

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2014/069681 A1

(43) 국제공개일
2014년 5월 8일 (08.05.2014)

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/008951
- (22) 국제출원일: 2012년 10월 29일 (29.10.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 인제대학교 산학협력단 (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 621-749 경상남도 김해시 어방동 607, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 허대영 (HUR, Dae Young); 608-091 부산시 남구 용호 1동 지에스 자이 하이즈 아파트 301동 1402호, Busan (KR). 박가빈 (PARK, Ga Bin); 614-768 부산시 부산진구 양정 1동 유림아시아드아파트 101동 1708호, Busan (KR). 김영석 (KIM, Yeong Seok); 612-788 부산시 해운대구 우 1동 대우마리나아파트 203동 503호, Busan (KR). 송현근 (SONG, Hyun Keun); 616-789 부산시 북구 화명 3동 롯데낙천대아파트 108동 803호, Busan (KR). 김성한 (KIM, Seong Han); 614-043 부산시 부산진구 전포 3동 362-64 한라비발디 101동 2508호, Busan (KR). 이현경 (LEE, Hyun Kyung); 608-

091 부산시 남구 용호 1동 지에스 자이 하이즈 아파트 301동 1402, Busan (KR). 박세광 (PARK, Sae Gwang); 614-110 부산시 부산진구 개금동 개금주공아파트 204동 807호, Busan (KR). 양재욱 (YANG, Jae Wook); 607-786 부산시 동래구 사직 2동 사직쌍용 예가아파트 118동 2502호, Busan (KR). 정하나 (JUNG, Ha Na); 614-111 부산시 부산진구 개금 1동 177-183번지 프리덤원룸 303호, Busan (KR). 박솔지 (PARK, Sol Ji); 601-051 부산시 동구 좌천 1동 문화아파트 1동 501호, Busan (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 153-803 서울시 금천구 가산디지털 1로 151 이노플렉스 1차 601호, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CANCER-TARGETING ANTIBODY AND COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CANCER COM-PRISING SAME

(54) 발명의 명칭 : 암 표적 항체 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
GAGCTCGATA TTGTGATGAC CAGGCT CCACTCTCCCTGCTGTCACTT TGGAGATCAA GDCCTCCACTCTCTTCCAGATCTAGTCAGACG
E L D I V M T Q A P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S

100     110     120     130     140     150     160     170     180
ATTGTACATAGT AATGGAACA CCACTATT TAGAATGGTACCTGCAGAAA CCAAGCCAGTCTCCA AAGCTCCTGATCTACAAGTTTCCAAC
I Y H S N G N T Y L E W V L Q K P G Q S P K L L I V K V S N

190     200     210     220     230     240     250     260     270
CGATTTCTGGGTC CAGACAGTTCAGTGGCAAGTGGATCATGSA CAGATTTCA CACTCAAGATCA GCAAGTGGAGGCTGAGGATCTG
R F S G V P D R F S G S G S W T D F T L K I S R V E A E D L

280     290     300     310     320     330     340     350     360
GGAGTTTATTACT GCTTCAAGGTTCACATGTTCTCCGACGTCGAGTGGAGGGA CCAAGCTGGAAA TCCAATCCTCTGCTGGGCTGGC
G V Y Y C F Q G S H V P R T F G G G T K L E I K S S G G G G

370     380     390     400     410     420     430     440     450
TCCGGCCTGGTGGTGGGGTGGT TCCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGA AGCTGA TGGAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCTGGGCTTCC
S G G G G G G S S R S S L E V K L M E S G T V L A R P G A S

460     470     480     490     500     510     520     530     540
GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACA GTTTACGACGCTACTGGGTGCACCTGGGTA AAAACAGAGGDCCTGGA CAGGGTCTAGAA TGG
Y K M S C K A S G Y S F S S Y W V H W V K Q R P G Q G L E W

550     560     570     580     590     600     610     620     630
ATTGGTGCTATTTAT CCTGGA AATAGTGA AACTAGATACA ACCAGAGTTC AAGGGCAAGGCCA AACTGACTGCA GTCACA CCGCCAGC
I G A I V P G N S E T H Y N Q K F K G K A K L T A V T P A S

640     650     660     670     680     690     700     710     720
ACGGCTACA TGGACCTCAGCAGCTGACA AATGAGGACTCTGGGTCAT TACTGTACA CTGACTTACA ATGCTTACCGAGGGT TGGT
T A V M D L S L T N E D S A V Y V Y C T L I V N A Y D G F G

730     740     750     760     770     780     790     800     810
TACTGGGCTCAGGGA CTCTGGTCACTGTCTCAGCAGC AAAACAGAGGDCCTACTGTCACTAGTGGCCAGGCGGCGAG
Y W G L G L T L V T V S A A K T T A P S V T S G Q A G Q

```

(57) Abstract: The present invention relates to a monoclonal antibody for inducing apoptosis by binding to a cancer cell and a medical use thereof, and the antibody according to the present invention exhibits activity for cancer cell line-specific binding and thus can be used in cancer cell-targeted diagnosis or as a drug conjugate to effectively diagnose or treat cancer. Also, the antibody according to the present invention exhibits the characteristic of inducing apoptosis by binding to cancer cells, particularly lymphoma cells and ovarian cancer cells, and thus the antibody according to the present invention can be used alone as an anticancer drug.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2014/069681 A1



(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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 암세포에 결합하여 세포사멸을 유도하는 단일클론 항체 및 이의 의학적 용도에 관한 것으로, 본 발명의 항체는 암세포주에 특이적으로 결합하는 활성을 갖는 바, 이를 이용하여 암세포 표적화 진단 또는 치료 컨쥬게이트로서 활용하여 암을 효과적으로 진단하거나 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 암세포, 특히 림프종 세포 및 난소암 세포에 결합하여 세포사멸을 유도하는 특성을 보이는 바, 이를 통해 본 발명의 항체 자체를 항암제로 사용할 수도 있다.

명세서

발명의 명칭: 암 표적 항체 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 암세포에 결합하여 세포사멸을 유도하는 단일클론 항체 및 이의 의학적 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 인간의 건강에 대한 가장 치명적인 위협 중의 하나이다. 미국에서는 매년 거의 1,300,000명의 새로운 환자가 암에 걸리며 심장병에 이어 제 2의 사망 원인으로 4명 중 약 1명에 이른다. 또한, 암은 5년 이내에 사망의 제 1 원인이 되어 심혈관 질병을 능가할 수 있다고 예측된다. 고형암이 이러한 사망의 대부분을 차지한다. 특정 암의 의학적 치료에 있어서는 상당한 진전이 있었지만, 모든 암에 대한 총 5-년 생존률은 지난 20년 동안 단지 약 10% 만이 개선되었다. 암 또는 악성 종양은 전이되며 조절되지 않는 방식으로 급속히 성장하므로, 적시에 발견하여 치료하기가 매우 어렵다. 또한, 암은 조직 내의 하나 또는 수개의 정상 세포가 악성 전환을 통해 신체 내의 거의 모든 조직으로부터 발생할 수 있으며, 특정한 조직 기원을 갖는 암의 유형 마다 서로 상이하다.
- [3] 암을 치료하기 위한 현행 방법은 상대적으로 비-선택적이다. 수술로 질병을 갖는 조직을 제거하고; 방사선 치료로 고형 종양을 감소시키며; 화학치료로 빠르게 분열하는 세포를 죽인다. 특히, 화학치료는 다양한 부작용을 낳아, 일부의 경우엔 투여될 수 있는 용량을 제한하여 결국엔 잠재적으로 유효한 약물의 사용을 배제시킬 정도로 부작용이 매우 심각하다. 또한, 암은 종종 화학요법 약물에 대해 내성을 발달시킨다. 따라서, 특이적이고 보다 효과적인 암 치료가 시급하다.
- [4] 종양세포는 "종양 항원"의 존재로 인해 정상 세포와 항원성에 있어서 상이하다. 이들은 종양세포에만 특유할 수 있거나, 또는 상이하게 발현되거나 과량으로 발현됨으로써 "종양-관련 항원"(TAA)으로서 인식된다. 종양세포는 단백질 1차 구조, 즉 아미노산 서열이 정상 세포와 상이할 뿐만 아니라(계놈 서열의 변화로부터 유래), 글리코실화, 포스포릴화의 변화와 같이 번역 후 변형의 변화로 인하여 2차 및 3차 구조도 정상 세포와 상이할 수 있으며, 이것은 계속해서 상기 단백질의 항원성을 변화시키고, 또한 그것을 종양-관련 항원으로서 특정한다. 한 전형적인 예는 유선에서 나오는 단백질 점액소인데, 이것 자체는 종양 세포에 존재하는 변화는 아니지만, 유방암 환자에서는 이것에 대한 자가항체가 발견된다(때로는 난소암에서도 그렇다). 그 이유는 아마도 정상 세포에서는 이 단백질이 고도로 글리코실화되고, 탄수화물 사슬의 치밀하고 두꺼운 코팅으로 인해서 전혀 노출되지 않기 때문인 것으로 추정된다.

