

(72) 발명자
신미향
경기도 성남시 수정구 산성동 1522번지

문유리
충청북도 청주시 상당구 내덕1동 661-42

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 CD66c(Cluster of Differentiation 66c)의 에피토프(epitope)인 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CD66c 에피토프는 폐선암에 특이적인 것인 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항의 폴리펩타이드를 에피토프(epitope)로 인지하는 항체 또는 항체 절편.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체는 단클론 항체 또는 다클론 항체인 항체 또는 항체 절편.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단클론 항체는 하이브리도마 세포(기탁번호: KCLRF-BP-00230)에 의해 생산된 것인 항체 또는 항체 절편.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 또는 항체 절편을 생산하는 세포주.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 세포주는 하이브리도마 세포(기탁번호: KCLRF-BP-00230)인 세포주.

청구항 8

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 폐선암 진단용 조성물.

청구항 9

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 폐선암 진단 키트.

청구항 10

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 폐선암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 CD66c의 폐선암 특이적 에피토프 및 이를 인식하는 항체에 대한 것으로, CD66c에서 폐선암에 특이적인 에피토프를 밝히고 이를 인식하는 항체, 이를 생산하는 세포주 및 이를 이용한 폐선암 진단 또는 폐선암 예방 또는 치료 용도에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 폐암은 빈번히 발생하는 암 중의 하나로 전 세계적으로 생명을 위협하는 암의 하나로 알려져 있다. 전 세계적으로 약 120만명 정도가 폐암에 걸리며 이를 통해 사망하는 환자는 전체 암 사망률의 25%를 차지하고 있다. 또한

한국에서는 폐암의 발생률과 치사율이 점차적으로 증가하는 추세로 2008년에 발표된 한국중앙암등록본부 자료에 의하면 2003년 내지 2005년에 우리나라에서는 연 평균 132,941건의 암이 발생했는데, 그 중 폐암은 남녀를 합쳐서 연 평균 16,123건으로 전체 암 발생의 12.1%로 2위를 차지하였다.(보건복지가족부 중앙암등록본부 2008년 10월 15일 발표 자료)

[0003] 폐암은 초기인 IA stage에서 조기 발견되는 경우 5년 생존율이 80%가량으로 알려져 있다.(Mulshine, J.L. and Sullivan, D.C. Clinical practice. Lung cancer screening. *N. Engl. J. Med.* 2005;352:2714-2720) 따라서 새로운 폐암의 특이적인 생체학적 표지의 발견에 있어 조기 발견이 가능한 표지를 찾는 것이 중요하다. 특히 폐암은 대표적인 불균질성 종양으로 다양한 형태의 치료에 대한 반응과 예후에 차이가 있다. 의학적으로는 크게 소세포성암(small cell lung cancer)과 비소세포성암(non-small cell lung cancers(NSCLC)) 두 개의 그룹으로 나뉘어 지며, 다시 비소세포성암은 세부적으로 폐선암(lung adenocarcinoma), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 대세포암 (large cell carcinoma)으로 나뉘어 진다.

[0004] 한편 CD66c는 CEACAM6(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) 또는 NCA(non-specific cross-reacting glycoprotein antigen)-90으로도 알려져 있으며, 폐암, 췌장암, 유방암, 직장암, 간암 등의 환자에서 혈액내의 CD66c의 양이 높게 나타나는 것으로 알려져 있다. 상기 CD66c는 세포 접착(cell adhesion)과 연관된 중요한 단백질로 호중성 백혈구(neutrophils)의 경우 사이토카인(cytokine)에 의해 활성화된 내피세포(endothelial cell)와의 접착에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 또한 정상세포의 경우 세포 접착이 이뤄지지 않을 경우 세포 자멸이 이뤄지는데 이런 작용을 아노이키스(anoikis)라 한다. 그러나 종양세포의 경우 이러한 아노이키스에 대해 저항력을 갖고 있으며 이로 인해 암발생과 암전이가 촉진된다. 상기 CD66c는 아노이키스를 억제한다는 보고가 있으며, CD66c의 발현을 조절함으로써 암세포의 악성 표현형(malignant phenotype)이 변한다는 보고도 있다. 또한 CD66c 유전자를 small interfering RNA를 이용해 silencing 시켜 단백질의 발현을 억제 했을 경우 아노이키스가 증가되어 in vivo상에서 암전이가 억제된다는 실험결과도 보고되고 있다. 결국 CD66c의 기능을 억제하는 것이 암전이를 억제하는데 중요한 작용을 할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 폐선암 세포에서 발현되는 CD66c에 대한 항체를 개발하기 위해, CD66c의 재조합 항원으로 폐선암 세포주를 면역화함으로써 폐선암에 특이적인 CD66c에 대한 항체를 개발하고 이의 에피토프를 밝힘으로써 본 발명을 성하였다.

[0007] 따라서 본 발명은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 CD66c(Cluster of Differentiation 66c)의 에피토프(epitope)인 폴리펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 에피토프(epitope)로 인지하는 항체 또는 항체 절편을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한 본 발명은 상기 항체 또는 항체 절편을 생산하는 세포주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 폐선암 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한 본 발명은 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 폐선암 진단 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 폐선암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 CD66c(Cluster of Differentiation 66c)의 에피토프(epitope)인 폴리펩타이드를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 에피토프(epitope)로 인지하는 항체 또는 항체 절편을 제공한다.

- [0015] 또한 본 발명은 상기 항체 또는 항체 절편을 생산하는 세포주를 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 폐선암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 폐선암 진단 키트를 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 폐선암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 이하 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.
- [0020] 본 발명에서 CD66c(Cluster of Differentiation 66c)는 CEACAM 6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) 또는 NCA(non-specific cross-reacting glycoprotein antigen)-90으로도 알려진 단백질로, 세포 접착(cell adhesion)과 연관된 중요한 단백질로 알려져 있으며 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열(Genebank Protein No. AAH05008)로 표시될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 에피토프는 항체에 의해 특이적으로 인식되는 항원결정부위로, 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 선형 에피토프(linear epitope)일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 항체는 면역글로불린 유전자로부터의 골격부(framwork) 영역을 포함하는 폴리펩티드, 또는 이의 단편을 의미하는데, 항체는 항원에 특이적으로 결합하여 이를 인식한다. 인식된 면역글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론 및 뮤 불변 영역 유전자뿐만 아니라, 다수의 면역글로불린 가변 영역 유전자들을 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되며, 이들은 차례로, 각각, 면역글로불린 클래스, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 정의된다. 특히 본 발명에서 항체는 키메라 항체, 인간화 항체를 모두 포함한다.
- [0023] 본 발명에서 키메라 항체는 가변 영역 서열들이 하나의 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 다른 종으로부터 유래된 항체들, 예를 들어, 가변 영역 서열들이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 인간 항체로부터 유래된 항체를 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 인간화 항체란 인간에서 면역성이 적으면서 비인간 항체의 활성을 보유하는 항체를 의미한다. 이는, 예를 들어, 비인간 CDR 영역을 유지시키고, 항체의 나머지 부분을 인간 대응부(counterparts)로 치환함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 하기 문헌들이 참조된다: Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 81:6851-6855(1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al, Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994).
- [0025] 본 발명에서 항체 절편은 항체 경쇄 가변 영역(V_L) 및 항체 중쇄 가변 영역(V_H)를 포함하여 CD66c 에피토프를 선택적으로 인식할 수는 것이면 이에 제한이 없으나, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv 및 CDR로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 특히, 상기 scFv는 상기 중쇄 가변부위(V_H) 및 경쇄 가변부위(V_L)를 링커 폴리펩타이드로 연결하여 단쇄(single chain)로 만든 항체 절편이다.
- [0026] 본 발명에서 단클론 항체는 당해 분야에 공지된 용어이며, 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도로 특이적인 항체이다. 전형적으로 상이한 결정기(에피토프)에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론 항체와는 다르게, 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 본 발명의 단클론 항체는 통상적인 클로닝 및 세포 융합 기술들을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 관심 대상의 면역원(항원)을 야생형이나 육종된 마우스(예를 들면, BALB/c)에 투여하여 천연 또는 사람 단클론 항체를 생산할 수 있다. 이러한 항원은 단독으로 투여되거나, 애주번트와 혼합하여 투여되거나, 벡터로부터 발현될 수 있으며 DNA 또는 융합 단백질로서 면역 반응을 유도할 수 있다. 융합 단백질은 면역 반응에 의도된 펩타이드와 커플링된 담체 단백질, 예를 들면, β -갈락토시다제, 글루타티온 S-트랜스퍼라제, 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 및 소 혈청 알부민을 포함하며, 담체 단백질은 이에 제한되지는 않는다. 상기의 경우에 펩타이드는 담체 단백질에 대해서 합텐(hapten)으로 작용한다.

- [0027] 상기 단클론 항체 제조 방법을 간략히 설명하면 다음과 같다. 동물을 부스팅시킨 후, 비장을 제거하고 비장 세포를 추출하여 당해 분야에 공지된 방법[Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); and Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)]으로 골수종 세포와 융합시킨다. 수득되는 하이브리드 세포를 통상적인 방법, 예를 들면, 제한 희석으로 클로닝하고, 목적하는 단클론 항체를 생산하는 수득된 클론을 배양하는 것이다. 단클론 항체는 항원-항체 결합을 사용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 또한, 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에, 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 또 다른 장점을 갖는다.
- [0028] 본 발명에서 하이브리도마 세포는 당해 분야에 공지되어 있으며, 항체 생산 세포와 불멸 세포, 예를 들면 골수종 세포와의 융합에 의해서 형성된 세포를 의미한다. 상기 하이브리드 세포는 항체를 지속적으로 공급할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 다클론 항체는 본 발명의 에피토프가 포함된 항원, 바람직하게는 서열번호 2의 CD66c의 일부분을 항원으로 하여, 동물에 주사하고 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 만들어질 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 검출 표지제는 항원-항체의 반응 결과물의 검출을 위한 표지를 의미하며, 구체적인 예로는 방사성 동위원소 표지, 효소, 화학발광화합물(chemoluminescent compound), 플루오레세인, 피코빌리프로테인, 희토류 킬레이트, 로다민 등과 같은 형광 물질, 효소 보조인자(enzyme cofactor), 바이오틴 등을 포함하나, 반드시 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에서 CD66c의 에피토프로 밝혀 낸 폴리펩타이드는 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 한다.
- [0032] 상기 CD66c의 에피토프는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 폐선암에 특이적인 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일실시예에서 CD66c의 재조합 항원(<실시예 1> 참조)으로 폐선암 세포주를 면역화함으로써 폐선암에 특이적인 CD66c에 대한 단클론 항체를 먼저 개발(<실시예 2> 참조)하고, 이의 에피토프가 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시됨을 최초로 밝힌 것이다.<실시예 3> 참조). 특히 본 발명의 CD66c의 에피토프는 종래 CD66c의 항체로 알려진 9A6(Santa cruz biotechnology) 또는 AP11(Dinona) 항체 와 달리, 본 발명의 단클론 항체(8F5)에 의해 특이적으로 인식되는 에피토프이다.<실시예 3> 참조)
- [0034] 따라서 본 발명의 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 CD66c의 에피토프는 폐선암에 특이적인 항체 형성을 유도하기 위한 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.
- [0035] 상기 CD66c의 에피토프는 생체시료로부터 분리하거나, 화학적으로 합성하거나 또는 유전공학기술로 생산할 수 있으며, 상기한 방법은 공지의 기술로 용이하게 실시할 수 있다.
- [0036] 한편 본 발명의 항체 또는 항체 절편은 본 발명의 에피토프를 인지하는 것을 특징으로 한다.
- [0037] 본 발명의 항체는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 단클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있으며, 상기 단클론 항체는 보다 바람직하게는 하이브리도마 세포(기탁번호: KCLRF-BP-00230)에 의해 생산된 것일 수 있다.
- [0038] 특히 본 발명의 항체는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 IgG1에 속하며, 카파(kappa) 경쇄를 포함한 것으로 분류될 수 있다.<실시예 2-2> 참조)
- [0039] 본 발명의 항체는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 폐선암에 특이적인 항체일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일실시예에서는 폐선암에 특이적인 항체를 제조하기 위해, 서열번호 2로 표시되는 CD66c의 일부와 사람의 면역글로불린 G의 Fc의 재조합 항원으로 폐선암 세포주를 면역하고, 상기 항원에 대해 특이적인 항체를 스크리닝함으로써, 본 발명의 항체를 개발한 것이다.<실시예 2> 참조)
- [0041] 한편 본 발명의 세포주는 상기 항체 또는 항체 절편을 생산하는 것을 특징으로 한다.

