

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

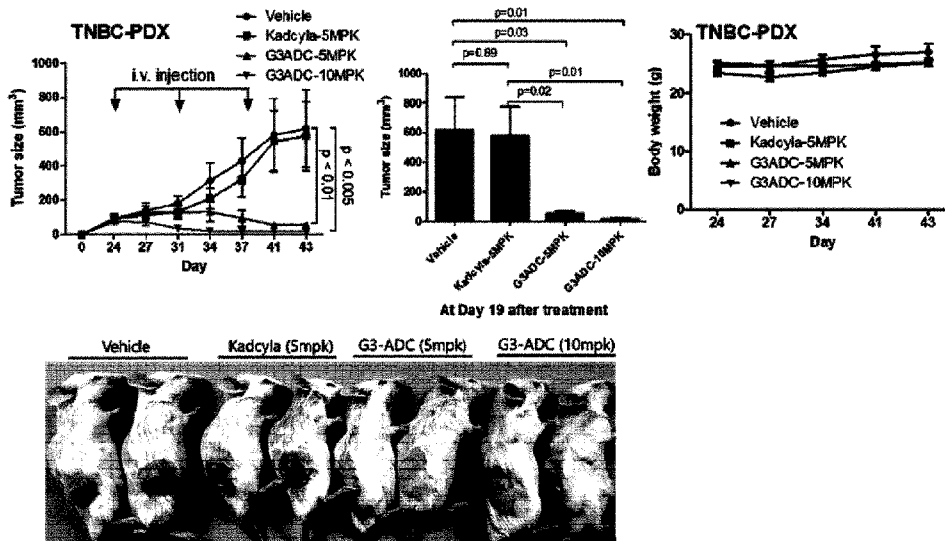
(43) 국제공개일
2018년 9월 27일 (27.09.2018) WIPO | PCT

WO 2018/174544 A2

- (51) 국제특허분류: *C07K 16/18* (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/003267
- (22) 국제출원일: 2018년 3월 21일 (21.03.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0035622 2017년 3월 21일 (21.03.2017) KR
10-2018-0032592 2018년 3월 21일 (21.03.2018) KR
- (71) 출원인: 주식회사 펩트론 (PEPTRON, INC.) [KR/KR];
34054 대전시 유성구 유성대로1628번길 37-24, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 문경덕 (MOON, Kyung Duk); 34054 대전시 유성구 유성대로1628번길 37-24, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이치영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, 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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: ANTIBODY BINDING SPECIFICALLY TO MUC1 AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: MUC1에 특이적으로 결합하는 항체 및 그의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to an anti-MUC1 antibody binding specifically to Mucin 1 (MUC1) and a use thereof and, more particularly, to an anti-MUC1 antibody or an antigen-binding fragment thereof, an antibody-drug conjugate or bispecific antibody comprising the antibody or an antigen-binding fragment thereof, a pharmaceutical composition for prevention or treatment of cancer, comprising the same conjugate or bispecific antibody, and a nucleic acid encoding the same antibody or an antigen-binding fragment thereof, a vector and a host cell, both carrying the same nucleic acid, and a method for preparing an anti-MUC1 antibody or an antigen-binding fragment thereof, using the same vector and host cell. According to the present invention, an antibody binding specifically to MUC1 or an antigen-binding fragment thereof shows outstanding affinity and binding force to MUC1 and an antibody-drug conjugate in which the antibody or an antigen-binding fragment thereof is conjugated with a drug can bind specifically to a MUC1-expressing cell to specifically or selectively transfer the drug with efficacy. Therefore, the anti-MUC1 antibody and the antibody-drug conjugate according to the present invention can be usefully applied to the treatment of a MUC1-related disease, for example, cancer.

[다음 쪽 계속]

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:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 MUC1(Mucin 1)에 특이적으로 결합하는 항-MUC1 항체 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체 또는 이중특이 항체, 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주세포, 이를 이용한 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, MUC1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MUC1에 대한 우수한 친화도 및 결합력을 나타내며, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 접합된 항체-약물 접합체는 MUC1 발현 세포에 특이적으로 결합함으로써 약물을 효과적이면서도 특이적 또는 선택적으로 전달할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 및 항체-약물 접합체는 MUC1 관련 질병, 예컨대, 암의 치료에 유용하게 적용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: MUC1에 특이적으로 결합하는 항체 및 그의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 MUC1(Mucin 1)에 특이적으로 결합하는 항-MUC1 항체 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체 또는 이중특이 항체, 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주세포, 이를 이용한 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 뮤신 1(MUC1, Mucin 1)은 다수의 당화된 세포외 도메인을 포함하는 막관통 당단백질이다. MUC1 길이는 세포 표면에서 200 내지 500 nm이고 MUC1은 정상 상피 세포의 정단막에 위치한다. MUC1은 유방, 위, 식도, 췌장, 요도, 폐, 신장 및 담낭과 같은 많은 장기의 선상 또는 내강 상피 세포에서 발현된다. 정상 조직에서 MUC1의 음전하 탄수화물은 탈수, pH 변화, 화분 및 미생물로부터 기저 상피를 보호하는 물리적 장벽을 형성한다.
- [4] MUC1 유전자는 단일 전사물을 암호화한다. 번역 후, MUC1는 성체 정자 단백질 엔테로키나아제 및 아그린(SEA) 도메인 내에 위치하는 GSVVV 모티프에서 오토클리브(autocleaved)된다. 이들은 N-말단 서브유닛 (MUC1-N) 및 C-말단 서브유닛(MUC1-C)의 2개의 펩티드 단편으로 구성된다.
- [5] MUC1-N 말단 서브유닛은 다양한 수의 반복서열(Tandem Repeats)을 가지며, 프롤린/트레오닌/세린이 풍부한(PTS: Proline/Threonine/Serine-rich) 도메인 및 SEA 도메인으로 구성된다. MUC1-C 말단 서브유닛은 58개의 아미노산 세포외 도메인(ECD: Extracellular Domain), 28개의 막관통 도메인(TMD: Transmembrane Domain) 및 72개의 아미노산 세포질 도메인(CD: Cytoplasmic Domain)으로 구성된다. MUC1은 세포외 도메인에 Extensively O-linked glycosylation이 일어난다. N-당화 패턴의 정도에 따라, MUC1-C 크기는 23 내지 25 kDa이 되며, N-당화가 결핍되는 경우에는 17 kDa이 된다. 처음 MUC1이 생성된 후, MUC1는 세포에 결합 되어 있는 부분과 세포밖에 release될 수 있는 부분이 noncovalent interaction을 통해 결합되며, 이때 cleavage는 Sheddase라는 효소에 의해 일어난다. MUC1 복합체는 IFN- γ 및 TNF- α 와 같은 사이토카인의 자극에 의해 분리된다. MUC1 방출은 TNF-알파 전환 효소(TACE: TNF- α Converting Enzyme) 및 매트릭스 기질금속단백질 분해효소(MMP: Matrix Metallo-protease)를 포함한 효소에 의해 일어난다. 이들 효소는 MUC1-C의 ECD를 절단하여 두 개의 절편으로 나누게 되며, 암이 진행됨에 따라, 이 세포외 절편은 암세포로부터

떠나 몸의 혈액내에 떠다니게 되면 세포와 결합되어져 있는 절편은 암세포와 함께 지속적으로 결합된 상태로 존재하게 된다. MUC1은 암세포의 성장에 중요한데, 그 이유는 다른 암세포에 존재하는 암세포 증식에 관련된 세포막 단백질과의 결합을 통해 지속적인 세포 증식 signal을 보내 암세포 증식에 결정적인 역할을 한다. 또한, 이 부분은 암세포 성장 및 소멸 때까지 항상 같이 그 운명을 같이 하여 암 검출의 좋은 타겟이 되며 또한 암을 제거할 수 있는 결정적인 Biomarker가 된다. 또한, MUC1의 다른 부분과는 다르게 이 부분은 유일하게 glycosylation이 되지 않는 부분으로 알려져 있으며 암과 정상적인 세포에서의 MUC1을 구별할 수 있는 뚜렷한 차이를 보이는 부분으로 생각되었다. 이에 본 발명자들은 MUC1의 세포에 결합하여 암과 운명을 같이 하며, 정상세포의 MUC1과 암세포의 MUC1을 구별할 수 있는 이 절편을 항체의 최적의 항원으로 보고 본 발명의 항체를 개발하였다.

[6]

[7] 한편, 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugate, ADC)는 링커를 통해 항체에 세포 독성 약물을 결합시킨 것이다. 단클론항체가 타겟 특이적 특성을 나타내므로, 항체-약물 접합체 중 약물은 선택적 표적능을 가지는 단클론항체에 의해 인지되는 항원/표적을 발현하는 종양에 전달될 수 있다. 이상적으로는 투여 후 혈액 중 프로드럭 상태의 항체-약물 접합체는 독성이 없어야 하고, 항체가 표적 종양 항원에 결합한 다음 암세포 내로 내재화되면, 약물이 활성 형태로 방출되어 종양 세포를 살해하게 된다.

[8] 이와 같이 항체가 결합하는 표적/항원을 결정하는 것이 항체-약물 접합체 제작에 가장 중요한 점이다. 특히, 항체가 결합하는 표적/항원은 종양 세포에서 우세하게, 이상적으로는 암세포 특이적 발현(과발현)하는 세포 표면 단백질이 되어 왔다.

[9]

[10] 이러한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 정상세포에서 발현되는 MUC1과는 차별이 되는 부분을 인식하는 암세포-MUC1에 특이적으로 결합하는 항체를 개발하고, ADC 특성상 암세포에 결합되어 ADC 효능을 극대화 할 수 있게 암세포와 운명을 같이 하는 “세포에 결합되어 있는 부분”과 결합하는 항-MUC1 항체 및 이를 포함하는 항체-약물 접합체가 MUC1 발현 세포에 특이적으로 결합하여 MUC1 발현에 의해 유발되는 질환을 치료할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[11]

[12] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[13]

[14] 발명의 요약

[15] 본 발명의 목적은 MUC1의 “세포에 결합되어 있는 부분”에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 접합된 항체-약물 접합체 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이 항체를 제공하는 데 있다.

[16] 본 발명의 다른 목적은 상기 항-MUC1 항체 생산을 위한 하이브리도마(KCLRFBP 00395)를 제공하는 데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체-약물 접합체 또는 이중특이 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물 및 치료 방법을 제공하는 데 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 진단용 조성물 및 진단 방법을 제공하는 데 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 리포솜 내에 MUC1-C 말단 부위, MUC1의 SEA 도메인 또는 MUC1의 C-말단 세포외 도메인 및 CpG-DNA를 캡슐화한 복합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공하는 데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 면역원성 조성물을 마우스에 접종하는 단계를 포함하는 항-MUC1 단일클론 항체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[21] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주세포, 이를 이용한 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[22]

[23] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 MUC1의 C-말단 세포외 도메인 내의 연속하는 5개 이상의 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드를 인식하는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[24] 바람직하게는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 6개의 상보성결정부위(CDR)를 포함하며, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1(GYTFTSYWMH)의 중쇄 CDR1; 서열번호 2(YINPGTGYIEYNQKFKD)의 중쇄 CDR2; 서열번호 3(STAPFDY)의 중쇄 CDR3; 서열번호 4(KASQDIKSYLS)의 경쇄 CDR1; 서열번호 5(YATRLAD)의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 6(LQYDESPYT)의 경쇄 CDR3로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[25] 본 발명은 또한, 상기 항-MUC1 항체 생산을 위한 하이브리도마(KCLRFBP 00395)를 제공한다.

[26] 본 발명은 또한, 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체 및 이중특이 항체를 제공한다.

[27] 본 발명은 또한, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체 또는 이중특이 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 치료 방법을 제공한다.

- [28] 본 발명은 또한, 암의 예방 또는 치료를 위한 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 제공한다.
- [29] 본 발명은 또한, 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 사용을 제공한다.
- [30] 본 발명은 또한, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 진단용 조성물 및 진단 방법을 제공한다.
- [31] 본 발명은 또한, 리포솜 내에 (1) MUC1의 C-말단 부위, MUC1의 SEA 도메인 또는 MUC1의 C-말단 세포외 도메인 및 (2) CpG-DNA를 캡슐화한 복합체를 포함하는 면역원성 조성물 및 상기 면역원성 조성물을 마우스에 접종하는 단계를 포함하는 항-MUC1 단일클론 항체 제조 방법을 제공한다.
- [32] 본 발명은 또한, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주세포, 이를 이용한 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

[33]

도면의 간단한 설명

- [34] 도 1a는 rhMUC1-C 단백질로 면역화된 마우스에서의 IgG 총량을 보여주는 그래프이다.
- [35] 도 1b 및 1c는 면역화된 마우스로부터 분리된 하이브리도마 세포를 스크리닝한 결과를 보여주는 것으로, 1b는 HAT 배지를 이용한 스크리닝 결과이고, 도 1c는 HT 배지를 이용한 스크리닝 결과이다.
- [36] 도 2a는 하이브리도마 세포로(hMUC1-1H7 클론) 면역화된 마우스의 복수에 대하여 ELISA를 수행한 결과를 보여주는 그래프로써, rhMUC1-C 특이적 항체의 존재를 보여준다.
- [37] 도 2b는 정제한 항-hMUC1 단일클론 항체를 SDS-PAGE 및 Commassie 염색에 의하여 분석한 결과를 보여준다.
- [38] 도 2c는 ELISA를 통하여 항-MUC1 항체의 이소 타입을 확인한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [39] 도 3a는 유방암 세포 용해물에 hMUC1-1H7클론에서 정제한 항-hMUC1 단일클론 항체 및 항-MUC1-CT 항체를 사용하여 웨스턴 블라팅을 수행한 결과를 보여준다.
- [40] 도 3b는 MCF-7, MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1 세포의 세포 용해물을 마우스 정상 IgG 또는 hMUC1-1H7클론에서 정제한 항-hMUC1 단일클론 항체로 면역 침전시키고, 항-MUC1-CT 항체를 사용하여 면역 블로팅한 결과를 보여준다.
- [41] 도 3c는 T47D 세포 용해물을 PNGase F로 처리하고, hMUC1-1H7클론에서 정제한 항-hMUC1 단일클론 항체를 사용하여 웨스턴 블라팅한 결과를 다른 항체를 사용한 경우와 비교하여 보여준다.
- [42] 도 3d는 PNGase F로 처리 한 T47D 세포 용해물을 hMUC1-1H7클론에서 정제한

항-hMUC1 단일클론 항체로 면역 침전시킨 다음, 항-MUC1-CT 또는 항-MUC1-CT2 항체로 면역 블로팅한 결과를 보여준다.

- [43] 도 4a는 췌장암 세포 용해물에 대하여 항-MUC1-CT 항체, hMUC1-1H7클론에서 정제한 항-hMUC1 항체, 또는 항-베타-액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블로팅한 결과를 보여준다.
- [44] 도 4b는 췌장암 세포 용해액에 대하여 마우스 정상 IgG 또는 hMUC1-1H7클론에서 정제한 항-hMUC1 단일클론 항체로 면역 침전시키고, 항-MUC1-CT 항체 및 항-hMUC1 단일클론 항체를 사용하여 면역 블로킹한 결과를 보여준다.
- [45] 도 5A는 유방암 세포에 hMUC1-1H7클론에서 정제한 항-hMUC1 항체를 4°C에서 처리하고(Surface) 또는 0.1% Triton X-100으로 세포를 용해시킨 후 항체를 처리하여 (intracellular) 얻어진 형광이미지를 보여준다.
- [46] 도 5B는 유방암 세포에 형광이 탐침된 hMUC1-1H7클론에서 정제한 항-hMUC1 항체를 처리하고 6시간 동안 37°C에서 배양한 후 얻어진 형광이미지를 보여준다.
- [47] 도 6은 췌장암 세포에 hMUC1-1H7클론에서 정제한 항-hMUC1 항체를 4°C에서 처리하고(Surface) 또는 0.1% Triton X-100으로 세포를 용해시킨 후 항체를 처리하여 (intracellular) 얻어진 형광이미지를 보여준다.
- [48] 도 7은 췌장암 세포에 형광이 탐침된 hMUC1-1H7클론에서 정제한 항-hMUC1 항체를 처리하고 24시간 동안 37°C에서 배양한 후 얻어진 형광이미지를 보여준다.
- [49] 도 8a는 재조합 발현 플라스미드 pFabE-hMUC1-1H7를 모식적으로 보여주는 개열지도이다.
- [50] 도 8b는 재조합 발현 플라스미드 pFabE-hMUC1-1H7에 의하여 발현되는 재조합 단백질을 모식적으로 보여준다.
- [51] 도 8c는 MCF-7, MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1 세포에 hMUC1-1H7클론에서 유래된 항 hMUC1 항체의 Fab 단편을 처리하여 얻어진 형광이미지이다.
- [52] 도 9는 MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1 세포를 hMUC1-1H7클론에서 유래된 항-hMUC1 항체를 처리한 경우의 세포 증식 변화를 보여주는 그래프이다.
- [53] 도 10a 내지 10h는 유방암을 갖는 마우스에 형광이 표지된 hMUC1-1H7클론에서 유래된 항-hMUC1 단일클론 항체를 정맥투여하여 얻어진 형광 이미지이다.
- [54] 도 11a 내지 11c는 췌장암을 갖는 마우스에 형광이 표지된 hMUC1-1H7클론에서 유래된 항-hMUC1 단일클론 항체를 정맥투여하여 얻어진 형광 이미지이다.
- [55] 도 12a는 이중이식 마우스 모델로부터 적출된 종양 조직의 모습이다.
- [56] 도 12b는 hMUC1-1H7클론에서 유래된 항-hMUC1 단일클론 항체가 투여된 이중이식 마우스 모델로부터 적출된 종양의 크기($(\text{넓이}^2 \times \text{길이})/2$)를 보여주는 그래프이다.

- [57] 도 12c는 항-hMUC1 단일클론 항체가 투여된 이종이식 마우스 모델로부터 적출된 종양 무게를 보여주는 그래프이다.
- [58] 도 12d는 항-hMUC1 단일클론 항체가 투여된 이종이식 마우스 모델의 체중을 나타낸 그래프이다.
- [59] 도 13은 유방암 조직에서의 MUC1 단백질 발현 여부를 보여주는 결과이다.
- [60] 도 14는 췌장암 조직에서의 MUC1 단백질 발현 여부를 보여주는 결과이다.
- [61] 도 15는 유방암 세포주에서의 hMUC1-1H7 항체-약물 접합체의 세포 독성을 보여주는 결과이다.
- [62] 도 16은 유방암 조직에서의 hMUC1-1H7 항체-약물 접합체의 암세포 증식억제 효과를 보여주는 결과이다.
- [63] 도 17은 ELISA를 통해 인간화 항체(hMUC1-G3)와 hMUC1-C의 결합 친화도를 확인한 결과이다.
- [64] 도 18은 hMUC1-G3 항체와 hMUC1-1H7 항체가 인식하는 hMUC1-C의 에피토프 동질성 여부를 ELISA로 확인한 결과이다.
- [65] 도 19는 유세포분석기를 통해 hMUC1-G3 항체가 세포에서 발현된 hMUC1을 특이적으로 인지함을 나타내는 결과이다.
- [66] 도 20은 유세포분석기를 통해 hMUC1-G3 항체와 hMUC1-1H7 항체가 ZR75-1 유방암 세포에서 발현된 hMUC1을 농도 의존적으로 인지함을 나타내는 결과이다.
- [67] 도 21은 유방암 세포주 중에서 MUC1이 발현되는 세포주(ZR75-1, T47D)와 MUC1이 발현되지 않는 세포주(MDA-MB-231)에서 hMUC1-G3 항체-약물 접합체가 MUC1 발현에 따라 선택적으로 유방암 세포를 죽이는 것을 보여주는 결과이다.
- [68] 도 22는 골수성 백혈병 세포주에서의 hMUC1-G3 항체-약물 접합체의 세포 독성을 보여주는 결과이다.
- [69] 도 23은 유방암 환자 유래 TNBC 조직이식을 통해 제작된 이종이식 마우스 모델에서의 hMUC1-G3 항체-약물 접합체의 암세포를 선택적으로 억제하는 효과를 나타내는 결과이다.
- [70]
- [71] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**
- [72] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [73]
- [74] MUC1(뮤신 1, Mucin 1)은 일반적으로 정상 상피 세포의 일면(정단막: apical membrane)에서 발현되며, 기저 상피를 건조, pH 변화, 오염, 및 미생물로부터 보호한다. 그러나, MUC1은 다양한 인간 암종에서 높은 레벨로 비정상적으로

발현되며, 당화 정도가 감소되고, 세포의 전체 표면에서 고르게 발현되며, 암세포의 증식, 침습, 전이 및 혈관형성을 촉진시키는데 관여한다. MUC1은 암 특이성 치료를 위한 타겟이 된다.

- [75] MUC1은 N-말단 서브유닛(MUC1-N) 및 C-말단 서브유닛(MUC1-C)을 포함하며, 상기 MUC1-N과 MUC1-C는 SEA 도메인(Sea urchin sperm protein enterokinase and agrin domain) 내의 절단부위에서 자가 절단되어 형성된다. SEA 도메인은 안정된 이형이량체 복합체를 형성하는데 기여한다. MUC1 절단이 일어나면 세포외 MUC1-N(MUC1의 N-말단 서브유닛)이 방출되어 많은 항-MUC1-SEA 항체들을 격리시킬 수 있다. 이제까지 알려진 대부분의 항-MUC1-SEA 항체들은 MUC1-N 반복서열 도메인을 타겟으로 하는 것으로 알려져 있다(Prinssen et al. 1998; Gillespie et al. 2000). MUC1-N은 세포 표면에서 직접적으로 발견되지 않고 말초 순환에서 관찰되므로, 제한된 순환 항-MUC1-N 항체만이 MUC1-양성 종양 세포에서 사용될 수 있다는 한계가 있다. 또한, MUC1-C(MUC1의 C-말단 서브유닛)의 에피토프를 선택하는 것 역시 어려운데, 대부분의 경우에서, MUC1-C 도메인이 막관통이거나 세포질에 위치하기 때문이다. 이와 같은 문제를 극복하기 위하여, 본 발명은 MUC1 절단 후 세포 표면에 남는 MUC1-C 말단 부위(세포외 도메인)를 타겟으로 하는 신규한 MUC1에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다.

[76]

- [77] 본 발명은 일 관점에서, MUC1에 특이적으로 결합하는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 MUC1의 C-말단 세포외 도메인 내의 연속하는 5개 이상의 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드를 인식하는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[78]

- [79] 특히, 본 발명에서는 PCT/KR2010/003879 특허 “리포좀에 포집된 올리고 뉴클레오타이드 및 에피토프를 포함하는 면역증강용 조성물”의 기술을 이용하여 인간 Mucin1(CD227) 전체 단백질 1134 아미노산 중 SEA 도메인을 포함하는 961 아미노산에서부터 1152 아미노산까지 192개의 아미노산이 발현된 항원을 이용하였다. Mucin1은 다양한 인간 아데노칼스노마 여러 암 종에서 약 100배 정도 높은 발현(Immunology, 2018, 225-240)을 하고 있으며 특이하게도 세포에서 합성된 후 SEA domain내에서 절단이 일어나 SEA domain을 포함한 세포에 결합되어 있는 부분과 그 나머지 부분으로 나누어 지게 되며 두 subunit는 noncovalent하게 결합되어 있다. 정상세포의 경우에 MUC1은 heavily glycosylated 되어 있으나 이 부분은 잘려져 나간 부분에서 주로 일어나며 세포와 결합되어 있는 부분에서는 상대적으로 glycosylation이 되어 있지 않다. 본 발명에서는 이 사실을 인지하여 cleavage가 되고 나서 세포와 결합하고 있는 190 아미노산을 항원으로 사용하여 glycosylation이 일어나지 않은 대장균에서 발현을 하였다.

- [80] 본 발명에 따른 항체는 대장균에서 발현된 항원으로 만들어졌으므로 glycosylation 되지 않는 항원을 인지한다. 본 발명에서는 마우스 하이브리도마 기술을 이용하여 항체를 개발하였으며, 개발된 항체는 특이하게도 아미노산 서열의 일차적 구조를 인식하지 않고 3차 구조를 인식하는 것을 확인하였다.
- [81] 본 발명의 일 실시예에서, 유방암 세포주인 T47D와 ZR75-1을 이용하여 FACS를 하였을 때 MUC-1 specific하게 인지하는 것을 확인하였으나, 세포를 파쇄하여 얻은 파쇄액에서는 일차구조를 인식하는 Western에서는 인지되지 않았다. 3차 구조를 인식하는 것을 검증하기 위해 세포 파쇄액과 본 발명에 따른 항체를 이용하여 Immunoprecipitation 방법으로 침전 후 Western을 하였을 경우 항원을 detection 하였으므로, 본 발명에 따른 항체는 특이적으로 3차 구조를 인식하는 항체임을 입증하였다.
- [82]
- [83] 본 발명에 있어서, 상기 MUC1의 C-말단 세포외 도메인은 서열번호 10(SVV VQLTLAFREG TINVHDVETQ FNQYKTEAAS RYNLTISDVS VSDVPFPFSA QS)의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있다.
- [84] 본 명세서에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 총칭하는 것으로서 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 상기 항체는 특정 항원과 면역학적으로 반응성인 면역글로블린 분자로, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론 항체(polyclonal antibody) 및 단클론 항체(단일클론 항체, monoclonal antibody) 항체와 전체 항체 및 항체 단편을 모두 포함할 수 있다. 상기 항체는 비자연적으로 생성된 것, 예컨대, 재조합적 또는 합성적으로 생성된 것일 수 있다. 상기 항체는 동물 항체(예컨대, 마우스 항체 등), 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 상기 항체는 단일클론 항체일 수 있다. 또한 항체는 특별한 언급이 없는 한, 항원 결합능을 보유한 항체의 항원 결합 단편도 포함하는 것으로 이해될 수 있다.
- [85] 본 명세서에서 "상보성결정부위(Complementarity-determining regions, CDR)"라 함은, 항체의 가변 부위 중에서 항원과의 결합 특이성을 부여하는 부위를 의미한다. 앞서 설명한 항체의 항원 결합 단편은 상기 상보성결정부위를 하나 이상 포함하는 항체 단편일 수 있다.
- [86] 본 발명에 있어서, 상기 항-MUC1 항체는 하이브리도마 hMUC1-1H7(KCLRF-BP-00395)로부터 생산된 것일 수 있다. 또한, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 하이브리도마 hMUC1-1H7(KCLRF-BP-00395)로부터 생산된 항체의 상보성결정부위(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3) 또는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [87] 한 측면에서, 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 6개의 상보성결정부위(CDR)를 포함한다. 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

서열번호 1(GYTFTSYWMH)의 중쇄 CDR1; 서열번호 2(YINPGTGYIEYNQKFKD)의 중쇄 CDR2; 서열번호 3(STAPFDY)의 중쇄 CDR3; 서열번호 4(KASQDIKSYLS)의 경쇄 CDR1; 서열번호 5(YATRLAD)의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 6(LQYDESPYT)의 경쇄 CDR3로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[88] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1의 중쇄 CDR1; 서열번호 2의 중쇄 CDR2; 서열번호 3의 중쇄 CDR3; 서열번호 4의 경쇄 CDR1; 서열번호 5의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 6의 경쇄 CDR3를 모두 포함하는 것일 수 있다.

[89]

[90] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 22 또는 24의 중쇄 가변영역 및 서열번호 23 또는 25의 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 22의 중쇄 가변영역 및 서열번호 23의 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 24의 중쇄 가변영역 및 서열번호 25의 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[91]

[92] 본 발명에 있어서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MUC1에 대한 저해 효과를 갖는다.

[93] MUC1 유전자는 하나의 전사체를 암호화하고, 번역 후에 MUC1 단백질은 SEA 도메인 내에 위치하는 GSVVV 모티프 중 "G"에서 자가절단(autocleaved)된다. 본 발명에 있어서, MUC1 단백질은 인간 MUC1 단백질일 수 있으며, 예컨대, GenBank Accession No. P15941의 아미노산 서열(서열번호 7)을 포함하거나, 또는 이와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 것일 수 있다. 상기 MUC1 단백질의 세포외 도메인은 인간 MUC1 단백질의 세포외 도메인일 수 있으며, 예컨대, GenBank Accession No. P15941의 아미노산 서열(서열번호 7) 중 961번째부터 1152번째까지의 192개 아미노산을 포함하는 단백질 단편(서열번호 8)일 수 있다. 상기 MUC1 단백질의 세포외 도메인은 SEA 도메인을 포함하며, 일 예에서, 상기 SEA 도메인은 GenBank Accession No. P15941의 아미노산 서열(서열번호 7) 중 1034번째부터 1152번째까지의 119개 아미노산을 포함하는 단백질 단편(서열번호 9)일 수 있다. 상기 SEA 도메인에 존재하는 GSVVV 모티프 중 "G"이 절단부위이며, 여기서 절단이 발생한 경우, 상기 "G" 이후(C-말단 방향으로)의 부위는 MUC1 단백질의 C-말단 세포외 도메인(또는 'MUC1-C 말단(부위) 세포외 도메인' 또는 'MUC1-C 서브유닛'이라고도 칭함)(서열번호 10)이 된다(표 1).

[94]

[51][illegible]

[illegible]

	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDTRPAPGS
	TAPPAHGVTST
	APDNRPALGST
	TAPPVHNVTST
	ASGSASGSAST
	TLVHNGTSAR
	ATTTTASKSTT
	PFSIPSHHSD
	TPTTLASHSTT
	KTDASSTHHST
	SVPPLTSSNH
	STSPQLSTGV
	SFFFLSFHIST
	NLQFNSSLLED
	PSTDYYQELQT
	RDISEMFLQIT
	YKQGGLGLS
	NIKFRPGSVV
	VQLTLAFREG
	TINVHDVETQ

		FNQYKTEAAS RYNLTISDVS VSDVPFPFSA QSGAGVPGWG IALLVLVCVL VALAIVYLIA LAVCQCRRKN YGQLDIFPAR DTYHPMSEYP TYHTHGRYVP PSSTRSPYE KVSAGNGGSS LSYTNPAVAA TSANL(서열번호 7)
MUC1 단백질의 세포외 도메인(C 말단 방향)	P15941 중 961-1152의 192개 아미노산 포함	ASGSASGSAS TLVHNGTSAR ATTPASKST PFSIPSHSD TPTTLASHST KTDASSTHHS SVPPLTSSNH STS <u>PQLSTGV SFFFLSFHIS</u> <u>NLQFNSSLED</u> <u>PSTDYYQELQ</u> <u>RDISEMFLOI</u> <u>YKQGGFLGLS</u> <u>NIKFRPGSVV</u> <u>VQLTLAFREG</u> <u>TINVHDTVETQ</u> <u>FNQYKTEAAS</u> <u>RYNLTISDVS</u> <u>VSDVPFPFSA QS</u> (서열번호 8; 밑줄: SEA 도메인; "G": 절단부위)
MUC1 단백질의 SEA 도메인	P15941 중 1034-1152의 119개 아미노산 포함	PQLSTGV SFFFLSFHIS NLQFNSSLED PSTDYYQELQ

		RDISEMFLQI YKQGGFLGLS NIKFRPG <u>SVV VQLTLAFREG</u> <u>TINVHDTVETQ</u> <u>FNQYKTEAAS</u> <u>RYNLTISDVS</u> <u>VSDVPFPFSA QS</u> (서열번호 9; 밑줄: C-말단 세포외 도메인)
MUC1-C 말단부위 세포외 도메인	MUC1 단백질의 SEA 도메인에서 절단되어 생성된 C-말단 서브유닛	SVV VQLTLAFREG TINVHDTVETQ FNQYKTEAAS RYNLTISDVS VSDVPFPFSA QS(서열번호 10)

[96]

[97] 본 발명에 있어서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MUC1 단백질(예컨대, 서열번호 7), 구체적으로, MUC1 단백질의 C-말단 세포외 도메인(예컨대, 서열번호 10) 내의 5개, 7개, 10개, 12개 이상 또는 바람직하게는 15개 이상의 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드(에피토프)를 인식하거나 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MUC1 단백질의 세포외 도메인(예컨대, 서열번호 8), MUC1 단백질의 SEA 도메인(예컨대, 서열번호 9) 또는 MUC1 단백질의 C-말단 세포외 도메인(예컨대, 서열번호 10)을 인식하거나, 및/또는 여기에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[98]

[99] 본 명세서에서의 용어 “MUC1 특이적 항체” 또는 “MUC1에 특이적으로 결합하는 항체”는 MUC1에 결합하여 MUC1의 생물학적 활성의 억제를 초래하는 항체를 의미하며, “항-MUC1 항체”와 혼용되어 사용된다.

