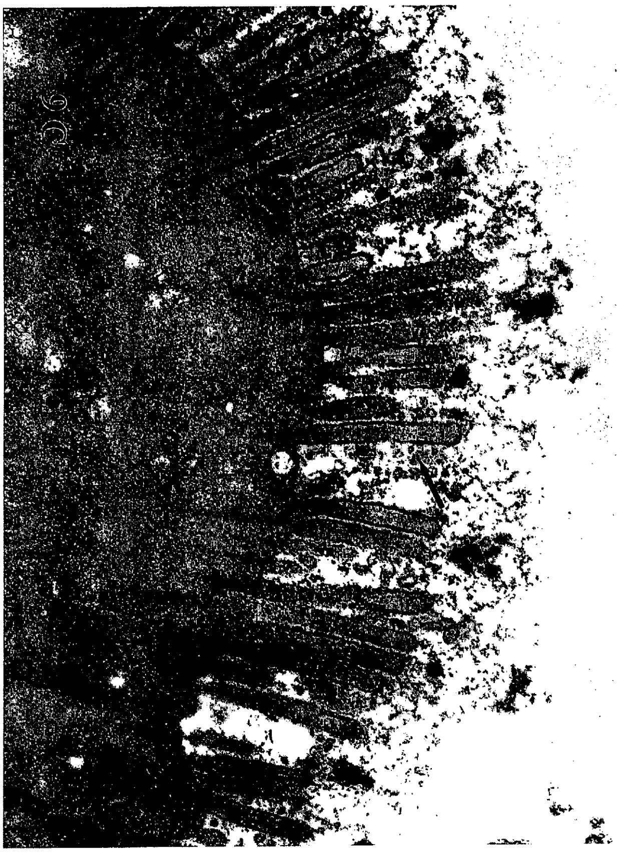

m
A
b
B
C
D

도면 8

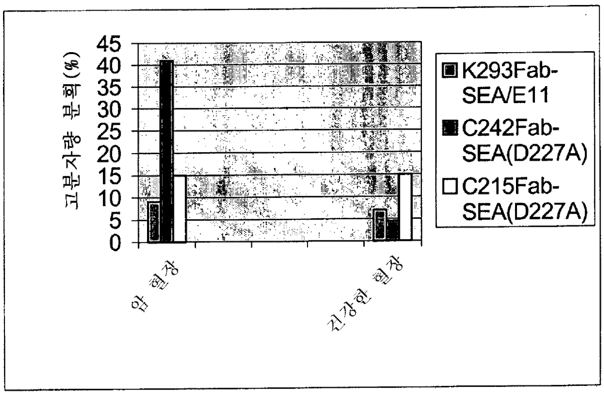


도면 9a

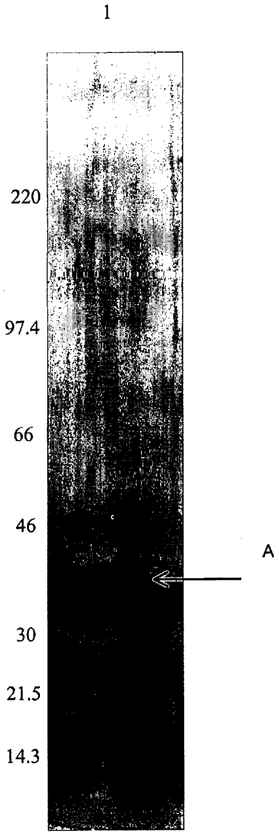
도면 9b



도면 10


고분자량 분획(%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
암 혈장
건강한 혈장
▣ K293Fab-SEA/E11
■ C242Fab-SEA(D227A)
□ C215Fab-SEA(D227A)

도면 11



도면 12

SEQ ID NO: 3 GALQNIIPAS
SEQ ID NO: 4 VIISAPSADA
SEQ ID NO: 5 VPTANVSVVD

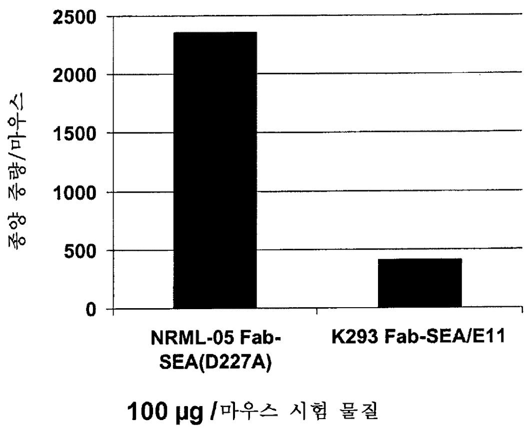
K293-친화성 크로마토그래피에 의해 분리된 35-45 kDa 단백질 밴드 (A로 라벨링)의 세개의 트립신소화성 펩티드 단편의 N-말단 서열(도 11 참조)