- [0042] 상기 세포주는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 기탁번호가 KCLRF-BP-00230인 하이브리도마 세포일 수 있다. 상기 하이브리도마 세포는 상기 단클론 항체를 생산하는 세포로 이의 제조방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 바람직하게는 항체 생산 세포와 불멸 세포, 예를 들면 골수종 세포와의 융합에 의해 제조될 수 있다. 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 CD66c 항원이 주입된 세포(바람직하게는 CHO-K1 세포)와 폐암 세포주를 면역시킨 마우스 비장과의 세포 융합을 통해 제조될 수 있다.
- [0043] 상기 하이브리도마 세포는 한국세포주연구재단(Korean Cell Line Research Foundation, KCLRF)에 '8F5'로 2010년 2월 22일자로 기탁번호 KCLRF-BP-00230로 기탁된 것이다.
- [0044] 한편 본 발명의 폐선암 진단용 조성물은 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.
- [0045] 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편은 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 CD66c(Cluster of Differentiation 66c)의 에피토프(epitope)를 특이적으로 인식하여, CD66c 항원을 효과적으로 검출할 수 있으며, 특히 CD66c 항원이 발현되는 폐선암을 효과적으로 검출할 수 있다.(<실시예 4> 참조)
- [0046] 상기 진단용 조성물에 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 사용하는 경우, 상기 항체 또는 항체 절편은 효소, 방사선동위원소, 형광물질, 크로모젠(chromogen) 및 염색물질로 이루어진 군으로부터 선택된 표지 물질들로 표시될 수 있다. 상기 형광물질로 플루오레센 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate: FITC), 피코에리트린(phycoerythrin: PE), 알로피코사이아닌 (allophycocyanin, APC) 또는 바이오틴(biotin) 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 진단용 조성물에는 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편 외에 면역학적 분석에 사용되는 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 검출 표지제, 용해제, 세정제가 포함될 수 있다. 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 상기 담체로는 이에 한정되지 않으나 가용성 담체, 예컨대 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액(예를 들어, PBS) 또는 불용성 담체, 예컨대 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 락텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0048] 한편 본 발명의 진단키트는 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 포함하여 폐선암을 효과적으로 진단할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 사용하기 위한 키트 시스템은 이에 한정되는 것은 아니나, ELISA 플레이트, 딥-스틱 디바이스, 면역 크로마토그래피 및 방사 분할 면역검정 디바이스, 플로우-쓰루(flow-through) 디바이스 등을 포함한다. 바람직하게는, 면역크로마토그래피법을 이용한 스트립 형태 또는 디바이스 형태의 진단 키트를 이용할 수 있다. 면역크로마토그래피법을 이용한 진단은, 검체의 혈청 중에 들어 있는 항원이 콜로이드성 금 입자(colloidal gold particle)에 결합된 표식자 항체(tracer antibody)와 반응한 다음, 모세관 현상에 의해 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 멤브레인의 미세구멍(micropore)을 통하여 이동하는 도중에 미세구멍의 내부 표면에 고정되어 있는 포획 항체(capture antibody)와 결합하여 발색띠를 형성함으로써, 양성 및 음성을 육안으로 판별 가능하도록 할 수 있다.
- [0050] 상기 키트는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 효소연관 면역분석법(ELISA) 또는 측방 유동 면역 크로마토그래피 분석법(lateral flow immunographic assay)을 이용할 수 있다. 앞서 기술한 바와 같이 샌드위치 면역분석법 및 측방 유동 면역 크로마토그래피 분석법(lateral flow immunographic assay)을 사용하는 경우 본 발명의 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 이용하여 항체 쌍을 제조하고 이를 이용하여 폐선암을 효과적으로 진단할 수 있다.
- [0051] 상기 본 발명의 키트에는 통상적으로 키트에 사용되는 것이라면 이에 한정되지 않지만, 예를 들어 ELSIA를 이용한 것이라면 고체상 지지체, 본 발명의 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편, 항원과의 반응을 위한 효소표지항체 및 효소반응을 나타내는 발색액을 함유하는 효소-연관 면역분석용(ELISA) 반응액을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로 효소표지항체액은 goat anti-mouse Ig-HRP일 수 있으며, 발색액은 테트라 메틸벤지딘

(Tetramethylbenzidine, TMB)일 수 있으며, 반응차단용액은 HCl 또는 H₂SO₄일 수 있다.

- [0052] 한편 본 발명의 폐선암 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.
- [0053] 본 발명의 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편은 종양 특히 폐선암 억제 효능이 매우 우수하다.(<실험예 5> 참조)
- [0054] 따라서 본 발명의 약학적 조성물은 상기 폐선암 특이적 항체 또는 항체 절편을 유효성분으로 함유함으로써 폐선암 예방 또는 치료용으로 효과적으로 이용될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 약학적 조성물 내의 유효성분으로서의 상기 항체 또는 항체 절편의 함량은 사용 형태 및 목적, 환자 상태, 증상의 종류 및 경중 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 50 중량%, 더 바람직하게는 1 내지 20 중량%일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 본 발명의 약학적 조성물은 사람을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 경피제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 추출물 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제 등의 보조제를 추가로 함유하는 것일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 원지, 고분 및 용안유 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제, 경피제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 약학적 조성물은 사람에게 단독으로 투여될 수 있으나, 일반적으로 투여방식과 표준 약제학적 관행(standard pharmaceutical practice)을 고려하여 선택된 약제학적 담체와 혼합되어 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 약학적 조성물은 전분 또는 락토오스를 함유하는 정제 형태로, 또는 단독 또는 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강내 또는 혀밑 투여될 수 있다. 이러한 액체 제제는 현탁제 (예를 들면, 메틸셀룰로오즈, 위텝솔(witepsol)과 같은 반합성 글리세라이드 또는 행인유(apricot kernel oil)와 PEG-6 에스테르의 혼합물 또는 PEG-8과 카프릴릭/카프릭 글리세라이드의 혼합물과 같은 글리세라이드 혼합물)와 같은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 제형화될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다. 예컨대, 유효성분 함량을 기준으로 1일 투여량이 1 내지 20 mg/kg, 바람직하게는 5 내지 10mg/kg일 수 있다. 상기한 투여량은 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량이 상기 투여 용량 미만이면 유의성 있는 효과를 얻을 수 없으며, 그 이상을 초과하는 경우 비경제적일 뿐만 아니라 상기 사용량의 범위를 벗어나면 바람직하지 않은 부작용이 나타날 우려가 발생할 수 있으므로,

상기 범위로 하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0060] 본 발명의 CD66c 에피토프는 폐선암 세포에 특이적인 것으로, 이를 인식하는 항체 또는 이의 절편은 폐선암 세포를 진단하거나 이를 치료 또는 예방하는 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 CD66c 재조합 부위를 설정한 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 2는 pSegTag-CD66c-HuIgFc 클로닝을 제작한 모식도를 나타낸 그림이다.
- 도 3은 pSegTagB-CD66c-HuIgFc 클로닝을 확인한 결과이다.
- 도 4는 형질전환된 CHO-K1 세포주에서 CD66c-HuIgFc 재조합 항원이 발현되는지 여부를 ELISA를 통해 확인한 결과이다.
- 도 5 정제된 CD66c-HuIgFc 재조합 항원을 확인한 western blot 결과이다.
- 도 6 재조합 CD66c-HuIgFc의 CD66c activity를 확인한 결과이다.
- 도 7 폐선암 특이 CD66c에 대한 단클론 항체의 개발 모식도이다.
- 도 8 A549세포 면역취 혈청의 A549 cell에 대한 역가를 확인한 결과이다.
- 도 9 A549세포 면역취 혈청의 CD66c-HuIgFc에 대한 역가를 확인한 결과이다.
- 도 10 8F5와 AP11의 western blotting 결과를 비교한 결과이다.
- 도 11 말초혈액에서의 8F5 단클론 항체의 결합 여부를 분석한 결과이다.
- 도 12 CD66c-HuIgFc에 대한 ELISA 분석결과이다.
- 도 13 폐암 조직에서의 8F5 염색 여부를 확인한 결과이다.
- 도 14는 본 발명의 단클론 항체의 에피토프를 MOLDI-TOF를 수행하여 확인한 결과이다.
- 도 15는 본 발명의 단클론 항체의 에피토프를 검증하기 위한 방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 16은 본 발명의 단클론 항체의 에피토프를 검증한 결과이다.
- 도 17은 본 발명의 MOLDI-TOF를 통해 밝혀 낸 본 발명의 에피토프와 이를 검증한 결과를 대조한 모식도이다.
- 도 18은 본 발명의 단클론 항체를 이용한 CD66c 항원이 포함된 폐선암을 검출한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 19는 본 발명의 단클론 항체의 항암 활성을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
 [0063] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] <실시예 1>

[0065] CD66c 및 Human immunoglobulin Fc region인 C_H2-C_H3가 결합된 재조합 항원(CD66c-HuIgFc)의 제조

[0066] <1-1> 유전자 클로닝

[0067] CD66c-HuIgFc 재조합 항원을 얻기 먼저 CD66c 전체 cDNA(서열번호: 1)중에서 소수성 부분을 제거한 34 내지 310aa 영역(서열번호: 2)을 설정(도 1)하여 CD66c 유전자에 대한 프라이머를 제작하고, 사람의 면역글로불린 G의 Fc (Human immunoglobulin Fc region C_H2-C_H3; HuIgFc)부분, 구체적으로 서열번호 11로 표시되는 염기성을 가지는 부분에 대한 프라이머를 제작하였다(표 1). 전체적인 클로닝 과정에 대한 모식도는 도 2에 표시하였다.

표 1

Gene	Primer	SEG ID	Sequence
CD66c	Hnd66c 5'	SEG ID No: 3	AAG CTT AAG CTC ACT ATT GAA TCC ACG
	66cEcRV 3'	SEG ID No: 4	GAT ATC AGT GAC TGT GGT CCT ATT GA
Human Ig Fc (CH2-CH3)	EcrVFc 5'	SEG ID No: 5	GAT ATC GAC GTC GAG TCC AAA TCT TGT
	FcXh01 3'	SEG ID No: 6	CTC GAG TTT ACC CGG AGA CAG GGA GA

[0068]

[0069]

[0070]

[0071]

[0072]

[0073]

[0074]

[0075]

[0076]

[0077]

[0078]

[0079]

[0080]

상기 CD66c 유전자는 사람의 폐선암 세포주인 A549(ATCC CCL-185)로부터 QIAGEN RNEasy Mini spin kit를 이용하여 RNA를 추출하고 상기 표 1에 기재된 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 실시함으로써 획득하였다. 구체적으로 상기 RT-PCR은 Novagen first cDNA synthesis kit를 이용하였으며 보다 구체적으로 RNA 1ug과 Oligo d(T) primer 1ul(10pmol/ul)를 넣어 70℃에서 10분간 반응시킨 후 냉각 시키고 5X buffer, 100mM DTT, reverse transcriptase를 넣어 37℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이렇게 합성된 cDNA를 표 1의 프라이머로 Bioneer의 PCR premix를 이용해 PCR을 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 2분간 30 cycles을 돌아 증폭시켜 CD66c 유전자를 확보하였다.

상기 실험결과, CD66c 전체 cDNA 중에서 소수성 부분이 제거된 영역을 암호화할 수 있는 CD66c 유전자에 대한 약 850bp 크기의 DNA를 확인하였으며(도 3a) 이를 pGEM T(Promega,USA) 벡터에 클로닝하고 제한효소 *EcoRI*으로 확인한 후 시퀀싱을 통해 서열번호 8의 염기서열임을 확인하였다.