[100]

본 발명에서의 “항-MUC1 항체”는 동물 항체(예컨대, 마우스 항체), 키메라 항체(예컨대, 마우스-인간 키메라 항체) 또는 인간화 항체일 수 있고, 단일클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있으며, 예컨대, 단일클론 항체일 수 있다. 다클론 항체(polyclonal antibody) 및 단일클론 항체(단클론 항체, monoclonal antibody)를 모두 포함하는 개념으로, 바람직하게는 단일클론 항체이며, 온전한 전체 항체(whole antibody) 형태를 가질 수 있다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조로서, 불변영역을 포함하는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다.

[101]

[102] 본 발명에 따른 항-MUC1 항체의 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG 형태를 포함하는 개념으로, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[103] 완전한 IgG 형태의 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[104]

[105] 본 발명에 있어서, 용어 "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.

[106] 본 발명에 있어서, "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다(CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다.

[107] 한편, 용어 "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.

[108]

[109] 본 발명에 따른 항-MUC1 항체의 "항원 결합 단편"은 항-MUC1 항체의 항원, 즉 MUC1와 결합할 수 있는 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv (scFv)₂, scFv-Fc, 및 Fv 등을 포함하는 개념으로, 본 명세서에서는 "항체 단편"과 동일한 의미로 혼용되어 사용된다. 항원 결합 단편은 예를 들어, scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을

생성하는 제조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 항원 결합 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 있다), 유전자 제조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

- [110] 본 발명에 있어서, 용어 "힌지 영역(hinge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, C_{H1} 및 C_{H2} 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)을 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다.
- [111] 상기 항-MUC1 항체는 단일클론 항체일 수 있다. 단일클론 항체는 당업계에 널리 알려진 방법대로 제조될 수 있다. 예컨대, phage display 기법을 이용해서 제조될 수 있다. 또는 항-MUC1 항체를 이용해서 통상의 방법에 의하여 마우스 유래의 단일클론 항체로 제조될 수 있다.
- [112] 한편, 전형적인 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 포맷을 이용하여 MUC1와의 결합능에 기초하여 개별 단클론 항체들을 스크리닝할 수 있다. 결합체들에 대해 분자적 상호작용을 검정하기 위한 경쟁적 ELISA(Competitive ELISA)와 같은 기능성 분석 또는 세포-기반 분석(cell-based assay)과 같은 기능성 분석을 통해 저해 활성에 대해 검정할 수 있다. 그런 다음 강한 저해 활성에 기초하여 선택된 단클론항체 멤버들에 대해 MUC1에 대한 각각의 친화도(K_d values)를 검정한다.
- [113]
- [114] 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 권리범위에는, 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 포함된 경쇄 및 중쇄의 CDR1 내지 CDR3 중 어느 하나 이상을 가지면서, 실질적으로 동일한 MUC1 항원에 대한 결합능 및 특이성을 가지는 펩타이드(peptide) 및 압타머(aptamer)도 포함된다.
- [115]
- [116] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항-MUC1 항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다. 본 발명에 있어서, 상기 하이브리도마는 기탁번호 KCLRF-BP-00395이다.
- [117] 본 발명은, 상기 하이브리도마가 생산하는 항-MUC1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 다른 예는 상기 하이브리도마가 생산하는 항-MUC1 항체의 중쇄 상보성결정부위(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, 또는 이들의 조합), 경쇄 상보성결정부위(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, 또는 이들의 조합), 또는 이들의 조합; 또는 상기 하이브리도마가 생산하는 항-MUC1 항체의 중쇄 가변영역, 경쇄 가변영역, 또는 이들의 조합을 포함하는 항-MUC1 항체 또는 그의 항원 결합

단편을 제공한다. 이 때, 상기 상보성결정부위는 통상적인 모든 방법에 의하여 결정될 수 있으며, 예컨대, IMGT definition(http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/) 또는 Kabat definition(<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)에 의하여 결정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [118] 본 발명에 있어서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MUC1-C 말단 세포외 도메인을 특이적으로 인식함으로써, MUC1-C 말단 세포외 도메인이 정상세포 대비 높은 수준으로 발현되고 당화가 적게 된 암 또는 종양 세포에서 특이적으로 작용할 수 있으며, 또한 세포의 일면뿐 아니라 전체 표면에 발현된 MUC1 단백질을 인식/결합할 수 있다. 또한, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MUC1 단백질, 특히 MUC1-C 말단 세포외 도메인과 결합할 뿐 아니라, 세포 내로 internalization시킴으로써(실시예 9-8, 실시예 18 참조) MUC1 매개 pathway를 효과적으로 저해하여 약리적 효과를 극대화시킬 수 있다. 또한, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 internalization 특성은 항체-약물 접합체(ADC)로 적용되는 경우에 접합된 약물을 효과적으로 세포 내로 전달시킬 수 있는 이점을 갖게 된다.

[119]

- [120] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 CAR(Chimeric antigen receptor)-T 세포 치료제 및/또는 CAR(Chimeric antigen receptor)-NK(natural killer cell)에 관한 것이다. 상기 CAR-T 또는 CAR-NK에 포함되는 항-MUC1 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 형태는 scFv가 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[121]

- [122] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 접합된 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugate, ADC)에 관한 것이다.

- [123] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 항체-약물 접합체의 약물은 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE)이다. 상기 항체-약물 접합체는 MUC1 발현 세포에 결합된 후, MUC1 발현 종양 세포로 내제화되고, 단백질 분해성 절단(proteolytic cleavage)에 의해 MMAE가 표적 MUC1 세포로 선택적으로 방출된다. 방출된 MMAE가 튜불린(Tubulin)에 결합하게 되면, 세포내 미세관 망을 분열시키고 세포주기정지를 유도하며, 미세관 분열이 발생하면서 세포사멸이 진행된다.

- [124] 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugate, ADC)는 타겟 암세포로 항암 약물을 전달하기 전까지 항암 약물이 항체에 안정적으로 결합되어 있어야 한다. 타겟으로 전달된 약물은 항체로부터 유리되어 타겟 세포의 사멸을 유도해야 한다. 이를 위해서는 약물이 항체에 안정적으로 결합함과 동시에 타겟 세포에서 유리될 때는 타겟 세포의 사멸을 유도할 충분한 세포독성을 가져야 한다.

- [125] 본 발명에 있어서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 항암제 등

약물을 포함하는 세포독성물질은 서로 결합(예컨대, 공유결합, 펩타이드 결합 등에 의함)되어 접합체(conjugate) 또는 융합 단백질(세포독성물질 및/또는 표지물질이 단백질인 경우)의 형태로 사용될 수 있다. 상기 세포독성물질은 암세포, 특히 고형암세포에 대하여 독성을 갖는 모든 물질일 수 있으며, 방사선동위원소, 세포 독소 화합물(small molecule), 세포 독성 단백질, 항암제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 세포 독소 단백질은 리신(ricin), 사포린(saporin), 젤로닌(gelonin), 모로딘(momordin), 데보가닌 (debouganin), 디프테리아독소, 녹농균독소(pseudomonas toxin) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 방사선동위원소로는 ¹³¹I, ¹⁸⁸Rh, ⁹⁰Y 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 세포 독소 화합물은 듀오카마이신(duocarmycin), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F; MMAF), N2'-디아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)메이탄신(N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)maytansine; DM1), PBD (Pyrrolobenzodiazepine) dimer 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [126] 본 발명에 있어서, 상기 항체-약물 접합체는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 기술에 따른 것일 수 있다.
- [127] 본 발명에 있어서, 상기 항체-약물 접합체는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 링커를 통하여 약물과 결합되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [128] 본 발명에 있어서, 상기 링커는 절단성 링커 또는 비절단성 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [129] 상기 링커는 항-MUC1 항체와 약물 사이를 연결하는 부위로, 예를 들어 상기 링커는 세포내 조건에서 절단 가능한 형태 즉, 세포 내 환경에서 항체에서 약물이 링커의 절단을 통해 방출될 수 있도록 한다.
- [130] 상기 링커는 세포 내 환경 예를 들어 리소좀 또는 엔도솜에 존재하는 절단제에 의해 절단될 수 있으며, 세포 내 펩티다아제 또는 프로테아제 효소 예를 들어 리소좀 또는 엔도솜 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 펩타이드 링커일 수 있다. 일반적으로 펩타이드 링커는 적어도 2개 이상의 아미노산 길이를 가진다. 상기 절단제는 카텝신 B 및 카텝신 D, 플라스민을 포함할 수 있으며, 펩타이드를 가수분해 하여 약물을 표적 세포 내로 방출할 수 있도록 한다. 상기 펩타이드 링커는 티올 의존성 프로테아제 카텝신-B에 의해 절단될 수 있고, 이는 암 조직에서 고발현되며, 예를 들어 Phe-Leu 또는 Gly-Phe-Leu-Gly 링커가 사용될 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 링커는 예를 들어 세포 내 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 것으로, Val-Cit 링커이거나 Phe-Lys 링커일 수 있다.
- [131] 본 발명에 있어서, 상기 절단성 링커는 pH 민감성으로, 특정 pH 값에서 가수분해에 민감할 수 있다. 일반적으로, pH 민감성 링커는 산성 조건에서

가수분해될 수 있음을 나타낸다. 예를 들어, 리소좀에서 가수분해될 수 있는 산성 불안정 링커 예를 들어, 하이드라존, 세미카바존, 티오세미카바존, 시스-아코니틱 아마이드 (cis-aconitic amide), 오르쏘에스테르, 아세탈, 케탈 등일 수 있다.

- [132] 상기 링커는 환원 조건에서 절단될 수도 있으며, 예를 들어 이황화 링커가 이에 해당할 수 있다. SATA(N-succinimidyl-S-acetylthioacetate), SPDP(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate), SPDB(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)butyrate) 및 SMPT(N-succinimidyl-oxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)toluene)를 사용하여 다양한 이황화 결합이 형성될 수 있다.
- [133] 본 발명에 있어서, 상기 약물 및/또는 약물-링커는 항체의 라이신을 통해 무작위로 접합되거나, 이황화 결합 사슬을 환원하였을 때 노출되는 시스테인을 통해 접합될 수 있다. 경우에 따라서, 유전공학적으로 제작된 태그 예를 들어, 펩타이드 또는 단백질에 존재하는 시스테인을 통해 링커-약물이 결합될 수 있다. 상기 유전공학적으로 제작된 태그 예를 들어, 펩타이드 또는 단백질은 예를 들어, 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 포함할 수 있다. 상기 펩타이드 또는 단백질은 펩타이드 또는 단백질의 카복시 말단에서 결실(deletion)을 가지거나, 펩타이드 또는 단백질의 카복시(C) 말단에 스페이서 유닛의 공유결합을 통한 부가를 갖는다. 상기 펩타이드 또는 단백질은 아미노산 모티프와 바로 공유결합되거나, 스페이서 유닛과 공유결합되어 아미노산 모티프와 연결될 수 있다. 상기 아미노산 스페이서 유닛은 1 내지 20개의 아미노산으로 구성되며, 그 중에서 글리신(glycine) 유닛이 바람직하다.
- [134] 상기 링커는 리소좀에서 다수 존재하거나, 또는 몇몇 종양세포에서 과발현되는 베타-글루쿠로니데이즈(β -glucuronidase)에 의해 인식되어 가수분해 되는 베타-글루쿠로나이드 링커를 포함할 수 있다. 펩타이드 링커와는 달리 친수성(hydrophilicity)이 커서 소수성의 성질이 높은 약물과 결합시 항체-약물 복합체의 용해도를 증가시킬 수 있는 장점을 지닌다.
- [135] 이와 관련하여, 본 발명에서는 대한민국 특허공개공보 제2015-0137015호에 개시된 베타-글루쿠로나이드 링커, 예를 들어 자가-희생기(self-immolative group)를 포함하는 베타-글루쿠로나이드 링커를 사용할 수 있다.
- [136] 또한, 상기 링커는 예를 들어 비절단성 링커일 수 있으며, 항체 가수분해 한 단계만을 통해 약물이 방출되어, 예를 들어 아미노산-링커-약물 복합체를 생산한다. 이러한 유형의 링커는 티오에테르기 또는 말레이미도카프로일기(maleimidocaproyl)일 수 있고, 혈액 내 안정성을 유지할 수 있다.
- [137] 본 발명에 있어서, 상기 약물은 화학요법제, 독소, 마이크로 RNA(miRNA), siRNA, shRNA 또는 방사성 동위원소인 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약물은 약리학적 효과를 나타내는 제제로 항체에 결합될 수 있다.

- [138] 상기 화학요법제는 세포독성 제제 또는 면역억제제일 수 있다. 구체적으로 마이크로투블린 억제제, 유사분열 억제제, 토포이소머라아제 억제제, 또는 DNA 인터칼레이터로서 기능할 수 있는 화학요법제를 포함할 수 있다. 또한, 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제, 구충제 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [139] 상기 약물에는 예를 들어, 마이탄시노이드, 오리스타틴, 아미노프테린, 악티노마이신, 블레오마이신, 탈리소마이신, 캄프토세신, N8-아세틸 스퍼미딘, 1-(2 클로로에틸)-1,2-다이메틸 술폰일 하이드라자이드, 에스페라마이신, 에토포사이드, 6-머캅토피린, 돌라스타틴, 트리코테센, 칼리케아미신, 탁솔(taxol), 탁산, 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 메토티렉세이트, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 A, 미토마이신 C, 클로람부실, 듀오카마이신, L-아스파라기나제(L-asparaginase), 머캅토피린(mercaptopurine), 티오구아닌(thioguanine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 시타라빈(cytarabine), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 니트로소우레아(nitrosourea), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 미토마이신(mitomycin), 다카바진(dacarbazine), 프로카바진(procarbazine), 토포테칸(topotecan), 질소 머스터드(nitrogen mustard), 사이톡산(cytosan), 에토포시드(etoposide), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), CNU(bischloroethylnitrosourea), 이리노테칸(irinotecan), 캄포토테신(camptothecin), 블레오마이신(bleomycin), 이다루비신(idarubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 닥티노마이신(dactinomycin), 플리카마이신(plicamycin), 미톡산트론(mitoxantrone), 아스파라기나제(asparaginase), 비노렐빈(vinorelbine), 클로로람부실(chlorambucil), 멜팔란(melphalan), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 부설판(busulfan), 트레오설판(treosulfan), 데카바진(decarbazine), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 9-아미노캄프토테신(9-aminocamptothecin), 크리스나톨(crisnatol), 미토마이신 C(mitomycin C), 트리메트렉세이트(trimetrexate), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 티아조푸린(tiazofurin), 리바비린(ribavirin), EICAR(5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 데프록사민(deferoxamine), 플록수리딘(floxuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 랄티트렉세드(raltitrexed), 시타라빈(cytarabine(ara C)), 시토신 아라비노시드(cytosine arabinoside), 플루다라빈(fludarabine), 타목시펜(tamoxifen), 라록시펜(raloxifene), 메게스트롤(megestrol), 고세렐린(goserelin), 류프롤리드 아세테이트(leuprolide acetate), 플루타미드(flutamide), 바이칼루타마이드(bicalutamide), EB1089, CB1093, KH1060, 베르테포르핀(verteporfin), 프탈로시아닌(phthalocyanine),

광감작제 Pe4(photosensitizer Pe4), 데메톡시-하이포크레린 A(demethoxy-hypocrellin A), 인터페론- α (Interferon- α), 인터페론- γ (Interferon- γ), 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor), 겐사이타빈(Gemcitabine), 벨케이드(velcade), 레발미드(revamid), 탈라미드(thalamid), 로바스타틴(lovastatin), 1-메틸-4-페닐피리디늄 이온(1-methyl-4-phenylpyridinium), 스타우로스포르린(staurosporine), 악티노마이신 D(actinomycin D), 닥티노마이신(dactinomycin), 블레오마이신 A2(bleomycin A2), 블레오마이신 B2(bleomycinB2), 페플로마이신(peplomycin), 에피루비신(epirubicin), 피라루비신(pirarubicin), 조루비신(zorubicin), 마이토산트론(mitoxantrone), 베라파밀(verapamil) 및 탐시가르긴(thapsigargin), 핵산 분해 효소 및 세균이나 동식물 유래의 독소로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[140] 본 발명에 있어서, 상기 약물은 링커 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 공유결합을 형성하기 위해 반응할 수 있는 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드기로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 친핵기를 포함할 수 있다.

[141]

[142] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이 항체(Bispecific antibody)에 관한 것이다.

[143] 상기 이중특이 항체는 항체의 2개의 암(arm) 중에서, 하나의 암(arm)은 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 나머지 다른 암(arm)은 MUC1 이외의 다른 항원, 바람직하게는 암 관련 항원 또는 면역관문 단백질 항원에 특이적인 항체 또는 면역효능세포 관련 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 형태를 의미한다.

[144] 본 발명에 따른 이중 항체에 포함되는 항-MUC1 항체 이외의 항체가 결합하는 항원은 바람직하게는 암 관련 항원 또는 면역관문 단백질 항원으로 Her2, EGFR, VEGF, VEGF-R, CD-20, MUC16, CD30, CD33, CD52, PD-1, PD-L1, CTLA4, BTLA4, EphB2, E-셀렉틴(selectin), EpCam, CEA, PSMA, PSA, ERB3, c-MET 등에서 선택될 수 있고, 면역효능세포 관련 항원으로는 TCR/CD3, CD16(Fc γ RIIIa) CD44, CD56, CD69, CD64(Fc γ RI), CD89 및 CD11b/CD18(CR3) 등이 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[145]

[146] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체-약물 접합체 또는 상기 이중특이 항체를 포함하는 MUC1 관련 질병의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[147] 상기 MUC1 관련 질병은 MUC1의 발현 또는 과발현, MUC1의 세포의 모든 표면에서 발현, 및/또는 정상 세포 대비 MUC1 단백질의 당화 감소와 관련된

질병일 수 있으며, 예컨대, 암일 수 있다. 상기 정상세포는 비-종양 세포일 수 있다. 이에 따라 상기 MUC1 관련 질병은 바람직하게는 암 또는 종양이지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [148] 용어 "암" 또는 "종양"은 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 의미한다.
- [149] 본 발명의 조성물로 치료할 수 있는 암 또는 암종은 특별히 제한되지 않으며, 고형암 및 혈액암을 모두 포함한다. 이러한 암의 예로는 흑색종 등의 피부암, 간암, 간세포암(hepatocellular carcinoma), 간세포성암, 위암, 유방암, 폐암, 난소암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 이자암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 식도암, 담도암, 고환암, 직장암, 두경부암, 경추암, 요관암, 골육종, 신경아세포종, 섬유육종, 횡문근육종, 성상세포종, 신경모세포종 및 신경교종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [150] 보다 바람직하게, 상기 암은 MUC1 단백질이 발현된 것을 특징으로 하며, 유방암, 췌장암, 전립선암, 폐암, 갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 간암, 담낭암, 신장암, 자궁경부암, 또는 방광암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다.
- [151] 상기 MUC1 관련 질병은 NASH(Non-Alcoholic SteatoHepatitis) 또는 TGF- β -mediated immune disease일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [152]
- [153] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물, 방법 및 용도에 있어서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단독 유효성분으로 제공되거나, 항암제 등의 세포독성 물질과 병용 투여되거나, 항암제 등의 세포독성물질과 접합된 접합체(antibody-drug conjugate; ADC) 형태로 제공될 수 있다.
- [154] 또한 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이를 포함하는 약학적 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 사용하는 용도로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이를 포함하는 약학적 조성물은 기존의 항암제 등의 치료제와 동시에 투여되거나, 순차적으로 투여되는 용도로 사용될 수 있다.
- [155]
- [156] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 항체-약물 접합체의 치료적 유효량을 MUC1 관련 질병의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, MUC1 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것이다. 상기 예방 및/또는 치료 방법은 상기 투여 단계 이전에 상기 질병의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [157]

- [158] 상기 조성물에서 약물의 국소적 전달을 위한 항체 접합체의 사용으로 약물이 항-MUC1 항체로 표적화된 항원을 나타내는 세포로 전달할 수 있도록 한다.
- [159] 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학 조성물은 또한 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [160] 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 또는 병변부위 국소 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [161]
- [162] 상기 약학 조성물 내의 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 함유량 또는 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 1일 투여량은 0.001 내지 1000mg/kg, 구체적으로 0.01 내지 100mg/kg, 보다 구체적으로 0.1 내지 50 mg/kg, 더욱 구체적으로 0.1 내지 20 mg/kg 범위일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 1일 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [163] 상기 약학 조성물은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 등의 형태로 제형화될 수 있으며, 제형화를 위하여 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [164] 상기 약학 조성물의 투여 대상 환자는 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 마우스, 래트 등을 포함하는 설치류 등을 포함하는 포유류일 수 있다.
- [165] 본 명세서에서 암의 치료는 암세포의 증식 저해, 암세포 사멸, 전이 억제 등과 같이 암의 증상의 악화를 방지하거나 완화 또는 호전시키거나, 암을 부분적 또는

전부 소멸시키는 모든 항암 작용을 의미하는 것일 수 있다.

[166]

[167] 본 발명은 또 다른 관점에서, 암의 예방 또는 치료를 위한 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도에 관한 것이다.

[168] 본 발명은 또 다른 관점에서, 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 사용에 관한 것이다.

[169]

[170] 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MUC1 단백질, 특히, MUC1-C-말단 세포외 도메인에 특이적으로 결합하므로, 이를 이용하여 MUC1 단백질 또는 MUC1-C-말단 세포외 도메인을 검출 또는 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 MUC1 단백질, 예컨대 MUC1-C-말단 세포외 도메인의 검출용 조성물 및 생물 시료에 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하는 단계를 포함하는 MUC1의 검출 방법에 관한 것이다.

[171] 상기 검출 방법은 상기 처리하는 단계 이후에, 항원-항체 반응 여부를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 검출 방법에서, 항원-항체 반응이 탐지되는 경우, 상기 생물 시료에 MUC1, 예컨대 MUC1-C-말단 세포외 도메인이 존재하는 것으로 결정(판단)할 수 있다. 따라서, 상기 검출 방법은 상기 확인하는 단계 이후에, 항원-항체 반응이 탐지되는 경우, 상기 생물 시료에 MUC1이 존재하는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 생물 시료는 포유류, 예컨대 인간(예컨대 암환자)으로부터 얻은 (분리된) 세포, 조직, 체액, 이들의 배양물 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[172] MUC1 단백질, 예컨대 MUC1 단백질의 C-말단 부위(또는 MUC1 단백질의 SEA 도메인 또는 MUC1-C-말단 세포외 도메인)의 발현은 여러 질병, 예컨대 암과 관련이 있으므로, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 MUC1 단백질 관련 질병, 예컨대, 암의 검출 또는 진단용 조성물 및 대상로부터 분리된 생물 시료에 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리(투여)하는 단계를 포함하는 암의 검출 또는 진단 방법 또는 검출 또는 진단에 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[173] 상기 검출 또는 진단 방법은, 상기 처리하는 단계 이후에, 항원-항체 반응 여부를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 방법에서, 항원-항체 반응이 탐지되는 경우, 상기 생물 시료 또는 상기 생물 시료가 유래된 환자에 MUC1 관련 질병, 예컨대 암이 존재하는 것으로 결정(판단)할 수 있다. 따라서, 상기 방법은 상기 확인하는 단계 이후에, 항원-항체 반응이 탐지되는 경우, 상기 생물 시료 또는 상기 환자를 MUC1 관련 질병 환자, 예컨대 암 환자로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 생물 시료는 포유류, 예컨대 인간(예컨대 암환자)으로부터 얻은 (분리된) 세포, 조직, 체액, 이들의 배양물 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

- [174] 상기 항원-항체 반응 여부를 확인하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 수행할 수 있다. 예컨대, 통상적인 효소 반응, 형광, 발광 및/또는 방사선 검출을 통하여 하여 측정될 수 있으며, 구체적으로, 면역크로마토그래피(Immunochromatography), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry), 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Floresence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting), 마이크로어레이, 면역침강분석 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [175] 이 때, 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표지물질을 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 표지 물질은 방사선동위원소, 형광 물질, 크로모젠(chromogen), 염색 물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 표지물질은 상기 항체 또는 항원 결합 단편에 통상적인 방법(예컨대, 공유결합, 배위결합, 이온결합 등의 화학결합)으로 결합(연결)된 것일 수 있다. 상기 항체 (또는 항원 결합 단편)과 표지물질의 결합은 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 기술에 따른 것일 수 있다.
- [176]
- [177] 본 발명의 일 실시예에서, MUC1의 C-말단부위를 유방암 세포주로부터 클로닝하고, Rosetta 컴피턴트 세포에서 발현하여 MUC1에 대한 단일클론 항체를 제조하였다. MUC1의 C-말단부위를 CpG-DNA(예컨대, MB-ODN 4531(O))와 제형화하여 DOPE:CHEMS 복합체내에 캡슐화하여, 마우스 면역화에 사용하였다. 마우스를 [MUC1의 C-말단부위]-[MB-ODN 4531(O)]-[DOPE:CHEMS] 복합체로 면역하면, MUC1-특이적 단일클론 항체의 생성이 현저히 증가함을 확인하였다. 또한, 항-hMUC1-SEA 단일클론 항체는 [hMUC1-SEA]-[MB-ODN 4531(O)]-[DOPE:CHEMS] 복합체로 면역화된 마우스로부터 얻어진 비장세포를 SP2/0 세포와 융합하여 수득될 수 있다.
- [178] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, MUC1의 C-말단 부위, MUC1의 SEA 도메인, 또는 MUC1의 C-말단 세포외 도메인을 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 다른 예는 리포솜 내에 (1) MUC1의 C-말단 부위, MUC1의 SEA 도메인, 또는 MUC1의 C-말단 세포외 도메인 및 (2) CpG-DNA를 캡슐화한 복합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 상기 면역원성 조성물은 살아있는 유기체 생체내에 주입(접종)시에 면역반응을 유발하여 항체를 생성시키는 능력을 갖는 조성물을 의미한다.
- [179] 본 발명에 있어서, 상기 리포솜은 양이온성 리포솜, 예컨대, dioleoylphosphatidylethanolamine(DOPE) 및 cholesteryl hemisuccinate(CHEMS)가 1:0.5 내지 1:2, 더욱 구체적으로 1:0.67 내지 1:1.5(DOPE: CHEMS)의 몰비, 예컨대

약 1:1의 몰비로 혼합된 혼합물 또는 이로부터 얻어진 것(예컨대 무용매 리피드 필름 등)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [180] 본 발명에 있어서, 상기 CpG-DNA는 CpG 모티프를 하나 이상, 예컨대 1 내지 3개 포함하는 총 10 내지 20개의 뉴클레오티드를 포함하는 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN: Oligodeoxynucleotide)를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 CpG-DNA는 'AGCAGCGGTTCGTGTCGGCCT'(서열번호 11)의 핵산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [181] 상기 리포솜과 올리고데옥시뉴클레오티드는 아주번트로서 기능을 할 수 있다. 아주번트(Adjuvant)는 면역 시스템과 함께 항원을 보다 쉽게 인식하는 것을 도우며, 면역 반응을 향상시킨다. 합성 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN: Oligodeoxynucleotide) 및 특정 염기 서열에 의해 플랭크된 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 박테리아 DNA는 B 림프구, 자연살 세포, 대식 세포, 및 수지상 세포에서 중요한 면역조절 효과를 갖는다.
- [182] 양이온성 리포솜(예를 들면, 리포펙타민, 포스파티딜-베타-올레오일-감마-팔미토일 에탄올아민(DOPE):콜레스테롤 헤미숙시네이트(CHEMS))이 항체 생성을 증가시키고, 항체 운반 및 CTL 반응을 증가시킨다. 그러므로, DOPE:CHEMS(1:1 비율) 복합체 내 캡슐화된 CpG-DNA (Lipoplex(O))는 인간 및 마우스 세포내에서 효과적인 면역 반응을 촉진시킬 수 있다.
- [183]
- [184] 본 발명은 또 다른 관점에서, MUC1의 C-말단 부위, MUC1의 SEA 도메인, 또는 MUC1의 C-말단 세포외 도메인 또는 리포솜 내에 (1) MUC1의 C-말단 부위, MUC1의 SEA 도메인, 또는 MUC1의 C-말단 세포외 도메인 및 (2) CpG-DNA를 캡슐화한 복합체를 포유류, 예컨대 마우스에 접종하는 단계를 포함하는 항 MUC1-SEA 단일클론 항체의 제조 방법에 관한 것이다. 상기 항체의 제조 방법은, 상기 접종하는 단계 이후에, 상기 마우스의 혈청으로부터 항체를 통상적인 방법으로 분리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [185]
- [186] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명에 따른 항-MUC1 항체를 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 핵산은 세포, 세포 용해물(lysate) 중에 존재하거나, 또는 부분적으로 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수도 있다. 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴드화(banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기 영동 및 해당 기술분야에 잘 알려진 기타의 것을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 기타 오염 물질, 예를 들어 다른 세포의 핵산 또는 단백질로부터 정제되어 나올 경우 "단리"되거나 "실질적으로 순수하게 된" 것이다. 본 발명의 핵산은 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 인트론 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.
- [187] 본 발명에 있어서, 상기 항-MUC1 항체를 코딩하는 핵산은 서열번호 34 내지

서열번호 45로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 항체의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 34 내지 39 및/또는 본 발명에 따른 항체의 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 40 내지 45이다.

[188]

[189] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 위하여, 부분적이거나 전장인 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA를 표준 분자 생물학 기술(예를 들어 PCR 증폭 또는 목적 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용한 cDNA 클로닝)로 수득할 수 있으며, DNA가 전사 및 번역 제어 서열에 "작동되도록 결합"되어 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[190] 본 명세서에서 사용되는 용어 "작동되도록 결합"은 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 의도된 기능을 하도록 항체를 코딩하는 유전자가 벡터 내로 라이게이션된다는 것을 의미할 수 있다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용되는 발현용 숙주세포와 상용성 있도록 선택된다. 항체의 경쇄 유전자 및 항체의 중쇄 유전자는 별개의 벡터 내로 삽입되거나, 두 유전자 모두 동일한 발현 벡터 내로 삽입된다. 항체는 표준 방법(예를 들어 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보성 제한 효소 부위의 라이게이션, 또는 제한 효소 부위가 전혀 존재하지 않을 경우 블런트(blunt) 말단 라이게이션)으로 발현 벡터 내로 삽입된다. 경우에 따라서, 상기 재조합 발현 벡터는 숙주세포로부터의 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 신호 펩티드가 프레임에 맞게 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 결합되도록 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드(즉, 면역글로불린 외 단백질 유래의 신호 펩티드)일 수 있다. 또한, 상기 재조합 발현 벡터는 숙주세포에서 항체 사슬 유전자의 발현을 제어하는 조절서열을 지닌다. "조절서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소(예를 들어 폴리아데닐화 신호)를 포함할 수 있다. 통상의 기술자는 형질전환시킬 숙주세포의 선택, 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 조절 서열을 달리 선택하여, 발현 벡터의 디자인이 달라질 수 있음을 인식할 수 있다.

