

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 9월 14일 (14.09.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/155355 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002631
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 10일 (10.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0028809 2016년 3월 10일 (10.03.2016) KR
- (71) 출원인: 제단법인 의약바이오컨버전스연구단 (MEDICINAL BIOCONVERGENCE RESEARCH CENTER) [KR/KR]; 16229 경기 수원시 영통구 광교로 145, 차세대융합기술연구원내 B동 8층 (이의동), Gyeonggi-do (KR). 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION); 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김성훈 (KIM, Sunghoon); 06269 서울특별시 강남구 남부순환로 365길 42, 4동 1005호 (도곡동, 도곡한신아파트), Seoul (KR). 성준식 (SUNG, Junsik); 06059 서울특별시 강남구 선릉로 131길 22-4, Seoul (KR). 권남훈 (KWON, Nam Hoon); 07007 서울특별시 동작구 사당로 29나길 3-4, 2층 (사당동), Seoul (KR). 심현보 (SHIM, Hyunbo); 06007 서울특별시 강남구 압

구정로 321, 3동 1206호 (압구정동, 한양아파트), Seoul (KR). 웬티 투하 (NGUYEN THI, Thu ha); 04108 서울특별시 마포구 신촌로 24길 40, 101호 (노고산동), Seoul (KR).

(74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS빌딩) 시원국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

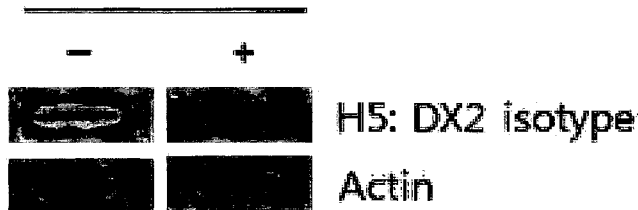
[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO AIMP2-DX2 PROTEIN

(54) 발명의 명칭 : AIMP2-DX2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체

[도 1A]

Epitope peptide (100 µg/ml)



(57) Abstract: The present invention relates to an antibody specifically binding to AIMP2-DX2 protein and, more particularly, to an antibody specifically binding to AIMP2-DX2 which recognizes, as an epitope, a polypeptide comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID.: 1, or a fragment of the antibody, a composition for diagnosing a cancer comprising the same, and a polynucleotide and recombinant expression vector encoding the antibody, a transformed cell using the same, and a method for preparing the antibody or the fragment of the antibody. Since the antibody according to the present invention does not react with a wild-type AIMP2 protein and specifically binds to an exon2-deleted AIMP2-DX2 mutant protein, the antibody can be effectively used to confirm the presence and expression level of AIMP2-DX2 protein. AIMP2-DX2 protein is associated with pathologies, such as cancer and inflammatory diseases, etc., and is particularly overexpressed in cancer diseases, such as lung cancer, breast cancer and colorectal cancer. Therefore, the present invention can be used for developing a cancer diagnostic composition which detects AIMP2-DX2 for cancer occurrence and progression and as a biomarker.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/155355 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 AIMP2-DX2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 '서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 항원결정부(epitope)로 인식하는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 단편, 이를 포함하는 암 진단용 조성물, 그리고 상기 항체를 암표화하는 폴리뉴클레오티드와 재조합 발현벡터, 이를 이용하여 형질전환된 세포 및 상기 항체 또는 항체의 단편을 제조하는 방법에 대한 것이다. 본 발명에 따른 항체는 야생형 AIMP2 단백질에는 반응하지 않고 exon2가 결손된 AIMP2-DX2 돌연변이 단백질에 특이적으로 결합하기 때문에 AIMP2-DX2 단백질의 존재와 발현 정도를 확인하는데 유용하게 이용될 수 있다. AIMP2-DX2 단백질은 암과 염증성 질환 등의 병리에 연관되어 있으며, 특히 폐암, 유방암, 대장암 등 암질환에서 과발현되어 있으므로, AIMP2-DX2를 암 발생과 진행과 바이오마커로 감지하는 암 진단용 조성물을 개발하는데 이용될 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

AIMP2-DX2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체

【기술분야】

본 출원은 2016년 3월 10일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2016-0028809호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

본 발명은 AIMP2-DX2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 항원결정부(epitope)로 인식하는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 단편, 이를 포함하는 암 진단용 조성물, 그리고 상기 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 재조합 발현벡터, 이를 이용하여 형질전환된 세포 및 상기 항체 또는 항체의 단편을 제조하는 방법에 대한 것이다.

【배경기술】

AIMP2(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2)는 아미노아실-tRNA 합성효소(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS) 복합체의 형성에 관련된 단백질 중의 하나이다. AIMP2는 단백질 합성에서의 본원적인 기능 외에도, 신규한 암 억제자(tumor suppressor)로서 Smad2/3와의 직접적인 상호작용을 통하여 TGF- β 의 신호전달을 강화시키는 기능이 있음이 알려져 있다.

본 발명자에 의한 대한민국 등록특허 제10-0762995호에 공지된 바와 같이, 폐암, 간암, 피부암, 유방암, 신장암, 골육종 등 다양한 암 세포주 및 조직에서는 AIMP2의 엑손(exon)2가 결손된 형태의 변이체인 AIMP2-DX2가 과발현되는 것이 관찰되었다. 한편, 정상 세포를 형질전환하여 AIMP2-DX2를 과발현되도록 하면, 야생형(WT) AIMP2의 수준이 크게 감소하며, AIMP2가 핵으로 이동하는 것을 막는 등 AIMP2의 활성이 억제되며, c-myc의 발현은 증가하고, 세포 성장은 촉진되는 등 TGF- β 신호의 기능 이상을 초래하는 것으로 나타났다. 이는 AIMP2-DX2와 암 발생과 진행 사이에 밀접한 관련성이 있음을 보여주는 것이다.

또한 본 발명자의 다른 대한민국 등록특허 제10-1067816호에서는 AIMP2가 TRAF2와의 상호작용을 통하여 TNF- α 의 세포사멸 활성(apoptotic activity)을 매개하며, 이 활성은 AIMP2-DX2에 의해 조절된다는 것을 처음으로 공개하였다. 아울러

AIMP2-DX2는 염증 마커인 COX-2의 발현에도 영향을 미친다는 점을 규명하여, AIMP2-DX2의 활성을 억제함으로써 염증성 질환의 치료 효과를 낼 수 있음을 제시하였다.

이와 같이 AIMP2-DX2 단백질이 다양한 질환의 유발과 진행에 연관되어 있음이 밝혀짐에 따라 AIMP2-DX2가 신약 개발의 새로운 표적 물질로 대두되고 있다. 따라서, 돌연변이체인 AIMP2-DX2 단백질을 야생형 AIMP2와 구별하여 정확하게 감지할 수 있는 시약과 진단 방법에 대한 기술 개발이 필요한 실정이다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

이에 본 발명자들은 인간의 AIMP2-DX2에서 exon2가 결손된 부위인 exon1과 exon3의 접합 부분(junction)에 대하여 Fab 파지 라이브러리(phage library)를 스크리닝함으로써 야생형 AIMP2에는 결합하지 않고 AIMP2-DX2에만 특이적으로 결합하는 항체를 선별하여 본 발명을 완성하였다.

따라서 본 발명의 목적은

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 항원결정부(epitope)로 인식하는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 단편을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은

상기 항체 또는 항체의 단편을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은

상기 항체 또는 항체의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은

상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은

상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 세포를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은

(a) 상기 항체 또는 항체의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현벡터로 숙주 세포를 형질전환하는 단계;

(b) 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 항체 또는 항체의 단편을 생산하는 단계; 및

(c) 숙주 세포에서 생산된 항체 또는 항체의 단편을 수득하는 단계를 포함하는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그 단편을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은

암 진단용 제제를 제조하기 위한 상기 항체 또는 항체의 단편의 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은

(a) 개체로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계;

(b) 상기 항체 또는 항체의 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 AIMP2-DX2 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 AIMP2-DX2 단백질 수준을 정상개체의 AIMP2-DX2 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 개체의 암 진단 방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 항원결정부(epitope)로 인식하는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 단편을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

상기 항체 또는 항체의 단편을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

상기 항체 또는 항체의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

(a) 상기 항체 또는 항체의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는
재조합 발현벡터로 숙주 세포를 형질전환하는 단계;

(b) 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 항체 또는 항체의 단편을 생산하는 단
계; 및

(c) 숙주 세포에서 생산된 항체 또는 항체의 단편을 수득하는 단계를 포함하
는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그 단편을 제조하는 방법을 제공한
다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
암 진단용 제제를 제조하기 위한 상기 항체 또는 항체의 단편의 용도를 제공
한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

(a) 개체로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계;

(b) 상기 항체 또는 항체의 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 AIMP2-
DX2 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 AIMP2-DX2 단백질 수준을 정상개체의 AIMP2-DX2 단백질 수준과 비
교하는 단계를 포함하는 개체의 암 진단 방법을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를
항원결정부(epitope)로 인식하는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체

의 단편을 제공한다.

본 발명에서 'AIMP2-DX2'는 야생형(wild type, WT) AIMP2 단백질에서 엑손(exon)2의 영역이 결실된 변이체를 의미한다. 상기 AIMP2(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2) 단백질은 아미노아실-티알엔에이 합성효소(aminoacyl-tRNA synthetase)를 포함하는 복합체의 형성에 관련된 단백질 중의 하나로, p38, JTV-1, JTV1 또는 p38/JTV-1 등으로 불리기도 하며, 인간에서는 7번 염색체 상(7p22)의 *AIMP2* 유전자에 암호화되어 있다. AIMP2 단백질은 312 또는 320개의 아미노산(aa)으로 이루어진 단백질로 발견되며, 312aa 단백질의 아미노산 서열은 Genbank accession number AAC50391.1 또는 GI:1215669, 320aa 단백질의 아미노산 서열은 Genbank accession number AAH13630.1 또는 GI:15489023 등으로 공지되어 있으며, 문헌에도 기재되어 있다(312aa version: Nicolaides, N. C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene, *Genomics* 29(2), 329-334 (1995); 320aa version: Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(26), 16899-16903 (2002)).

따라서 본 발명에서 AIMP2-DX2 단백질은 상기 312aa 또는 320aa의 AIMP2 단백질에서 exon2에 해당하는 아미노산 서열이 결실된 변이체 단백질을 의미한다. 상기 AIMP2-DX2 단백질은 전체 서열의 AIMP2에서 exon2의 영역이 결실된 단백질, 그리고 AIMP2 단백질의 등가물(아미노산 서열의 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의한 변형체로 AIMP2과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 등가물, 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가하나 AIMP2과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 유도체)에서 exon2의 영역이 결실된 단백질을 포함한다. 또한 AIMP2-DX2 단백질은 AIMP2 단백질의 exon2의 아미노산 서열이 모두 결실되거나, exon2의 아미노산 서열의 일부가 결실되어 AIMP2에서 exon1과 exon3에 해당하는 아미노산 서열이 본 발명에 따른 항체에 의하여 인식될 수 있을 정도로 가깝게 위치하게 된 단백질을 의미하며, 나아가 exon1, exon3, 및/또는 exon4 영역의 일부가 결실된 단백질도 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에서의 AIMP2-DX2 단백질은 AIMP2 단백질의 exon2 영역이 모두 결실된 단백질, 즉 exon2에 의해 암호화되는 69개의 아미노산이 모두 결실되어 AIMP2의 exon1의 마지막 아미노산과 exon3의 첫 번

체 아미노산이 연결되어 있는 단백질이다.