또한 상기 Human Ig Fc 영역(HuIgFc)은 human B 세포(ATCC CTL-1834)로부터 얻은 RNA를 QIAGEN RNEasy Mini spin kit로 추출하고 상기 표 1에 기재된 프라이머를 이용하여 상기 RT-PCR을 실시함으로써 획득하였다.

상기 CD66c 유전자가 클로닝된 pGEM T-CD66c gene을 제한효소(Promega, USA) *HindIII*와 *EcoRV*로 잘라 insert를 준비하고 HuIgFc는 *EcoRV*와 *XhoI*로 잘라 두 개의 insert를 준비하였다. 발현 벡터로 Igk 리더 서열(leader sequence)를 갖고 있는 pSegTagB(invitrogen, USA) 벡터를 제한효소 *HindIII*와 *XhoI*으로 잘라 준비하여 두 개의 insert를 동시에 넣어 클로닝을 수행하였다.

최종 pSegTagB-CD66c-HuIgFc 재조합 유전자는 제한 효소 *BglII*로 처리하여 1300bp의 DNA 절편이 나타남을 확인함으로써 CD66c-HuIgFc 재조합 유전자가 클로닝 되었음을 최종 확인하였다.(도 3b)

<1-2> 형질전환

상기 <실시에 1-1>에서 제조된 pSecTag-CD66c-HuIgFc DNA로 CHO-K1 세포(ATCC CRL-9618)에 형질 전환하여 재조합 항원을 발현하는 세포주를 개발하였다. 자세한 실험방법은 아래와 같다.

먼저 형질전환 하루 전날 CHO-K1 세포를 6-웰 플레이트에 1×10^6 cells/ml의 농도로 접종하고 10% Fetal bovine serum(Gibco, USA)가 들어있는 DMEM 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, USA) 3ml를 넣어 37℃, 5% CO₂ 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 상기 <실시에 1-1>에서 제조된 pSecTag-CD66c-HuIgFc DNA를 Effectene transfection reagent 키트(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 CHO-K1 세포에 형질전환하였다.

상기 형질전환한지 3일 후, 상층액을 취하여 CD66c와 HuIg를 이용한 ELISA assay를 실시하여 발현되는 CD66c-HuIgFc의 양을 확인하고 안정적인 세포주를 만들기 위해 150ug/ml의 Zeocin (Gibco, USA)을 이용해 선별과정을 진행하였다. 선별과정 진행 후 최종적인 세포주를 확립하기 위해 제한 희석(limiting dilution)을 실시하여 단일 콜로니(single colony)를 확보하였다.

<1-3> 재조합 항원의 정제

CD66c-HuIgFc 재조합 항원의 경우, 이를 발현하는 상기 <실시에 1-2> 세포주의 상층액을 Protein G-affinity chromatography에 적용함으로써 손쉽게 정제를 할 수 있다. 자세한 실험방법은 아래와 같다.

상기 <실시에 1-2>에서 선택된 형질전환 세포주를 배양한 상층액을 수집하고 여기에 protein G-agarose(Thermo Fisher Scientific Inc. USA)를 넣어 4℃에서 밤새 결합시킨 후 이를 컬럼에 패키징(packaging)하고 15ml의 wash buffer(20mM Phosphate buffer pH7.2)를 이용해 수세하였다. 이후, 컬럼에 5ml의 희석버퍼(Elution Buffer,

0.1M Glycine pH 2.9)를 넣어 1 ml 정도의 분획(fractions)을 받고 바로 100ul의 중화버퍼(Neutralizing buffer, 1M TrisCl pH 8.0)를 넣어 중화시켜 정제된 CD66c-HuIgFc 재조합 단백질을 수득하였다.

[0081] 상기 확보한 재조합 단백질은 280nm의 흡광도를 측정한 다음, 용리(elution)시키고 Phosphate buffered saline(PBS)용액으로 투석한 후 BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific Inc. USA)를 이용해 농도를 측정하였다.

[0082] 상기와 같이 Protein G-affinity chromatography를 이용해 정제된 항원 2ug, 5ug, 10ug을 10% Tris-glycine 겔에 로딩한 후 니트로셀룰로오스막(nitrocellulose membrane)에 옮기고 human Ig-HRP로 검출하는 western blot을 실시하여 분자량 105kDa의 단백질을 확인하였다.(도 5)

[0083] <1-4> 형질전환 세포주에서 재조합 항원의 발현여부 확인

[0084] 상기 <실시예 1-2>에서 형질전환된 CHO-K1 세포주에서 CD66c-HuIgFc 재조합 항원의 발현을 확인하기 위해, CD66c에 대한 항체인 AP11, HuIgFc에 대한 항체인 Goat anti-human Fc fragment와 Goat anti-human Ig를 이용한 세 가지 sandwich ELISA를 이용하였다.(표 2 참조, mAb: monoclonal antibody)

표 2

	method #1	method #2	method #3
coating	anti-CD66c mAb (AP11)	anti-Human Ig Fc	anti-Human Ig
detecting	anti-Human Ig Fc-HRP	Mouse anti-CD66c mAb	
		Goat anti-mouse IgM-HRP	

[0086] 구체적으로 96-웰 마이크로타이타 플레이트(microtitration plates, Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark)에 100ng/웰의 AP11 mAb(DINONA, Korea) 및 400ng/웰의 Goat anti-human Fc fragment, Goat anti-human Ig 항체를 각각 PBS 버퍼에 희석하여 넣어준 후 37℃에서 한 시간 동안 배양하여 코팅하였다. 이후, 1x블로킹 버퍼(blocking buffer, Sigma)를 웰당 200ul씩 넣어 37℃에서 한 시간 동안 배양시켜 블로킹하였다. 블로킹된 웰에 상기 <실시예 1-2>에서 형질전환된 CHO-K1 세포주의 배양 상층액을 100ul 넣은 후 37℃에서 한 시간 동안 배양시켜 코팅된 항체와 결합을 유도하고 결합하지 않는 항체는 PBS로 세 번 수세하여 제거하였다. 상기 AP11 mAb와 상층액이 결합된 웰에 Hydroperoxidase(HRP) conjugated goat anti-human Fc fragment specific Ab(Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA)를 넣어준 후 37℃에서 30분간 반응시키고, anti-human Ig Fc와 anti-human Ig와 상층액이 결합된 웰에 mouse anti-CD66c mAb를 넣어준 후, 37℃에서 1시간 반응시키고 PBS로 세 번 수세한 뒤 HRP conjugated goat anti mouse IgM (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA)을 넣어 37℃에서 30분간 반응시켰다. 상기와 같이 HRP를 결합시킨 후 웰을 PBS로 수세하여 결합하지 않은 HRP conjugate를 제거하고, TMB(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) 기질 용액을 웰당 50ul씩 넣은 후 실온에서 10분간 반응시킨 다음, 2N 황산으로 반응을 중지하였다. 반응 정도는 ELISA reader를 이용해 450nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 4에 기재하였다. 이때 대조군으로 pSegTag vector만 형질전환 시켜 얻은 세포 상층액과 HuIgFc가 결합된 다른 항원PD1((주)다이노나)을 사용하였다.

[0087] 상기 도 4에 기재한 바와 같이, 상기 <실시예 1-2>에서 형질전환된 CHO-K1 세포주에서 CD66c-HuIgFc 재조합 항원이 발현되고 있음을 알 수 있다.

[0088] <1-5> 재조합 항원의 기능 확인

[0089] 상기 <실시예 1-3>에서 정제된 재조합 항원(CD66c-HuIgFc)이 CD66c 항원으로써 기능을 하는지 여부를 확인하기 위해, anti-CD66c 항체인 AP11이 A549 세포 표면에 결합하는 것을 상기 재조합 항원이 방해하는지를 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용해 확인하고 그 결과를 도 6에 기재하였다.

[0090] 구체적으로 상기 재조합 항원 0ug, 10ug, 50ug, 100ug과 AP11 항체를 4℃에서 30분간 결합시킨 후 이를 A549 세포에 넣어 4℃에서 30분간 반응시키고 PBS 3ml을 넣어 1500rpm에서 3분간 원심 분리하여 수세하였다. 결합된 항체를 확인하기 위해, 이차 항체인 goat anti-Mouse IgM FITC (Dinona)을 200배 희석하여 넣은 후 4℃에서 15분간 반응시킨 후 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 수세한 후 유세포 분석기로 측정하였다.

- [0091] 상기 도 6에 기재한 바와 같이, CD66c-HuIgFc를 첨가하지 않은 경우 양성이 나온 반면(도 6b), 상기 재조합 항원(CD66c-HuIgFc) 10ug, 50ug, 100ug와 anti-CD66c mAb를 먼저 결합시킨 후, A549 세포에 결합시킨 경우, 투여량에 비례하여 블로킹 현상이 발생함을 알 수 있다.(도 6c, d, e)
- [0092] <실시예 2>
- [0093] **폐선암 특이적 단클론 항체의 개발**
- [0094] <2-1> 하이브리도마 세포 및 단클론 항체의 제조
- [0095] 폐선암에서 직접 발현되는 특이적인 CD66c에 대한 단클론 항체를 개발하기 위해, 상기 재조합 CD66c-HuIgFc를 직접 면역화하지 않고 폐선암 A549 세포주를 면역화한 후 boosting 단계에서 상기 재조합 CD66c-HuIgFc를 주입함으로써 CD66c에 대한 항체를 증폭시켰으며, 하이브리도마 선별 과정에서 CD66c-HuIgFc와 A549 세포에 모두 양성인 항체를 골라 폐선암에서 발현되는 CD66c에 대한 항체를 선별하였다.(도 7 참조)
- [0096] 폐선암 특이적 단클론 항체를 개발하기 위하여 6 주령의 Balb/c 암컷 마우스 한 마리당 폐선암 세포주인 A549(ATCC CCL-185)를 1×10^7 의 수만큼 마우스 복강(IP; intraperitoneal cavity)으로 3주간의 간격으로 세 번 주입하고 정맥에서 혈액 검체를 취하여 혈청을 분리하였다. 상기 분리된 혈청에 상기 <실시예 1>에서 정제된 CD66c-HuIgFc를 100ng/웰을 넣어 37℃에서 1시간 반응시켜 코팅하고 차단 버퍼(blocking buffer, sigma)를 웰당 200ul씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시켜 차단하였다. 이렇게 코팅된 플레이트에 분리한 혈청을 희석하여 넣고 37℃에서 1시간 반응시키고 결합하지 않은 항체를 PBS로 수세하였다. 마지막으로 결합되어있는 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-HRP(Jackson)을 200배 희석하여 웰당 100ul씩 넣은 후 37℃에서 반응시킨 후 PBS로 수세하고 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 웰당 50ul로 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 2N H₂SO₄(sigma)로 반응을 중지시킨 후 450nm에서의 흡광도를 측정함으로써 역가를 확인하고, A549 세포에 희석한 혈청을 넣고 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS 3ml을 넣고 1500rpm에서 3분간 원심분리하여 결합하지 않은 항체를 수세하고 결합된 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-FITC(Dinona)을 200배 희석하여 넣은 후 4℃에서 15분간 반응 시킨 후 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 수세한 후 유세포 분석기로 측정하여 CD66c에 대한 역가를 확인하고 그 결과를 도 8 및 도 9에 기재하였다. 구체적으로 세포 융합을 실시하기 3일 전 50 ug anti-CD40 agonist mAb를 넣어 면역반응을 증가시키고 100ug CD66c-HuIgFc를 주입하여 CD66c에 대한 항체가 증폭되도록 유도하였다.
- [0097] 상기 도 8 및 도 9에 기재한 바와 같이, A549 세포에 대한 역가를 유세포분석기로 확인한 결과 모두 높게 나타난 것을 확인하였고(도 8), CD66c에 대한 항원을 직접 면역화하지 않았음에도 A549 세포를 면역화한 혈청에서 CD66c-HuIgFc에 대한 양성률이 높게 나타난 것을 확인하였다(도 9).
- [0098] 상기와 같이 면역화된 쥐의 비장을 절제하여 단일 세포 부유액을 수득하고 RPMI(GIBCO)으로 2회 정도 세척한 후, 0.4% trypan blue(sigma)를 1:1(v/v)으로 섞은 후 현미경으로 염색되지 않은 세포를 측정하는 트립판 블루(trypsin blue) 염색법으로 세포수를 계수하였다. 세포융합 partner 세포로는 SP2/0 (ATCC CRL-1581) 또는 X63 moue myeloma 세포주(ATCC CRL-1580)를 사용하였으며 상기 비장세포와 동일하게 세척 후 세포수를 계수하였다.
- [0099] 상기 골수(myeloma) 세포와 비장세포는 1:5의 비율로 혼합하고 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 미리 37℃로 예열된 50% PEG(polyethylene glycol) 1500 1ml을 1분에 걸쳐 서서히 첨가하였다. 약 1분 정도 정체시켰다가 RPMI 배지를 서서히 추가하여 단계적으로 희석하였다. 이를 원심 분리한 후 1xHAT이 포함된 RPMI(20%FBS, hypoxanthine-aminopterin-thymidine)에 부유시키고, 96-웰 플레이트에 100ul/웰로 분주한 후 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 상기 융합 후 일정기간 HAT feeding을 진행하고, 군락을 형성한 웰이 관찰되면 배양 상층액을 폐선암 세포주인 A549 세포에 하이브리도마 배양 상층액을 100ul씩 넣고 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS 3ml을 넣고 1500rpm에서 3분간 원심분리하여 결합하지 않은 항체를 수세하고 결합된 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-FITC (Dinona)을 200배 희석하여 넣은 후 4℃에서 15분간 반응시킨 후 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 수세한 후 유세포 분석기로 측정하였고 CD66c-HuIgFc를 이용해 정제된 CD66c-HuIgFc를 100ng/웰을 넣어 37℃에서 1시간 반응시켜 코팅하고 차단 버퍼(blocking buffer, sigma)를 웰당 200ul씩 넣고 37℃에서 1시간 반응 시켜 차단하였다. 이렇게 코팅된 플레이트에 하이브리도마 배양 상층액을 웰당 100ul씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시키고 결합하지 않은 항체를 PBS로 수세하였다. 마지막으로 결합되어있는 항체를 확인