[191]

[192] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다. 본 발명에 따른 숙주 세포는 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균 및 곤충세포로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[193]

구체적으로는 본 발명에 따른 숙주세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는

스타필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스페르길러스 속(*Aspergillus* sp.)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다.

[194] 또한 식물이나 포유동물로부터 유래할 수 있다. 바람직하게는, 원숭이 신장 세포7(COS7: monkey kidney cells)세포, NSO 세포, SP2/0, 차이니즈 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney)세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포 등이 이용 가능하지만 이에 한정되지 않는다. 특히 바람직하게는 CHO 세포가 사용될 수 있다.

[195]

[196] 상기 핵산 또는 상기 벡터는 숙주세포에 형질주입 또는 트랜스펙션(transfection)된다. "형질주입" 또는 "트랜스펙션시키기 위해 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산(DNA 또는 RNA)을 도입하는 데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술, 예를 들어 전기 영동법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션(lipofection) 등을 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 항-글리피칸 3 항체를 발현시키기 위해 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현 벡터로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열이 포함된다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 대장균(*Escherichia coli*)에서 얻어지는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ gt10과 λ gt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2°C 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL941이다.

[197]

[198] 본 발명은 또 다른 관점에서, 숙주세포를 배양하여 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현시키는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법에 관한 것이다.

[199] 상기 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터가 포유류 숙주세포 내로 도입될 경우 항체는 숙주세포에서 항체가 발현되게 하기에 충분한 기간 동안, 또는 더 바람직하게는 숙주세포가 배양되는 배양 배지 내로 항체가 분비되게 하기에 충분한 기간 동안 숙주세포를

배양함으로써 제조될 수 있다.

- [200] 경우에 따라서, 발현된 항체는 숙주세포로부터 분리하여 균일하도록 정제할 수 있다. 상기 항체의 분리 또는 정제는 통상의 단백질에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법, 예를 들어 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다. 상기 크로마토그래피는 예를 들어, 프로틴 A 컬럼, 프로틴 G 컬럼을 포함하는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 또는 소수성 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 상기 크로마토그래피 이외에, 추가로 여과, 초여과, 염석, 투석 등을 조합함으로써 항체를 분리, 정제할 수 있다.

[201]

- [202] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[203]

- [204] 실시예 1: 재조합 hMUC1-C 단백질의 제작

- [205] MCF7 세포로부터 MUC1-C 말단(이하, "hMUC1-C 단백질"로 칭함; P15941의 961번째부터 1152번째까지의 192개 아미노산을 포함하는 단백질, 이 중에서 1034-1152 aa는 MUC-SEA 도메인임)을 암호화하는 인간 cDNA를 얻고 다음의 프라이머 세트를 사용하여 RT-PCR하여 증폭시켰다.

- [206] 센스 프라이머: hMUC1 C-Nco I-S3 5'-CC ATG GCC TCA GGC TCT GCA TC-3'(서열번호 12);

- [207] 안티 센스 프라이머: hMUC1 C-Xho I-AS4 5'-CTC GAG AGA CTG GGC AGA GAA AGG AAA T-3'(서열번호 13).

- [208] 얻어진 hMUC1-C 말단 단백질 암호화 서열은 DNA 시퀀싱으로 확인하여, GenBank Accession No. J05582.1의 2954번째부터 3529까지의 576개의 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 서열과 동일한 서열을 갖는 것을 확인하였다(서열번호 26).

[209]

- [210] 실시예 2: 재조합 hMUC1-C(rhMUC1-C) 단백질의 발현 및 정제

- [211] 상기 증폭된 cDNA 단편을 C-말단 His-tag을 포함하는 발현벡터 pET-22b(Novagen, Darmstadt, Germany)에 클로닝하였다. 상기 얻어진 플라스미드를 *Escherichia coli* Rosetta™(Invitrogen, Carlsbad, CA) 수용세포(competent cells)에 형질전환시키고, 1 mM isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)를 사용하여 37°C에서 8시간동안 유도시켰다. 상기 얻어진 세포를 얼음상의 용해버퍼(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X100, 1 g/ml lysozyme, proteinase inhibitor cocktail)에서 소니케이션에 의하여 용해시켰다. 원심분리 후, inclusion body 분획을 buffer B(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8

M urea, pH 8.0)와 혼합하고, Ni-NTA agarose(Qiagen, Valencia, CA) system를 사용하여 정제하였다. 상기 얻어진 혼합물을 Ni-NTA 컬럼상으로 로딩시키고, wash buffer C(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 6.3)로 세척하였다. 결합된 단백질을 elution buffer(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 4.5)로 용출시키고, SDS-PAGE 및 웨스턴블라팅으로 분석하였다. 웨스턴 블랏은 항-His-tag 항체(Santa Cruz)를 사용하여 수행하였다.

[212]

[213] 실시예 3: Lipoplex(O) 복합체의 제조

[214] MB-ODN 4531은 3개의 CpG 모티프(밑줄로 표시)를 포함하는 20개의 염기로 구성되어 있다(AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT: 서열번호 11). 상기 CpG ODN(oligodeoxynucleotide)(이하, "CpG-DNA 4531(O)"로 칭함)은 Samchully Pharm(한국, 서울) 및 GenoTech(한국 대전)에서 구입하였다. 포스파티딜-베타-올레오일-감마-팔미토일에탄올아민(DOPE) 및 콜레스테롤헤미석시네이트(CHEMS)를 에탄올에서 1:1 몰비로 혼합한 후, 질소가스로 증발시켜 무용매 리피드 필름(solvent-free lipid film)을 제조하였다. 무용매 리피드 필름을 같은 부피의 수용성 CpG-DNA 4531(O) 50 μ g 및 rhMUC1-C 단백질(실시예 2) 50 μ g을 포함하는 혼합물에 재현탁하고, 실온에서 30분간 강력하게 교반하여 DOPE 및 CHEMS 복합체 내에 공동캡슐화(coencapsulated)된 CpG-DNA 4531(O) 및 rhMUC1-C 단백질을 제조하였다. "Lipoplex(O) 복합체"는 CpG-DNA 4531(O)이 DOPE 및 CHEMS 복합체 내에 캡슐화된 것을 칭한다. pH를 7.0으로 맞춘 후, rhMUC1-C 단백질 및 Lipoplex(O) 복합체를 초음파발생장치로 30초간 초음파 처리하고, 용액을 0.22 μ m 필터를 사용하여 여과하고 액체 질소로 3번 동결-용해하여, 하기 시험에 사용하였다.

[215]

[216] 실시예 4: 동물의 준비

[217] 4주령 암컷 BALB/c 마우스(OrientBio, Inc. (한국 서울)) 및 BALB/cAnNCri-nu/nu 마우스(four-week-old)를 Nara Biotech, Inc(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 상기 마우스를 특정 병원체가 없는 조건에서 의 무균 조건에서 20-25°C 및 32-37% 습도 하에 유지되었다. 모든 동물 시험 과정은 한림대학교 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Veterinary Research & Quarantine Service of Korea"에 따라 수행하였다. 상기 마우스를 isoflurane 흡입을 통하여 희생시키고 고통을 최소화하기 위한 모든 노력을 기울였다.

[218]

[219] 실시예 5: 마우스의 면역화

[220] 50 μ g의 rhMUC1-C 단백질 및 50 μ g의 CpG-DNA 4531가 포스파티딜-베타-올레오일-감마-팔미토일에탄올아민:콜레스테롤헤미석시네이

트(DOPE:CHEMS 복합체)에 공동캡슐화된 복합체를 포함하는 리포솜 복합체를 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 4회 복강내 주입하여 면역화하였다.

[221]

[222] 실시예 6: 항원-특이적 Ig ELISA

[223] rhMUC1-C 특이적 IgG 총량을 ELISA에 의해 측정하였다. 96-웰 면역플레이트를 10 μ g/ml의 rhMUC1-C 단백질(실시예 2)로 코팅하고 PBS-T(0.1%(v/v) Tween-20를 포함하는 PBS) 내의 1%(w/v) 소 혈청 알부민(BSA)으로 차단시켰다. 상기 실시예 5에서 면역화된 마우스 혈청, 하이브리도마 세포 배양 상등액, 또는 정제된 항체를 PBS-T로 희석하고 실온에서 2 시간 동안 배양 하였다. 플레이트를 PBS-T로 3 회 세척하고 염소 항-마우스 IgG HRP-접합된 2 차 항체와 함께 1 시간 동안 배양 하였다. TMB 기질 용액 A 및 B(1:1 비율)(Kirkegaard and Perry Laboratories, 미국 메릴랜드주 게이더스버그)를 사용하여 전개시키고, Spectra Max 250 마이크로 플레이트 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하여, 비색분석(colorimetric assay)을 수행하였다.

[224]

[225] 실시예 7: 항-hMUC1 단일클론 항체의 제조 및 정제

[226] 상기 실시예 5에서 rhMUC1-C 단백질로 면역화된 마우스의 비장 세포를 폴리에틸렌 글리콜(PEG, Sigma-Aldrich)을 사용하여 SP2/0 골수종 세포(ATCC)와 융합시켰다. 융합된 세포를 배양하고, hypoxanthine-aminopterin-thymidine(HAT, Sigma-Aldrich) 배지로 선택하였다. 상기 선택된 하이브리도마 세포의 배양 상청액을 ELISA를 통하여 rhMUC1-C 단백질에 대한 결합을 시험하고, 결합 양성을 보이는, 즉 rhMUC1-C 단백질 특이적인 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 스크리닝하였다. 하이브리도마 클론은 표준 하이브리도마 기술에 따라 선별되었다(Yokoyama et al. 2006). 상기 얻어진 하이브리도마 클론(KCLRf-BP-00395; 이하 상기 하이브리도마 세포 및 이로부터 생산되는 항체를 "hMUC1-1H7"로 명명함)을 hypoxanthine-thymidine(HT) 배지에서 배양 하였다. ELISA-양성 하이브리도마 세포 집단을 서브클로닝하였다. 단일클론 항체 생산을 위하여, 초기 및 10 일 후, 마우스에 하이브리도마 세포(hMUC1-1H7 클론)를 i.p. 접종하였다. 10 일 후에 복강액을 채취하고, 3,000 rpm으로 30 분간 원심분리 하였다. 상등액을 Protein-A 크로마토 그래피(Repligen, Waltham, MA)를 사용하여 rhMUC1-C 단백질에 결합하는 항-hMUC1 단일클론 항체를 정제 하였다.

[227]

[228] 실시예 8: 항-hMUC1 단일클론 항체의 IgG 이소타입(Isotype) 확인

[229] 상기 실시예 7에서 얻어진 항-hMUC1 단일클론 항체의 IgG 이소타입을 측정하기 위해, 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International, 미국 펜필드)를 1 μ g/ml의 hMUC1-C 단백질로 코팅하고, 1% BSA를 함유하는 PBS 내 0.05%

Tween-20(PBST)로 차단하였다. 항-hMUC1-C 단일클론 항체를 각 플레이트의 상부 열에 첨가하고, 일련의 PBST 내 1:4 희석은 다음 열에 위치시켰다. 플레이트를 실온에서 2시간 동안 배양시키고 PBST로 세척하였다. 이어서, 호스라디시 퍼옥사이드(HRP: Horseradish Peroxidase)(BD Pharmingen)와 결합된 항-마우스 총 IgG, IgG1, IgG2a, IgG3b, IgG3 항체를 각 웰에 첨가하고(1:500 dilution), 실온에서 1시간 동안 배양하였다. TMB 기질 용액 A 및 B(1:1 비율)(Kirkegaard and Perry Laboratories, 미국 메릴랜드주 게이더스버그)를 사용하여 전량 분석하였고, Spectra Max 250 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, 미국 캘리포니아주 써니테일)을 사용하여 450 nm 흡광도에서 측정하였다.

[230]

[231] 실시예 9: 항-hMUC1-SEA 단일클론 항체의 반응성 시험

[232] 실시예 9-1: 세포 배양

[233] 인간 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB-231) 및 췌장암 세포주(Capan-2, CFPAC-1)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 구입하고, 인간 유방암 세포주(T47D, ZR75-1) 및 췌장암 세포주 Capan-1, PANC-1)는 Korean Cell Line Bank(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 구입하였다.

[234] MCF-7 세포는 0.01 mg/ml의 인간 재조합 인슐린이 보충된 Eagle's Minimum Essential Medium에서 배양하고; MDA-MB-231 세포는 Leibovitz's L-15 medium(Thermo Fisher Scientific)에서 배양하고; T47D, ZR75-1, 및 Capan-1 세포는 RPMI-1640 medium(Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였다. Capan-2 세포는 McCoy's 5A medium(Thermo Fisher Scientific)에서, CFPAC-1 세포는 Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM, Thermo Fisher Scientific)에서, PANC-1 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Thermo Fisher Scientific)에서 각각 배양하였다. 모든 배지는 10%(w/v) 우태아혈청(FBS, Thermo Fisher Scientific), 100 U/ml 페니실린, 및 100 mg/ml 스트렙토마이신을 보충하여 사용하였다. MCF-7, T47D, ZR75-1 Capan-1, Capan-2, CFPAC-1, 및 PANC-1 세포는 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 배양하고, MDA-MB-231 세포는 37°C의 CO₂이 없는 조건에서 배양하였다.

[235]

[236] 실시예 9-2: 시험을 위한 항체의 준비

[237] 웨스턴 블라팅 및 면역 침전에 의해 세포에서 MUC1을 검출하기 위하여, 상업적으로 입수 가능한 항-MUC1-CT 항체 및 항-MUC1-CT2 항체를 Abcam(Cambridge, UK)으로부터 입수하였다. 항-MUC1-CT 항체 및 항-MUC1-CT2 항체는 MUC1의 세포질 꼬리 영역을 인식한다. 항-베타-액틴 항체는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[238]

[239] 실시예 9-3: 웨스턴 블라팅 분석

- [240] 상기 세포를 용해 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 프로티아제 저해제 콕테일, 1%(w/v) NP-40)으로 용해시키고, 4 °C에서 14,000 rpm으로 20 분간 원심 분리하였다. 4~12% Bis-Tris 구배 겔(Thermo Fisher Scientific)에서 같은 양의 단백질을 분리하고, 실온에서 1 시간 동안 PBS-T 중 3 %(w/v) BSA로 차단 된 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮겼다. 상기 니트로셀룰로오스 멤브레인을 4 °C에서 하룻밤 동안 항-hMUC1 항체(hMUC1-1H7; 실시예 7), 항-MUC1-CT 항체(Abacam, EPR1023), 항-MUC1-CT2 항체(Abcam, ab80952), 또는 항-베타-액틴 항체(Sigma-Aldrich)와 함께 배양 하였다. 면역 반응성 단백질은 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 향상된 화학 발광 시약(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 측정하였다.
- [241]
- [242] 실시예 9-4: 면역 침강 분석
- [243] 세포 용해 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 프로티아제 저해제 콕테일, 1%(w/v) NP-40)을 항-hMUC1 항체와 4 °C에서 밤새 함께 배양 하였다. 단백질 A 비드를 혼합물에 첨가하고 4 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 원심 분리에 의해 수집된 면역 복합체를 세척하고 웨스턴 블라팅으로 분석하였다. 멤브레인을 항-hMUC1 항체(hMUC1-1H7), 항-MUC1-CT 항체(Abacam, EPR1023), 항-MUC1-CT2 항체(Abcam, ab80952), 또는 항-베타-액틴 항체(Sigma-Aldrich) 항체와 배양 하였다.
- [244]
- [245] 실시예 9-5: 탈글리코실화 분석(Deglycosylation assay)
- [246] T47D 세포의 세포 용해물을 용해 완충액(0.5%(w/v) SDS, 1%(w/v) 베타-머 캅토에탄올)으로 추출하고 100 °C에서 10 분간 끓였다. 그 후 시료를 37 °C에서 2 시간 동안 PNGase F(Elpis-Biotech, Daejeon, Korea)와 함께 배양하고, 100 °C에서 10 분간 끓여 주었다. 얻어진 시료를 용해 완충액으로 희석하고 항-hMUC1 단일클론 항체로 면역 침전시켰다. 생성된 면역 복합체를 항-MUC-CT 항체 또는 항-MUC1-CT2 항체로 웨스턴 블라팅하여 분석하였다.
- [247]
- [248] 실시예 9-6: 공초점 현미경 분석(Confocal microscopy)
- [249] 세포를 12-웰 배양판의 폴리-L-라이신으로 코팅된 유리커버 슬립 상에서 배양 하였다. 세포 표면 염색을 위해, 세포를 4%(w/v) 파라포름알데하이드로 고정시키고, 3%(w/v) BSA로 차단시키고, 얼음상에서 2 시간 동안 항-hMUC1 항체로 염색하였다. 세포 내부 염색을 위해, 세포를 4%(w/v) 파라포름알데하이드로 고정시키고, 0.1%(w/v) Triton X-100으로 투과성화시키고, 3%(w/v) BSA로 차단시키고, 실온에서 2 시간 동안 항-hMUC1 항체로 염색시켰다. PBS-T로 세척 한 후, 얻어진 세포 시료를 Alexa Flour 488 접합 2차 항체(Invitrogen, Eugene, OR)와 함께 1 시간 동안 배양하였다. 세포 핵은

Hoechst 33258로 염색하였다. 모든 세포 시료는 공초점 레이저 스캐닝 현미경 시스템 CLSM, LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Germany)에 장착하고 관찰하였다.

[250]

[251] 실시예 9-7: 세포 내재화 분석(Internalization assay)

[252] 항-hMUC1 단일클론 항체를 DyLight 488로 제조자의 지시(Thermo Fisher Scientific)에 따라 표지 하였다. 유방암 세포 및 췌장암 세포를 DyLight 488 표지 항-hMUC1 항체로 처리하고 37 °C에서 지시된 시간 동안 배양하였다. 항체가 내재화된 세포로부터 발생하는 형광 신호는 CLSM(LSM 710, Carl Zeiss)으로 검출 하였다.

[253]

[254] 실시예 10: 항-hMUC1 단일클론 항체의 가변부위의 클로닝

[255] 항-hMUC1 단일클론 항체(hMUC1-1H7; 실시예 7)를 마우스 단일클론 항체 이소타입 타이핑 키트(Dipstick format, Bibco BRL 또는 Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 배양하였다. RNeasy Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 상기 하이브리도마 세포에서 total RNA를 추출하여 cDNA를 생성하였다. hMUC1-1H7로부터 생성된 항-hMUC1 단일클론 항체의 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위(VH 및 VL)를 클로닝하기 위해, 상기 생성된 cDNA를 하기 프라이머 세트를 갖는 벤트 폴리머라제(Vent polymerase, NEB)를 사용하여 증폭시켰다.

[256] 중쇄용 프라이머: IGG1(5'-GGA AGA TCT ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'; 서열번호 14) 및 5'MH2(5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3'; 서열번호 15)

[257] 경쇄(kappa chain)용 프라이머: 3'Kc(5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3'; 서열번호 16) 및 5'Mk(5'-GG GAG CTC GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3'; 서열번호 17).

[258] 표준 PCR 반응을 25 사이클 동안 수행하였다. 얻어진 PCR 산물을 pGEM-T 이지 벡터(Promega)에 직접 라이게이션시켰다. 클로닝된 마우스 Ig 삽입물을 DNA 시퀀싱으로 분석 하였다.

[259]

[260] 실시예 11: 항-hMUC1 단일클론 항체의 항원 결합 단편(Fab)의 발현

[261] 항-hMUC1 단일클론 항체(hMUC1-1H7; 실시예 7)의 경쇄 가변부위 및 중쇄 가변부위(VH 및 VL)를 암호화하는 서열을 증폭하고 각각 *Sfi* I 및 *Bst* XI을 사용하여 세균 발현 벡터 FabE로 서브 클로닝하고(Jeon 등, Mol.Immunol.44: 827-836 (2007), Kwon 등 Oncol. Rep. 18: 513-517 (2007)), 얻어진 재조합 발현 플라스미드를 pFabE-hMUC1-1H7(도 8a)로 명명하였다.

[262] 이때 사용된 프라이머는 다음과 같다.

[263] 중쇄가변부위 암호화 서열 (393 bp) 증폭용 프라이머

[264] Forward primer: 5'-ggc cca gcc ggc cat ggc cSA RGT NMA GCT GSA GSA GTC WGG-3' (서열번호 18);

- [265] Reverse primer: 5' -GGC CGT GCT GGC CCC GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'(서열번호 19),
- [266] 경쇄가변부위 암호화 서열 (396 bp) 증폭용 프라이머
- [267] Forward primer: 5'-CCA TTG CAG TGG CAC TGG CTG GTT TCG CTA CCG TAG CAC AGG CAG CCG AYA TTG TGM TSA CMC ARW CTM CA-3' (서열번호 20);
- [268] Reverse primer: 5'-CCA CCG TAC TGG CGG ATA CAG TTG GTG CAG CAT C-3' (서열번호 21).
- [269] 재조합 발현 플라스미드 pFabE-hMUC1-1H7을 제한 분석(restriction analysis) 및 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. pFabE-hMUC1-1H7을 TG1 대장균 세포에 형질전환시키고, 재조합 단백질의 발현을 최적화하고, 항-His 항체를 사용하여 웨스턴 블라팅하여 확인 하였다.
- [270] 재조합 Fab(pFabE-hMUC1-1H7)의 대규모 생산 및 정제를 위하여, 하이브리도마 hMUC1-1H7 클론의 배양액 500 ml를 0.5 mM IPTG로 처리하고 18°C에서 16 시간동안 배양하였다. 상기 배양물을 원심분리하여 배양 상등액을 수확하고, Ni-NTA 친 화성 칼럼(Clontech)에 넣어, VH-CH 융합 단백질에서의 His 태그를 사용하여 적절하게 접혀지고 조립된 Fab 단백질을 분리하였다.
- [271] 칼럼에 결합된 재조합 Fab를 10 mM imidazole(pH 8.0)로 용출시키고, 단백질 용액을 4°C에서 원심분리(3,500 xg)하여 centricon을 사용하여 투석하고 농축시켰다.
- [272]
- [273] 실시예 12: MTT 분석
- [274] 5일 동안 항-hMUC1 단일클론 항체(10 µg/ml)로 처리된 암세포의 성장은 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드(MTT, Sigma-Aldrich) 용액을 사용하여 측정하였다. 지시된 시간에 MTT 용액을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37 °C에서 추가로 4 시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후, 포르마잔 결정(formazan crystals)을 DMSO에 용해시켰다. 발색은 650 nm의 기준 파장을 갖는 595 nm의 분광 광도계를 사용하여 모니터링하였다.
- [275]
- [276] 실시예 13: 생체내 분포 이미징(Biodistribution imaging in vivo)
- [277] 50%(w/v) Matrigel 중의 5×10⁶ Capan-2 세포를 4 주령의 수컷 BALB/cAnCrj-nu/nu 마우스의 등쪽 우측 옆구리에 피하 접종 하였다. 유방암 세포주 주입을 위해, 17베타-에스트라디올 펠렛(미국, FL, Sarasota, Innovative Research of America, 펠렛, 60 일 방출)을 마우스에 피하 이식하였다. 다음날, 50%(w/v) Matrigel 중의 5×10⁶ 세포(T47D, ZR75-1)를 상기 마우스의 등쪽 우측 옆구리에 피하 접종하였다.
- [278] 종양 체적이 평균 약 100mm³에 이르면, 상기 마우스에 정상 마우스 IgG-DyLight 755(5 mg/kg) 또는 항-hMUC1 항체-DyLight 755(5 mg/kg)를 정맥

주사 하였다. 이어서, 0, 24, 48 시간에서 생체 내 영상 시스템(IVIS 200, Xenogen Corporation, MA)을 사용하여 항체 표적 이미지를 모니터링하였다. 생체 내에서 항-hMUC1 단일클론 항체의 세포 내 국소 위치화를 검출하기 위해, DyLight 488-표지된 항-hMUC1 항체(5 mg/kg)를 정맥 내에 주사하였다. 2 일 후, 종양 조직을 채취하고, 동결 절편을 수행하였다. 항체의 내재화는 CLSM(LSM 710, Carl Zeiss)으로 종양 절편에서 검출되었다.

[279]

[280] 실시예 14: 췌장암 마우스 모델의 제조

[281] 이종이식(xenograft) 분석을 위하여, 50% Matrigel 내의 5×10^6 Capan-2 세포를 16마리의 BALB/cAnCrj-nu/nu 마우스의 등쪽 우측 옆구리에 피하 접종하였다($n=8$). 종양 부피가 75 mm^3 이 되었을 때, 상기 마우스를 무작위로 2개의 처리군으로 나누었다(eight mice/group): PBS 처리군 및 항-hMUC1 단일클론 항체 처리군. 상기 항체는 10 mg/kg 의 양으로 1주일에 2번 정맥내 투여하였다. 캘리퍼스를 사용하여 7일 간격으로 종양 지름을 측정하고, 다음의 수식에 의하여 종양 부피를 계산하였다: $(\text{넓이}^2 \times \text{길이})/2$. 항-hMUC1 단일클론 항체 처리 후 11주일 후에 마우스들을 희생시키고 종양의 무게를 측정하였다.

[282]

[283] 실시예 15: 조직 어레이 및 면역조직화학(immunohistochemistry)

[284] 파라핀-함몰 인간 유방암 조직 절편을 ISU ABXIS(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 상기 조직 절편에 xylene을 30분동안 처리하여 파라핀을 제거하고, 에탄올로 다시 수화시킨 후, 3% 과산화수소 용액과 함께 10분동안 인큐베이팅하였다. 시트르산 용액(pH 6.0)에서 항원 회복(Antigen retrieval)을 수행하였다. 상기 절편을 정상 말혈청을 사용하여 30분간 블라킹하고, 실온에서 2시간동안 항-hMUC1 항체($1 \mu\text{g/slide}$)와 함께 인큐베이팅하였다. 상기 절편을 세척하고 바이오틴화된 항-마우스 IgG 항체 Vector Laboratories, Burlingame, CA)와 함께 1시간동안 인큐베이팅하였다. 그 후, 세척하고, HRP-스트렙타비딘과 함께 30분간 인큐베이팅하였다. 3,3-diaminobenzidine(DAB, Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 면역반응성을 검출하고, 헤마톡실린(Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)으로 대조염색하였다. 현미경 (Eclipse E-200, Nikon, and Tokyo, Japan)을 사용하여 모든 이미지를 시험하였다.

[285]

[286] 실시예 16: 항-hMUC1 단일클론 항체의 특성 확인

[287] PBS(control) 또는 rhMUC1-C와 Lipoplex (O) 복합체로 마우스($n=4$)를 면역화시킨 후(실시예 5 참조), 3차 면역 접종 후, 마우스 혈청을 수집하고 ELISA를 이용하여 rhMUC1-C 특이적 IgG 총량을 측정하여(실시예 6 참조), rhMUC1-C에 대한 항체 형성을 확인하였다. 그 결과를 도 1a에 나타내었다. 도 1a에서 control은 PBS 접종군이고, rhMUC1-C-1, -2, -3, 및 -4는 마우스 각 개체를 의미한다. 도 1a에서 보여지는 바와 같이, rhMUC1-C 특이 적 IgG가 유의적일

유도된 것을 확인할 수 있다.

- [288] 다음으로, 상기 면역화된 마우스로부터 분리된 하이브리도마 세포를 실시예 7에 따라서 스크리닝한 결과를 도 1b 및 1c에 나타내었다. 도 1b는 HAT 배지를 이용한 스크리닝 결과이고, 도 1c는 HT 배지를 이용한 스크리닝 결과이다. 도 1b 및 1c에서, #는 96-well plate의 개수이며, A~H는 plate의 가로 구획을 명명한 것이다. 도 1b 및 1c의 결과로부터, hMUC1-1H7 클론을 rhMUC1-C 특이적 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마로 선정하였다.
- [289] 상기 선정된 하이브리도마 hMUC1-1H7 세포를 2017년 3월 8일자로 대한민국 서울 종로구 연건동에 위치한 한국세포주연구재단(KCLRF)에 기탁하여, 수탁번호 KCLRF-BP-00395를 부여 받았다.
- [290] 다음으로, 상기 분리된 하이브리도마 hMUC1-1H7 클론으로부터 항-hMUC1 단일클론 항체를 정제하고, SDS-PAGE 및 Commassie 염색을 사용하여 정제된 항체를 분석하였다. 도 2a는 하이브리도마 hMUC1-1H7 클론을 마우스의 복강에 주사한 후 복수를 회수하고, ELISA를 통하여 rhMUC1-C 특이적 항체의 존재를 분석한 결과이며, control serum은 PBS 집종군의 결과를 의미한다. 그 결과, hMUC1-1H7 클론이 주입된 마우스의 복수에 rhMUC1-C 특이적 항체가 존재함을 확인하여 이를 분리, 정제하였다. 상기 분리, 정제된 항-hMUC1 단일클론 항체를 SDS-PAGE 및 Commassie 염색에 의하여 분석하여, 그 결과를 도 2b에 나타내었다. 도 2b에서 HC는 중쇄, LC는 경쇄를 각각 나타낸다.
- [291] 몇 가지 IgG 이소타입에 대한 ELISA를 수행하여, 상기 얻어진 항-MUC1 항체의 이소 타입을 확인하여(실시예 8 참조), 그 결과를 도 2c에 나타내었다. 도 2c에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 정제된 항-MUC1 항체는 IgG1 타입임을 확인하였다.
- [292]
- [293] 실시예 17: 유방암 세포 및 췌장암 세포에서의 항-MUC1 항체 특이성 시험
- [294] 상기 얻어진 항-hMUC1 단일클론 항체가 유방암 세포에서 MUC1 단백질(정상세포에서 MUC1 단백질이 MUC1-N 서브유닛 도메인과 MUC1-C 서브유닛 도메인의 dimer로 구성되어 있으며 hyperglycosylation 되어 있는 것과 달리, 암세포주에서는 주로 MUC1-C 서브유닛 도메인이 존재하며 hypoglycosylation 되어 있음)을 인식하는지를 평가하기 위해, 유방암 세포(MCF-7, MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1)의 세포 용해물을 SDS-PAGE에 의하여 분리하고, 항-hMUC1 단일클론 항체 및 항-MUC1-CT 항체를 사용하여 웨스턴 블라팅을 수행하였다(실시예 9.4 참조). 상기 얻어진 결과를 도 3a에 나타내었다. 그 결과, 항-MUC1-CT 항체는 MCF-7, T47D 및 ZR75-1에서 MUC1 단백질을 검출하였지만, MDA-MB-231에서는 검출하지 못하였다. 반면, 항-hMUC1 단일클론 항체는 모든 세포시료에서 MUC1 단백질을 인식하지 못하였다. MDA-MB-231 세포에서 MUC-1 단백질이 검출되지 않았기 때문에, 이 세포주를 모든 시험에서 음성 대조군으로 사용하였다.
- [295] 항-hMUC1 단일클론 항체가 내재(endogenous) MUC1 단백질을 고유한 상태로

인지할 수 있는지를 알아보기 위해, MCF-7, MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1 세포의 세포 용해물을 마우스 정상 IgG 또는 항-hMUC1 단일클론 항체로 면역 침전시키고, 항-MUC1-CT 항체를 사용하여 면역 블로팅하여(실시예 9.5 참조), 그 결과를 도 3b에 나타내었다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 항-hMUC1 단일클론 항체가 MCF-7, T47D 및 ZR75-1 세포에서 자연 상태의 MUC1 단백질을 효율적으로 면역 침전시킬 수 있음을 알 수 있다.

[296] 상기 도 3a의 결과는 항-hMUC1 단일클론 항체가 Western blotting에서 사용된 denature된 MUC1 단백질을 인식 못함을 보여주는 반면, 도 3b의 결과는 항-hMUC1 단일클론 항체가 면역침전을 통해 암에서 고유한 형태의 MUC1 단백질을 인식함을 보여주며, 이는 항-hMUC1 단일클론 항체가 MUC1 단백질의 고유한 3차 구조를 인식함을 입증한다고 할 수 있다.

