



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월13일
(11) 등록번호 10-2665275
(24) 등록일자 2024년05월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) C07K 1/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/3007 (2013.01)
C07K 1/13 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7035209
- (22) 출원일자(국제) 2018년07월06일
심사청구일자 2021년06월22일
- (85) 번역문제출일자 2019년11월28일
- (65) 공개번호 10-2020-0026185
- (43) 공개일자 2020년03월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2018/025618
- (87) 국제공개번호 WO 2019/009388
국제공개일자 2019년01월10일
- (30) 우선권주장
JP-P-2017-133698 2017년07월07일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
US20020146750 A1
US20050244333 A1
US20120315285 A1
WO2005086875 A2

- (73) 특허권자
아스텔라스세이야쿠 가부시킴가이샤
일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고
- (72) 발명자
도이하라, 히토시
일본 1038411 도쿄도 츄오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고 아스텔라스 세이야쿠 가부시킴가이샤 내
히라야마, 가즈노리
일본 1038411 도쿄도 츄오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고 아스텔라스 세이야쿠 가부시킴가이샤 내
시라이, 히로키
일본 1038411 도쿄도 츄오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고 아스텔라스 세이야쿠 가부시킴가이샤 내
- (74) 대리인
장수길, 박보현

전체 청구항 수 : 총 33 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 신규 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트

(57) 요약

암의 진단, 특히 대장암, 유방암, 폐암, 갑상선암 또는 이들이 전이된 암의 진단에 유용할 것이 기대되는, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트, 및 당해 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 사용한 진단 수단의 제공. 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트, 및 당해 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 5/10 (2020.05)

G01N 33/574 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

이하의 (a) 및 (b)로 이루어지는 군에서 선택되는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트:

(a) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트; 그리고

(b) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역이며, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1의 글루탐산이 피로글루탐산으로 수식된 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.

청구항 2

제1항에 있어서, 이하의 (a) 및 (b)로 이루어지는 군에서 선택되는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트:

(a) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트; 그리고

(b) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트이며, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1의 글루탐산이 피로글루탐산으로 수식된 중쇄 프래그먼트, 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.

청구항 4

표지부와 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체.

청구항 5

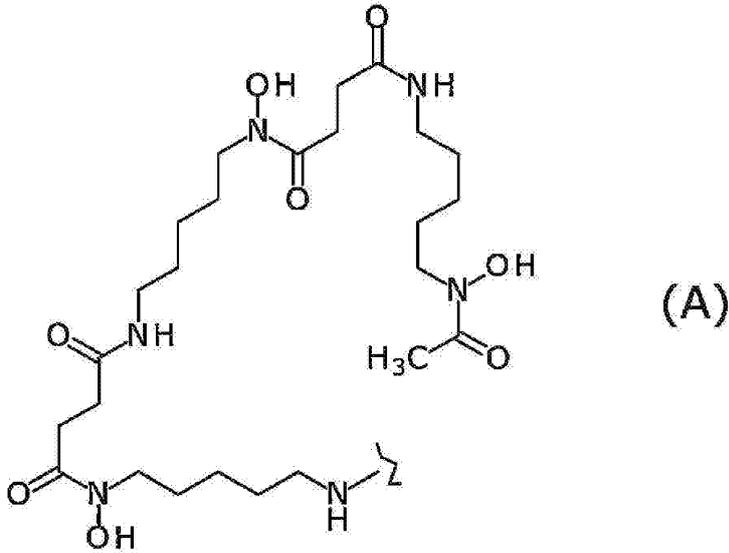
제4항에 있어서, 표지부가 (i) 배위자 및 링커, (ii) 배위자, (iii) 형광 색소 및 링커, 또는 (iv) 형광 색소인 복합체.

청구항 6

제5항에 있어서, 표지부가 (i) 배위자 및 링커, 또는 (ii) 배위자인 복합체.

청구항 7

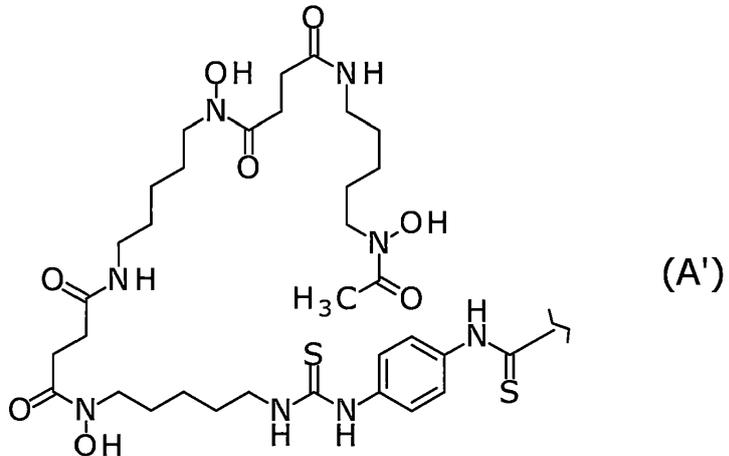
제6항에 있어서, 배위자가 하기 식 (A)로 나타나는 배위자인 복합체:



식 중, 파선은 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트 또는 링커로의 결합을 나타낸다.

청구항 8

제6항에 있어서, 표지부가 (i) 배위자 및 링커이며, 당해 배위자 및 링커가 하기 식 (A')로 나타나는 기인 복합체:



식 중, 파선은 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트로의 결합을 나타낸다.

청구항 9

제8항에 있어서, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트가, 당해 Fab 프래그먼트 중의 아미노기를 통해, 표지부 말단의 C(=S)기의 탄소 원자와 결합하고 있는 복합체.

청구항 10

제6항에 있어서, 하기 식 (I)로 나타나는 복합체:



식 중, Ab는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이고,

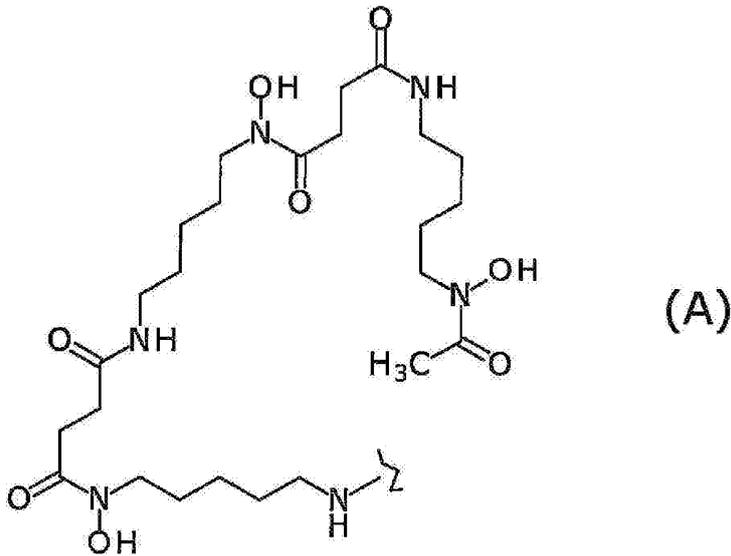
L은 배위자이고,

X는 링커 또는 결합이고, 그리고

p는 1 내지 25의 자연수이다.

청구항 11

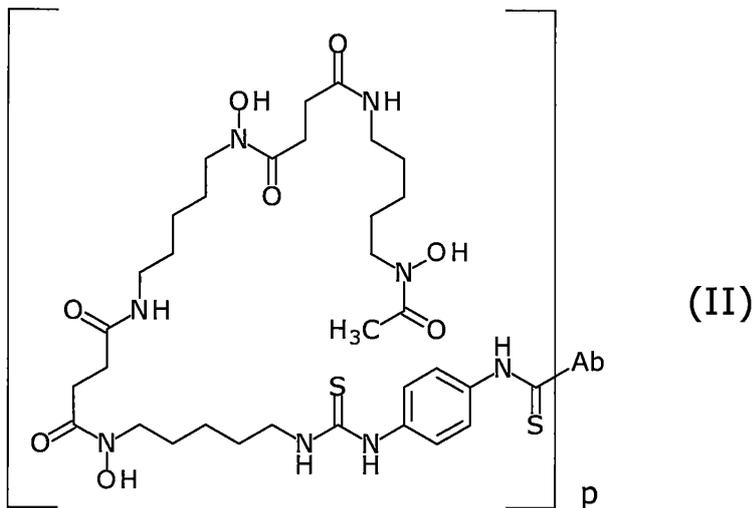
제10항에 있어서, L이 하기 식 (A)로 나타나는 배위자인 복합체:



식 중, 파선은 X(단, X가 결합인 경우에는 Ab)로의 결합을 나타낸다.

청구항 12

제8항에 있어서, 하기 식 (II)로 나타나는 복합체:



식 중, Ab는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이고,

p는 1 내지 25의 자연수이고,

여기서, Ab는 당해 Ab 중의 아미노기를 통해, 표지부 말단의 C(=S)의 탄소 원자와 결합하고 있다.

청구항 13

제10항에 있어서, p가 1 내지 16의 자연수인 복합체.

청구항 14

제10항에 있어서, p가 1 내지 10의 자연수인 복합체.

청구항 15

제5항에 있어서, 추가로 금속을 포함하는 복합체.

청구항 16

제15항에 있어서, 금속이 금속 방사성 동위 원소인 복합체.

청구항 17

제15항에 있어서, 금속이 ⁸⁹Zr인 복합체.

청구항 18

제16항에 있어서, PET 트레이서로서 사용하기 위한 복합체.

청구항 19

제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열; 및 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 20

제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열; 및 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 21

이하의 (a) 및 (b)를 포함하는 발현 벡터:

(a) 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(b) 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 22

이하의 (a) 및 (b)를 포함하는 발현 벡터:

(a) 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,

(b) 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 23

이하의 (a) 및 (b)로 이루어지는 군에서 선택되는 숙주 세포:

(a) 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 및

(b) 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 24

이하의 (a) 및 (b)로 이루어지는 군에서 선택되는 숙주 세포:

(a) 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 및

(b) 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 25

이하의 (a) 내지 (c)로 이루어지는 군에서 선택되는 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정을 포함하는, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법:

(a) 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;

(b) 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고

(c) 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포, 및 제1항의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 26

이하의 (a) 내지 (c)로 이루어지는 군에서 선택되는 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정을 포함하는, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법:

(a) 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;

(b) 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고

(c) 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포, 및 제3항에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 기재된 방법에 의해 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 조제하는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트를 표지부와 공유 결합시키는 공정을 포함하는, 표지부와 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 생산하는 방법.

청구항 28

제25항 또는 제26항에 기재된 방법에 의해 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 조제하는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트를 배위자와, 링커를 통하거나 또는 직접, 공유 결합시키는 공정을 포함하는, 배위자와 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 생산하는 방법.

청구항 29

제28항에 기재된 방법에 의해 배위자와 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 생산하는 공정, 및 당해 복합체의 배위자에 금속 방사성 동위 원소를 배위 결합시키는 공정을 포함하는, 금속 방사성 동위 원소로 표지된 표지부와 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 생산하는 방법.

청구항 30

제15항에 기재된 복합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 대장암, 유방암, 폐암, 갑상선암 또는 이들이 전이된 암의 진단에 사용하기 위한 진단용 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 병기 진단약인 진단용 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 대장암 또는 대장암이 전이된 암의 진단에 사용하는 진단용 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 대장암이 전이된 암이 전이성 간암인 진단용 조성물.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 신규 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 당해 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 진단용 조성물, 및 당해 Fab 프래그먼트를 사용하여 암을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] CEA(Carcinoembryonic antigen; 암배아성 항원) 또는 CEACAM(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule; 암배아성 항원-관련 세포 부착 분자)은 1965년에 발견된 종양 마커이며(J. Exp. Med.; 1965; 121: 439-462, PNAS; 1969; 64: 161-167), 현재까지 23개의 CEA 관련 분자가 밝혀져 있다(BioMedCentral Biology; 2010; 8: 12-33). 그 중, CEACAM5는 정상 조직에서 거의 발현이 확인되지 않지만, 태아의 소화관이나 대장암에서 발현되고 있다(BBA; 1990; 1032: 177-189, Mol. Pathol.; 1999; 52: 174-178). 또한, CEACAM5는 유방암, 폐암, 갑상선암에서도 발현되고 있는 것이 알려져 있다(Diagn. Cytopathol.; 1993; 9: 377-382,

Cancer Res.; 1990; 50: 6987-6994, Histopathology; 2000; 37: 530-535).