하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-HRP(Jackson)을 2000배 희석하여 well당 100ul씩 넣은 후 37℃에서 반응시킨 후 PBS로 수세하고 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 well당 50ul 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 2N H₂SO₄(sigma)로 반응을 중지 시킨 후 450nm에서의 흡광도를 측정함으로써 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 실시하였다.

[0100] 상기 두 가지 방법에서 모두 양성을 보이는 8F5 단클론 항체를 선별하고, 최종적으로 제한 희석(limiting dilution)을 통해 단일 콜로니의 8F5 mAb 를 발현하는 하이브리도마 세포를 확보하였다.

[0101] <2-2> 단클론 항체의 아이소타입(isotype) 결정

[0102] 상기 <실시에 2-1>에서 제조된 8F5 단클론 항체의 아이소타입을 결정하기 위해 mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit (BD Biosciences, USA)로 분석하였다. 구체적으로 isotyping은 rabbit anti-murine isotype specific antisera(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA, Kappa, Lamda)를 이용하고 secondary antibody는 peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG를 사용하였다. 발색 반응은 ortho-phenylenediamine(OPD)와 hydrogen peroxide substrate를 이용해 유도하였으며 450nm의 흡광도를 측정하여 값을 확인하였다.

[0103] 상기 실험결과, 8F5 단클론 항체는 mouse IgG1/kappa light chain으로 확인되었다.(결과 미기재)

[0104] <2-3> 단클론 항체를 이용한 CD66c 항원의 검출

[0105] 본 발명의 8F5 단클론 항체와 anti-CD66c AP11항체를 이용하여 A549 세포 용해물과 재조합 항원(CD66c-HuIgFc)에 대한 western blotting을 실시하였다.

[0106] 구체적으로 1x10⁷ cells의 폐선암 세포주 A549를 lysis buffer(1% Nonidet P-40;NP-40 in 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 50mM EDTA, and 1mM phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride;PMSF) 100ul로 현탁한 후, 상온에서 15분간 용해시킨 다음 원심 분리를 통해 세포 잔존물을 제거하고 상층액을 모아 용해물을 준비하였다. 준비된 A549 용해물과 상기 <실시에 1>에서 수득한 재조합 항원(CD66c-HuIgFc)을 3분간 끓인 후 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 reducing과 non-reducing 조건에서 로딩하였다. 이를 니트로셀룰로오스 막에 electrophoretic transfer시킨 후 5% skim milk(sigma) 용액으로 블로킹하고 각각 8F5와 AP11 단클론 항체에 결합시킨 후, 8F5 단클론 항체를 결합시킨 것은 PBS로 세 번 세척한 후 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma, Saint Louis, USA)을 결합시키고, AP11 단클론 항체는 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM (Sigma, Saint Louis, USA)을 반응시켰다. 상기 니트로셀룰로오스 막을 PBS로 세척한 후 enhanced chemiluminescence detection system(ECL, Amersham, Sweden)로 밴드를 확인하여 그 결과를 도 10에 기재하였다.

[0107] 상기 도 10에 기재한 바와 같이, non-reduced와 reduced 조건에서 두 항체 모두 대략 75kDa의 band가 확인되었고, 재조합 CD66c-HuIgFc는 두 항체 모두 non-reduced 조건에서는 약 210kDa과 reduced 조건에서는 105kDa의 band를 확인 할 수 있다. 재조합 CD66c-HuIgFc의 크기가 non-reduced와 reduced에서 차이가 나타나는 것은 HuIgFc부위에서 dimer가 형성 되었기 때문에 크기의 차이가 발생한 것이다.

[0108] 결국 종래 anti-CD66c에 대한 항체인 AP11과 8F5의 western blotting 결과가 일치함을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 단클론 항체를 이용하여 CD66c 항원의 검출할 수 있음을 알 수 있다.

[0109] 한편 CD66c 항원의 경우 혈액의 과립구(granulocytes)에서 모두 발현되고 있다고 알려져 있다. 이에 말초 혈액에 대한 8F5의 결합 정도를 확인하기 위해 PBMC(peripheral blood mononuclear cells, 적십자혈액원)에 8F5 항체를 1ug 넣고 4℃에서 30분간 반응 시킨 후 PBS 3ml을 넣고 1500rpm에서 3분간 원심분리 하여 결합하지 않은 항체를 washing하고 결합된 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-FITC (Dinona)을 200배 희석하여 넣은 후 4℃에서 15분간 반응 시킨 후 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 washing한 후 유세포 분석기로 측정하였고 그 결과를 도 11에 기재하였다.

[0110] 상기 도 11에 기재한 바와 같이, 8F5 단클론 항체를 이용함으로써 CD66c 항원이 거의 모든 과립구(granulocytes)에서 98% 정도 발현하는 것을 확인하였으며, 림프구(lymphocytes)와 단핵세포(monocytes)에서는

거의 발현되지 않는 것을 알 수 있다.

- [0111] 또한 anti-CD66c에 대한 단클론 항체로써 AP11 이외에 널리 알려진 9A6(SantaCrutz, USA) 클론을 이용해 8F5와 CD66c-HuIgFc에 대한 결합을 확인하기 위해 정제된 CD66c-HuIgFc를 100ng/웰을 넣어 37℃에서 1시간 반응시켜 코팅하고 blocking buffer(sigma)를 웰당 200ul씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시켜 차단하였다. 이렇게 코팅된 플레이트에 1ug/ml 농도의 9A6, 8F5, AP11항체를 웰당 100ul씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시키고 결합하지 않은 항체를 PBS로 수세하였다. 마지막으로 결합되어있는 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-HRP(Jackson)을 2000배 희석하여 웰당 100ul씩 넣은 후 37℃에서 반응시킨 후 PBS로 수세하고 TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 웰당 50ul 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 2N H₂SO₄(sigma)로 반응을 중지시킨 후 450nm에서의 흡광도를 측정하는 방법인 ELISA로 확인하고 그 결과를 도 12에 기재하였다.
- [0112] 상기 도 12에 기재한 바와 같이, 세 항체 모두 CD66c-HuIgFc에 높은 값을 나타내고 있으나, 세 클론이 activity는 서로 다르게 나타남을 알 수 있다.(도 12)
- [0113] <2-4> 8F5 단클론 항체를 이용한 폐선암 세포주의 CD66c 항원의 발현 분석
- [0114] KCLB(Korean Cell Line Bank)와 SNU(Seoul National University)를 통해 확보한 다양한 암 세포주에서의 8F5 단클론 항체의 결합 여부를 유세포 분석기(flow cytometry)로 확인하였다.
- [0115] 구체적으로 암세포주는 KCLB(Korean Cell Line Bank)와 SNU(Seoul National University)를 통해 얻었으며 L-132, SW-900, DU145, LNCap, MDA-MB231, MCF-7는 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO, invitrogen)가 첨가된 Dubco's MEM(GIBCO, invitrogen) 배지를, A549, NCI-H460, NCI-H417, DLD-1, HCT116, HT-29, SW-480, SW-620, PC-3 은 10% heat inactivated FBS이 첨가된 RPMI 1640(GIBCO, invitrogen) 배지를 이용해 37℃에서 5% CO₂ 상태의 배양기를 이용해 배양하였다.
- [0116] 상기 배양된 암세포주에 본 발명의 8F5 단클론 항체를 넣어 4℃에서 30분간 배양한 후 PBS로 수세하고, FITC-conjugated goat anti-mouse Ig G(DiNona Inc, Korea)를 넣어 4℃에서 15분간 배양하였다. 다시 PBS로 수세한 후 FACScaliber(Becton Dickinson, USA)로 분석하여 그 결과를 표 3에 기재하였다.

표 3

Cell line	Origin	Result
L-132	Lung normal	-
A549	Lung adenocarcinoma	+++
NCI-H460	Squamos lung cancer	-
SW-900	Large cell lung cancer	-
NCI-H417	Small cell lung cancer	-
DLD-1	Colon cancer	-
HCT116	Colon cancer	-
HT-29	Colon cancer	+
SW-480	Colon cancer	-
SW-620	Colon cancer	-
MDA-MB-231	Breast cancer	-
MCF7	Breast cancer	-
LNCap	Prostate cancer	-
Du-145	Prostate cancer	-
PC-3	Prostate cancer	-

The percentage of 8F5 positive cells among 5000 cells were performed by FACS analysis

- : less than 10% of positive cells
 + : 10~25%, ++ : 25~50%, +++ : 50~75%, ++++ : 75~90%

[0117]

[0118]

상기 표 3에 기재한 바와 같이, 본 발명의 8F5 단클론 항체는 폐선암 세포주 A549에서는 높게 결합하는 반면, 정상 폐세포주인 L-132와 small cell carcinoma 세포주인 NCI-H417, HT-29를 제외한 4개의 colon cancer cell line, 3개의 prostate cell line, 2개의 breast cancer cell line에서 모두 결합하지 않는 것을 확인하였고, colon cancer cell line인 HT-29는 약하게 결합이 나타나는 것을 확인하였다.

[0119]

<2-5> 8F5 단클론 항체를 이용한 폐암 조직에서 CD66c 항원의 발현 분석

[0120]

충북대학병원에서 수득한 정상 흉선(thymus), 림프절(lymph node), 편도(tonsil), 비장(spleen), 신장(kidney), 요도(urethra) 및 피부(skin)의 동결조직으로 8F5에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였으며, 임상에서 확보한 폐암 조직은 10% 포르말린(sigma)로 고정시킨 후 파라핀(paraffin)에 포매(embedding)시켰다.

[0121]

구체적으로 조직염색은 8F5 단클론 항체를 블로킹 버퍼(blocking buffer, 4% skim milk, 0.1% Tween-20, PBS)에 넣어 4℃에서 밤새 반응시킨 후 biotinylated goat anti-mouse IgG와 HRP conjugated streptavidin (Dako, Denmark)를 넣어 실온에서 20분간 결합시켰다. 발색 반응은 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, Saint Louis, US A)를 이용해 실시하고 그 결과를 표 4 및 도 13에 기재하였다.