[297] MUC1의 세포외 도메인은 세포 표면으로부터 200-500nm까지 조밀하게 당화되어 있다. 따라서, 항-hMUC1 단일클론 항체가 탈글리코실화된 단백질 코어를 인식 할 수 있는지 여부를 조사하였다(실시예 9.6 참조). T47D 세포 용해물을 PNGase F로 처리하고, 항-MUC1-CT 항체, 항-MUC1-CT2 항체, 항-hMUC1 단일클론 항체(실시예 7), 또는 항-베타-액틴 항체를 사용하여 웨스턴 블라팅한 결과를 도 3c에 나타내었다. 도 3c에 나타난 바와 같이, 항-hMUC1 단일클론 항체는 MUC1 단백질을 검출하지 않음을 알 수 있다. 한편, PNGase F로 처리 한 T47D 세포 용해물을 항-hMUC1 단일클론 항체로 면역 침전시킨 다음, 항-MUC1-CT 또는 항-MUC1-CT2 항체로 면역 블로팅한 결과를 도 3d에 나타내었다. 도 3d에 나타난 바와 같이, 항-hMUC1 단일클론 항체는 T47D 세포에서 탈글리코실화된 MUC1 단백질을 면역 침전시킬 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 항-hMUC1 단일클론 항체가 글리코실화 상태와 무관하게 천연 상태의 MUC1 단백질을 성공적으로 인식 할 수 있음을 입증한다.

[298] 항-hMUC1 단일클론 항체가 췌장암 세포에서 손상되지 않은(intact) MUC1 단백질을 인식하는지 여부를 시험하기 위하여, 췌장암 세포(Capan-1, Capan-2, CFPAC-1, 및 PANC-1)의 세포 용해물을 SDS-PAGE에 의해 분리시키고, 항-MUC1-CT 항체, 항-hMUC1 항체, 또는 항-베타-액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블라팅을 수행하여, 그 결과를 도 4a에 나타내었다. 도 4a에서 알 수 있는 바와 같이, 항-hMUC1 단일클론 항체는 시험된 모든 세포 시료에서 MUC1 단백질을 인식 할 수 없는 것으로 나타났다.

[299] 한편, 항-hMUC1 단일클론 항체가 내인성 MUC1 단백질을 고유한 상태로인지 할 수 있는지를 알아보기 위해, 다양한 췌장암 세포(Capan-1, Capan-2, CFPAC-1, 및 PANC-1)의 세포 용해액에 대하여 면역 침전을 수행하고, 항-MUC1-CT 항체 및 항-hMUC1 단일클론 항체를 사용하여 면역 블로킹하였다. 상기 얻어진 결과를 도 4b에 나타내었다. 도 4b에 나타난 바와 같이, 항-hMUC1 단일클론 항체는 췌장암 세포(Capan-2 및 CFPAC-1)에서 자연 상태의 MUC1 단백질을 효율적으로 면역 침전할 수 있음을 확인할 수 있다.

[300]

[301] 실시예 18: 항-hMUC1 단일클론 항체의 세포 표면 및 세포 내 MUC1 단백질의 인지 및 세포 내재화(internalization) 확인

[302] 항-hMUC1 단일클론 항체가 손상되지 않은 세포에서 MUC1 단백질을 인식하고 결합할 수 있는지 확인하기 위하여, 유방암 세포 (MCF-7, MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1) 및 췌장암 세포(Capan-1, Capan-2, CFPAC-1, PANC-1)에 대하여 면역 형광 염색하고 그 결과를 공초점 현미경으로 분석하였다(실시예 9-7 참조).

[303] 보다 구체적으로, MCF-7, MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1 세포를 항-hMUC1 단일클론 항체 또는 마우스 정상 IgG와 함께 4°C(세포 표면 MUC1 단백질의 경우) 또는 실온(세포내 MUC1 단백질의 경우)에서 항온 배양 한 후, Alexa 488(녹색)-접합된 2 차 항체와 함께 1시간 동안 배양하였으며, 세포 핵은 Hoechst 33258(청색)로 염색하였다. 얻어진 형광 이미지는 공초점 현미경(CLSM, LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하였으며, 이를 도 5의 A 에 나타내었다(scale bar: 10 μ m). 또한, 유방암 세포에서의 항-hMUC1 단일클론 항체의 내재화를 확인하기 위하여, MCF-7, MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1 세포를 DyLight 488(녹색)-표지된 항-hMUC1 단일클론 항체로 처리하고 37°C에서 6 시간 동안 배양하고, 핵은 Hoechst 33258로 염색한 후, 얻어진 형광 이미지를 공초점 현미경(CLSM, LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하여, 도 5의 B에 나타내었다 (scale bar: 10 μ m).

[304] 또한, 췌장암 세포에서의 세포 표면 및 세포내 영역에 위치한 MUC1 단백질에 대한 항-hMUC1 단일클론 항체의 결합을 시험하였다. 췌장암 세포주 Capan-1, Capan-2, CFPAC-1 및 PANC-1 세포를 항-hMUC1 단일클론 항체 또는 마우스 정상 IgG와 함께 4 °C(표면) 또는 실온(세포 내)에서 배양한 다음, Alexa 488 접합 2 차 항체와 함께 1시간 동안 배양하였으며, 핵은 Hoechst 33258로 염색하였다. 얻어진 형광 이미지는 공초점 현미경(CLSM, LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하여, 도 6에 나타내었다(scale bar: 10 μ m).

[305] 상기 도 5 및 도 6의 결과로부터, 항-hMUC1 항체가 유방암 세포(MCF-7, T47D 및 ZR75-1)와 췌장암 세포(Capan-2 및 CFPAC-1)에서 MUC1을 뚜렷하게 염색함을 알 수 있고, 이들은 세포 표면 및 세포 내에 위치함을 알 수 있다.

[306] 이러한 결과는 항체가 MUC1 C-말단의 서브유닛의 세포외 영역을 인식한다는 것을 시사한다. 항체의 치료제로서의 효능은 세포 내재화에 더욱 의존한다고 할 수 있다. 따라서, 항-hMUC1 항체를 DyLight 488과 결합시키고, 이를 유방암 세포와 췌장암 세포에 6 시간 동안 처리한 후, 항체의 세포 내재화 여부를 형광 이미지를 통하여 확인하였다. 췌장암 세포(Capan-1, Capan-2, CFPAC-1 및 PANC-1)를 DyLight 488-표지된 항-hMUC1 단일클론 항체로 처리하고, 0, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간 및 24시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 핵은 Hoechst 33258로 염색하였다. 얻어진 형광 이미지는 공초점 현미경(CLSM, LSM 710, Carl

Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하여, 도 7에 나타내었다(scale bar: 10 μ m).

유방암에서의 세포 내재화는 도 5(b)에서 확인할 수 있다.

[307] 즉, 상기 결과들은 항-hMUC1 단일클론 항체가 살아있는 세포에서 MUC1 단백질을 표적하고 내재화할 수 있음을 확인시켜준다.

[308]

[309] 실시예 19: 항-hMUC1 단일클론 항체의 가변부위 클로닝 결과

[310] 항-hMUC1 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포(hMUC1-1H7)로부터 항-hMUC1 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변부위를 클로닝하고, DNA 시퀀싱하였다(실시예 10). 상기 DNA 시퀀싱에 의해 확인된 서열을 BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 의해 분석하여 공지된 서열과의 상동성을 분석하였다. hMUC1-1H7 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변부위를 코딩하는 cDNA(중쇄 가변부위 코딩 cDNA: 393bp; 경쇄 가변부위 코딩 cDNA: 396bp)는 공지된 마우스 면역글로불린(IgG1)의 중쇄 및 경쇄의 가변부위의 암호화 서열과 각각 약 80 내지 95 % 및 93 내지 98 %의 서열 상동성을 보였다.

[311] 상기 얻어진 DNA 서열을 기초로 중쇄 및 경쇄의 CDR을 공지된 방법(kabat CDR definition)으로 확인하였다(표 2). 중쇄 및 경쇄의 가변영역 서열은 하기 표 3에 나타내었다.

[312]

[313] [표2]

중쇄 가변영역 CDR		서열번호	경쇄 가변영역 CDR		서열번호
CDR1	GYTFTSYWMH	1	CDR1	KASQDIKSYLS	4
CDR2	YINPGTGYIEYNQKFKD	2	CDR2	YATRLAD	5
CDR3	STAPFDY	3	CDR3	LQYDESPYT	6

[314]

[315] [표3]

	아미노산 서열		서열번호
중쇄	hMUC	EVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKVSGYTFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGYINP	22
가변	1-	GTGYIEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASSTAPFDYW	
영역	1H7	GQGTTLTVSS	
경쇄	hMUC	DIVITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIKSYLSWYQQKPKWSPKTLIYYATR	23
가변	1-	LADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLESDDTATYYCLQYDESPYTFGGGTKLEI	
영역	1H7	KR	

[316]

[317] 실시예 20: 항-hMUC1 단일클론 항체로부터 유도된 재조합 Fab 단편의 발현 확인 및 상기 재조합 Fab 단편의 암세포의 MUC1 단백질 인식 시험

- [318] 발현 벡터 pFabE를 사용하여 대장균에서 재조합 Fab를 발현시켰다(실시예 11).
- [319] 벡터 pFabE는 경쇄의 불변부위(CL), 중쇄의 불변부위(CH1), 경쇄 가변부위(VL), 및 중쇄 가변부위(VH)가 삽입될 수 있는 2 개의 클로닝 사이트 *Bst*XI 및 *Sfi*I를 각각 포함한다. hMUC1-1H7의 VL 및 VH 서열을 순차적으로 서브 클로닝함으로써 재조합 발현 플라스미드 pFabE-hMUC1-1H7을 구축하였다(도 8a). 상기 재조합 플라스미드는 대장균에서 LacZ 프로모터의 제어하에서 VL-CL 융합 단백질 및 VH-CH1 융합 단백질을 이중-시스트론 발현(bi-cistronic expression)시킨다. VL-CL 융합 단백질은 N 말단 OmpA 태그 및 C 말단 Pre-S1 태그를 포함하지만, VH-CH1 융합 단백질은 N 말단 pelB 태그 및 C 말단 His 태그를 포함한다(도 8b). 재조합 VH-CH1 융합 단백질이 His tag를 포함하므로, Ni-NTA affinity column chromatography를 사용하여 대장균의 대규모 배양과 배양 상등액으로부터 hMUC1-1H7의 재조합 Fab 정제를 수행하였다.
- [320] 상기 정제된 재조합 Fab(이하, "재조합 Fab-hMUC1-1H7")이 암세포의 MUC1을 인식(결합)할 수 있는지 시험하기 위하여, 유방암 세포(MCF-7, MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1)에 대하여 면역 형광 염색 시험을 수행하였다. 유방암 세포 MCF-7, MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1 세포를 각각 재조합 Fab-hMUC1-1H7과 함께 배양한 후, Alexa 488-접합 2 차 항체와 함께 배양하였으며, 핵은 Hoechst 33258로 염색하였다. 얻어진 형광 이미지는 공초점 현미경(CLSM, LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하여, 도 8 c에 나타내었다(scale bar: 10 μ m).
- [321] 도 8c에 나타난 바와 같이, 공 초점 영상은 재조합 Fab-hMUC1-1H7가 유방암 세포(MCF-7, T47D 및 ZR75-1)에서 MUC1을 뚜렷하게 염색하였으며, 이는 상기 재조합 Fab-hMUC1-1H7가 유방암 세포의 MUC1을 인식함을 의미한다.
- [322]
- [323] 실시예 21: 항-hMUC1 단일클론 항체의 유방암 세포의 증식 억제 효과
- [324] MUC1은 다양한 유형의 암 조직에서 과발현되어 세포의 증식을 촉진한다. 항-hMUC1 단일클론 항체의 암치료제로서의 유효성을 확인하기 위하여, 항-hMUC1 단일클론 항체가 유방암 세포 증식에 미치는 영향을 시험하였다.
- [325] MDA-MB-231, T47D 및 ZR75-1 세포를 항-hMUC1 항체(10 μ g/ml; 실시예 7) 또는 정상 마우스 IgG1(10 μ g/ml)로 처리하고, 도 9에 표시된 시간 간격으로 MTT 분석(실시예 12)에 의해 세포 증식에 미치는 영향을 시험하였다.
- [326] 상기 얻어진 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9에서 control은 항체를 처리하지 않은 군이다. 도 9에 나타난 바와 같이, 항-hMUC1 항체의 처리에 의하여, 대조군 IgG 처리와 비교하여, T47D 및 ZR75-1 세포의 증식이 현저하게 지연됨이 확인되었다. 대조적으로, 항-hMUC1 항체는 MDA-MB-231 세포의 증식을 변화시키지 않았다. 이러한 결과는, 항-hMUC1 단일클론 항체는 MUC1을 발현하는 암세포에 선택적으로 항암효과를 나타냄을 의미한다.
- [327]
- [328] 실시예 22: 유방암 및 췌장암에 주입된 항-hMUC1 단일클론 항체의 생체 내

위치화 확인

- [329] 생체 내 항-hMUC1 단일클론 항체의 효과를 입증하기 위해, T47D, ZR75-1, 또는 Capan-2 종양을 갖는 BALB/C nu/nu 마우스에 DyLight 755-표지된 정상 IgG(5 mg/kg) 또는 DyLight 755-표지 항-hMUC1 단일클론 항체(5 mg/kg)를 정맥투여하고 전신 형광 이미징을 수행하였다(실시예 13). 표지된 항체의 분포는 0, 24 및 48 시간에서 형광의 총 flux(photon/sec)를 측정함으로써 정량화하였다.
- [330] 상기 얻어진 결과를 도 10a 내지 10h(유방암), 및 11a 내지 11c(췌장암)에 나타내었다.
- [331] 도 10a 내지 10d는 유방암 세포인 T47D 세포가 피하주입되어 종양이 유도된 마우스에서의 결과이고, 도 10e 내지 10h는 유방암 세포인 ZR75-1 세포가 피하주입되어 종양이 유도된 마우스에서의 결과를 나타낸다. 도 10b 및 10f에서, 해부 마우스의 이미징은 실시간 IVIS 이미징 시스템 200을 사용하여 수행하였다. 도 10c 및 10g의 경우, 여러 기관과 종양을 분리하여 항체 분포한 결과를 보여준다. 도 10d 및 10h는 종양 절편을 핵에 대해 DAPI로 염색하고 공초점 현미경으로 평가한 결과를 보여준다(scale bar: 10 μ m).
- [332] 도 10a, 10b, 10e, 10f, 11a, 및 11b의 결과로부터, 상기 항-hMUC1 항체가 종양 영역에 특이적으로 국한되어 위치함을 알 수 있다. 또한, 도 10c 및 10g의 결과로부터, 종양 및 기타 장기가 분리되었을 때, 항-hMUC1 항체는 다른 중요한 기관에 영향을 미치지 않고 종양 조직에만 위치함이 확인되었다.
- [333] 또한 상기 결과로부터 DyLight로 표지된 항-hMUC1 단일클론 항체는 종양 절편에서 뚜렷한 염색 결과를 나타내는 반면, DyLight로 표지된 정상 IgG는 이러한 효과를 나타내지 않음을 확인할 수 있다. 또한, 도 10d, 10h 및 11c의 공초점 영상에 의하여, 항-hMUC1 단일클론 항체의 종양 특이적 세포 내 위치화가 추가로 확인되었다.
- [334] 상기 결과는 항-hMUC1 단일클론 항체가 동물 모델에서 유방암과 췌장암을 특이 적으로 표적화하는데 사용될 수 있음을 시사한다.
- [335]
- [336] 실시예 23: 항-hMUC1 단일클론 항체의 이종이식 마우스 모델에서의 항암 효과 시험
- [337] 이종이식 마우스 모델을 사용하여 in vivo에서 췌장암 세포의 성장에 대한 MUC1 표적 단일클론 항체의 효과를 시험하였다. 첫째로 우리는 Capan-2 세포를 이용하여 nors 마우스(n = 8)를 등쪽 오른쪽 옆구리에 피하 주사하여 종양 성장을 허용했다. 종양 크기가 75mm³에 도달하면, 항-hMUC1 단일클론 항체를 일주일에 두 번 정맥내 투여하고, 11주동안 종양 크기를 모니터링하였다. 상기 이종이식 마우스 모델의 준비 및 종양 크기 시험은 실시예 14에 따라 수행하였다.
- [338] 이종 이식 마우스 모델 실험 동안, PBS 투여 그룹에서 8 마리의 마우스 중 2 마리가 죽었고, 8 마리의 마우스 중 하나가 항-hMUC1 단일클론 항체 투여 그룹에서 사망하였다.

[339] 상기 이종이식 마우스 모델로부터 적출된 종양 조직의 모습을 도 12a에 나타내고, 종양의 크기((넓이*길이)/2), 무게, 및 마우스의 체중을 각각 도 12b, 12c, 및 12d에 각각 나타내었다. 도 12a 내지 12d에 나타난 바와 같이, 항-hMUC1 단일클론 항체 투여에 의하여 췌장 종양의 진행이 약화됨과, 상기 항체 치료가 시험체의 체중에 불리한 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있다.

[340]

[341] 실시예 24: 인간 유방암 및 췌장암 조직에서의 MUC1 단백질의 발현 시험

[342] 면역염색에 의하여 유방암 및 췌장암 조직에서의 MUC1 단백질의 발현 여부를 조사하였다. 정상 조직을 대조군으로 하여 유방암 조직 및 췌장암 조직을 시험하였다. 그 결과를 도 13(유방암) 및 도 14(췌장암)에 나타내었다. 도 13 및 도 14로부터, 대부분의 유방암 조직 및 췌장암 조직에서 MUC1이 발현하는 반면, 정상 유방 조직에서는 MUC1이 발현하지 않는 것을 확인하였다.

[343] 유방암 조직 및 췌장암조직에서의 MUC1 발현을 확인한 면역조직화학 분석 결과를 표 4(유방암 조직) 및 표 5(췌장암 조직)에 각각 나타내었다.

[344]

[345] [표4]

Breast cancer tissue sections (AccuMax Array)	n	MUC1 positive (%)	Number (%) of cases expressing MUC1				
			>75 %	50-74 %	11-49 %	<10 %	Negative (%)
A312 (II)	21	16(76.2%)	5(23.8%)	5(23.8%)	6(28.6%)	4(19%)	1(4.8%)
A202 (VIII)	30	13(43.3%)	4(13.3%)	2(6.7%)	7(23.3%)	12(40%)	5(16.7%)
total	51	29(56.9%)	9(17.6%)	7(13.7%)	13(25.5%)	16(31.4)	6(11.8%)

[346]

[347] [표5]

Pancreas cancer tissue sections (AccuMax Array)	n	MUC1 positive (%)	Number (%) of cases expressing MUC1				
			>75 %	74-50 %	49-11 %	<10 %	Negative (%)
A207 (IV)	33	60.6	1(3.0)	3(9.1)	16(48.5)	10(30.3)	3(9.1)

[348]

[349] 표 4에 나타난 바와 같이, 51개 유방암 시료를 분석한 결과, 전체 시료 중 18 %가 종양 세포의 75 % 이상에서 MUC1 양성 반응을 보였다. 암세포 시료의 14 %와 25 %는 종양 세포의 50-74 %와 11-49 %에서 MUC1 발현이 양성이었다.

그러나 유방암 표본의 12 %는 MUC1의 발현을 보이지 않았다.

[350] 또한, 표 5에 나타난 바와 같이, 33 개의 채장암 표본의 경우, 3 %의 시료가 종양 세포의 75 % 이상에서 MUC1 양성 반응을 보였다. 암 시료의 9.1 %와 48.5 %는 종양 세포의 50-74 %와 11-49 %에서 MUC1 발현에 양성이었다.

[351] 이러한 결과는 MUC1의 발현이 유방암 진단 및 치료 표적에 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다.

[352]

[353] 실시예 25: 항-hMUC1 마우스 항체(1H7) ADC의 세포독성(cytotoxicity) 확인

[354] Levena Biopharma(USA)에서 MMAE를 1H7 항체에 결합시켜 ADC를 제작하였다. 제작된 ADC의 항체 대비 MMAE의 비율(DAR)은 5.80이었다. 1H7-ADC의 세포독성 확인을 위하여, MDA-MB-231, T47D, ZR75-1 3종의 세포주를 사용하였다. 각 세포주는 96-웰 플레이트에서 배양하였으며, 배양 시작 24시간 뒤, 도 15와 같이 설정된 농도의 1H7-ADC를 처리하였다. 1H7-ADC 처리 후, 72시간 뒤, CCK-8 kit(Dojindo, USA)를 이용하여 세포 생존율을 비교하였다. CCK-8의 처리 방법은 제공된 매뉴얼에 따라 수행하였으며, 흡광값은 IX 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, USA)를 사용하여 측정하였다. 1H7-ADC를 처리한 T47D 및 ZR75-1 세포의 생존율은 1H7-ADC를 처리하지 않은 대조군 대비 현저히 낮아짐을 확인하였다. 대조적으로, 1H7-ADC를 처리한 MDA-MB-231 세포의 생존은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는, 1H7-ADC는 MUC1이 발현되는 암세포에 선택적으로 항암효과를 나타냄을 의미한다.

[355]

[356] 실시예 26: 환자 유래 유방암 조직에서의 항-hMUC1 단일클론 항체(1H7)-ADC의 암 증식 억제 효과

[357] 상기 실시예 25에서 언급된 1H7-ADC의 암 증식 억제 효과를 동물모델에서 확인하고자 하였다. 중아바이오(서울, 한국)에서 구입한 MUC1이 과발현 되는 환자 유래 유방암 조직(TNBC)을 NRGa 마우스에 이식하였고, 마우스에 이식한 유방암 조직이 일정 크기 이상 자랐을 때(100-200mm³), 1H7-ADC를 혈관주사로 투여하였다. 도 16에서 나타난 바와 같이, 1H7-ADC를 투여하였던 마우스의 암 조직의 크기는 시간에 따라 감소하였으나, 1H7-ADC를 투여하지 않았던 대조군 마우스의 암 조직은 시간이 지남에 따라 비례적으로 사이즈가 커지는 것을 확인하였다. 상기 결과는 MUC1이 발현된 환자 유래의 암조직에서 1H7-ADC가 조직 수준에서 암세포의 성장을 억제하는 효과를 가짐을 의미한다.

[358]

[359] 실시예 27: 1H7을 바탕으로 한 인간화 항체의 제작

[360] ADC 제조를 통해 세포 독성 및 동물 모델에서의 항암 효과를 확인한 1H7 항체를 바탕으로 인간화 항체를 제작하였다. 인간화 항체는 오송 첨단의료산업 진흥재단의 신약개발지원 센터(오송, 한국)와 퓨전 안티바디스(Fusion antibodies,

영국)에 의뢰하여 제작하였다. 1H7 항체의 항원 인식 부위를 동일시 하고, 항원 인식 부위를 제외한 가변 부위 서열에 변화를 주어 Heavy chain 서열 6종, light chain 서열 6종을 제작하였다. 각각의 아미노산 서열은 표 6에 나타내었다.

[361]

[362] [표6]

항체	아미노산 서열	서열번호
G3	중쇄 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMHWVQQAPGKGLEWIGYINP	24
	가변 GTGYIEYNQKFKDRVTITADKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCASSTAPFDYW	
	영역 GGGTLTVSS	
	경쇄 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCKASQDIKSYLSWYQQKPGQAPRLLIYYATR	25
	가변 LADGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCLQYDESPYTFGGGTKLEI	
	영역 KR	

[363]

[364] 실시예 28: 인간화 항체와 hMUC1-C의 결합 친화도(Binding affinity) 측정

[365] 상기 실시예 27에서 제작된 항-hMUC1-C 인간화 항체와 hMUC1-C 단백질의 결합에 관한 친화도 측정은 ELISA 방법을 통해 측정하였다. ELISA를 통한 친화도 분석은 제작된 항-hMUC1-C 인간화 항체를 동일농도로 96-웰 면역 플레이트에 코팅하고, super block 용액으로 차단시켰다. 이 후, MBP-hMUC1-C 단백질을 희석하여 항-hMUC1-C 인간화 항체가 코팅된 면역 플레이트에 넣고, 37°C incubator에서 정치하여 결합시켰다. 플레이트를 세척 용액으로 3회 세척하고, HRP가 접합된 항-MBP 항체와 함께 반응시켰다. TMB 기질 용액을 사용하여 반응을 전개시키고, 2N HCl을 사용하여 반응을 종료시켰다. 이후, 항원-항체 결합 반응에 의해 나타난 흡광값은 I3X 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, USA) 기를 통해 측정하여, 비색분석(colorimetric assay)을 수행하였다. 도 17은 코팅된 인간화 항체에 따른 MBP-hMUC1-C에 대한 결합 친화도 차이를 나타낸다.

[366]

[367] 실시예 29: 항-hMUC1-C 인간화 항체와 항-hMUC1-C 마우스 항체(1H7)의 에피토프 동질성 확인

[368] 제작된 항-hMUC1-C 인간화 항체와 항-hMUC1-C 마우스 항체의 에피토프 동질성 확인은 경쟁적 ELISA(Competitive ELISA)를 통해 확인하였다. MBP-hMUC1-C 단백질을 희석하여 다양한 농도로 96-웰 면역 플레이트에 코팅하였다. 이 후, 바이오틴이 표지 된 50nM 항-hMUC1-C 인간화 항체와 항-hMUC1-C 마우스 항체를 5uM부터 연속적 희석하여 동시에 MBP-hMUC1-C 단백질이 코팅된 플레이트에 넣고 정치 상태에서 반응시켰다. HRP가 표지 된 스트렙타비딘을 일정농도로 처리하여 항-hMUC1-C 인간화 항체에 표지 된

바이오틴을 감지하였다. 비색분석을 위해서 친화성 확인을 위해 사용된 TMB 기질 용액을 사용하였다. 반응에 의한 흡광값은 I3X 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, USA) 기를 통해 측정하여 분석하였다. 도 18에 그 결과를 나타내었으며, 바이오틴이 표지 되지 않은 항-hMUC1-C 마우스 항체의 농도 증가에 따른 흡광값의 감소는 항-hMUC1-C 인간화 항체와 항-hMUC1-C 마우스 항체가 동일한 에피토프를 인지함을 나타낸다.

[369]

[370] 실시예 30: 항-hMUC1-C 인간화 항체의 hMUC1-C에 대한 세포 결합 양상 분석(FACS analysis)

[371] hMUC1의 발현이 알려진 세포주에서의 항-hMUC1 인간화 항체의 hMUC1-C에 대한 세포 결합 양상을 분석하고자 FACS 분석을 수행하였다. 각 세포주들은 배양배지에서 배양 후, 일정 수의 세포를 각 튜브로 나누어 준비하였다. 이후, 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 원심분리 후 FACS 분석 용액으로 1회 세척하였다. 준비된 세포주에 항-hMUC1 인간화 항체를 처리하였고, 4°C에서 배양을 통해 세포에 해당 인간화 항체가 결합하도록 처리하였다. 이후, FITC가 표지된 항-인간 IgG 항체를 처리하였고, FACS 분석은 BD FACS Canto(BD, USA)를 이용하여 실시하였다. 분석 결과는 도 19에 나타내었으며, 대조물질로써, 인간 IgG를 사용하여 비교하였다. hMUC1의 발현이 알려진 3종의 세포주에서는 항-hMUC1 인간화 항체와 hMUC1-C의 결합에 의해 형광값이 증가하였으며, hMUC1을 발현하지 않는 MDA-MB-231 세포주에서는 형광값의 변화가 없었다. 이는, 제작된 항-hMUC1 인간화 항체가 세포에서 발현된 hMUC1을 특이적으로 인지함을 나타낸다.

[372] hMUC1의 발현이 확인된 ZR75-1 세포주에서 항-hMUC1-C 인간화 항체(G3)와 항-hMUC1-C 마우스 항체(1H7)를 다양한 농도로 처리하여 항체의 농도 의존적으로 형광값이 증가하는 것을 FACS분석을 통해 확인하였다. 분석 결과는 도 20에 나타내었다.

[373]

[374] 실시예 31: 항-hMUC1 인간화 항체 ADC(G3-ADC)의 세포독성(cytotoxicity) 확인

[375] 실시예 31-1: 유방암 세포주에서의 세포독성 확인

[376] 알테오젠(대전, Korea)에서 MMAE를 항-hMUC1 인간화 항체에 결합시켜 ADC를 제작하였다. 제작된 ADC의 항체 대비 MMAE의 비율(DAR)은 4.8이었다. 제작된 ADC의 세포독성 확인을 위하여, MDA-MB-231(MUC1-, HER2-), T47D(MUC1+, HER2+), ZR75-1(MUC1+, HER2+) 3종의 세포주를 사용하였다. 각 세포주는 96-웰 플레이트에서 배양하였으며, 배양 시작 24시간 뒤, MUC1-ADC(G3-ADC) 와 대조군으로 이용된 Kadcyla(HER2-ADC)를 해당 농도로 처리하였다. ADC 처리 후, 72시간 뒤, CellTiterGlo kit(Promega, USA)를 이용하여 세포 생존율을 비교하였다. CellTiterGlo 처리 방법은 된 매뉴얼에 따라

수행하였으며, 발광값은 I3X 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, USA)를 사용하여 측정하였다. G3-ADC를 처리한 T47D 및 ZR75-1 세포의 성장율은 G3-ADC를 처리하지 않은 대조군 대비 현저히 낮아짐을 확인하였다(도 21). 대조적으로, ADC를 처리한 MDA-MB-231 세포의 생존은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는, G3-ADC는 MUC1이 발현되는 암세포에 선택적으로 항암효과를 나타냄을 의미한다. 대조군으로 이용된 Kadcyla의 경우 G3-ADC 대비 낮은 세포 독성을 보였으나, 이는 Her2의 발현 수준이 실험된 세포에서 낮게 발현되기 때문이라고 보여진다.

[377]

[378] 실시예 31-2: 골수성 백혈병 세포주에서의 세포독성 확인

[379] 실시예 31-1에서 사용된 동일한 항-hMUC1 인간화 항체 ADC를 사용하여, 골수성 백혈병 세포주에서의 세포 독성을 확인하였다. 사용된 골수성 백혈병 세포주는, K562(MUC1+), KG-1(MUC1-) 2종을 사용하였다. 각 세포주는 96-웰 플레이트에서 배양하였으며, 배양 시작 24시간 뒤, 항-hMUC1 인간화 항체 ADC를 해당 농도로 처리하였다. 항-hMUC1 인간화 항체 ADC 처리 후, 72시간 뒤, MTT assay를 통해 세포 생존율을 비교하였다. 항-hMUC1 인간화 항체 ADC를 처리한 세포의 생존율은 처리하지 않은 대조군 대비 현저히 낮아짐을 확인하였다. 이는 도 22에 나타내었으며, 2종의 세포주 중 MUC1 발현이 확인된 K562 세포주에서만 세포 독성이 확인되었다.

[380]

[381] 실시예 32: 환자 유래 유방암 조직에서의 항-hMUC1-C 인간화 항체-ADC의 암 증식 억제 효과

[382] 상기 실시예 31에서 언급된 항-hMUC1-C 인간화 항체-약물 접합체의 암 증식 억제 효과를 동물모델에서 확인하였다. 중아바이오(서울, Korea)에서 구입한 MUC1이 과발현되어 있는 환자 유래 유방암 조직(TNBC)을 NRGa 마우스에 총 24마리에 이식하였고, 마우스에 이식한 유방암 조직이 일정 크기 이상 자랐을 때(100-200mm³), 무작위적으로 선택하여 4개 그룹(n=5)로 구분하였다. 각 그룹은 음성대조군, Kadcyla(5 mg/kg), 항-hMUC1-G3-ADC(5 mg/kg 및 10 mg/kg)로서, 1주일에 1회, 총 3회를 혈관주사로 투여하였다. 도 23에 나타난 바와 같이, 항-hMUC1-C 인간화 항체-약물접합체를 투여하였던 마우스의 암 조직의 크기는 감소하였으나, 항-hMUC1-C 인간화 항체-약물접합체를 투여하지 않았던 대조군 마우스의 암 조직 크기는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 상기 결과는 MUC1이 발현된 암 조직에 대하여 항-hMUC1-C 인간화 항체-약물접합체가 TNBC 유방암 조직의 성장을 저해하는 효과가 있음을 의미한다. 실험된 모든 동물 개체에서 통계적으로 유의한 몸무게 변화는 관찰되지 않았으며, 농도 의존적으로 암세포 성장을 효과적으로 억제함을 확인하였다. 통계적 분석은 Two-way ANOVA로 하였다.

