(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년12월21일
(11) 등록번호 10-1214262
(24) 등록일자 2012년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0052917
(22) 출원일자 2010년06월04일
심사청구일자 2010년06월04일
(65) 공개번호 10-2011-0133278
(43) 공개일자 2011년12월12일
(56) 선행기술조사문헌
Molecular & Cellular Proteomics. 2008, Vol. 7, No. 1, pp.1-14*
Journal of Molecular Biology. 2004, Vol. 343, pp.985-996.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
김상직
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
안현주
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
고정헌
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(74) 대리인
양부현

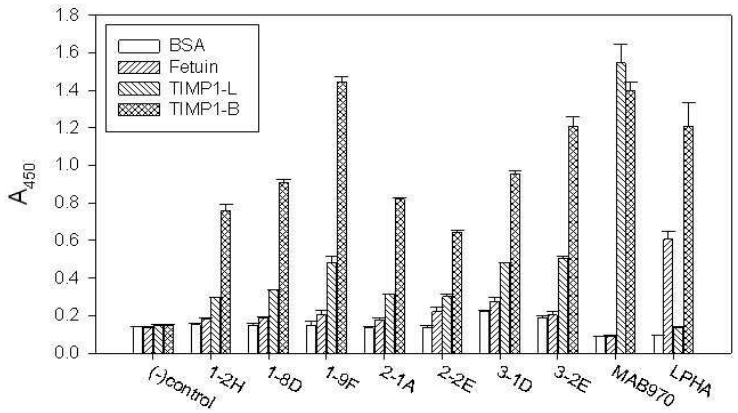
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **N?연결 β(1,6) 가지를 갖는 TIMP?1 당단백질을 특이적으로 인지하는 항체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 GnT-V에 의해 도입된 비정상적 당쇄인 N-연결 β(1,6) 가지를 갖는 TIMP-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터 및 숙주세포에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 항체를 유효성분으로서 포함하는 암의 전이 또는 진행 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 GnT-V에 의해 TIMP-1 단백질에 도입된 비정상적 당쇄로부터 유도되는 구조적 변화를 구별할 수 있다. 본 발명의 항체를 이용하여 비정상적 당쇄가 도입된 TIMP-1 단백질을 검출함으로써 암의 전이 또는 진행에 관한 정보를 용이하게 얻을 수 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	RBM2100911
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	암특이 당쇄변이를 인식하는 항체의 개발 및 이를 이용한 암진단에 관한 연구
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2009년 05월 01일 ~ 2010년 04월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

N-연결 β(1,6) 가지 당쇄가 부가된 TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 다음의 중쇄 CDR (complementarity determining region) 및 경쇄 CDR을 포함하는 가변영역을 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(i) 서열목록 제1서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제2서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제3서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제4서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제5서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제6서열로 이루어진 LCDR 3;

(ii) 서열목록 제7서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제8서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제9서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제10서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제11서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제12서열로 이루어진 LCDR 3;

(iii) 서열목록 제13서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제14서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제15서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제16서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제17서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제18서열로 이루어진 LCDR 3;

(iv) 서열목록 제19서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제20서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제21서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제22서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제23서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제24서열로 이루어진 LCDR 3;

(v) 서열목록 제25서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제26서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제27서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제28서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제29서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제30서열로 이루어진 LCDR 3;

(vi) 서열목록 제31서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제32서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제33서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제34서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제35서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제36서열로 이루어진 LCDR 3; 또는

(vii) 서열목록 제37서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제38서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제39서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제40서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제41서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제42서열로 이루어진 LCDR 3.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄의 말단에 시알산(sialic acid)이 더욱 부가된 TIMP-1에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄의 말단에 존재하는 시알산과 TIMP-1이 공동으로 형성하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 다음의 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합

단편:

(ⅰ) 서열목록 제43서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제44서열로 이루어지는 VL;

(ⅱ) 서열목록 제45서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제46서열로 이루어지는 VL;

(ⅲ) 서열목록 제47서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제48서열로 이루어지는 VL;

(ⅳ) 서열목록 제49서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제50서열로 이루어지는 VL;

(ⅴ) 서열목록 제51서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제52서열로 이루어지는 VL;

(ⅵ) 서열목록 제53서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제54서열로 이루어지는 VL; 또는

(ⅶ) 서열목록 제55서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제56서열로 이루어지는 VL.

청구항 6

제 1 항 또는 제 5 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 7

상기 제 6 항의 핵산분자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 8

상기 제 7 항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄가 부가된 TIMP-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법.

(a) 상기 제 8 항의 숙주세포를 배양하는 단계; 및

(b) 상기 숙주세포에서 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄가 부가된 TIMP-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편를 발현시키는 단계.

청구항 10

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 GnT-V에 의해 도입된 비정상적 당쇄인 N-연결 β(1,6) 가지를 갖는 TIMP-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터 및 숙주세포에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 항체를 유효성분으로서 포함하는 암의 전이 또는 진행 진단용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당화(glycosylation)은 단백질의 기능을 조절하고 단백질 구조의 다양성을 증가시키는 메카니즘을 제공하는 가

장 흔한 트랜스레이션 후(post translation) 변형중의 하나이다. 당화되는 패턴은 세포 타입 및 세포 조건에 의존적이다. 따라서, 암세포와 같은 특정 타입의 세포 단백질상에서 특이 글리칸(glycan)의 비정상적 발현은 가능성 있는 바이오마커(biomarker)를 제공할 수 있고, 글리칸 연결에 의해 발생되는 구조적 변화를 구별할 수 있는 능력은 진단 및 치료적 응용에서 매우 큰 관심의 대상이 되고 있다. 이와 같은 변화를 검출하기 위해 항체를 이용하는 접근법이 적용되어 왔다. 탄수화물 에피토프를 인지하는 단일클론 항체들을 다양한 형태의 면역원(immunogen)을 사용한 하이브리도마 기술에 의해 성공적으로 제조하였다고 보고되었다[1, 2, 3, 4, 5]. 그러나, 탄수화물 자체가 자가 항원(self antigen)이기 때문에 탄수화물을 사용한 면역화는 항상 성공적인 것은 아니어서, 종종 1차 IgM 반응이 약하게 일어나거나, 특정의 경우에서는 면역 반응을 전혀 일으키지 않는다.

[0003] 한편, 파아지-디스플레이(phage-display)방법에 의한 항체 라이브러리는 항-글리칸 항체를 분리하기 위해 사용되어 왔다(6, 7, 8, 9, 10). 파아지-디스플레이 방법은 결합가 및 다양성과 같은 항체 디자인에서의 인위적 유연성을 부여할 수 있어서, 낮은 면역원성을 갖는 자가-항원 유사 탄수화물에 대한 항체 제조에 더욱 큰 이점을 갖는 것으로 간주되어 왔다(8, 10). 당전이효소 GnT-V (N-acetylglucosaminyltransferase-V)의 증가된 활성에 의해 유도된 N-연결된 글리칸의 증가된 가지화(branching)는 암 진전에 비정상적 당화가 관련되어 있다는 것을 증명하는 대표적인 예이다(11). GnT-V에 의해 β(1,6) 가지를 첨가함으로써 말단 시알산(sialic acid) 잔기를 위한 추가적 자리를 제공하고, 이는 최종적으로 당단백질에서 전체적인 시알산화(sialylation)에 이르게 한다(12, 13).

[0004] TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1)을 포함하는 몇 개의 당단백질이 GnT-V의 타겟이 되며, 이러한 단백질의 변형은 암의 전이 능력과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(14, 15, 16, 17).

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 당단백질 TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1)은 암의 전이 및 진행에 따라 그 당쇄 구조가 비정상적으로 변화하며, 이는 당전이효소 GnT-V (N-acetylglucosaminyltransferase-V)의 비정상적 발현에 의한 N-연결된 β (1,6) 당쇄의 첨가 때문이다. 이에, 본 발명자들은 암의 전이를 효과적으로 모니터링하기 위해, GnT-V에 의해 부가된 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄를 갖는 TIMP-1 당단백질을 특이적으로 인지하는 항체를 제조하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, TIMP-1 당단백질에 대해 decoy 면역화 방법 및 파아지-디스플레이(phage-display) 기술을 조합하여 당화된 TIMP-1의 당쇄 구조 변화만을 특이적으로 인지하는 항체를 성공적으로 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 N-연결 β(1,6) 가지의 비정상적 당쇄가 부가된 당단백질 TIMP-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것에 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 것에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공하는 것에 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 진행 진단용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0013] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄가 부가된 TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0015] 본 발명의 항체는 N-연결 β(1,6) 가지의 비정상적 당쇄가 부가된 당단백질 TIMP-1에 특이적 결합능을 갖는다. 본 발명의 항체는 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄가 부가되지 않은 TIMP-1 단백질에는 결합하지 않는다.