- [0003] 대장암 환자에서는 건강인에 비해 혈중 CEACAM5의 농도가 높아(J. Exp. Med.; 1965; 121: 439-462), CEACAM5는 종양 마커로서 사용되고 있다. 대장암 환자의 조직학적인 검토에서는 90% 이상의 조직에서 CEACAM5가 고발현되고 있다(British J. Cancer; 2013; 108: 662-667).
- [0004] 대장암의 조기 전이는 간장에 국한되어 있기 때문에, 조기에 간 전이를 발견하여 치료할 수 있으면, 재발률을 저하시킬 수 있다(Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.; 2017; 3: 163-173). 간 전이의 진단에는 CT(컴퓨터 단층 촬영)나 MRI(핵자기 공명 화상법), FDG-PET(Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography; 플루오로데옥시글루코스-양전자 방출 단층촬영)가 사용되고 있다. CT나 MRI, FDG-PET의 검출 감도는 각각 74.4, 80.3, 81.4%이며, 1cm 이하의 종양에서는 검출 감도는 CT에서 47.3%, MRI에서 60.2%로 저하된다(Radiology; 2010; 257: 674-684). 간 특이성 조영제 MRI도 사용되고 있지만, 1cm 이하의 종양에서는 그의 검출 감도는 29 내지 38%이다(Radiology; 2005; 237: 89-98).
- [0005] 암을 진단, 치료하기 위해서, 항암제나 금속 방사성 동위 원소를 결합시킨 항체가 사용되고 있다. 항체를 사용한 타겟팅은 종양 세포에 대한 특이성이 높고, 부작용이 적다. 현재까지 몇 가지의 금속 방사성 동위 원소로 표지된 모노클로날 항체가 진단 및 치료에 임상 응용되고 있다(Cancer Control; 2012; 19: 196-203).
- [0006] 한편, 일반적으로 항체는 혈중 반감기가 길고, 체 내에 투여 후, 암을 가시화하기에 충분한 시그널 대 백그라운드 비를 부여하는 종양 대 혈액 비에 달하는 데 4일 내지 5일의 긴 기간을 필요로 한다(Clin. Pharmacol. Ther.; 2010; 87: 586-592). 또한 항체의 Fc 영역은, 항체 의존성 세포 장애(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity: ADCC)나 보체 의존성 세포 장애(Complement-Dependent Cytotoxicity: CDC)의 약리 작용을 일으킨다(Glycoconj. J.; 2013; 30: 227-236, Curr. Opin. Biotechnol.; 2002; 13: 609-614). 또한 항체는 간장에서 대사되기 때문에 표적에 관계없이 간장에 고집적되지만, 대장암의 조기 전이는 간장에 국한되어 있기 때문에, 항체에서 간 전이의 병소를 검출하는 것은 어렵다(Clin. Pharmacol. Ther.; 2010; 87: 586-592).
- [0007] Fab, scFv, 디아바디와 같은 저분자화된 재조합 항체 프래그먼트는, 조직 침투성이 높기 때문에 병소에 도착하기 쉽고, 대장균이나 효모에서의 발현계를 사용한 저비용에 의한 생산을 기대할 수 있는 점에서 치료용 항체로서 이용되는 한편, 혈중 반감기가 짧고, 신장 배설되는 특징을 갖는 점에서, 진단약으로서의 이용도 보고되어 있다(Nat. Biotechnol.; 2005; 23: 1126-1136).
- [0008] 진단약으로서 응용되고 있는 항인간 CEACAM5 항체로서는, 마우스 모노클로날 항체 T84.66의 인간화 항체인 M5A(특허문헌 1)가 알려져 있다. ⁶⁴Cu로 표지한 M5A는, 피하에 암세포를 이식한 마우스를 사용한 시험에서, 양호한 PET 이미지를 얻기 위해서는 투여 후 22시간 이상 경과할 필요가 있는 것(비특허문헌 1), 또한 간 전이의 모델 마우스를 사용한 시험에 있어서, 간장의 정상 조직과 간장의 병소 부위로의 도입은 투여 후 3시간에서는 동일한 정도이고, 24시간 경과 후에는 유의차가 있는 것(비특허문헌 2)이 보고되어 있다.
- [0009] 항인간 CEACAM5 항체의 프래그먼트에서는, 마우스 모노클로날 항체의 NP-4의 Fab'를 ^{99m}Tc로 표지한 CEA-Scan을 대장암의 진단에 이용할 수 있는 것이 보고되어 있다(비특허문헌 3). 그러나, CEA-Scan의 병소 부위로의 도입은 정상적인 간장으로의 도입을 상회하지 않으며, 또한 간 전이의 검출 감도는 FDG-PET보다 낮다(비특허문헌 4). CEA-Scan은, 1999년에 FDA에 대장암의 진단약으로서 인가되었지만, 이제는 판매되고 있지 않다(비특허문헌 5).

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2005/086875호 팸플릿

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Bioconjug. Chem.; 2008; 19: 89-96
- (비특허문헌 0002) PLOS ONE; 2014; 9(9): e106921

(비특허문헌 0003) Ann. Surg.; 1997; 226: 621-631

(비특허문헌 0004) J. Nucl. Med.; 2000; 41: 1657-1663

(비특허문헌 0005) Kenneth T. Cheng, "99mTc-Arcitumomab", [online], Update: March 17, 2008., Molecular Imaging and Contrast Agent Database, [2017년 5월 17일 검색], 인터넷<URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23676/>>

발명의 내용

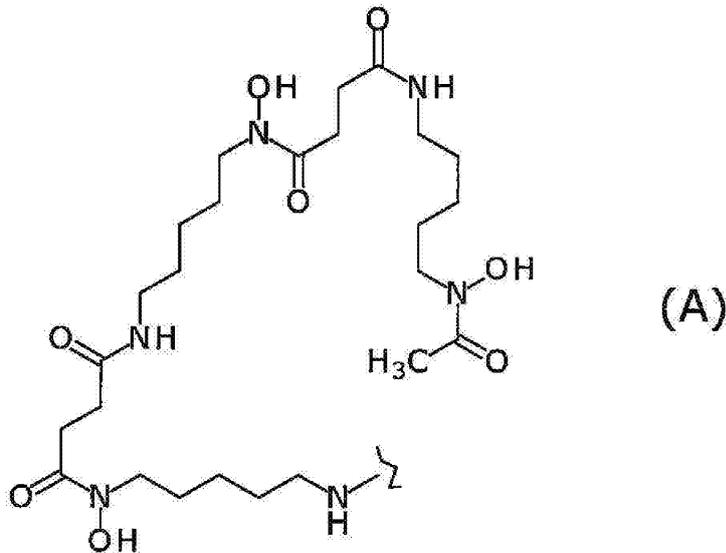
해결하려는 과제

- [0012] 1가의 Fab 프래그먼트는, 분자량 약 50kDa이며, 분자량 약 150kDa의 항체보다 작고, 신장 배설되며, 혈중 반감기도 짧다. 그 때문에, 간 전이를 검출할 수 있고, 투여 후 2 내지 32시간 이내에 암을 가시화하기에 충분한 시그널 대 백그라운드 비를 부여하는 중앙 대 혈액 비에 달한다. Fc 영역이 없기 때문에 ADCC이나 CDC를 야기하는 일도 없다. 이러한 특징으로부터, 항체와 비교하여, Fab 프래그먼트는, 진단약으로서 보다 유효할 것을 기대할 수 있다.
- [0013] 그러나, Fab 프래그먼트에서는, 저분자화에 의해 그의 결합 활성이 감약되는 경우가 많다. 또한 항체를 체내 진단약으로서 이용하기 위해서는, PET 트레이서 또는 형광 색소 등의 검출되는 물질로 표지해야만 하지만, Fab 프래그먼트에서는, 그러한 물질로 표지됨으로써, 그의 결합 활성이 감약된다는 과제가 있다.
- [0014] 본 발명의 과제는, 인간 CEACAM5를 검출하기에 유용하고, 또한 투여 후 단시간(예를 들어, 4시간) 사이에 암병소에 집적할 것이 기대되는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 제공하는 데 있다. 또한, 본 발명의 과제는, 투여한 당일에 진단이 가능할 것이 기대되는 당해 Fab 프래그먼트를 포함하는 진단용 조성물 및 그것을 이용한 진단 방법을 제공하는 데 있다.

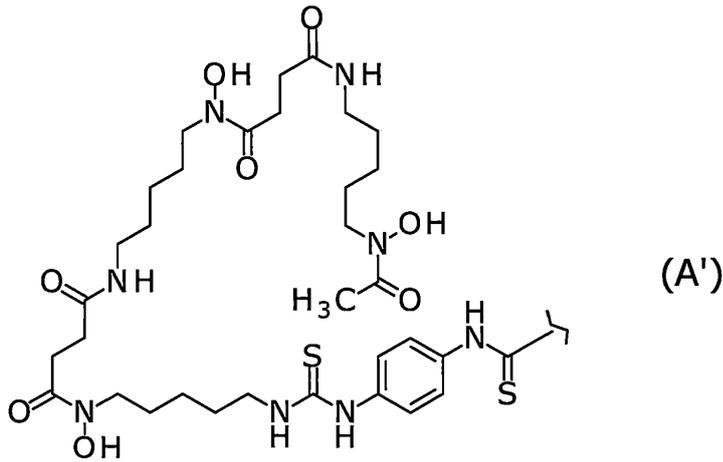
과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명자들은, 인간 CEACAM5를 검출하는 데 유용한 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 제작에 있어서 상당한 예의 검토를 거듭한 결과, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 제작하고(실시예 1), 당해 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트는 표지부의 결합에 의해 인간 CEACAM5에 대한 결합 활성이 감약되지 않는 것(실시예 3), 그리고 당해 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체는 투여 4시간 후에 있어서 피하 이식 모델 및 간 이식 모델에 있어서 인간 CEACAM5 양성 암세포에 집적되어, 인간 CEACAM5 양성 암세포를 검출할 수 있는 것을 발견하였다(실시예 5 및 6). 즉, 본 발명은, 암에 집적되는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트, 및 당해 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 제공한다.
- [0016] 본 발명은, 의학상 또는 산업상 유용한 물질·방법으로서 이하의 발명을 포함하는 것이다.
- [0017] 즉, 일 형태에 있어서, 본 발명은 이하와 같을 수 있다.
- [0018] (1) 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트, 그리고 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 38까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 54부터 60까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 93부터 101까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0019] (2) 이하의 (a) 및 (b)로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 (1)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트:
- [0020] (a) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트; 그리고

- [0021] (b) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역이며, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1의 글루탐산이 피로글루탐산으로 수식된 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0022] (3) 이하의 (a) 및 (b)로 이루어지는 군에서 선택되는, 상기 (2)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트:
- [0023] (a) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트; 그리고
- [0024] (b) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트이며, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1의 글루탐산이 피로글루탐산으로 수식된 중쇄 프래그먼트, 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0025] (4) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는, 상기 (3)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0026] (5) 표지부와 상기 (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체.
- [0027] (6) 표지부가 (i) 배위자 및 링커, (ii) 배위자, (iii) 형광 색소 및 링커, 또는 (iv) 형광 색소인, 상기 (5)에 기재된 복합체.
- [0028] (7) 표지부가 (i) 배위자 및 링커, 또는 (ii) 배위자인, 상기 (6)에 기재된 복합체.
- [0029] (8) 배위자가 하기 식 (A)로 나타나는 배위자인, 상기 (7)에 기재된 복합체:



- [0030] 식 중, 파선은 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트 또는 링커로의 결합을 나타낸다.
- [0031]
- [0032] (9) 표지부가 (i) 배위자 및 링커이며, 당해 배위자 및 링커가 하기 식 (A')로 나타나는 기인, 상기 (7)에 기재된 복합체:

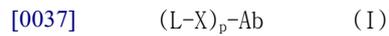


[0033]

[0034] 식 중, 파선은 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트로의 결합을 나타낸다.

[0035] (10) 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트가, 당해 Fab 프래그먼트 중의 아미노기를 통해, 표지부 말단의 C(=S)기의 탄소 원자와 결합하고 있는, 상기 (9)에 기재된 복합체.

[0036] (11) 하기 식 (I)로 나타나는, 상기 (7)에 기재된 복합체:



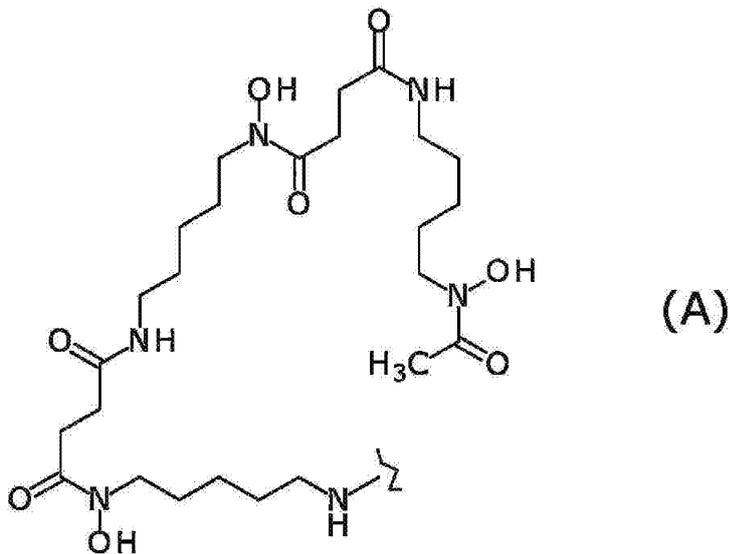
[0038] 식 중, Ab는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이고,

[0039] L은 배위자이고,

[0040] X는 링커 또는 결합이고, 그리고

[0041] p는 1 내지 25의 자연수이다.

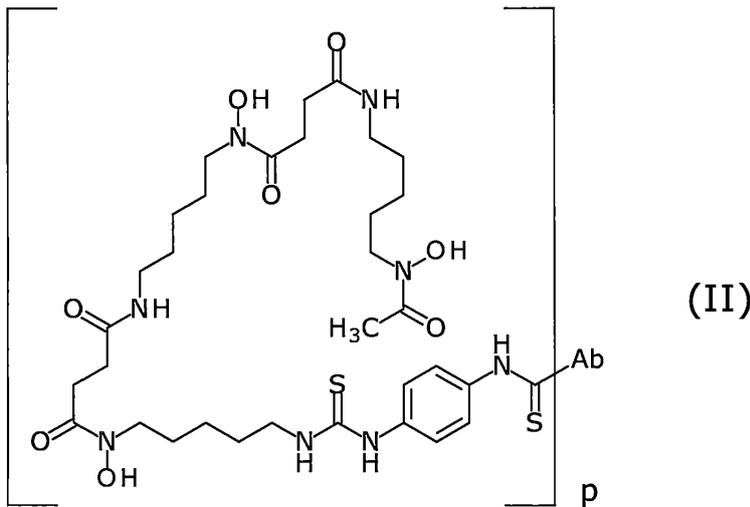
[0042] (12) L이 하기 식 (A)로 나타나는 배위자인, 상기 (11)에 기재된 복합체:



[0043]

[0044] 식 중, 파선은 X(단, X가 결합인 경우에는 Ab)로의 결합을 나타낸다.