[383]

- [384] 수탁번호
 [385] 기탁기관명: 한국세포주연구재단
 [386] 수탁번호: KCLRFBP00395
 [387] 수탁일자: 20170308
 [388]

산업상 이용가능성

- [389] 본 발명에 따르면, MUC1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MUC1에 대한 우수한 친화도 및 결합력을 나타내며, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 접합된 항체-약물 접합체는 MUC1 발현 세포에 특이적으로 결합함으로써 약물을 효과적이면서도 특이적 또는 선택적으로 전달할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 항-MUC1 항체 및 항체-약물 접합체는 MUC1 관련 질병, 예컨대, 암의 치료에 유용하게 적용될 수 있다.
- [390]
- [391] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 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.

[392]

서열목록 Free Text

- [393] 전자파일 첨부하였음.

[394]


한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)

03129, 서울시 종로구 대학로 103 서울대학교 의과대학 암연구소 7층

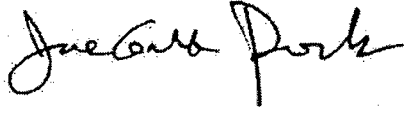
TEL : +82-2-3668-7915, FAX : +82-2-742-0021, <http://cellbank.snu.ac.kr>, kclb@kclb.krKorean Cell Line Bank; Korean Cell Line Research Foundation; International Microorganism Depository Authority approved by WIPO
Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 103 Daehak-ro, Chongno-gu, Seoul 110-799, KOREA

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약
국제 규격

7.1조에 따른 국제 규격의

원기탁 증명서

대한민국 대전, 유성구, 유성대로 1628 번길, 37-24 펩트론 귀하

I. 미생물의 동정	
기탁자로부터 받은 학명 정보: hMUC1-1H7	국제 기탁기관에 수여된 기탁번호: KCLRF-BP-00395
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치 상기 I 항에 표시된 미생물은 하기의 서류와 같이 제출되었음: ☐ 과학적 성질 ☐ 분류학상 위치 (적절한 위치에 ×표 하시오)	
III. 접수 및 수리 본 국제 수탁기관은 상기 I항목에 표시된 미생물을 2017년 3월 8일자로 접수하였음.	
IV. 국제 수탁 기관	
명칭: 한국세포주은행 (Korean Cell Line Research Foundation) 주소: 대한민국 110-744 서울 종로구 연건동 28 서울대학교 의과대학 암 연구소	국제 수탁기관의 대표자 서명:  2017년 3월 13일

BP/4 (KCLRF Form 17)

청구범위

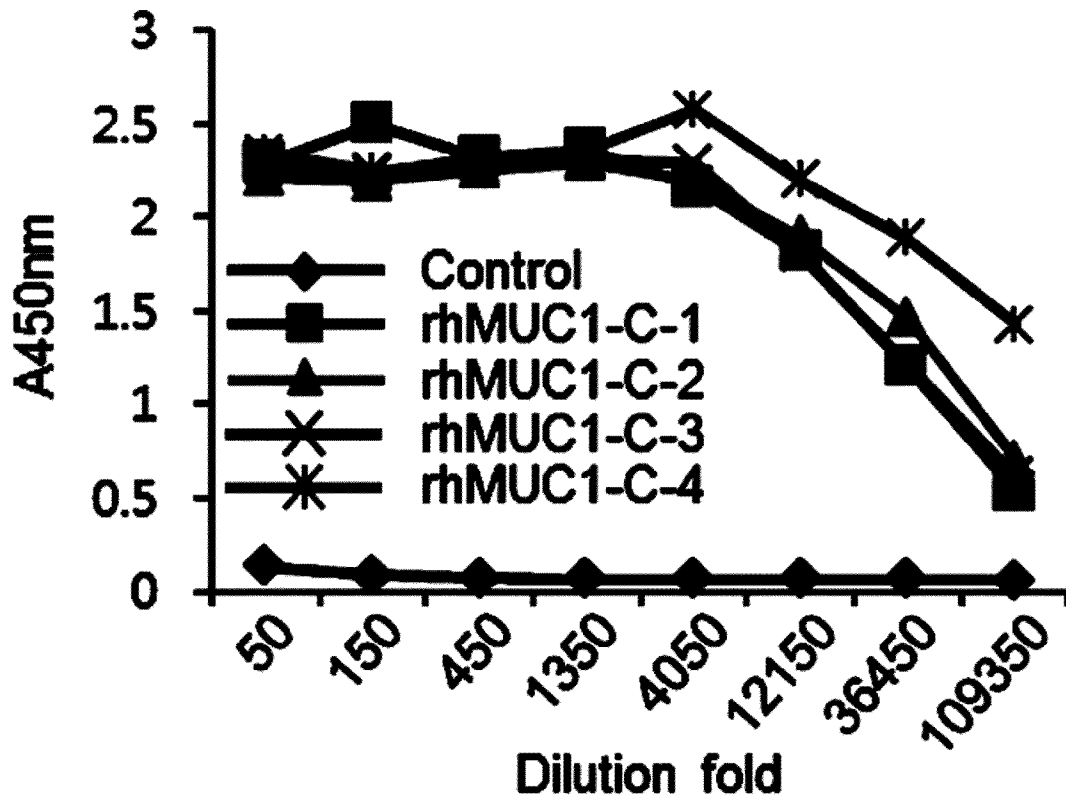
- [청구항 1] MUC1의 C-말단 세포외 도메인 내의 연속하는 5개 이상의 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드를 인식하는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 MUC1의 C-말단 세포외 도메인은 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
서열번호 1의 중쇄 CDR1; 서열번호 2의 중쇄 CDR2; 서열번호 3의 중쇄 CDR3; 및
서열번호 4의 경쇄 CDR1; 서열번호 5의 경쇄 CDR2; 서열번호 6의 경쇄 CDR3를 포함하는 것을 특징으로 하는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
서열번호 22 또는 24의 중쇄 가변영역 및 서열번호 23 또는 25의 경쇄 가변영역을 포함하는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
서열번호 22의 중쇄 가변영역 및 서열번호 23의 경쇄 가변영역; 또는
서열번호 24의 중쇄 가변영역 및 서열번호 25의 경쇄 가변영역을
포함하는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 6] 기탁번호 KCLRF-BP-00395인 항-MUC1 항체 생산을 위한 하이브리도마.
- [청구항 7] 제1항의 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 접합된 항체-약물 접합체.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 링커를 통하여 약물과 결합되는 것을 특징으로 하는 항체-약물 접합체.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 링커는 절단성 링커 또는 비절단성 링커인 것을 특징으로 하는 항체-약물 접합체.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 약물은 화학요법제, 독소, 마이크로 RNA(miRNA), siRNA, shRNA 또는 방사성 동위원소인 것을 특징으로 하는 항체-약물 접합체.
- [청구항 11] 제1항의 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이 항체(bispecific antibody).
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 이중특이 항체는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편과, 암 관련 항원 또는 면역관문 단백질 항원 또는 면역효능세포 특이적 표적분자에 대한 결합능을 가지는 항체로 이루어진 것을 특징으로 하는 이중특이 항체.
- [청구항 13] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합

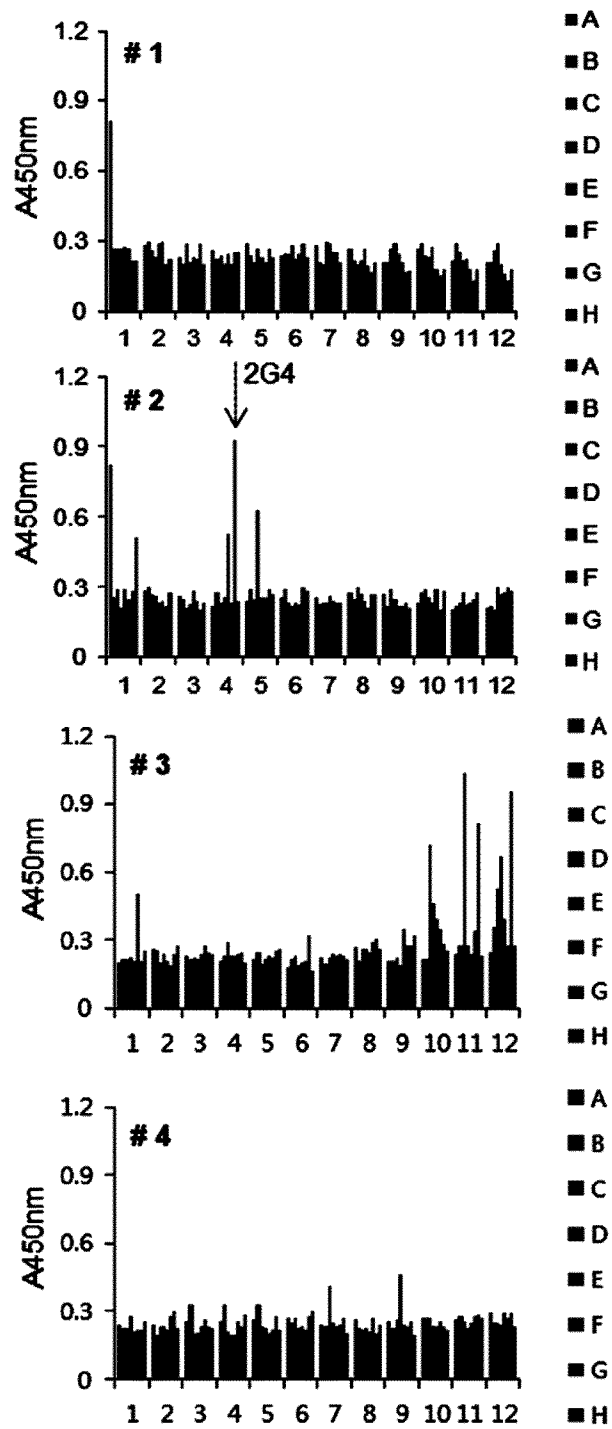
- 단편, 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체 또는 제11항 내지 제12항 중 어느 한 항의 이중특이 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 암은 MUC1 단백질이 발현된 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 암은 유방암, 췌장암, 전립선암, 폐암, 갑상선암, 위암, 난소암, 대장암, 간암, 담낭암, 신장암, 자궁경부암, 또는 방광암인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 16] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 진단용 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 암은 MUC1 단백질이 발현된 것을 특징으로 하는 암의 진단용 조성물.
- [청구항 18] 리포솜 내에 (1) MUC1의 C-말단 부위, MUC1의 SEA 도메인, 또는 MUC1의 C-말단 세포외 도메인 및 (2) CpG-DNA를 캡슐화한 복합체를 포함하는 면역원성 조성물.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 리포솜은 dioleoylphosphatidylethanolamine(DOPE) 및 cholesteryl hemisuccinate(CHEMS)가 1:0.5 내지 1:2의 몰비로 혼합된 혼합물인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.
- [청구항 20] 제18항에 있어서, 상기 CpG-DNA는 CpG 모티프를 1 내지 3개 포함하는 총 10 내지 20개의 뉴클레오티드를 포함하는 올리고데옥시뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.
- [청구항 21] 제18항 내지 제20항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 마우스에 접종하는 단계를 포함하는 항 MUC1-SEA 단일클론 항체의 제조 방법.
- [청구항 22] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산.
- [청구항 23] 제22항에 따른 핵산을 포함하는 제조법 발현 벡터.
- [청구항 24] 제23항에 따른 제조법 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포.
- [청구항 25] 제24항에 있어서, 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균 및 곤충세포로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 숙주세포.
- [청구항 26] 제25항에 있어서, 원숭이 신장 세포7(COS7: monkey kidney cells) 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포, 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.), 아스페르길러스 속(*Aspergillus* sp.), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스

속(*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurosporacrassa*)으로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 숙주세포.

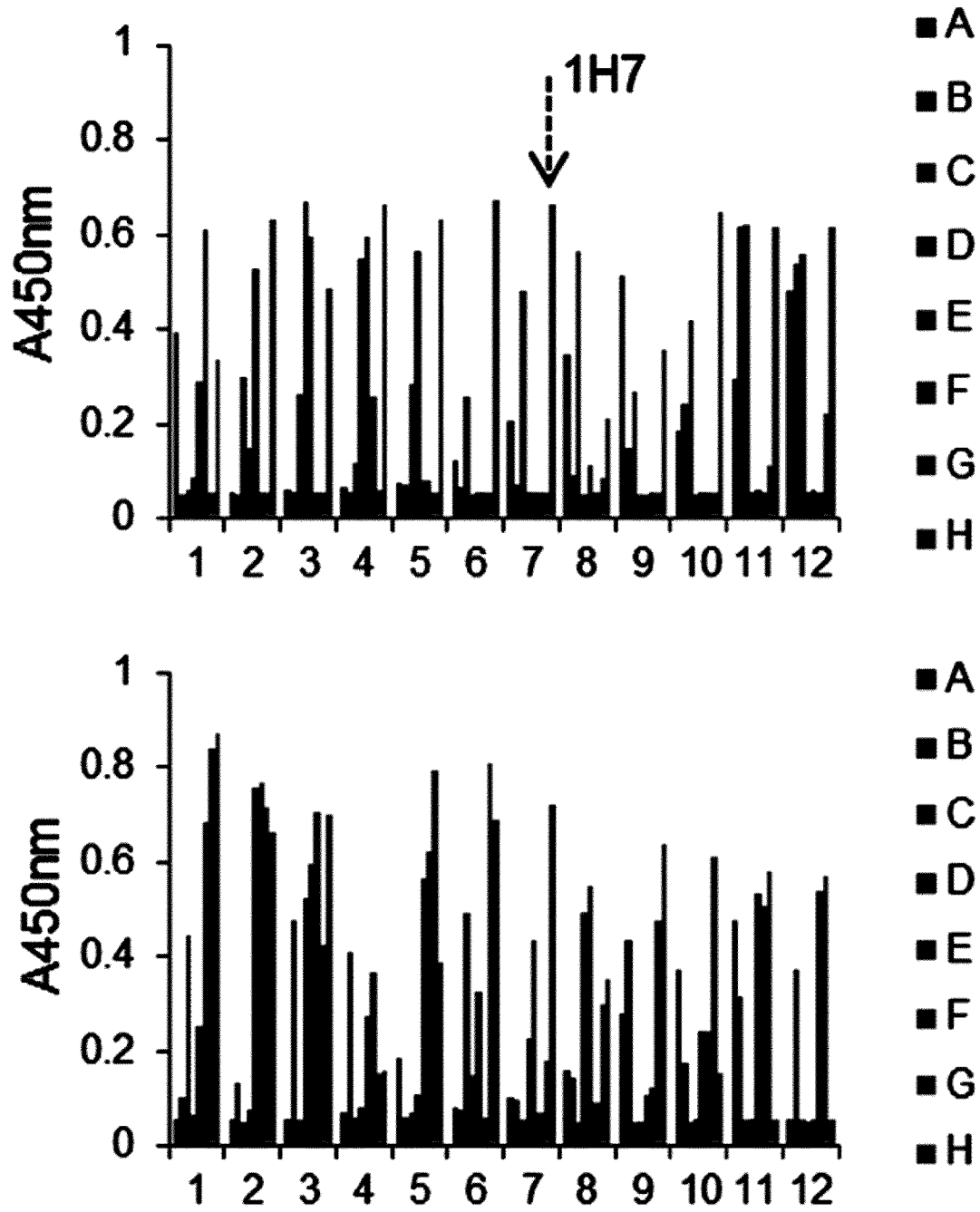
[청구항 27] 제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 항-MUC1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법.

[도 1a]

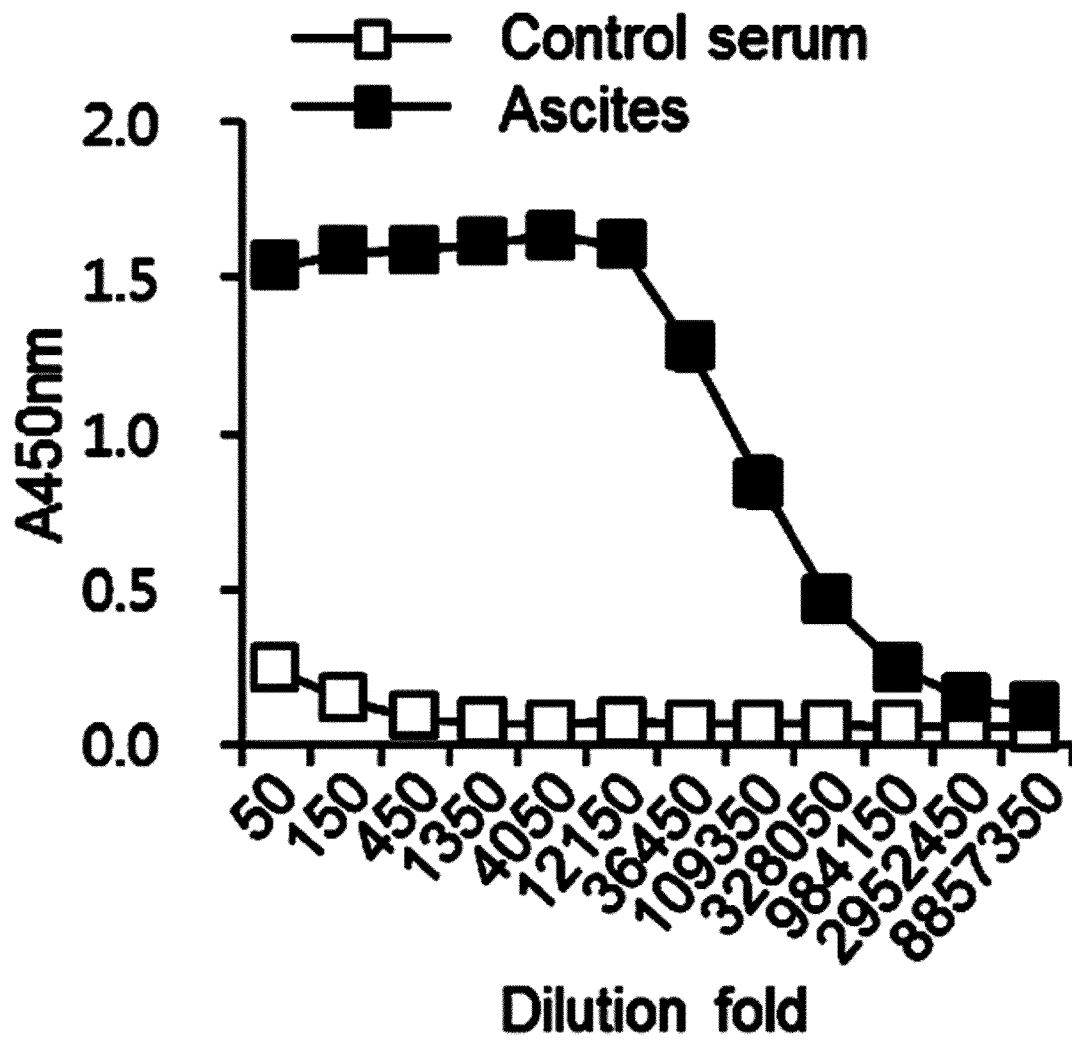




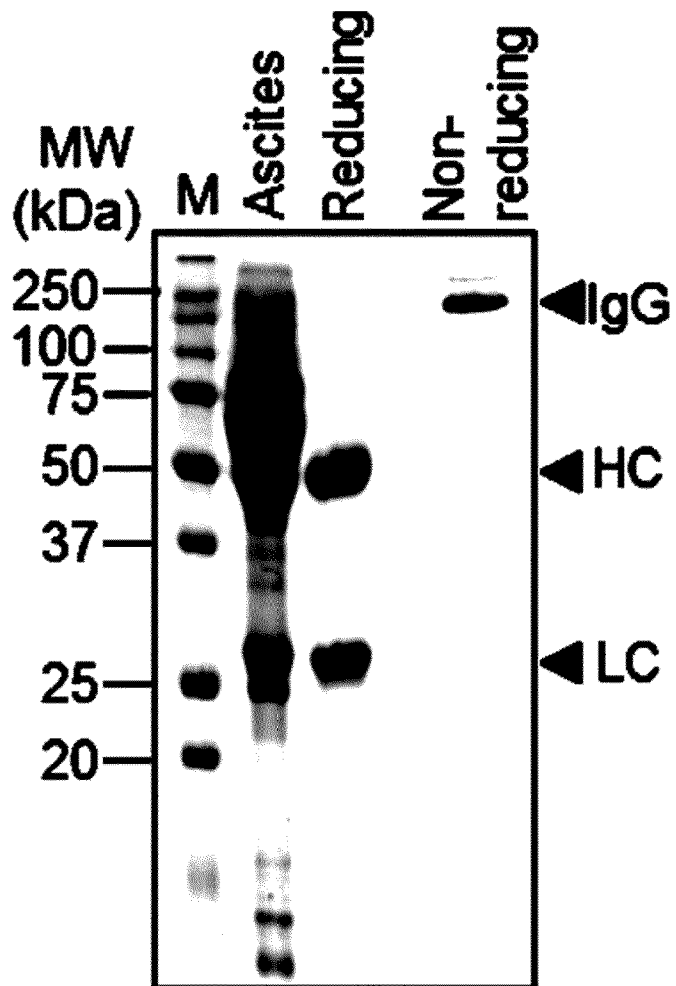
[도1c]



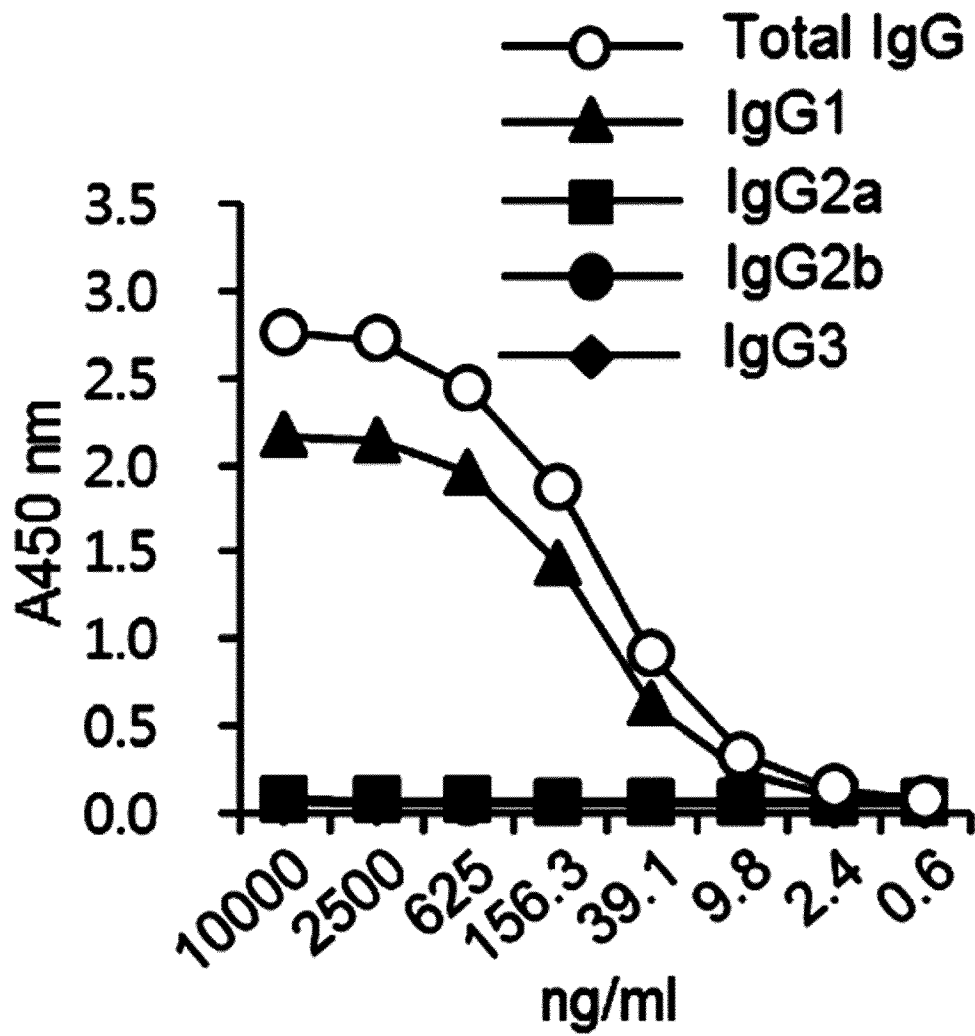
[도2a]



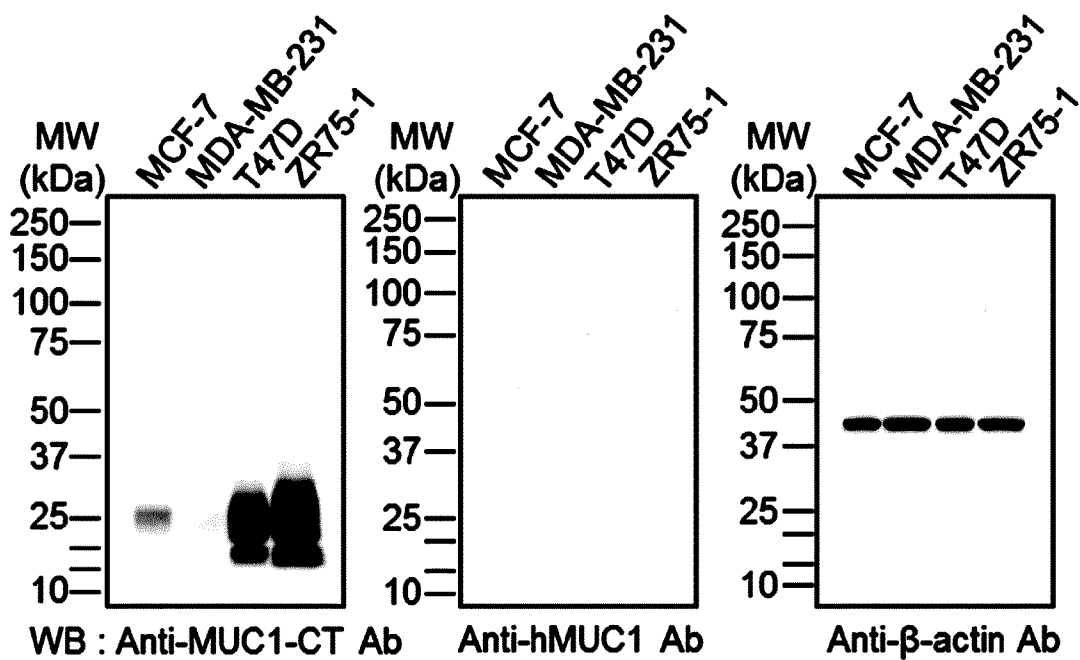
[도2b]



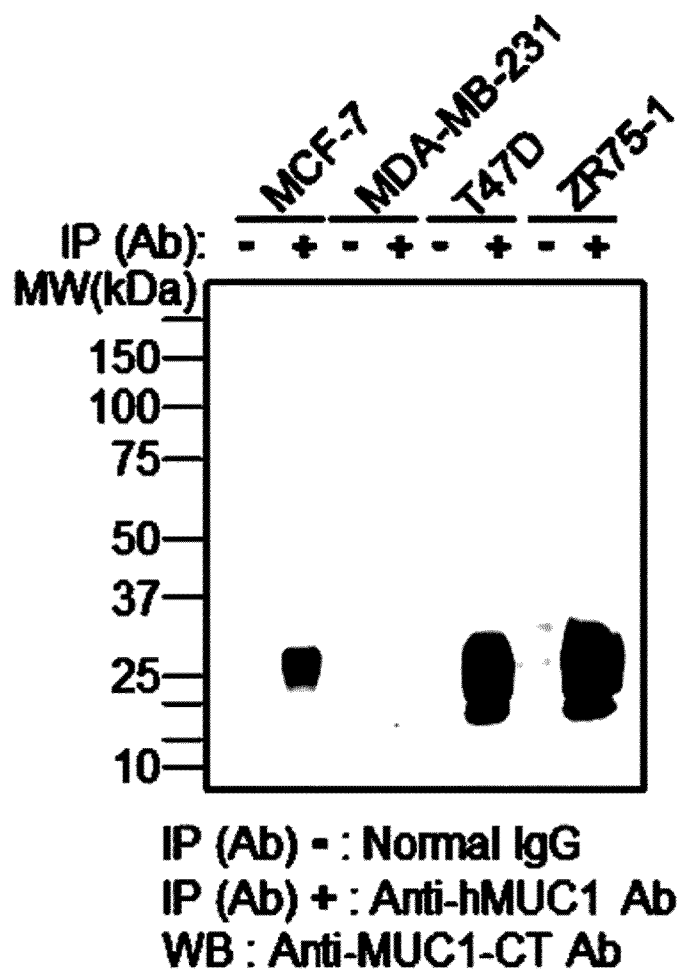
[도2c]



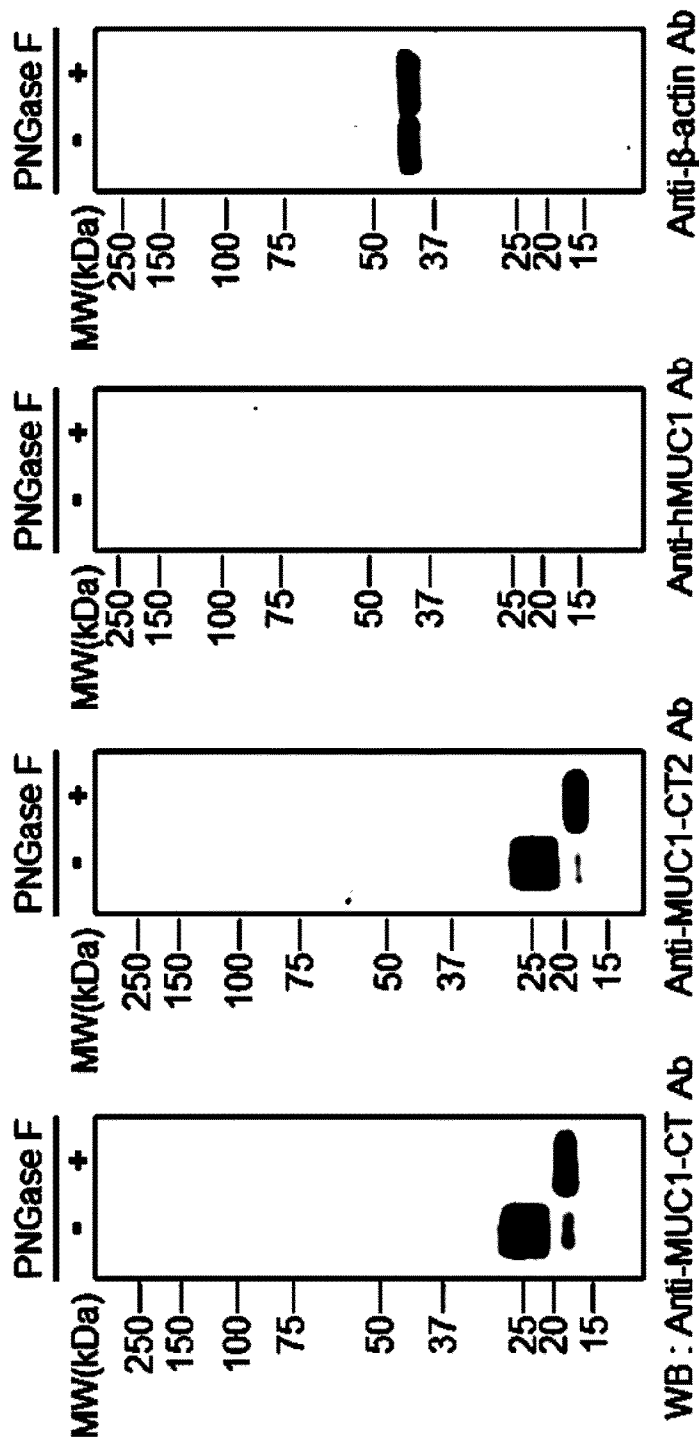
[도3a]



