

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 6월 3일 (03.06.2021)



(10) 국제공개번호
WO 2021/107725 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/18 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/017197
- (22) 국제출원일: 2020년 11월 27일 (27.11.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0156418 2019년 11월 29일 (29.11.2019) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR). 울산과학기술원 (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) [KR/KR]; 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 성균관대학교 산학협력단 (RESEARCH BUSINESS FOUN-

DATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR).

- (72) 발명자: 김동욱 (KIM, Dong Wook); 07345 서울시 영등포구 여의동로 213, Seoul (KR). 김홍태 (KIM, Hong Tae); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 김용환 (KIM, Yong Hwan); 04310 서울시 용산구 청파로 47길 100, Seoul (KR). 안유리 (AN, Yu Ri); 06170 서울시 강남구 봉은사로 114길 12, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울시 송파구 법원로 135 6층, 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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW,

(54) Title: COBLL1 PROTEIN-SPECIFIC ANTIBODY OR ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF, AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭: Cobll1 단백질 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이의 용도

▪ Heavy chain 서열 분석 결과 AA

	FR1_VH	CDR1_VH	FR2_VH	CDR2_VH	FR3_VH	CDR3_VH	FR4_VH
3A11	EVNLVESGGGGLKFKGGSLKSCAAG	QRTFSST	NSWVQTFRKLEWAT	ISSGGGNT	YYDSVGRFTTISQNAQNLFLQSSSLKSEGTAFYTC	ARCTGSLTFAY	WQGTTLVGA
4B8	QVQLQSGGASLPASVMSCKAS	GYTFSTV	QWVQRPQGLWGA	ITPGGQOT	RYTERFQKATLPAKSSSTAYMQLSSLSASDQAVYTC	ADPAY	WQGTTLVGS
5C12	EVQLVDSGGGLKFKGGSLKSCAAS	QRTFSQV	NSWVQTFRKLEWAT	ISSGGGNT	YYDSVGRFTTISQNAQNLFLQSSSLKSEGTAFYTC	ARCTGSLTFAY	WQGTTLVGS
6A2	EVQLVESGGGGLKFKGGSLKSCAAS	QRTFSQV	NSWVQTFRKLEWAA	ISSGGGNT	YYDSVGRFTTISQNAQNLFLQSSSLKSEGTAFYTC	ARCTGSLTFAY	WQGTTLVGS
18D12	EVQLVESGGGGLKFKGGSLKSCAAG	QRTFSST	NSWVQTFRKLEWAT	ISSGGGNT	YYDSVGRFTTISQNAQNLFLQSSSLKSEGTAFYTC	ARCTGSLTFAY	WQGTTLVGS

▪ Light chain 서열 분석 결과 BB

	FR1_VL	CDR1_VL	FR2_VL	CDR2_VL	FR3_VL	CDR3_VL	FR4_VL
3A11	DVLMQTPLSLPVSLGGQASISCRSS	QSVHSQNTY	LSNVLKRPQSPKLLSY	KVS	RRFSQVPRFSGGSGGTFTLISIKVNAEDQVYFC	QSSRVFNT	FGGTSLKIX
4B8	DVLTQSPAPSLAVSLQRATISCKAS	ESVDNYGIST	MMPTQRPQSPKLLSY	AAS	NQGSQVPRFSGGSGGTFTLISIKVNAEDQVYFC	QSSRVFNT	FGGTSLKIX
5C12	DVLMQTPLSLPVSLGGQASISCRSS	QSVHSQNTY	LSNVLKRPQSPKLLSY	KVS	RRFSQVPRFSGGSGGTFTLISIKVNAEDQVYFC	QSSRVFNT	FGGTSLKIX
6A2	DVLMQTPLSLPVSLGGQASISCRSS	QSVHSQNTY	LSNVLKRPQSPKLLSY	KVS	RRFSQVPRFSGGSGGTFTLISIKVNAEDQVYFC	QSSRVFNT	FGGTSLKIX
18D12	DVLMQTPLSLPVSLGGQASISCRSS	QSVHSQNTY	LSNVLKRPQSPKLLSY	KVS	RRFSQVPRFSGGSGGTFTLISIKVNAEDQVYFC	QSSRVFNT	FGGTSLKIX

AA ... Heavy chain sequence analysis result

BB ... Light chain sequence analysis result

(57) Abstract: The present invention relates to a Cobll1 protein-specific antibody or antigen-binding fragment thereof, and to uses thereof. The antibody or antigen-binding fragment thereof of the present invention effectively detects Cobll1 protein, and may be effectively used in a progression stage of chronic myeloid leukemia (CML) or in a method for diagnosing cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 Cobll1 단백질에 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Cobll1 단백질을 효과적으로 검출하여, 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia; CML)의 진행 단계 또는 암의 진단 방법에 효과적으로 사용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/107725 A1



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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: Cobll1 단백질 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 Cobll1 단백질에 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 백혈병(leukemia)은 백혈구가 종양성으로 증식하는 질환을 총칭한다. 백혈병의 종류는 백혈병이 기원하는 백혈구에 따라 골수성 백혈병과 림프성 백혈병으로 나눌 수 있고, 진행속도에 따라 급성 백혈병과 만성 백혈병으로 나뉜다. 백혈병의 임상학적 양상은 질환의 유형과 침범한 세포의 성질에 따라 다양하다. 림프성 백혈병은 림프계 혈액세포가, 골수성 백혈병은 골수계 혈액세포가, 그리고 만성 골수성 백혈병은 변이가 생긴 조혈모세포(hematopoietic stem cell; HSC)의 악성 클론들에 의해서 발생한다.
- [4] 특히, 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia; CML)은 조혈모세포가 골수 내에서 대량 증식하여 비정상적으로 증가한 각종 혈구 세포가 말초 혈액이나 기타 장기를 침습하는 악성 혈액 질환으로 성인에서 주로 발병하는 악성 혈액암이다. 만성 골수성 백혈병은 만성기(chronic phase; CP), 가속기(accelerated phase; AP) 및 급성기(blast crisis; BC)의 세 가지 임상 단계를 통해 진행된다. 만성 골수성 백혈병의 진단을 위한 가장 일반적인 방법은 염색체 검사를 통해서 필라델피아 염색체를 발견하는 것이다. 실제 만성 골수성 백혈병 환자의 95% 정도에서 9번 염색체와 22번 염색체 사이의 전좌가 발견되며, 상기 전좌는 9번 염색체의 q34 위치에 존재하는 abl(abelson oncogene) 유전자 일부가 22번 염색체 q11.2 위치에 존재하는 bcr(break point cluster region) 유전자로 전위되어 형성되는데, 이러한 재배열을 BCR-ABL1 재배열(BCR-ABL1 rearrangement)이라고 한다.
- [5] 일반적으로, BCR-ABL1 융합 유전자를 초래하는 전위는 CML 개시의 주요 원인이며, BCR-ABL1 융합 유전자는 항상적으로 활성화된(constitutively active) 티로신 키나아제인 BCR-ABL1 융합 단백질을 암호화한다. 이매티닙(imatinib)은 BCR-ABL1을 표적으로 하는 최초의 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor; TKI)로서, CML 치료에 매우 효과적임이 밝혀졌다. 그러나 이매티닙은 이매티닙 치료에 대한 primitive CML 세포의 내성(resistance) 및 비감수성(insensitivity)으로 인해, CML 클론을 완전히 제거할 수 없다는 문제가 있다. 그 외에도, 닐로티닙(nilotinib)이 TKI로서 CML 치료에 사용되고 있다. ATP 및 allosteric 부위 억제제를 포함한 차세대 BCR-ABL1 TKI의 개발에도 불구하고

일부 환자는 급성기로의 진행 단계에서 여전히 TKI에 대한 내성을 나타낸다. 이러한 내성은 BCR-ABL1 키나아제 의존성이거나 또는 비의존성인 것으로 밝혀졌다. 대다수의 환자는 점 돌연변이(point mutation)나 증폭(amplification)과 같은 BCR-ABL1 키나아제 의존성 메커니즘을 통해 내성을 나타내는 반면, BCR-ABL1 비의존성 내성의 존재는 TKI 내성의 다른 메커니즘이 있음을 시사한다.

- [6] 그 외에도 만성 골수성 백혈병의 급성기에서는 상당수의 환자가 표적항암제에 내성을 보이는데, 병기의 진단이 이루어지지 못한 채 항암제 치료를 진행하다가 골수이식 등의 대체적인 치료 전략을 세우는 시기 등이 지연되는 문제가 발생하기도 한다.
- [7] 따라서 만성 골수성 백혈병에 대한 새로운 바이오마커로서의 단백질을 확인하고 이의 기능을 분석하는 연구가 진행되고 있다.
- [8] Cobll1(Cordon-bleu protein-like 1) 단백질은 세포사멸의 음성 조절인자(negative regulator)로 알려져 있으며 낮은 인슐린 내성과 관련되어 있다. 또한, Cobll1의 발현이 높은 CML 환자의 경우 임상 결과가 좋지 않다고 알려져 있다. 특히 Cobll1 단백질은 CML의 진행 초기인 만성기(CP)에서는 발현되어 있지 않으나, 급성기(BP)에서 발현이 확연히 증가하여, Cobll1 단백질이 CML의 급성기로의 진행과 연관되어 있음이 확인된 바 있다. 또한 Cobll1의 발현시 TKI에 내성을 갖는 것으로 연구된 바 있다(특허문헌 1). 나아가 Cobll1은 CML에서 NF-κB 신호 전달 경로의 활성화를 통해 TKI 내성과 모세포 전환(blastic transformation)을 유도하는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 1).
- [9] (특허문헌 1) 한국등록특허 제10-1820572호
- [10] (비특허문헌 1) Han, S., et al. Cobll1 is linked to drug resistance and blastic transformation in chronic myeloid leukemia. Leukemia 31, 1532 (2017)
- [11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명에서는 만성 골수성 백혈병(CML)의 급성기 세포 또는 기존의 표적 항암제에 내성을 보이는 세포에서 많이 발현되는 Cobll1 단백질을 검출함으로써, CML의 발병 또는 진행을 조기에 진단하여 환자의 예후를 보다 신속하고 정확하게 예측하는 것을 목적으로 한다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 이를 위해 본 발명에서는 Cobll1 단백질에 특이적인 항체를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [15] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Cobll1 단백질을 효과적으로 검출하여, 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia; CML)의 진행 단계 또는

암의 진단 방법에 효과적으로 사용될 수 있다.