종양세포에서 글리코실화가 불량하면, 항원성 결정소로서 작용하는 단백질 단편이 면역 시스템에 노출되게 된다.

- [5] TAA는 현재 특정 종양, 예를 들어 림프종, 암종, 육종 또는 흑색종과 결합될수 있는 분자인 것으로 생각되며, 종양에 대해 세포성 및/또는 체액성 면역반응을 도출할 수 있고, 드물게는 종양에 대해 숙주를 방어하기도 한다. 이와 같은 TAA는 현재 3가지 부류로 분류되는데, 1명의 또는 단지 소수의 개체에만 존재하고 정상 세포에서는 발견되지 않는 특정 종양에 대해 고도로 특이적인 것, 예를 들어 종양-특이적 이식 항원(제 1 부류); 상이한 환자들의 다수의 관련된 종양에 존재하는 것(제 2 부류); 및 정상세포와 악성 세포에 존재하며, 악성 세포에서 다량으로 발현되는 것(제 3 부류)이다. 제 2 부류의 TAA는 많은 종양에 존재하고 정상 피험자에서는 드물게 관찰되기 때문에 임상적으로 유용한 분석을 위한 잠재성이 가장 큰 것으로 생각된다.
- [6] 따라서, 특이적이고 보다 효과적인 암 치료 방법으로 상기 종양세포 특이적 항원을 표적하는 항체를 사용하는 연구 및, 상기 항체를 통해 암세포의 세포사멸을 유도하는 암치료제 개발이 현재 관심을 받고 있다. 상기 기술과 관련하여 국내공개특허공보 10-2010-0045903은 암세포의 세포사멸 수용체인 항 DR5를 표적하는 항체를 개시하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 따라서 본 발명은 종양세포 특이적 항원을 표적하는 신규 항체 및 상기 항체를 통해 암세포의 세포사멸을 유도하는 암 치료 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 암세포에 결합하여 세포사멸을 유도하는 단일클론 항체로서,
- [9] 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3 를 포함하는 경쇄 가변 영역 및;
- [10] 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3 를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체를 제공한다.
- [11] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 항체는 단일쇄 가변영역 (scFv, Single-chain variable fragment) 항체 이며, 서열번호 9, 서열번호 13, 서열번호 17 또는 서열번호 21의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [12] 또한 본 발명은 상기 단일쇄 가변영역 항체를 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [13] 또한 본 발명은 상기 항체를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [14] 또한 본 발명은 상기 항체를 포함하고, 상기 항체에 하나 또는 둘 이상의 진단제

또는 항암제를 결합시킨 암세포 표적화 진단 또는 치료 컨쥬게이트를 제공한다.

발명의 효과

- [15] 본 발명의 항체는 암세포주에 특이적으로 결합하는 활성을 갖는 바, 이를 이용하여 암세포 표적화 진단 또는 치료 컨쥬게이트로서 활용하여 암을 효과적으로 진단하거나 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 암세포, 특히 림프종 세포 및 난소암 세포에 결합하여 세포사멸을 유도하는 특성을 보이는 바, 이를 통해 본 발명의 항체 자체를 항암제로 사용할 수도 있다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 실시예 1의 IM9세포주에 대한 유세포분석 결과이다.
 [17] 도 2는 본 발명에 따른 scFv 클론 ITTab1-1의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열 및 이의 CDR 및 링커 영역을 나타낸 것이다.
 [18] 도 3은 본 발명에 따른 scFv 클론 ITTab1-2의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열 및 이의 CDR 및 링커 영역을 나타낸 것이다.
 [19] 도 4는 본 발명에 따른 scFv 클론 ITTab1-3의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열 및 이의 CDR 및 링커 영역을 나타낸 것이다.
 [20] 도 5는 본 발명에 따른 scFv 클론 ITTab1-4의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열 및 이의 CDR 및 링커 영역을 나타낸 것이다.
 [21] 도 6은 본 발명의 항체의 NK 림프종세포에 대한 결합여부를 검토한 공초점현미경 결과 사진이다.
 [22] 도 7은 본 발명의 항체치리로 인한 NK 림프종세포의 세포자멸사를 검토한 유세포분석 실험 결과이다.
 [23] 도 8은 본 발명의 항체의 난소암 세포에 대한 결합여부를 검토한 유세포분석 실험 결과이다.
 [24] 도 9는 본 발명의 항체치리로 인한 난소암세포의 세포자멸사를 검토한 유세포분석 실험 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 본 발명은 암세포에 결합하여 세포사멸을 유도하는 단일클론 항체로서,
 [26] 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3 를 포함하는 경쇄 가변 영역 및; 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3 를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체를 제공한다.
 [27] 본 발명의 발명자들은 종양세포 특이적 항원을 표적하는 신규 항체에 대해 연구하던 중, ConA 로 자극된 PBMC를 사용하여 B cell tumor cells (IM9)에 특이적으로 결합하는 하이브리도마 세포를 구축하였고, 이를 통해 제조된 단일클론항체가 암세포, 특히 NK 림프종 세포 및 난소암 세포와 특이적으로

- 결합하며, 이의 세포사멸 또한 유도한다는 점을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [28] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 7, 서열번호 11, 서열번호 15 또는 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [29] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 8, 서열번호 12, 서열번호 16 또는 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [30] 본 발명에서 "항체"는 전체 형태의 항체("전항체") 또는 그의 기능적인 단편일 수 있다. 상기 전항체는 단량체 또는 2 이상의 전항체가 결합되어 있는 다량체의 형태일 수 있다. 상기 항체의 기능적인 단편은 전항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 갖는 항체로서, 실질적으로 전항체가 인식하는 것과 동일한 항원결합부위 (epitope)를 인식하는 것을 의미한다. 상기 항체의 기능적인 단편에는 단일쇄 가변영역 단편 (scFv), (scFv)₂, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 등이 포함되거나 이에 한정되지 않으며, 본 발명에서는 단일쇄 가변영역 단편(scFv, Single-chain variable fragment) 형태의 항체가 바람직하다. 상기 단일쇄 가변영역(scFv)은 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 링커 펩타이드를 통하여 연결되어 단일쇄 폴리펩티드 형태를 취하는 항체 단편을 의미한다. 상기 항체는 당업계에 알려져 있는 방법, 예를 들어, 파지 디스플레이 방법 또는 효모 세포 표면 발현 시스템을 사용하여 생성될 수 있다.
- [31] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 단일쇄 가변영역 항체이며, 이는 서열번호 9, 서열번호 13, 서열번호 17 또는 서열번호 21의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [32] 또한, 본 발명의 항체는 인간을 포함하는 포유동물, 조류 등을 포함한 임의의 동물로부터 유래한 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 항체는 인간, 생쥐, 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니피그, 낙타, 말 또는 닭의 항체일 수 있다.
- [33] 여기서 인간 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 가진 항체로서, 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 분리된 항체 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대하여 형질 이식되고 내재적 면역글로불린은 발현하지 않는 동물로부터 분리된 항체가 포함된다.
- [34] 또한 본 발명은 상기 서열번호 9, 서열번호 13, 서열번호 17 또는 서열번호 21의 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 가변영역 항체 각각을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [35] 본 발명의 항체를 코딩하는 유전자 서열은 당업계에 잘 알려진 방법에 의하여 얻어질 수 있다. 예를 들면, 상기 항체의 중쇄 및 경쇄의 일부분 또는 전부를 코딩하는 DNA 서열 또는 해당 아미노산 서열에 근거하여, 당분야에 잘 알려진 올리고뉴클레오티드 합성기법, 예를 들어 부위 지향적 돌연변이 발생법(site-directed mutagenesis) 및 중합효소 연쇄 반응(PCR)법 등을 사용하여 원하는 대로 합성할 수 있다.
- [36] 보다 구체적으로, 상기 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 가변영역

- 항체를 코딩하는 유전자는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [37] 또한, 상기 서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 가변영역 항체를 코딩하는 유전자는 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [38] 또한, 상기 서열번호 17의 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 가변영역 항체를 코딩하는 유전자는 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [39] 또한, 상기 서열번호 21의 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 가변영역 항체를 코딩하는 유전자는 서열번호 22의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [40] 본 발명의 일실시예에서, 상기 유전자 및 이를 포함하는 발현벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 적절한 조건 하에서 배양하여 항체를 발현시키고 분리하여 항체 분자를 생산할 수 있다.