[0016] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 항체는 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄의 말단에 시알산(sialic acid)이 첨가된 TIMP-1 당단백질에 특이적으로 결합한다.

[0017] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 항체는 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄의 말단에 존재하는 시알산과 TIMP-1 단백질(서열목록 제57서열)의 특정 아미노산 서열이 공동으로 구성하는 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0018] 본 명세서에서 용어 "항체(antibody)"는 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄가 부가된 당단백질 TIMP-1에 대한 특이 항체로서, 상기 당쇄 구조를 갖는 당단백질 TIMP-1에 특이적으로 결합하며, 완전한 항체 형태 뿐만 아니라 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함하는 의미이다.

[0019] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ε) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ1), 감마2(γ2), 감마3(γ3), 감마4(γ4), 알파1(α1) 및 알파2(α2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다 (Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4,pp. 45-65, sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)).

[0020] 항체 분자의 항원 결합 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')2 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')2 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv (two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고, 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수 분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')2 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 항체는 바람직하게는 Fv 형태, Fab 형태, 또는 완전한 항체 형태이다.

[0022] 또한, 본 발명에서 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ε) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 불변영역은 감마1(IgG1), 감마 3(IgG3) 및 감마4(IgG4)이이고, 가장 바람직하게는 감마 1(IgG1) 이소타입이다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 형일 수 있으며, 바람직하게는 카파형이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 항체는 카파(κ) 경쇄와 감마1(γ1) 중쇄를 가지는 Fab 형태 또는 IgG1 형태임을 알 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 중쇄 CDR (complementarity determining region) 및 경쇄 CDR을 갖는 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다: (i) 서열목록 제1서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제2서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제3서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제4서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제5서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제6서열로 이루어진 LCDR 3; (ii) 서열목록 제7

서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제8서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제9서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제10서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제11서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제12서열로 이루어진 LCDR 3; (iii) 서열목록 제13서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제14서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제15서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제16서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제17서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제18서열로 이루어진 LCDR 3; (iv) 서열목록 제19서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제20서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제21서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제22서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제23서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제24서열로 이루어진 LCDR 3; (v) 서열목록 제25서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제26서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제27서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제28서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제29서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제30서열로 이루어진 LCDR 3; (vi) 서열목록 제31서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제32서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제33서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제34서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제35서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제36서열로 이루어진 LCDR 3; 또는 (vii) 서열목록 제37서열로 이루어진 HCDR 1, 서열목록 제38서열로 이루어진 HCDR 2, 서열목록 제39서열로 이루어진 HCDR 3, 서열목록 제40서열로 이루어진 LCDR 1, 서열목록 제41서열로 이루어진 LCDR 2, 서열목록 제42서열로 이루어진 LCDR 3.

[0024] 상기 CDR를 포함하는 가변영역을 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 N-연결 β(1,6) 가지의 비정상적 당쇄가 부가된 TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1)에 특이적으로 결합한다.

[0025] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 다음의 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다: (i) 서열목록 제43서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제44서열로 이루어지는 VL; (ii) 서열목록 제45서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제46서열로 이루어지는 VL; (iii) 서열목록 제47서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제48서열로 이루어지는 VL; (iv) 서열목록 제49서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제50서열로 이루어지는 VL; (v) 서열목록 제51서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제52서열로 이루어지는 VL; (vi) 서열목록 제53서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제54서열로 이루어지는 VL; 또는 (vii) 서열목록 제55서열로 이루어지는 VH 및 서열목록 제56서열로 이루어지는 VL.

[0026] 본 명세서에서, 용어"중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.

[0027] 또한 본 명세서에서 용어"경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VL 및 불변 영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.

[0028] 본 명세서에서, 용어 "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로블린 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)). 중쇄 및 경쇄에는 각각 3개의 CDR, 즉 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3과, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3이 포함 되어 있다. CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공한다.

[0029] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, N-연결 β(1,6) 가지의 당쇄를 갖는 TIMP-1 당단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 범위 내에서 첨부한 서열목록에 기재된 아미노산 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 곁사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 곁사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

[0030] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스 (hydropathy index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루이신 (+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스타인 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글라이신 (-0.4); 쓰레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 타이로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메

이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5). 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

[0031] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스팔테이트(+3.0± 1); 글루타메이트 (+3.0 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글라이신 (0); 쓰레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 ± 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루이신 (-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4). 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443(1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, Gene 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-3(1989); Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90(1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65(1992) and Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10(1990))은 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0032] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs (scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab')단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 단일클론 항체이다. 용어 "단일클론 항체"는, 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체분자를 의미하며, 단일클론 항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.

[0034] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄가 부가된 당단백질 TIMP-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0035] 본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

[0036] 본 발명 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

[0037] 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴

클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.

[0038] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0039] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 그리고 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함되며, 바람직하게는 플라스미드 벡터이다.

[0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터에서 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자는 프로모터와 작동적으로 결합(operatively linked)되어 있다.

[0041] 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[0042] 본 발명의 재조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0043] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli* (예컨대, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pLλ프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 숙주세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 츄린겐시스의 독소단백질 유전자의 프로모터(Appl. Environ. Microbiol. 64:3932-3938(1998); Mol. Gen. Genet. 250:734-741(1996)) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다.

[0044] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λgt4○λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0045] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β-액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스,의 프로모터 엡스타인 바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터))가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0046] 본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질 (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His (hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다. 또한, 본 발명의 벡터에 의해 발현되는 단백질이 항체이기 때문에, 정제를 위한 추가적인 서열 없이도, 발현된 항체는 단백질 A 컬럼 등을 통하여 용이하게 정제할 수 있다.

[0047] 한편, 본 발명의 발현 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이

신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0048] 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 발현하는 벡터는, 중쇄와 경쇄가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 중쇄와 경쇄를 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다.

[0049] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환 된 숙주세포를 제공한다.

[0050] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 에스케리치아 콜라이(Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(Streptomyces), 슈도모나스(Pseudomonas)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida)), 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis) 또는 스타필로코쿠스(Staphylococcus)(예를 들면, 스타필로코쿠스 카르노수스(Staphylocus carnosus))와 같은 원핵 숙주 세포를 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 숙주세포는 바람직하게는 *E. coli*이고 보다 바람직하게는 E. coli ER2738, E. coli XL-1 Blue, E. coli BL21(DE3), E. coli JM109, E. coli DH 시리즈, E. coli TOP10, E. coli TG1 및 E. coli HB101이다. 가장 바람직하게는 숙주세포는 E. coli ER2738 또는 E. coli TG1이다.

[0051] 상기 벡터의 적합한 진핵세포 숙주 세포는 아스페르길러스 속(Aspergillus species)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(Pichia pastoris), 사카로마이세스 세르비시아(Saccharomyces cerevisiae), 쉬조사카로마세스(Schizosaccharomyces) 및 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa)와 같은 효모, 그 밖의 하등 진핵세포, 그리고 곤충-유래 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포를 포함한다. 또한, 식물 또는 포유동물로부터 유래한 세포도 숙주 세포로 이용할 수 있다. 바람직하게는, 숙주세포는 원숭이 신장 세포7(COS7: monkey kidney cells), NSO 세포, SP2/0, 차이니즈 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 293 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다. E. coli 등의 미생물을 이용하는 경우 생산성은 동물세포 등에 비하여 높은 편이나 당화(glycosylation) 문제로 인해 인택트(intact)한 Ig 형태의 항체 생산에는 바람직하지 않지만, Fab 및 Fv 등의 생산에는 사용될 수 있다.

[0052] 본 명세서에서, 숙주 세포로의 "형질전환" 및/또는 "형질감염"은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO4)) 침전, 염화 칼슘(CaCl2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 예를 들어 염화칼슘법을 이용하는 칼슘 처리 또는 일렉트로포레이션은 일반적으로 원핵세포에 대해 사용된다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Haror Laboratory Press)(1989)) 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)을 사용한 형질감염은 특정 식물 세포의 형질전환에 사용된다((Shaw et. al, Gene, 23:315(1983), 국제 공개특허 WO 89/05859). 세포벽이 없는 포유동물 세포의 경우, 인산칼슘 침전법을 사용할 수 있다(Graham et .al,, Virology, 52:456-457(1978)). 포유동물 숙주 세포로의 형질전환의 일반적인 방법 및 특징은 미국 특허 제4,399,216호에 기재되어 있다. 효모내로의 형질전환은 일반적으로 반 솔링겐(Van Solingen) 등의 문헌(J. Bact.,130:946(1977)) 및 히시아오(Hsiao) 등의 문헌(Proc. Natl. Acad. Sci.(USA), 76:3829(1979))의 방법에 따라 수행된다.