[16]

발명의 효과

[17] 본 발명에 따른 신규한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하여, Cobll1 단백질을 효과적으로 검출할 수 있다.

[18] 따라서 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이용함으로써, 만성 골수성 백혈병의 급성기, 또는 자궁경부암 또는 골육종을 신속하고, 정확하며, 간편하게 진단할 수 있어, 만성 골수성 백혈병 또는 암의 진단, 예방, 치료 등의 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

[19] 또한 본 발명의 항체를 이용한 ELISA 키트를 사용함으로써, 시료의 대량 검사가 가능하며, 분자적 진단으로써의 응용 가능성을 기대할 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 Ni-NTA 컬럼을 이용하여 Cobll1 단백질의 N-말단 부위의 항원을 정제한 결과를 나타낸다.

[22] 도 2는 실시예 1에서 발현 및 정제된 Cobll1 단백질의 N-말단 부위의 항원에 대해 Western blot을 수행한 결과를 나타낸다.

[23] 도 3 및 4는 각각 실시예 1에서 제조된 단클론항체가 Myc-Cobll1 단백질을 과발현하는 293T 세포(Myc-Cobll1) 및 CML 급성기 환자 세포(KRCMC 1885 PBMC, BC)에서 발현되는 Cobll1 단백질을 정상적으로 검출하였음을 보여주는 Western blot 결과이다.

[24] 도 5는 실시예 2에서 제조된 다클론항체가 Cobll1 단백질을 정상적으로 검출하였음을 보여주는 Western blot 결과이다. K562는 인간 유래 만성골수성백혈병 세포, 293T는 인간 유래 신장세포, HeLa는 인간 유래 자궁경부암 세포, H1299는 인간 유래 폐암 세포를 나타낸다.

[25] 도 6은 단클론항체 3A11, 4H8, 5C12, 6A2 및 18D12의 VH 및 VL의 아미노산 서열을 나타낸다.

[26] 도 7 내지 11은 각각 단클론항체 3A11, 4H8, 5C12, 6A2 및 18D12의 VH 및 VL의 아미노산 서열 및 염기 서열을 나타낸다.

[27]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[28] 본 발명은 Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[29] 구체적으로, 본 발명의 Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 (1) 내지 (5)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[30] (1) 서열번호 1의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 2의 서열을 갖는 CDRH2; 및

서열번호 3의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 4의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 5의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 6의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[31] (2) 서열번호 7의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 8의 서열을 갖는 CDRH2; 및 서열번호 9의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 10의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 11의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 12의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[32] (3) 서열번호 13의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 14의 서열을 갖는 CDRH2; 및 서열번호 15의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 16의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 17의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 18의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[33] (4) 서열번호 19의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 20의 서열을 갖는 CDRH2; 및 서열번호 21의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 22의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 23의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 24의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[34] (5) 서열번호 25의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 26의 서열을 갖는 CDRH2; 및 서열번호 27의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 28의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 29의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 30의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[35] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 표 1의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함하는 항체 1 내지 항체 5 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

[36]

[37] [표1]

구분	중쇄 CDR			경쇄 CDR		
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
항체 1 (3A11)	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	서열번호 4	서열번호 5	서열번호 6
항체 2(4H8)	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	서열번호 11	서열번호 12
항체 3(5C12)	서열번호 13	서열번호 14	서열번호 15	서열번호 16	서열번호 17	서열번호 18
항체 4(6A2)	서열번호 19	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23	서열번호 24
항체 5(18D12)	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27	서열번호 28	서열번호 29	서열번호 30

[38] 또다른 실시태양에서, 본 발명의 Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 (6) 내지 (10)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[39] (6) 서열번호 31의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 32의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[40] (7) 서열번호 33의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 34의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[41] (8) 서열번호 35의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 36의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[42] (9) 서열번호 37의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 38의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[43] (10) 서열번호 39의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 40의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[44] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 표 2의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 1 내지 항체 5 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

[45]

[46] [표2]

구분	중쇄 가변 영역	경쇄 가변 영역
항체 1 (3A11)	서열번호 31	서열번호 32
항체 2 (4H8)	서열번호 33	서열번호 34
항체 3 (5C12)	서열번호 35	서열번호 36
항체 4 (6A2)	서열번호 37	서열번호 38
항체 5 (18D12)	서열번호 39	서열번호 40

[47]

[48] 또다른 실시태양에서, 본 발명의 Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 (11) 내지 (15)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[49] (11) 서열번호 41의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 42의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[50] (12) 서열번호 43의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 44의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[51] (13) 서열번호 45의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 46의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[52] (14) 서열번호 47의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 48의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[53] (15) 서열번호 49의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 50의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[54] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 표 3의 염기 서열에 의해 각각 암호화되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 1 내지 항체 5 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

[55]

[56] [표3]

구분	중쇄 가변 영역	경쇄 가변 영역
항체 1 (3A11)	서열번호 41	서열번호 42
항체 2 (4H8)	서열번호 43	서열번호 44
항체 3 (5C12)	서열번호 45	서열번호 46
항체 4 (6A2)	서열번호 47	서열번호 48
항체 5 (18D12)	서열번호 49	서열번호 50

[57]

[58] 본 발명에서 "항체(Antibody)"는 Cobll1 단백질과 같은 항원에 특이적으로 결합하고 인식하는 폴리펩티드를 의미한다. 본 발명은 Cobll1 단백질에 결합하는 완전한 항체 형태뿐만 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함한다.

[59] 본 발명에서 "항체"는 단클론항체, 다클론항체 및 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체)를 모두 포함할 수 있다. 항체는 2개의 중쇄(heavy chain)와 2개의 경쇄(light chain)로 구성되며, 대상 항원의 종류에 따라 아미노산 서열이 달라지는 가변 영역(variable region)과 서열이 달라지지 않는 불변 영역(constant region)을 갖는다.

[60] 바람직하게는, 본 발명에서 상기 항체는 단클론항체일 수 있다. 가장 바람직하게는, 상기 항체는 본원에서 3A11, 4H8, 5C12, 6A2 또는 18D12로 지칭되는 단클론항체일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "단클론항체(monoclonal antibody)"는 상기 항체 분자가 단일 분자로 구성되도록 제조된 것을 의미한다. 단클론항체는 동일한 에피토프를 갖는 항원에 대해서만 반응하는 특이성을 가지며, 또한 특정 에피토프에 대해서만 친화성을 나타낸다. 본 발명의 단클론항체는 Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다. 다르게는, 본 발명의 단클론항체는 140 kDa 또는 180 kDa 크기의 Cobll1 단백질의 소단편(small fragment) 또는 이소형 단백질에 특이적으로 결합할 수 있다. 일

실시태양에서, 본 발명의 18D12 단클론항체는 180 kDa 크기의 Cobll1 단백질의 소단편(small fragment) 또는 이소형 단백질에 특이적으로 결합할 수 있다. 본 발명의 3A11 또는 6A2 단클론항체는 140 kDa 크기의 Cobll1 단백질의 소단편(small fragment) 또는 이소형 단백질에 특이적으로 결합할 수 있다.

- [61] 발명의 일 실시태양에서, 상기 단클론항체는 하이브리도마 세포주에서 생산되는 것일 수 있다. 상기 하이브리도마 세포는 당업계에서 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 상기 하이브리도마 세포는 항원 단백질을 동물에 면역시키고, 상기 피면역 동물로부터 유래된 항체 생산세포인 B 세포를 골수종세포와 융합시켜서 하이브리도마를 제조한 다음, 그 중에서 항원 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마를 선택하는 방법으로 제조할 수 있다. 상기 피면역 동물은 실시예에서 사용된 마우스뿐만 아니라 염소, 양, 모르모트, 래트 또는 토끼와 같은 동물을 사용할 수 있다.
- [62] 이에 따라 본 발명은 또한 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.
- [63]
- [64] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄는 IgG, IgM, IgD, IgA의 타입을 가지고, 경쇄는 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다. 바람직하게는, 본 발명의 상기 항체에서 중쇄는 IgM이고, 경쇄는 카파 타입일 수 있다.
- [65] 경쇄 및 중쇄의 가변 영역들은 "상보성 결정 부위(complementarity-determining region, CDR)"라고 하는 매우 가변적인 3개의 영역을 포함한다. CDR은 항원의 에피토프(epitope)에 결합하며, 각 체인의 CDR은 전형적으로 3개의 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 갖는다. 본원에서는 중쇄의 CDR을 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3로, 경쇄의 CDR을 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3로 표기하기도 한다. 이러한 CDR은 각 항체에 있어 항원 특이성에서 매우 중요한 부위이며, 따라서 항체를 특정하는데 있어 가장 중요한 부분이다.
- [66] 본원에서 사용된 용어 "(항체의) 항원 결합 단편"은 항체 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab(fragment antigen binding)는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합부위를 가진다. F(ab')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 F(ab')의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역이 연결되어 있고 단쇄

Fv(single-chain variable fragment, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있음), 또는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[67] 본원에서 사용된 용어 "프레임워크(Framework)" 또는 "FR"은 CDR로도 불리는 초가변 영역(hypervariable region, HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 나타낸다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4 개의 FR 도메인 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 구성된다. 따라서, HVR (CDR) 및 FR 서열은 일반적으로 중쇄 가변 영역(VH)에서 다음의 순서로 나타난다:

[68] FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4.