본 발명에서 ‘항체(antibody)’는 면역글로불린(immunoglobulin, Ig)이라고도 불리며, 항원에 선택적으로 작용하여 생체 면역에 관여하는 단백질의 총칭이다. 자연에서 발견되는 전체 항체(whole antibody)는 일반적으로 여러 도메인으로 이루어진 폴리펩티드인 경쇄(light chain, LC) 및 중쇄(heavy chain, HC)의 2개 쌍으로 이루어지거나, 이들 HC/LC의 2개의 쌍으로 된 구조를 기본 단위로 구성된다. 포유류의 항체를 구성하는 중쇄의 종류는 그리스 문자 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 표시되는 5가지 유형이 있으며, 중쇄의 종류에 따라 각각 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 등 다른 종류의 항체를 구성하게 된다. 포유류의 항체를 구성하는 경쇄의 종류는 λ 및 κ 로 표시되는 2가지 종류가 존재한다.

항체의 중쇄와 경쇄는 구조적으로 아미노산 서열의 가변성에 따라 가변영역과 불변영역으로 구분된다. 중쇄의 불변영역은 항체의 종류에 따라 CH1, CH2 및 CH3(IgA, IgD 및 IgG 항체) 및 CH4(IgE 및 IgM 항체) 등 3 또는 4개의 중쇄불변영역으로 구성되어 있으며, 경쇄는 1개의 불변영역인 CL으로 구성되어 있다. 중쇄와 경쇄의 가변영역은 각각 중쇄가변영역(VH) 또는 경쇄가변영역(VL)의 하나의 도메인으로 이루어져 있다. 경쇄와 중쇄는 각각의 가변영역과 불변영역이 나란히 정렬되어 1개의 공유 이황결합(disulfide bond)에 의해 연결되고, 경쇄와 결합한 두 분자의 중쇄는 2개의 공유 이황결합을 통해 연결되어 전체 항체의 형태를 형성한다. 전체 항체는 중쇄 및 경쇄의 가변영역을 통해 항원에 특이적으로 결합하며, 전체 항체는 2개의 중쇄 및 경쇄의 쌍(HC/LC)으로 구성되어 있으므로, 한 분자의 전체 항체는 두 개의 가변영역을 통해 동일한 두 개의 항원에 결합하는 2가의 단일특이성을 갖게 된다. 항원에 결합하는 항체 가변영역을 항체의 항원결합부위(antigen-binding site)라고 하고, 항원의 표면에서 항체에 의해 인식되는 부분을 항원결정부(epitope)라고 한다.

항원결합부위(antigen-binding site)를 포함하고 있는 항체의 가변영역은 서열 가변성이 적은 골격 부위(framework region, FR)와 서열 가변성이 높은 과가변성 부위(hypervariable region)인 상보성 결정부위(complementary determining region, CDR)로 세분된다. VH와 VL은 각각 3개의 CDR 및 4개의 FR이 N-말단부터 C-말단의 방향으로 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 순서로 배열되어 있다. 항체의 가변영역 안에서도 서열 가변성이 가장 높은 CDR이 항원과 직접 결합하는 부위로, 항체의 항원특이성에 가장 중요하다.

본 발명에 따른 항체는 AIMP2-DX2 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 단편으로서, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 항원결정부(epitope)로 인식하는 것을 특징으로 한다. 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열(이하 본 명세서에서는 AIMP2-DX2 항원 펩티드로 지칭함)은 AIMP2 단백질에서 exon2가 전부 결실된 AIMP2-DX2 단백질에서 exon1과 exon3가 접합된 부위의 11개의 아미노산의 서열로서, 아미노산 서열로는 GHVQDYGALKD이다. N-말단의 서열 GHVQ는 exon1에 해당하며, C-말단의 서열 DYGALKD는 exon3에 해당한다(도 1의 B 참고). 서열번호 1의 아미노산 서열은 exon2가 결손되지 않은 야생형의 AIMP2 단백질에는 존재하지 않으므로, 서열번호 1을 항원결정부로 인식하는 항체 또는 항체의 단편은 야생형 AIMP2 단백질에는 결합하지 않고, AIMP2-DX2 변이체 단백질에만 특이적으로 결합하는 항체 또는 그 단편임을 알 수 있다.

본 발명자들은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 항원결정부(epitope)로 인식하여 AIMP2-DX2 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 개발하기 위하여 파지 표시(phage-displayed) Fab 라이브러리를 스크리닝하였다. 간략하게, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 운반체 단백질을 접합하기 위한 시스테인(Cys) 아미노산을 C-말단에 추가하고, 운반체 단백질인 키홀 림펫 헤모시아닌을 접합하여 토끼에 주입하여 면역반응을 유도하였다. 면역반응을 일으킨 토끼의 비장에서 추출한 mRNA로부터 토끼 항체의 가변영역에 해당하는 cDNA를 합성하고, 인간 Fab의 항체 불변영역을 암호화하는 DNA를 연결하여 파지 디스플레이에 사용되는 pComb3XTT 벡터에 삽입하였다. 상기 토끼/인간의 키메라 Fab를 암호화하는 벡터를 대장균(ER2537)에 형질전환하고, 헬퍼 파지(helper phage)로 감염시켜 제작한 Fab 라이브러리를 AIMP2-DX2 단백질에 대하여 패닝하여 AIMP2-DX2 단백질에 결합하는 클론을 선별하였다.

본 발명자들은 항원 흡착(antigen preadsorption), siRNA를 이용한 항원 발현 억제 등의 실험을 통하여 상기 Fab 라이브러리 스크리닝에서 선별된 H5 항체와 항체의 단편(Fab)이 AIMP2-DX2 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다. H5 항체와 AIMP2-DX2 변이체 간의 결합은 AIMP2-DX2 변이체 단백질의 용해성에 영향을 미치는 N-말단 아미노산 결손 형태에도 영향을 받지 않는다. 특히 본 발명에 따른 항체는 야생형의 AIMP2 단백질에는 전혀 결합하지 않고, AIMP2-DX2 단백질에만 결합하여, AIMP2-DX2 변이체 단백질을 선별적으로 감지하는데 매우 효과적이

다.

본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편은 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정부위(CDR)1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편은 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정부위(CDR)1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄가변영역으로 구성되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

또한 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편은 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정부위(CDR)1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄가변영역으로 필수적으로 구성되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

또한 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편은 상기한 중쇄와 경쇄의 CDR의 구성을 포함하면서, 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역(VH); 및 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역(VL)을 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

또한 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편은 상기한 중쇄와 경쇄의 CDR의 구성을 포함하면서, 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역(VH); 및 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역(VL)으

로 구성되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

또한 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편은 상기한 중쇄와 경쇄의 CDR의 구성을 포함하면서, 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역(VH); 및 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역(VL)으로 필수적으로 구성되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

상기 본 발명에 따른 항체는 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체일 수 있다.

또한 본 발명에 따른 항체는 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄로 구성되는 것을 특징으로 하는 항체일 수 있다.

또한 본 발명에 따른 항체는 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄로 필수적으로 구성되는 것을 특징으로 하는 항체일 수 있다.

본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편은 상기한 CDR, VH와 VL, 또는 경쇄와 중쇄의 구성을 갖는 것이라면 그 종류에 제한이 없으며, 항체는 IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD 형태의 항체일 수 있다. 바람직하게는 IgG 형태의 항체일 수 있다.

또한 본 발명에서 항체의 단편은 AIMP2-DX2 항원에 특이적인 결합력을 유지하고 있는 항체의 단편을 의미하며, 구체적으로는 Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, Fv, 디아바디(diabody), scFv 등의 형태일 수 있다. Fab(fragment antigen-binding)는 항체의 항원 결합 단편으로, 중쇄와 경쇄 각각의 하나의 가변영역과 불변영역으로 구성되어 있다. F(ab')₂는 항체를 펩신으로 가수분해시켜서 생성되는 단편으로, 두 개의 Fab가 중쇄 경첩(hinge)에서 이황결합(disulfide bond)으로 연결된 형태를 하고 있다. F(ab')는 F(ab')₂ 단편의 이황결합을 환원하여 분리시킨 Fab에 중쇄 경첩이 부가된 형태의 단량체 항체 단편이다. Fv(variable fragment)는 중쇄와 경쇄 각각의 가변영역으로만 구성된 항체 단편이다. scFv(single chain variable fragment)는 VH와 VL이 유연한 펩티드 링커로 연결되어 있는 재조합 항체 단편이다. 디아바디(diabody)는 scFv의 VH와 VL가 매우 짧은 링커로 연결되어 서로 결합하지 못하고, 동일한 형태의 다른 scFv의 VL와 VH와 각각 결합하여 이량체를 형성하고 있는 형태의 단편을 의미한다.

또한 본 발명에 따른 항체는 단일한 B 세포에서 유래하는 단일클론(monoclonal) 항체일 수도 있고, 복수의 B 세포에서 유래하는 다클론(polyclonal) 항체일 수도 있으며, 항체의 중쇄와 경쇄의 아미노산 서열이 실질적으로 동일한 항체의 집단인 단일클론 항체인 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편은 인간을 포함하는 포유동물, 조류 등을 포함한 임의의 동물에서 유래한 것일 수 있으며, 상이한 종의 항체 서열을 함께 가지고 있는 키메라(chimera) 항체 또는 항체의 단편일 수 있다. 본 발명의 항체 또는 그 단편은 효소, 형광 물질, 방사선 물질 및 단백질 등과 접합된 것일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

또한 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

AIMP2-DX2 변이체 단백질은 여러 종류의 암에서 과발현되어 있으며, 암의 발생과 진행에 밀접하게 연관되어 있음이 알려져 있다. 본 발명자들이 밝힌 바에 따르면(대한민국 등록특허 제10-0762995호), 폐암, 간암, 피부암, 유방암, 신장암, 골육종 등 다양한 종류의 암 세포주 및 암 조직에서는 AIMP2-DX2가 특이적으로 과발현된다. AIMP2-DX2가 과발현되면 암 억제자(tumor suppressor)의 기능을 가지고 있는 야생형 AIMP2의 수준이 극적으로 감소하며, 핵으로의 이동이 억제되는 등 활성이 떨어진다. 또한 과발현된 AIMP2-DX2는 c-myc의 발현을 증가시키고 AIMP2가 핵으로 이동하는 것을 막으며, TGF- β 신호의 기능 이상을 초래하는 등, AIMP2-DX2의 발현 수준과 암 발생과 진행 사이에 밀접한 관련성이 있다. 따라서 AIMP2-DX2의 이상 발현 또는 이상 과발현을 감지함으로써 암을 진단할 수 있음을 알 수 있다.

본 발명에 따른 암 진단용 조성물은 AIMP2-DX2를 이상 발현 또는 과발현하는 암이라면 제한 없이 진단 대상이 될 수 있다. 예를 들어, 결장암, 대장암, 폐암, 간암, 위암, 식도암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 자궁내막암, 유모암, 난소암, 유방암, 갑상선암, 뇌암, 두경부암, 악성흑색종, 림프종, 재생불량성 빈혈 또는 혈액암 등을 진단 대상으로 할 수 있으며, 바람직하게는 유방암, 대장암, 결장암, 폐암, 간암, 피부암, 신장암, 골육종 등을 진단하는데 이용될 수 있다. 또한 본 발명에 따른 암 진단용 조성물은 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편 외에, 2차 항체, 2차 항체의 발색 반응을 위한 기질, 보조

인자 등 항체로 단백질을 감지하기 위하여 통상적으로 사용되는 요소들을 추가로 포함할 수 있다.