- [41]
- [42] 본 발명의 항체는 암세포에 특이적으로 결합하는 특성을 보이며, 특히 림프종 세포 및 난소암 세포에 결합하여 세포사멸을 유도하는 특성을 보이는 바, 이는 암의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [43] 따라서 본 발명은 상기 항체를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물, 항암제의 제조를 위한 상기 항체의 용도, 그리고 치료상 유효량의 상기 항체를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.
- [44] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 항체를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤향제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤향제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [45] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤향제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol),

- 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [46] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 항체를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 제형화하여 사용할 수 있다.
- [47] 본 발명의 일실시에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [48] 상기 항체의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [49] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [50] 상기 암으로는 간암, 폐암, 대장암, 난소암, 유방암, 전립선암, 백혈병, 림프종 및 췌장암으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [51]
- [52] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하고, 상기 항체에 하나 또는 둘 이상의 진단제 또는 항암제를 결합시킨 암세포 표적화 진단 또는 치료 컨쥬게이트를 제공한다.
- [53] 상기 진단제로는 방사성핵종, 상자성 금속이온, 초상자성 나노입자, 발색효소, 크로모포어, 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 사용할 수 있으며, 상기 조영제는 CT 조영제, MRI 조영제, 및 광학 조영제, 및 초음파 조영제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [54] 상기 항암제로는 종래 암의 치료에 사용되는 것이라면 제한없이 사용될 수 있으며, 예를들면 시스플라틴, 5-플로오우라실, 아드리아마이신, 메토트렉세이트, 빈블라스틴, 부셀판, 클로람부실, 시클로포스파미드, 멜팔란, 니트로젠 무스타드, 니트로소우레아, 탁솔, 파클리탁셀, 도세탁셀, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 블레오마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토마이신-C 및 하이드록시우레아로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 사용할 수 있다. 항암제와 본 발명의 항체와의 연결은 당업계에 공지된 방법, 예컨대, 공유 결합, 가교 등을 통해 수행될 수 있다.
- [55] 또한, 상기 항암제로는 치료용 방사성 핵종, 예를들어 ^{32}P , ^{47}Sc , ^{64}Ga , ^{64}Cu , ^{66}Cu ,

⁶⁷Cu, ⁸⁹Sr, ⁹⁰Y, ⁹¹Y, ¹⁰³Pd, ^{103m}Rh, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹¹In, ^{117m}Sn, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴⁵Sm, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁵Dy, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁹Er, ¹⁷⁶Lu, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸²Ta, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁸W, ¹⁹²Ir, ^{195m}Pt, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ²³⁰U, ²⁵²Cf 또는 이들의 조합 등을 사용할 수 있다.

[56] 본 발명의 암세포 표적화 치료 컨쥬게이트에 포함되는 본 발명의 항체의 양은 결합되는 항암제의 종류 및 양에 따라 달라질 수 있다. 바람직하게는 치료를 위해 투여되는 양의 항암제를 표적 암질환 부위에 충분히 전달할 수 있는 양일 수 있다. 그러나, 약물은 그 투여 경로 및 치료 횟수뿐 만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 항체를 항암제와 결합시켜 암질환을 치료하기 위한 용도에 따른 적절한 유효량을 결정할 수 있을 것이다.

[57] 본 발명의 암세포 표적화 치료 컨쥬게이트에는 상기 항체의 안정성을 유지/보존하기 위한 적당한 완충용액이 포함될 수 있다. 본 발명의 암세포 표적화 치료 컨쥬게이트는 본 발명에서 원하는 효과를 나타내는 한, 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다. 예컨대, 본 발명의 컨쥬게이트는 피하 주사, 근육내 주사, 정맥 주사, 요도 주입, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 등과 같이 비경구로 투여될 수 있다.

[58] 이외에도 본 발명의 암세포 표적화 치료 컨쥬게이트에는 일반적인 약학조성물에 통상적으로 첨가되는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 운할제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 운할제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[59] 또한 본 발명의 암세포 표적화 치료 컨쥬게이트는 통상적인 방법에 따라 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 증, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 제형화하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 포함제 형태로 제조할 수 있다.

[60]

발명의 실시를 위한 형태

[61] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[62]

[63] <제조예 1> scFv(single chain Fv)인 ITTab1 항체 제작

[64] 1. 하이브리도마 세포주 구축

[65] 마우스는 5-6주령 암컷 Balb/c 마우스를 오리엔트바이오에서 구입하여 사용하였다. 구입한 마우스는 온도 20-25°C, 습도 60%, 조도 200-300 Lux 의 실내

환경에서 고품사료와 물을 충분히 공급하여 1주일간 순화를 진행하였다.

- [66] 건강한 지원자로부터 Ficoll-gradient 방법으로 분리한 PBMC 1×10^7 를 Con A (콘카나발린 A) 10ug/ml 로 자극한 후 마우스에 면역한 후, 2달 후에 마우스의 비장을 분리하여 1×10^8 의 비장세포를 확보하고 이를 10^7 의 SP 2/0-Ag14 마우스 골수종세포(myeloma cell)와 폴리에틸렌글리콜(PEG 4000; Sigma, St Louis, MO) 방법을 사용하여 융합하였다. 상기의 방법은 Kohler G, Milstein C. Nature 256 (1975) 495-497 에 자세히 기술되었다. 획득한 100개의 하이브리도마 세포주의 배양 상층액을 사용하여 FACS 염색을 수행, B cell tumor cells (IM9, Raju, Ramos)에 반응성이 있는 하이브리도마 세포를 획득하였다.

- [67] 2. 하이브리도마 세포주로부터 scFv(single chain Fv)인 ITTab1 항체 제작 및 활성 검증

- [68] 본 발명의 ITT-ab1(Inje Tumor Targeting - antibody1) 마우스항체는, 라이브러리(library) 제작단계(A)와; 항체기능확인단계(B)를 포함하는 것을 특징으로 하여 제조되었다.

- [69] 또한 라이브러리(library)제작단계(A)는, B cell tumor cells(IM9) 에 결합하는 항체를 생산의 방법 1에서 획득한 하이브리도마 세포(이하 하이브리도마 F6 세포)로부터 scFv(단쇄 Fv) 형태의 비면역 마우스 항체 분절 라이브러리(library)를 제작하는 단계로서,

- [70] RNA를 정제하는 분리정제단계(a1)와; First strand cDNA 제작 및 마우스항체 유전자의 증합효소 연쇄반응으로 증폭시키는 증합효소 연쇄반응 증폭단계(a2)와; 컴피턴트 셀(competent cell)을 제작하는 셀 제작단계(a3)와; 상기 제작단계를 바탕으로 scFv(single chain Fv) 라이브러리를 완성하는 라이브러리(library) 완성단계(a4)로 구성된다. 각 단계별로 과정을 설명하면 아래와 같다.

- [71] 1) 분리정제단계(a1)

- [72] 분리정제단계(a1)는, RNA를 정제하는 것으로서, 하이브리도마 F6 세포를 배양하여 TRIZOL 시약을 사용하여 F6 cell 1×10^7 에 TRIZOL 2ml을 넣어 상온에서 5분간 반응한 뒤, TRIZOL 1ml 당 클로로포름 200ul 씩 15초 가량 vortex 해주었다. 그리고 원심분리기를 이용하여 4°C에서 13000rpm에 15분간 원심분리 하였다. 그리고 상층액을 중간층을 따지 않게 조심하여 마이크로센트리퓨트 튜브(microcentrifuge tube)에 옮겨 이소프로필 알콜을 같은 비율로 섞어 상온에서 10분간 반응시켰다. 이후 4°C에서 12000 x g 로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 75% 에탄올 1ml을 넣어 세척해주고 한번 더 4°C에서 12000 x g로 15분 동안 원심분리하고 상층액을 제거한 후 DEPC 처리된 증류수 30ul로 RNA를 회수하였다. RNA는 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동 하여 RNA 순도를 확인하였고, 분광흡광계를 이용하여 정량한 후 실험에 사용하였다.

- [73] 2) 증합효소 연쇄반응 증폭단계(a2)

- [74] 증합효소 연쇄반응증폭단계(a2)는, First strand cDNA 제작 및 마우스항체

유전자를 증합효소 연쇄반응 증폭시키는 단계로서, 분리정제단계(a1)에서 정제된 RNA 2 ug을 0.5 ug의 올리고(dT)과 혼합하고 증류수를 첨가하여 최종 부피가 10 ul가 되도록 한 다음 75°C에서 5분간 반응시켰다. 이후 cDNA 반응용액 15 ul (5 x M-MLV 반응용액 5 ul, M-MLV 역전사효소 100unit, 10 mM dNTP 1.25 ul, RNase Inhibitor 4unit)를 첨가하여 RNA 샘플과 섞어 vortex 하였다. 이를 연쇄증합반응 장치에서 37°C에서 1시간, 95°C에서 5분간 반응시킨 후 mGAPDH 프라이머로 항체유전자를 증합효소 연쇄반응 증폭하였다.