[69] 또한, HVR (CDR) 및 FR 서열은 일반적으로 경쇄 가변 영역(VL; 경쇄의 타입에 따라 V_K 또는 V_L로도 표기됨)에서 다음의 순서로 나타난다:

[70] FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4.

[71] 본원에서 사용된 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 이와 같은 것은, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 scFv와 같은 다른 구성물이 생리적 조건 하에서 비교적 안정한 항원과 복합체를 형성한다는 것을 의미한다. 특이적 결합은 적어도 약 1×10^{-6} M이하의 평형 해리 상수 (예를 들어, 이보다 작은 KD는 보다 단단한 결합을 나타냄)로 특성화될 수 있다. 2 개의 분자가 특이적으로 결합하는지 여부를 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져있으며, 예를 들어 평형 투석, 표면 플라즈몬 공명 등을 포함한다.

[72] 본 발명의 상기 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체일 수 있다.

[73] 본원에서 사용된 용어 "인간 항체(human antibody)" 또는 "인간화 항체(humanized antibody)"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성된 항체, 또는 인간 항체 레퍼토리(repertoires) 또는 다른 인간 항체 코딩 서열을 이용하는 비인간 근원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유한다.

[74] 본원에서 사용된 용어 "키메라(chimeric) 항체"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 근원(source) 또는 종(species)으로부터 유래되고, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 상이한 근원 또는 종에서 유래한 항체를 의미한다.

[75] 본 발명의 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, Cobll1 단백질을 특이적으로 인식할 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.

- [76] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 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.
- [77] 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.
- [78]
- [79] 본 발명은 또한 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 제공한다.
- [80] 본 발명의 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 본 발명의 핵산은 상기한 뉴클레오타이드 염기 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 염기 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 염기 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 염기 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 문헌 [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)] 및 [Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)] 등에 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, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 ncbi 웹사이트의 BLAST 페이지를 통하여 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 ncbi 웹사이트의 BLAST help 페이지에서 확인할 수 있다.
- [81]
- [82] 본 발명은 또한 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

- [83] 본 명세서에서 용어 "발현 벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위하여, 발현시킬 뉴클레오타이드 염기 서열에 작동가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스 작용 인자(cis-acting element)를 포함하고, 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포 또는 시험관 내 발현 시스템에 의해 제공될 수 있다. 상기 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 그리고 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로 바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 일례에서, 본 발명의 벡터에서 상기 스위치 분자를 코딩하는 핵산 분자는 상기 벡터의 프로모터와 작동적으로 연결(operatively linked)되어 있다. 본원에서 사용된 용어 "작동적으로 연결"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [84] 본 발명의 재조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)] 등에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [85] 본원에서 사용된 용어 "클로닝(cloning)"은 동일한 유전자를 대량 생산하는 유전 공학기술로, 유전자 또는 DNA 절편을 대량 생산하기 위하여 벡터(vector)로 작용하는 플라스미드 또는 바이러스에 도입하여 세포분열을 통하여 유전적으로 동일한 클론을 복제하는 기술을 의미한다.
- [86] 본원에서 사용된 용어 "cDNA"는 mRNA와 상보적인 DNA를 의미한다.
- [87] 본원에서 사용된 용어 "클론(clone)"은 동일한 복제물을 의미하는 것으로, 동일한 세포집단 또는 특정 유전자 절편의 동일한 복제물을 뜻한다.
- [88] 본원에서 사용된 용어 "형질전환(transformation)"은 외래 유전자를 숙주 세포로 도입하여 숙주 세포의 유전적인 성질이 변하는 것을 의미하고, 숙주가 진핵세포인 경우에는 "형질주입(transfection)"이라는 용어를 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 형질전환은 외래 유전자를 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 모든 방법을 포함할 수 있고, 바람직하게는 외래 유전자를 대장균에 도입하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 형질전환하는 방법으로는 전기천공법, 리포솜을 이용한 방법, Ca^{++} 을 이용한 DNA 운반 방법 등 일반적으로 쓰이는 방법을 사용할 수 있다.
- [89]
- [90] 본 발명은 또한 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트를 제공한다.
- [91] Cobll1 단백질의 경우, CML의 진행 초기인 만성기(CP)에는 Cobll1이 발현되어 있지 않지만 급성기(BC)에 도달한 환자 치료에서는 Cobll1 단백질의 발현량이

확연하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한 자궁경부암 세포인 HeLa 세포와 골육종 세포인 U2OS 세포에서도 Cobll1 단백질이 발현되어 있는 것을 확인하였다.

[92] 이에 따라 본 발명의 키트는 만성 골수성 백혈병의 급성기의 진단, 또는 자궁경부암 또는 골육종의 진단에 사용될 수 있다.

[93] 본 발명의 Cobll1 단백질 검출용 키트에는 검사대상시료를 채취 또는 검출 시약을 적용하기 위한 도구, 항원-항체 결합을 확인하기 위한 시약 또는 장치 등 항체를 사용하여 생물학적 시료로부터 항원 단백질의 존재유무를 확인하는 통상의 검출 또는 진단 키트에 포함될 수 있는 도구, 장치 또는 시약이 더 포함될 수 있다.

[94] 본 발명의 키트는 Cobll1 단백질을 면역분석 방법에 따라 검출하여 만성 골수성 백혈병의 급성기의 진단, 또는 자궁경부암 또는 골육종의 진단에 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 또는 면역염색 포맷은, 예를 들어, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 효소결합면역측정법(ELISA), 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색, 면역친화성 정제, 면역 크로마토그래피(immunochromatography) 등을 포함할 수 있다.

[95] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 샌드위치 효소결합면역측정법(Sandwich ELISA)에 사용하기 위한 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 키트는 포획 항체(capturing antibody)로서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부위; 및 검출 항체(detection antibody)로서 Cobll1 단백질에 대한 다클론항체를 포함하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트일 수 있다. 상기 포획 항체로서의 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 바람직하게는 단클론항체일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 단클론항체 3A11, 4H8, 5C12, 6A2 또는 18D12일 수 있다. 상기 검출 항체로서의 다클론항체는 바람직하게는 서열번호 53의 아미노산 서열을 갖는 Cobll1 단백질의 C-말단 부위에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.

[96] 상기 검출 항체는 검출 표지와 연결될 수 있다. 검출 표지의 구체적인 예로는 화학물질(예를 들어, 비오틴), 효소(예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스래디쉬 퍼옥시다아제(Horseradish peroxidase, HRP) 및 사이토크롬 P450), 방사능물질(예를 들어, C14, I125, P32 및 S35), 형광물질(예를 들어, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 검출 표지는 비오틴이다.

[97] 상기 검사대상시료는 개체로부터 유래된 생물학적 물질일 수 있다. 상기 개체는 척추동물일 수 있다. 상기 척추동물은 포유동물, 바람직하게는 인간일 수 있다. 상기 시료는 개체로부터 채취되거나 분리된 것, 예를 들어, 혈액 또는 혈액 구성성분(blood constituent), 체액(bodily fluid), 타액, 가래, 또는 이들의 조합일 수

있다.

- [98] 본 발명은 상기 검출 키트를 사용하여, 상기 포획항체 및 검출항체를 검사대상시료와 접촉시켜, 이로부터 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 Cobll1 단백질의 검출 방법을 제공한다. 일 실시태양에서, 본 발명의 검출 방법은
- [99] (a) (i) 검사대상시료;
- [100] (ii) 포획 항체로서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부위; 및
- [101] (iii) 검출 항체로서 Coll1 단백질에 특이적으로 결합하는 다클론항체
- [102] 를 포함하는 배지를 제공하는 단계;
- [103] (b) 상기 포획 항체 및 상기 검출 항체가 Coll1 단백질과 결합하는 조건 하에 상기 배지를 인큐베이션하는 단계; 및
- [104] (c) 상기 포획 항체와 Coll1단백질이 결합한 부분 이외의 항원결정기(epitope)에 결합된 검출 항체의 검출 표지의 수준을 측정하는 단계
- [105] 를 포함한다.
- [106] 본원에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"란, 시료 중의 Cobll1 단백질 항원과 이를 인지하는 본 발명에 따른 항체의 결합물을 의미한다. 이러한 항원-항체 복합체는 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particlecounting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 군에서 선택되는 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 상기 검출에 의해, Cobll1 단백질을 정성적 또는 정량적 분석할 수 있다.