표 4

	Tymus	Lymphnode	Tonsil	Spleen	Kidney	Urethra	Skin
Cortex	-	-	-	-	-	-	-
Medulla	-	-	-	-	-	-	-
B cell	-	-	-	-	-	-	-
T cell	-	-	-	-	-	-	-
Epithelium	-	-	-	-	-	-	-
Endothelium	-	-	-	-	-	-	-
Tubular	-	-	-	-	-	-	-
GM	-	-	-	-	-	-	-
GC	-	-	-	-	-	-	-
SE	-	-	-	-	-	-	-
ECC	-	-	-	-	-	-	-
KR	-	-	-	-	-	-	-

Various human frozen tissues were stained by immunohistochemical method. All of them were not expressed.

[0122]

[0123]

상기 표 4에 기재한 바와 같이, 충북대학교 병원을 통해 얻은 정상 동결조직에 대한 8F5 단클론 항체 염색 결과 모든 조직에서 음성임을 알 수 있다.

[0124]

그러나 폐선암 조직에서는 갈색의 양성이 확인 되었으며(도 13a, b), 편평세포암(squamous cell carcinoma, 도 13c)과 소세포암(small cell carcinoma, 도 13d)조직에서는 음성으로 나타나, 본 발명의 8F5 단클론 항체를 이용하여 폐선암 조직을 검출할 수 있음을 알 수 있다.

[0125]

<실시예 3>

[0126]

본 발명의 단클론 항체의 에피토프(epitope) 결정

[0127]

<3-1> 본 발명의 단클론 항체의 에피토프(epitope) 결정

[0128]

상기 <실시예 2>에서 제조된 본 발명이 단클론 항체인 8F5 항체의 에피토프를 결정하기 위하여, MOLI-TOF 방법을 이용한 단백질 펩타이드 분석법을 이용하였다.

[0129]

먼저 상기 8F5 항체 2 내지 5ug과 Protein A resin(amersham phamarcia) 20ul를 넣고 4℃에서 12시간 이상 결합시킨 후 A549 용해물을 500ul넣고 4℃에서 4시간 이상 회전시킨 다음, 항체에 결합하지 않은 단백질을 PBS로 수세하여 제거하고 항체에 결합한 단백질만 protein A resin에 남게 하였다. 이를 SDS-PAGE 겔에 로딩하여 단백질을 분리하고 이에 트립신을 처리(trypsinization)한 뒤 MOLDI-TOF (Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Anal Chem. 1996 Mar 1;68(5):850-8.)를 수행하여 펩타이드를 분석하였다. 상기 분석된 화면을 캡처하여 도 14에 기재하였다.

[0130]

상기 도 14에 기재한 바와 같이, 본 발명의 단클론 항체의 에피토프는 서열번호 7의 아미노산 서열

(RNDAGSYECEIQNPASANR)로 표시됨을 알 수 있다.

[0131] <3-2> 본 발명의 단클론 항체의 에피토프(epitope) 검증

[0132] 상기 <실시예 3-1>의 프로테오 분석으로 결정된 8F5 항체에 대한 항원이 CD66c임을 확인하였고, 이에 대한 에피토프(epitope)를 검증하기 위하여 도 15에 기재한 바와 같이 상기 <실시예 3-1>에서 결정된 에피토프 부위를 포함하거나 포함하지 않는 재조합 항원을 제작하여 8F5 항체에 대한 면역반응을 실시하였다.

[0133] <3-2-1> CD66c mutant 재조합 유전자 제조

[0134] pSec-Tag-CD66cfull1-hFc 재조합 유전자를 이용하여 8F5 항체의 epitope부위에 존재하는 제한효소 BamHI를 이용해 CD66c mutant 재조합 유전자를 만들었다. 구체적으로 서열번호 8로 표시되는 상기 CD66c 항원의 전체 염기서열과 hFc가 결합된 유전자를 pSec-Tag에 삽입하고 이를 8F5 항체의 epitope부위에 존재하는 제한효소 BamHI를 이용하여 절단함으로써 CD66c mutant 재조합 유전자를 확보하였다.

[0135] 보다 구체적으로 8F5 항체의 에피토프가 포함되지 않은 CD66c mutant(BI /BHI)는 BamHI으로 자른 후, 상기 서열번호 8의 CD66c 유전자의 535 내지 787bp 사이의 252bp를 제거하고 나머지 단편을 다시 연결하는 방법으로 제작하였다. 상기와 같이 제조된 CD66c mutant(BI /BHI)의 서열은 서열번호 9의 염기서열로 표시된다.

[0136] 한편 8F5 항체의 에피토프(epitope)를 포함하나 N 말단의 N domain과 A domain 일부가 결핍된 CD66c mutant(HPK/HdIII/PstI/klenow)는 Hind III와 PstI으로 자른 후 N 말단부터 479bp 단편을 제거하고 나머지 유전자 단편에 Klenow를 처리하여 HindIII와 PstI에 의한 접착 말단(sticky end)을 채워 평활말단(blunt ends)을 서로 연결하여 제조하였다. 상기와 같이 제조된 CD66c mutant(HPK/HdIII/PstI/klenow)의 서열은 서열번호 10의 염기서열로 표시된다.

[0137] <3-2-2> CD66c mutant 재조합 유전자의 발현

[0138] 상기 CD66cfull1-hFc, CD66c mutant(BI /BHI)-hFc, CD66c mutant(HPK/HdIII/PstI/klenow)-hFc가 삽입된 pSec-Tag 벡터를 Effectene(Qiagen사)을 이용하여 CHO-K1 세포에 삽입함으로써 형질전환하였다.

[0139] 보다 구체적으로 상기 각 유전자 및 Effectene complex를 하루 전날 플레이팅하여 새로운 배지로 갈아준 CHO 세포에 뿌리고 48시간 동안 배양하였다. 상기 형질감염한지 이틀 후 배양 상등액을 수확하여 human Fc(hFc)를 검출하는 sandwich ELISA를 이용해 발현여부를 확인하였다.(결과 미기재)

[0140] <3-2-3> 본 발명의 단클론 항체의 에피토프(epitope) 검증

[0141] 본 발명의 단클론 항체의 CD66c에 대한 에피토프를 검증하기 위해, 기존에 알려진 anti-CD66c 항체인 9A6(Santa cruz), AP11(다이노나)를 well당 100ng 넣어 37℃에서 한 시간 반응시켜 capture 항체로서 코팅하고, 1xblocking 용액(sigma)을 well당 200ul 넣고 37℃에서 한 시간 반응시켜 블로킹하였다. 상기 준비된 플레이트에 상기 <실시예 3-2-2>에서 제조된 CD66c full1-hFc, CD66c mutant(BI /BHI)-hFc 및 CD66c mutant(HPK/HdIII/PstI/klenow)-hFc의 배양 상등액을 well당 100ul씩 넣은 후 37℃에서 한 시간 반응시키고 PBS로 수세하여 결합하지 않는 항체는 제거하였다. 이에 anti-human Ig-HRP(Jackson)을 희석하여 넣어주고 1시간 반응시킨 후 PBS로 수세한 뒤 TMB 용액을 well당 50ul씩 넣어 10분간 반응시킨 후 황산 50ul를 넣어 반응을 중지시키고 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 배양 상등액에 CD66c mutant-hFc 단백질이 존재함을 확인하기 위해, 대조군으로 anti-human Ig 항체를 이용하여 Capture & detect Sandwich ELISA를 수행하고 상기 실험 결과를 표 5 및 도 16에 기재하였다.

표 5

[0142]

	Capture 항체			
	8F5	9A6	AP11	a-huIg

상층 배양액	CD66c full-hFc	2.873	2.838	2.913	3.123
	CD66c mutant (HPK/HdIII/PstI/klenow)-hFc	2.804	0.049	0.097	3.113
	CD66c mutant(BI /BHI)-hFc	0.019	1.924	2.662	3.149
	negative	0.017	0.027	0.247	3.161

[0143] 상기 표 5 및 도 16에 기재한 바와 같이, 본 발명의 8F5 항체는 상기 <실시예 3-1>에서 결정된 에피토프를 포함하고 있는 CD66c full-hFc 또는 CD66c mutant(HPK/HdIII/PstI/klenow)-hFc에 결합하는 활성이 있으나, 상기 에피토프가 제거된 CD66c mutant(BI /BHI)-hFc에 대해서는 거의 결합하지 않음을 알 수 있다. 그러나 기존 CD66c의 항체인 9A6, AP11는 상기 에피토프가 제거된 CD66c mutant(BI /BHI)-hFc에 주로 결합하는 것을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 8F5 항체는 종래 9A6, AP11 항체와 다른 에피토프인 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시됨을 알 수 있다.

[0144] 상기와 같은 실험결과는 도 17에 기재한 바와 같이, MOLDI-TOF를 통해 밝힌 8F5 항체의 에피토프(epitope) 부위와 정확히 일치함을 알 수 있다.

[0145] <실시예 4>

[0146] **본 발명의 단클론 항체를 이용한 폐선암의 검출**

[0147] 본 발명의 단클론 항체로 CD66c항원을 면역분석법(immunoassay)을 이용하여 검출하였다.

[0148] 구체적으로 먼저 종래 CD66c에 대한 항체인 AP11를 웰당 100ng 넣고 37℃에서 한 시간 반응시켜 capture 항체로서 코팅하고, 1xblocking 용액(sigma)을 웰당 200ul 넣고 37℃에서 한 시간 반응시켜 블로킹하였다. 이렇게 준비된 플레이트에 폐선암 세포주인 A549와 소세포 폐암 세포주인 H417, 위암 세포주인 KatoIII (ATCC HB-103), 혈액암 세포주인 K562(ATCC CCL-243)의 용해물을 웰당 100ug씩 넣은 후 37℃에서 한 시간 반응시키고 PBS로 수세하여 결합하지 않는 항체는 제거하였다. 이에 8F5항체에 HRP를 conjugation시킨 항체를 희석하여 넣어주고 1시간 반응시킨 후 PBS로 수세한 뒤 TMB 용액을 웰당 50ul씩 넣어 10분간 반응시킨 후 황산 50ul를 넣어 반응을 중지시키고 450nm에서의 값을 확인하였다. 이때 CD66c full-hFc 단백질을 standard로 하여 나온 값(detection Ag)을 정량적으로 계산하였으며, 그 결과를 도 18에 기재하였다.

[0149] 상기 도 18에 기재한 바와 같이, 본 발명의 8F5 항체를 통하여 폐선암을 효과적으로 검출할 수 있어 폐선암 특이적 바이오 마커로 효과적으로 이용될 수 있음을 알 수 있다.

[0150] <실시예 5>

[0151] **본 발명의 단클론 항체의 항암 활성**

[0152] 마우스는 6주령(18g)된 수컷 Nude-mouse(중앙실험동물)을 사용하였으며, 폐선암 세포주인 A549를 1xtrypsin-EDTA(GIBCO)로 부유시키고, Hanks balanced salt solution(HBSS)에 두 번 수세하여 1x10⁷ cell을 한 마리의 누드 마우스에 100ul 부피로 마우스 앞다리 뒷부분에 주사하여 종양주를 획득하였다. 종양의 중심괴사(central necrosis)가 일어나기 전에 충분한 혈액공급으로 급속히 자라는 단계의 종양 절편을 만들었으며, 피부 위를 만져 종양편의 위치를 확인하고 1주일에 2회 이상 성장을 관찰한 다음 이식 후 부피가 100mm³에 도달한 마우스를 본 실험에 사용하였다.

[0153] 통계적 유의성을 획득하기 위해, 부피가 100mm³가 된 마우스를 선별하고 각 그룹당 10마리의 마우스를 배정하였으며 본 발명의 단클론 항체는 개체당 100ug/100ul의 1xPBS에 희석하여 마우스 꼬리 정맥에 주사하였고, 주사 간격은 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35일로 총 7회 투여하였다.

[0154] 종양 부피 측정은 본 발명의 단클론 항체 투여일을 기준으로 1주일에 2회씩 캘리퍼스(calipers)로 종양의 장, 단축을 측정하였고 1주일 단위로 4 내지 5주간 측정하여 시험물질의 효과를 판별하였으며, 그 결과를 도 19에 기재하였다.