[0053] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄가 부가된 당단백질 TIMP-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다: (a) 상기 설명된 숙주세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 숙주세포에서 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄가 부가된 TIMP-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현시키는 단계.

[0054] 상기 항체 제조에서 형질전환된 숙주세포의 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 이러한 다양한 배양 방법은 다양한 문헌(예를 들면, James M. Lee, Biochemical Engineering, Prentice-Hall International Editions, 138-176)에 개시되어 있다. 세포 배양은, 세포의 성장방식에 따라 현탁배양과 부착배양, 배양방법에 따라 회분식, 유가식 및 연속배양식의 방법으로 구분된다. 배양에 사용되는 배지는 특정한 균주의 요구조건을 적절하게 만족시켜야 한다.

[0055] 동물세포 배양에서 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 사용될 수 있는 탄소원의 예는, 포도당, 자당, 유당, 과당, 말토오스, 전분 및 셀룰로오스와 같은 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유 및 코코넛유와 같은 지방, 팔미트산, 스테아린산 및 리놀레산과 같은 지방산, 글라이세롤 및 에탄올과

같은 알코올, 그리고 아세트산과 같은 유기산을 포함한다. 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원의 예는, 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액(CSL) 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원을 포함한다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서, 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에, 아미노산, 비타민, 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다.

[0056] 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20℃ 내지 45℃, 바람직하게는 25℃ 내지 40℃이다.

[0057] 형질전환 된 숙주세포를 배양하여 수득한 항체는 정제하지 않은 상태로 사용될 수 있으며 추가로 다양한 통상의 방법, 예를 들면 투석, 염 침전 및 크로마토그래피 등을 이용하여 고 순도로 정제하여 사용될 수 있다. 그 중에서 크로마토그래피를 이용하는 방법이 가장 많이 사용되며, 컬럼의 종류와 순서는 항체의 특성, 배양방법 등에 따라 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에서 선택할 수 있다.

[0058] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 진행 진단용 조성물을 제공한다.

[0059] 본 발명의 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄를 갖는 당단백질 TIMP-1에 대한 항체는 생물학적 시료에 적용하여 암의 전이 또는 진행을 모니터링 하는데 사용될 수 있다. 당전이 효소 GnT-V에 의해 TIMP-1 단백질에 도입된 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄는 암의 전이, 진행 또는 진전과 밀접한 관련이 있고, 이러한 비정상적 당쇄를 갖는 당단백질 TIMP-1의 생성을 관찰함으로써 암의 전이 및 진행을 모니터링할 수 있다.

[0060] 본 명세서에서 사용된 용어 "생물학적 시료"란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 발명의 항체와 반응시켜서 암의 전이 또는 진행에 관한 정보를 얻을 수 있다.

[0061] 상기한 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 또는 섬광계수법(scintillation counting method)으로 검출할 수 있다.

[0062] 본 명세서에서 "검출"은 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러 가지 표지체를 사용하여 실시할 수 있다. 표지체의 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 또는 방사성 동위원소를 포함한다. 검출 표지체로서 사용되는 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β-D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제 및 β-라타마제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+}, Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하며, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르 및 이소루미놀 유도체 등을 포함하며, 미소입자로는 콜로이드 금 및 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 57Co, 3H, 125I 및 125I-볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함한다.

[0063] 바람직하게는, 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있다. 효소면역흡착법(ELISA)에는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 본 발명의 항체는 검출 표지를 가질 수 있으며, 검출표지를 가지지 않을 경우는 본 발명의 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.

[0064] 본 발명의 암의 전이 또는 진행 진단용 조성물은 키트의 형태로 제공될 수 있으며, 상기한 항체를 이용한 검출에 필요한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0065] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0066] (ⅰ) 본 발명의 항체는 GnT-V에 의해 도입된 비정상적 당쇄, N-연결 β(1,6) 가지가 부가된 당단백질 TIMP-1에

특이적으로 결합한다. (ii) 본 발명의 항체는 GnT-V에 의해 도입된 비정상적 당쇄를 갖는 당단백질 TIMP-1와, 상기 당쇄를 갖지 않는 단백질 TIMP-1을 구별할 수 있다. (iii) 본 발명의 항체의 결합 특이성은 TIMP-1 단백질 부위 뿐만 아니라 N-연결 β(1,6) 가지 당쇄 말단의 시알산에 동시에 의존적이다. (iv) 본 발명의 항체를 이용하면 비정상적인 당쇄를 갖는 당단백질 TIMP-1을 검출함으로써 암의 전이 또는 진행에 관한 유용한 정보를 얻을 수 있다.

발명의 효과

[0067] 본 발명의 항체는 GnT-V에 의해 TIMP-1 단백질에 도입된 비정상적 당쇄로부터 유도되는 구조적 변화를 구별할 수 있다. 본 발명의 항체를 이용하여 비정상적 당쇄가 도입된 TIMP-1 단백질을 검출함으로써 암의 전이 또는 진행에 관한 정보를 용이하게 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1a 내지 도 1c는 Lec4 및 Lec4(+)GnT-V 세포로부터 TIMP-1을 발현시키고 정제한 것을 보여준다.

도 1a는 Lec4 (회색 점선) 및 Lec4(+)GnT-V (검은색 실선) 세포들의 FACS 분석결과이다. 세포들을 비오티닐화된(biotinylated) LPHA 및 FITC-컨쥬게이트된 Neutravidin을 사용하여 염색하고 분석하였다.

도 1b는 TIMP-1의 2가지 상이한 당화형태, Lec4으로부터 발현하고 정제한 TIMP1-L(레인 1) 및 Lec4(+)GnT-V으로부터 발현하고 정제한 TIMP1-B(레인 2)의 SDS-PAGE 블로팅 결과를 보여준다.

도 1c는 TIMP-1의 2가지 상이한 당화형태, Lec4으로부터 발현하고 정제한 TIMP1-L (레인 1) 및 Lec4(+)GnT-V으로부터 발현하고 정제한 TIMP1-B(레인 2)의 렉틴(lectin) 블로팅 결과를 보여준다.

도 2는 파아지 ELISA를 사용하여 scFv-파아지 클론을 스크리닝한 결과를 보여준다. 패닝 이후에 무작위로 선별한 192개 클론에 대해 TIMP1-L 및 TIMP1-B에 대한 결합능을 테스트하였다. 도 2에는 48개 클론에 대한 데이터만을 보여주었다.

도 3은 TIMP-1의 2가지 당화형태에 대한 scFv-Fc의 결합능을 ELISA에 의해 분석한 결과를 보여준다. 정제한 scFv-Fc 및 항-Tie2 scFv-Fc (음성 대조군)을 BSA, Fetuin, TIMP1-L 또는 TIMP1-B으로 코팅(100 ng/well)된 각 마이크로타이터 웰에 첨가하였다. 결합된 scFv-Fc는 HRP-컨쥬게이트된 염소 항-인간 IgG(Fc-특이)항체에 의해 검출하였다. 비교를 위해, MAb970 (생쥐 항-TIMP-1 항체, R&D systems) 및 비오티닐화된 LPHA를 마이크로타이터 웰에 첨가하고, 이들의 결합을 각각 HRP-컨쥬게이트된 염소 항-생쥐 IgG 항체 및 HRP-컨쥬게이트된 Neutravidin으로 검출하였다.

도 4a 및 도 4b는 scFv-Fc 결합에 대한 TIMP-1의 엑소글리코시다아제(exoglycosidase) 처리의 효과를 보여준다.

도 4a는 엑소글리코시다아제 처리 후 TIMP1-L (레인 1-4) 및 TIMP1-B (레인 5-8)의 웨스턴 블로팅 분석 결과를 보여준다. 도 4a에서 각 레인은 TIMP-1을 효소 없이 인큐베이션한 결과(레인 1, 5), 뉴라미니다아제와 인큐베이션한 결과(레인 2, 6), 뉴라미니다아제 및 갈락토시다아제와 인큐베이션한 결과(레인 3, 7), 뉴라미니다아제, 갈락토시다아제 및 헥소사미니다아제와 인큐베이션한 결과(레인 4, 8)이다. 처리한 TIMP-1 단백질 50 ng을 SDS-PAGE를 행하였다. 막으로 이동시킨 후에, TIMP-1을 항-myc 항체에 의해 검출하였다.