[107]

발명의 실시를 위한 형태

- [108] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.
- [109]
- [110] [실시예 1]
- [111] 항원 제작 및 정제
- [112] Cobll1 단백질에 대한 단클론항체를 제조하기 위해, Cobll1 단백질(서열번호 51)의 2차 구조 분석 및 hydrophobicity & antigenicity 분석을 통해 Cobll1 단백질의 N-말단을 선택하여 항원을 제작하였다.
- [113] Cobll1 단백질의 N-말단 1-330 mutant를 발현하는 벡터를 제작하기 위하여 하기 두가지 프라이머를 이용하여 PCR 한 후, 그 결과 증폭된 DNA 조각을 분리하여 Gateway plasmid system인 pDONR223에 클로닝 하였다. Entry vector를 제작한 이후에 His-tag이 있는 pDEST17 vector에 LR reaction 한 이후, 이 벡터를 항체 개발을 위한 항원 정제에 이용하였다. 상기 벡터를 E.coli, BL21(DE3) 균주에

형질 전환하고, 단백질을 발현을 유도하였다. Ni-NTA 컬럼을 이용하여 발현된 Cobll1 N-말단 항원을 분리·정제하였다(도 1). 분리·정제한 단백질에 대해 His-tag 항체를 이용하여 Western blot을 수행하여 목적하는 항원이 정제되었음을 확인하였다(도 2).

[114] [표4]

Cobll1_5'_ATTB 1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AAT GGA CGG CCG AAC CCC GCG
Cobll1_3' for 300_ATT2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA CAT CGG GGG CAG TGG AGC

[115]

[116] [실시예 2]

[117] 단클론항체의 제조

[118] 실시예 1에서 정제한 항원을 BALB/C 마우스에 주사하여 1차 면역접종하였다. 그로부터 2주 후 항원을 다시 주사하여 2차 면역접종하였다. 마우스에서 채혈하여 ELISA로 항체 역가를 측정하여 면역반응 테스트를 수행하였다. 측정된 역가가 적합한 항체가 생성되었다고 할 수 있는 기준 역가(serum dilution 1:1000에서 O.D.> 1.5) 이상이 될 때까지, 매 2주마다 항원을 주사하여 면역반응을 증강시켰다.

[119] 그 후 마우스의 비장을 절제하고 B 세포를 분리하여 마우스의 골수종 세포(myeloma cell)와 융합한 후, 배양하였다. 배양 상층액을 이용하여 ELISA를 수행하였다. ELISA 결과에서 양성결과를 보인 well의 세포를 96 well 플레이트로 분주하였다. 1차 클로닝 후 콜로니가 형성되면 ELISA를 수행하여 양성결과를 나타낸 well 중에서 O.D.값이 높고 well 내 콜로니가 1개인 positive well을 선정하여 2차 클로닝하였다. 이와 같은 방식으로 3차에 걸쳐 클로닝을 수행하였고 ELISA 스크리닝을 통해 ELISA score가 가장 높은 클론들을 선별하여 하이브리도마 세포주 3A11, 4H8, 5C12, 6A2 및 18D12를 얻었다. 이를 배양하여 단클론항체 3A11, 4H8, 5C12, 6A2 및 18D12를 획득하였다.

[120] 단클론항체가 정상적으로 제조되었는지를 확인하기 위해, Myc-Cobll1 단백질을 과발현하는 293T 세포(Myc-Cobll1), 실제 CML 급성기 환자의 혈액(KRCMC 1885 PBMC, BC), CML 만성기 환자의 혈액(KRCMC 1922, PBMC, CP)를 이용하여 Western blot을 수행하였다. Western blot의 loading control로서 actin을 사용하였다. 그 결과는 도 3 및 4에 나타난 바와 같이, 제조된 5개의 단클론항체 모두 Myc-Cobll1 단백질 과발현 세포(Myc-Cobll1) 및 CML 급성기 환자 세포(KRCMC 1885 PBMC, BC)에서 발현되는 Cobll1 단백질을 검출하였음을 확인하였다. CML 만성기 환자 세포(KRCMC 1922, PBMC, CP)에서는 Cobll1 단백질이 검출되지 않았다.

[121]

[122] [실시예 3]

[123] 다클론항체의 제조

[124] 항체 제조를 위하여 GST-벡터에 Cobll1 단백질의 C-말단 부위(서열번호 53)의 유전자 서열을 삽입하고, 이 벡터를 항원(antigen)으로서 피하 주사를 통하여 토끼에 1차 주입하였다. 2주 후에 벡터를 다시 2차 주입한 후에 55일째 채혈하였고, 채혈된 토끼의 혈액으로부터 Aminolink Coupling Gel Column Kit를 이용하여 정해진 프로토콜에 따라 Rabbit-anti-Cobll1 antibody를 분리하였다.

[125] 그 결과는 도 5에 나타난 바와 같이, 제조된 다클론항체는 Cobll1 단백질을 발현하는 세포, 즉, 만성골수성백혈병 세포(K562), 신장세포(293T), 자궁경부암 세포(HeLa), 폐암 세포(H1299)에 결합하는 것을 확인하였다. 이로부터 Cobll1 단백질에 결합하는 다클론항체가 정상적으로 제조되었음을 확인하였다.

[126]

[127] [실시예 4]

[128] 단클론항체의 서열 분석

[129] 실시예 2에서 얻은 5개의 단클론항체 3A11, 4H8, 5C12, 6A2 및 18D12의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 가변 영역(variable region)의 아미노산 서열 및 염기 서열을 분석하였다.

[130] 이를 위해 실시예 2의 5개의 하이브리도마 세포주로부터 total RNA를 분리하였고 이로부터 cDNA를 제작하였다. total RNA의 추출은 RNeasy mini kit을 이용하여 제조사의 방법에 따라 추출하였다. 또한 제조된 cDNA를 이용하여 PCR, TA 클로닝 및 시퀀싱을 수행하여 가변 영역을 분석하였다. 문헌 [Larrick, J.W., et al. 1989. Biochem. Biophys. Res. Comm. 160, 1250] 및 [Jones, S.T. and Bendig, M.M. 1991]를 바탕으로 개발된 마우스의 VH 및 VL 유전자를 증폭하기 위한 Mouse Ig-Primer set (Millipore, Cat#69831-3)를 구매하여 PCR 실험을 통하여 각 유전자 부분을 증폭하는 실험을 수행하였다. Band isolation 후, pMD20-TA 벡터를 사용하여 TA 클로닝을 수행하였다. TA 클로닝 산물의 시퀀싱을 수행하여 가변 영역의 아미노산 서열 및 염기 서열을 분석하였다.

[131] 단클론항체 3A11, 4H8, 5C12, 6A2 및 18D12의 VH 및 VL의 아미노산 서열 및 염기 서열을 도 6 내지 11에 나타내었다.

[132]

[133] [실시예 5]

[134] 단클론항체의 isotype 분석

[135] 실시예 2의 5개의 하이브리도마 세포주를 사용하여 Isotype ELISA kit를 통해 각 단클론항체의 isotype를 분석하였다. 그 결과는 표 5에 나타낸 바와 같이, 단클론항체의 isotype은 모두 IgG(kappa)임이 확인되었다.

[136] [표5]

Hybridoma clones	Antibody isotype
3A11	Kappa / IgG1
4H8	Kappa / IgG2b
5C12	Kappa / IgG2a
6A2	Kappa / IgG2b
18D12	Kappa / IgG1

[137]

[138] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 2의 서열을 갖는 CDRH2; 및 서열번호 3의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 4의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 5의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 6의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 2] 서열번호 7의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 8의 서열을 갖는 CDRH2; 및 서열번호 9의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 10의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 11의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 12의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 3] 서열번호 13의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 14의 서열을 갖는 CDRH2; 및 서열번호 15의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 16의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 17의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 18의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 4] 서열번호 19의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 20의 서열을 갖는 CDRH2; 및 서열번호 21의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 22의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 23의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 24의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 서열번호 25의 서열을 갖는 CDRH1; 서열번호 26의 서열을 갖는 CDRH2; 및 서열번호 27의 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 28의 서열을 갖는 CDRL1; 서열번호 29의 서열을 갖는 CDRL2; 및 서열번호 30의 서열을 갖는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 6] 서열번호 31의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 32의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 7] 서열번호 33의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 34의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