또한 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

구체적으로 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 따른 항체의 중쇄가변영역을 암호화하는 서열번호 16 또는 경쇄가변영역을 암호화하는 서열번호 18로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

또한 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

본 발명에서 ‘재조합(recombinant)’은 ‘유전자 조작(genetic manipulation)’과 호환하여 사용될 수 있으며, 유전자에 변형을 가하고 자르고 연결하는 등 분자적 클로닝(molecular cloning) 실험 기법을 이용하여 자연의 상태에는 존재하지 않는 형태의 유전자를 제조하는 것을 의미한다. 본 발명에서 ‘발현(expression)’은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다.

본 발명에서 ‘재조합 발현벡터’란 적합한 숙주세포(host cell)에서 목적하는 단백질 또는 핵산(RNA)을 발현할 수 있는 벡터로서, 폴리뉴클레오티드(유전자) 삽입물이 발현될 수 있도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. ‘작동가능하게 연결된(operably linked)’이란 일반적인 기능을 수행하도록 핵산 발현조절서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것으로, 발현조절서열에 의해 유전자가 발현될 수 있도록 연결된 것을 의미한다. 상기 ‘발현조절서열(expression control sequence)’이란 특정한 숙주세포에서 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열, 개시 코돈, 종결 코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 등을 포함한다.

본 발명의 재조합 발현벡터는 클로닝과 항체 제조 분야에서 통상적으로 사용되는 벡터라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 그 예로는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 플라스미드에는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119, pET-22b(+)), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 등이 있으며, 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배클로 바이러스와 같은 곤충 바이러스 등이 사용될 수 있다. 과지 표시 등에 통상적으로 사용되는 pComb3 계열의 벡터를 사용할 수도 있고, 항체를 포유류 세포에서 발현하기 위하여 포유류 세포에서 단백질을 발현하기 위하여 통상적으로 사용되는 벡터, 예를 들어 pcDNA나 pVITRO 등의 벡터를 사용할 수 있다.

또한 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

본 발명의 세포는 본 발명의 재조합 발현벡터에 포함된 항체 또는 그 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는데 사용될 수 있는 세포라면 그 종류는 특별히 제한되지 아니한다. 본 발명에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포(숙주 세포)는 원핵생물(예를 들어, 대장균), 진핵생물(예를 들어 효모 또는 다른 균류), 식물 세포(예를 들어, 담배 또는 토마토 식물 세포), 동물 세포(예를 들어, 인간 세포, 원숭이 세포, 햄스터(hamster) 세포, 랫 세포(rat cell), 마우스 세포(mouse cell), 곤충 세포 또는 이들에서 유래한 하이브리도마일 수도 있다. 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류에서 유래한 세포일 수 있다. 예를 들어, HEK293T, 293F 세포 등을 이용할 수 있다.

본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편의 폴리펩티드를 발현할 수 있는 재조합 발현벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기천공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기

위한 공지의 방법에 의해 항체 또는 그 단편을 생산하기 위한 세포 내부로 도입하여 형질전환할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포는 본 발명에 따른 항체의 중쇄, 경쇄 또는 항체의 단편을 생산하게 된다.

또한 본 발명은

(a) 본 발명에 따른 항체 또는 항체의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현벡터로 숙주 세포를 형질전환하는 단계;

(b) 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 항체 또는 항체의 단편을 생산하는 단계; 및

(c) 숙주 세포에서 생산된 항체 또는 항체의 단편을 수득하는 단계를 포함하는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그 단편을 제조하는 방법을 제공한다.

(a) 단계는 본 발명에 따른 항체 또는 그 단편을 생산하기 위한 숙주세포를 상기 항체 또는 그 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 작동가능하게 연결된 재조합 발현벡터로 형질전환하는 단계이다.

통상의 기술자는 선택된 숙주세포와 재조합 발현벡터의 종류에 따라 앞서 서술한 바와 같이 적절한 형질전환 방법을 선택하여 본 단계를 실시할 수 있다. 중쇄와 경쇄의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터는 동일한 숙주세포에 공동형질전환하여 중쇄와 경쇄가 하나의 세포에서 발현되도록 할 수도 있고, 중쇄와 경쇄의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터를 각각 별개의 숙주세포에 형질전환하여 중쇄와 경쇄가 따로 발현되도록 할 수도 있다.

(b) 단계는 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 숙주세포에 도입된 재조합 발현벡터로부터 본 발명에 따른 항체의 중쇄, 경쇄 또는 항체의 단편의 폴리펩티드가 생산되도록 하는 단계이다.

통상의 기술자는 선택한 숙주세포를 배양하기 위한 배지 조성과 배양 조건, 배양 시간 등을 적절하게 선택할 수 있다. 숙주세포에서 생산되는 항체 분자는 세포의 세포질 내에 축적되거나, 적절한 신호 서열에 의하여 세포 외부 또는 배양 배지로 분비되거나, 페리플라즈마 등으로 표적화(targeted)되도록 할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 항체가 AIMP2-DX2에 대한 결합특이성을 유지하도록 당업계에 공지되어 있는 방법을 이용하여 단백질 리폴딩(refolding)시키고 기능성 구조(conformation)

를 갖도록 하는 것이 바람직하다. 또한 IgG 형태의 항체를 생산하는 경우, 중쇄와 경쇄는 별개의 세포에서 발현시키고 별도의 단계에서 중쇄와 경쇄를 접촉시켜 완전한 항체를 구성하도록 제조할 수도 있고, 중쇄와 경쇄를 동일한 세포에서 발현되도록 하여 세포 내부에서 완전한 항체를 형성하도록 할 수도 있다.

(c) 단계는 숙주세포에서 생산된 항체 또는 그 단편을 수득하는 단계이다.

숙주세포에서 생산된 항체 또는 그 단편 폴리펩타이드의 특성, 숙주세포의 특성, 발현 방식 또는 폴리펩타이드의 표적화 여부 등을 고려하여 통상의 기술자는 수득 방법을 적절히 선택 및 조절할 수 있다. 예를 들어, 배양 배지로 분비된 항체 또는 그 단편은 숙주세포를 배양한 배지를 수득하고, 원심분리하여 불순물을 제거하는 등의 방법으로 항체를 회수할 수 있다. 필요에 따라 세포 내 특정 소기관이나 세포질에 존재하는 항체를 세포 외부로 방출하여 회수하기 위하여 항체 또는 그 단편의 기능적 구조에 영향을 미치지 않는 범위에서 세포를 용해시킬 수도 있다. 또한 수득한 항체는 크로마토그래피, 필터 등에 의한 여과, 투석 등의 방법을 통해 불순물을 더욱 제거하고 농축하는 과정을 추가로 거칠 수 있다.

본 발명은 암 진단용 제제를 제조하기 위한 상기 항체 또는 항체의 단편의 용도를 제공한다.

본 발명은

(a) 개체로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계;

(b) 상기 항체 또는 항체의 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 AIMP2-DX2 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 AIMP2-DX2 단백질 수준을 정상개체의 AIMP2-DX2 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 개체의 암 진단 방법을 제공한다.

본 발명의 상기 ‘생물학적 시료’ 또는 ‘시료’는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 시료, 생검 표본, 조직 배양과 같은 고형 조직 시료 또는 이로부터 유래된 세포가 포함된다. 보다 구체적으로 예를 들면 이에 한정되지는 않으나 조직, 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 젖, 복수액, 활액, 복막액 등일 수 있다. 상기 시료는 동물, 바람직하게는 포유동물로부터 수득될 수 있으며, 가장 바람직하게는 인간으로부터 수득될 수 있다. 상기

시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 시료로부터 핵산 및 단백질을 분리하여 검출에 사용할 수 있다.

본 발명의 상기 ‘개체’란 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 상기 효과가 필요한 환자(patient)일 수 있다.

본 발명의 진단방법은, 정상개체의 생물학적 시료 내 AIMP2-DX2 단백질 수준을 암 의심 개체의 생물학적 시료 내 단백질 수준과 비교함으로써 실제 질환 발병 여부를 진단할 수 있다. 즉, 암으로 추정되는 개체의 생물학적 시료로부터 본 발명의 상기 항체 또는 그 단편을 이용해 AIMP2-DX2 단백질의 수준을 측정하고, 정상개체의 생물학적 시료로부터 본 발명의 항체 또는 그 단편을 이용해 AIMP2-DX2 단백질 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 질환 의심 개체의 AIMP2-DX2 단백질 수준이 정상개체의 것보다 이상 발현 또는 이상 과발현인 경우 이를 해당질환으로 진단할 수 있다. 따라서 상기 진단방법은 ‘(d) 정상 개체의 AIMP2-DX2 단백질 수준보다 이상 발현 또는 이상 과발현인 경우 암이 발병된 것으로 판정하는 단계.’를 추가적으로 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 전술한 바와 같이, 체액 내 AIMP2-DX2의 수준은 특히 폐암, 간암, 피부암, 유방암, 신장암, 골육종 등 다양한 암 세포주 및 조직에서 증가되어 있는 것으로 보고된 바 있는 것에 근거한다. 암에 대해서는 전술한 바와 같다.

상기 진단 방법은 AIMP2-DX2 단백질과 본 발명의 항체 또는 그 단편들의 특이적 항원-항체 반응을 통하여 달성되는 것으로서, 상기 반응에 의해 생성되는 항원-항체 복합체의 생성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해 정량적으로 측정 가능하다. 본 발명에서 용어 ‘항원-항체 복합체’란 AIMP2-DX2 단백질과 이에 특이적인 본원 발명의 항체 및 그 단편의 결합물을 의미한다.

상기 검출 라벨(표지)은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다

제, 우레아제, 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[Mo(CN)_8]^{4-}$ 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다.

단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색(immunohistochemistry), 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 분석 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 암 의심환자에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, AIMP2-DX2 생성량의 증가여부 등 이상 발현 또는 이상 과발현을 판단하여, 질병 의심 환자의 실제 암 발병 여부를 진단할 수 있다.

본 발명의 용어 ‘~을 포함하는(comprising)’이란 ‘함유하는’ 또는 ‘특징으로 하는’과 동일하게 사용되며, 조성물 또는 방법에 있어서, 언급되지 않은 추가적인 성분 요소 또는 방법 단계 등을 배제하지 않는다. 용어 ‘~로 구성되는(consisting of)’이란 별도로 기재되지 않은 추가적인 요소, 단계 또는 성분 등을 제외하는 것을 의미한다. 용어 ‘필수적으로 구성되는(essentially consisting of)’이란 조성물 또는 방법의 범위에 있어서, 기재된 성분 요소 또는 단계와 더불어 이의 기본적인 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 성분 요소 또는 단계 등을 포함하는 것을 의미한다.