도 4b는 TIMP-1의 엑소글리코시다아제 처리 후에 scFv-Fc의 결합을 ELISA에 의해 분석한 결과를 보여준다. 정제한 scFv-Fc (1-9F), MAb970 및 비오티닐화된 LPHA를 사용하여, 도 4a의 실험에서 사용하였던 TIMP-1 샘플들로 코팅된 각 마이크로타이터 웰에 대해 이들의 결합능에 대해 테스트하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0070] **실시예**

[0071] **실험 재료 및 방법**

[0072] **1. GnT-V 과발현 CHO 세포주의 개발**

[0073] 본 발명자들은 당단백질의 N-연결 β(1, 6) 가지의 첨가에 의한 변화를 구별할 수 있는 항체를 제조하고자 하였다. 이를 위해, 2개의 CHO 세포주, Lec4 및 Lec4(+)GnT-V를 사용하여 인간 TIMP-1의 2개의 상이한 당단백질형태를 제조하였다. Lec4 세포주는 GnT-V 활성이 없어 β(1,6) 가지를 생성할 수 없으며, GnT-V 고활성을 갖는 재조합 Lec4인 Lec4(+)GnT-V 세포주는 GnT-V 발현 벡터를 도입하여 구성하였다. 상기 2가지의 세포주내에서 발현되는 TIMP-1 단백질은 β(1,6) 가지 때문에 상이한 글리칸 조성과 구조를 가질 것으로 예측하였다.

[0074] GnT-V 활성이 결핍된 CHO 세포주인 Lec4 세포주는 10% FBS(fetal bovine serum, Invitrogen)을 함유하는 α-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양하였다. GnT-V 과발현 CHO 세포주를 얻기 위해서, GnT-V 발현 플라스미드, MGAT5/pCXN (14)를 Lipofectamine (Invitrogen)을 사용하여 Lec4 세포안으로 형질전환시키고, 형질전환체는 G418을 포함하는 배지내에서 선별하였다. 선별된 형질전환체(Lec4(+)GnT-V)내에서 GnT-V의 발현은 FACS를 사용한 세포표면상의 β(1-6) 가지의 함량을 분석하여 확인하였다.

[0075] 간략하게 설명하면, 세포들을 수집하고 PBS (phosphate buffered saline)으로 2회 세정한 후, PBA (1% BSA(bovine serum albumin)/0.01% sodium azide/PBS)으로 4℃ 에서 10분간 블로킹하였다. 비오티닐화된 LPHA (leukocytic phytohemagglutinin(Sigma) 및 FITC-컨쥬게이트된 NeutrAvidin (Pierce, Rockford, IL)을 염색을 위해 세포에 첨가하고, 염색된 세포는 유세포분석기 FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA)을 사용하여 분석하였다.

[0076] **2. 인간 TIMP-1의 발현 및 정제**

[0077] 인간 TIMP-1 cDNA를 발현 벡터 pcDNA3.1/myc-His (hygro) (Invitrogen)안으로 클로닝하였다. Lec4 세포 및 Lec4(+)GnT-V 세포를 Lipofectamine (Invitrogen)을 사용하여 플라스미드로 형질전환하였다. 안정한 클론을 200 μg/mℓ 하이그로마이신(Roche, Mannheim, Germany)을 함유하는 완전 배지를 사용하여 선별하고, TIMP-1 발현은 웨스턴 블로팅에 의해 확인하였다. 선별된 클론은 무혈청 배지(CHO-SFM, JBI, Korea)내에서 배양하였고, 배양 상등액을 His-태깅된 TIMP-1의 정제를 위해 코발트 친화 크로마토그래피에 적용하였다.

[0078] **3. Decoy 면역화 및 scFv 라이브러리 제조**

[0079] TIMP-1 당단백질의 2 가지의 다른 당화형태의 차이점을 인지하는 항체를 효과적으로 제조하기 위해, 본 발명자들은 인간배아줄기세포(hESCs, human embryonic stem cell)와 다른 인간 세포를 구분할 수 있는 항체를 제조하기 위해 성공적으로 적용된 방법, decoy 면역화 전략을 이용하였다(19, 20). Decoy 면역화시킨 후에, β(1, 6) 가지를 갖는 당화 형태에 특이적인 농후화된 B 세포 군집을 파아지-디스플레이 scFv 라이브러리 제조 및 스크리닝에 사용하였다.

[0080] 먼저, 6 주령 암컷 BALB/c 생쥐(Daehan Biolink Co., Umsong, Korea)를 실험에 사용하였고, 한국생명공학연구원(KRIBB)의 지침에 따라 다루었다. 생쥐를 Lec4(+)GnT-V 세포로부터 정제한 TIMP-1 단백질, TIMP1-B으로 오른쪽 발바닥 뒷쪽내에 0, 14, 및 28일에 각각 면역화시켰고, Lec4 세포로부터 정제한 TIMP-1 단백질인 TIMP1-L을 왼쪽 발바닥 뒤쪽에 -3, 0, 14, 및 28일에 각각 면역화시켰다. 31일 째에, 오른쪽 오금 림프절을 제거하였다. 림프구 현탁액을 준비하고 총 RNA 추출 후, cDNA 합성을 행하였다(21, 22). 생쥐의 중쇄 및 카파쇄(kappa chain) 가변영역(VH 및 VK)를 코딩하는 cDNA를 Ex Taq 중합효소(Takara, Shiga, Japan)와 VH 및 VK에 특이적인 축퇴 프라이머를 사용하여 PCR 증폭하였다(23).

[0081] 단축된 링커에 기반한 다가 scFv 파아지미드 라이브러리 포맷을 위해, 단일 잔기 링커를 VH 및 VK 사이에 도입하도록 디자인하였다(Ravn et al, 8). 간략하게 설명하면, *Bbs*I 자리를 포함하는 증폭된 VH 및 VK를 *Bbs*I으로 절단하고 라이게이션에 의해 결합시켰다. 조합된 레파토리를 *Sfi*I 자리를 포함하는 연장 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다. 증폭된 scFv 레파토리는 scFv 클로닝을 위한 *Sfi*I-*Sfi*I 자리 및 발현된 scFv 검출을 위한 myc 태그 서열을 Fab 서열을 제거한 후에 유전자 Ⅲ 서열의 업스트림에 도입하여, pComb3H-HA6 (21)으로부

터 유래된 파아지미드 벡터, pDR-D1안으로 최종적으로 클로닝하였다. 최종 컨스트럭트는 *E. coli* TG1 세포안으로 전기천공법에 의해 도입하였고, scFv 레파토리를 표현하는 박테리오파아지는 VCSM13 헬퍼파아지(Stratagene, La Jolla, CA)로 형질전환된 세포를 감염시켜 선별하였다.

[0082] **4. 라이브러리의 바이오패닝 및 스크리닝**

[0083] 마이크로타이터 웰(Nunc, Naperville, IL)을 4℃에서 200ng의 정제 TIMP1-L 또는 TIMP1-B 단백질로 하룻밤 코팅하고, PBS로 2회 세정한 후, SuperBlock T20 블로킹 완충액(Pierce)으로 블로킹하였다. 라이브러리 파아지(10^{12} colony forming unit)을 TIMP1-L으로 코팅된 웰내에서 37℃ 30분간 전(pre)-인큐베이션 하였다. 이어서, 차감된 파아지를 TIMP1-B으로 코팅된 웰내에서 37℃ 2 시간 동안 인큐베이션하였다. PBS 내의 0.05% Tween 20 (PBST)으로 세정한 후, 결합된 파아지를 0.1 M 글리신-HCl (pH 2.2)으로 용출시키고, 2 M Tris 염기로 중성화시켰다. 용출된 파아지는 TG1 세포에 감염시킨 후 헬퍼 파아지로 초-감염(super infection) 하여 증폭시켰다(24). 이어서, 증폭된 파아지는 추가 패닝(panning) 과정을 반복하였다. 개별 scFv 파아지 클론을 스크리닝하기 위해, 192개의 콜로니를 2차 패닝 이후에 출구 플레이트로부터 무작위로 선별하였다. 이들을 OD = 0.5 까지 배양한 후, scFv 파아지는 헬퍼 파아지로 초-감염 시켜 회수하였다. 회수한 파아지는 TIMP-1 코팅된 마이크로웰에 적용하였다. 파아지 결합은 호오스래디쉬 퍼옥시다아제(HRP)-컨쥬게이트된 항-M13 항체(GE healthcare)를 사용한 파아지 ELISA에 의해 검출하였다. 특이 결합능을 보여주는 클론은 DNA 염기서열 분석을 행하고, 결정된 뉴클레오타이드 서열은 IMGT/V-QUEST (http://imgt.cines.fr/vquest)을 이용하여 분석하였다.