[0045] (13) 하기 식 (II)로 나타나는, 상기 (9) 또는 (12) 중 어느 하나에 기재된 복합체:



- [0046]
- [0047] 식 중, Ab는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이고,
- [0048] p는 1 내지 25의 자연수이고,
- [0049] 여기서, Ab는 당해 Ab 중의 아미노기를 통해, 표지부 말단의 C(=S)의 탄소 원자와 결합하고 있다.
- [0050] (14) p가 1 내지 16의 자연수인, 상기 (11) 내지 (13) 중 어느 하나에 기재된 복합체.
- [0051] (15) p가 4 내지 16의 자연수인, 상기 (11) 내지 (13) 중 어느 하나에 기재된 복합체.
- [0052] (16) 추가로 금속을 포함하는, 상기 (6) 내지 (15) 중 어느 하나에 기재된 복합체.
- [0053] (17) 금속이 금속 방사성 동위 원소인, 상기 (16)에 기재된 복합체.
- [0054] (18) 금속이 ⁸⁹Zr인, 상기 (16)에 기재된 복합체.
- [0055] (19) PET 트레이서로서 사용하기 위한, 상기 (17) 또는 (18)에 기재된 복합체.
- [0056] (20) 이하의 (a) 및 (b)로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리뉴클레오티드:
- [0057] (a) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및
- [0058] (b) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0059] (21) 이하의 (a) 및 (b)로 이루어지는 군에서 선택되는, 폴리뉴클레오티드:
- [0060] (a) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및
- [0061] (b) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0062] (22) 이하의 (a) 및/또는 (b)를 포함하는 발현 벡터:
- [0063] (a) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0064] (b) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0065] (23) 이하의 (a) 및/또는 (b)를 포함하는 발현 벡터:

- [0066] (a) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드,
- [0067] (b) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0068] (24) 이하의 (a) 내지 (d)로 이루어지는 군에서 선택되는 숙주 세포:
- [0069] (a) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0070] (b) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0071] (c) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0072] (d) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.
- [0073] (25) 이하의 (a) 내지 (d)로 이루어지는 군에서 선택되는 숙주 세포:
- [0074] (a) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0075] (b) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0076] (c) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0077] (d) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.
- [0078] (26) 이하의 (a) 내지 (c)로 이루어지는 군에서 선택되는 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정을 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법:
- [0079] (a) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0080] (b) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0081] (c) 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포, 및 상기 (2)의 (a)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.
- [0082] (27) 이하의 (a) 내지 (c)로 이루어지는 군에서 선택되는 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정을 포함하는, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법:
- [0083] (a) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하

는 폴리뉴클레오티드 및 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;

- [0084] (b) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0085] (c) 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포, 및 상기 (4)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.
- [0086] (28) 상기 (26) 또는 (27)에 기재된 방법에 의해 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 조제하는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트를 표지부와 공유 결합시키는 공정을 포함하는, 표지부와 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 생산하는 방법.
- [0087] (29) 상기 (26) 또는 (27)에 기재된 방법에 의해 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 조제하는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트를 배위자와, 링커를 통하거나 또는 직접, 공유 결합시키는 공정을 포함하는, 배위자와 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 생산하는 방법.
- [0088] (30) 상기 (29)에 기재된 방법에 의해 배위자와 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 생산하는 공정, 및 당해 복합체의 배위자에 금속 방사성 동위 원소를 배위 결합시키는 공정을 포함하는, 금속 방사성 동위 원소로 표지된 표지부와 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체를 생산하는 방법.
- [0089] (31) 상기 (16) 내지 (19) 중 어느 하나에 기재된 복합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 진단용 조성물.
- [0090] (32) 병기 진단약인, 상기 (31)에 기재된 진단용 조성물.
- [0091] (33) 대장암, 유방암, 폐암, 갑상선암 또는 이들이 전이된 암의 진단에 사용하는, 상기 (31) 또는 (32)에 기재된 진단용 조성물.
- [0092] (34) 대장암 또는 대장암이 전이된 암의 진단에 사용하는, 상기 (33)에 기재된 진단용 조성물.
- [0093] (35) 대장암이 전이된 암이 전이성 간암인, 상기 (34)에 기재된 진단용 조성물.
- [0094] (36) 대장암, 유방암, 폐암, 갑상선암 또는 이들이 전이된 암의 진단용 조성물의 생산을 위한, 상기 (16) 내지 (19) 중 어느 하나에 기재된 복합체의 사용.
- [0095] (37) 대장암, 유방암, 폐암, 갑상선암 또는 이들이 전이된 암의 진단에 있어서 사용하기 위한, 상기 (16) 내지 (19) 중 어느 하나에 기재된 복합체.
- [0096] (38) 상기 (16) 내지 (19) 중 어느 하나에 기재된 복합체를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대장암, 유방암, 폐암, 갑상선암 또는 이들이 전이된 암의 진단 방법.
- [0097] (39) 표지부를 포함하는 복합체로서 사용하기 위한, 상기 (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0098] (40) 표지부를 포함하는 복합체의 생산을 위한, 상기 (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 사용.
- [0099] (41) 표지부를 포함하는 복합체가 상기 (5) 내지 (18) 중 어느 하나에 기재된 복합체인, 상기 (39)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0100] (42) 표지부를 포함하는 복합체가 상기 (5) 내지 (18) 중 어느 하나에 기재된 복합체인, 상기 (40)에 기재된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 사용.

발명의 효과

- [0101] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트는, 인간 CEACAM5를 검출하는 데 유용하고, 대장암, 유방암, 폐암, 갑상선암 또는 이들이 전이된 암 등의 암의 진단에 유용할 것이 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0102] 도 1a는, 인간 대장암 세포주 LS174T 세포(인간 CEACAM5 양성 세포)를 오른쪽 어깨의 피하에, 인간 대장암 세포주 HCT-15 세포(인간 CEACAM5 음성 세포)를 왼쪽 어깨의 피하에 이식한 마우스에 PB009-03을 투여하고, 투여 4시간 후에 PET로 촬영한 대표적인 화상이다. 얻어진 마우스를 촬영하였으므로, 우측의 동그라미가 LS174T 세포를 이식한 마우스의 오른쪽 어깨를, 좌측의 동그라미가 HCT-15 세포를 이식한 마우스의 왼쪽 어깨를 나타낸다. 우측의 바는, 중앙에 대한 방사선 집적량(Maximum Standardized Uptake Value; SUV-Max)을 나타낸다.

도 1b는, 인간 대장암 세포주 LS174T 세포(인간 CEACAM5 양성 세포)를 오른쪽 어깨의 피하에, 인간 대장암 세포주 HCT-15 세포(인간 CEACAM5 음성 세포)를 왼쪽 어깨의 피하에 이식한 마우스에 PB009-03을 투여하고, 투여 4시간 후, 24시간 후 및 48시간 후에 PET로 촬영하고, 화상 해석을 행한 결과를 나타낸 그래프이다. 종축은 중앙부에 집적된 PB009-03의 SUV-Max값을 나타낸다. 또한, 그래프 중의 에러 바는 평균값±표준 오차(MEAN±SEM)를 나타낸다.

도 2a는, 루시페라아제 발현 LS174T 세포(인간 CEACAM5 양성 세포)를 간장에 이식한 마우스에 PB009-03을 투여하고, 투여 4시간 후에 PET로 촬영한 대표적인 화상이다. 화살표는 세포를 이식한 부분을, 우측의 바는 SUV-Max값을 나타낸다.

도 2b는, 루시페라아제 발현 LS174T 세포(인간 CEACAM5 양성 세포)를 간장에 이식한 마우스에 PB009-03을 투여하고, 투여 4시간 후 및 24시간 후에 PET로 촬영하고, 화상 해석을 행한 결과를 나타낸 그래프이다. 종축은 간장과 중앙부에 집적된 PB009-03의 SUV-Max값의 비(중앙/간장 비)를 나타낸다. 또한, 그래프 중의 에러 바는 평균값±표준 오차(MEAN±SEM)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103] 이하에, 본 발명에 대하여 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들에 한정되는 것은 아니다. 본 명세서에서 특별히 정의되지 않는 한, 본 발명에 관련하여 사용되는 과학 용어 및 기술 용어는, 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 것으로 한다.

[0104] 본 발명자들은, 항인간 CEACAM5 항체 또는 그의 항원 결합 프래그먼트의 제작에 있어서 상당한 예의 검토를 거듭한 결과, 인간 CEACAM5를 검출하는 데 유용한 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 제작하는 데 성공하였다.

[0105] 항체 분자의 기본 구조는, 각 클래스 공통으로 분자량 5만 내지 7만의 중쇄와 2 내지 3만의 경쇄로 구성된다. 중쇄는 통상적으로 약 440개의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드쇄로 이루어지며, 클래스마다 특징적인 구조를 가지고, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE에 대응하여 γ , μ , α , δ , ϵ 쇠라고 불린다. 또한 IgG에는, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4가 존재하고, 각각 $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$ 라고 불리고 있다. 경쇄는 통상적으로 약 220개의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드쇄로 이루어지며, L형과 K형의 2종이 알려져 있고, 각각 λ , κ 쇠라고 불린다. 항체 분자의 기본 구조의 펩티드 구성은, 각각 상동인 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄가, 디설피드 결합(S-S 결합) 및 비공유 결합에 의해 결합하고, 분자량 15만 내지 19만이다. 2종의 경쇄는 어느 중쇄와도 쌍을 이룰 수 있다. 개개의 항체 분자는 항상 동일한 경쇄 2개와 동일한 중쇄 2개로 이루어질 수 있다.

[0106] 쇠 내 S-S 결합은, 중쇄에 4개(μ , ϵ 쇠에는 5개), 경쇄에는 2개 있고, 아미노산 100 내지 110 잔기마다 하나의 루프를 이루고, 이 입체 구조는 각 루프간에서 유사하고, 구조 단위 또는 도메인이라 불린다. 중쇄, 경쇄 모두 N 말단측에 위치하는 도메인은, 동종 동물의 동일 클래스(서브클래스)로부터의 표품이어도, 그의 아미노산 서열이 일정하지 않아, 가변 영역이라 불리며, 각 도메인은 각각 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)이라 불리고 있다. 이로부터 C 말단측의 아미노산 서열은, 각 클래스 또는 서브클래스마다 거의 일정하여 정상 영역이라고 불리고 있고, 각 도메인은 각각 CH_1 , CH_2 , CH_3 또는 C_L 이라 표시된다.

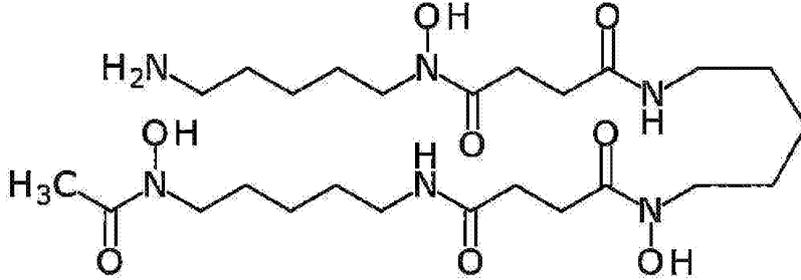
[0107] 항체와 항원의 결합의 특이성은, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 의해 구성되는 부분의 아미노산 서열에 의한다. 한편, 보체나 각종 세포와의 결합과 같은 생물학적 활성은 각 클래스 Ig의 정상 영역의 구조의 차를 반영하고 있다. 중쇄와 경쇄의 가변 영역의 가변성은, 어느 쇠에도 존재하는 3개의 작은 초가변 영역에 거의 한정되는 것을 알고 있으며, 이들 영역을 상보성 결정 영역(CDR; 각각 N 말단측으로부터 CDR1, CDR2, CDR3)이라 부르고 있다. 가변 영역의 나머지 부분은 프레임워크 영역(FR)이라 불리고, 비교적 일정하다.