【유리한 효과】

따라서 본 발명은 AIMP2-DX2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 단편, 이를 포함하는 암 진단용 조성물, 그리고 상기 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 재조합 발현벡터, 이를 이용하여 형질전환된 세포 및 상기 항체 또는 항체의 단편을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 제공하는 항체와 항체의 단편은 야생형 AIMP2에는 반응하지 않고 exon2가 결손된 AIMP2-DX2 돌연변이 단백질에 특이적으로 결합하기 때문에 암, 염증성 질환 등 다양한 병리에 연관되어 있는 AIMP2-DX2 단백질의 존재와 발현 정도를 확인하는데 효과적이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 H5 Fab의 AIMP2-DX2 항원 펩티드에 대한 결합특이성을 확인하기 위한 실험을 나타낸다. 도 1의 A는 폐암세포주인 H460 세포 용해물을 항원 펩티드(epitope peptide, 100 µg/ml) 존재 하에 H5 Fab(“+”로 표시), 또는 항원 펩티드를 첨가하지 않은 상태에서 H5 Fab(“-”로 표시)로 감지한 웨스턴 블롯 결과이다. 도 1의 B는 야생형 AIMP2에서 exon2가 결손된 AIMP2-DX2의 아미노산 서열에서 H5 항체를 선별하는데 사용한 항원 펩티드에 해당하는 부분을 나타낸다(밑줄 친 부분, 아미노산 서열 GHVQDYGALKD). exon1, exon3, exon4는 각각 회색, 녹색, 검정색으로 표시되어 있다.

도 2는 H5 Fab의 AIMP2-DX2 항원에 대한 결합특이성을 확인하기 위한 실험을 나타낸다. 도 2의 A는 AIMP2-DX2에 대한 siRNA(siDX2, “DX2”; si exon4 #1, “#1”; si exon4 #2, “#2”)로 형질전환되어 72시간 동안 배양한 H460 세포 용해물과 H5 Fab를 이용한 웨스턴 블롯 결과이다. 도 2의 B는 실험에 사용한 siRNA의 표적 부위를 나타낸다. siDX2는 AIMP2-DX2의 exon1-exon3 접합 부분, si exon4 #1와 #2는 각각 exon4의 상이한 부분을 표적으로 한다. “C”는 대조군(control)을 의미한다.

도 3은 H5 Fab와 N-말단이 결손된 AIMP2-DX2 단백질의 결합을 확인하기 위한 실험을 나타낸다. 도 3의 A는 다양한 형태의 AIMP2-DX2 단백질을 발현하도록 형질전환된 HEK293T 세포 용해물을 항원 펩티드(epitope peptide, 100 µg/ml) 존재 하에서 H5 Fab(“H5+epitope peptide”), 또는 항원 펩티드가 없는 상태에서 H5 Fab(

“H5”)를 이용하여 감지한 웨스턴 블롯 결과이다. HEK293T 세포에서 발현된 AIMP2-DX2 단백질은 strep tag에 접합되어 있으며, 전체 길이의 단백질이거나(F-DX2, “F”), N-말단 아미노산이 결손된 형태의 단백질이다(“ $\Delta 2$ ” , 아미노산 2개 결손, $\Delta 2$ -DX2; “ $\Delta 23$ ” , 아미노산 23개 결손, $\Delta 23$ -DX2; “ $\Delta 33$ ” , 아미노산 33개 결손, $\Delta 33$ -DX2). 이 결과는 H5 Fab가 epitope을 포함하고 있는 다양한 형태의 AIMP2-DX2를 인식함을 보여준다. “EV” 는 공벡터(empty vector)를 의미한다. 도 3의 B는 상기 AIMP2-DX2 단백질들의 모식도(exon1, exon3, exon4는 각각 회색, 녹색, 검정색으로 표시; strep tag는 주황색으로 표시, 링커 포함하여 30개 아미노산으로 구성)와 AIMP2-DX2 아미노산 서열에서 해당하는 부분을 나타낸다(검정색 화살표와 적색으로 표시된 아미노산).

도 4는 H5 IgG 항체와 AIMP2-DX2 항원 펩티드의 결합력을 확인하기 위한 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance) 실험을 나타낸다. H5 항체와 IgG 단백질을 CM5 chip에 코팅하고, AIMP2-DX2 항원 펩티드를 다양한 농도로 흘려보내어 항원 펩티드와 항체 간 결합 반응 정도를 센서그램(sensorgram)으로 나타내었다. 센서그램의 x축은 시간(초, s), y 축은 반응(response unit, RU)을 표시한다. 상자 안은 AIMP2-DX2 항원 펩티드의 농도를 나타내며(단위는 모두 nM), 도 4의 A와 B에서 모두 같다.

도 5는 H5 Fab의 결합특이성을 확인하기 위한 웨스턴 블롯 실험을 나타낸다. H460 세포 용해물을 전기영동한 블롯을 야생형 AIMP2와 AIMP2-DX2에 모두 결합하는 #324 항체(도 5의 A), 또는 H5 Fab(도 5의 B)와 반응시킨 결과를 보여준다. 블롯에서 야생형 AIMP2(“AIMP2”)와 AIMP2-DX2(“DX2”)의 단백질 밴드의 위치는 각각 적색 화살표로 표시되어 있다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

키메라 Fab 라이브러리 제작

AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항원결합부위(antigen-binding site)를 스크리닝하기 위한 토끼/인간 키메라(chimeric) Fab library를 구축하였다. 토끼의 면역화(immunization), 토끼 비장세포(splenocyte)로부터의 mRNA의 분리와 cDNA 합성, 그리고 토끼/인간 키메라 Fab 항체 라이브러리 구축은 기본적으로 'Phage Display: A Laboratory Manual' (Barbas, C.F. 3rd. et al. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press)에 공지된 방법에 따라 수행하였다.

구체적으로, 야생형 AIMP2 단백질과 AIMP2-DX2 돌연변이 단백질을 구분할 수 있는 항원결정부(epitope)로서, AIMP2-DX2에서 exon1과 exon3가 접합한 부분의 폴리펩티드를 이용하였다(도 1의 B 참고, 아미노산 서열 GHVQDYGALKD). 상기 AIMP2-DX2 항원 펩티드의 C-말단에 운반체 단백질인 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin, KLH) 단백질을 접합하기 위하여 시스테인(C) 아미노산을 추가하였다. KLH에 접합된 AIMP2-DX2 항원 펩티드를 토끼에 접종하여 면역반응을 유도하고, 토끼의 비장을 수득하여 mRNA를 분리하고, 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 키메라 Fab 라이브러리 구축에 필요한 토끼 항체의 가변영역의 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)를 제작하였다. cDNA의 제작에 사용된 프라이머는 표 1에 기재된 바와 같다. 제작된 cDNA로부터 표 2에 기재된 프라이머의 조합과 표 3에 기재된 PCR 조건을 이용하여 토끼 항체의 중쇄와 경쇄 가변영역의 DNA를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동으로 분리한 후 gel extraction kit를 이용하여 정제하였다.

【표 1】

RT-PCR 프라이머

	정방향 프라이머							
중쇄 (서열번호)	RVH1 (25)	RVH2 (26)	RVH3 (27)	RVH4 (28)	RVH5 (29)	RVH6 (30)		
경쇄(카파) (서열번호)	RVK1 (31)	RVK2 (32)	RVK3 (33)	RVK4 (34)	RVK5 (35)	RVK6 (36)	RVK7 (37)	RVK8 (38)
경쇄(람다) (서열번호)	RVL1 (39)	RVL2 (40)	RVL3 (41)	RVL4 (42)	RVL5 (43)	RVL6 (44)		
	역방향 프라이머							
중쇄 (서열번호)	RJH-b (45)							
경쇄(카파) (서열번호)	RJK1-b (46)	RJK2-b (47)	RJK3-b (48)	RJK4-b (49)				
경쇄(람다) (서열번호)	RJL-b (50)							

(프라이머 하단 괄호 안의 숫자는 해당 프라이머의 서열번호를 나타냄).

【표 2】

RT-PCR에 사용한 프라이머의 조합

	44 개의 프라이머 조합							
중쇄	RVH1 RJH-b	RVH2 RJH-b	RVH3 RJH-b	RVH4 RJH-b	RVH5 RJH-b	RVH6 RJH-b		
경쇄 (카파)	RVK1 RJK1-b	RVK2 RJK1-b	RVK3 RJK1-b	RVK4 RJK1-b	RVK5 RJK1-b	RVK6 RJK1-b	RVK7 RJK1-b	RVK8 RJK1-b
	RVK1 RJK2-b	RVK2 RJK2-b	RVK3 RJK2-b	RVK4 RJK2-b	RVK5 RJK2-b	RVK6 RJK2-b	RVK7 RJK2-b	RVK8 RJK2-b
	RVK1 RJK3-b	RVK2 RJK3-b	RVK3 RJK3-b	RVK4 RJK3-b	RVK5 RJK3-b	RVK6 RJK3-b	RVK7 RJK3-b	RVK8 RJK3-b
	RVK1 RJK4-b	RVK2 RJK4-b	RVK3 RJK4-b	RVK4 RJK4-b	RVK5 RJK4-b	RVK6 RJK4-b	RVK7 RJK4-b	RVK8 RJK4-b
경쇄 (람다)	RVL1 RJL-b	RVL2 RJL-b	RVL3 RJL-b	RVL4 RJL-b	RVL5 RJL-b	RVL6 RJL-b		

【표 3】

경쇄와 중쇄 가변영역 DNA를 증폭하기 위한 PCR 조건

PCR 반응 프로그램	30x				
94°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C
2 분	30 초	30 초	30 초	7 분	∞

(∞는 시간제한이 없음을 의미함.)

인간의 Fab를 포함하는 pComb3XTT로부터 키메라 Fab 라이브러리 구축에 필요

한 인간 항체(Fab)의 불변영역의 DNA를 PCR 반응으로 수득하였다. 경쇄와 중쇄 불변영역은 pComb3XTT(2640.2ng/ml) 플라스미드를 주형으로 하고, 각각 HKC-F(정방향, 서열번호 53), Lead-b(역방향, 서열번호 54)의 프라이머 쌍과 HlgCH1-F(정방향, 서열번호 51), dpseq(역방향, 서열번호 52)의 프라이머 쌍을 이용하여 표 4에 기재된 PCR 조건에 따라 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 gel extraction kit를 이용하여 정제하였다. 정제된 중쇄와 경쇄 불변영역의 DNA의 크기는 각각 400bp와 350bp였다.

【표 4】

경쇄와 중쇄 불변영역 DNA를 증폭하기 위한 PCR 조건

PCR 반응 프로그램	25x				
94°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C
2 분	30 초	30 초	30 초	10 분	∞

(∞는 시간제한이 없음을 의미함.)

앞서 준비한 토끼 항체의 가변영역의 DNA와 인간 항체(Fab)의 불변영역의 DNA는 중복확장 PCR(overlap extension PCR)로 연결하였다. 중쇄는 중쇄 가변영역 DNA와 불변영역 DNA 혼합하여 주형으로 하고, LeadVH(서열번호 55), dpseq(서열번호 52)의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR 반응을 실시하였고, 경쇄는 경쇄 가변영역 DNA와 불변영역 DNA를 혼합하여 주형으로 하고, RSC-SF(서열번호 56), Lead-b(서열번호 54)의 프라이머쌍을 이용하여 PCR 반응을 실시하였다. PCR 조건은 표 5에 기재된 바와 같다.

【표 5】

중복확장 PCR 조건

PCR 반응 프로그램	25x				
94°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C
2 분	30 초	30 초	1 분	10 분	∞

(∞는 시간제한이 없음을 의미함.)