- [75] 마우스 항체 특이 프라이머로 항체유전자를 증합효소 연쇄반응 증폭하였다. 경쇄(light chain)와 중쇄(heavy chain)의 가변영역(variable region)들을 각각 증폭하고 이를 링커 특이 프라이머를 이용한 오버래핑 증합효소 연쇄반응으로 결합한 뒤 pComb3X-TT 발현벡터의 *Sfi* 제한효소 사이트에 클로닝하여 라이브러리를 제작하였다. 이때 사용되는 프라이머는 매뉴얼 (Barbas et al., Phage Display; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,(2001), New York)에 의해 결정하였고 Bioneer(Korea)에 제작 의뢰하여 합성하였다.
- [76] 증합효소 연쇄반응 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation하고 94°C 30초, 57°C 15초, 72°C 30초로 25 cycles 반응한 뒤 72°C에서 10분간 반응하였다. 증폭의 유무는 1% 아가로스 겔 전기영동으로 확인하고 Qiagen 겔 추출 키트를 이용하여 정제하고 상기 증폭된 경쇄가변부위와 중쇄가변부위를 주형으로 하고 다음 오버래핑 증합효소 연쇄반응을 실시하였다.
- [77] 증합효소 연쇄반응 산물은 Qiagen 겔 추출 키트로 아가로스에서 DNA를 정제하고 *Sfi*로 제한효소 절단을 한 다음 다시 겔 추출(gel extraction)을 하였다. *Sfi* 절단된 항체 유전자 30 ng과 *Sfi* 절단된 pComb3X-TT 30 ng을 혼합한 후 10X 버퍼와 리가아제(ligase, Gibco-BRL, USA) 10 unit를 첨가하고 실온에서 2시간동안 반응한 후 TOP10F' competent cell에 형질변환하였다.
- [78] 본 발명의 제조합 인간 단세포균 항체 개발에 사용된 마우스 IgG 특이 프라이머는 Phage Display 매뉴얼(Barbas et al., Phage Display; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,(2001), New York)에 상세하게 기술되어 있다.
- [79] 3) 셀 제작단계(a3)
- [80] 셀제작단계(a3)는, 컴피턴트 셀(Electrocompetent cell)을 제작하는 단계로서, 대장균 ER2537을 미니멀 플레이트(minimal plate)에서 배양하여 F' 섬모의 발현을 유도한 후 수용성 세포 (competent cell) 제작에 사용하였다. SB 배지(10 g MOPS, 30 g, bacto-trypton, 20 g yeast extract in 1 L) 2 ml에 ER2537을 접종하여 37°C에서 18시간동안 배양한 후, O.D₆₀₀가 3.54 되도록 배양하였다. 전 배양액 1 ml를 LB 배지(10 g NaCl, 10 g, bacto-trypton, 5 g yeast extract in 1 L) 100ml에 O.D₆₀₀가 0.4가 되도록 배양하였다. 그후 원심분리기를 통해 4°C에서 4,000 rpm으로 10분간 원침하였다. 50mM CaCl₂ 20ml로 세포를 부유시킨 다음 아이스에서 30분간 반응 후 4°C 에서 4,000 rpm으로 10분간 원침하였다. 상층액을 제거하고 (10%

글리세롤 + 50mM CaCl₂) 3ml을 넣어 세포를 부유한 후 50ul씩 분주하여 사용하였다.

[81] 4) 라이브러리 완성단계(a4)

[82] 라이브러리(library)완성단계(a4)는, 상기 제작단계를 바탕으로 scFv(단쇄 Fv) 라이브러리를 완성하는 단계로서, 회수된 파지 항체를 대수 증식기의 대장균 ER2537에 감염시킨 후 100 µg/mL의 암피실린이 첨가된 LB 아가 플레이트에 도말하여 37°C 에서 18시간 배양하였다. 형성된 집락을 100 µg/mL의 암피실린이 첨가된 SB (SB/amp) 액체배지 5 mL에 접종하여 37°C에서 250 rpm으로 4시간 진탕배양 하였다. 파지 형성을 위하여 VCSM13을 10¹⁰ pfu 첨가하여 37°C 에서 30분간 정치하여 감염시킨 후 37°C 에서 250 rpm으로 1시간 30분 배양하고 카나마이신을 최종 70 µg/mL이 되게 첨가하여 37°C 에서 18시간동안 배양하였다. 이후 배양액을 2,500 rpm 10분간 원심시켜 파지가 포함된 상층액을 회수하였다.

[83] 이후 항체기능확인단계(B)는, 라이브러리(library)완성단계(a4)에서 완성된 항체들의 기능을 확인하는 것으로 IM-9 세포를 인지하는 파지 항체를 α-M13과 α-mIgG-PE로 처리한후 FACS 염색을 수행하여, B cell tumor cells인 IM9에 결합하는지 여부를 확인하였다.

[84]

[85] <실시예 1> ITTab1의 B cell tumor cells (IM9) 결합능 검토

[86] 파지 디스플레이에 의해 확보된 ITTab1이 기 확보된 하이브리도마에서 유래된 항체와 같은 특징을 보유하는지 규명하기 위해 B cell tumor cells 인 IM9 세포주에 대한 결합능을 FACS staining으로 확인하였다. IM-9 세포 (10⁶)에 1 ug의 각각 ITTab1 서브클론 항체(ITTab 1-1 내지 ITTab 1-4)를 처리하고 30분 결합 후 PBS로 세척하였다. 세척된 세포는 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG, (Sigma-Aldrich)를 30분간 결합한후 3번 PBS로 세척하고 FACS Calibur (BD Pharmingen)로 관찰하였다. 결과를 도 1에 나타냈다.

[87] 도 1을 참조하면, IM-9 세포의 표면에서 ITTab1의 서브클론 항체 모두가 결합하는 것이 관찰 되었다. 이러한 결과를 통해, 이 항체에 대한 타겟 항원이 IM-9 세포에 존재하며, 기 확보된 하이브리도마 세포에서 얻은 항체와 파지 디스플레이에 의해 확보된 본 발명의 ITTab1 항체가 동일한 항원을 인지하는 것을 확인할 수 있었다.

[88]

[89] <실시예 2> ITTab1의 항체 CDR 영역의 서열 규명 및 전체 핵산 및 아미노산 서열 규명

[90] 파지 디스플레이에 의해 확보된 ITTab1의 서브클론인 ITTab1-1 내지 ITTab1-4의 CDR 영역의 서열을 규명하기 위해 시퀀싱을 진행하고 확보된 정보를 사용하여 특징을 관찰하였다. scFv (단쇄 Fv) 형의 ITTab1-1 내지 ITTab1-4의 가변영역 내 상보성 결정부위(Complimentarily-determining region,

CDR)를 규명한 결과, 밑줄의 부위는 링커 부위 이고 이를 경계로 경쇄와 중쇄로 나뉘며 중쇄의 제일 선두에 나오는 굵은 글씨체로 표시된 부위부터 중쇄의 CDR1, CDR2 그리고 CDR3로 결정되었다. 링커를 경계로 경쇄의 선두에 나오는 굵은 글씨체로 표시된 부위는 경쇄의 CDR1, CDR2 그리고 CDR3로 결정되었다.

[91] **1) ITTab1-1**

[92] 도 2에 ITTab1-1의 염기 및 아미노산 서열 및 이의 CDR 및 링커 영역을 나타내었다.

[93] 도 2를 참조하면, ITTab1-1는 굵은 글씨체의 순서대로 경쇄의 CDR1(서열번호 1), CDR2(서열번호 2), CDR3(서열번호 3), 중쇄의 CDR1(서열번호 4), CDR2(서열번호 5), CDR3(서열번호 6)을 포함한다.

[94] 또한, ITTab1-1의 경쇄 아미노산 서열을 서열번호 7에, 중쇄 아미노산서열을 서열번호 8에 나타내었고,

[95] ITTab1-1의 전체 아미노산 서열을 서열번호 9에, 전체 염기서열을 서열번호 10에 나타내었다.

[96] **2) ITTab1-2**

[97] 도 3에 ITTab1-2의 염기 및 아미노산 서열 및 이의 CDR 및 링커 영역을 나타내었다.

[98] 도 3를 참조하면, ITTab1-2는 굵은 글씨체의 순서대로 경쇄의 CDR1(서열번호 1), CDR2(서열번호 2), CDR3(서열번호 3), 중쇄의 CDR1(서열번호 4), CDR2(서열번호 5), CDR3(서열번호 6)을 포함한다.