[0084] **5. scFv-Fc의 발현 및 정제**

[0085] 선별된 scFv 파아지 클론의 특성을 추가적으로 분석하기 위해, 파아지미드 DNA로부터 *Sfi*I 절단한 scFv 서열을 scFv-Fv 발현 벡터, pDR-OriP-Fc1안으로 직접 클로닝하였다. 벡터는 인간 Fcγ1 서열과 scFV 클로닝 자리 및 oriP 서열이 뒤 따르는 힌지(hinge) 영역을 포함하도록 pcDNA3.1(Invitrogen)으로부터 변형하여 제작하였다(25). 생쥐 IgG의 카파쇄 및 pelB의 리더 서열들로 구성되는 하이브리드 시그널 펩타이드 서열은 파아지미드로부터 scFv 서열을 직접 클로닝하기 위한 *Sfi*I-*Sfi*I 자리의 업스트림에 포함시켰다(26). 생성된 scFv-Fv 발현 플라스미드는 제조자의 지시에 따라 Lipofectamine (Invitrogen)을 사용하여 293E 세포(CRL-10852, ATCC)안으로 도입하였다. 형질전환된 세포들을 10% FBS를 포함하는 DMEM (Invitrogen)내에서 80%의 컨플루언시에 도달할 때까지 성장시켰다. 이어서, 배지를 무혈청 배지로 교환하였고, 배양 상등액은 매 3일 마다 회수하였다. scFv-Fc의 정제를 위해, 배양 상등액을 단백질 G-세파로오스 컬럼(Amersham Pharmacia Biotech)상에서 친화성 크로마토그래피를 행하였다(21).

[0086] **6. 엑소글리코시다아제(exoglycosidase) 절단**

[0087] 상기 N-연결 β(1,6) 가지를 갖는 TIMP-1에 우선적인 결합능을 갖는 scFv 클론을 선별하고 scFv-Fv 포맷으로 전환시킨 후, TIMP-1을 엑소글리코시다아제(exoglycosidase)으로 처리하여 이의 결합에 대한 효과를 조사함으로써 이들의 결합 특이도에 대한 특성을 분석하였다.

[0088] 2 μg의 정제한 TIMP-1을 G6 반응 완충액(NEB; 50 mM of NaAcetate 및 5 mM의 $CaCl_2$, pH 5.5)내에서 10 mU의 뉴라미니다아제(NEB), 1 mU의 β(1-4)-갈락토시다아제, 혹은 1mU의 β-*N*-아세틸헥소사미니다아제(NEB)의 단독 혹은 이들과 함께 37℃에서 24 시간 동안 인큐베이션 하였다. 효소 처리는 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 확인하였다.

[0089] **7. 웨스턴 블롯 및 렉틴 블롯**

[0090] 정제 또는 엑소글루코시다아제 처리된 TIMP-1은 12% SDS-PAGE 환원젤내에서 전기영동을 행하였다. 막으로 이동시킨 후에, 막을 PBS내에서 4% BSA으로 블로킹하고, 항-myc 항체 또는 비오티닐화된 LPHA으로 인큐베이션하였다. PBST으로 세정한 후, 결합된 항체 및 LPHA는 HRP-컨쥬게이트된 항-생쥐 IgG (Fc specific, Pierce) 및 NeutrAvidin (Pierce)으로 각각 검출하였다.

[0091] **8. ELISA**

[0092] 마이크로타이터 웰을 BSA, fetuin (Sigma), 정제한 TIMP-1 또는 엑소글리코시다아제-처리된 TIMP-1으로 4℃에서 하룻밤 코팅하고, SuperBlock T20 블로킹 완충액(Pierce)으로 블로킹하였다. 플레이트는 PBST으로 각 단계 마다 4회 세정하였다. 모든 인큐베이션은 37℃에서 1-2 시간 동안 수행하였다. HRP-컨쥬게이트된 염소 항-인간 IgG (Fc-specific, Pierce), 항-생쥐 IgG (Fc specific, Pierce) 및 NeutrAvidin (Pierce)을 결합 ScFv-Fc, 생쥐 항-인간 TIMP-1 항체(MAB970, R&D systems) 및 비오티닐화된 LPHA를 각각 검출하는데 사용하였다. 색깔은 TMB 기질 반응제 세트(BD Biosciences, San Diego, CA)으로 전개시켰고, 흡광도는 microtiter reader (Emax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)을 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

[0093] **실험결과**

[0094] **1. N-연결 β(1,6) 가지를 갖는 또는 갖지 않는 TIMP-1의 발현**

[0095] N-연결 β(1,6) 가지를 갖거나 또는 갖지 않는 TIMP-1 단백질들을 얻기 위해서, TIMP-1 발현을 위한 2가지의 CHO 세포주를 사용하였다.

[0096] GnT-V 활성이 결여된 Lec4 세포주를 N-연결 β(1,6)이 없는 TIMP-1 (TIMP1-L)의 발현에 사용하였고, 상기 실험 방법에서 기술된 바와 같이 GnT-V 활성을 갖도록 제조된 재조합 Lec4 세포주, Lec4(+)GnT-V 세포주를 N-연결 β(1,6) 가지를 갖는 TIMP-1(TIMP1-B)의 발현에 사용하였다. 2가지 세포주는 세포 표면 N-연결 β(1,6) 가지를 체크하여 확인한 바와 같이 GnT-V 활성에서 상이하였다. FACS 분석을 통해 Lec4(+)GnT-V 세포주에서 세포 표면 N-연결 β(1,6) 가지가 존재한다는 것을 명확히 확인하였다(도 1a). 2가지 세포주에서 TIMP-1을 발현시켜 정제하고, SDS-PAGE에 의해 TIMP1-L 및 TIMP1-B에 대해 상이한 밴드 패턴이 나타남을 확인하였다. 즉, TIMP1-B는 TIMP1-L과 비교하였을 때 얼룩(smear) 형태의 밴드 패턴과 비교적 큰 분자량을 가짐을 나타내었는데(도 1b), 이는 TIMP1-B상에 추가적인 N-연결 β(1,6) 가지가 존재한다는 것을 나타낸다. 예상된 바와 같이, TIMP1-B상의 N-연결 β(1,6) 가지가 LPHA를 사용한 렉틴 블로팅에 의해 확인된 반면, TIMP1-L에 대해서는 이것이 확인되지 않았다(도 1c).

[0097]

[0098] **2. TIMP-1상의 글리칸 차이를 인지하는 항체의 제조**

[0099] 생쥐 면역 시스템을 사용하여 TIMP-1 단백질상에 글리칸 첨가에 의해 유도되는 구조적 변화를 인지하는 항체를 제조하였다. 상시 실험방법 및 재료에서 기재된 바와 같이, decoy 면역화 프로토콜에 따라, TIMP1-L을 decoy 면역원으로서 사용하여 TIMP1-B를 인지하는 B 세포 군집을 농후화하였다. VH 및 VL을 코딩하는 cDNA는 오른쪽 오금 림프절로부터 회수한 B 세포의 총 RNA로부터 합성하여, 파아지 디스플레이 벡터안으로 클로닝하여 2 X 10^9 클론의 scFV 라이브러리를 제조하였다. 라이브러리의 온전성을 검사하기 위해, 24개의 클론을 무작위로 선별하여 다양한 DNA 서열을 갖는 적절한 크기의 scFV 인서트를 포함한다는 것을 확인하였다. 파아지 라이브러리를 회수한 후에, 파아지-디스플레이된 scFv 라이브러리를 TIMP1-B에 대해서 4 차례 패닝(panning)하였다. 각 차례의 패닝에서는 TIMP1-L 결합체를 제거하기 위해 TIMP1-L에 대한 차감 패닝(subtraction panning)을 포함시켰다. 패닝 후의 농후화된 풀(pool)을 TIMP1-B 특이적인 개별 클론의 스크리닝에 사용하였다(도 2). 테스트한 192개의 클론 중에서, 20개의 클론이 TIMP1-B에 대해 선호적인 결합을 보여준 반면, 대부분의 클론은 TIMP1-L 및 TIMP1-B 모두에 결합하여 차이를 보여주지 못하였다. 상기 20개의 클론을 DNA 서열분석을 한 결과 7개의 특이적인 서열을 가지고 있음을 알아내었다(표 1).