도면 13

```
1   MGKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVAINDPFIDLNYMVYMFQYD

51  STHGKFHGTVKAENGKLVINGNPITIFQERDPSKIKWGDAGAEYVVESTG

101 VFTTMEKAGAHLQGGAKRVIISAPSADAPMFVMGVNHEKYDNSLKIISNA
                      VIISAPSADA

151 SCTTNCLAPLAKVIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQKTVDGPSGKLWRDGR

201 GALQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMAFRVPTANVSVVDLTCRLE
    GALQNIIPAS                        VPTANVSVVD

251 KPAKYDDIKKVVKQASEGPLKGILGYTEHQVVSSDFNSDTHSSTFDAGAG

301 IALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE
```

SEQ ID NO:3 내지 5의 펩티드 서열을 글리세르알데하이드 3-포스페이트 탈수소 효소(accession no. P04406)의 단백질 서열을 대응시켰다

도면 14



SEQUENCE LISTING
<110> Active Biotech AB
<120> Novel antibody

```
<130> 2000449
<140>
<141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 747
<212> DNA
<213> Macaca fascicularis
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(747)
<223> K293 variable region (scFv); PRT (aa)-sequence Vl
      (1-110), mod Huston (111-129), Vh (130-249)
<400> 1
cac gtt ata ttg act cag tcg ccc tct gtg tct ggc tct cct gga cag    48
His Val Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
  1               5                  10                  15
tcg gtc acc ctc tcc tgc act gga acc agc aat gac atc ggt ggc tat    96
Ser Val Thr Leu Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Ile Gly Gly Tyr
             20                  25                  30
gat tat gtc tcg tgg tat cag cat cac cca ggc aaa gcc ccc aag ctc    144
Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
         35                  40                  45
atg att tac aat gtc aat aag cgg ccc tca ggg gtc tct gag cgc ttc    192
Met Ile Tyr Asn Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Glu Arg Phe
     50                  55                  60
tct ggc tcc aag tct gcc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct gga ctc    240
Ser Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65                  70                  75                  80
cag gat gac gat gag gct gat tac tat tgc agt tcc tat gca cgc cgg    288
Gln Asp Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Arg Arg
                 85                  90                  95
gac act tac att ttc ggt ggt ggg acc cgg ctc acc gtc cta ggt caa    336
Asp Thr Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Gln
            100                 105                 110
gcc aac ggt gaa ggc ggc tct ggt ggc ggg gga tcc gga ggc ggc ggt    384
Ala Asn Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125
tct gag gtg cag ctg cag gag tgg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg    432
Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Trp Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
    130                 135                 140
gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tct ggt ttc tcc atc agc agt    480
Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser
145                 150                 155                 160
ggt tat ggc tgg agc tgg atc cgt cag tcc cca ggg aag gga ctg gaa    528
Gly Tyr Gly Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
                165                 170                 175
tgg att gga gac atc tct tat agt ggg aac tcc agg tac aac ccg tcc    576
Trp Ile Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Ser Arg Tyr Asn Pro Ser
```

```
            180                 185                 190
ctc aag agt cga gtc acc att tca aga gac acg tcc aag aac cag ttc   624
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
        195                 200                 205
tcc ctg aag ctg acc tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc gtg tat tac   672
Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
    210                 215                 220
tgt gcg aga cat gat aga ggc tgg cac gaa tac ttc gac ttc tgg ggc   720
Cys Ala Arg His Asp Arg Gly Trp His Glu Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
225                 230                 235                 240
cag gga gtc ctg gtc acc gtt tcc tca                               747
Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
                245
<210> 2
<211> 249
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 2
His Val Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
  1               5                  10                  15
Ser Val Thr Leu Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Ile Gly Gly Tyr
             20                  25                  30
Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
         35                  40                  45
Met Ile Tyr Asn Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Glu Arg Phe
     50                  55                  60
Ser Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65                  70                  75                  80
Gln Asp Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Arg Arg
                 85                  90                  95
Asp Thr Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Gln
            100                 105                 110
Ala Asn Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125
Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Trp Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
    130                 135                 140
Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser
145                 150                 155                 160
Gly Tyr Gly Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
                165                 170                 175
Trp Ile Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Ser Arg Tyr Asn Pro Ser
            180                 185                 190
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
        195                 200                 205
Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
    210                 215                 220
Cys Ala Arg His Asp Arg Gly Trp His Glu Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
225                 230                 235                 240
Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
                245
```

1
1