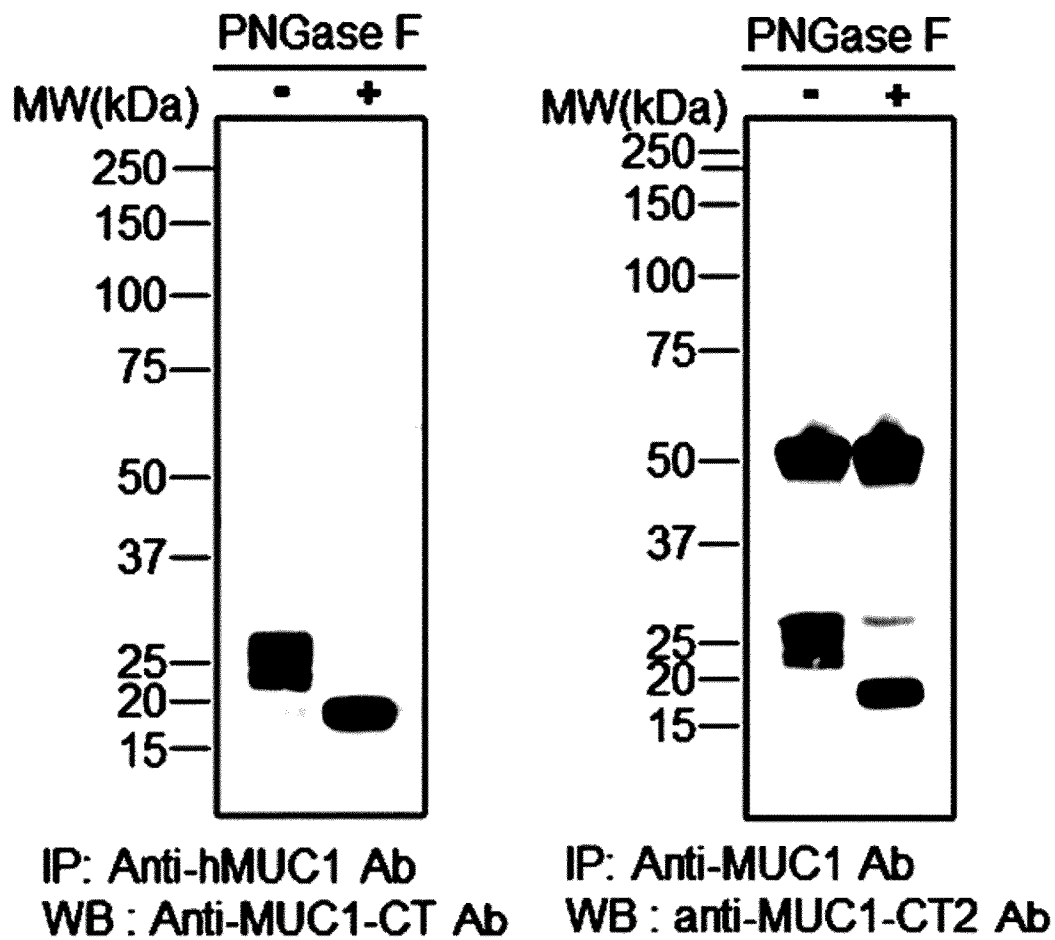
[도3b]



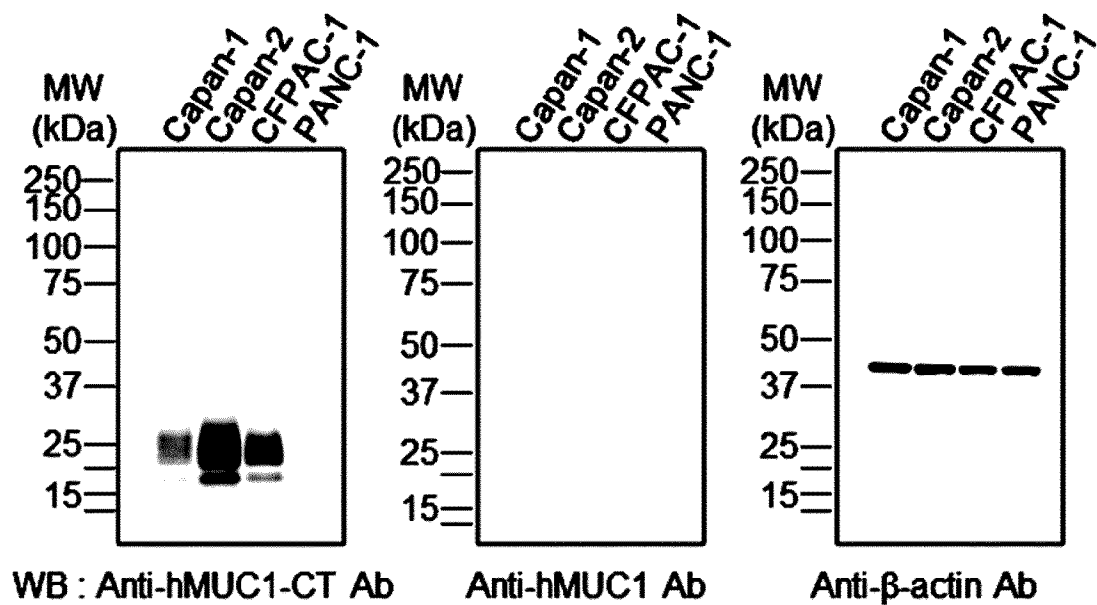
[도3c]



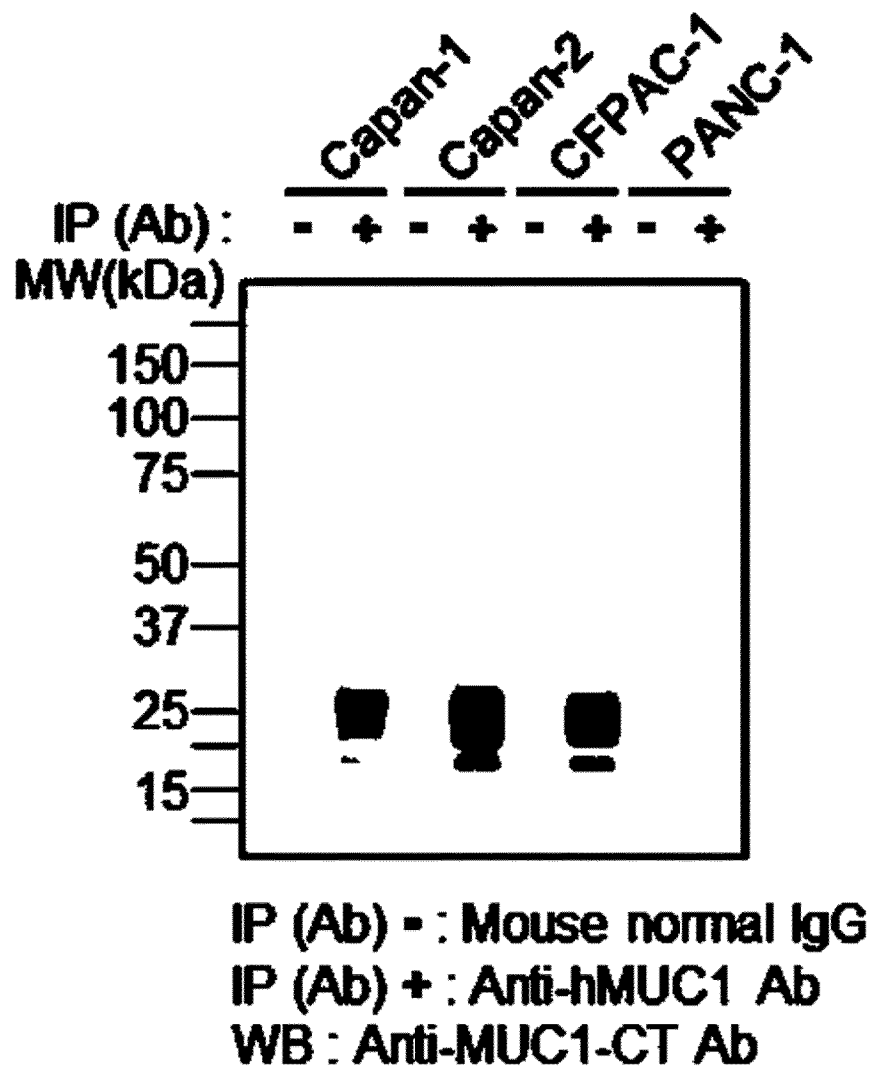
[도3d]



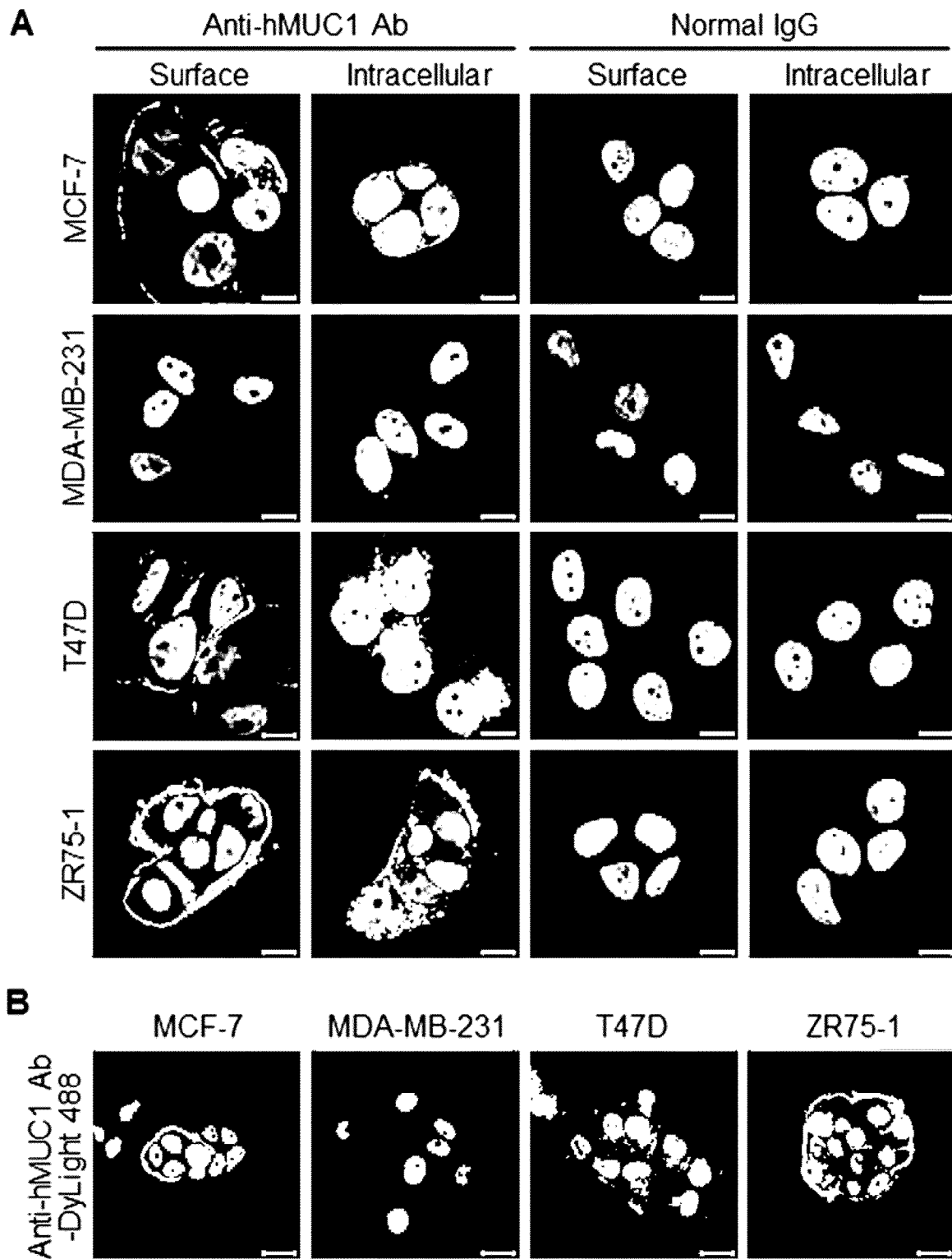
[도4a]



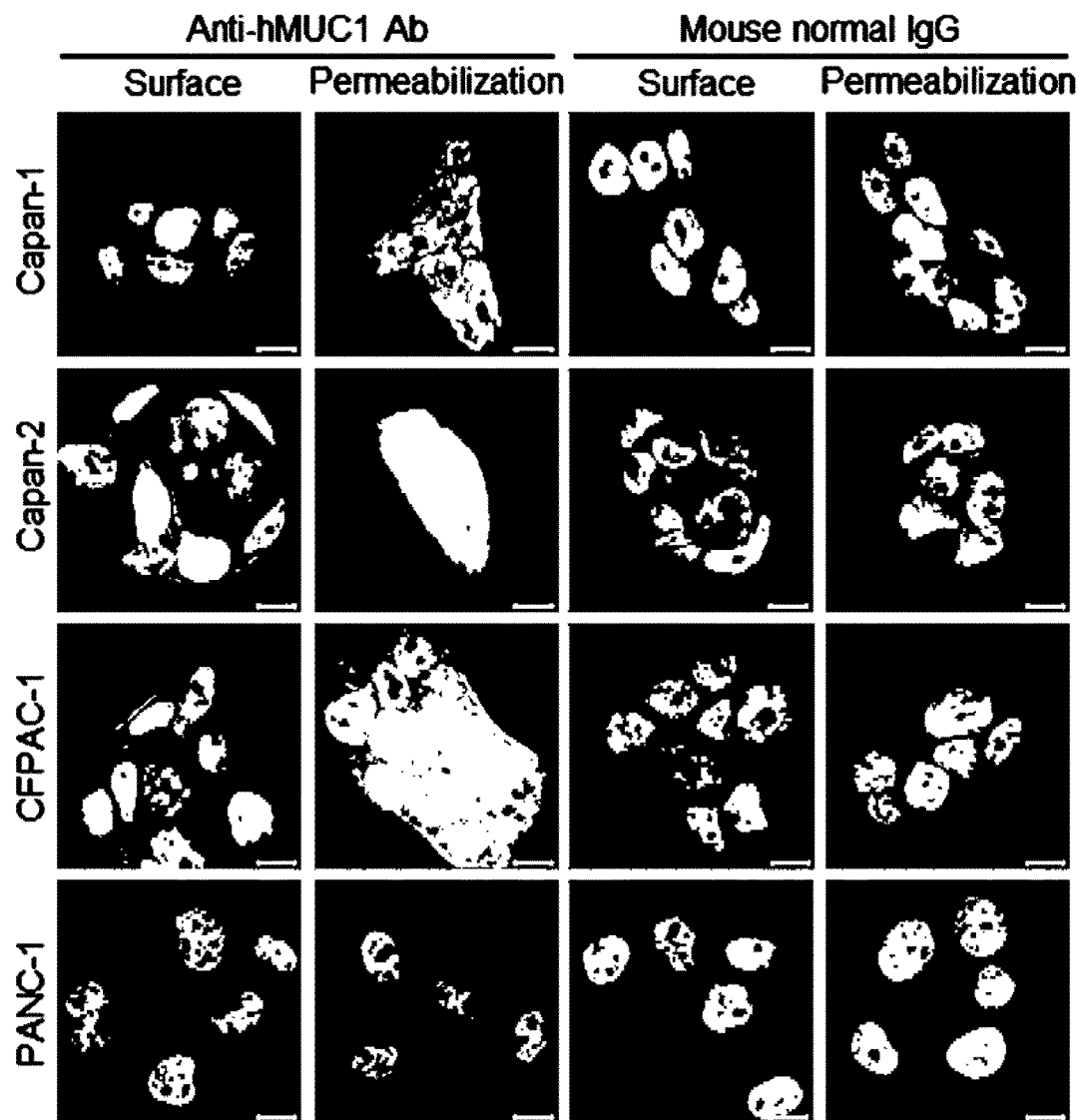
[도4b]



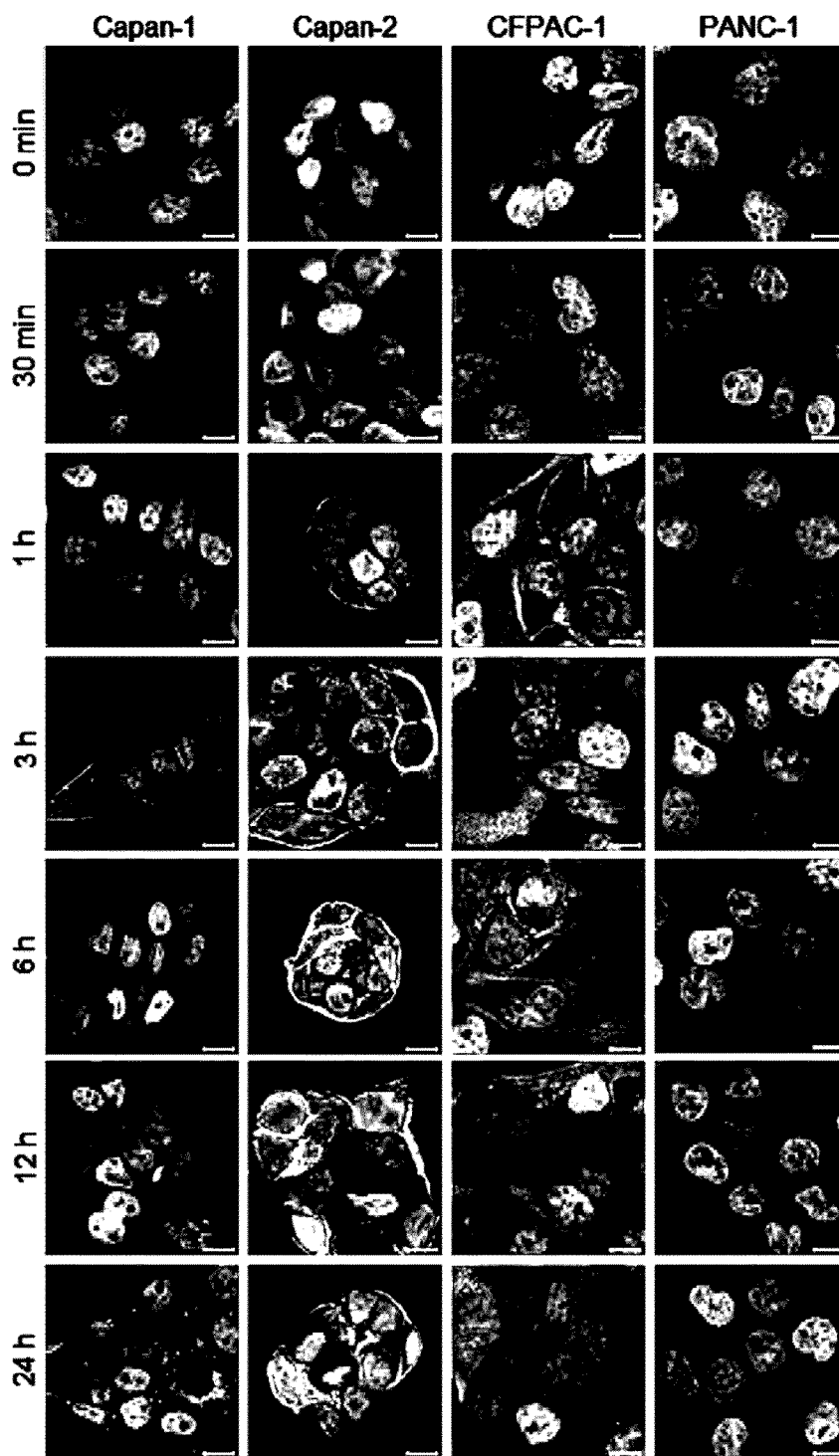
[도5]



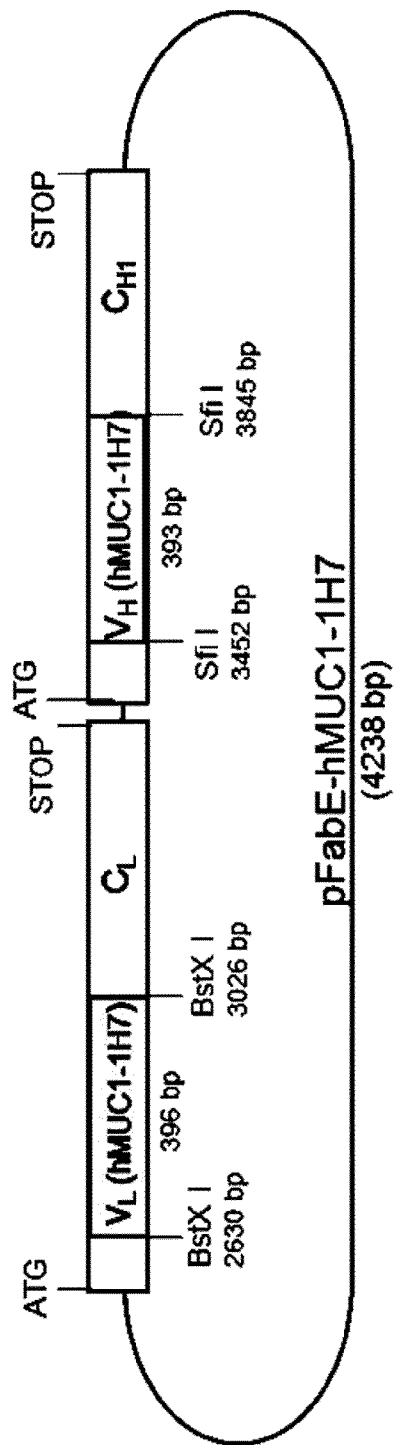
[도6]



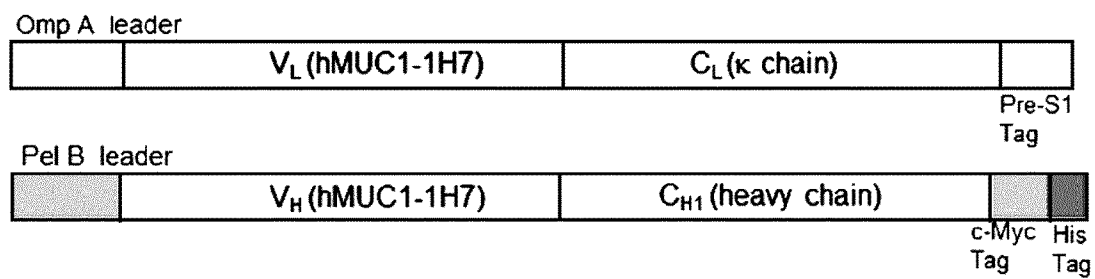
[도7]



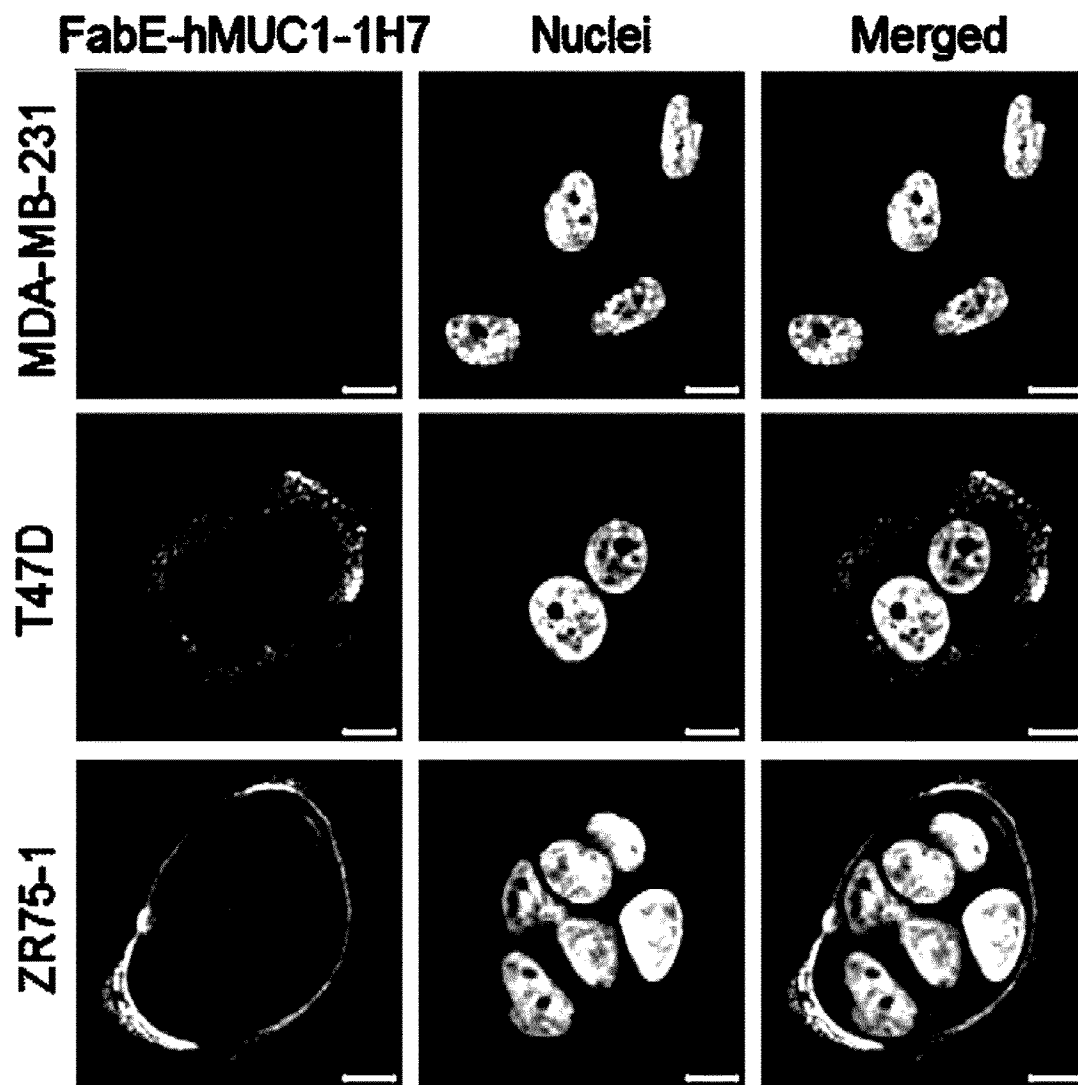
[도8a]



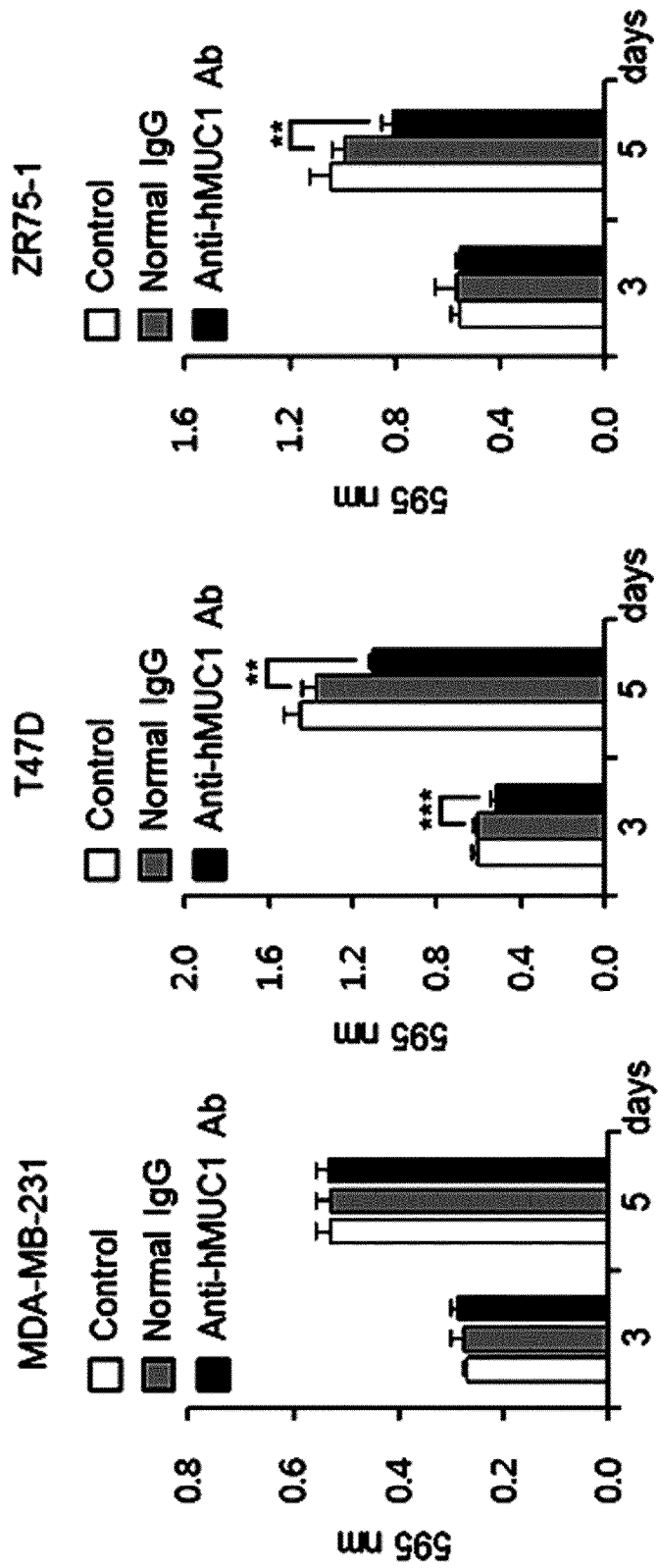
[도8b]