[99] 또한, ITTab1-2의 경쇄 아미노산 서열을 서열번호 11에, 중쇄 아미노산서열을 서열번호 12에 나타내었고,

[100] ITTab1-2의 전체 아미노산 서열을 서열번호 13에, 전체 염기서열을 서열번호 14에 나타내었다.

[101] **3) ITTab1-3**

[102] 도 4에 ITTab1-3의 염기 및 아미노산 서열 및 이의 CDR 및 링커 영역을 나타내었다.

[103] 도 4를 참조하면, ITTab1-3은 굵은 글씨체의 순서대로 경쇄의 CDR1(서열번호 1), CDR2(서열번호 2), CDR3(서열번호 3), 중쇄의 CDR1(서열번호 4), CDR2(서열번호 5), CDR3(서열번호 6)을 포함한다.

[104] 또한, ITTab1-3의 경쇄 아미노산 서열을 서열번호 15에, 중쇄 아미노산서열을 서열번호 16에 나타내었고,

[105] ITTab1-3의 전체 아미노산 서열을 서열번호 17에, 전체 염기서열을 서열번호 18에 나타내었다.

[106] **4) ITTab1-4**

[107] 도 5에 ITTab1-4의 염기 및 아미노산 서열 및 이의 CDR 및 링커 영역을 나타내었다.

[108] 도 5를 참조하면, ITTab1-4는 굵은 글씨체의 순서대로 경쇄의 CDR1(서열번호

1), CDR2(서열번호 2), CDR3(서열번호 3), 중쇄의 CDR1(서열번호 4), CDR2(서열번호 5), CDR3(서열번호 6)을 포함한다.

[109] 또한, ITTab1-4의 경쇄 아미노산 서열을 서열번호 19에, 중쇄 아미노산서열을 서열번호 20에 나타내었고,

[110] ITTab1-4의 전체 아미노산 서열을 서열번호 21에, 전체 염기서열을 서열번호 22에 나타내었다.

[111]

[112] <실시예 3> NK 림프종세포에 대한 ITTab1의 항원 발현 검출능 규명

[113] ITTab1의 항원에 대한 반응성과 종양세포에 대한 발현 패턴을 확인하기 위해, NK 림프종 세포에 대해 ITTab1의 항원이 존재하는지 여부를 면역형광법 및 공초점현미경으로 분석하였다.

[114] NK 림프종 세포를 1ug의 ITTab1과 함께 30분간 배양 한 후 세포를 회수하여 PBS를 사용하여 세척하였다. 세척한 세포주를 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Sigma-Aldrich)와 함께 30분간 배양한 후 PBS 로 3번 세척하였다. 세척된 세포는 형광 마운팅 배지 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)를 사용하여 커버-슬립 밑에 현미경 슬라이드 위에 놓고 마운팅하였다. 형광 염색된 세포는 Confocal Laser-Scanning microscope (Carl ZEISS, 510 META, Jena, Germany)를 사용하여 400× original magnification으로 관찰하고 confocal Microscopy Software Release 3.0 (Carl ZEISS, 510 META)로 분석하였다.

[115] 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6을 참조하면, 공초점현미경 결과에서 세포표면과 세포질 모두에서 ITTab1에 의해 초록색 형광으로 염색되는 결과를 확인할 수 있는 바, 이를 통해 ITTab1 항체에 대한 타겟 항원이 NK 림프종 세포에 존재함을 확인할 수 있었다.

[116]

[117] <실시예 4> ITTab1이 NK 림프종 세포의 세포자멸사에 미치는 영향 검토

[118] NK 림프종 세포에 발현되는 ITTab1 항원의 NK 림프종 세포에 대한 기능을 규명하기 위하여 먼저 ITTab1을 종양 세포에 처리 후 자멸사에 미치는 효과를 아넥신(annexin)-V 어세이로 분석하였다.

[119] NK 림프종 세포 (10⁶ cells)를 각각의 농도의 ITTab1과 함께 1시간 배양 한 후 세포를 회수하여 PBS를 사용하여 두 번 세척하였다. 세척한 세포주를 100 ul의 아넥신-V 결합 버퍼 (10mM EPES/NaOH pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂)로 현탁한후 2ul의 FITC-컨쥬게이트 아넥신-V (BD Pharmingen)와 7-ADD를 처리하였다. 처리된 NK 림프종 세포를 어두운 상태의 실온에서 15분간 배양한후 400 ul의 아넥신-V 결합 버퍼를 더 첨가 해준 후 FACS Calibur (BD Pharmingen)를 사용하여 분석하였다.

[120] 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7을 참조하면, ITTab1항체가 증가되는 농도 의존적으로 세포의 자멸사가 유도되는 것을 관찰하였으며 이를 통해, 본 발명의 ITTab1가 NK 림프종 세포에서 세포자멸사 유도 항체로 발달될 수 있음을

시사한다.

[121]

[122] <실시예 5> 난소암 세포에 대한 ITTab1의 항원 발현 검출능 규명

[123] ITTab1의 항원에 대한 반응성과 종양세포에 대한 발현 패턴을 확인하기 위해 난소암 세포에 대해 ITTab1의 항원이 존재하는지를 항체로 염색하고 FACS calibur(BD Pharmingen)로 관찰하였다.

[124] 난소암 세포는 1ug의 ITTab1과 함께 30분간 배양 한 후 세포를 회수하여 PBS를 사용하여 세척되었다. 세척한 세포주를 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Sigma-Aldrich)와 함께 30분간 배양한 후 PBS 로 3번 세척하였다. 세척된 세포는 FACS calibur(BD Pharmingen)를 사용하여 분석하였다.

[125] 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8을 참조하면, 유세포분석 결과에서 세포표면과 세포질 모두에서 ITTab1에 의해 ITTab1의 항원이 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 상기 결과를 통해 본 발명의 항체에 대한 타겟 항원이 난소암 세포에 존재함을 알 수 있었다.

[126]

[127] <실시예 6> ITTab1이 난소암 세포의 세포자멸사에 미치는 영향 검토

[128] 난소암 세포에 발현되는 ITTab1 항원의 난소암 세포에 대한 기능을 규명하기 위하여 먼저 ITTab1을 종양 세포에 처리 후 자멸사에 미치는 효과를 프로피뎀 아이오드(PI)치리에 의한 세포 주기 분석으로 분석하였다.

[129] 난소암 세포(10^6 cells)는 5ug의 ITTab1과 함께 1시간 배양 한 후 세포를 회수하여 PBS를 사용하여 두 번 세척되었다. 세척한 세포주를 프로피뎀 아이오드(PI)로 처리 한 후 세포를 FACS caliber (BD Pharmingen)를 사용하여 분석하였다.

[130] 결과를 도 9에 나타내었다. 난소암 세포에 ITTab1를 처리하게 되면 PI염색 결과 subG1 기에 해당하는 apoptosis 세포가 isotype control (MOPC) 처리한 세포에서 보다 항체의 농도가 증가할수록 증가되는 양상을 보여주었다. 이를 통해, 본 발명의 ITTab1가 난소암 세포에서 세포자멸사 유도 항체로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[131]

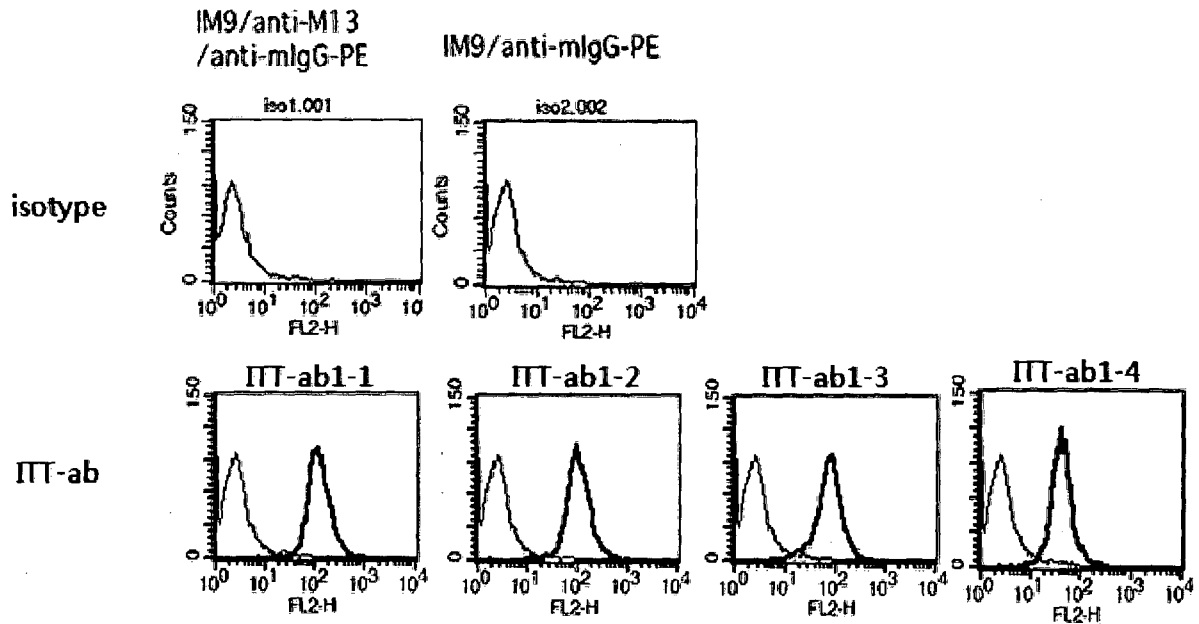
[132] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 암세포에 결합하여 세포사멸을 유도하는 단일클론 항체로서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3 를 포함하는 경쇄 가변영역 및;
서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3 를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 경쇄 가변영역은
서열번호 7, 서열번호 11, 서열번호 15 또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 것인 항체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 중쇄 가변영역은
서열번호 8, 서열번호 12, 서열번호 16 또는 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 것인 항체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 항체는 단일쇄 가변영역 (scFv, Single-chain variable fragment) 항체이며,
서열번호 9, 서열번호 13, 서열번호 17 또는 서열번호 21의 아미노산 서열을 갖는 것인 항체.