- [0108] 항체의 중쇄 정상 영역의 C_{H1} 도메인과 C_{H2} 도메인 사이에 있는 영역은 힌지 영역이라 불리고, 이 영역은, 프롤린 잔기를 많이 포함하고, 2개의 중쇄를 연결하는 복수의 쇠간 S-S 결합을 포함한다. 예를 들어, 인간의 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 각 힌지 영역에는, 중쇄간의 S-S 결합을 구성하고 있는, 각각 2개, 4개, 11개, 2개의 시스테인 잔기를 포함한다. 힌지 영역은, 과과인이나 펩신 등의 단백질 분해 효소에 대한 감수성이 높은 영역이다. 항체를 과과인으로 소화한 경우, 힌지 영역의 중쇄간 S-S 결합보다도 N 말단측의 위치에서 중쇄가 절단되어, 2개의 Fab 프래그먼트와 1개의 Fc 프래그먼트로 분해된다. Fab 프래그먼트는, 경쇄와, 중쇄 가변 영역, C_{H1} 도메인과 힌지 영역의 일부를 포함하는 중쇄 프래그먼트로 구성된다. Fab 프래그먼트는 가변 영역을 포함하고, 항원 결합 활성을 갖는다.
- [0109] <본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트>
- [0110] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트에는, 이하의 특징을 갖는 Fab 프래그먼트가 포함된다:
- [0111] 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0112] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 정상 영역으로서, I γ 1, I γ 2, I γ 3 또는 I γ 4 등 중 어느 정상 영역도 선택 가능할 수 있다. 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 정상 영역은, 인간 I γ 1 정상 영역이다.
- [0113] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄 정상 영역으로서, I λ 또는 I κ 중 어느 정상 영역도 선택 가능할 수 있다. 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄 정상 영역은, 인간 I κ 정상 영역이다.
- [0114] 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트는, 이하의 Fab 프래그먼트이다:
- [0115] 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0116] Fab 프래그먼트를 포함하고, 항체를 세포에서 발현시키는 경우, 항체가 번역 후에 수식을 받는 것이 알려져 있다. 번역 후 수식의 예로서는, 중쇄 C 말단의 리신의 카르복시펩티다아제에 의한 절단, 중쇄 및 경쇄 N 말단의 글루타민 또는 글루탐산의 피로글루타미화에 의한 피로글루탐산으로의 수식, 글리코실화, 산화, 탈아미드화, 당화 등을 들 수 있고, 각종 항체에 있어서, 이러한 번역 후 수식이 발생하는 것이 알려져 있다(J. Pharm. Sci., 2008; 97: 2426-2447).
- [0117] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트에는, 번역 후 수식에 의해 발생한 Fab 프래그먼트도 포함될 수 있다. 번역 후 수식에 의해 발생할 수 있는 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 예로서는, 중쇄 N 말단이 피로글루타미화된 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 들 수 있다. 이러한 N 말단의 피로글루타미화에 의한 번역 후 수식은, 항체의 활성에 현저한 영향을 미치지 않는 것은 당해 분야에서 알려져 있다(Anal. Biochem.; 2006; 348: 24-39).
- [0118] 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트는, 하기 특징을 갖는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이다:
- [0119] 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역이며, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1의 글루탐산이 피로글루탐산으로 수식된 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0120] 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트는, 하기 특징을 갖는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이다:
- [0121] 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트이며, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1의 글루탐산이 피로글루탐산으로 수식된 중쇄 프래그먼트, 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0122] 본 발명에는, 이하의 특징을 갖는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트도 포함된다:

- [0123] 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트, 그리고 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 38까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 54부터 60까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 93부터 101까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트.
- [0124] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트는, 인간 CEACAM5에 결합한다. 얻어진 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 인간 CEACAM5에 대한 결합 활성을 측정하는 방법으로서, 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance; SPR)법에 의한 해석이나 ELISA 등의 방법이 있다. 예를 들어, SPR법에 의한 해석을 사용하는 경우, Biacore T200(GE 헬스케어·재팬사)을 사용하여, 센서칩에 비오틴 캡처 키트(Biotin CAPture Kit)(GE 헬스케어·재팬사)와 비오틴화한 인간 CEACAM5를 고상화하고, 단계 희석한 Fab 프래그먼트를 첨가함으로써 결합 속도 상수(ka), 해리 속도 상수(kd) 및 해리 상수(K_D)를 측정할 수 있다.
- [0125] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트는, 본 명세서에 개시되는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트 및 경쇄의 서열 정보에 기초하여, 당해 분야에서 공지된 방법을 사용하여, 당업자에 의해 용이하게 제작될 수 있다. 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 후술하는 <본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법>에 기재된 방법에 따라서 생산할 수 있다.
- [0126] <본 발명의 복합체>
- [0127] 본 발명의 복합체는, 표지부와 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체이다.
- [0128] 「표지부」란, (i) 배위자 및 링커, (ii) 배위자, (iii) 형광 색소 및 링커, 또는 (iv) 형광 색소이다. 어떤 형태로서는, (i) 배위자 및 링커, 또는 금속을 포함하는 (ii) 배위자를 들 수 있다. 어떤 형태로서는, (iii) 형광 색소 및 링커를 들 수 있다. 어떤 형태로서는, (i) 배위자 및 링커를 들 수 있다. 「표지부」의 배위자는 추가로 금속을 포함하고 있어도 되고, 어떤 형태로서는, 금속을 포함하는 (i) 배위자 및 링커, 또는 (ii) 배위자이며, 다른 형태로서는, (i) 금속과 킬레이트 착체를 형성한 배위자 및 링커, 또는 (ii) 금속과 킬레이트 착체를 형성한 배위자이다.
- [0129] 금속, 형광 색소 또는 비금속 방사성 동위 원소를 포함하는 본 발명의 복합체는, 각종 조영제 등에 사용할 수 있고, 예를 들어 MRI 조영제, PET 트레이서, 형광 표지된 분자 이미징제 등에 사용된다.
- [0130] 본 명세서에 있어서 「금속」은, 상자(常磁)성 금속 이온 또는 금속 방사성 동위 원소를 의미한다. 금속으로서, 각 배위자에 배위 결합하는 금속이면 특별히 제한은 없다. 복합체의 사용 목적에 따라서, 공지된 적절한 배위자와 금속의 조합이 선택된다.
- [0131] 상자성 금속 이온은, MRI 조영제에 적합하게 사용된다. 상자성 금속 이온의 형태로서는, Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Rh²⁺, Co²⁺, Gd³⁺, Eu³⁺, Dy³⁺, Tb³⁺, Pm³⁺, Nd³⁺, Tm³⁺, Ce³⁺, Y³⁺, Ho³⁺, Er³⁺, La³⁺, Yb³⁺, Mn³⁺ 또는 Mn²⁺를 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 어떤 형태로서는, Gd³⁺, Mn³⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ 또는 Fe³⁺를 들 수 있다. 어떤 형태로서는, Mn³⁺ 또는 Mn²⁺를 들 수 있다. 이 경우, 복합체에는 카운터 음이온으로서 할로젠 등을 사용할 수 있다. 또한, 카운터 음이온은 배위자의 C(=O)O⁻여도 되고, 추가로 복합체는 Na⁺ 등의 카운터 양이온을 갖고 있어도 된다.
- [0132] 금속 방사성 동위 원소는, 예를 들어 PET 트레이서 등에 사용된다. 금속 방사성 동위 원소의 형태로서는, ⁸⁹Zr, ⁵¹Mn, ⁵²Fe, ⁶⁰Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ^{99m}Tc 또는 ¹¹¹In을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 어떤 형태로서는, ⁸⁹Zr, ⁶⁰Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ^{99m}Tc 또는 ¹¹¹In을 들 수 있다. 어떤 형태로서는, 지르코늄의 방사성 동위체를 들 수 있다. 어떤 형태로서는 ⁸⁹Zr을 들 수 있다.
- [0133] 「배위자」란, 본 복합체에 있어서 금속과 킬레이트 착체를 형성할 수 있는 부분이며, 어떤 형태로서는, 킬레이트체로 구성되는 기를 의미한다. 구성되는 기란, 킬레이트체로부터 프로톤이 제거되어, 결합손을 갖는 기이다.

[0134] 「킬레이트제」란, 금속과 배위 결합할 수 있는 화합물이다.

[0135] 「킬레이트제」로서는, 시테로포어와 비시테로포어를 들 수 있다. 추가로 어떤 형태로서는, MAG3(머캅토아세틸-글리실-글리실-글리신, CAS 번호: 66516-09-4), 및 그의 공지된 반응성 유도체를 들 수 있다. 시테로포어로서는, 히드록삼산형, 카테콜형 또는 혼합 배위자형을 들 수 있다. 히드록삼산형 시테로포어로서는, 예를 들어 페리크롬, 하기 식:



[0136]

[0137] 으로 나타나는 데페록사민(DFO), 푸사리닌 C, 오르니박틴, 로도투루르산, 및 이들의 공지된 반응성 유도체를 들 수 있다. 카테콜형 시테로포어로서는, 예를 들어 엔테로박틴, 바실리박틴, 비브리오박틴, 및 이들의 공지된 반응성 유도체를 들 수 있다. 혼합 배위자형 시테로포어로서는, 예를 들어 아조토박틴, 피요베르딘, 에르시니아 박틴, 및 이들의 공지된 반응성 유도체를 들 수 있다. 또한, 상기 시테로포어의 경우, DFO는 그의 반응성 관능기인 -NH₂를 통해 링커 또는 Fab 프래그먼트와 반응시킬 수 있고, DFO 이외의 시테로포어의 경우에는, 카르복시기, 수산기, 아미노기 등의 반응성 관능기를 통해, 당업자가 통상 사용하는 방법으로 링커 또는 Fab 프래그먼트와 반응시킬 수도 있다.

[0138]

비시테로포어로서는, DTPA(디에틸렌트리아민오아세트산, CAS 번호: 67-43-6), DTPA-BMA(1,7-비스(메틸카르바모일메틸)-1,4,7-트리아자헵탄-1,4,7-삼아세트산, CAS 번호: 119895-95-3), EOB-DTPA(에톡시벤질DTPA, 2-[[[(2S)-2-[비스(카르복시메틸)아미노]-3-(4-에톡시페닐)프로필]-[2-[비스(카르복시메틸)아미노]에틸]아미노]아세트산), TTHA(트리에틸렌테트라민옥아세트산, CAS 번호: 869-52-3), DO3A(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7-삼아세트산, CAS 번호: 217973-03-0), HP-DO3A(10-(2-히드록시프로필)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7-삼아세트산, CAS 번호: 120041-08-9), DOTA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산, CAS 번호: 60239-18-1), 및 이들의 공지된 반응성 유도체를 들 수 있다.

[0139]

또한, 본 명세서 중의 화합물 및 복합체는, 특별히 기재되지 않는 한 프리체 및 그의 염도 포함한다. 여기서 「그의 염」이란, 그의 화합물 및 복합체의 치환기 종류에 따라서, 산부가염 또는 염기와의 염을 형성하는 경우가 있고, 그의 화합물 및 복합체를 형성할 수 있는 염이다. 구체적으로는 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 질산, 인산 등의 무기산이나, 포름산, 아세트산, 프로피온산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 푸마르산, 말레산, 락트산, 말산, 만델산, 타르타르산, 디벤조일타르타르산, 디톨루오일타르타르산, 시트르산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산, 아스파르트산, 글루탐산 등의 유기산과의 산부가염, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 알루미늄 등의 무기 염기나, 메틸아민, 에틸아민, 에탄올아민, 리신, 오르니틴 등의 유기 염기와의 염, 아세틸류신 등의 각종 아미노산 및 아미노산 유도체와의 염이나 암모늄염 등을 들 수 있다. 예를 들어, DFO는 데페록사민메탄술폰산염으로서도 존재하고, 다른 염으로서도 존재한다. DTPA는 프리체와 함께 나트륨염으로서도 존재한다.

[0140]

MRI 조영제에 사용하는 경우의 「킬레이트제」의 어떤 형태로서는, 상기 시테로포어 및 비시테로포어 킬레이트제이다.

[0141]

PET 트레이저에 사용하는 경우의 「킬레이트제」의 어떤 형태로서는, 상기 시테로포어 및 비시테로포어 킬레이트제이며, 또한 어떤 형태로서는 MAG3이다. 어떤 형태로서는, DFO이다.

[0142]

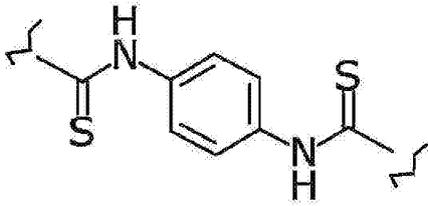
본 발명의 복합체에 포함되는 배위자를 형성하는 「킬레이트제」의 어떤 형태로서는, DFO, DTPA, DTPA-BMA, EOB-DTPA, DO3A, HP-DO3A, DOTA를 들 수 있다. 어떤 형태로서는, DFO, DTPA, DOTA를 들 수 있다. 어떤 형태로서는, DFO를 들 수 있다.

[0143]

「링커」란, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트와 배위자 사이에 거리를 만드는 기이다. 복합체에 있어서의

「링커」의 어떤 형태로서는,

[0144] 하기 식:



[0145] (이하 -C(=S)-NH-(1,4-페닐렌)-NH-C(=S)-라 표기함), -CH₂-(1,4-페닐렌)-NH-C(=S)-, -C(=O)-(C₁₋₂₀ 알킬렌)-C(=O)-를 들 수 있다. 여기서 「C₁₋₂₀ 알킬렌」이란, 직쇄 또는 분지의 탄소수 1 내지 20의 알킬렌이다. C₁₋₂₀ 알킬렌의 어떤 형태로서는, C₁₋₁₀ 알킬렌, C₁₋₂ 알킬렌을 들 수 있다. C₁₋₂₀ 알킬렌의 어떤 형태로서는, 에틸렌을 들 수 있다. 어떤 형태로서는, -C(=S)-NH-(1,4-페닐렌)-NH-C(=S)-를 들 수 있다. 어떤 형태로서는, -C(=O)-C₂H₄-C(=O)-를 들 수 있다. 링커를 형성하기 위해 사용할 수 있는 시약으로서는, HO-C(=O)-(C₁₋₂₀ 알킬렌)-C(=O)-OH, 숙신산, p-페닐렌다이소티오시아네이트 등을 들 수 있다.

[0147] 형광 색소를 포함하는 본 발명의 복합체는 형광 표지된 분자 이미징제로서 사용할 수 있다.