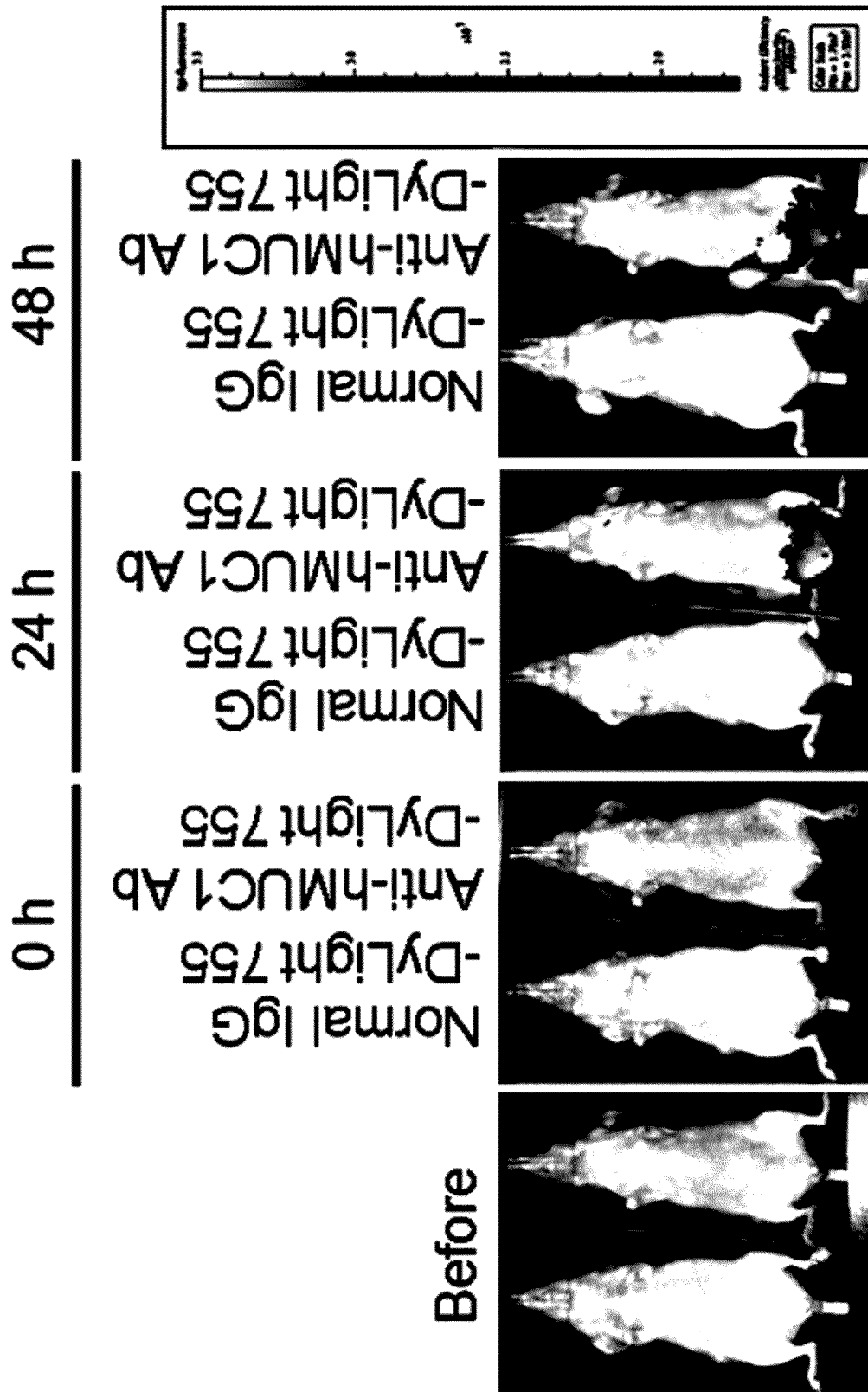
[도8c]



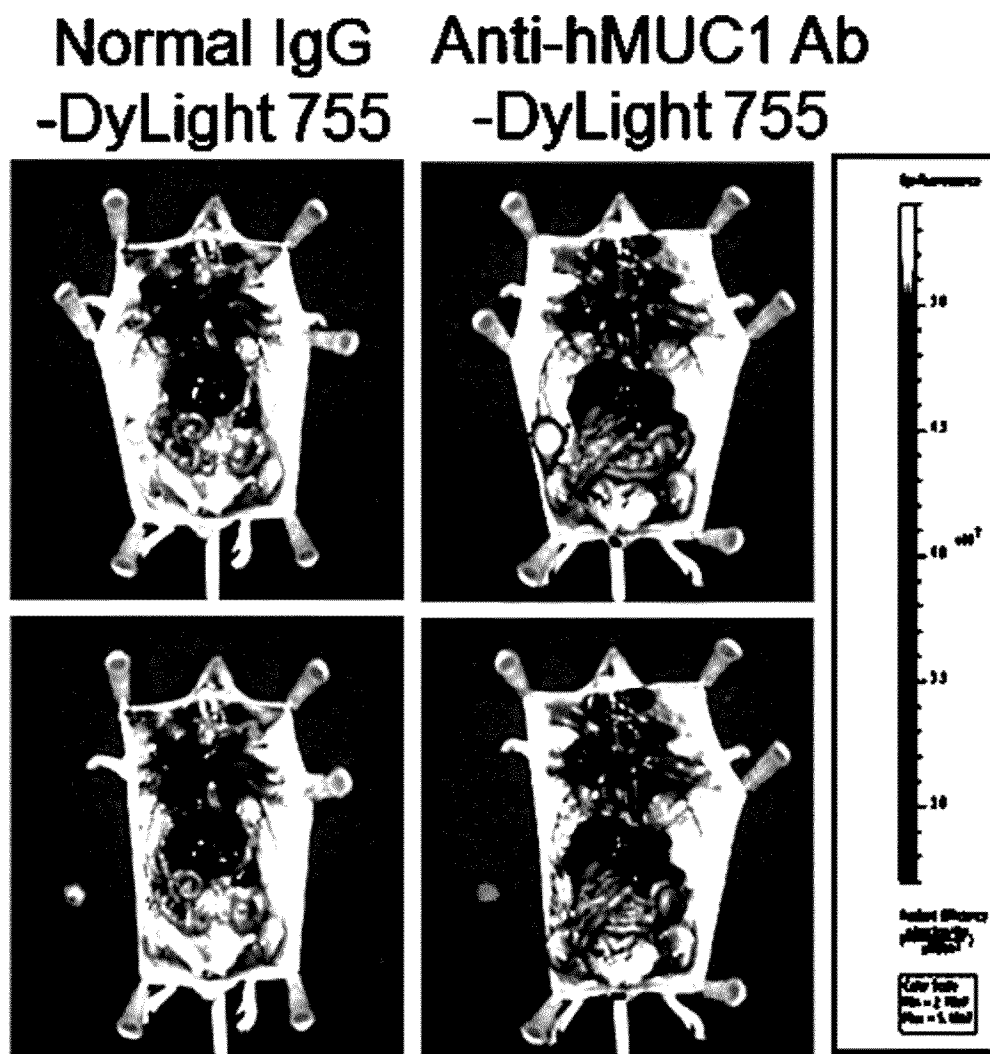
[도9]



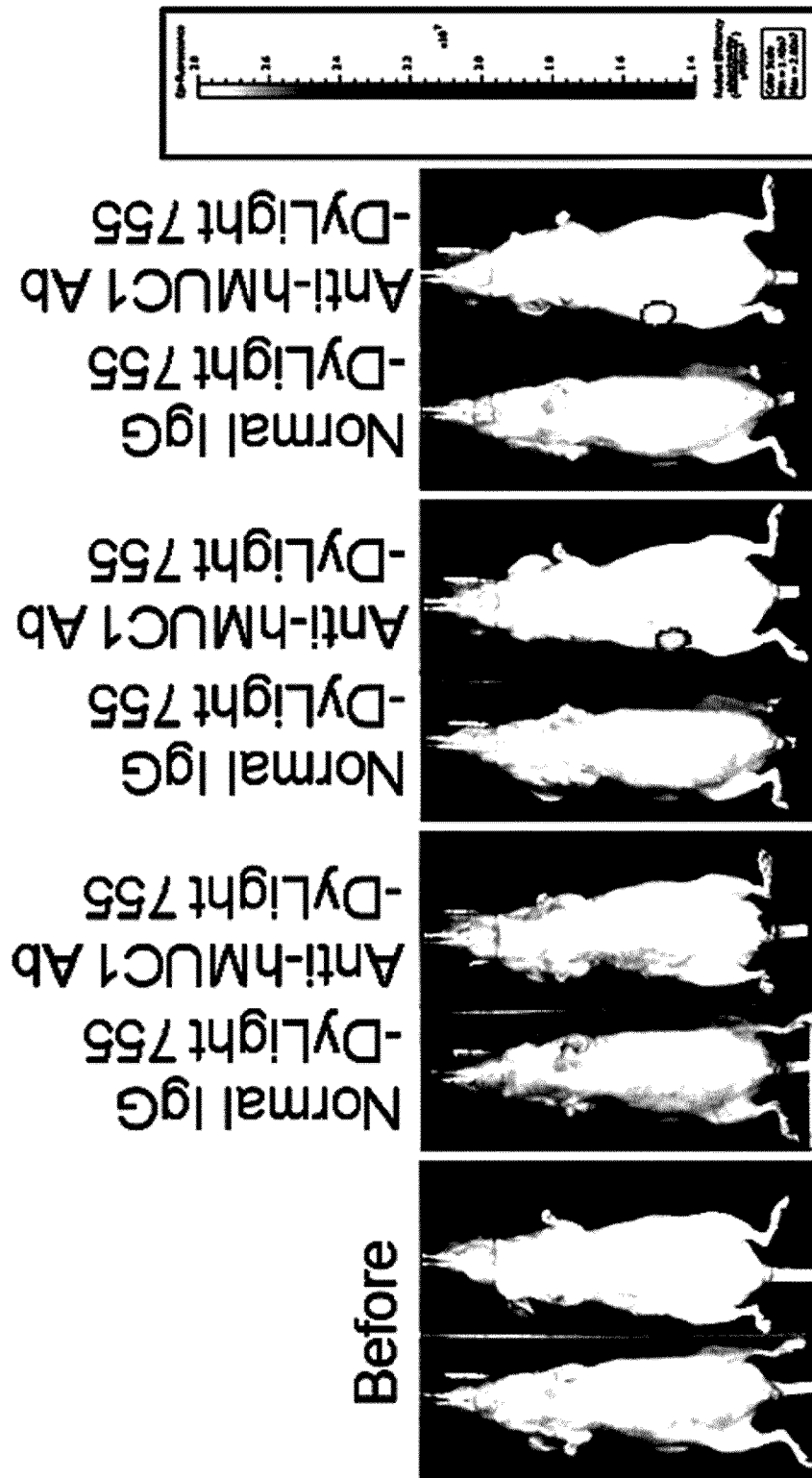
[도10a]



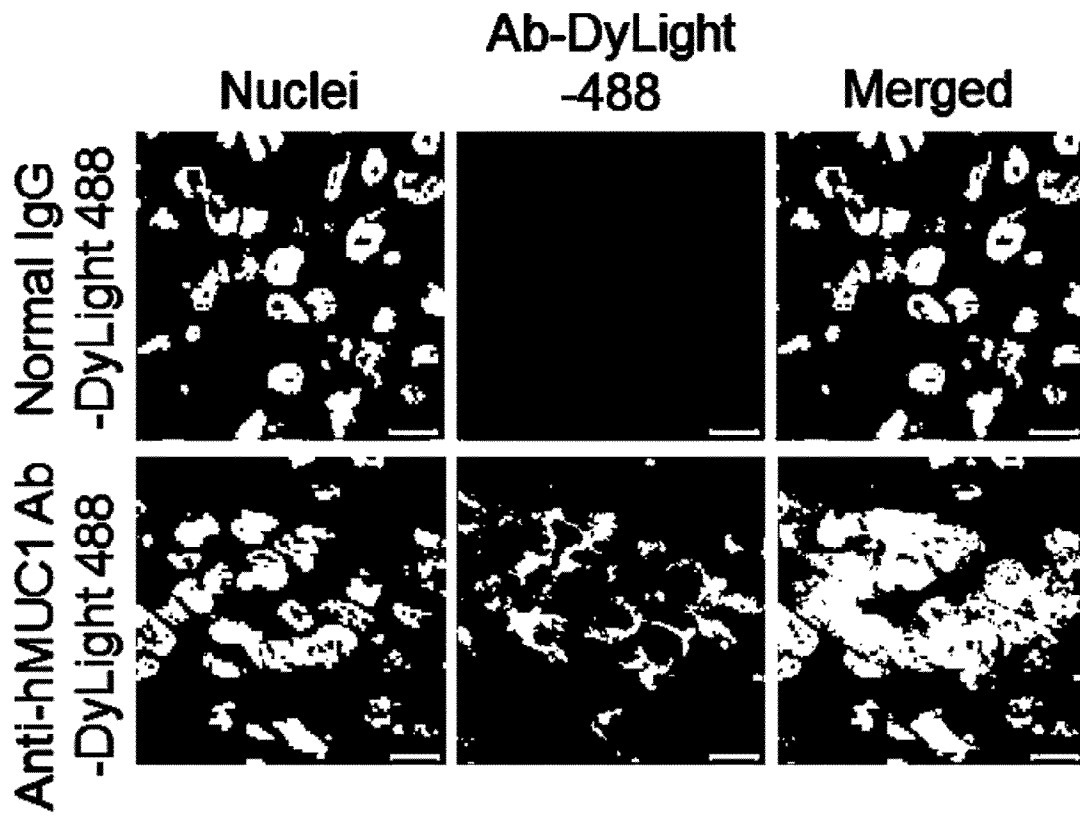
[도10b]



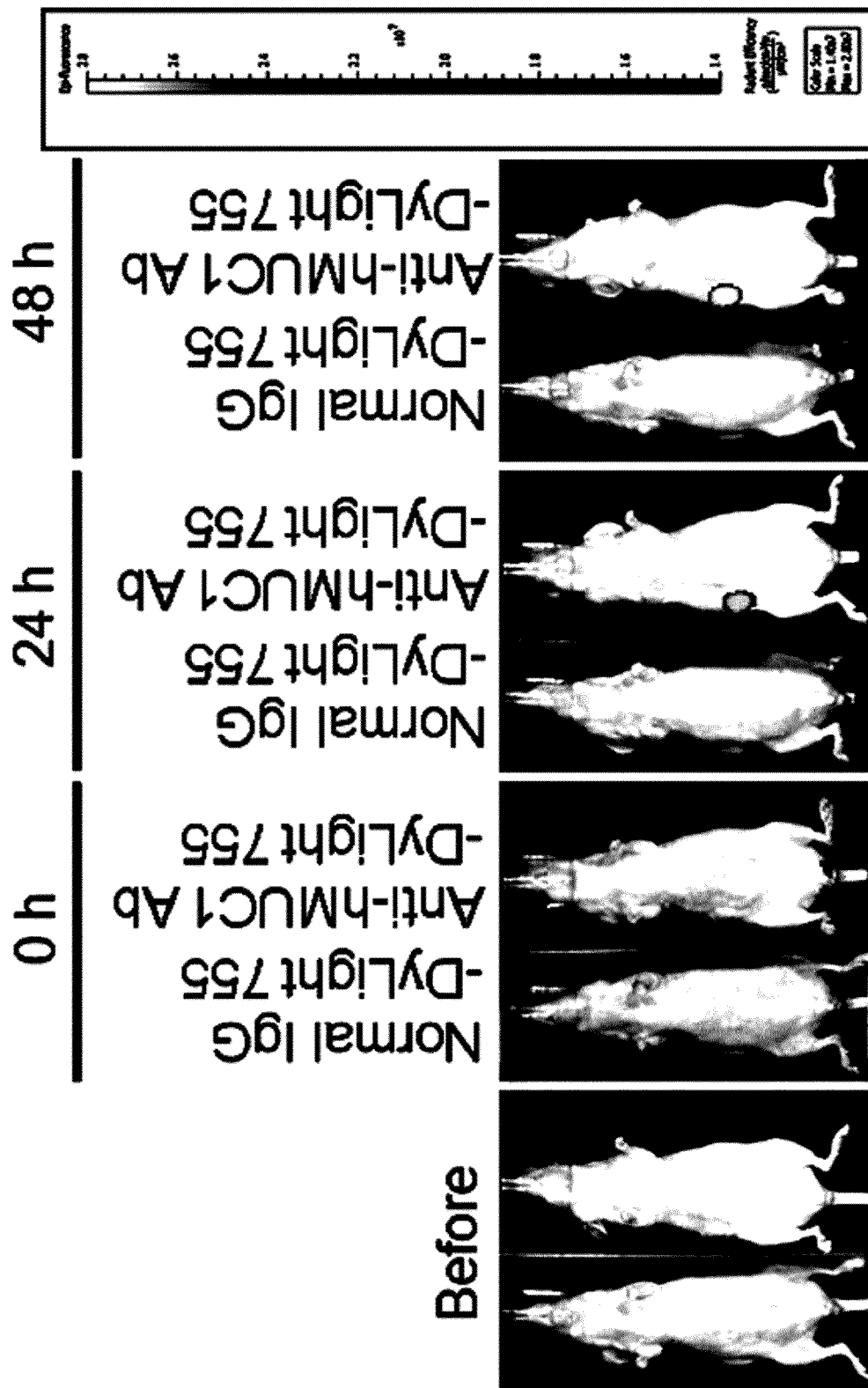
[도10c]



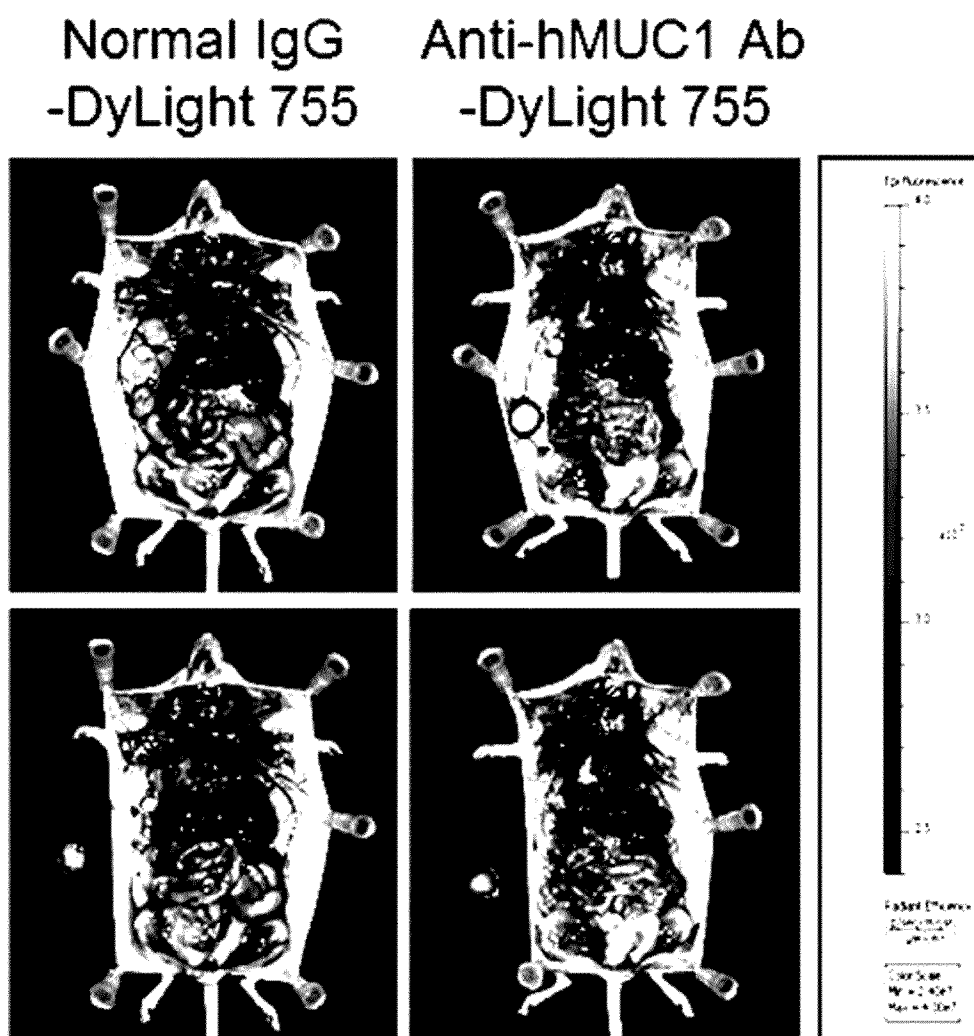
[도10d]



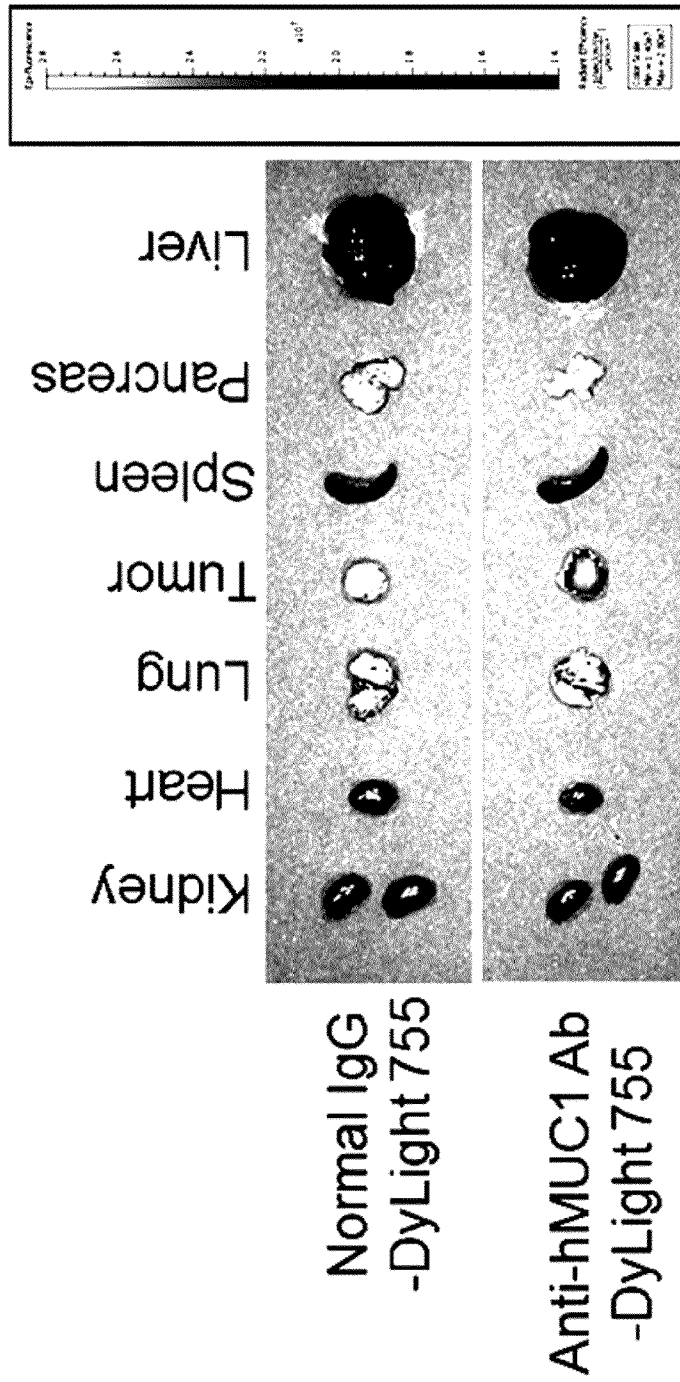
[도10e]



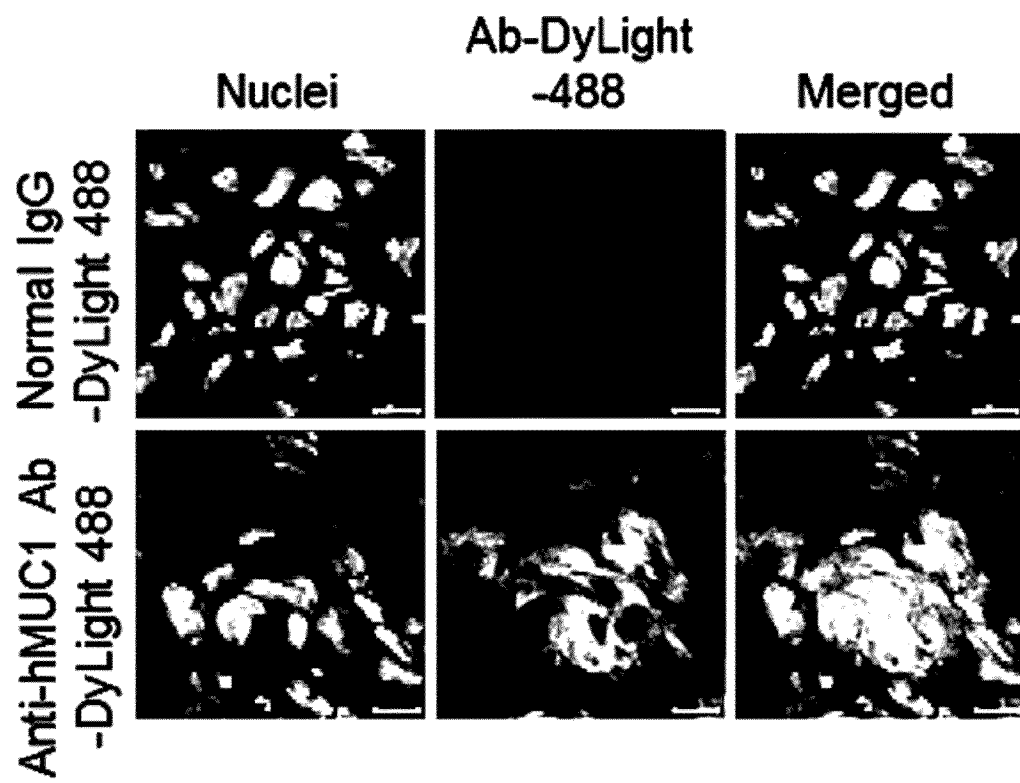
[도10f]



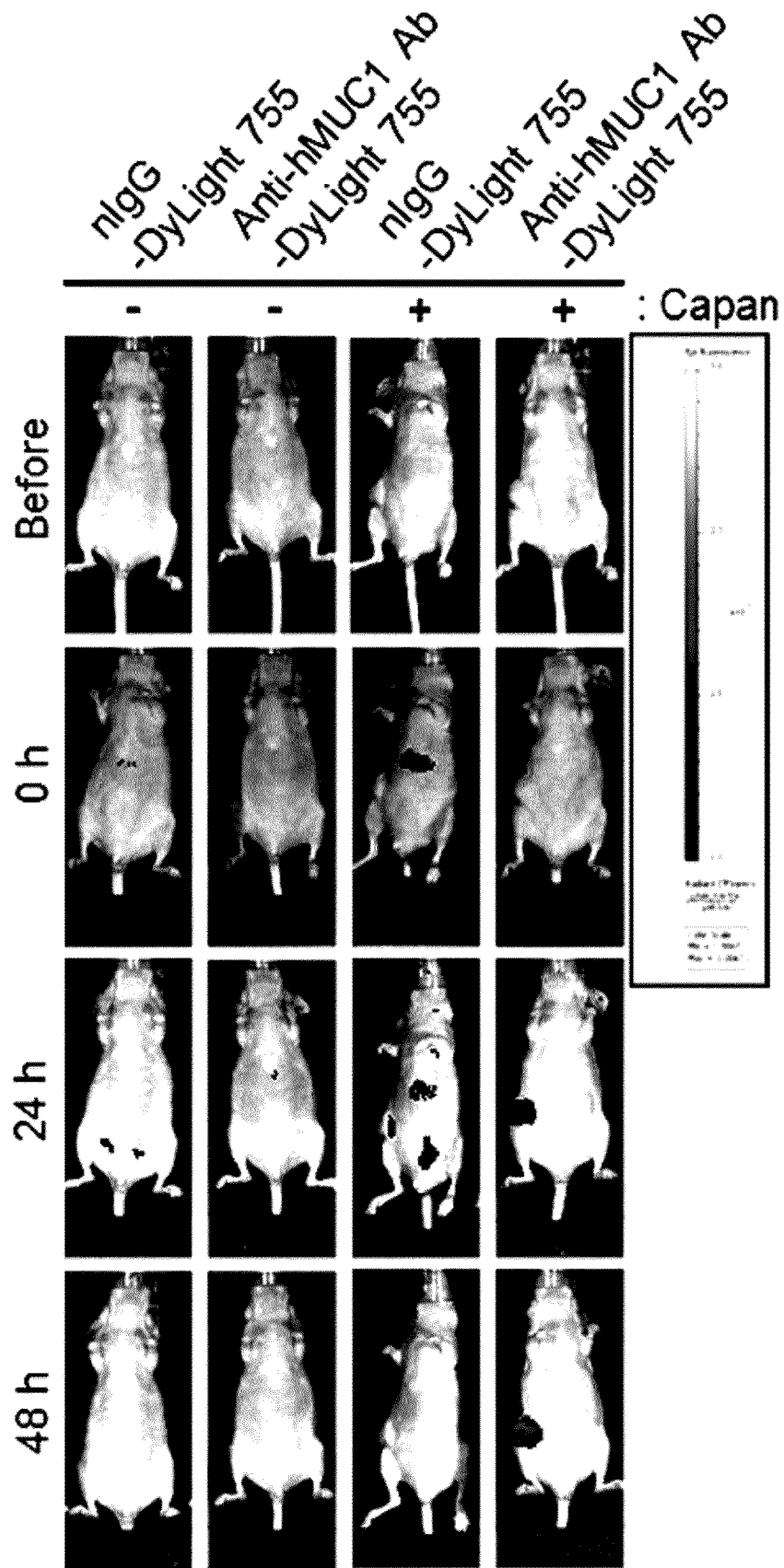
[도 10g]



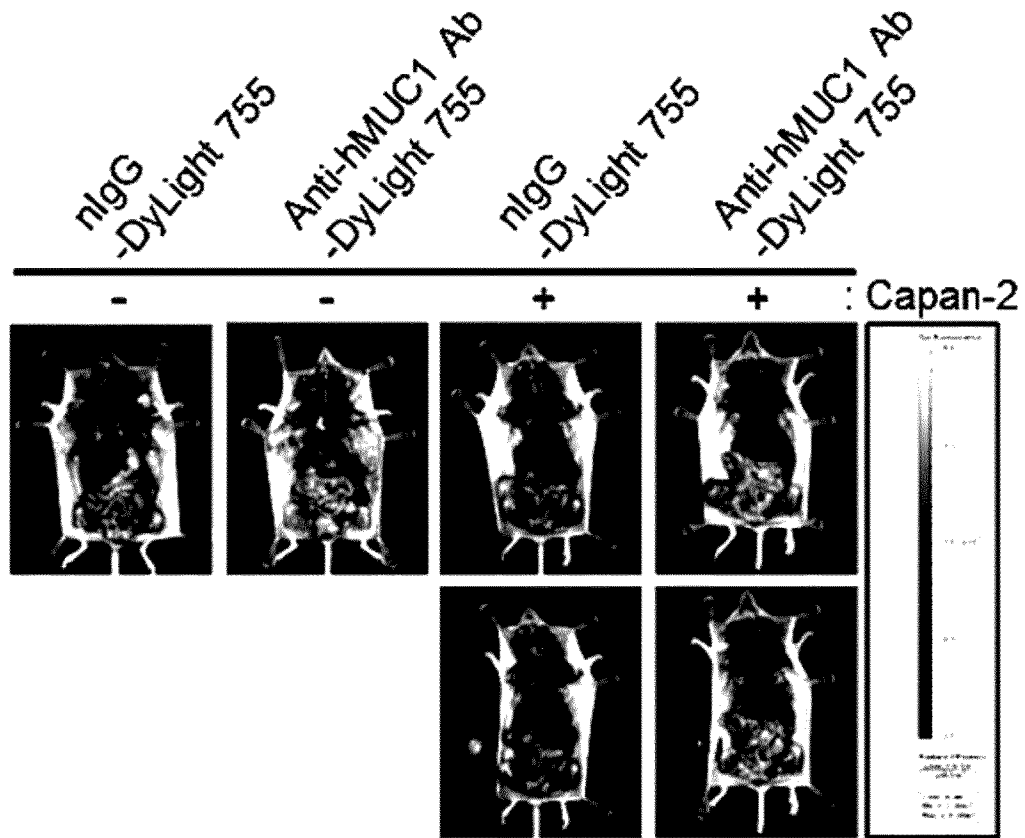
[도10h]