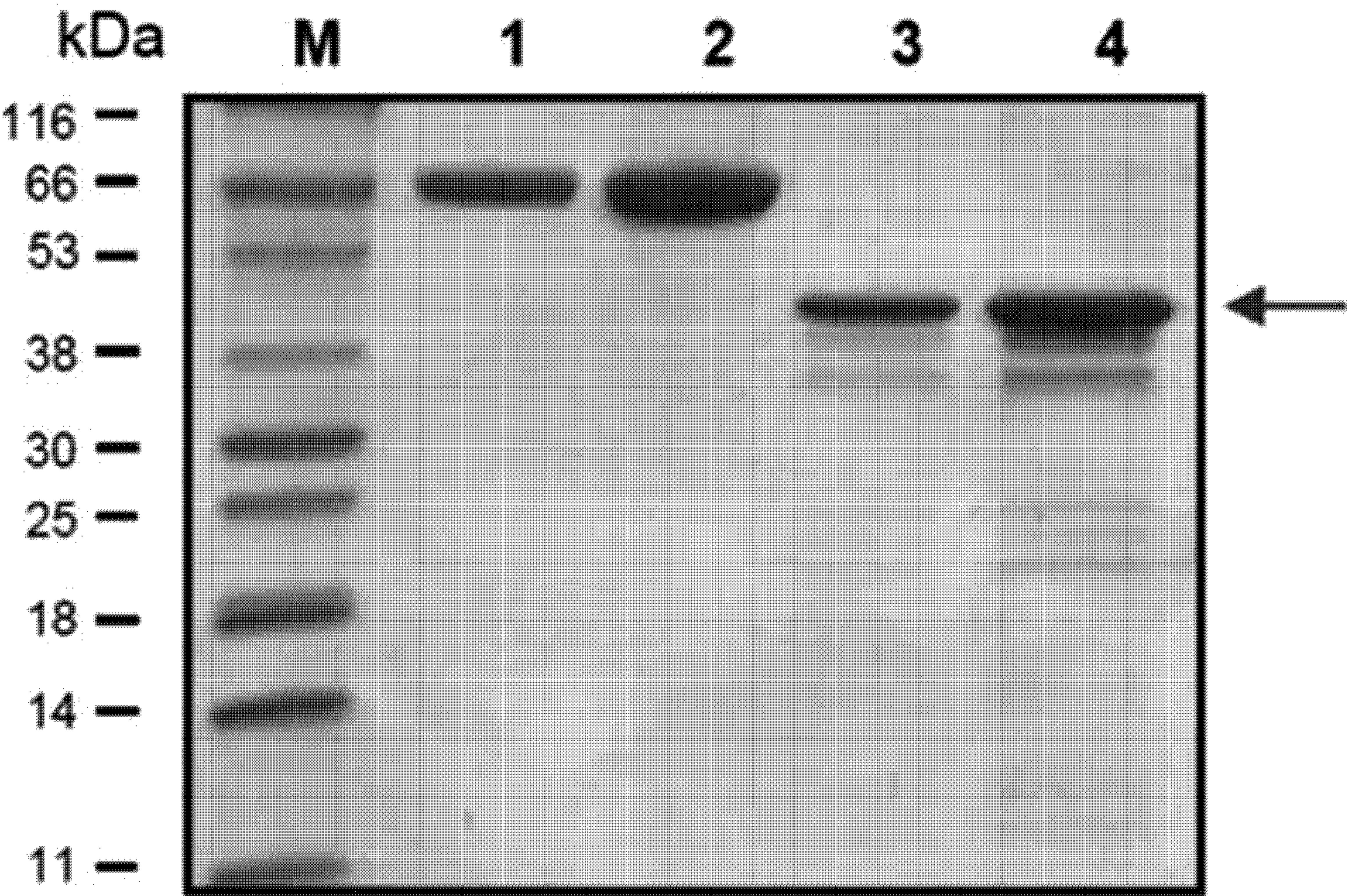
을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

- [청구항 8] 서열번호 35의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및
서열번호 36의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 9] 서열번호 37의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및
서열번호 38의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 10] 서열번호 39의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및
서열번호 40의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 11] 서열번호 41의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및
서열번호 42의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 12] 서열번호 43의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및
서열번호 44의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 13] 서열번호 45의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및
서열번호 46의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 14] 서열번호 47의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및
서열번호 48의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

- [청구항 15] 서열번호 49의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및
서열번호 50의 염기 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 16] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 단클론항체인 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 17] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 중쇄는 면역글로불린 M(IgM)인 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 18] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 경쇄는 카파 타입인 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 19] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산.
- [청구항 20] 제19항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 21] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 하이브리도마 세포주.
- [청구항 22] 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트.
- [청구항 23] 제22항에 있어서, 만성 골수성 백혈병의 급성기의 진단에 사용되는 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트.
- [청구항 24] 제22항에 있어서, 자궁경부암 또는 골육종의 진단에 사용되는 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트.
- [청구항 25] 포획 항체(capturing antibody)로서 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 항체; 및
검출 항체(detection antibody)로서 서열번호 53의 아미노산 서열을 갖는 Cobll1 단백질의 C-말단 부위에 특이적으로 결합하는 다클론항체를 포함하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트.
- [청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 검출 항체는 검출 표지와 연결된 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트.
- [청구항 27] 제26항에 있어서, 상기 검출 표지는 비오티인 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트.
- [청구항 28] 제25항에 있어서, 상기 키트는 샌드위치 효소결합면역측정법(Sandwich ELISA)에 사용하기 위한 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트.

- [청구항 29] 제25항에 있어서, 만성 골수성 백혈병의 급성기의 진단에 사용되는 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트.
- [청구항 30] 제25항에 있어서, 자궁경부암 또는 골육종의 진단에 사용되는 것을 특징으로 하는, Cobll1 단백질의 검출용 키트.

[도1]