표 1

[0100]

Clone	VH family	VH segment	Differences from germline (Nucleotides, Amino acids)[a]	HCDR3	VL family	VL segment	Differences from germline (Nucleotides, Amino acids)[a]	LCDR3
1-2H	mVH1	IGHV1-15	(4,3)	GNYEGY	mVK6	IGKV6-23	(3,2)	QQYSSYPYT
1-8D	mVH5	IGHV5-9-1	(6,4)	HYYGYVTY	mVK6	IGKV6-23	(4,3)	QQYSSYPLT
1-9F	mVH1	IGHV1-15-1	(6,3)	GGYLGY	mVK6	IGKV6-23	(9,7)	QQYSSYPLT
2-1A	mVH5	IGHV5-6-5	(8,4)	QDYGNYVG	mVK6	IGKV6-23	(4,1)	QQYSSYPLT
2-2E	mVH5	IGHV5-9-1	(12,7)	QDYGNYVG	mVK6	IGKV6-23	(4,2)	QQYSSYPLT
3-1D	mVH5	IGHV5-9-3	(6,2)	QDYGNYVG	mVK6	IGKV6-23	(1,0)	QQYSSYPLT
3-2E	mVH9	IGHV9-3-1	(7,3)	EGLRRVFLPAY	mVK1	IGKV1-110	(4,2)	SQSTHVPLT

[0101] [a]: CDR3를 제외한 V-유전자 세그먼트내에서의 뉴클레오타이드 및 아미노산의 차이. 뉴클레오타이드 서열은 IMGT/V-QUEST (http://imgt.cines.fr/vquest)를 사용하여 분석하였다.

[0102] 한편, 상기 7개의 클론들의 중쇄 및 경쇄의 가변영역(VH, VL)의 아미노산 서열은 다음과 같았다.

[0103] 클론 1-2H의 VH (서열목록 제43서열): EVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFT DYEMH WVKQTPVHGLEWIG TIDPETGGTAYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTR GNYEGY WGQGTTLTVSS

[0104] 클론 1-2H의 VL (서열목록 제44서열): DIVMTQSHKFMSPSVGDRVSITC KASQDVGSAVA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC QQYSSYPYT FGGGTKLELK

[0105] 클론 1-8D의 VH (서열목록 제45서열): EVKLMESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS NYTMS WVRQTPEKRLEWVA TISGGGGNTYYPDSVKG RFTISRDNAKNNLYLQMSSLRSEDTALYYCAI HYYGYVTY WGQGTLVTVSA

[0106] 클론 1-8D의 VL (서열목록 제46서열): DILLSQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVGTAVA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC QQYSSYPLT FGAGTKLELK

[0107] 클론 1-9F의 VH (서열목록 제47서열): EVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFT DYEMH WVKQTPVHGLEWIG VIDPETGGTAYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTR GGYLGY WGQGTLVTVSA

[0108] 클론 1-9F의 VL (서열목록 제48서열): SIVMTQTQKFMSTSVGDRVSVTC RASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC QQYSSYPLT FGAGTKLEIK

[0109] 클론 2-1A의 VH (서열목록 제49서열): EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS SYAMS WVRQTPEKRLEWVA TITGGGETYYPDSVKG RFTISRDNAKSTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTR QDYGNYVG WGQGTTLTVSS

[0110] 클론 2-1A의 VL (서열목록 제50서열): DIQMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVGTAVA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC QQYSSYPLT FGGGTKLELK

[0111] 클론 2-2E의 VH (서열목록 제51서열): DVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTYS SYAMS WVRQTPEKRLEWVA TISGGGSYTYYPDSVKG RFTISRDNAKNTLNLQMNSLRSEDTAIYYCTR QDYGNYVG WGQGTTVTVSS

[0112] 클론 2-2E의 VL (서열목록 제52서열): DILLTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVGTAVA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC QQYSSYPLT FGSGTKLELK

[0113] 클론 3-1D의 VH (서열목록 제53서열): EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS SHAMS WVRQTPEKRLEWVA TISSGGSYTYYPDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCAR QDYGNYVG WGQGTTLTVSS

[0114] 클론 3-1D의 VL (서열목록 제54서열): DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVGTAVA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC QQYSSYPLT FGSGTKLEIK

[0115] 클론 3-2E의 VH (서열목록 제55서열): QIQLAQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT NYGMN WVKQAPGKGLKWMG WINTYTGEPTYADDFKG RFAFSLETSATTAYLQINNLKNEDTATYFCVR EGLRRVFLPAY WGQGTLVTVSA

[0116] 클론 3-2E의 VL (서열목록 제56서열): DVFMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS QSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDRLSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC SQSTHVPLT FGAGTKLELK

[0117] **3. 항-TIMP-1 항체의 결합 특이도**

[0118] 항체 특이도를 정밀하게 분석하기 위해, 동물세포 발현 카세트 벡터인 pDR-OriP-Fc1을 사용하여 선별된 scFv 파아지 클론을 scFv-Fc 포맷으로 변환하였다. EBNA-1 (Epstein-Barr Virus nuclear antigen-1)을 발현하는 293E 세포안으로 형질전환시켰을 때, EBNA-1/OriP 시스템은 에피좀(episomal) 증폭과 형질전환된 에피좀 DNA의 유지를 매개하기 때문에 OriP을 갖는 벡터는 고수준의 일시적 발현이 가능하다(25, 27).

[0119] 클론된 scFv 서열을 갖는 벡터를 293E 세포에 형질전환하고, 형질전환된 세포를 주기적으로 배지를 교체하면서 9일간 무혈청 배지에 배양하였다.

[0120] 무혈청 배양 상등액 30㎖으로부터 평균적으로 약 200 μg의 정제된 scFv-Fc를 얻을 수 있었다. scFv-Fc의 순도는 환원조건하의 10% SDS-PAGE상에서 단일 55-kDa 밴드에 의해 확인하였다.

[0121] 정제한 scFv-Fc의 결합 활성을 간접 ELISA에 의해 측정하였다.

[0122] TIMP1-L 및 TIMP1-B 모두에 동등한 결합 활성을 보여주는 항-인간 TIMP-1 항체(MAB970, R&D systems)와는 다르게, scFv-Fc 모두는 TIMP1-L 보다는 TIMP1-B에 대해 더 높은 결합활성을 나타내었다(도 3). TIMP1-B에 대한 선호적 결합활성은 LPHA와 비견할만하였다. 그러나, 상기 항체들은 β(1,6) 가지화된 N-연결 글리칸을 갖는 것으로 알려진 혈청 당단백질 fetuin과는 결합하지 않았다. 이러한 사실은 LPHA의 결합과는 반대되는 것이었다. 이러한 사실은 아마도 상기 항체들의 에피토프가 글리칸 뿐만 아니라 TIMP-1 단백질의 특정 서열과 β(1,6) 가지화된 N-연결 글리칸 모두에 의해 구성되는 구조적 에피토프일 것을 암시하는 것이다. 클론들 중에서도 1-9F는 가장 강한 결합 활성을 보였으며, 이 항체를 사용하여 추가적인 특성을 분석하였다.

[0123] TIMP1-L 및 TIMP1-B에 대해 엑소글리코시다아제 처리한 후에 웨스턴 블로팅 분석 및 ELISA 분석을 통해, 1-9F의 결합 특이도를 조사하였고, 이를 LPHA의 결합 특이도와 비교하였다. 도 4a에서는 엑소글리코시다아제 처리 (뉴라미니다아제, 뉴라미니다아제 + 갈락토시다아제, 뉴라미니다아제 + 갈락토시다아제 + 헥소사미니다아제)에 의해 TIMP-1 단백질의 분자량이 단계적으로 감소하는 것을 보여준다.

[0124] 예상한 바와 같이, 양쪽의 TIMP-1 단백질상에서 코어 펜타-사카라이드 구조를 제외한 모든 올리코사카라이드를 제거할 것으로 예측되는 3개의 엑소글리코시다아제로 함께 TIMP1-L 및 TIMP1-B을 처리한 후에는 이들 단백질의 분자량은 동일한 것처럼 나타났다.