[0148] 본 발명의 복합체에 사용하는 형광 색소로서는, 광 이미징에 통상 사용되는 근적외 파장(650 내지 1000nm)에 흡수 극대 및 발광 극대가 있는 색소를 사용할 수 있다. 형광 색소의 어떤 형태로서는, 시아닌 또는 인도시아닌 화합물을 들 수 있다. 어떤 형태로서는, IRDye800CW(LI-COR사), Cy(Molecular Probe사), Alexa Fluor, BODIPY 및 DyLight(Thermo Fisher Scientific사), CF790(Biotium사), DY(DYOMICS GMBH사), HiLyte Fluor680 및 HiLyte Fluor750(Anaspec사), PULSAR650 및 QUASAR670(Biosearch Technologies사) 등을 들 수 있다. 어떤 형태로서는, IRDye800CW를 들 수 있다. 또한, 형광 색소는, 그의 카르복시기, 수산기, 아미노기 등을 통해, 또는 당업자가 통상 사용하는 방법으로 활성화기를 도입하고, Fab 프래그먼트 또는 링커와 반응시킬 수 있다. 활성화기가 도입된 형광 색소의 어떤 형태로서는, N-히드록시숙신이미드(NHS)기로 에스테르화된 형광 색소를 들 수 있다. 예를 들어, 상술한 IRDye800CW의 NHS 에스테르는 시판되고 있으며, 그것들을 이용 가능하다.

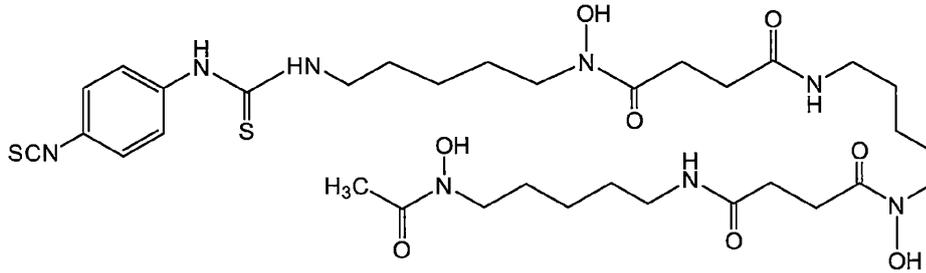
[0149] 비금속 방사성 동위 원소를 포함하는 본 발명의 복합체는, PET 트레이서로서 사용할 수 있다.

[0150] 본 발명의 복합체에 사용하는 비금속 방사성 동위 원소로서는, ¹⁸F, ¹¹C, ¹⁵O, ¹³N을 들 수 있다. 어떤 형태로서는, ¹⁸F를 들 수 있다. 비금속 방사성 동위 원소를 포함하는 화합물의 결합에는, 예를 들어 N-숙신이미딜-4-[¹⁸F]플루오로벤조산([¹⁸F]SFB)을 사용할 수 있다.

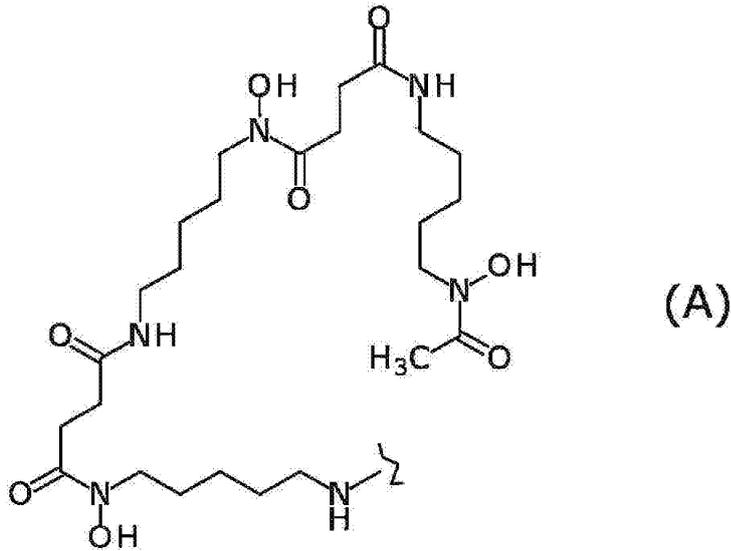
[0151] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트와 표지부의 결합은, 공지된 방법에 의해, 당업자가 적절히 행할 수 있다. 예를 들어, 표지부를 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 1 이상의 아미노기(예를 들어, N 말단 아미노기나 아미노산 측쇄의 아미노기), 1 이상의 티올기(예를 들어, 아미노산 측쇄의 티올기), 또는 1 이상의 카르복실기(예를 들어, C 말단이나 아미노산의 측쇄의 카르복실기)에 결합시킬 수 있다. 어떤 형태로서, 본 발명의 복합체는, 표지부가 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 1 이상의 아미노기에 결합한 복합체이다.

[0152] 본 발명의 복합체는, 표지부가 배위자 및 링커인 경우, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트와 링커를 반응시켜 얻어진 물질에 배위자를 형성하는 킬레이트제를 반응시켜 생산할 수도 있다. 배위자를 형성하는 킬레이트제에 링커를 반응시켜 얻어진 물질에 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 반응시켜 생산할 수도 있다. 반응예로서는, 킬레이트제의 아미노기와 링커를 반응시켜 얻어진 물질을, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 1 이상의 아미노기(예를 들어, N 말단 아미노기나 리신 측쇄의 아미노기)와 반응시키는 것을 들 수 있다. 표지부가 배위자인 경우, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트와 배위자를 형성하는 킬레이트제를 반응시켜 생산할 수도 있다. 반응예로서는, 킬레이트제를, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 1 이상의 아미노기(예를 들어, N 말단 아미노기나 리신 측쇄의 아미노기)와 반응시키는 것을 들 수 있다. 본 발명의 복합체의 생산에는, 아민에 이소티오시아네이트를 첨가하여 티오우레아를 합성하는 반응이나, 아민에 카르복실산을 첨가하여 아미드를 합성하는 반응 등을 사용할 수 있다. 당해 반

응은, 당업자에게 공지된 방법을 적용함으로써 행할 수 있다. 또한, 원료로서 미리 배위자와 링커가 결합한 화합물을 사용할 수도 있다. 배위자와 링커가 결합한 화합물의 예로서는, 이하의 식으로 나타나는 p-SCN-Bn-DFO(p-이소티오시아노페닐아미노티오카르보닐기 치환 DFO, CAS 번호: 1222468-90-7),



- [0153]
- [0154] p-이소티오시아노벤질기 치환 DTPA(p-SCN-Bn-DTPA, CAS 번호: 102650-30-6), p-이소티오시아노벤질기 치환 DOTA(p-SCN-Bn-DOTA, CAS 번호: 127985-74-4), 및 p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA([(R)-2-아미노-3-(4-이소티오시아네이토펜일)프로필]-트랜스-(S, S)-시클로헥산-1,2-디아민-오아세트산, CAS 번호: 157380-45-5)를 들 수 있다.
- [0155] 예를 들어, 본 발명의 복합체는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 1 이상의 아미노기(예를 들어, N 말단 아미노기나 아미노산의 측쇄의 아미노기)와, 이소티오시아나산기를 갖는 표지부를 반응시켜, 아미노기를 통해 1 이상의 표지부가 결합한 Fab 프래그먼트인 복합체로서 생산할 수 있다.
- [0156] 상기 생산 방법에 의해 생산한, 1 이상의 표지부가 결합한 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트에 금속(상자성 금속 이온 또는 금속 방사성 동위 원소)을 첨가하여, 금속을 포함하는 본 발명의 복합체를 얻을 수 있다.
- [0157] 본 발명의 복합체는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트에 1 이상의 표지부가 결합한 복합체이다. 본 발명의 복합체는, 어떤 형태로서는 1 내지 25의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 1 내지 23의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 1 내지 16의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 1 내지 11의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 1 내지 10의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 1 내지 9의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 4 내지 23의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 4 내지 16의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 4 내지 10의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 4 내지 9의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 3 내지 23의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 3 내지 16의 표지부와 결합한, 어떤 형태로서는 3 내지 10의 표지부와 결합한, 또한 어떤 형태로서는 3 내지 9의 표지부와 결합한, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이다. 본 발명의 복합체는, 어떤 형태로서는 추가로 금속을 포함하는, 1개 이상의 표지부와 결합한 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이다. 본 발명의 복합체의 어떤 형태로서는, 결합한 표지부의 수가 다른 복합체의 혼합물이어도 된다.
- [0158] 하나의 실시 형태로서, 본 발명의 복합체는, 표지부와 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체이다.
- [0159] 어떤 실시 형태로서, 본 발명의 복합체는, 표지부가 (i) 배위자 및 링커, 또는 (ii) 배위자인 복합체이다.
- [0160] 어떤 실시 형태로서, 본 발명의 복합체는, 표지부가 (i) 배위자 및 링커, 또는 (ii) 배위자이며, 당해 배위자가 하기 식 (A)로 나타나는 배위자인 복합체이다:



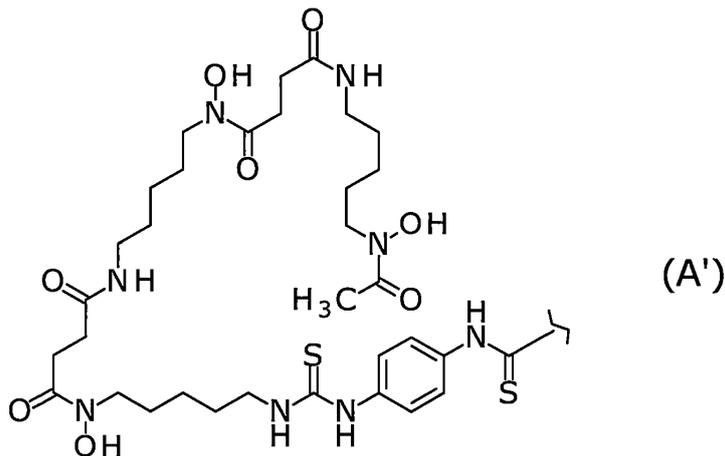
[0161]

[0162]

식 중, 파선은 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트 또는 링커로의 결합을 나타낸다.

[0163]

어떤 실시 형태로서, 본 발명의 복합체는, 표지부가 (i) 배위자 및 링커이며, 당해 배위자 및 링커가 하기 식 (A')로 나타나는 기인 복합체이다:



[0164]

[0165]

식 중, 파선은 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트로의 결합을 나타낸다.

[0166]

어떤 실시 형태로서, 본 발명의 복합체는, 표지부가 식 (A')로 나타나는 기이며, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트가, 당해 Fab 프래그먼트 중의 아미노기를 통해, 표지부 말단의 C(=S)기의 탄소 원자와 결합하고 있는 복합체이다.

[0167]

어떤 실시 형태로서, 본 발명의 복합체는 하기 식 (I)로 나타나는 복합체이다:

[0168]



[0169]

식 중, Ab는 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이고,

[0170]

L은 배위자이고,

[0171]

X는 링커 또는 결합이고,

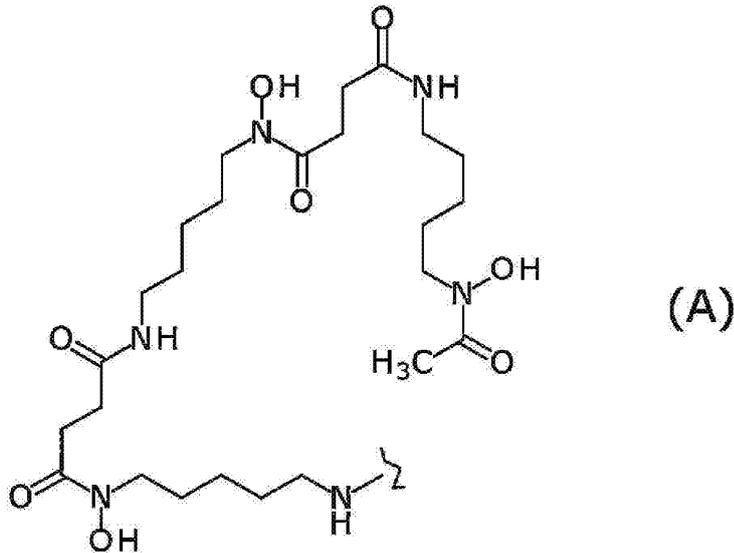
[0172]

p는 1 내지 25의 자연수이며, p의 어떤 형태로서는 1 내지 23의 자연수이고, 어떤 형태로서는 1 내지 16의 자연수이고, 어떤 형태로서는 1 내지 11의 자연수이고, 어떤 형태로서는 1 내지 10의 자연수이고, 어떤 형태로서는 1 내지 9의 자연수이고, 어떤 형태로서는 4 내지 23의 자연수이고, 어떤 형태로서는 4 내지 16의 자연수이고, 어떤 형태로서는 4 내지 10의 자연수이고, 어떤 형태로서는 4 내지 9의 자연수이고, 어떤 형태로서는 3 내지 23

의 자연수이고, 어떤 형태로서는 3 내지 16의 자연수이고, 어떤 형태로서는 3 내지 10의 자연수이고, 또한 어떤 형태로서는 3 내지 9의 자연수이다.