15% SDS-PAGE gel

M: protein size marker

1: BSA 1 ug

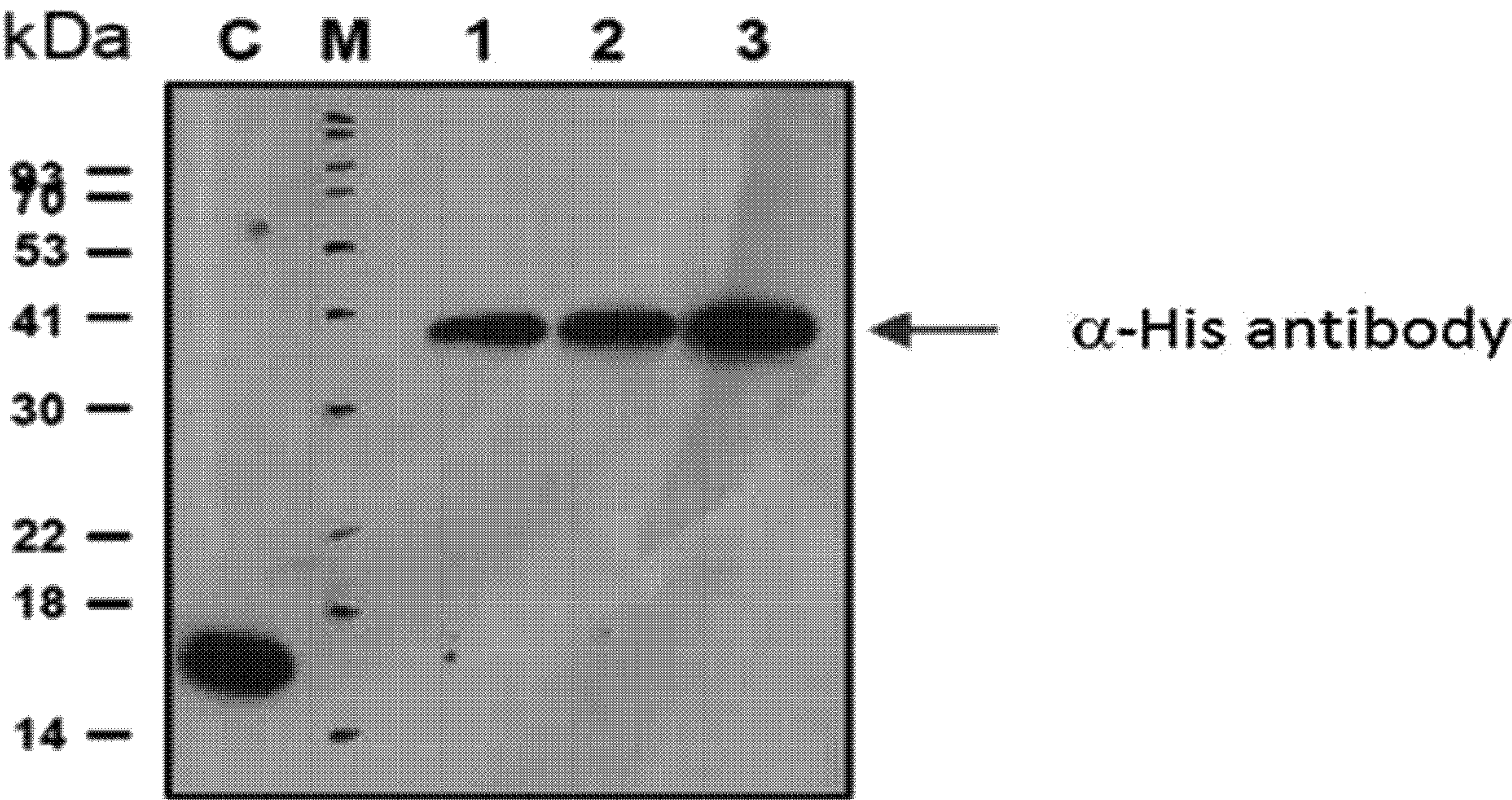
2: BSA 3 ug

3: CobII I 1 ug

4: CobII I 3 ug

Approximate concentration is 0.5 mg/mL

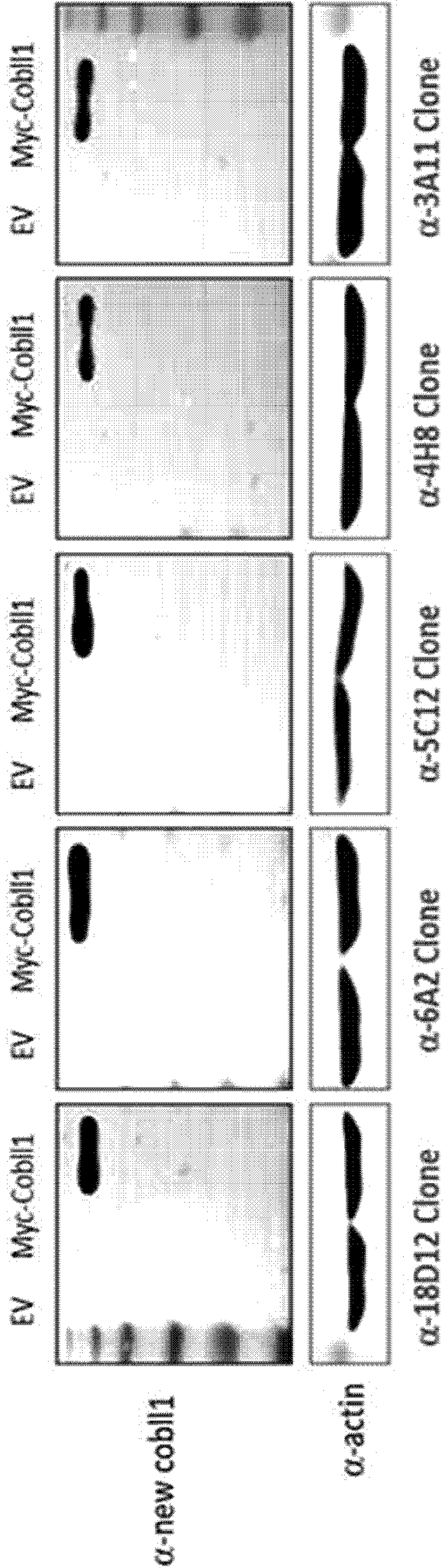
[도2]



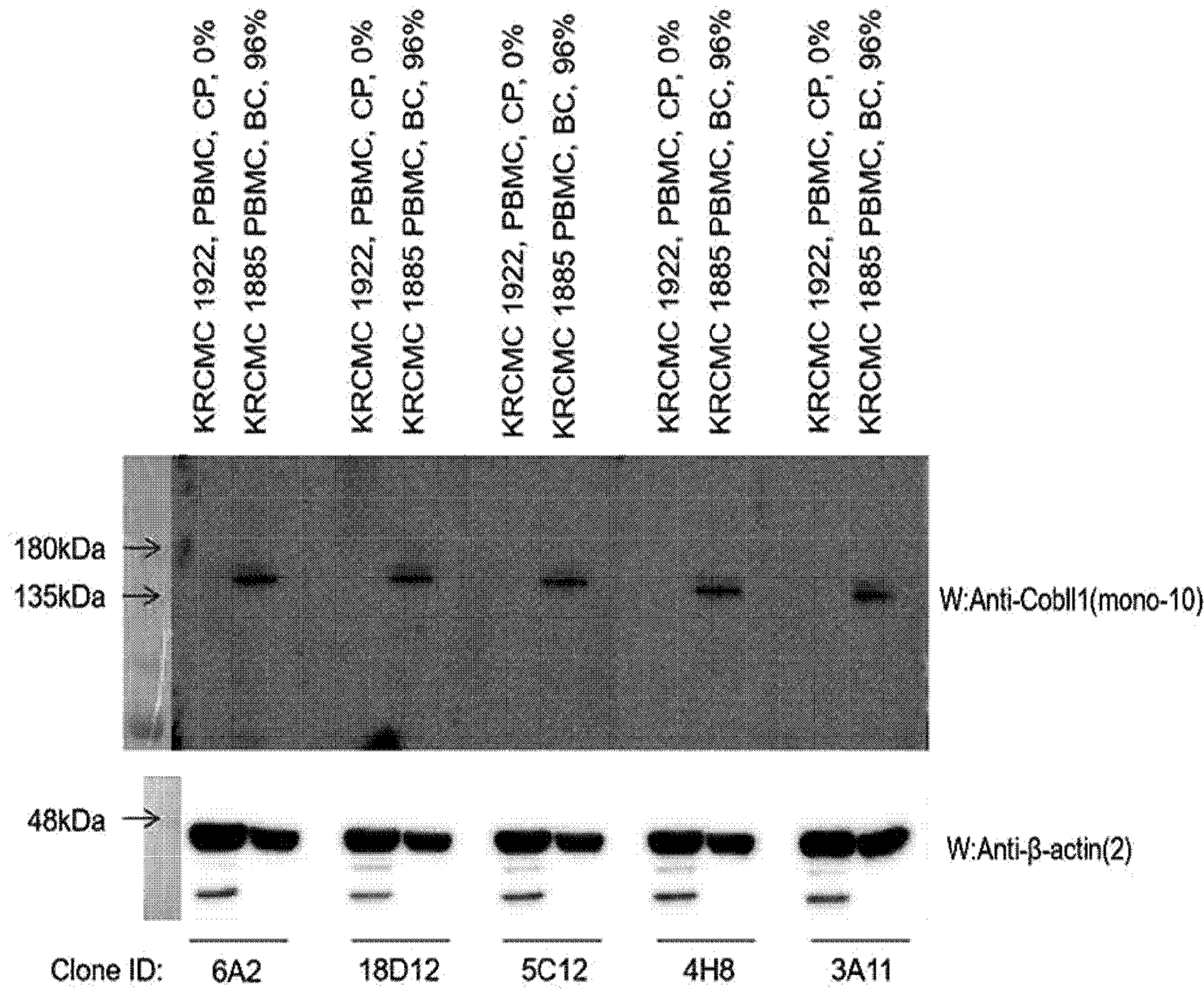
[도3]

- EV : 293T cells expressing empty vector
- Myc-Cobll1 : 293T cells expressing myc-Cobll1 protein.

New mouse 5 Cobll1 antibodies from different hybridoma clones



[도4]



[도5]



[도6]

Heavy chain 서열 분석 결과

	FR1_VH	CDR1_VH	FR2_VH	CDR2_VH	FR3_VH	CDR3_VH	FR4_VH
3A11	EVNLVESGGGLVKPGSLKLSCAAS	GFTFSSYT	MSNVRQTPEKRLDWAT	ISSGGGHT	YYPDSVNGRFTISRDNAKNNLYLQWSSLRSSEDTAFYYC	ARYTGTSLTWPAY	WGQGTLLTVSA
4H8	QVQLQSGAEIARPGASVNLSCAS	GYTFISW	MQNVRQPGQGLEWGA	IYPGDGDT	RYTERFNGKATLTADKSSSTAYNQISSLASEDSAVYYC	ASPAY	WGQGTLLTVSS
5C12	EVQLVESGGGLVKPGSLKLSCAAS	GFTFSDYY	MYNVRQTPEKRLDWAT	ISNGGSYT	YYPDSVNGRFTISRDNAKNNLYLQWSSLKSEDTAMYYC	ARGDYFFDY	WGQGTLLTVSS
6A2	EVQLVESGGGLVKPGSLKLSCAAS	GFTFSDYY	MYNVRQTPEKRLDWAA	ISNGGSYT	YYPDSVNGRFTISRDNAKNNLYLQWSSLKSEDTAMYYC	ARGDYFFDY	WGQGTLLTVSS
18D12	EVQLVESGGGLVKPGSLKLSCAAS	GFTFSDYY	MYNVRQTPEKRLDWAT	ISNGGSYT	YYPDSVNGRFTISRDNAKNNLYLQWSSLKSEDTAMYYC	ARGPFYFDY	WGQGTLLTVSS

Light chain 서열 분석 결과

	FR1_VL	CDR1_VL	FR2_VL	CDR2_VL	FR3_VL	CDR3_VL	FR4_VL
3A11	DVMTQTPLSPVSLGDQASISCRSS	QSLVHSNGNTY	LEWFLQKPGQSPKLLIY	KVS	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	FGGSHVPWT	FGGGTKLEIK
4H8	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	ESVDNYGISE	MAWFQKPGQPPKLLIY	AAS	NQSGVPAREFSGSGSGTDFTSLNIHNEEDDTAMFEC	QQSKEVPYT	FGGGTKLEIK
5C12	DVMTQTPLSPVSLGDQASISCRSS	QSLVHSNGNTY	LHWLQKPGQSPKLLIY	KVS	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	SQSTHVPWT	FGGGTKLEIK
6A2	DVMTQTPLSPVSLGDQASISCRSS	QSLVHSNGNTY	LHWLQKPGQSPKLLIY	KVS	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	SQSTHVPWT	FGGGTKLEIK
18D12	DVMTQTPLSPVSLGDQASISCRSS	QSLVHSNGNTY	LHWLQKPGQSPKLLIY	KVS	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	SQSTHVPWT	FGGGTKLEIK

[도7]

FR1_VH	CDR1_VH	FR2_VH	CDR2_VH	FR3_VH	CDR3_VH	FR4_VH
EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYT	MSWVROTPEKRLEWVAT	ISSGGGHT	YYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLOMSSLRSEDIAFYVC	ARYTGTSLTWFAV	WGGGTLVTVSA

FR1_VK	CDR1_VK	FR2_VK	CDR2_VK	FR3_VK	CDR3_VK	FR4_VK
DVLMITQTPLSLPVSLGDOASISCRSS	QSIVHSNGNTY	LEWFLQKPGQSPKLLY	KVS	NRFSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYC	FGGSHVPWT	FGGGTKLEIK

3A11-VH: IGHV5-9

GAAGTGATGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACCTCTCTGTGCGCCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATACCAATGCTTGGGTTCGCCAGACT
CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGTCCGAACCATTAGTAGTGGTGGTCAACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTGGATTCAACCATCTCCAGAGACAAATGCCAAGAACAACCTGTA
CCTGCAAATGAGCAGCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTTATTACTGTGCAAGATACACTGGGACCTCCCTGACCTGGTTTGGTCTTACCTGGGGCCAAAGGGACTCTGGTCACCTGCTCTGC