상기와 같이 제작된 Fd 중쇄 단편(중쇄 불변영역+중쇄 가변영역)과 키메라 경쇄(경쇄 불변영역+경쇄 가변영역)의 DNA는 gel extraction kit를 이용하여 분리 정제하였다. 중쇄와 경쇄 PCR 산물은 각각 각각 750bp, 800bp였다. 마지막으로, Fd

중쇄 단편과 키메라 경쇄를 Fab 형태로 결합시키기 위하여, Fd 중쇄와 키메라 경쇄의 혼합물을 주형으로 하고, RSC-SF(서열번호 56), dpseq(서열번호 52)의 프라이머 쌍을 이용하여 표 6에 기재된 조건에 따라 PCR을 실시하였다. PCR 산물로 얻어진 Fab(Fd 중쇄+키메라 경쇄)는 1.5% 젤에 전기영동하고 gel extraction kit로 분리정제하였다. 최종 결과물은 1500bp 크기였다.

【표 6】

Fab를 제작하기 위한 PCR 조건

PCR 반응 프로그램	25x				
94°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C
2 분	30 초	30 초	1.5 분	10 분	∞

(∞는 시간제한이 없음을 의미함.)

상기와 같이 제작된 Fab DNA는 파지(phage)에서 발현되어 파지 표시(phage-displayed) Fab library를 구축할 수 있도록 pComb3XTT 벡터에 삽입하였다. 구체적으로, Fab의 PCR 산물과 pComb3XTT 벡터를 SfiI 제한효소로 각각 절단한 후 1% 젤에 전기영동하고 분리정제하였다. 제한효소 반응은 5 µg의 Fab DNA와 30 µg의 pComb3XTT 벡터를 각각 2.5 µl의 SfiI 제한효소로 절단하여 실시하였다. 절단된 Fab DNA와 벡터의 크기는 각각 1500bp, 3400bp이다. 제한효소로 절단한 Insert DNA와 벡터를 3:1의 몰비율로 혼합하고 T4 리가아제(ligase)로 반응시킨 뒤, 에탄올로 침전시켰다.

키메라 Fab DNA가 삽입된 벡터는 전기천공법(electroporation)으로 ER2537 대장균에 형질전환시켰다. 전기천공에는 SOC 배지(Super Optimal Broth with Catabolite Repression-glucose added)를 사용하였다. 차가운 상태로 유지한 큐벳(cuvette)에 200 µl의 ER2537 대장균 수용성 세포(competent cell)와 벡터를 혼합하고 전기 충격을 가한 뒤, 즉시 SOC를 3mL 첨가하였다. 이후 50ml 튜브로 옮겨 상온에서 1시간 동안 배양하고, 1 µl, 1/10 µl, 1/100 µl의 용량으로 미리 데워놓은 앰피실린을 포함하는 100mm 아가(agar) 플레이트에 도포하였다. 별도로, 오염 여부를 확인하기 위하여 카나마이신과 앰피실린이 함유된 반으로 나뉜 플레이트에도 도포하였다. 도포하고 남은 전기 충격을 받은 대장균을 4000g, 4°C에서 15분 동안 원심분리하고 상층액을 제거한 뒤 500 µl의 SOC로 재분산하여 150mm 앰피실린 플레이트에 도포하고, 앞서 대장균을 도포한 100mm 플레이트들과 함께 37°C에서 약

18시간 동안 배양하였다. 결과물로 다음 날 약 10^7 개의 형질전환된 콜로니를 수득하였다.

<실시예 2>

파지 표시(phage-displayed) Fab 라이브러리 패닝과 스크리닝

<2-1> 파지 표시 Fab 라이브러리 패닝

AIMP2-DX2 항원 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항원결합부위를 갖는 Fab를 선별하기 위하여 앞선 실시예에서 제작한 항체(Fab) 라이브러리 패닝(panning) 실험을 공지의 방법(Bai, X. et al. PLoS ONE 2015, doi:10.1371/journal.pone.0141045)에 따라 실시하였다.

패닝의 첫 번째 단계로 헬퍼 파지(helper phage)를 대장균에 도입하는 라이브러리 레스큐(library rescue)를 실시하였다. 실험 하루 전 150mm 플레이트에 도포하여 자라난 콜로니를 5ml LB(Luria-Bertani Broth)에 접종하여 모아준 후 이 중 100 μ l를 앰피실린(50 μ g/mL)을 포함하는 20ml SB(Super Broth)에 접종하고, 3시간 동안 37°C에서 220rpm으로 진탕배양하였다. 배양액의 600nm 흡광도(OD600)가 0.5에 이르면, 500 μ l의 VCSM13 헬퍼 파지(10^{12} pfu)를 넣어 준 후, 다시 37°C에서 120rpm으로 1시간 동안 진탕배양하였다. 이후 카나마이신(70 μ g/mL)을 첨가하여 30°C에서 추가로 220rpm으로 18시간 동안 진탕배양하였다. 배양물은 12,000rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 모아 5ml의 5×폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG) 침전 용액(16% PEG-8000, 12% NaCl)에 첨가하고 30분간 얼음 위에 두었다. 그리고 다시 12,000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 수득한 침전물(pellet)을 1ml의 3% BSA를 포함하는 PBS에 재분산하여 파지 용액(phage solution)을 준비하고, 실온에 1시간 동안 두었다. 별도로 10ml의 LB에 160 μ l의 ER2537 대장균을 접종하여 항생제 없이 220rpm, 37°C에서 진탕배양하였다.

패닝을 위한 면역시험관(immunotube, Nunc cat. No 470319)은 10 μ g의 AIMP2-DX2 항원 펩티드(토끼 면역반응에 사용한 항원 펩티드를 BSA에 접합한 형태)를 포함하는 1ml PBS를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 시험관 내부 표면에 항원 펩티드를 흡착시켰다. 이후 1시간 동안 3% 탈지유(skim milk)가 첨가된 PBST(tween20을 포함하는 PBS)로 블로킹(blocking)하여 항원이 흡착되지 않은 부분

이 메워지도록 하였다. 파지 라이브러리(10^{12} pfu)는 3% 탈지유와 300 μ g BSA를 포함하는 1ml의 PBST로 1시간 동안 블로킹하였다.

블로킹된 면역시험관에 파지 라이브러리를 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 진탕배양하여 파지에 발현된 Fab와 항원 펩티드가 결합하도록 하고, 5ml의 PBST로 3번 세척하였다. 면역시험관에 결합한 파지는 1ml의 triethylamine(100mM in deionized water)로 실온에서 10분간 용출하고 즉시 0.5ml의 Tris(1M, pH 7.0)로 중화한 뒤, 8.5ml의 지수성장 중기(mid-log phage)의 ER2537 대장균과 혼합하였다. 대장균과 파지 배양물은 120rpm, 37°C에서 1시간 동안 진탕배양하고, 2% 포도당과 앰피실린을 포함하는 LB 아가 플레이트에 도포하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 플레이트에서 자란 대장균은 약 10^8 세포를 앰피실린을 포함하는 20ml의 SB 배지(super broth: 3% tryptone, 2% yeast extract, 1% MOPS, pH 7.0)에 접종하고 배양하여 OD600이 0.7에 이르면 10^{12} pfu의 VCSM13 헬퍼 파지를 첨가하였다. 37°C에서 1시간 동안 80rpm으로 교반하고, 카나마이신(70 μ g/ml)을 추가하여 200rpm, 30°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양액은 원심분리하고, 파지를 5ml의 5×PEG 침전 용액(20%(w/v) PEG8000, 15% (w/v) NaCl)으로 침전시켜 얼음에서 30분 동안 두었다. 침전된 파지는 원심분리하여 0.3ml의 PBS에 재분산하고 다음 단계의 패닝에 사용하였다. 패닝은 상기한 방법으로 4회 반복하였으며, 패닝으로 선별된 대장균 콜로니들을 결과물로 수득하였다.

<2-2> 클론 스크리닝

실시에 <2-1>의 패닝에서 선별된 콜로니의 파지가 발현하는 항체(Fab)가 실제로 AIMP2-DX2 항원 펩티드에 특이적으로 결합하는지 확인하였다.

먼저 2회 내지 4회차 패닝에서 선별된 콜로니 중, BSA에 접합된 AIMP2-DX2 항원 펩티드에 결합하는 콜로니를 Bai, X. et al.(2015)의 방법에 따라 ELISA 실험으로 선별하였다. ELISA 실험을 위한 96well 면역플레이트는 AIMP2-DX2 항원 펩티드(10 μ l/ml)로 코팅하고, 180 μ l의 3% BSA-PBST로 블로킹하였다. 항체(Fab)를 발현하는 대장균 배양액은 3500rpm에서 15분간 원심분리하여 침전시키고, 40 μ l의 1×TES(20% sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM TRIS, pH 8.0)와 60 μ l의 0.2×TES을 차례로 넣고 분산시켜 세포 외막을 제거하고 세포질 추출물(periplasmic extract)을 제조

하였다. 이를 원심분리하여 수득한 상층액 25 μ l를 항원 펩티드로 코팅한 면역플레이트에 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 플레이트는 PBST로 3~4번 세척하고, 2차 항체로 3% BSA-PBST에 희석한 anti-human IgG(Fab specific)-HRP(1:1000)를 25 μ l씩 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 플레이트를 세척하고, tetramethylbenzidine(TMB)을 25 μ l 첨가하여 10분 동안 발색 반응을 진행한 후, 황산(H_2SO_4 , 1mM)을 25 μ l씩 첨가하여 반응을 중지시켰다. ELISA 실험의 음성대조군은 항원 펩티드 대신 BSA를 사용한 실험이었으며, 배경(background)과 비교하여 3배 이상 강한 신호를 나타내는 콜로니를 선별하였다.

ELISA에서 선별된 콜로니의 항체 클론은 웨스턴 블롯을 이용하여 AIMP2-DX2에 대한 결합특이성을 확인하였다. 앞서 선별된 대장균 콜로니를 앰피실린을 포함하는 20mL SB 배지로 배양하여 OD600이 0.7에 이르렀을 때 IPTG(1mM final)를 첨가하고 하룻밤 동안 30°C에서 진탕배양하였다. 원심분리하여 침전시킨 대장균에 1ml의 차가운 1×TES를 첨가하여 재분산하고, 1.5ml의 차가운 0.2×TES를 넣어 얼음에서 30분간 배양하여 세포질 추출물을 제조하였다. 원심분리하여 수득한 상층액을 3% 탈지유-PBST와 1:1로 혼합하여 웨스턴 블롯의 1차 항체(primary antibody)로 사용하였다. 2차 항체(secondary antibody)로는 anti-HA tag antibody-HRP 또는 anti-human Fab antibody-HRP를 사용하였다. AIMP2-DX2를 발현하는 결장암 세포주인 SW460 세포 용해물을 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과, 클론 H5의 항체(Fab)가 25kDa 크기의 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다(데이터 미도시).