[0173] 어떤 실시 형태로서, 본 발명의 복합체는,

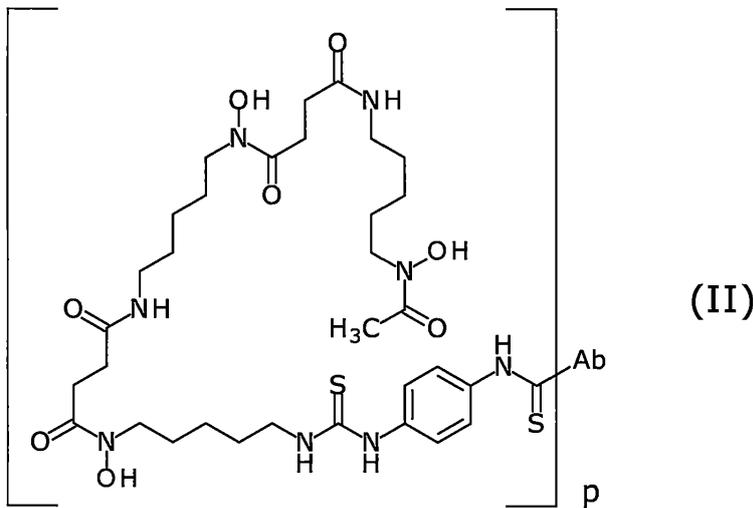
[0174] L이 하기 식 (A)로 나타나는 배위자인, 식 (I)의 복합체이다:



[0175]

[0176] 식 중, 파선은 X(단, X가 결합인 경우에는 Ab)로의 결합을 나타낸다.

[0177] 식(I)의 복합체의 어느 실시 형태로서는 하기 식 (II)로 나타나는 복합체이다:



[0178]

[0179] 식 중, Ab는 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트이고,

[0180] p는 1 내지 25의 자연수이며, p의 어떤 형태로서는 1 내지 23의 자연수이고, 어떤 형태로서는 1 내지 16의 자연수이고, 어떤 형태로서는 1 내지 11의 자연수이고, 어떤 형태로서는 1 내지 10의 자연수이고, 어떤 형태로서는 1 내지 9의 자연수이고, 어떤 형태로서는 4 내지 23의 자연수이고, 어떤 형태로서는 4 내지 16의 자연수이고, 어떤 형태로서는 4 내지 10의 자연수이고, 어떤 형태로서는 4 내지 9의 자연수이고, 어떤 형태로서는 3 내지 23의 자연수이고, 어떤 형태로서는 3 내지 16의 자연수이고, 어떤 형태로서는 3 내지 10의 자연수이고, 또한 어떤 형태로서는 3 내지 9의 자연수이고,

[0181] Ab는 당해 Ab 중의 아미노기를 통해, 표지부 말단의 C(=S)의 탄소 원자와 결합하고 있다.

[0182] 어떤 실시 형태로서, 본 발명의 복합체는 식 (I)의 복합체이며, 추가로 금속을 포함하는 복합체이다. 금속의

어떤 형태로서는, 금속 방사성 동위 원소를 들 수 있다. 금속 방사성 동위 원소의 어떤 형태로서는, ⁸⁹Zr을 들 수 있다.

[0183] 어떤 실시 형태로서, 본 발명의 복합체는 식 (II)의 복합체이며, 추가로 금속을 포함하는 복합체이다. 금속의 어떤 형태로서는, 금속 방사성 동위 원소를 들 수 있다. 금속 방사성 동위 원소의 어떤 형태로서는, ⁸⁹Zr을 들 수 있다.

[0184] 본 발명의 복합체에는, 복수종의 복합체의 혼합물인 복합체도 포함된다. 예를 들어, 표지부와 번역 후 수식을 받지 않은 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체, 및 표지부와 상기 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 번역 후 수식에 의해 발생한 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체의 혼합물인 복합체도 본 발명의 복합체에 포함된다.

[0185] 복수종의 본 발명의 복합체의 혼합물인 본 발명의 복합체의 어느 실시 형태를 이하에 나타낸다:

[0186] (1) 표지부가 식 (A')로 나타나는 배위자 및 링커이며, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트가, 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트인 복합체, 그리고 표지부가 식 (A')로 나타나는 배위자 및 링커이며, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트가, 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트이며, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1의 글루타민이 피로글루탐산으로 수식된 중쇄 프래그먼트, 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 포함하는 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트인 복합체의 혼합물인 복합체.

[0187] (2) 추가로 금속을 포함하는, (1)의 복합체.

[0188] (3) 추가로 금속을 포함하는 (1)의 복합체 및 금속을 포함하지 않는, (1)의 복합체의 혼합물인 복합체.

[0189] (4) 금속이 금속 방사성 동위 원소인, (2) 내지 (3)의 복합체.

[0190] (5) 금속 방사성 동위 원소가 ⁸⁹Zr인, (4)의 복합체.

[0191] <본 발명의 폴리뉴클레오티드>

[0192] 본 발명의 폴리뉴클레오티드에는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 포함된다.

[0193] 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 또는 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0194] 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서는, 예를 들어 서열 번호 1의 염기 번호 1부터 363까지의 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다.

[0195] 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서는, 예를 들어 서열 번호 3의 염기 번호 1부터 336까지의 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다.

[0196] 바람직한 실시 형태에 있어서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 또는 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0197] 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서는, 예를 들어 서열 번호 1에 나타나는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다.

[0198] 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서는, 예를 들어 서열 번호 3에 나타나는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다.

[0199] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트 및 경쇄의

아미노산 서열에 기초하여 디자인된 염기 서열에 기초하여, 당해 기술 분야에서 공지된 유전자 합성 방법을 이용하여 합성하는 것이 가능하다. 이러한 유전자 합성 방법으로는, 국제 공개 제90/07861호에 기재된 항체 유전자의 합성 방법 등의 당업자에게 공지된 다양한 방법이 사용될 수 있다.

[0200] <본 발명의 발현 벡터>

[0201] 본 발명의 발현 벡터에는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 그리고 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 포함된다.

[0202] 바람직한 본 발명의 발현 벡터에는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 그리고 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 포함된다.

[0203] 바람직한 본 발명의 발현 벡터에는, 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 그리고 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 포함된다.

[0204] 본 발명의 발현 벡터는, 원핵 세포 및/또는 진핵 세포의 각종 숙주 세포 중에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 코딩되는 폴리펩티드를 산생할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다. 이러한 발현 벡터로서는, 예를 들어 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, 레트로바이러스) 등을 들 수 있고, 바람직하게는 pEE6.4나 pEE12.4(Lonza사)를 사용할 수 있다.

[0205] 본 발명의 발현 벡터는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 중쇄 프래그먼트 및/또는 경쇄를 코딩하는 유전자에 기능 가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 숙주 세포 중에서 본 발명의 Fab 프래그먼트를 발현시키기 위한 프로모터로서는, 숙주 세포가 에세리키아속균인 경우, 예를 들어 Trp 프로모터, lac 프로모터, recA 프로모터, λPL 프로모터, lpp 프로모터, tac 프로모터 등을 들 수 있다. 효모 중에서의 발현용 프로모터로서는, 예를 들어 PH05 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터를 들 수 있고, 바실루스속균에서의 발현용 프로모터로서는, SL01 프로모터, SP02 프로모터, penP 프로모터 등을 들 수 있다. 또한, 숙주가 포유 동물 세포 등의 진핵 세포인 경우, CMV, RSV, SV40 등의 바이러스 유래의 프로모터, 레트로바이러스의 프로모터, 액틴 프로모터, EF(elongation factor; 신장 인자) 1α 프로모터, 히트 쇼크 프로모터 등을 들 수 있다.

[0206] 본 발명의 발현 벡터는, 숙주 세포로서 세균, 특히 대장균을 사용하는 경우, 개시 코돈, 종지 코돈, 터미네이터 영역 및 복제 가능 단위를 더 포함할 수 있다. 한편, 숙주로서 효모, 동물 세포 또는 곤충 세포를 사용하는 경우, 본 발명의 발현 벡터는 개시 코돈, 종지 코돈을 포함할 수 있다. 또한, 이 경우, 인핸서 서열, 본 발명의 중쇄 프래그먼트 및/또는 경쇄를 코딩하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 분비 시그널 서열, 스플라이싱 접합부, 폴리아데닐레이션 부위, 또는 복제 가능 단위 등을 포함하고 있어도 된다. 또한, 목적에 따라서 통상 사용되는 선택 마커(예를 들어, 테트라사이클린 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자, 카나마이신 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 디히드로엽산 환원 효소 유전자)를 포함하고 있어도 된다.

[0207] <본 발명의 형질 전환된 숙주 세포>

[0208] 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포에는, 이하의 (a) 내지 (d)로 이루어지는 군에서 선택되는, 본 발명의 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포가 포함된다.

[0209] (a) 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리

뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;

- [0210] (b) 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0211] (c) 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0212] (d) 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.
- [0213] 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 이하의 (a) 내지 (d)로 이루어지는 군에서 선택되는, 본 발명의 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포이다:
- [0214] (a) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0215] (b) 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0216] (c) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0217] (d) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.
- [0218] 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 이하의 (a) 내지 (d)로 이루어지는 군에서 선택되는, 본 발명의 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포이다:
- [0219] (a) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0220] (b) 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0221] (c) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0222] (d) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.
- [0223] 바람직한 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포로서는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포, 그리고 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포를 들 수 있다.
- [0224] 형질 전환하는 숙주 세포로서는, 사용하는 발현 벡터에 적합하고, 해당 발현 벡터로 형질 전환되어, Fab 프래그먼트를 발현할 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않고, 본 발명의 기술 분야에 있어서 통상 사용되는 천연 세포

또는 인공적으로 수립된 세포 등 다양한 세포(예를 들어, 세균(에세리키아속균, 바실루스속균), 효모(사카로마이세스속, 피키아속 등), 동물 세포 또는 곤충 세포(예를 들어, Sf9) 등), 포유 동물 세포주(예를 들어, CHOK1SV 세포, CHO-DG44 세포, 293 세포 등의 배양 세포)가 예시된다. 형질 전환 자체는, 예를 들어 인산칼슘법, 일렉트로포레이션법 등 공지된 방법에 의해 행해질 수 있다.

- [0225] <본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법>
- [0226] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정을 포함한다.
- [0227] 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법에 있어서 배양하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 이하의 (a) 내지 (c)로 이루어지는 군에서 선택된다:
- [0228] (a) 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0229] (b) 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0230] (c) 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포, 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.
- [0231] 어떤 형태로서는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법에 있어서 배양하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 이하의 (a) 내지 (c)로 이루어지는 군에서 선택된다:
- [0232] (a) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0233] (b) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0234] (c) 서열 번호 2의 아미노산 번호 1 내지 121에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1 내지 112에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.
- [0235] 어떤 형태로서는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법에 있어서 배양하는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 이하의 (a) 내지 (c)로 이루어지는 군에서 선택된다:
- [0236] (a) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포;
- [0237] (b) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포; 그리고
- [0238] (c) 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포, 및 서열 번호 4에 나타나는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포.

- [0239] 바람직하게는, 사용되는 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포는, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포, 또는 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 경쇄를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포이다.
- [0240] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법에 있어서, 형질 전환된 숙주 세포는, 영양 배지 중에서 배양될 수 있다. 영양 배지는, 형질 전환된 숙주 세포의 생육에 필요한 탄소원, 무기 질소원 또는 유기 질소원을 포함하고 있는 것이 바람직하다. 탄소원으로서, 예를 들어 글루코오스, 텍스트란, 가용성 전분, 자당 등이, 무기 질소원 또는 유기 질소원으로서, 예를 들어 암모늄염류, 질산염류, 아미노산, 옥수수 침지액, 펩톤, 카제인, 육액기스, 콩깻묵, 감자 추출액 등이 예시된다. 또한 원하는 경우 다른 영양소(예를 들어, 무기염(예를 들어, 염화칼슘, 인산이수소나트륨, 염화마그네슘), 비타민류, 항생 물질(예를 들어, 테트라사이클린, 네오마이신, 암피실린, 카나마이신 등) 등)을 포함하고 있어도 된다.
- [0241] 형질 전환된 숙주 세포의 배양 자체는, 공지된 방법에 의해 행해진다. 배양 조건, 예를 들어 온도, 배지의 pH 및 배양 시간은 적절히 선택된다. 예를 들어, 숙주가 동물 세포인 경우, 배지로서는, 약 5 내지 20%의 태아 소 혈청을 포함하는 MEM 배지(Science; 1952; 122: 501), DMEM 배지(Virology; 1959; 8: 396-397), RPMI1640 배지(J. Am. Med. Assoc.; 1967; 199: 519-524), 199 배지(Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 1950; 73: 1-8) 등을 사용할 수 있다. 배지의 pH는 약 6 내지 8인 것이 바람직하고, 배양은 통상 약 30 내지 40℃에서 약 15 내지 336시간 행해지고, 필요에 따라서 통기나 교반을 행할 수도 있다. 숙주가 곤충 세포인 경우, 예를 들어 태아 소 혈청을 포함하는 Grace's 배지(PNAS; 1985; 82: 8404-8408) 등을 들 수 있고, 그의 pH는 약 5 내지 8인 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 20 내지 40℃에서 15 내지 100시간 행해지고, 필요에 따라서 통기나 교반을 행할 수도 있다. 숙주가 세균, 방선균, 효모, 사상균인 경우, 예를 들어 상기 영양원을 함유하는 액체 배지가 적당하다. 바람직하게는 pH가 5 내지 8인 배지이다. 숙주가 E.coli인 경우, 바람직한 배지로서 LB 배지, M9 배지(Miller 등, Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory; 1972: 431) 등이 예시된다. 이러한 경우, 배양은 필요에 따라서 통기, 교반하면서, 통상 14 내지 43℃, 약 3 내지 24시간 행할 수 있다. 숙주가 바실루스속균인 경우, 필요에 따라서 통기, 교반을 하면서, 통상 30 내지 40℃, 약 16 내지 96시간 행할 수 있다. 숙주가 효모인 경우, 배지로서, 예를 들어 Burkholder 최소 배지(PNAS; 1980; 77: 4505-4508)를 들 수 있고, pH는 5 내지 8인 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 20 내지 35℃에서 약 14 내지 144시간 행해지고, 필요에 따라서 통기나 교반을 행할 수도 있다.
- [0242] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정에 더하여, 발현시킨 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 회수, 바람직하게는 분리, 정제하는 공정을 포함할 수 있다. 분리, 정제 방법으로서, 예를 들어, 염석, 용매 침전법 등의 용해도를 이용하는 방법, 투석, 한외 여과, 겔 여과, 도데실황산나트륨-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 등 분자량의 차를 이용하는 방법, 이온 교환 크로마토그래피나 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등의 하전을 이용하는 방법, 친화성 크로마토그래피 등의 특이적 친화성을 이용하는 방법, 역상 고속 액체 크로마토그래피 등의 소수성의 차를 이용하는 방법, 등전점 전기 영동 등의 등전점의 차를 이용하는 방법 등을 들 수 있다.
- [0243] <본 발명의 복합체를 생산하는 방법>
- [0244] 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 표지부와 공유 결합시키는 공정을 포함한다. 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은 또한, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트와 표지부를 공유 결합시키는 공정을 포함하고 있어도 된다. 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은 또한, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 발현시킨 당해 Fab 프래그먼트를 회수하는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트와 표지부를 공유 결합시키는 공정을 포함하고 있어도 된다. 사용되는 링커, 배위자 또는 형광 색소 등, 및 연결의 방법은, <본 발명의 복합체>에 기재된 것을 사용할 수 있다.
- [0245] 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트를 표지부와 공유 결합시키는 공정을 포함하는 방법이다. 어떤 형태로서는, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환

된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 발현시킨 당해 Fab 프래그먼트를 회수하는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트를 표지부와 공유 결합시키는 공정을 포함하는 방법이다.