- [청구항 5] 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 가변영역 (scFv, Single-chain variable fragment) 항체를 코딩하는 유전자.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 유전자는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것인 유전자.
- [청구항 7] 서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 가변영역 (scFv, Single-chain variable fragment) 항체를 코딩하는 유전자.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 유전자는 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 것인 유전자.
- [청구항 9] 서열번호 17의 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 가변영역 (scFv, Single-chain variable fragment) 항체를 코딩하는 유전자.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 유전자는 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 것인 유전자.
- [청구항 11] 서열번호 21의 아미노산 서열을 갖는 단일쇄 가변영역 (scFv, Single-chain variable fragment) 항체를 코딩하는 유전자.

- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 유전자는 서열번호 22의 염기서열로 이루어진 것인 유전자.
- [청구항 13] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 암은 간암, 폐암, 대장암, 난소암, 유방암, 전립선암, 백혈병, 림프종 및 췌장암으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 암 예방 또는 치료용 약학조성물.
- [청구항 15] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하고, 상기 항체에 하나 또는 둘 이상의 진단제 또는 항암제를 결합시킨 암세포 표적화 진단 또는 치료 컨쥬게이트.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 진단제는 방사성핵종, 상자성 금속이온, 초상자성 나노입자, 발색효소, 크로모포어, 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상인 것인 암세포 표적화 진단 또는 치료 컨쥬게이트.
- [청구항 17] 제15항에 있어서,
상기 항암제는 시스플라틴, 5-플로오우라실, 아드리아마이신, 메토트렉세이트, 빈블라스틴, 부셀판, 클로람부실, 시클로포스파미드, 멜팔란, 니트로젠 무스타드, 니트로소우레아, 탁솔, 파클리탁셀, 도세탁셀, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 블레오마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토마이신-C 및 하이드록시우레아로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 것인 암세포 표적화 진단 또는 치료 컨쥬게이트.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

10 20 30 40 50 60 70 80 90
GAGCTCGATATTGTGATGACTCAGGCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCA TCTCTTGCA GATCTAGTCAGAGC
E L D I V M T Q A P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S

100 110 120 130 140 150 160 170 180
ATTGTACATAGTAATGGAACAACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAC
I Y H S N G N T Y L E W V L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N

190 200 210 220 230 240 250 260 270
CGATTTTCTGGGTCCTCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCATGGACAGATTTCACTCAAGATCAAGCAGATGGAGGCTGAGGATCTG
R F S G V P D R F S G S G S W T D F T L K I S R V E A E D L

280 290 300 310 320 330 340 350 360
GGAGTTTAT TACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCTCGGACGTTCGGTGGAGGACCAAGCTGGAAAATCAAATCCTCTGGTGGCGGTGGC
G V Y Y C F Q G S H V P R T F G G G T K L E I K S S G G G G

370 380 390 400 410 420 430 440 450
TGGGGGGTGGTGGGGGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAAGCTGATGGAGTCTGGACTGTGCTGGCAAAGCCCTGGGCTTCC
S G G G G G G S S R S S L E V K L M E S G T V L A R P G A S

460 470 480 490 500 510 520 530 540
GTGAAGA TGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACA G T T T A G C A G C T A C T G G T G C A C T G G T A A A C A G A G G C C T G G A C A G G G T C T A G A A T G G
V K M S C K A S G Y S F S S Y W V H W V K Q R P G Q G L E W

550 560 570 580 590 600 610 620 630
ATTGGTGCTATTTATCCTGCAAATAGTGAAACTAGATACAACCCAGAGTTCAGGGCCAAGGCCAAACTGACTGCA G T C A C C C G C A G C
I G A I Y P G N S E T R Y N Q K F K G K A K L T A V T P A S

640 650 660 670 680 690 700 710 720
ACGGCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGGGTCTATTACTGTACACTCACTACAATGCTTACGACGGGTTGGT
T A Y M D L S S L T N E D S A Y Y Y C T L I Y N A Y D G F G

730 740 750 760 770 780 790 800 810
TACTGGGGCTAGGGACTCTGGTCACTGTCTCAGCAGCCAAAACGACAGCCCACTCTGTCACTAGTGGCCAGGCCGCCAG...
Y W G L G T L V T V S A A K T T A P S V T S G Q A G Q

[Fig. 3]

10 20 30 40 50 60 70 80 90
 GAGCTCGACGTTTGA TGAGCCAGACTCCA CTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGC
 E L D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S
 100 110 120 130 140 150 160 170 180
 ATTGTACATAGTAATGCAAAACACCTATT TAGAATGGTACCTGCAGAAACCA GGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAAGTTTCCAAC
 I V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N
 190 200 210 220 230 240 250 260 270
 CGATTTTCTGGGGTCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGA CAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTG
 R F S G Y P D R F S G S G S G T D F T L K I S R Y E A E D L
 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 GGAGTTTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTT CCTCGGADGTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGCTGAAATCCTCTGGTGGCGGTGGC
 G Y Y Y C F Q G S H Y P R T F G G G T K L E L K S S G G G G
 370 380 390 400 410 420 430 440 450
 TCGGGCGGTGGTGGGGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGATGTGGTGGAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCC
 S G G G G G G S S R S S L E V M L V E S G T V L A R P G A S
 460 470 480 490 500 510 520 530 540
 GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACA GTTTTAGCAGCTACTGGGTGCCTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGG
 Y K M S C K A S G Y S F S S Y W V H W V K Q R P G Q G L E W
 550 560 570 580 590 600 610 620 630
 ATTGGTGTATTTATCCTGGAAATAGTGAAACTAGATACA ACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCAACCCGCCAGC
 I G A I Y P G N S E T R Y N Q K F K G K A K L T A Y T P A S
 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 ACGGCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGGGGTCTATTACTGTACACTCATCTACAATGCTTACGACGGGTTTGGT
 T A Y M D L S S L T N E D S A V Y Y Y C T L I Y N A V D G F G
 730 740 750 760 770 780 790 800
 TACTGGGGCTAGGGACTCTGGTCACTGTCTCAGCAGGCCAAAACAACACCCCCATCTGTCACTAGTGGCCAGGCCGGCCAG
 Y W G L G T L V T V S A A K T T P P S V T S G Q A G Q

[Fig. 4]

10 20 30 40 50 60 70 80 90
 GAGCTCGACATTTTGGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGC
 E L D I L L T Q S P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S

100 110 120 130 140 150 160 170 180
 ATTGTACATAGTAATGGAAACAACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAC
 I V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N

190 200 210 220 230 240 250 260 270
 CGATTTTCTGGGGTCCCAAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGGCAGTGGAGGCTGAGGATCTG
 R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L

280 290 300 310 320 330 340 350 360
 GGAGTTTATTACTGCTTCAAGGTTCAACATGTTCTCCGACGTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGCTGAAATCCTCTGGTGGGGGTGGC
 G V Y Y C F Q G S H V P R T F G G G T K L E L K S S G G G G

370 380 390 400 410 420 430 440 450
 TCGGGGGTGGTGGGGGTGGTCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCC
 S G G G G G S S R S S L E Y Q L Q Q S G T V L A R P G A S

460 470 480 490 500 510 520 530 540
 GTGAAGAATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTAGCAGCTACTGGGTGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGG
 V K M S C K A S G V S F S S Y W V H W V K Q R P G Q G L E W

550 560 570 580 590 600 610 620 630
 ATTGGTGTATTTATCCTGGAAATAGTGAAACTAGATACAACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCACTCACACCCGCCAGC
 I G A I V P G N S E T R Y N Q K F K G K A K L T A V T P A S

640 650 660 670 680 690 700 710 720
 ACGGCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGGGGTCTATTACTGTACACTCATCTACAATGCTTACGACGGGTTTGGT
 T A Y M D L S S L T N E D S A V Y Y C T L I V N A Y D G F G

730 740 750 760 770 780 790 800 810
 TACTGGGGCCTAGGGACTCTGGTCACTGTCTCAGCAGCCAAAAACGACACCCCATCTGTCACTAGTGGCCAGGGCCGCCAG
 Y W G L G T L V T V S A A K T T P P S V T S G Q A G Q

[Fig. 5]

10 20 30 40 50 60 70 80 90
 GAGCTCGATATTGTGATGACACAGTCTCCACTCTCCCTGCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGC
 E L D I V M T Q S P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S

100 110 120 130 140 150 160 170 180
 ATTGTACATAGTAATGGAAACAOCCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAAACAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAAAAGTTTCCAAC
 I V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K Y S N

190 200 210 220 230 240 250 260 270
 CGATTTTCTGGGGTCCCAAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTG
 R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L

280 290 300 310 320 330 340 350 360
 GGAGTTTATTACTCCTTTCAAGGTTTACATGTTCCCTCGAOCGTTCGGTGGAGGGACCAAACTGGAGCTGAAACTCCTCTGGTGGCGGTGGC
 G V Y Y C F Q G S H V P R T F G G G T K L E L K S S G G G G

370 380 390 400 410 420 430 440 450
 TCGGGCGGTGGTGGGGTGGTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTTCAAGTGCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCC
 S G G G G G G S S R S S L E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S

460 470 480 490 500 510 520 530 540
 GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTATGCACTACTGGGTGCAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGG
 V K M S C K A S G Y S F S S Y W V H W V K Q R P G Q G L E W

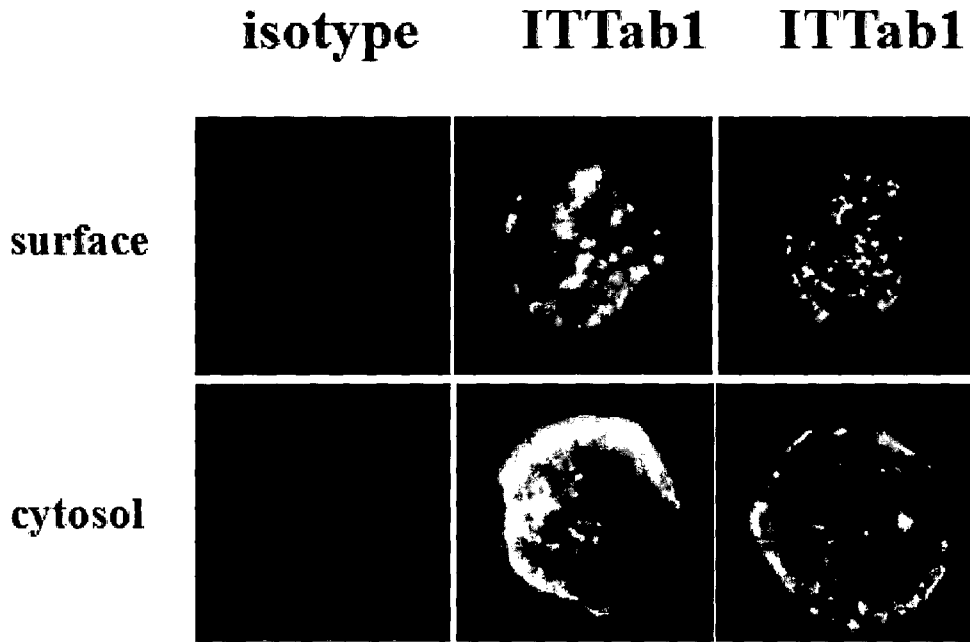
550 560 570 580 590 600 610 620 630
 ATTGGTGTATTTATCCTGGAAATAGTGAAAATAGATACAACCAGAGTTCAGGGCAAGGCCAAAAGTACTGCACTGCAACCCGCCAGC
 I G A I Y P G N S E T R Y N Q K F K G K A K L T A V T P A S

640 650 660 670 680 690 700 710 720
 ACGGCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGGGTCTATTACTGTACACTCATCTACAATGCTTACGACGGGTTTGGT
 T A Y M D L S S L T N E D S A V Y Y C T L I Y N A V D G F G

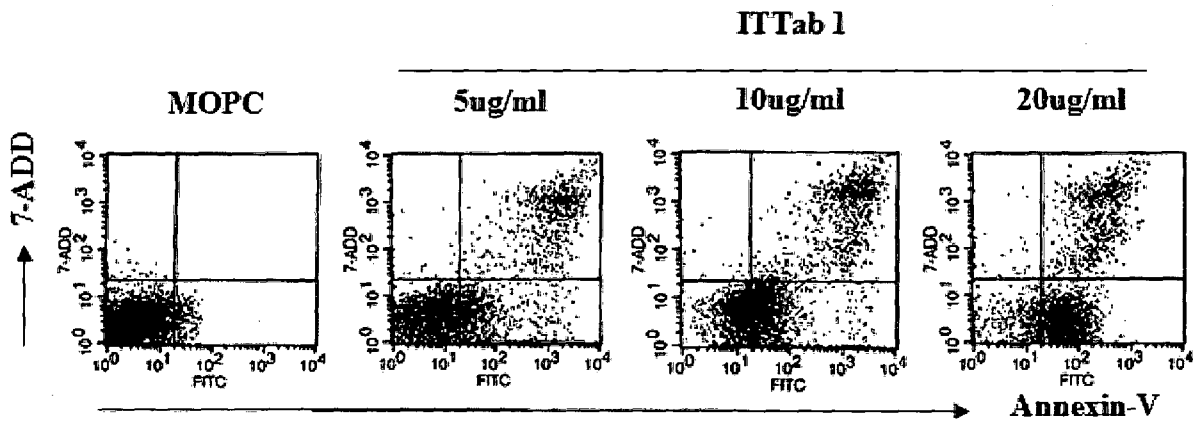
730 740 750 760 770 780 790 800 810
 TACTGGGOCCTAGGGACTCTGGTCACTGTCTCAGCAGOCAAAACGACAGOCOCATCTGTCACTAGTGGCCAGGCCGGCCAG
 Y W G L G T L V T V S A A K T T A P S V T S G Q A G Q

4/5/1

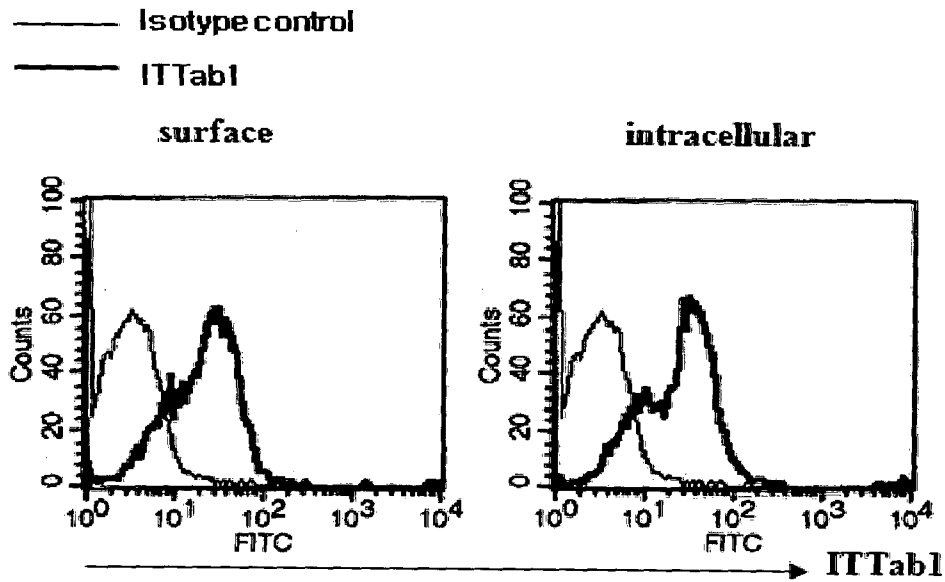
[Fig. 6]



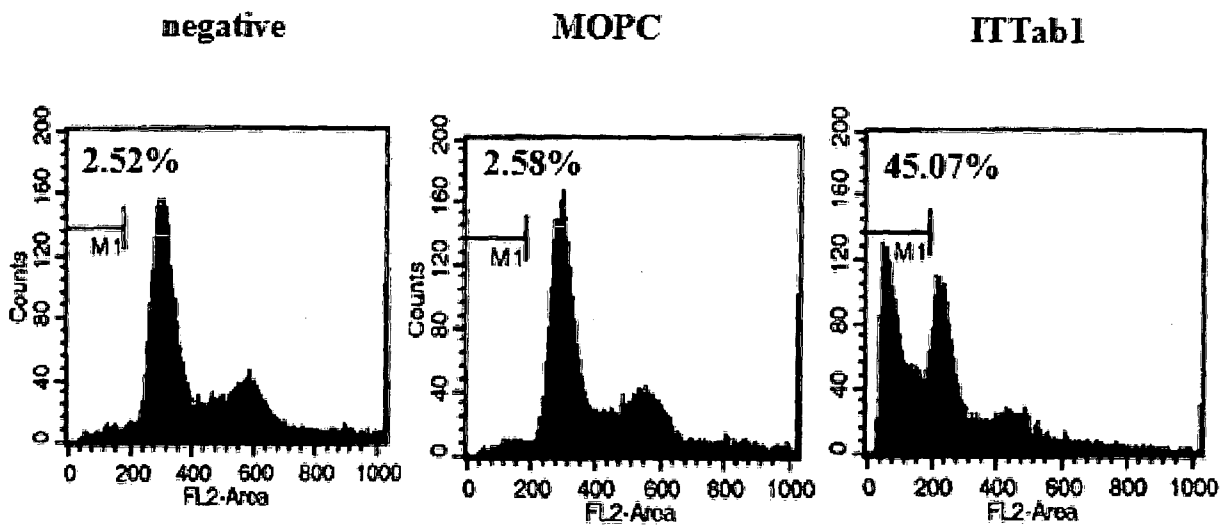
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/008951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/30(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 35/00(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 16/30; A61K 39/395; C12N 15/09; C07K 16/18