[0155] 상기 도 19에 기재한 바와 같이, 본 발명의 8F5 항체가 A549 세포에서 발현되는 항원이 없는 항체로써 8F5 와 같은 isotype을 가진 항체인 isotype control 항체 (Dinona)에 비하여 약 30% 이상의 종양억제 효능이 있음을 알 수 있다.

수탁번호

[0156]

기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00230

수탁일자 : 20100222

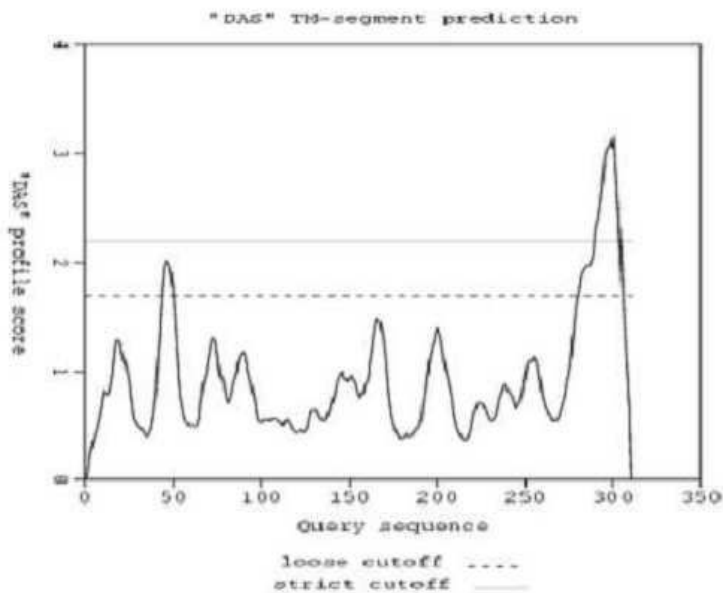
도면

도면1

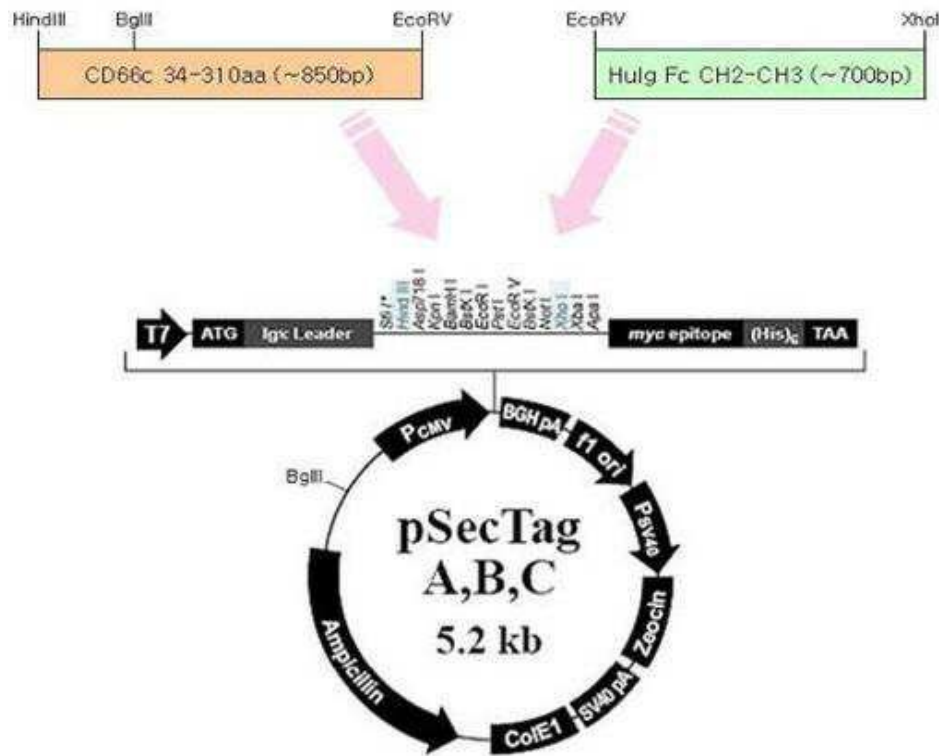
CD66c Genebank Protein No. AAH05008

```

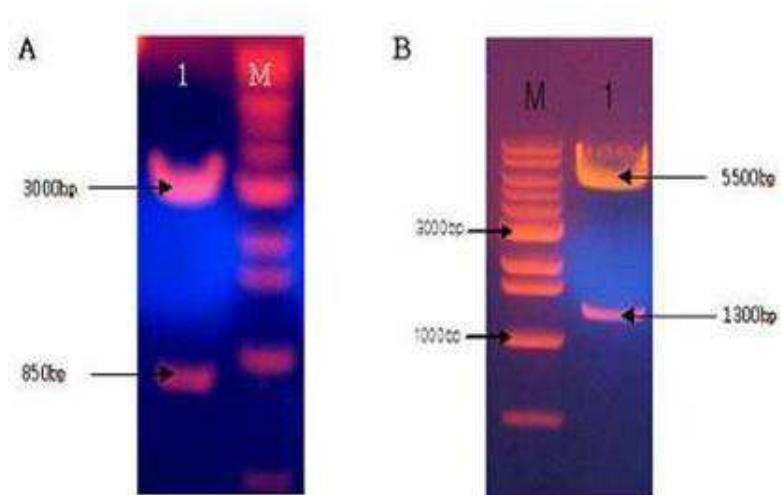
1 MGPPSAPPCR LHVPWKEVLL TASLLTFWNP PTTAKLTIES TPFNVAEGKE VLLLAHNLPO
61 NRIGYSWYKG ERVDGNSLIV GYVIGTQQAT PGPAYSGRET IYPNASLLIQ NVTQNDTGFY
121 TLQVIKSDLV NEEATGQFHV YPELKPSPIS SNNSNPVEDK DAVAFTCEPE VQNTTYLWWV
181 NGQSLFVSPR LQLSNGNMTL TLLSVKENDA GSYECEIQNP ASANRSDPVT LNVLYGPDVF
241 TISPSKANYR PGENLNLSCH AASNPPAQYS WFINGTFQQS TQELFIPNIT WNNSGSYMCO
301 AHNSATGLNR TTVTMITVSG SAPVLSAVAT VGITIGVLAR VALI
    
```



도면2

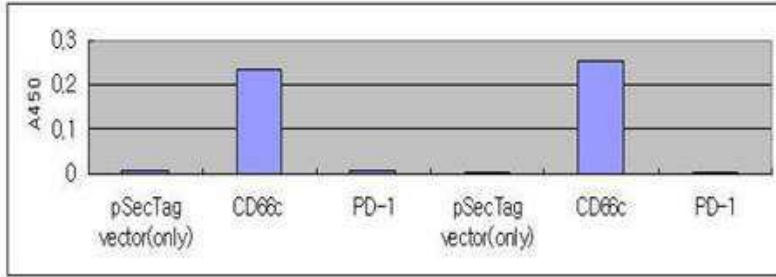


도면3

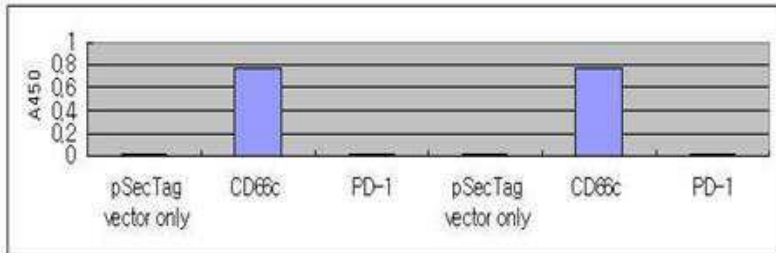


도면4

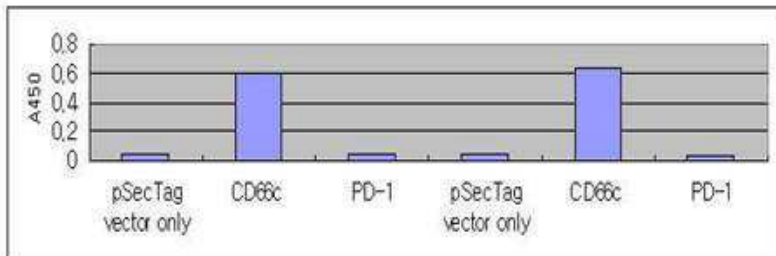
A. anti-CD66c mAb (AP11) coating - method #1