A

3A11-VK: IGKV1-117

GAIGTTTIGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCIGTCAGCTTGGAGATCAAGCCCTCACTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTGTACATAGTAATGGAACACCTATTATTAGATGGTTC
CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAG
CAGATGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGTCTTCAAGGTTTCAATGTTCCGTGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAAC

FR1_VH	CDR1_VH	FR2_VH	CDR2_VH	FR3_VH	CDR3_VH	FR4_VH
QVQLQSGAELARPGASVNLSCKAS	GYTFTSYW	MQWVKORPGGLEWIGA	IYPGDGDT	RYTEKFKGKATLTADKSSSTAYIMQLSSLASDASVYYC	ASPAY	WGQGTTLTVSS
FR1_VK	CDR1_VK	FR2_VK	CDR2_VK	FR3_VK	CDR3_VK	FR4_VK
DIVLTQSPASLAISLGORATISCRAS	ESVDNYGISF	INWFCQKPGQPKLLIY	AAS	NQSGVPAFSGSGGTDFSLNHPMEEDDTAMFQC	QQSKEVPYT	FGGGTKLEIK

4H8-VH:IGHV1-87

CAGGTTGAGCTCCAGCAGCTGGGGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAATGTTGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGTTACTGGATGCAGTGGGTAAACACAGAG
GCCTGGACAGGGTCTGGAAATGGATTGGGGCTATTATCTCGAGATGGTGATACCTAGTACACTGAGAATTCAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATAAATCTCCAGCACAGCCT
ACATGCCAACTCAGCAGCTTGGCACTGAGGACTCTGGGCTATTACTGTGCTCCCGGCTACTGGGGCCAGGCCACTCTCACAGTCTCTCAG

4H8-VK: IGV3-2

GTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCTCCGAACGTGTACGGAACTCCTTACTTTGGCTGACAGAAATACATTGCAGTATCCTCCTCATAGGATGGAGTGTGAGGCTGAAGTCTGTCCCA
GACCCACTGCCACTAAACCTGGCAGGGACCCGGATCCTTGGTGGATGCAGCAIAGAATGAGGAGTTGGGTGGCTGCTCCGTGTTCTGTGGAACCAAGTTCATAAACTAAIGCCATAAA
TTATCAACACTTTCGTGGCTTCGAGGAGATGGTGGCCCTCGCCCTAGAGACACAGCCAAAGAAGCTGGAGATTGGGTGACGACAAATGTC

[도9]

FR1_VH	CDR1_VH	FR2_VH	CDR2_VH	FR3_VH	CDR3_VH	FR4_VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFSQYY	MYWVROTPEKRLIEWVAT	ISNGGSYT	YYPDSVKGRFTISRQNAKNNLYLQMSLSKSEDTAMYYC	ARGDYFFDY	WGQGTTLTVSS

FR1_VK	CDR1_VK	FR2_VK	CDR2_VK	FR3_VK	CDR3_VK	FR4_VK
DVVMITQTPLSLPVSLGDOASISCRSS	QSLVHSNGNTY	LHNVCLQKPGQSPKLLIY	KVS	NRFSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPPWT	FGGGTKLEIK

5C12-VH : IGHV5-4

GAAGTGCAGCTGGTGAGTCIGGGGGAGGCTTAGTGAAGCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCTGIGCAGCCTCIGGATTCACCTTCAGIGACTATTACAIGTATGGGTTCGCCAGACT
CCGGAAAGAGGCTGGAGTGGGTCCGAACCATTAGTAAGTGGTAGTTACACCTACTACTACAGACAGTGTGAAGGGCGATTACCACTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTGA
CCTGCAAAATGAGCAGTCGTGAAGTCGTAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGGGACTACTACTTGGGGCCAAGGCCACCTCTCACAGTCTCCTCAG

5C12-VK : IGV1-110

GAITGTIGATGACCCAAATCCACTCTCCCTGCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCCTCCATCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTCACAGTAATGGAAACACCTATTACATTGGTGTG
CCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCA
GCAGAGTGGAGGCTGAGGAATCTGGGAGTTATTCTGCTCTCAAAGTACACAATGTTCTCCGTGGAGCAGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAAC

[도10]

FR1_VH	CDR1_VH	FR2_VH	CDR2_VH	FR3_VH	CDR3_VH	FR4_VH
EVQLVESGGGLVHPGGSKLSCAAS	GFTFSDYY	MYWVROTPEKRLEWAA	ISNGGSYT	YYPOSVKGRFTISRDNAKNNLYLOMSSLKSEDTAMYYC	ARGDYFFDY	WGQGTTLTVSS

FR1_VK	CDR1_VK	FR2_VK	CDR2_VK	FR3_VK	CDR3_VK	FR4_VK
DVVMITOTPLSLPVSLGDOASISCRSS	QSLVHSNGNTY	LHWYLOKPGOSPKLLIY	KVS	NRFSGVYPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPPNT	FGGGTKLEIK

6A2-VH:IGHV5-4

GAAGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACCTCTCTGGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGIGACTATTACAIGTATTGGGTTCGCAGACT
CCGGAAAGAGGCTGGAGTGGGTCCAGCCATTAGTAATGGTGGTAGTACACCTACTAACCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTCACTCCAGAGACAAATGCCAAGAACAACCTGTGA
CCTGCCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCAATGATTACTGTGCAAGAGGCGACTACTATTGACTACTGGGGCCCAAGGCCACCACCTCAGAGTCTCCTCA

6A2-VK:IGKV1-110

GATGTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCCTGCTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGTAATGGAACACCTATTACATTGGTGA
CCTGCAGAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCTGATCTACAAAGTTCCAAACCGATTTCIGGGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCA
GCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTTCGCTCTCAAAGTACACAATGTTCTCCGTGGACGTTGGGAGGCACCAAGCTGGGAATCAAA

[표 11]

FR1_VH	CDR1_VH	FR2_VH	CDR2_VH	FR3_VH	CDR3_VH	FR4_VH
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS	GFTEFDYY	MYWVROTPEKRLIEWVAT	ISNGGSYT	YYPDSVKGRFTISRDNAKNNLFLQMS	SLKSEDTAMYYC	ARGPFYFDY
WGQGTTLTIVSS						

FR1_VK	CDR1_VK	FR2_VK	CDR2_VK	FR3_VK	CDR3_VK	FR4_VK
DWVMTQTPLSLPVSLGDOASISCRSS	QSLVHSNGNTY	LHWYLOKPGQSPKLLIY	KVS	NRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPWPWT	FGGGTKLEIK

18D12-VH : IGHV5-4

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCTGTCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACAIGTATTGGGTTCGCCAGACT
CCGGAAAGAGGCTGGAGTGGGTCCGAACCATTAGTAIGGTGTAGTACACCTACTACTACAGACAGTGTGAAGGGGGGATTACCACTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTT
CCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCAATGATTACTGTGCAAGAGGTCTTCTACTGCTAGTGGGGCCAAAGGCACCACCTCTCACAGTCTCTCTCA

18D12-VK : IGKV1-110

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCCTCCATCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTAGATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCT
GCCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGATCTGGGGTCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAG
CAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTCTGCTCTCAAGTACGCAGTTCCTCCGTGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/017197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K 16/18(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(2006.01); A61K 31/7105(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/42(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C40B 30/04(2006.01); C40B 40/08(2006.01); G01N 33/574(2006.01)

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: Cobll1, 항체(antibody), 항원 결합 단편(antigen-binding fragment), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DA	KR 10-1820572 B1 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 19 January 2018 (2018-01-19) See claims 13-16.	1-30
A	PLESINGEROVA, H. et al. Expression of COBLL1 encoding novel ROR1 binding partner is robust predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica. 2018, vol. 103, no. 2, pp. 313-324. See abstract; and figures 1 and 2.	1-30
A	TAKAYAMA, K. I. et al. COBLL1 modulates cell morphology and facilitates androgen receptor genomic binding in advanced prostate cancer. PNAS. 08 May 2018, vol. 115, no. 19, pp. 4975-4980. See abstract; and figure 3.	1-30
A	US 2011-0190157 A1 (KIPPS, T. J. et al.) 04 August 2011 (2011-08-04) See entire document.	1-30
A	WO 2008-019199 A2 (MACROGENICS, INC. et al.) 14 February 2008 (2008-02-14) See entire document.	1-30



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 “D” document cited by the applicant in the international application “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

04 March 2021

Date of mailing of the international search report

05 March 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/017197

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0033029 A (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 17 March 2014 (2014-03-17) See entire document.	1-30

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13^{ter}.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13^{ter}.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13^{ter}.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/017197