ELISA 실험을 통해 결합이 확인된 H5 클론의 Fab를 암호화하는 DNA의 염기서열을 sequencing으로 확인하였다. 확인된 H5 Fab의 중쇄와 경쇄의 CDR의 염기서열과 아미노산 서열은 본 명세서 서열목록의 서열번호 3 내지 서열번호 14에 기재되어 있다. 또한 H5 Fab의 중쇄와 경쇄 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열은 본 명세서 서열목록의 서열번호 15 내지 서열번호 18에 기재되어 있는 바와 같다. H5 Fab의 중쇄 부분(Fd, 토끼 항체에서 유래한 중쇄 가변영역과 인간 항체의 중쇄 CH1 도메인)의 염기서열과 아미노산 서열은 각각 서열번호 24와 서열번호 23에 기재되어 있으며, H5 Fab의 경쇄 부분(토끼 항체에서 유래한 경쇄 가변영역과 인간 항체의 경쇄 C κ 도메인)의 염기서열과 아미노산 서열은 각각 서열번호 22와 서열번호 21에 기재되어 있다.

상기와 같이 공유한 서열이 확인된 H5 Fab는 보다 보편적으로 사용되는 형태인 IgG 형태의 전체 항체로 전환하였다. Fab를 IgG 항체로 전환하는 통상의 방법에 따라, H5 Fab의 중쇄 및 경쇄의 가변영역의 DNA를 PCR로 증폭하고, 인간의 IgG1의 중쇄 및 경쇄 불변영역의 유전자가 클로닝되어 있는 pVITR01 벡터에 적절한 제한효소를 이용하여 삽입하였다. 이와 같이 제작된 H5 IgG 항체의 중쇄(토끼 항체에서 유래한 중쇄 가변영역과 인간 항체의 중쇄 불변영역)와 H5 IgG 항체의 경쇄(토끼 항체에서 유래한 경쇄 가변영역과 인간 항체의 경쇄 불변영역 C_K 도메인)의 염기서열과 아미노산 서열은 본 명세서 서열목록의 서열번호 19 내지 서열번호 22에 기재되어 있는 바와 같다. H5 IgG 항체의 경쇄의 염기서열과 아미노산 서열은 H5 Fab의 경쇄의 서열과 동일하다. H5 IgG의 DNA를 포함하는 벡터는 293F 세포주에서 발현시키고, protein G affinity chromatography로 분리정제하였다.

<실시예 3>

선별된 클론의 AIMP2-DX2에 대한 결합특이성 확인

H5 항체 또는 단편(Fab)의 AIMP2-DX2에 대한 결합특이성을 더욱 자세하게 확인하였다.

먼저 H5 Fab가 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는지 여부를 항원 흡착(antigen preadsorption) 실험으로 알아보았다(도 1). AIMP2-DX2를 발현하는 폐암 세포주인 H460 세포 용해물을 전기영동하고, AIMP2-DX2 항원 펩티드(100 µg/ml) 존재 하에 H5 Fab(도 1의 A, “+”) 또는 항원 펩티드를 첨가하지 않은 조건에서 H5 Fab(도 1의 A, “-”)로 웨스턴 블롯을 실시하였다. 항원 펩티드와 반응하지 않은 H5 Fab는 AIMP2-DX2 단백질 밴드를 감지하였으나, 항원 펩티드가 추가된 조건에서의 H5 Fab는 AIMP2-DX2 단백질 밴드와 전혀 반응하지 않아, H5 Fab가 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합함을 보여주었다.

추가적으로 H460 세포에서 AIMP2-DX2의 발현을 억제하는 방법으로 H5 Fab의 AIMP2-DX2에 대한 결합특이성을 확인하였다(도 2). AIMP2-DX2의 exon1-exon3 접합 부분 또는 exon4를 표적으로 하는 siRNA(도 2의 B, 각각 “siDX2”(서열번호 57), “si exon4 #1”(서열번호 58), “si exon4 #2”(서열번호 59))로 H460 세포를 형질전환하고 72시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 용해물을 H5 Fab로 웨스턴 블롯을 실시한 결과(도 2의 A), AIMP2-DX2의 exon1-exon3 접합 부분 뿐 아니라, exon4를 표적으로 하는 siRNA로 형질전환된 세포 용해물에서도 H5 Fab에 의해

AIMP2-DX2 단백질 밴드가 감지되지 않았다. siRNA에 의해 AIMP2-DX2 변이체의 mRNA가 모두 분해되었기 때문인 것으로 판단된다.

AIMP2-DX2 단백질의 N-말단 아미노산 결실이 H5 Fab와 AIMP2-DX2 단백질의 결합에 영향을 미치는지 알아보았다(도 3). AIMP2-DX2 단백질의 N-말단의 아미노산 잔기는 AIMP2-DX2 단백질의 용해성에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(대한민국 특허출원 제10-2014-0058634호). AIMP2-DX2 단백질 N-말단에서 2개, 23개, 또는 33개의 아미노산이 결손된 형태의 AIMP2-DX2(도 3의 B)에 strep tag를 접합하여 HEK293T 세포에서 각각 발현시키고, H5 Fab로 웨스턴 블롯 실험을 실시하였다. 도 3의 A에서 보여지듯이, H5 Fab는 전체 길이의 AIMP2-DX2 단백질 뿐 아니라, N-말단이 결손된 형태의 AIMP2-DX2에도 모두 잘 결합하는 것으로 나타났다. 한편 AIMP2-DX2 항원 펩티드가 존재하는 조건에서 H5 Fab(“H5+epitope peptide”)는 전체 길이 또는 N-말단이 결손된 AIMP2-DX2 어느 것에도 결합하지 않아, H5 Fab가 AIMP2-DX2 단백질에 특이적으로 결합하는 것을 재확인하였다.

IgG 형태로 전환한 H5 항체의 AIMP2-DX2 항원에 대한 결합력을 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance) 실험으로 확인하였다(도 4). H5 항체(IgG)와 IgG 단백질을 CM5 chip에 코팅하고, AIMP2-DX2 항원 펩티드를 다양한 농도로 흘려 보내고 H5 항체와 결합 반응 정도를 측정하였다. 분석시료나 버퍼는 15 μ l/min의 유속으로 6분 동안 주입하고, 20분 동안 세척하였다. H5 항체 및 IgG가 각각 항원 펩티드와 반응한 반응결과에서 단백질이 코팅되지 않은 blank의 반응값을 빼준 sensorgram으로 분석하였다. 그 결과 도 4에서 보는 바와 같이 H5 항체는 항원 펩티드 농도에 비례하여 결합이 증가하였으나 IgG는 단백질과 항원 펩티드의 유의한 결합을 관찰할 수 없었다. IgG로 전환된 형태의 H5 항체도 Fab의 AIMP2-DX2 항원에 대한 결합력을 유지하고 있음을 알 수 있다.

마지막으로, H5 항체가 야생형(WT) AIMP2 단백질과 AIMP2-DX2를 구별할 수 있는지 확인하였다(도 5). 야생형 AIMP2와 AIMP2-DX2를 구분하지 않고 결합하는 #324 항체와 H5 Fab를 이용하여 H460 세포 용해물로 웨스턴 블롯을 실시하고 결과를 비교하였다. #324 항체가 야생형 AIMP2와 AIMP2-DX2에 모두 결합한 것과는 대조적으로(도 5의 A), H5 Fab는 야생형 AIMP2에는 전혀 결합하지 않고, AIMP2-DX2에만 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다(도 5의 B). 즉 H5 항체를 이용하여

AIMP2-DX2만 선택적으로 감지할 수 있음을 확인하였다. H5 IgG 항체는 H5 Fab의 가변영역을 그대로 포함하며, 항원에 대한 결합 특징을 유지하고 있으므로, H5 IgG 항체로도 H5 Fab와 동일한 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

【산업상 이용가능성】

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 항체는 야생형 AIMP2에는 반응하지 않고 exon2가 결손된 AIMP2-DX2 돌연변이 단백질에 특이적으로 결합하기 때문에 AIMP2-DX2 단백질의 존재와 발현 정도를 확인하는데 유용하게 이용될 수 있다. AIMP2-DX2 단백질은 암과 염증성 질환 등의 병리에 연관되어 있으며, 특히 폐암, 유방암, 대장암 등 암 질환에서 과발현되어 있으므로, AIMP2-DX2를 암 발생과 진행의 바이오마커로 감지하기 위한 암 진단용 조성물을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 항원결정부(epitope)로 인식하는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 단편.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항체의 단편은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정부위(CDR)1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항체의 단편.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항체의 단편은 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항체의 단편.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항체의 단편.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 항체는 IgG, IgA, IgM, IgE 및 IgD로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항체의 단편.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 항체의 단편은 디아바디, Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, Fv 및 scFv로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항체의 단편.

【청구항 7】

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 항체의 단편을 포함하는 암 진단용 조성물.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 암은 결장암, 대장암, 폐암, 간암, 위암, 식도암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 자궁내막암, 유모암, 난소암, 유방암, 갑상선암, 뇌암, 두경부암, 악성흑색종, 림프종, 재생불량성 빈혈 및 혈액암로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 진단용 조성물.

【청구항 9】

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 항체의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 16 또는 서열번호 18로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 11】

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현벡터.

【청구항 12】

제11항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포.

【청구항 13】

- (a) 제12항의 재조합 발현벡터로 숙주 세포를 형질전환하는 단계;
- (b) 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 항체 또는 항체의 단편을 생산하는 단계; 및
- (c) 숙주 세포에서 생산된 항체 또는 항체의 단편을 수득하는 단계를 포함하는 AIMP2-DX2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그 단편을 제조하는 방법.

【청구항 14】

암 진단용 제제를 제조하기 위한 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 항체의 단편의 용도.

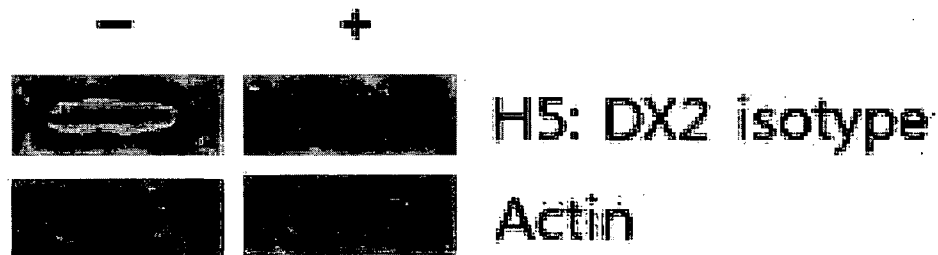
【청구항 15】

- (a) 개체로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계;
- (b) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 항체의 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 AIMP2-DX2 단백질 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 AIMP2-DX2 단백질 수준을 정상개체의 AIMP2-DX2 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 개체의 암 진단 방법.