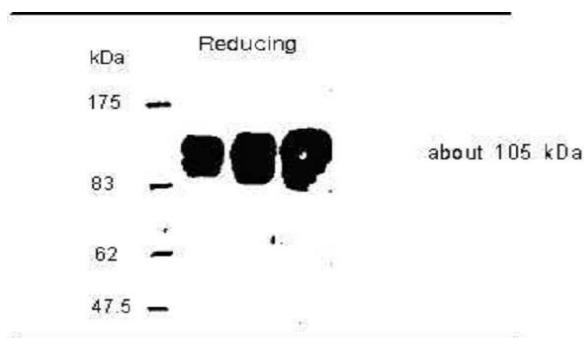
B. anti-Human Ig Fc coating - method #2



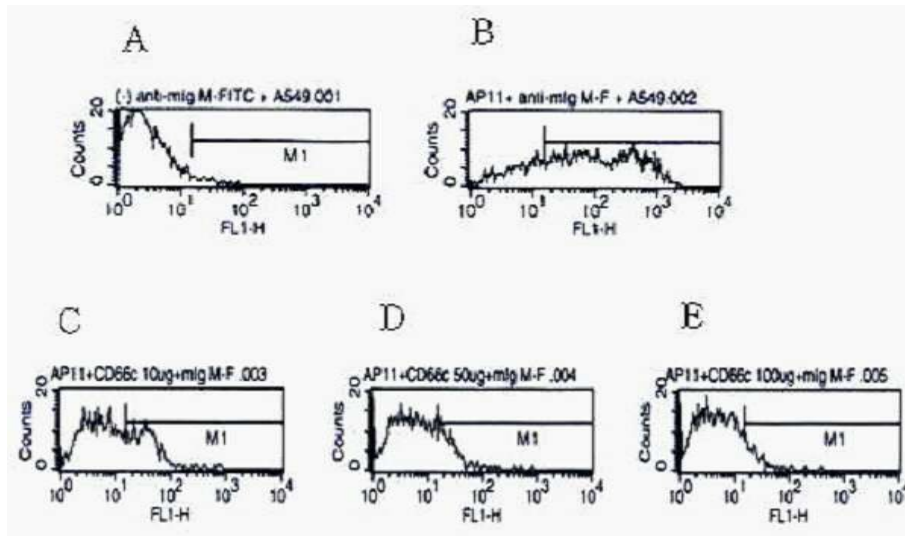
C. anti-Human Ig coating - method #3



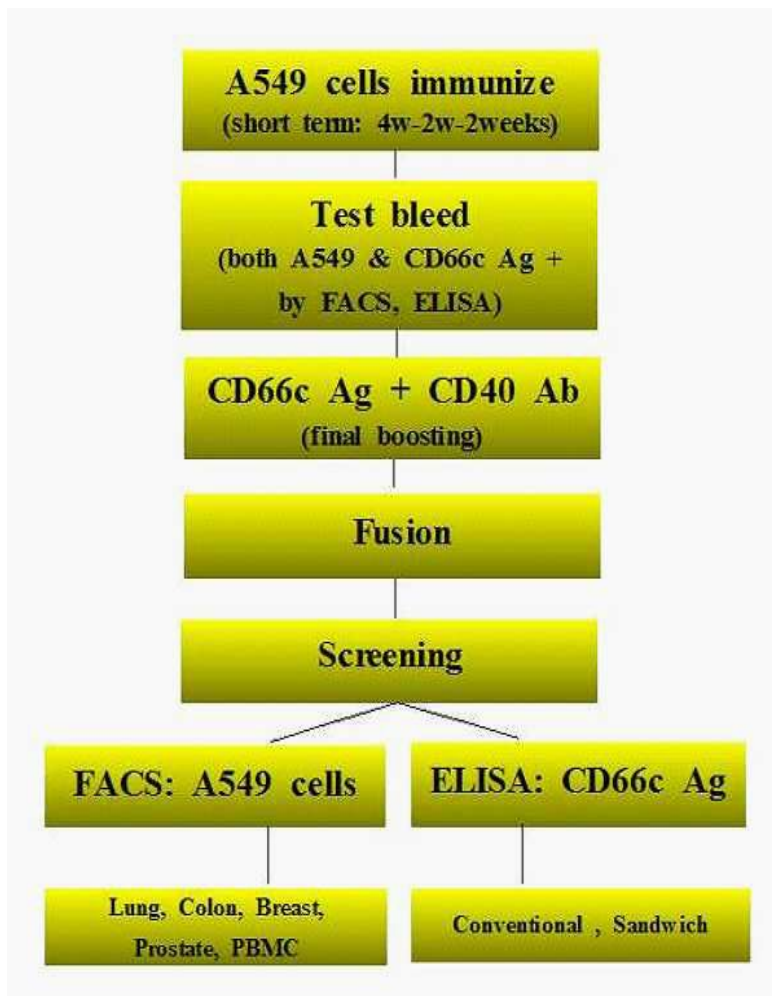
도면5



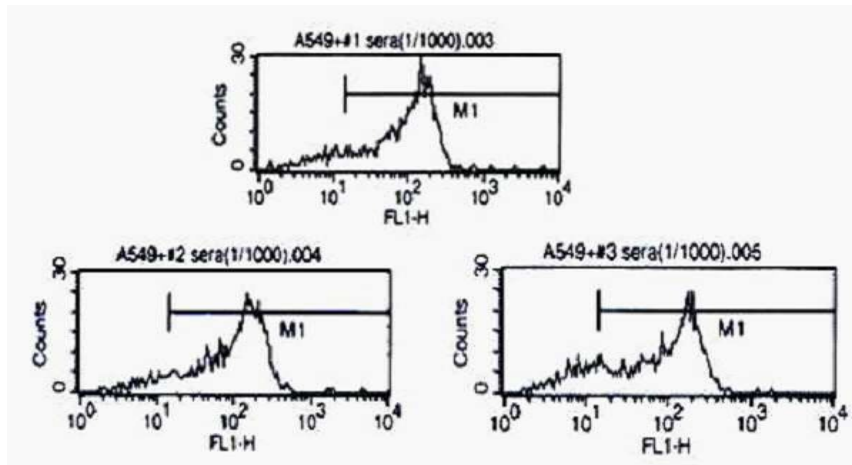
도면6



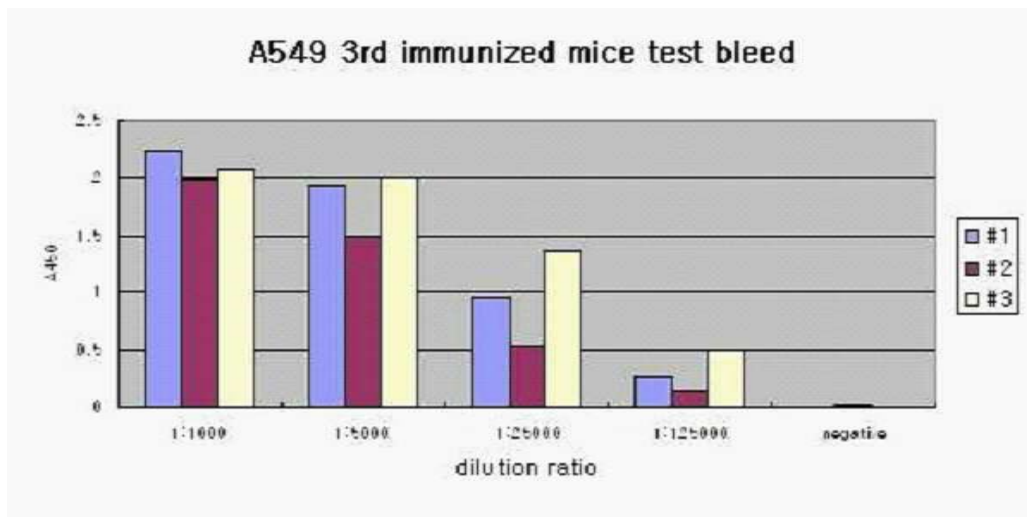
도면7



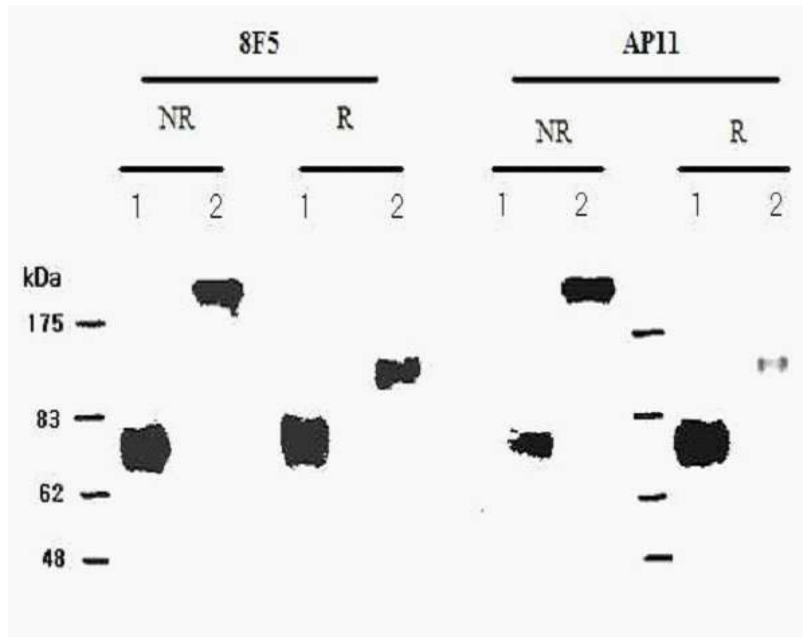
도면8



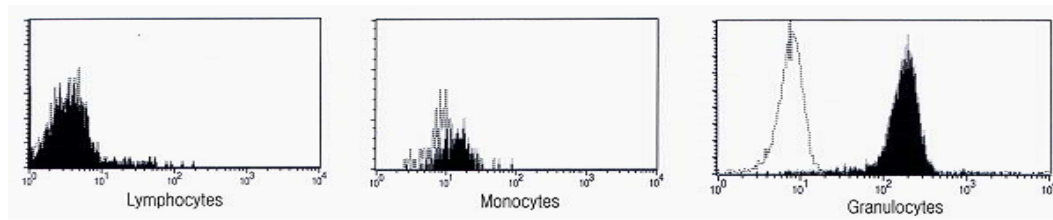
도면9



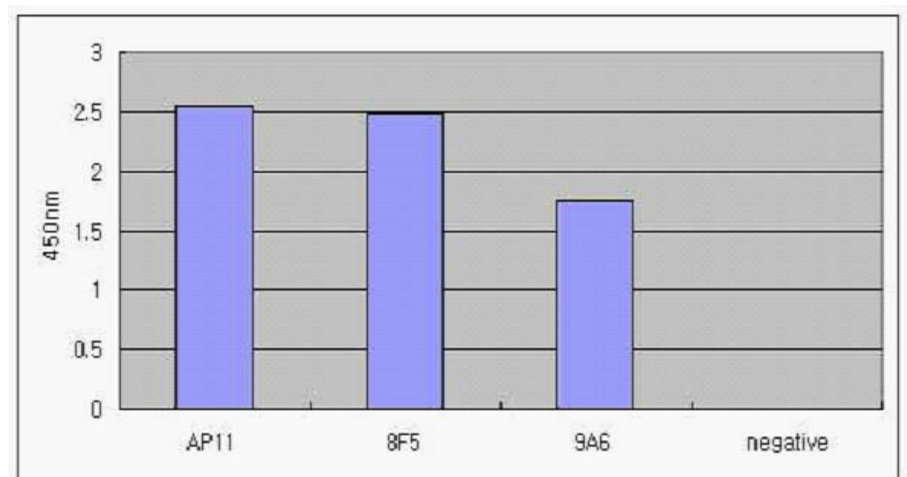
도면10



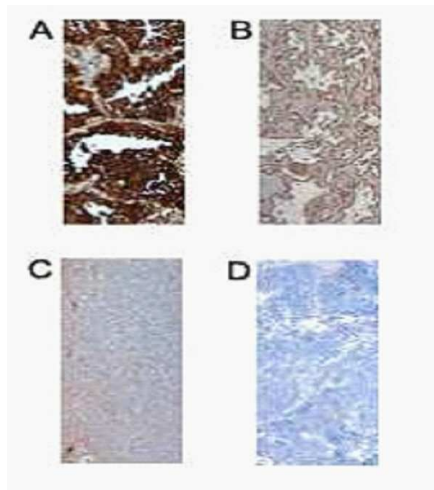
도면11



도면12



도면13



도면14

(MATRIX) (SCIENCE) Mascot Search Results

User : usns
 Email : tech@protecometech.com
 Search title :
 MS data file : D:\data\L20090522035_dinona_dtfiles\0525_dinona.dta
 Database : old (4 sequences; 2085 residues)
 Timestamp : 26 May 2009 at 08:35:08 GMT
 Significant hits: [gi1dinona](#) protein

Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold p < 0.05 Max. number of hits AUTO

Standard scoring MudPIT scoring Ions score cut-off 0 Show sub-sets

Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

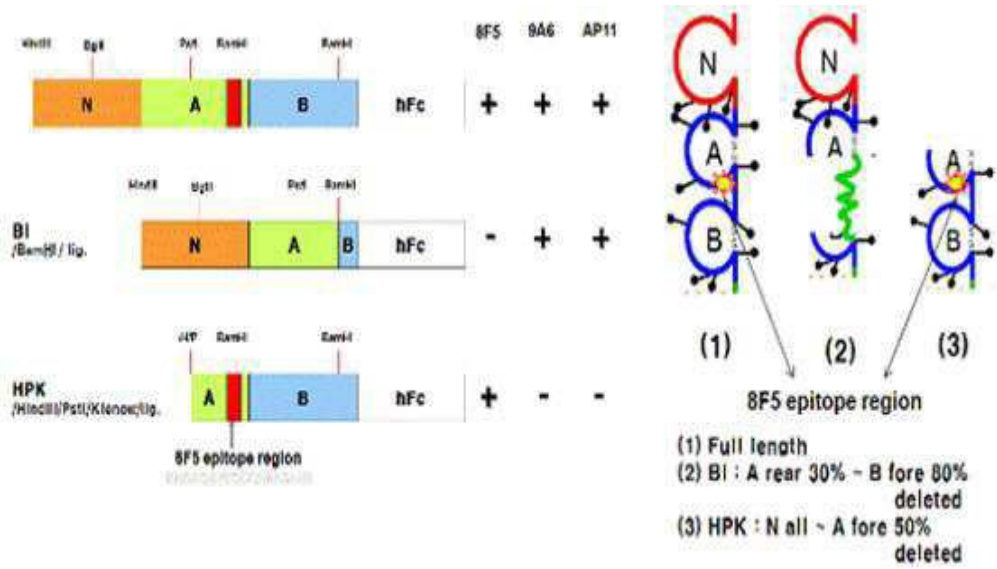
Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

1. [gi1dinona](#) Mass: 31635 Score: 5 Queries matched: 2
 protein
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

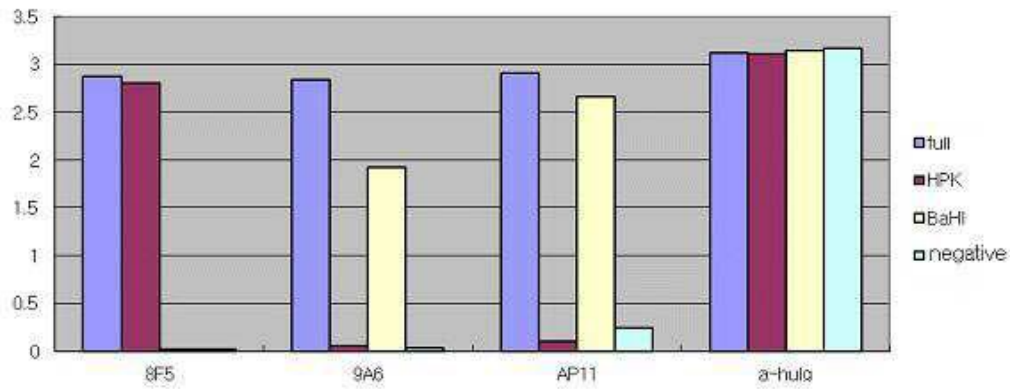
1. [gi1dinona](#) Mass: 31635 Score: 5 Queries matched: 2
 protein
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 106	723.4036	2167.1888	2166.9236	0.2653	1	11	0.028	1	K.SKDAGSYECRIQIFASAKR.S + 2 Deamidation (NQ): Propionamide (C)
<input checked="" type="checkbox"/> 120	1502.7909	3003.5673	3002.6188	0.9485	1	3	0.34	1	K.LTTEKTFPRVAGREVLIIAENLRQIKR.I