[0125] 대조군 항-인간 TIMP-1 항체와는 다르게, TIMP1-B에 대한 1-9F 및 LPHA의 결합활성은 엑소글리코시다아제 처리에 의해 영향을 받았다(도 4b). 1-9F의 TIMP1-B에 대한 결합은 뉴라미니다아제 처리에 의해 현저하게 감소되었으나, 다른 추가적인 효소 처리에 의해서는 크게 영향을 받지 않은 반면, 이의 TIMP1-L에 대한 결합은 효소 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 이는 1-9F의 TIMP1-B에 대한 결합에서, β(1,6) 가지상의 말단 시알산이 결정적인 역할을 한다는 것을 암시한다.

[0126] 그러나, LPHA의 결합은 뉴라미니다아제 처리만으로는 변화하지 않았으며, 추가적인 효소처리에 의해 결합이 단계적으로 감소하였는데, 이러한 결과는 이의 결합 특이성이 β(1,6) 연결된 N-아세틸글루코사민 및 갈락토오스를 인지한다는 것을 반영하는 것이다. 따라서, 1-9F는 β(1,6)가지, 구체적으로는 β(1,6) 가지상의 말단 시알산의 추가에 의해 유도되는 구조적 차이를 인지함으로써 TIMP-1의 두가지 당화형태를 구분할 수 있다.

[0127] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0128] **참고문헌**

[0129] [1] S. Hakomori, Tumor-associated carbohydrate antigens. Annu Rev Immunol 2 (1984) 103-26.

[0130] [2] S. Masutani, N. Miyazawa, S. Fujii, A. Nishikawa, H. Matsukawa, T. Shimano, T. Mori, and N. Taniguchi, Preparation and characterization of monoclonal antibodies to an N-linked oligosaccharide. Anal Biochem 188 (1990) 149-54.

[0131] [3] E. Kaltgrad, S. Sen Gupta, S. Punna, C.Y. Huang, A. Chang, C.H. Wong, M.G. Finn, and O. Blixt, Anti-carbohydrate antibodies elicited by polyvalent display on a viral scaffold. Chembiochem 8 (2007) 1455-62.

[0132] [4] G. Srikrishna, N.M. Varki, P.C. Newell, A. Varki, and H.H. Freeze, An IgG monoclonal antibody against Dictyostelium discoideum glycoproteins specifically recognizes Fucalpha1,6GlcNAcbeta in the core of N-linked glycans. Localized expression of core-fucosylated glycoconjugates in human tissues. J Biol Chem 272 (1997) 25743-52.

[0133] [5] D.R. Bundle, M.A. Gidney, N. Kassam, and A.F. Rahman, Hybridomas specific for carbohydrates; synthetic human blood group antigens for the production, selection, and characterization of monoclonal typing reagents. J Immunol 129 (1982) 678-2.

[0134] [6] S. Mao, C. Gao, C.H. Lo, P. Wirsching, C.H. Wong, and K.D. Janda, Phage-display library selection of high-affinity human single-chain antibodies to tumor-associated carbohydrate antigens sialyl Lewisx and Lewisx. Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999) 6953-8.

[0135] [7] K.J. Lee, S. Mao, C. Sun, C. Gao, O. Blixt, S. Arrues, L.G. Hom, G.F. Kaufmann, T.Z. Hoffman, A.R. Coyle, J. Paulson, B. Felding-Habermann, and K.D. Janda, Phage-display selection of a human single-chain fv antibody highly specific for melanoma and breast cancer cells using a chemoenzymatically synthesized G(M3)-carbohydrate antigen. J Am Chem Soc 124 (2002) 12439-46.

[0136] [8] P. Ravn, A. Danielczyk, K.B. Jensen, P. Kristensen, P.A. Christensen, M. Larsen, U. Karsten, and S. Goletz, Multivalent scFv display of phagemid repertoires for the selection of carbohydrate-specific antibodies and its application to the Thomsen-Friedenreich antigen. J Mol Biol 343 (2004) 985-96.

[0137] [9] K. Sakai, Y. Shimizu, T. Chiba, A. Matsumoto-Takasaki, Y. Kusada, W. Zhang, M. Nakata, N. Kojima, K. Toma, A. Takayanagi, N. Shimizu, and Y. Fujita-Yamaguchi, Isolation and characterization of phage-displayed single chain antibodies recognizing nonreducing terminal mannose residues. 1. A new strategy for generation of anti-carbohydrate antibodies. Biochemistry 46 (2007) 253-62.

[0138] [10] S. Schoonbroodt, M. Steukers, M. Viswanathan, N. Frans, M. Timmermans, A. Wehnert, M. Nguyen, R.C. Ladner, and R.M. Hoet, Engineering antibody heavy chain CDR3 to create a phage display Fab library rich in antibodies that bind charged carbohydrates. J Immunol 181 (2008) 6213-21.

[0139] [11] J.W. Dennis, S. Laferte, C. Waghorne, M.L. Breitman, and R.S. Kerbel, Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. Science 236 (1987) 582-5.

[0140] [12] Y.J. Kim, and A. Varki, Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. Glycoconj J 14 (1997) 569-76.

[0141] [13] D.H. Dube, and C.R. Bertozzi, Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. Nat Rev Drug Discov 4 (2005) 477-88.

[0142] [14] Y.S. Kim, S.Y. Hwang, H.Y. Kang, H. Sohn, S. Oh, J.Y. Kim, J.S. Yoo, Y.H. Kim, C.H. Kim, J.H. Jeon, J.M. Lee, H.A. Kang, E. Miyoshi, N. Taniguchi, H.S. Yoo, and J.H. Ko, Functional proteomics study reveals that N-Acetylglucosaminyltransferase V reinforces the invasive/metastatic potential of colon cancer through aberrant glycosylation on tissue inhibitor of metalloproteinase-1. Mol Cell Proteomics 7 (2008) 1-14.

[0143] [15] S. Ihara, E. Miyoshi, J.H. Ko, K. Murata, S. Nakahara, K. Honke, R.B. Dickson, C.Y. Lin, and N. Taniguchi, Prometastatic effect of N-acetylglucosaminyltransferase V is due to modification and stabilization of active matriptase by adding beta 1-6 GlcNAc branching. J Biol Chem 277 (2002) 16960-

7.

[0144] [16] H.B. Guo, I. Lee, M. Kamar, S.K. Akiyama, and M. Pierce, Aberrant N-glycosylation of beta1 integrin causes reduced alpha5beta1 integrin clustering and stimulates cell migration. Cancer Res 62 (2002) 6837-45.

[0145] [17] H.B. Guo, I. Lee, M. Kamar, and M. Pierce, N-acetylglucosaminyltransferase V expression levels regulate cadherin-associated homotypic cell-cell adhesion and intracellular signaling pathways. J Biol Chem 278 (2003) 52412-24.

[0146] [18] W. Chaney, S. Sundaram, N. Friedman, and P. Stanley, The Lec4A CHO glycosylation mutant arises from miscompartmentalization of a Golgi glycosyltransferase. J Cell Biol 109 (1989) 2089-96.

[0147] [19] A.H. Yin, S. Miraglia, E.D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A.G. Leary, J. Olweus, J. Kearney, and D.W. Buck, AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 90 (1997) 5002-12.

[0148] [20] H.S. Choi, H. Kim, A. Won, J.J. Kim, C.Y. Son, K.S. Kim, J.H. Ko, M.Y. Lee, C.H. Kim, and C.J. Ryu, Development of a decoy immunization strategy to identify cell-surface molecules expressed on undifferentiated human embryonic stem cells. Cell Tissue Res 333 (2008) 197-206.

[0149] [21] S.J. Kim, M.H. Jang, J.T. Stapleton, S.O. Yoon, K.S. Kim, E.S. Jeon, and H.J. Hong, Neutralizing human monoclonal antibodies to hepatitis A virus recovered by phage display. Virology 318 (2004) 598-607.

[0150] [22] S.J. Kim, M.H. Jang, H.J. Ahn, J.H. Kim, J.H. Lim, C.J. Ryu, N.K. Lim, K.S. Kim, M.J. Park, I. Park, and H.J. Hong, Selection of an affinity-matured antibody against a defined epitope by phage display of an immune antibody library. J Immunol Methods 329 (2008) 176-83.

[0151] [23] Z. Wang, M. Raifu, M. Howard, L. Smith, D. Hansen, R. Goldsby, and D. Ratner, Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. J Immunol Methods 233 (2000) 167-77.

[0152] [24] J.D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths, and G. Winter, By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol 222 (1991) 581-97.