【도면】

【도 1A】

Epitope peptide (100 μ g/ml)

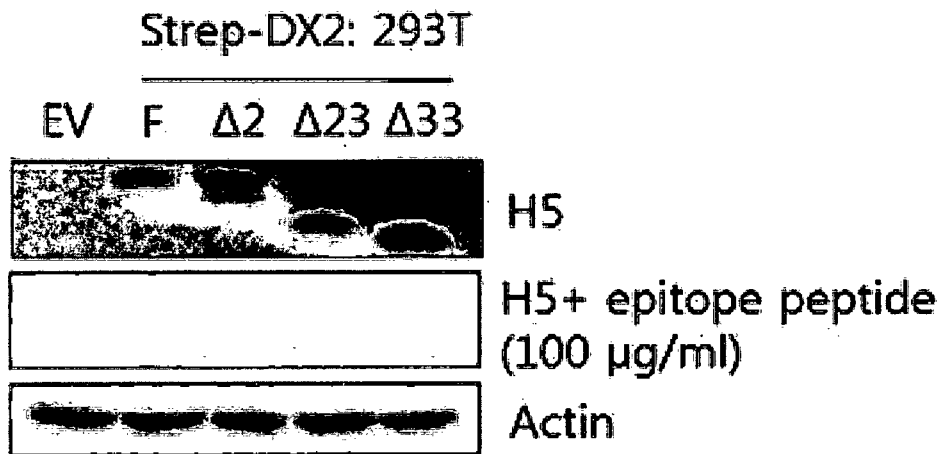


【도 1B】

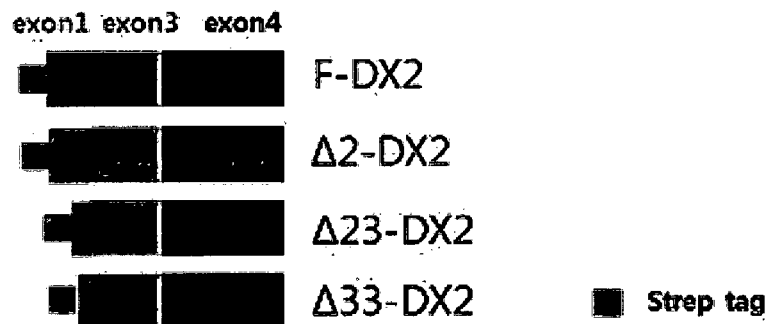
DX2 amino acid sequence

MPMYQVKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNVHGRSYGPAPGAGHVQDYGALKDIVI
 NANPASPPLSLLVLHRLLCHEFRVLSTVHTHSSVKSVPENLLKCFGEQNKKQPRQD
 YQLGFTLIWKNVPKTQMKFSIQTMCPIEGEGNIARFLFSLFGQKHNAVNATLIDSWVD
 IAIFQLKEGSSKEKAAVFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVVLWSVLQQIGGCSVT
 VPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK

【도 2A】



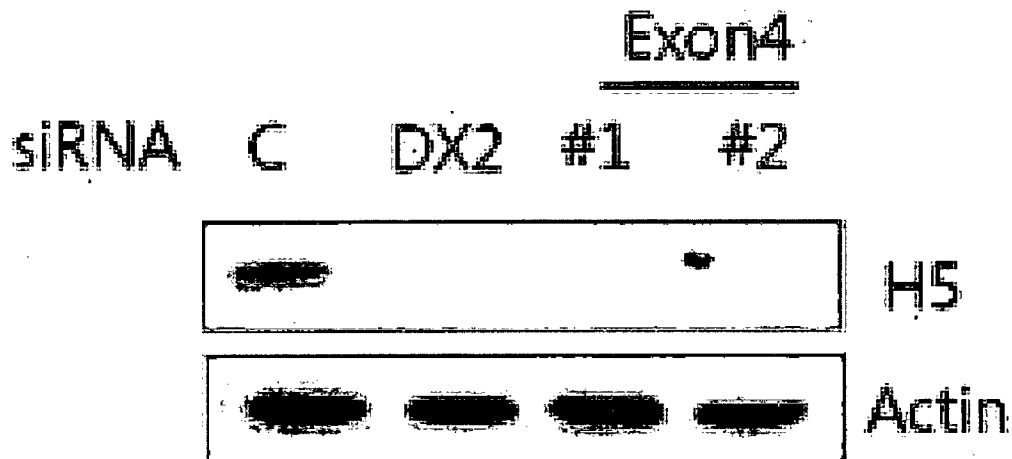
【도 2B】



DX2 amino acid sequence

F-DX2	$\Delta 2$ -DX2	$\Delta 23$ -DX2	$\Delta 33$ -DX2
→→		→	→
MPMYQVKPYHGGAPLRVELPTCMYRLPNVHGRSYGPAPGAG HVQDYGALKDIVINANPASPLSLLVLHRLLCHEFRVLSTVHTHS SVKSVPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTLIWKNVPKTQMKF SIQTMCPIEGEGNIARFLFSLFGQKHNAVNATLIDSWVDIAIFQLK EGSSKEKAAVFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVVLWSVLQQI GGCSVTPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK			

【도 3A】



【도 3B】

AIMP2-DX2 nucleotide sequence (Exon1-Exon3-Exon4)

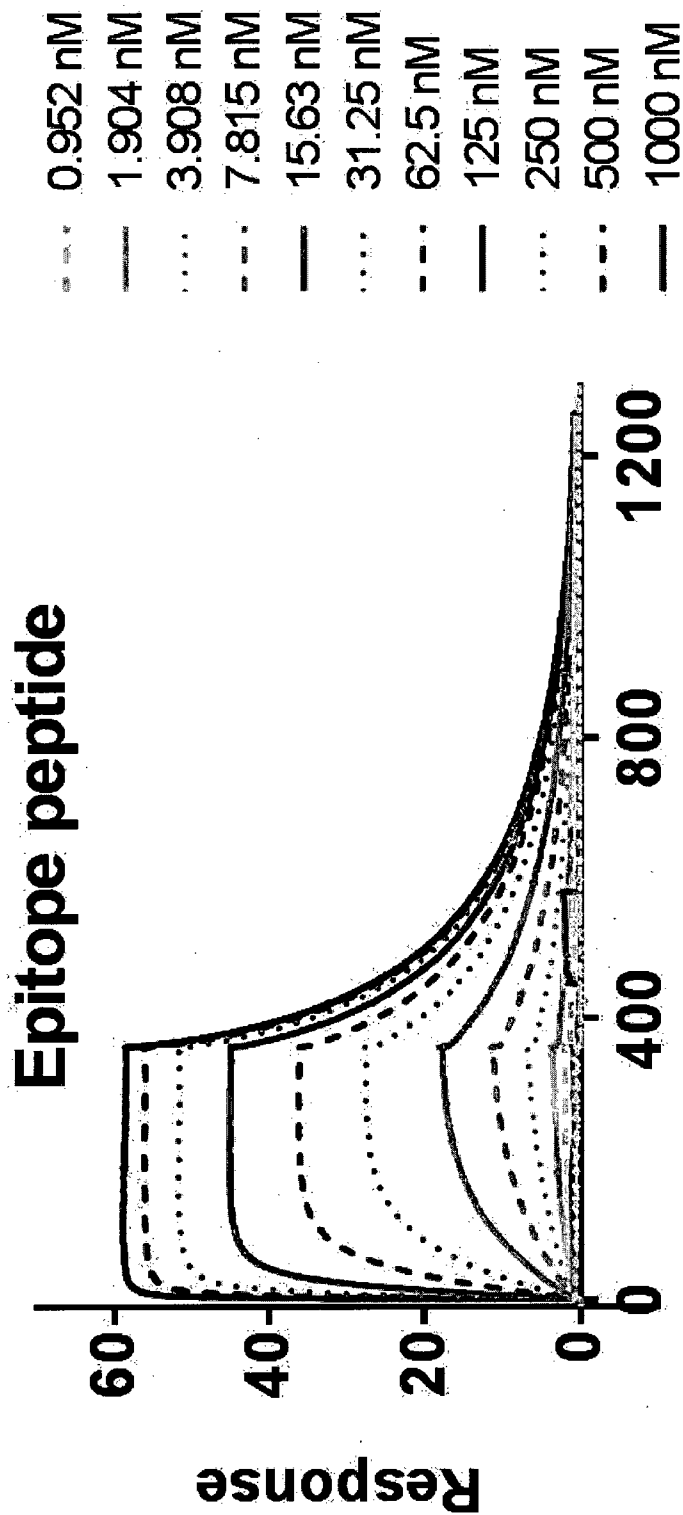
siDX2

ATGCCGATGTACCAGGTAAAGCCCTATCACGGGGGCGGCGCGCCTCTCCGTGTGG
 AGCTTCCCACCTGCATGTACCGGCTCCCCAAGCTGCACGGCAGGAGCTACGGCCC
 AGCGCCGGGCGCTGGCCACGTGCAGGATTACGGGGCGCTGAAAGACATCGTGATC
 AACGCAAACCCGGCCTCCCCTCCCCTCTCCCTGCTTGTGCTGCACAGGCTGCTCTG
 TGAGCACTTCAGGGTCCTGTCCACGGTGCACACGCACTCCTCGGTCAAGAGCGTGC
 CTGAAAACCTTCTCAAGTGCTTTGGAGAACAGAATAAAAAACAGCCCCGCCAAGACT
 ATCAGCTGGGATTCACCTTAATTTGGAAGAATGTGCCGAAGACGCAGATGAAATTCA
 GCATCCAGACGATGTGCCCCATCGAAGGCGAAGGGAACATTGCACGTTTCTTGTTT
 TCTCTGTTTGGCCAGAAGCATAATGCTGTCAACGCAACCCCTTATAGATAGCTGGGTA
 GATATTGCGATTTTTCAGTTAAAAGAGGGAAGCAGTAAAGAAAAAGCCGCTGTTTTT
 CGCTCCATGAACTCTGCTCTTGGGAAGAGCCCTTGGCTCGCTGGGAATGAACTCAC
 CGTAGCAGACGTGGTGTGTGGTCTGTACTCCAGCAGATCGGAGGCTGCAGTGTGA
 CAGTGCCAGCCAATGTGCAGAGGTGGATGAGTCTTGTGAAAACCTGGCTCCTTTT
 AACACGGCCCTCAAGCTCCTTAAGTGA