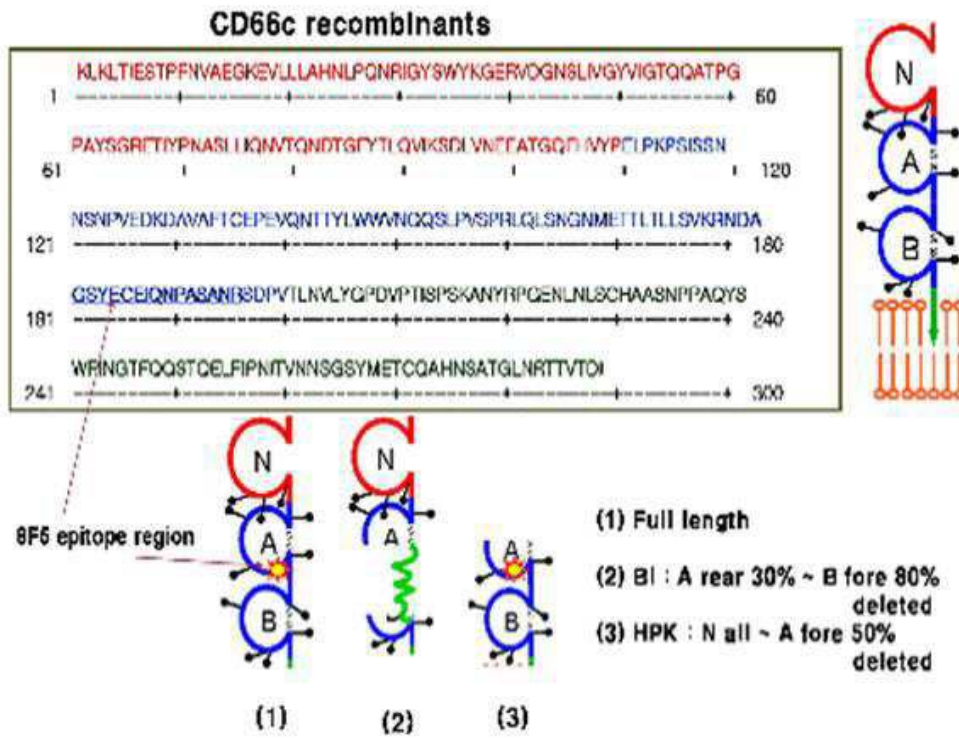
도면15



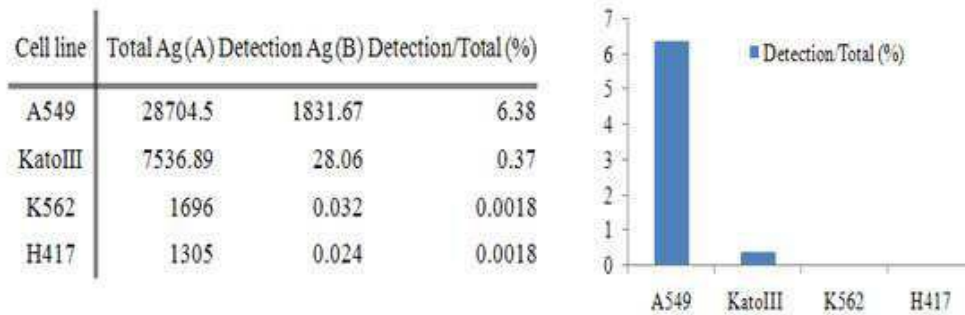
도면16



도면17



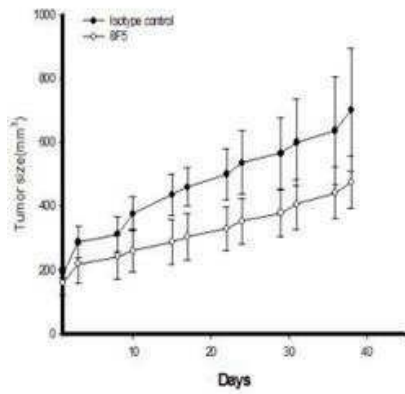
도면18



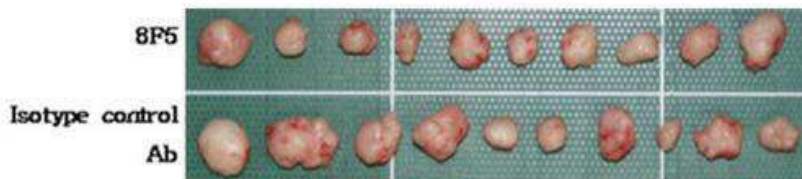
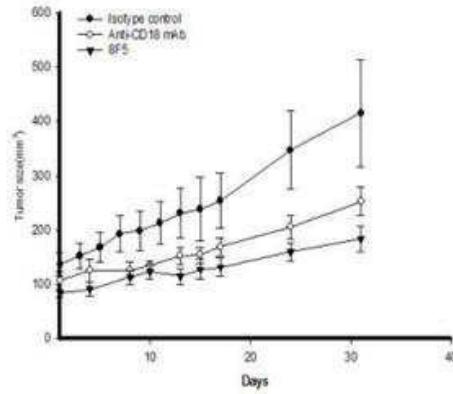
도면19

In vivo ADCC efficacy of therapeutic monoclonal antibody(8F5) against lung adenocarcinoma

1' *In vivo* efficacy test - Result



2' *In vivo* efficacy test - Result



서열목록

- <110> DiNonA Inc.
- <120> Epitope of CD66c specific to lung adenocarcinoma and antibody recognizing the same
- <130> DPP20103373KR
- <150> KR2010-0018078
- <151> 2010-02-26
- <160> 11
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 344
- <212> PRT
- <213> CD66c
- <400> 1

Met Gly Pro Pro Ser Ala Pro Pro Cys Arg Leu His Val Pro Trp Lys

1 5 10 15

Glu Val Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr

Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser
 290 295 300

Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Met Ile Thr Val Ser Gly
 305 310 315 320

Ser Ala Pro Val Leu Ser Ala Val Ala Thr Val Gly Ile Thr Ile Gly
 325 330 335

Val Leu Ala Arg Val Ala Leu Ile
 340

<210> 2
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Recombinant CD66c
 <400> 2

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Arg Ile Gly Tyr Ser
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Ser Leu Ile Val Gly Tyr
 35 40 45

Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
 50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
 85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Val Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp

130 135 140
 Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 145 150 155 160
 Asn Gly Asn Met Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn Asp Ala
 165 170 175

Gly Ser Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn Arg Ser
 180 185 190
 Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro Thr Ile
 195 200 205

Ser Pro Ser Lys Ala Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
 210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Ile Asn
 225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr

245 250 255
 Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr
 260 265 270

Gly Leu Asn Arg

275

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> CD66c gene forward primer

<400> 3

aagcttaagc tcactattga atccacg 27

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> CD66c gene reverse primer

<400> 4

gatatcagtg actgtgtcc tattga 26

<210> 5

<211> 27
 <212> DNA
 <213> HuIgFc forward primer
 <400> 5
 gatatcgacg tcgagtccaa atcttgt 27
 <210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> HuIgFc reverse primer
 <400> 6
 ctcgagttta cccggagaca gggaga 26
 <210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope of 8F5 monoclonal antibody
 <400> 7
 Arg Asn Asp Ala Gly Ser Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Asn Arg
 <210> 8
 <211> 831
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD66c cDNA-hydrophobic region
 <400> 8
 actattgaat ccacgccgtt caatgtcgca gaggggaagg aggtttcttct actcgcccac 60
 aacctgcccc agaatcgtat tggttacagc tggtaaaaag gcgaaagagt ggatggcaac 120
 agtctaattg taggatatgt aataggaact caacaagcta ccccagggcc cgcatacagt 180
 ggtcgagaga caatataccc caatgcatcc ctgctgatcc agaacgtcac ccagaatgac 240
 acaggattct atacctaca agtcataaag tcagatcttg tgaatgaaga agcaaccgga 300
 cagttccatg tatacccgga gctgccaag cctccatct ccagcaacaa ctccaacccc 360

gtggaggaca aggatgctgt ggccttcacc tgtgaacctg aggttcagaa cacaacctac 420
 ctgtggggg taaatggta ggcctcccg gtcagtcca ggctgagct gtccaatggc 480
 aacatgacc tcaacttact cagcgtcaaa aggaacgatg caggatccta tgaatgtgaa 540
 atacagaacc cagcagatgc caaccgcagt gaccagtc caactgaatgt cctctatggc 600
 ccagatggcc ccaccatttc cccctcaaag gccaattacc gtccaggga aaatctgaac 660

ctctctgccc acgcagctc taaccacct gcacagtact cttggtttat caatgggacg 720
 ttccagcaat ccacacaaga gctctttatc cccaacatca ctgtgaataa tagcggatcc 780
 tatatgtgcc aagcccataa ctcagccact ggcctcaata ggaccacagt c 831

<210> 9
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD66c mutant(BI /BHI)

<400> 9
 aagcttaagc tcaacttga atccacgcc ttcaatgtcg cagaggggaa ggaggttctt 60
 ctactcgccc acaacctgcc ccagaatcgt attggttaca gctggtaca aggcgaaaga 120

gtggatggca acagtctaata ttaggatata gtaataggaa ctcaacaagc taccacaggg 180
 cccgcataca gtggtcgaga gacaatatac ccaatgcat ccctgctgat ccagaacgctc 240
 acccagaatg acacaggatt ctataccta caagtcataa agtcagatct tgtgaatgaa 300
 gaagcaaccg gacagttcca tgtataccg gagctgcca agcctccat ctccagcaac 360
 aactcaacc ccgtggagga caaggatgct gtggccttca cctgtgaacc tgaggttcag 420
 aacacaacct acctgtggtg ggtaaatggt cagagcctcc cggtcagtcc caggctgcag 480
 ctgtccaatg gcaacatgac cctcactcta ctcagcgtca aaaggaacga tgcaggatcc 540

tatatgtgcc aagcccataa ctcagccact ggcctcaata ggaccacagt cacggatatac 600
 600

<210> 10
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD66c mutant(HPK/HdIII/PstI/klenow)

<400> 10
 aagctgctgt ccaatggcaa catgacctc actctactca gcgtcaaaag gaacgatgca 60

ggatcctatg aatgtgaaat acagaaccca gcgagtgcc accgcagtga cccagtcacc 120
ctgaatgtcc tctatggccc agatgtcccc accatttccc cctcaaagcc caattaccgt 180

ccaggggaaa atctgaacct ctctgcccac gcagcctcca acccacctgc acagtactct 240
tggtttatca atgggacgtt ccagcaatcc acacaagagc tctttatccc caacatcact 300
gtgaataata gcggatccta tatgtgccaa gcccataact cagccactgg cctcaatagg 360
accacagtca cggatatc 378

<210> 11
<211> 705
<212> DNA
<213> Human immunoglobulin Fc region CH2-CH3
<400> 11

gacgtcgagt ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 60
ctcctggggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaac ccaaggacac cctcatgatc 120

tcccggacce ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga cectgaggtc 180
aagttcagct ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 240
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctca ccgtcctgca ccaggactgg 300
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 360
aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 420
tcccagagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggttctat 480
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 540

acgcctccc tgctggactc cgacggctcc ttcttctct atagcaagct caccgtggac 600
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac 660
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccggta aatga 705