[0246] 어떤 형태로서는, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트를 i) 배위자와 링커를 통해 결합시키거나 또는 ii) 배위자와 직접 공유 결합시키는 공정을 포함하는 방법이다. 어떤 형태로서는, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 발현시킨 당해 Fab 프래그먼트를 회수하는 공정, 및 당해 Fab 프래그먼트를 i) 배위자와 링커를 통해 결합시키거나 또는 ii) 배위자와 직접 공유 결합시키는 공정을 포함하는 방법이다.

[0247] 어떤 형태로서는, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 당해 Fab 프래그먼트를 배위자와 링커를 통하거나 또는 직접 공유 결합시키는 공정, 및 당해 복합체의 배위자에 금속을 배위 결합시키는(즉, 킬레이트 착체를 형성시키는) 공정을 포함하는 방법이다. 어떤 형태로서는, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 발현시킨 당해 Fab 프래그먼트를 회수하는 공정, 당해 Fab 프래그먼트를 배위자와 링커를 통하거나 또는 직접 공유 결합시키는 공정, 및 당해 복합체의 배위자에 금속을 배위 결합시키는 공정을 포함하는 방법이다.

[0248] 어떤 형태로서는, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 당해 Fab 프래그먼트를 배위자와 링커를 통하거나 또는 직접 공유 결합시키는 공정, 및 당해 복합체의 배위자에 금속 방사성 동위 원소를 배위 결합시키는(즉, 킬레이트 착체를 형성시키는) 공정을 포함하는 방법이다. 어떤 형태로서는, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 본 발명의 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 발현시키는 공정, 발현시킨 당해 Fab 프래그먼트를 회수하는 공정, 당해 Fab 프래그먼트를 배위자와 링커를 통하거나 또는 직접 공유 결합시키는 공정, 및 당해 복합체의 배위자에 금속 방사성 동위 원소를 배위 결합시키는 공정을 포함하는 방법이다.

[0249] 본 발명의 복합체를 생산하는 방법은, 상기에서 특정하는 2개 이상의 공정을 일련의 공정으로서 포함하는 방법으로서 실시할 수도 있고, 상기에서 특정하는 적어도 하나의 공정을 포함하는 방법으로서 실시할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 표지부와 결합시키는 공정을 포함하는 방법, 및 표지부를 결합시킨 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트에 금속으로 표지하는 공정을 포함하는 방법도 또한, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법에 포함된다. 또한, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법에는, 공정의 순서가 다른 방법도 포함된다. 예를 들어, 배위자를 금속 방사성 동위 원소로 표지한 후에, 당해 배위자를 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트와 공유 결합시키는 방법도, 본 발명의 복합체를 생산하는 방법에 포함된다.

[0250] <본 발명의 진단용 조성물 · 진단 방법>

[0251] 본 발명은, 형광 색소, 금속 또는 비금속 방사성 동위 원소를 포함하는 본 발명의 복합체(이하, 검출 가능한 본 발명의 복합체라 칭한다.)를 포함하는, 진단용 조성물에 관한 것이다. 검출 가능한 본 발명의 복합체는, 통상법에 따라서 제제화되어, 병기 진단약(특히 암의 진단)으로서 이용할 수 있다. 병기 진단약이란, 병상이 어느 정도 진행되어 있는지를 검사하는 것이 가능한 진단약을 의미한다. 예를 들어, 암에 대하여는, 그의 스테이지를 검사하는 것이 가능한 진단약을 의미한다. 본 발명의 진단용 조성물에 의해 진단할 수 있는 것이 기대되는 암은, 대장암, 유방암, 폐암, 갑상선암 및 이들이 전이된 암으로 이루어지는 군에서 선택된다. 바람직하게는, 당해 암은 대장암 또는 대장암이 전이된 암이다. 보다 바람직하게는, 당해 암은 대장암이 전이된 암이며, 그러한 암에는 전이성 간암이 포함된다.

[0252] 본 발명의 진단용 조성물의 제제화 시에 검출 가능한 본 발명의 복합체의 첨가량은, 환자의 증상의 정도나 연령, 사용하는 제제의 제형, 또는 Fab 프래그먼트의 결합 역가 등에 따라서 상이하지만, 예를 들어 환자의 단위 체중당 Fab 프래그먼트의 질량 배이스로 0.001mg/kg 내지 100mg/kg 정도를 사용하면 된다.

[0253] 본 발명의 진단용 조성물의 제형의 예로서는, 주사제, 점적용제 등의 비경구제를 들 수 있고, 정맥내 주사, 표적 국소로의 근육내 주사, 피하 주사 등에 의해 투여하는 것이 바람직하다. 또한, 제제화 시에는, 약학적으로 허용되는 범위에서, 이들 제형에 따른 담체나 첨가제를 사용할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체나 첨가제의 종류는 특별히 한정되지 않고, 당업자에게 주지된 담체나 첨가제를 사용할 수 있다.

[0254] 본 발명은 또한, 암의 진단용 조성물, 어떤 형태로서는, 병기 진단용 조성물의 생산을 위한, 검출 가능한 본 발

명의 복합체의 사용에 관한 것이다. 본 발명은, 암의 진단에 있어서 사용하기 위한, 어떤 형태로서는, 병기 진단에 있어서 사용하기 위한, 검출 가능한 본 발명의 복합체에도 관한 것이다.

[0255] 그리고, 본 발명은, 검출 가능한 본 발명의 복합체를, 수술 전 또는 수술 중에 대상에게 투여하는 것을 포함하는 암의 진단 방법에도 관한 것이다. 여기에 있어서, 「대상」이란, 그 진단을 받을 것을 필요로 하는 인간 또는 기타 포유 동물이며, 어떤 형태로서는, 그 진단을 받을 것을 필요로 하는 인간이다. 본 발명의 진단 방법에 있어서의 검출 가능한 본 발명의 복합체의 유효량은 상기 제제화 시에 검출 가능한 본 발명의 복합체의 유효량과 동일한 양이어도 된다. 본 발명의 진단 방법에 있어서, 검출 가능한 본 발명의 복합체는, 정맥내 주사 등에 의해 투여하는 것이 바람직하다. PET 트레이서로서 사용하기 위한 본 발명의 복합체는, 투여로부터 1.5 내지 48시간 후, 어떤 형태로서는 2 내지 48시간 후, 어떤 형태로서는 4 내지 24시간 후, 어떤 형태로서는 4 내지 6시간 후, 어떤 형태로서는 1.5 내지 6시간 후에 PET로 촬상할 수 있다. 본 발명의 진단 방법에 있어서, 형광 표지된 본 발명의 복합체를 수술 중 진단에 사용하는 경우, 당해 복합체는, 예를 들어 수술의 2 내지 48시간 전, 바람직하게는 4시간 전에 환자에게 투여된다.

[0256] 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명은, 본 발명의 복합체의 생산을 위한, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 사용에도 관한 것이다. 어떤 형태로서는, 본 발명은, 본 발명의 복합체를 포함하는 진단용 조성물의 생산을 위한, 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 사용에도 관한 것이다.

[0257] 본 발명에 대하여 전반적으로 기재하였지만, 추가로 이해를 얻기 위해 참조하는 특정한 실시예를 여기에 제공한다. 그러나, 이들은 예시 목적으로 하는 것으로서, 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

[0258] **실시예**

[0259] (실시예 1: 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트의 제작)

[0260] 마우스 유래의 항인간 CEACAM5 항체인 T84.66을 문헌(Protein Eng. Des. Sel.; 2004; 17: 481-489)에 기재된 방법을 참고로 하여 인간화 후, 문헌(Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics; 2014; 82: 1624-1635)에 준하여 구축한 인간화 항체의 분자 모델을 사용하여, 표지부를 결합시켜도 친화성이 감약되지 않을 것이 기대되는 가변 영역을 갖는 항체를 설계하였다.

[0261] 상기 항체의 중쇄 가변 영역 유전자의 5'측에 시그널 서열(Protein Engineering; 1987; 1: 499-505)을 코딩하는 유전자를, 그리고 3'측에 인간 Ig γ 1의 Fab 영역 유전자(서열 번호 1의 염기 번호 364부터 678까지의 염기 서열로 이루어짐)를 각각 연결시키고, 이 중쇄 프래그먼트 유전자를 GS 벡터 pEE6.4(Lonza사)에 삽입하였다. 또한, 항체의 경쇄 가변 영역 유전자의 5'측에 시그널 서열을 코딩하는 유전자를, 그리고 3'측에 인간 Ig κ 의 정상 영역 유전자(서열 번호 3의 염기 번호 337부터 657까지의 염기 서열로 이루어짐)를 각각 연결시키고, 이 경쇄 유전자를 GS 벡터 pEE12.4(Lonza사)에 삽입하였다. 항체의 중쇄 프래그먼트와 경쇄의 유전자가 각각 삽입된 전술한 pEE 벡터를 NotI와 PvuI로 제한 효소 절단하고, 라이게이션용 키트 TAKARA Ligation Kit Ver2.1(Takara사)을 사용하여 라이게이션을 행하고, 중쇄 프래그먼트와 경쇄의 양쪽 유전자가 삽입된 GS 벡터를 구축하였다.

[0262] 전술한 중쇄 프래그먼트와 경쇄의 양쪽 유전자가 삽입된 GS 벡터를 사용하여, 일과성 발현 및 항상적 발현의 2 종류의 방법으로 항체 발현을 행하였다. 일과성 발현에 대하여는, Expi293 발현 배지(Expression Medium)(Thermo Fisher Scientific사)에서 약 300만개/mL로 배양된 Expi293F 세포(Thermo Fisher Scientific사)에 대하여, 전술한 중쇄 프래그먼트와 경쇄의 양쪽 유전자가 삽입된 GS 벡터를 에피펙타민 293 형질감염 키트(ExpiFectamine 293 Transfection Kit)(Thermo Fisher Scientific사)를 사용하여 형질감염시키고, 5 내지 7일간 배양하였다. 배양 상청을 KappaSelect(GE 헬스케어·재팬사)를 사용하여 정제하고, Fab 프래그먼트를 얻었다. 항상적 발현에 대하여는, CHOK1SV 세포(Lonza사)에 PvuI로 직쇄로 한 전술한 중쇄 프래그먼트와 경쇄의 양쪽 유전자가 삽입된 GS 벡터를 진 펄서(Gene Pulser)(Bio-Rad사)를 사용한 일렉트로포레이션법으로 형질감염시켰다. 형질감염 다음날에 메티오닌선택시민을 첨가하고, 5 내지 7일간 배양하였다. 메틸셀룰로오스 함유 반고형 배지에 세포를 과중하고, 콜로니 형성 후에 ClonePix FL(Molecular Devices사)를 사용하여 Fab 프래그먼트의 발현량이 많은 세포를 취득하였다. 당해 세포의 배양 상청을 Capto L(GE 헬스케어·재팬사), Q 세파로스 패스트 플로우(Sepharose Fast Flow)(GE 헬스케어·재팬사) 및 BioPro S75(와이엠씨사)를 사용하여 정제하고, Fab 프래그먼트를 얻었다.

[0263] 제작한 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트(PB009-01이라 칭한다.)의 중쇄 프래그먼트를 코딩하는 염기 서열을 서열 번호 1에, 그것에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 서열 번호 2에, PB009-01의 경쇄를 코딩하는 염기 서열

을 서열 번호 3에, 그것에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 서열 번호 4에 각각 나타낸다. PB009-01의 중쇄 가변 영역은, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 121까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 중쇄의 CDR1, CDR2, CDR3은, 각각 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35, 50부터 66, 99부터 110까지의 아미노산 서열로 이루어진다. PB009-01의 경쇄 가변 영역은, 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 경쇄의 CDR1, CDR2, CDR3은, 각각 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 38, 54부터 60, 93부터 101까지의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0264] 또한, 가변 영역 및 CDR 서열은 Kabat 번호 부여를 따라서 결정하였다(Kabat 등, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda).