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1820572	B1	19 January 2018	EP	3336548	A1	20 June 2018
				KR	10-2017-0019635	A	22 February 2017
				WO	2017-026843	A1	16 February 2017
US	2011-0190157	A1	04 August 2011	WO	2010-019921	A2	18 February 2010
				WO	2010-019921	A3	15 April 2010
WO	2008-019199	A2	14 February 2008	AU	2007-281876	A1	14 February 2008
				AU	2007-281876	B2	05 September 2013
				CA	2656222	A1	14 February 2008
				CA	2656222	C	17 July 2018
				CY	1118098	T1	28 June 2017
				DK	2029173	T3	07 November 2016
				EP	2029173	A2	04 March 2009
				EP	2029173	B1	20 July 2016
				EP	2505209	A1	03 October 2012
				ES	2599319	T3	01 February 2017
				HU	E030269	T2	28 April 2017
				IL	195573	A	01 August 2011
				IL	195573	B	20 September 2018
				JP	2009-541492	A	26 November 2009
				JP	2014-014362	A	30 January 2014
				JP	2016-074684	A	12 May 2016
				JP	5764290	B2	19 August 2015
				LT	2029173	T	10 November 2016
				PL	2029173	T3	28 April 2017
				PT	2029173	T	02 November 2016
				US	10100116	B2	16 October 2018
				US	2008-0044429	A1	21 February 2008
				US	2015-0023964	A1	22 January 2015
				US	2019-0218288	A1	18 July 2019
				US	8785599	B2	22 July 2014
				WO	2008-019199	A3	31 July 2008
				WO	2008-019199	A8	14 February 2008
KR	10-2014-0033029	A	17 March 2014	AU	2012-236068	A1	17 October 2013
				AU	2014-346648	A1	23 June 2016
				AU	2017-203511	A1	15 June 2017
				AU	2017-203511	B2	11 July 2019
				CA	2831336	A1	04 October 2012
				CA	2831336	C	01 October 2019
				CA	2934033	A1	14 May 2015
				CL	2013002828	A1	04 July 2014
				CN	103619882	A	05 March 2014
				CN	103619882	B	19 October 2016
				CN	106414500	A	15 February 2017
				CN	106414500	B	10 April 2020
				CN	106632677	A	10 May 2017
				CO	6900116	A2	20 March 2014
				CU	20130130	A7	28 August 2014
				CU	24151	B1	29 February 2016
				DO	P2013000219	A	28 February 2014
				EA	201391449	A1	31 March 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/017197

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 2694553 A2	12 February 2014
		EP 2694553 B1	11 October 2017
		EP 3066130 A1	14 September 2016
		EP 3066130 B1	15 May 2019
		EP 3066131 A1	14 September 2016
		EP 3323833 A1	23 May 2018
		EP 3323833 B1	04 December 2019
		ES 2651510 T3	26 January 2018
		ES 2742224 T3	13 February 2020
		ES 2785081 T3	05 October 2020
		GT 201300233 A	04 August 2015
		IL 228619 A	31 December 2013
		IL 228619 B	30 November 2016
		JP 2014-512812 A	29 May 2014
		JP 2016-026209 A	12 February 2016
		JP 2017-500057 A	05 January 2017
		JP 6082997 B2	22 February 2017
		JP 6553069 B2	31 July 2019
		MX 2013011363 A	25 April 2014
		MY 160662 A	15 March 2017
		NI 201300099 A	07 January 2014
		NZ 617008 A	26 February 2016
		PE 12712014 A1	08 October 2014
		PE 20141271 A1	08 October 2014
		SG 193956 A1	29 November 2013
		TN 2013000387 A1	20 January 2015
		US 10040865 B2	07 August 2018
		US 10239952 B2	26 March 2019
		US 10858444 B2	08 December 2020
		US 2014-0294841 A1	02 October 2014
		US 2015-0259436 A1	17 September 2015
		US 2016-0280796 A1	29 September 2016
		US 2016-0369006 A1	22 December 2016
		US 2017-0088630 A1	30 March 2017
		US 2019-0144563 A1	16 May 2019
		US 9074000 B2	07 July 2015
		US 9540448 B2	10 January 2017
		WO 2012-135854 A2	04 October 2012
		WO 2012-135854 A3	14 March 2013
		WO 2015-070061 A1	14 May 2015
		WO 2015-070078 A1	14 May 2015
		ZA 201306940 B	28 May 2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/18(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/18(2006.01); A61K 31/7105(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/42(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C40B 30/04(2006.01); C40B 40/08(2006.01); G01N 33/574(2006.01)		
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: Cobll1, 항체(antibody), 항원 결합 단편(antigen-binding fragment), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DA	KR 10-1820572 B1 (가톨릭대학교 산학협력단 등) 2018.01.19 청구항 13-16	1-30
A	PLESINGEROVA, H. 등, 'Expression of COBLL1 encoding novel ROR1 binding partner is robust predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia', Haematologica, 2018, 103권, 2호, 페이지 313-324 초록; 및 도 1, 2	1-30
A	TAKAYAMA, K. I. 등, 'COBLL1 modulates cell morphology and facilitates androgen receptor genomic binding in advanced prostate cancer', PNAS, 2018.05.08, 115권, 19호, 페이지 4975-4980 초록; 및 도 3	1-30
A	US 2011-0190157 A1 (KIPPS, T. J. 등) 2011.08.04 전체 문헌	1-30
A	WO 2008-019199 A2 (MACROGENICS, INC. 등) 2008.02.14 전체 문헌	1-30
☒ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년03월04일(04.03.2021)	국제조사보고서 발송일 2021년03월05일(05.03.2021)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2014-0033029 A (메모리얼 슬로안-케터링 켄서 센터) 2014.03.17 전체 문헌	1-30

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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 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
KR 10-1820572 B1	2018/01/19	EP 3336548 A1	2018/06/20
		KR 10-2017-0019635 A	2017/02/22
		WO 2017-026843 A1	2017/02/16
US 2011-0190157 A1	2011/08/04	WO 2010-019921 A2	2010/02/18
		WO 2010-019921 A3	2010/04/15
WO 2008-019199 A2	2008/02/14	AU 2007-281876 A1	2008/02/14
		AU 2007-281876 B2	2013/09/05
		CA 2656222 A1	2008/02/14
		CA 2656222 C	2018/07/17
		CY 1118098 T1	2017/06/28
		DK 2029173 T3	2016/11/07
		EP 2029173 A2	2009/03/04
		EP 2029173 B1	2016/07/20
		EP 2505209 A1	2012/10/03
		ES 2599319 T3	2017/02/01
		HU E030269 T2	2017/04/28
		IL 195573 A	2011/08/01
		IL 195573 B	2018/09/20
		JP 2009-541492 A	2009/11/26
		JP 2014-014362 A	2014/01/30
		JP 2016-074684 A	2016/05/12
		JP 5764290 B2	2015/08/19
		LT 2029173 T	2016/11/10
		PL 2029173 T3	2017/04/28
		PT 2029173 T	2016/11/02
		US 10100116 B2	2018/10/16
		US 2008-0044429 A1	2008/02/21
		US 2015-0023964 A1	2015/01/22
		US 2019-0218288 A1	2019/07/18
		US 8785599 B2	2014/07/22
		WO 2008-019199 A3	2008/07/31
		WO 2008-019199 A8	2008/02/14
KR 10-2014-0033029 A	2014/03/17	AU 2012-236068 A1	2013/10/17
		AU 2014-346648 A1	2016/06/23
		AU 2017-203511 A1	2017/06/15
		AU 2017-203511 B2	2019/07/11
		CA 2831336 A1	2012/10/04
		CA 2831336 C	2019/10/01
		CA 2934033 A1	2015/05/14
		CL 2013002828 A1	2014/07/04
		CN 103619882 A	2014/03/05
		CN 103619882 B	2016/10/19
		CN 106414500 A	2017/02/15
		CN 106414500 B	2020/04/10
		CN 106632677 A	2017/05/10
		CO 6900116 A2	2014/03/20
		CU 20130130 A7	2014/08/28
		CU 24151 B1	2016/02/29
		DO P2013000219 A	2014/02/28
		EA 201391449 A1	2014/03/31

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 2694553 A2	2014/02/12
		EP 2694553 B1	2017/10/11
		EP 3066130 A1	2016/09/14
		EP 3066130 B1	2019/05/15
		EP 3066131 A1	2016/09/14
		EP 3323833 A1	2018/05/23
		EP 3323833 B1	2019/12/04
		ES 2651510 T3	2018/01/26
		ES 2742224 T3	2020/02/13
		ES 2785081 T3	2020/10/05
		GT 201300233 A	2015/08/04
		IL 228619 A	2013/12/31
		IL 228619 B	2016/11/30
		JP 2014-512812 A	2014/05/29
		JP 2016-026209 A	2016/02/12
		JP 2017-500057 A	2017/01/05
		JP 6082997 B2	2017/02/22
		JP 6553069 B2	2019/07/31
		MX 2013011363 A	2014/04/25
		MY 160662 A	2017/03/15
		NI 201300099 A	2014/01/07
		NZ 617008 A	2016/02/26
		PE 12712014 A1	2014/10/08
		PE 20141271 A1	2014/10/08
		SG 193956 A1	2013/11/29
		TN 2013000387 A1	2015/01/20
		US 10040865 B2	2018/08/07
		US 10239952 B2	2019/03/26
		US 10858444 B2	2020/12/08
		US 2014-0294841 A1	2014/10/02
		US 2015-0259436 A1	2015/09/17
		US 2016-0280796 A1	2016/09/29
		US 2016-0369006 A1	2016/12/22
		US 2017-0088630 A1	2017/03/30
		US 2019-0144563 A1	2019/05/16
		US 9074000 B2	2015/07/07
		US 9540448 B2	2017/01/10
		WO 2012-135854 A2	2012/10/04
		WO 2012-135854 A3	2013/03/14
		WO 2015-070061 A1	2015/05/14
		WO 2015-070078 A1	2015/05/14
		ZA 201306940 B	2014/05/28