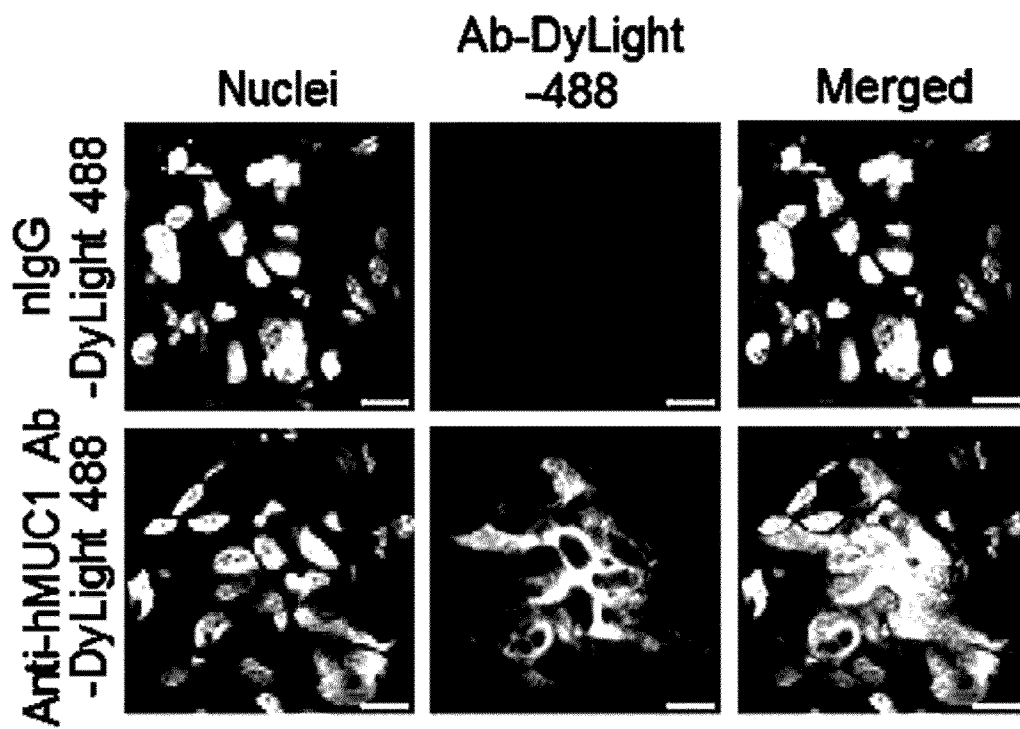
[도11a]



[도11b]

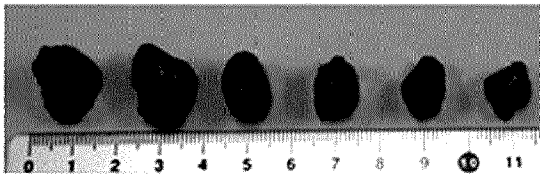
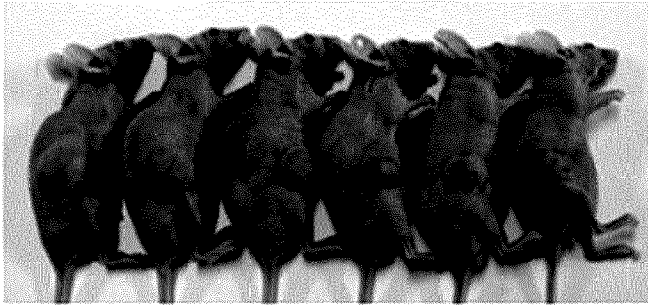


[도11c]

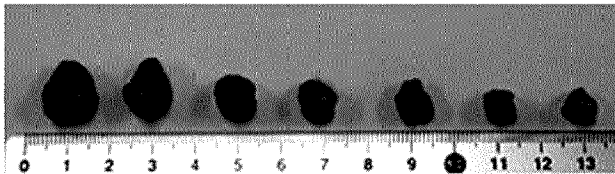


[도 12a]

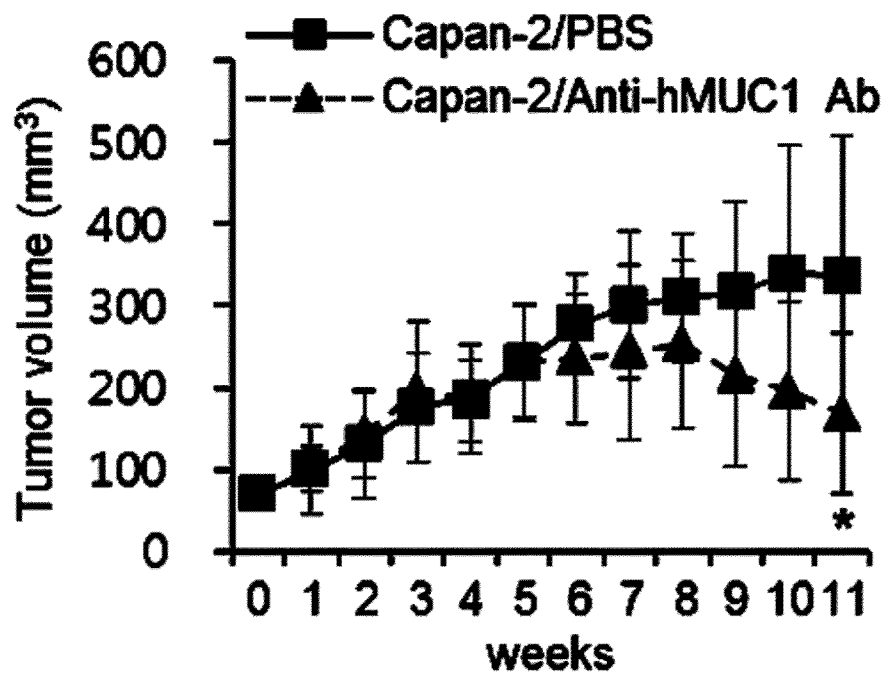
Capan-2/PBS



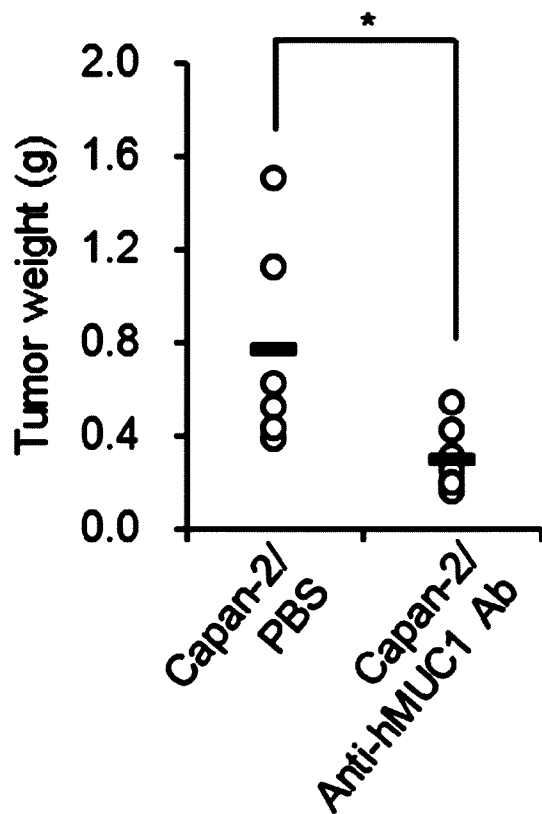
Capan-2/Anti-hMUC1 Ab



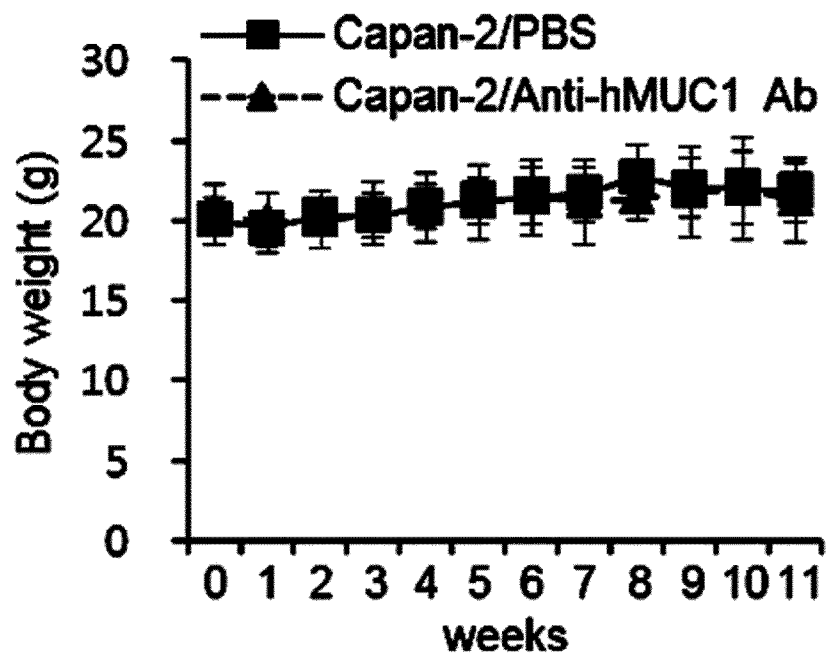
[도12b]



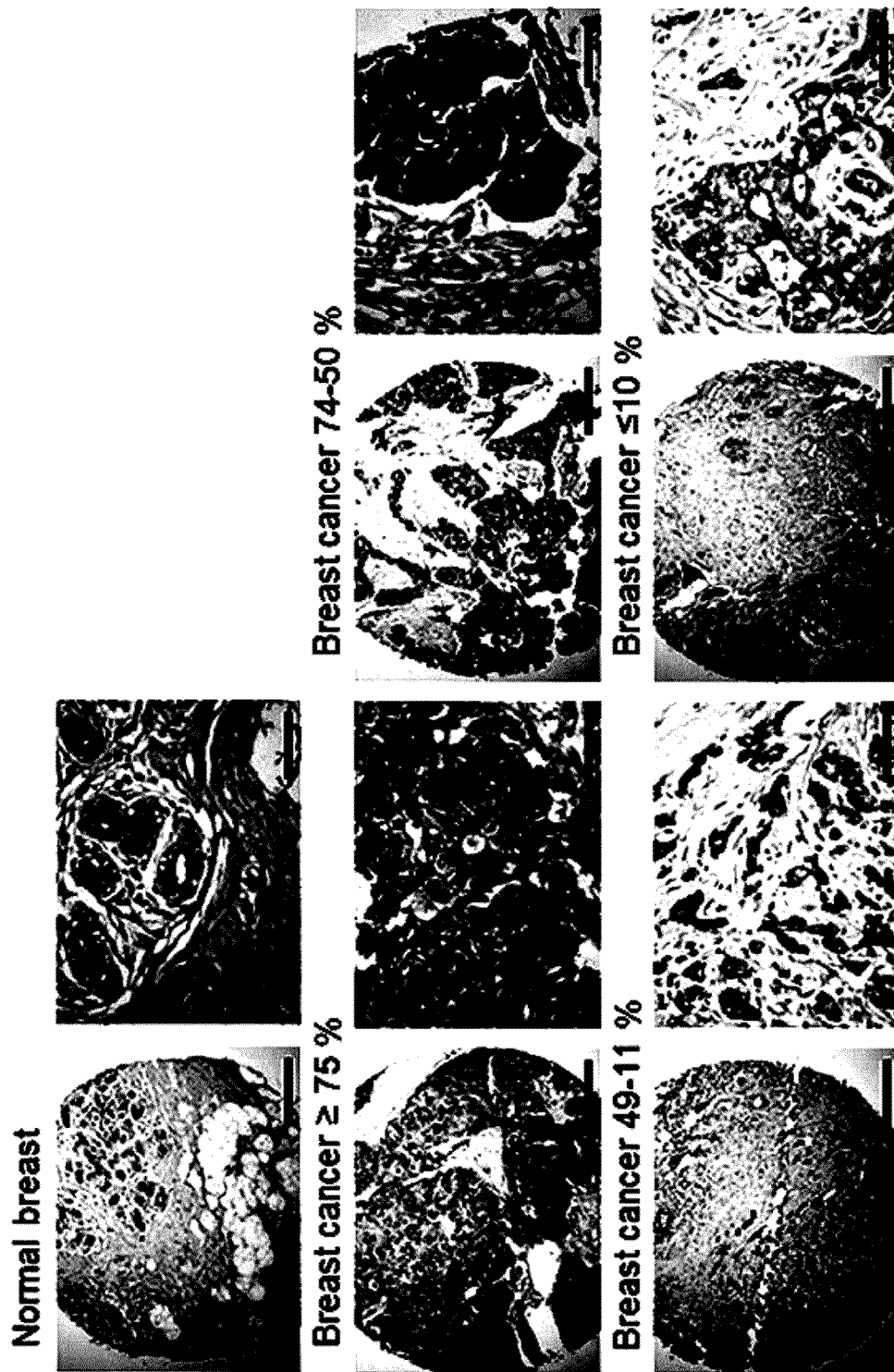
[도12c]



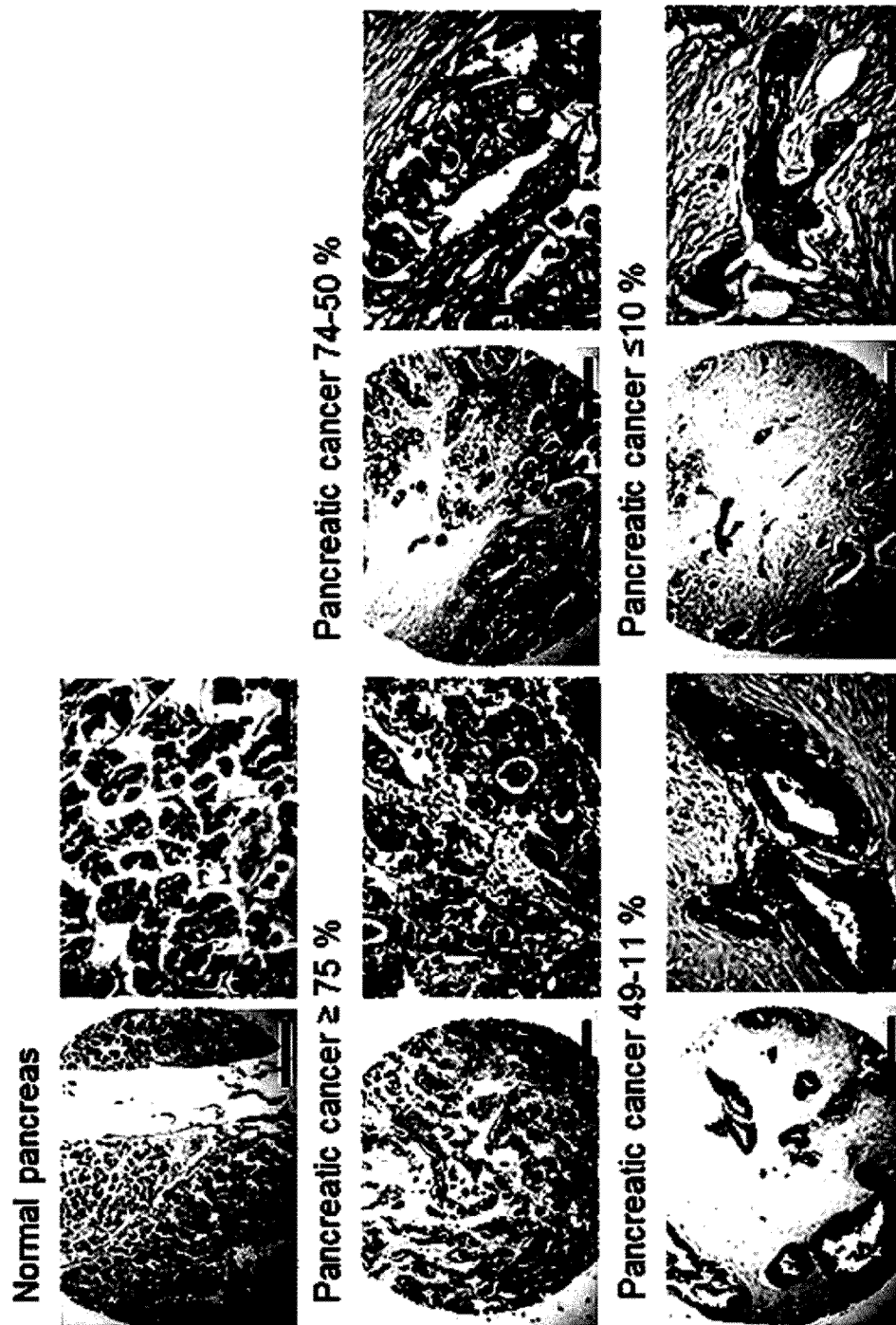
[도12d]



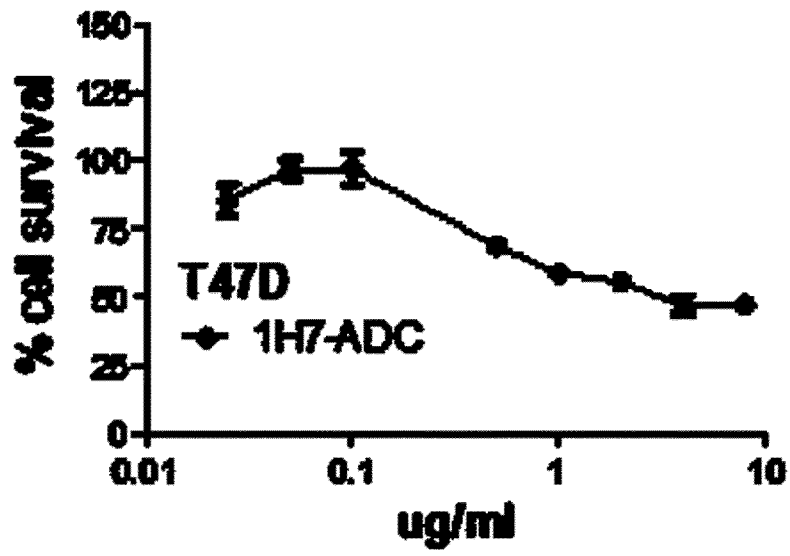
[도13]



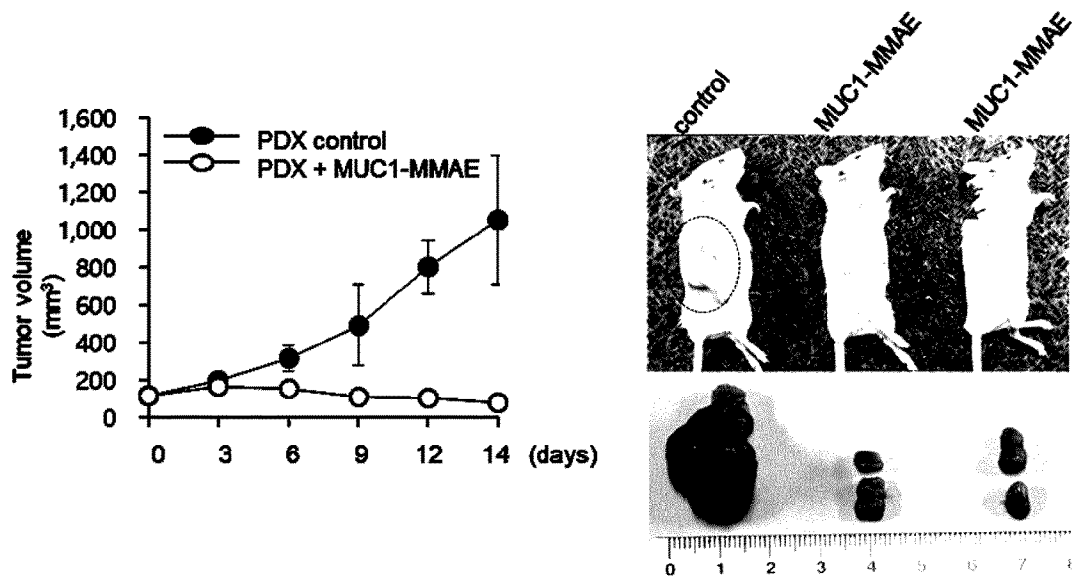
[도14]



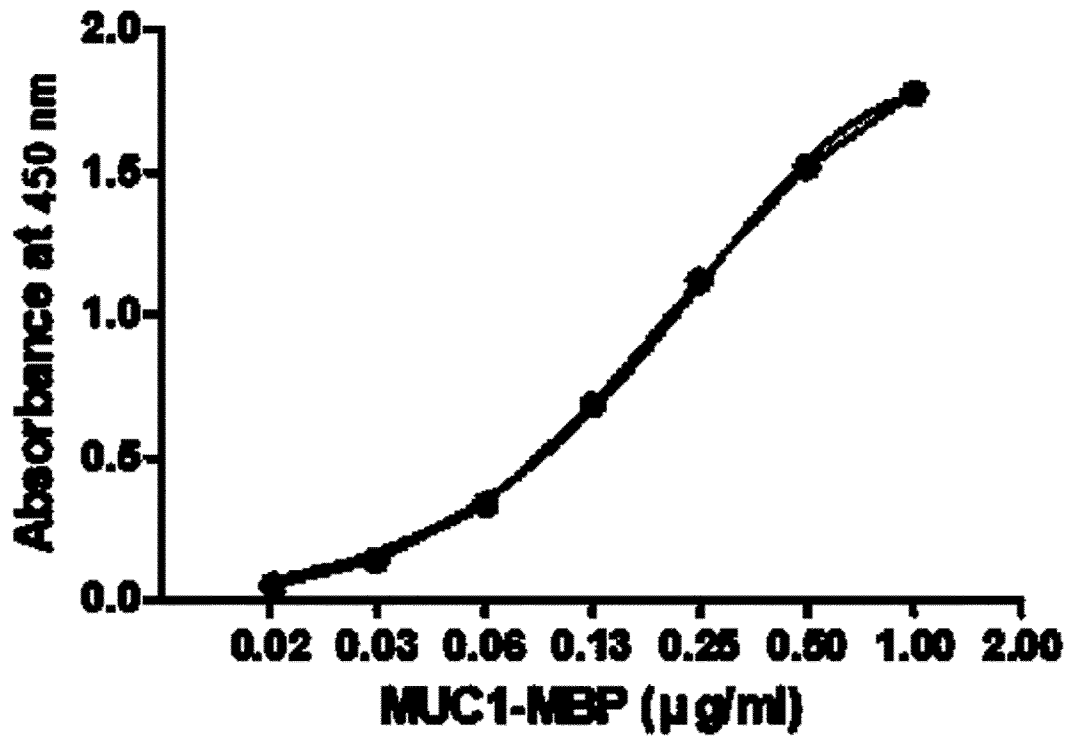
[도15]



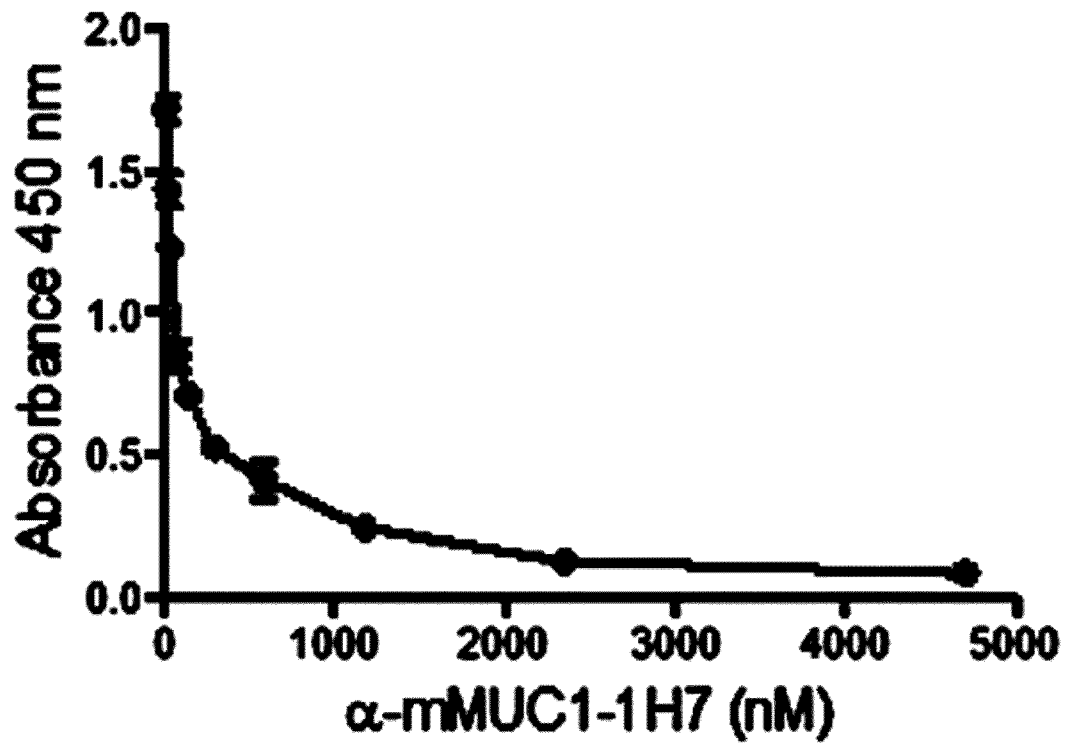
[도16]



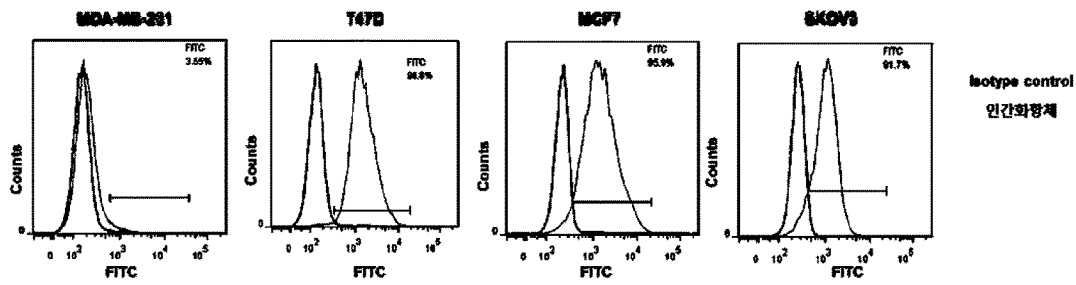
[도17]



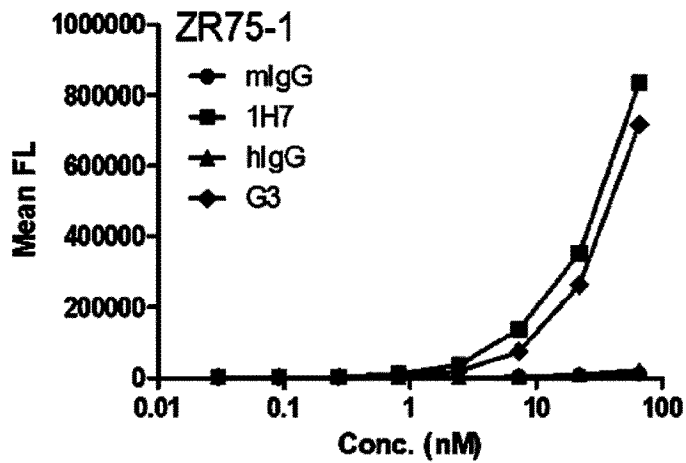
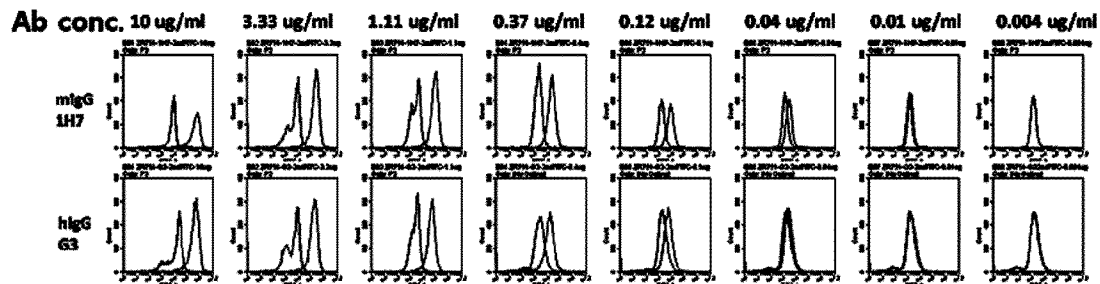
[도18]



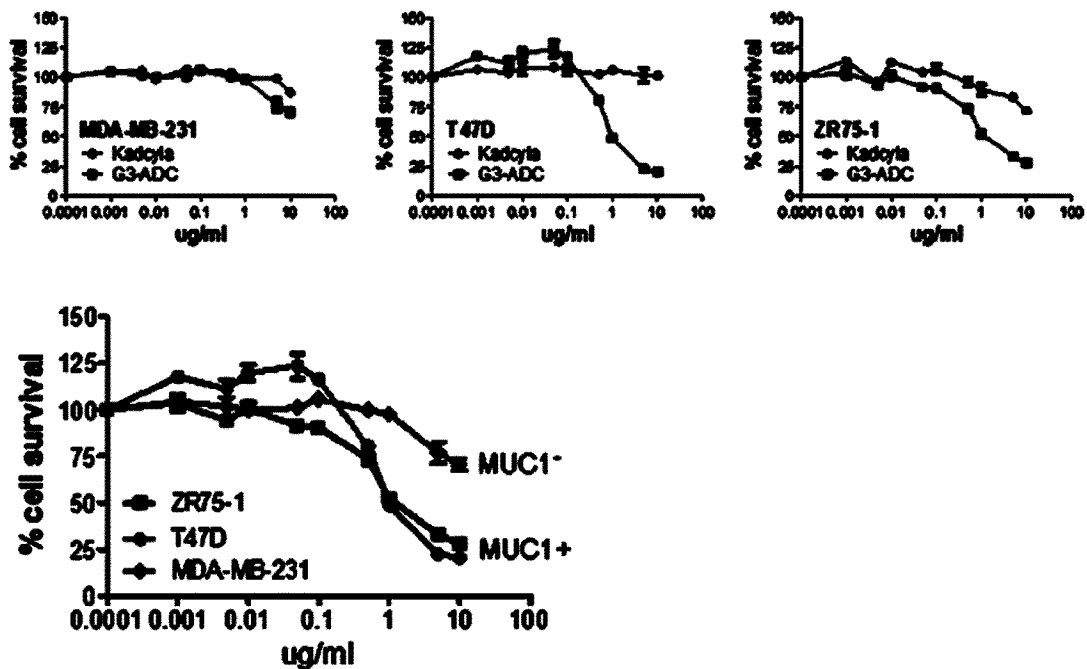
[도19]



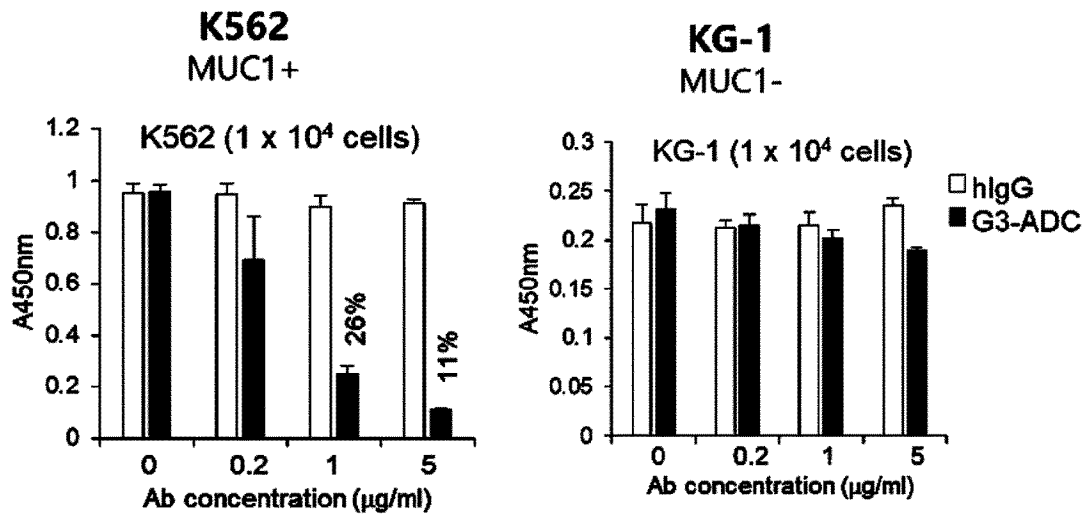
[도20]



[도21]



[도22]



[도23]