[0153] [25] G. Berntzen, E. Lunde, M. Flobakk, J.T. Andersen, V. Lauvrak, and I. Sandlie, Prolonged and increased expression of soluble Fc receptors, IgG and a TCR-Ig fusion protein by transiently transfected adherent 293E cells. J Immunol Methods 298 (2005) 93-104.

[0154] [26] P. Valadon, J.D. Garnett, J.E. Testa, M. Bauerle, P. Oh, and J.E. Schnitzer, Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006) 407-12.

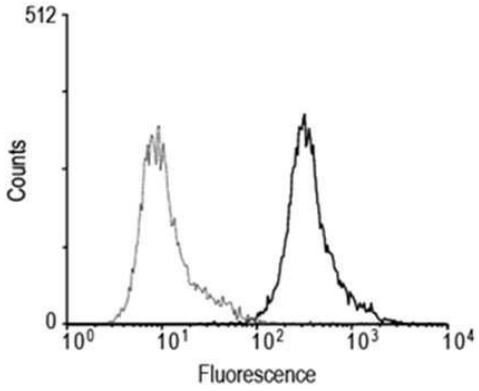
[0155] [27] J.L. Yates, N. Warren, and B. Sugden, Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. Nature 313 (1985) 812-5.

[0156] [28] R.D. Cummings, and S. Kornfeld, The distribution of repeating [Gal beta 1,4GlcNAc beta 1,3] sequences in asparagine-linked oligosaccharides of the mouse lymphoma cell lines BW5147 and PHAR 2.1. J Biol Chem 259 (1984) 6253-60.

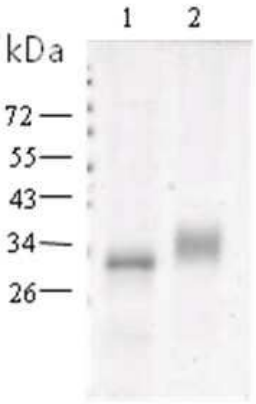
[0157] [29] M.J. Elices, and I.J. Goldstein, Initiation of poly-N-acetyllactosamine chain biosynthesis occurs preferentially on complex multiantennary asparagine-linked oligosaccharides. Carbohydr Res 203 (1990) 109-18.

도면

도면1a

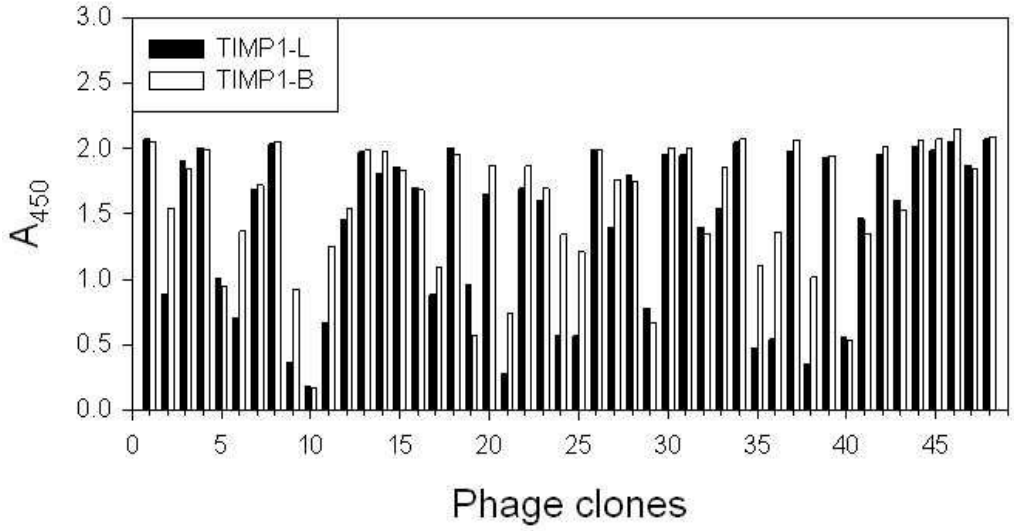


도면1b

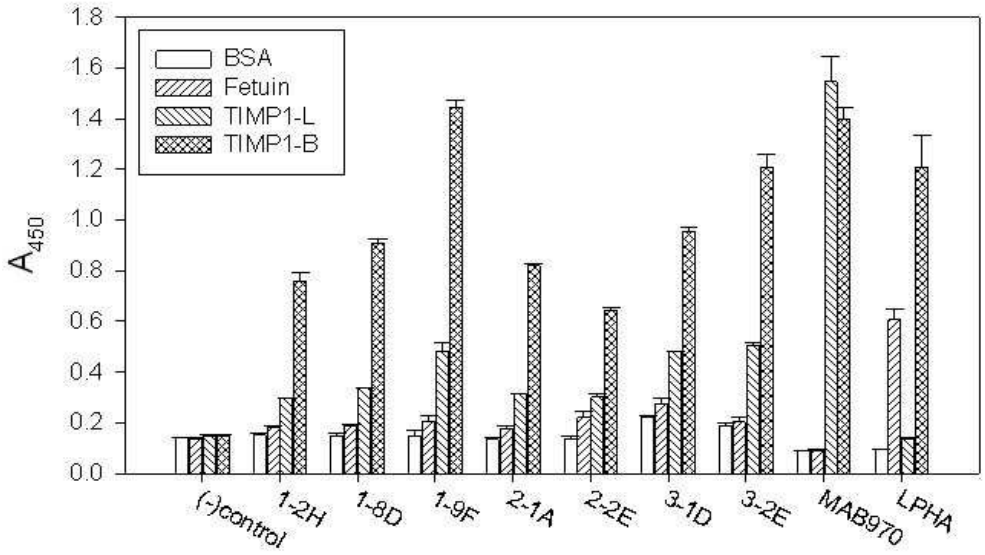


도면1c

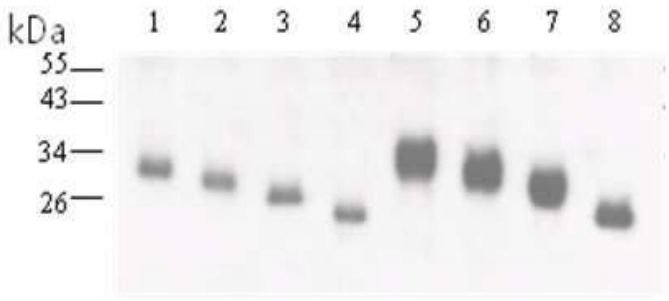
도면2


TIMP1-L
TIMP1-B
A450
Phage clones

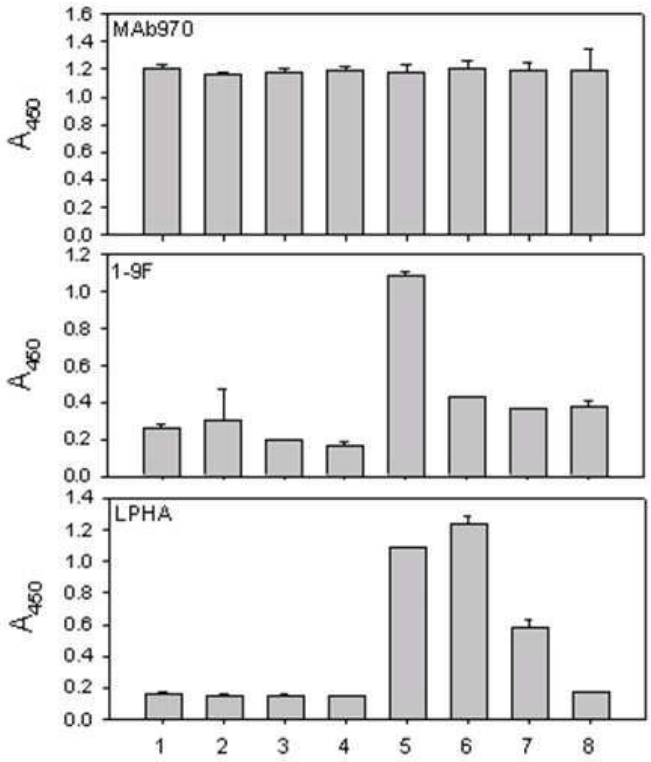
도면3


BSA
Fetuin
TIMP1-L
TIMP1-B
A450
(-)control
1-2H
1-8D
1-9F
2-1A
2-2E
3-1D
3-2E
MAB970
LPHA

도면4a


kDa
1 2 3 4 5 6 7 8
55
43
34
26

도면4b



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부