[0265] (실시예 2: Fab 프래그먼트 복합체의 생산)

[0266] 킬레이트제인 DFO의 Fab 프래그먼트 PB009-01로의 결합에는, p-SCN-Bn-DFO(p-이소티오시아노페닐아미노티오키아르보닐기 치환 DFO)(Macrocyclics사)를 사용하였다. 인산 완충 생리 식염수(pH 7.4)로 1mg/mL로 조제한 Fab 프래그먼트 용액에, 1/5양의 0.1M 탄산나트륨 용액(pH 9.0)을 첨가하였다. 이것에 최종 농도 1mg/mL가 되도록 p-SCN-Bn-DFO를 첨가하고, 37°C에서 1시간 반 반응시켰다. 반응 후, 아미콘울트라 3K-0.5mL 원심식 필터(머크 밀리포어사)를 사용하여, DFO가 링커(-C(=S)-NH-(1,4-페닐렌)-NH-C(=S)-)를 통해 결합한 Fab 프래그먼트(PB009-02라 칭한다.)를 정제하였다.

[0267] PB009-02에 대하여, 질량 분석으로 DFO로 구성되는 배위자의 결합수를 확인하였다. PB009-02를, MassPREP 마이크로 탈염 칼럼(Micro Desalting Column)(Waters사)을 사용하여 탈염하고, SYNAPT G2 질량 분석계(Waters사)를 사용하여 측정을 실시하였다. 그 결과, 1개의 PB009-01에 DFO로 구성되는 배위자가 적어도 3개 내지 10개 결합한 분자가 확인되었다.

[0268] (실시예 3: 결합 활성 평가)

[0269] PB009-02의 결합 활성을 상세하게 측정하기 위해서, SPR법에 의한 해석을 행하였다. 본 실시예에서는, 비교 Fab 프래그먼트로서, T84.66의 인간화 항체인 M5A의 Fab 프래그먼트(M5A-Fab라 칭한다.)를 사용하였다. DFO를 링커를 통해 결합시킨 M5A-Fab(M5A-Fab-DFO라 칭한다.)는, 실시예 2에 기재된 방법을 사용하여 제작하였다.

[0270] Biacore T200(GE 헬스케어·재팬사)을 사용하여 SPR법에 의한 해석을 행하였다. 센서칩의 표면에 비오틴 캡처 키트, 시리즈 S(GE 헬스케어·재팬사)와 비오틴 표지 키트-NH₂(도진 가가꾸 연구소)로 비오틴화한 10 µg/mL의 인간 CEACAM5(R&D 시스템즈사)를 유속 5 µL/min으로, 2분간 첨가하여 고상화하였다. PB009-01, PB009-02, M5A-Fab 및 M5A-Fab-DFO를, HBS-EP+ 용액(GE 헬스케어·재팬사)으로 400nM으로부터 2배 공비로 6단계 희석하고, 유속 50 µL/min으로 100 µL를 유로에 각각 첨가하였다. 이 측정계에 의해, 데이터 해석 소프트웨어(BIA Evaluation, GE 헬스케어·재팬사)를 사용하여 PB009-01, PB009-02, M5A-Fab 또는 M5A-Fab-DFO와 인간 CEACAM5의 해리 상수(K_d)를 각각 계산하였다. 그 결과, 하기 표에 나타낸 바와 같이 M5A-Fab는 DFO의 결합에 의해 결합 활성이 감약되는 것에 비해, PB009-01은 DFO의 결합에 의해 결합 활성이 감약되지 않는 것이 확인되었다.

표 1

Fab	K _d (M)	DFO 가 결합된 Fab	K _d (M)
PB009-01	1.7E-10	PB009-02	6.1E-10
M5A-Fab	1.6E-10	M5A-Fab-DFO	9.6E-09

[0271]

[0272] (실시예 4: DFO가 결합된 Fab 프래그먼트 복합체의 ⁸⁹Zr 표지)

[0273] ⁸⁹Zr은 Zr-옥살레이트로서 3D Imaging LLC사에서 구입하였다. 20 µL의 Zr-옥살레이트(2.6mCi)를 2M의 탄산나트륨 10 µL로 중화한 후 5mg/mL의 젠티스산 20 µL를 첨가하였다. 또한, 0.05%의 폴리소르베이트 80을 포함하는

20mM의 HEPES(4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산)를 110 μ L 첨가하였다. 10mg/mL의 PB009-02를 40 μ L 첨가하고, 실온에서 30분간 반응 후, 추가로 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, 아미콘울트라 10K-0.5mL 원심식 필터(마크 밀리포어사)를 사용하여, ⁸⁹Zr 표지한 PB009-02(PB009-03이라 칭한다.)를 정제하였다.

[0274] (실시예 5: 복합체의 피하 이식 모델에 있어서의 조영 평가)

[0275] 면역 부전 마우스(NOG 마우스; Taconic Biosciences사)의 오른쪽 어깨의 피하에 인간 CEACAM5 양성 세포로서 인간 대장암 세포주 LS174T 세포(ATCC(등록 상표); CL-188)를 1×10^6 세포 이식하고, 왼쪽 어깨의 피하에 인간 CEACAM5 음성 세포로서 인간 대장암 세포주 HCT-15 세포(ATCC(등록 상표); CCL-225)를 5×10^6 세포 이식하였다. 본 실시예는 N=3으로 실시하였다. 종양 체적이 약 300mm³가 된 후, PB009-03(약 20 μ g, 약 120 μ Ci)을 정맥 투여하였다. PB009-03 투여 4시간 후, 24시간 후 및 48시간 후에 PET로 촬상하고, 종양 부분의 SUV-Max를 측정하였다. 그 결과, 도 1a에 나타내는 바와 같이 PB009-03은, 투여 4시간 후에 있어서, 인간 CEACAM5 음성 세포인 HCT-15 세포에 비해, 인간 CEACAM5 양성 세포인 LS174T 세포에 많이 집적되는 것이 나타났다. 또한, 도 1b에 나타내는 바와 같이 PB009-03은 투여 4시간 후로부터 48시간 후까지 인간 CEACAM5 양성의 암세포를 검출할 수 있는 것이 밝혀졌다.

[0276] (실시예 6: 복합체의 간 이식 모델에 있어서의 조영 평가)

[0277] 마취 하에서 면역 부전 마우스(NSG 마우스; The Jackson Laboratory사)의 간장에 루시페라아제 발현 LS174T 세포를 1×10^6 세포 이식하였다. 본 실시예는 N=6으로 실시하였다. IVIS 이미징 시스템(imaging system)(퍼킨 엘머사)에서 루시페라아제의 발현을 지표로 간장에서의 세포의 생착을 확인한 후에, 실시예 4와 동일한 방법으로 제작한 PB009-03(약 14 μ g, 약 100 μ Ci)을 정맥 투여하였다. PB009-03 투여 4시간 후 및 24시간 후에 PET로 촬상하였다. 간장 및 LS174T 종양(이식한 LS174T 세포가 간장에 생착된 상태를 가리킴)의 SUV-Max를 각각 측정하고, 간장의 SUV-Max에 대한 종양의 SUV-Max의 비를 산출하였다. 그 결과, 도 2a에 나타내는 바와 같이 PB009-03은, 투여 4시간 후에 있어서, 간장에 생착된 LS174T 종양에 집적되는 것이 나타났다. 또한, 투여 4시간 후 및 24시간 후에 있어서의 간장에 대한 종양의 시그널 비는 도 2b에 나타내는 값이었다. 이러한 점에서, PB009-03은 투여 4시간 후 및 24시간 후에 있어서, 간장에 존재하는 인간 CEACAM5 양성의 암세포를 검출할 수 있는 것이 밝혀졌다.

산업상 이용가능성

[0278] 본 발명의 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트 및 당해 항인간 CEACAM5 항체 Fab 프래그먼트를 포함하는 복합체는, 대장암, 유방암, 폐암, 갑상선암 및 이들이 전이된 암으로 이루어지는 군에서 선택되는 암의 진단에 유용할 것이 기대된다.

서열목록 자유텍스트

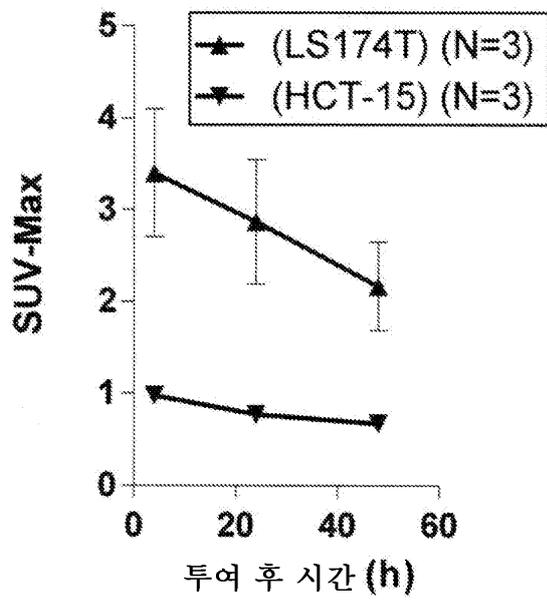
[0280] 이하 서열표의 숫자 색인 <223>에는, 「인공 서열(Artificial Sequence)」의 설명을 기재한다. 구체적으로는 서열표의 서열 번호 1 및 3으로 표시되는 염기 서열은, 각각 PB009-01의 중쇄 프래그먼트 및 경쇄의 염기 서열이며, 서열 번호 2 및 4로 표시되는 아미노산 서열은, 각각 서열 번호 1 및 3에 의해 코딩되는 중쇄 프래그먼트 및 경쇄의 아미노산 서열이다.

도면

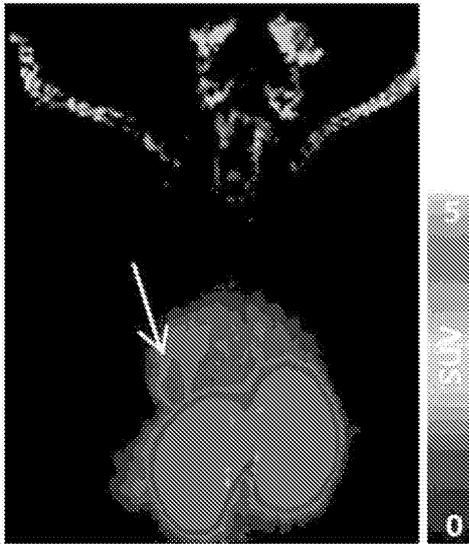
도면1a



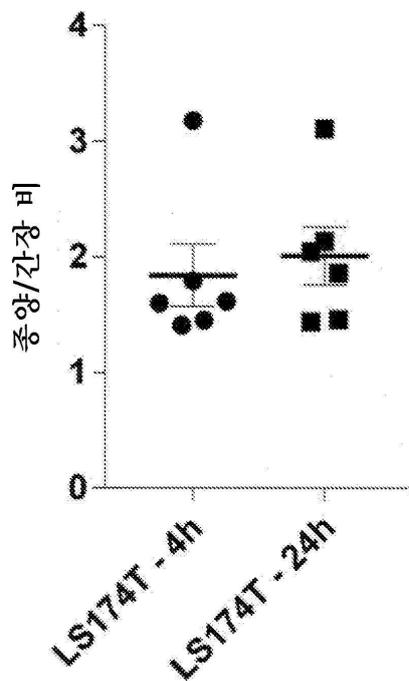
도면1b



도면2a



도면2b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> Novel Anti-human CEACAM5 antibody Fab fragment

<130> A18007A00

<150> JP 2017-133698

<151> 2017-07-07

<160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 678
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA encoding PB009-01 Fab heavy chain
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(678)
 <400> 1
 gaa gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc gga 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc ttc aac atc cgg gac acc 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr
 20 25 30
 tac atg cac tgg gtg cgc cag gcc cct ggc aag gga ctg gaa tgg gtg 144
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gcc aga atc gac ccc gcc aac ggc aac agc aga tac gtg ccc aag ttc 192
 Ala Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Val Pro Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc cgg ttc acc atc agc gcc gac acc agc aga aac acc gcc tac 240
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Arg Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcc ccc ttc ggc tac tac gtg tcc gac tac gcc atg gcc tat tgg ggc 336
 Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 cag ggc acc ctc gtg aca gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg 384

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg 432

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130 135 140

gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg 480

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct 528

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc gtg 576

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac 624

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt 672

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

gac tga 678

Asp

225

<210> 2

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Val Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Arg Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp
 225
 <210> 3
 <211> 657
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding antibody light chain

<220><221> CDS

<222> (1)..(657)

<400> 3

gac atc cag ctg acc cag agc cct agc agc ctg tct gcc agc gtg ggc 48

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac aga gtg acc atc acc tgt aga gcc ggc gag agc gtg gac atc ttc 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe

20 25 30

ggc gtg gga ttt ctg cac tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc 144

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

aag ctg ctg atc tac aga gcc agc aac ctg gaa agc ggc atc ccc agc 192

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser

50 55 60

aga ttc agc ggc agc ggc tcc aga acc gac ttc acc ctg acc atc agc 240

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

agc ctg cag ccc gag gac ttc gcc acc tac tac tgc cag cag acc aac 288

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn

85 90 95

gag gac ccc tac acc ttt ggc cag ggc acc aag gtg gaa atc aag cgt 336

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 384

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 432

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