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 aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cancer cell, extinction, monoclonal antibody, tumor, CDR etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, DAEJIN et al., "CM1 Ligation Initiates Apoptosis in a Caspase 8 Dependent Manner in Ramos Cells and in a Mitochondria Controlled manner in Raji Cells", Human Immunology, 2002, vol. 63, pages 576-587. See the entire document.	1-17
A	US 7691376 B2 (GELBER, Cohava) 06 April 2010 See the entire document.	1-17
A	HEO, Dae Young et al., "Effect of CM1 on the Proliferation and Apoptosis of Germinal Center B Cells", Inje Medical, 2002, vol. 21, no. 2, pages 349-356. See the entire document.	1-17
A	KR 10-2009-0078339 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 17 July 2009 See the entire document.	1-17
A	JP 2007-515165 A (VACCINEX, INC.) 14 June 2007 See the entire document.	1-17

 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

25 APRIL 2013 (25.04.2013)

Date of mailing of the international search report

25 APRIL 2013 (25.04.2013)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/008951

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
US 7691376 B2	06.04.2010	AT 513857 T	15.07.2011		
		AU 2000-67607 A1	13.03.2001		
		CA 2381706 A1	22.02.2001		
		EP 1204683 A1	15.05.2002		
		EP 1204683 B1	22.06.2011		
		IL 148113 A	31.05.2010		
		IL 148113 D0	12.09.2002		
		JP 2003-508355 A	04.03.2003		
		US 2002-0037287 A1	28.03.2002		
		US 2006-0165678 A1	27.07.2006		
		US 2007-0269372 A1	22.11.2007		
		US 6376654 B1	23.04.2002		
		US 6986891 B2	17.01.2006		
		US 7226750 B1	05.06.2007		
		US 7498129 B2	03.03.2009		
		WO 01-12674 A1	22.02.2001		
		WO 01-12674 A9	06.09.2002		
		KR 10-2009-0078339 A	17.07.2009	AU 2007-307536 A1	17.04.2008
				CA 2639119 A1	19.04.2007
				CA 2666249 A1	17.04.2008
CN 101541834 A	23.09.2009				
EP 1932857 A1	18.06.2008				
EP 2067791 A1	10.06.2009				
TW 200823235 A	01.06.2008				
TW 200840825 A	16.10.2008				
US 2009-0142346 A1	04.06.2009				
US 2010-0008928 A1	14.01.2010				
WO 2007-043635 A1	19.04.2007				
WO 2008-044754 A1	17.04.2008				
JP 2007-515165 A	14.06.2007			AT 526037 T	15.10.2011
		AU 2004-296184 A1	23.06.2005		
		AU 2004-296184 B2	16.12.2010		
		CA 2548180 A1	23.06.2005		
		CN 1913921 A	14.02.2007		
		CN 1913921 B	22.02.2012		
		EP 1708751 A2	11.10.2006		
		EP 1708751 A4	07.11.2007		
		EP 1708751 B1	28.09.2011		
		IL 176007 D0	05.10.2006		
		NZ 547591 A	27.11.2009		
		US 2005-158323 A1	21.07.2005		
		US 2009-081210 A1	26.03.2009		
		WO 2005-055936 A2	23.06.2005		
		WO 2005-055936 A3	03.11.2005		

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/30(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 16/30; A61K 39/395; C12N 15/09; C07K 16/18

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: 암세포, 사멸, 단일클론 항체, 종양, CDR 등

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KIM, DAEJIN 외 17명, `CM1 Ligation Initiates Apoptosis in a Caspase 8 Dependent Manner in Ramos Cells and in a Mitochondria Controlled Manner in Raji Cells`, Human Immunology, 2002, 63권, 576-587페이지. 문서 전체 참조.	1-17
A	US 7691376 B2 (GELBER, COHAHA) 2010.04.06 문서 전체 참조.	1-17
A	허대영 외 4명, 'CM1이 종자중심 B세포의 apoptosis와 증식반응에 미치는 영향', 인체의학, 2002, 21권, 2호, 349-356페이지. 문서 전체 참조.	1-17
A	KR 10-2009-0078339 A (다케다 야쿠힌 교교 가부시키키가이샤) 2009.07.17 문서 전체 참조.	1-17
A	JP 2007-515165 A (바크시넥스인코포레이티드) 2007.06.14 문서 전체 참조.	1-17

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 2013년 04월 25일 (25.04.2013)	국제조사보고서 발송일 2013년 04월 25일 (25.04.2013)
--------------------------------------------	--------------------------------------------------

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 허주형 전화번호 82-42-481-8150
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일		
US 7691376 B2	2010.04.06	AT 513857 T	2011.07.15		
		AU 2000-67607 A1	2001.03.13		
		CA 2381706 A1	2001.02.22		
		EP 1204683 A1	2002.05.15		
		EP 1204683 B1	2011.06.22		
		IL 148113 A	2010.05.31		
		IL 148113 D0	2002.09.12		
		JP 2003-508355 A	2003.03.04		
		US 2002-0037287 A1	2002.03.28		
		US 2006-0165678 A1	2006.07.27		
		US 2007-0269372 A1	2007.11.22		
		US 6376654 B1	2002.04.23		
		US 6986891 B2	2006.01.17		
		US 7226750 B1	2007.06.05		
		US 7498129 B2	2009.03.03		
		WO 01-12674 A1	2001.02.22		
		WO 01-12674 A9	2002.09.06		
		KR 10-2009-0078339 A	2009.07.17	AU 2007-307536 A1	2008.04.17
				CA 2639119 A1	2007.04.19
CA 2666249 A1	2008.04.17				
CN 101541834 A	2009.09.23				
EP 1932857 A1	2008.06.18				
EP 2067791 A1	2009.06.10				
TW 200823235 A	2008.06.01				
TW 200840825 A	2008.10.16				
US 2009-0142346 A1	2009.06.04				
US 2010-0008928 A1	2010.01.14				
WO 2007-043635 A1	2007.04.19				
WO 2008-044754 A1	2008.04.17				
JP 2007-515165 A	2007.06.14			AT 526037 T	2011.10.15
		AU 2004-296184 A1	2005.06.23		
		AU 2004-296184 B2	2010.12.16		
		CA 2548180 A1	2005.06.23		
		CN 1913921 A	2007.02.14		
		CN 1913921 B	2012.02.22		
		EP 1708751 A2	2006.10.11		
		EP 1708751 A4	2007.11.07		
		EP 1708751 B1	2011.09.28		
		IL 176007 D0	2006.10.05		
		NZ 547591 A	2009.11.27		
		US 2005-158323 A1	2005.07.21		
		US 2009-081210 A1	2009.03.26		
		WO 2005-055936 A2	2005.06.23		
		WO 2005-055936 A3	2005.11.03		