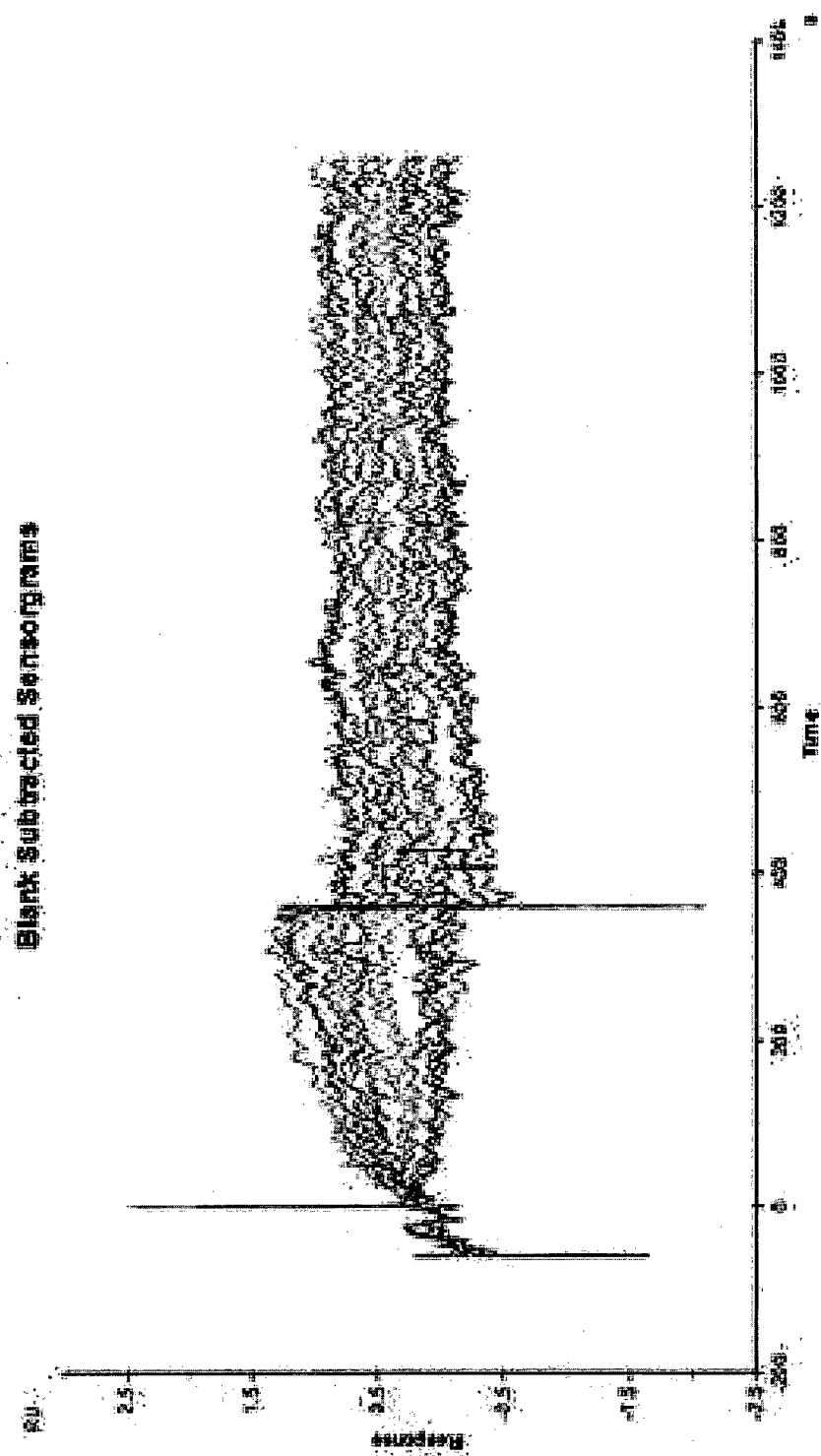
si exon4 #2

si exon4 #1

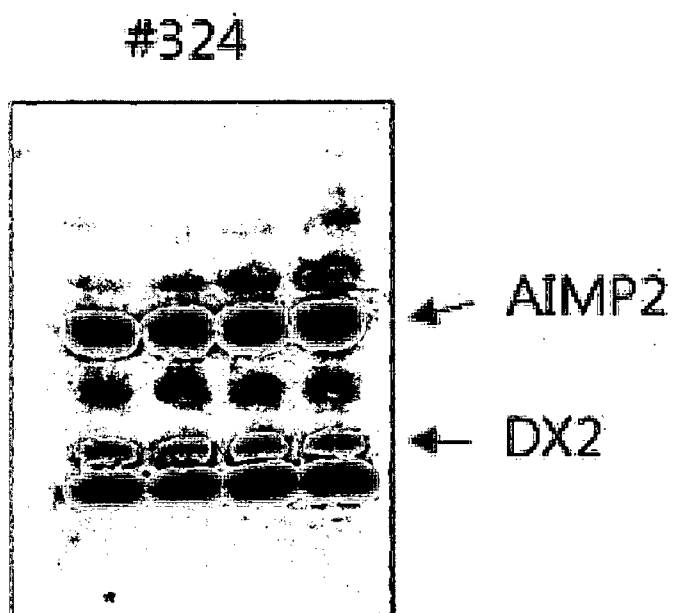
【도 4A】



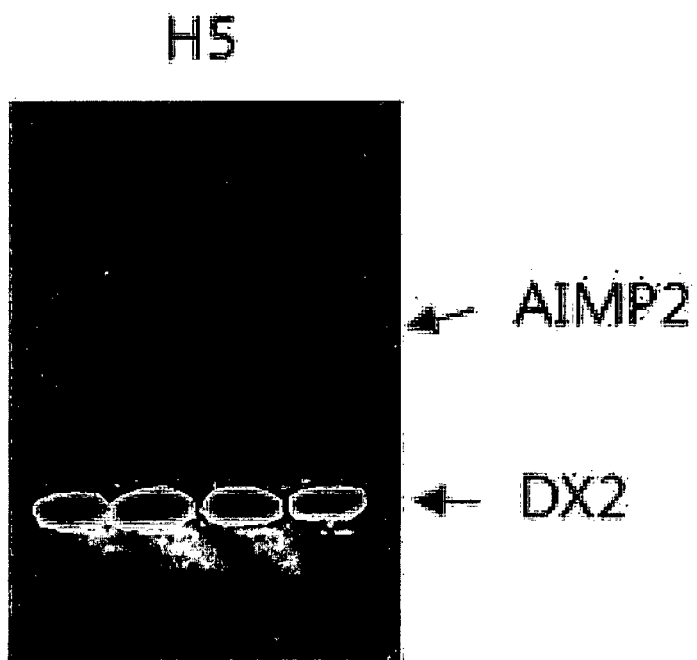
【도 4B】



【도 5A】



【도 5B】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/002631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/18; A61K 39/395; G01N 33/577; C07K 14/47; G01N 33/566; C12N 15/12; C12Q 1/68; C07K 16/30; C07K 16/40; C12N 15/63; G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: AIMP2-DX2 antibody, epitope, GHVQDYGALKD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011-0117572 A1 (KIM et al.) 19 May 2011 See abstract; claims 1-3; SEQ ID NO:2 on pages 22-23; and paragraph [0189].	1-15
A	KR 10-2015-0131655 A (MEDICINAL BIOCONVERGENCE RESEARCH CENTER) 25 November 2015 See abstract; and claims 1-17.	1-15
A	CHANG et al., "Lentiviral Vector-mediated shRNA against AIMP2-DX2 Suppresses Lung Cancer Cell Growth through Blocking Glucose Uptake", Molecules and Cells, vol. 33, pp. 553-562 (2012) See the entire document.	1-15
A	KR 10-2016-0002582 A (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 08 January 2016 See the entire document.	1-15
A	JO et al., "Rapid Detection of Exon 2-deleted AIMP2 Mutation as a Potential Biomarker for Lung Cancer by Molecular Beacons", Biosensors and Bioelectronics, vol. 46, pp. 142-149 (2013) See the entire document.	1-15
PX	US 2016-0272721 A1 (MEDICINAL BIOCONVERGENCE RESEARCH CENTER) 22 September 2016 See abstract; and claims 1-14.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 JUNE 2017 (14.06.2017)

Date of mailing of the international search report

14 JUNE 2017 (14.06.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/002631

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0117572 A1	19/05/2011	CN 101087804 A	12/12/2007
		CN 101087804 B	04/07/2012
		EP 1814909 A1	08/08/2007
		EP 1814909 A4	25/06/2008
		EP 1814909 B1	24/08/2011
		JP 2008-521398 A	26/06/2008
		JP 4718556 B2	06/07/2011
		KR 10-0762995 B1	04/10/2007
		KR 10-2006-0057992 A	29/05/2006
		US 2006-0110397 A1	25/05/2006
		US 2009-0156536 A1	18/06/2009
		US 2011-0136119 A1	09/06/2011
		US 7459529 B2	02/12/2008
		US 8003780 B2	23/08/2011
		US 8431393 B2	30/04/2013
		WO 2006-057500 A1	01/06/2006
KR 10-2015-0131655 A	25/11/2015	WO 2015-174641 A1	19/11/2015
KR 10-2016-0002582 A	08/01/2016	KR 10-1636821 B1	07/07/2016
US 2016-0272721 A1	22/09/2016	CN 101087804 A	12/12/2007
		CN 101087804 B	04/07/2012
		EP 1814909 A1	08/08/2007
		EP 1814909 A4	25/06/2008
		EP 1814909 B1	24/08/2011
		JP 2008-521398 A	26/06/2008
		JP 4718556 B2	06/07/2011
		KR 10-0762995 B1	04/10/2007
		KR 10-2006-0057992 A	29/05/2006
		US 2006-0110397 A1	25/05/2006
		US 2009-0156536 A1	18/06/2009
		US 2011-0117572 A1	19/05/2011
		US 2011-0136119 A1	09/06/2011
		US 7459529 B2	02/12/2008
		US 8003780 B2	23/08/2011
		US 8431393 B2	30/04/2013
		WO 2006-057500 A1	01/06/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/18(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/18; A61K 39/395; G01N 33/577; C07K 14/47; G01N 33/566; C12N 15/12; C12Q 1/68; C07K 16/30; C07K 16/40; C12N 15/63; G01N 33/574

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: AIMP2-DX2 항체, 에피토프, GHVQDYGALKD

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2011-0117572 A1 (KIM 등) 2011.05.19 요약; 청구항 1-3; 페이지 22-23의 SEQ ID NO:2; 및 문단 [0189] 참조.	1-15
A	KR 10-2015-0131655 A (재단법인 의약바이오컨버전스연구단) 2015.11.25 요약; 및 청구항 1-17 참조.	1-15
A	CHANG 등, 'Lentiviral vector-mediated shRNA against AIMP2-DX2 suppresses lung cancer cell growth through blocking glucose uptake' Molecules and Cells, Vol.33, pp.553-562 (2012) 전체 문헌 참조.	1-15
A	KR 10-2016-0002582 A (부산대학교 산학협력단) 2016.01.08 전체 문헌 참조.	1-15
A	JO 등, 'Rapid detection of exon 2-deleted AIMP2 mutation as a potential biomarker for lung cancer by molecular beacons' Biosensors and Bioelectronics, Vol.46, pp.142-149 (2013) 전체 문헌 참조.	1-15
PX	US 2016-0272721 A1 (MEDICINAL BIOCONVERGENCE RESEARCH CENTER) 2016.09.22 요약; 및 청구항 1-14 참조.	1-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 06월 14일 (14.06.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 06월 14일 (14.06.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



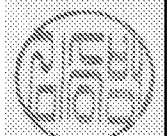
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0117572 A1	2011/05/19	CN 101087804 A CN 101087804 B EP 1814909 A1 EP 1814909 A4 EP 1814909 B1 JP 2008-521398 A JP 4718556 B2 KR 10-0762995 B1 KR 10-2006-0057992 A US 2006-0110397 A1 US 2009-0156536 A1 US 2011-0136119 A1 US 7459529 B2 US 8003780 B2 US 8431393 B2 WO 2006-057500 A1	2007/12/12 2012/07/04 2007/08/08 2008/06/25 2011/08/24 2008/06/26 2011/07/06 2007/10/04 2006/05/29 2006/05/25 2009/06/18 2011/06/09 2008/12/02 2011/08/23 2013/04/30 2006/06/01
KR 10-2015-0131655 A	2015/11/25	WO 2015-174641 A1	2015/11/19
KR 10-2016-0002582 A	2016/01/08	KR 10-1636821 B1	2016/07/07
US 2016-0272721 A1	2016/09/22	CN 101087804 A CN 101087804 B EP 1814909 A1 EP 1814909 A4 EP 1814909 B1 JP 2008-521398 A JP 4718556 B2 KR 10-0762995 B1 KR 10-2006-0057992 A US 2006-0110397 A1 US 2009-0156536 A1 US 2011-0117572 A1 US 2011-0136119 A1 US 7459529 B2 US 8003780 B2 US 8431393 B2 WO 2006-057500 A1	2007/12/12 2012/07/04 2007/08/08 2008/06/25 2011/08/24 2008/06/26 2011/07/06 2007/10/04 2006/05/29 2006/05/25 2009/06/18 2011/05/19 2011/06/09 2008/12/02 2011/08/23 2013/04/30 2006/06/01