



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0001246
(43) 공개일자 2022년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/7068 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 31/7068 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0079372

(22) 출원일자 2020년06월29일

심사청구일자 2020년06월29일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

아주대학교 산학협력단

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)

(72) 발명자

홍순선

서울특별시 서대문구 문화촌길 6-24, 102동 1601호(홍제동, 문화촌현대아파트)

김용성

경기도 수원시 팔달구 권광로 246, 110동 1703호(인계동, 래미안 노블클래스)

이지은

인천광역시 중구 인종로 109, 101동 1406호(신흥동1가, 풍림아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 8 항

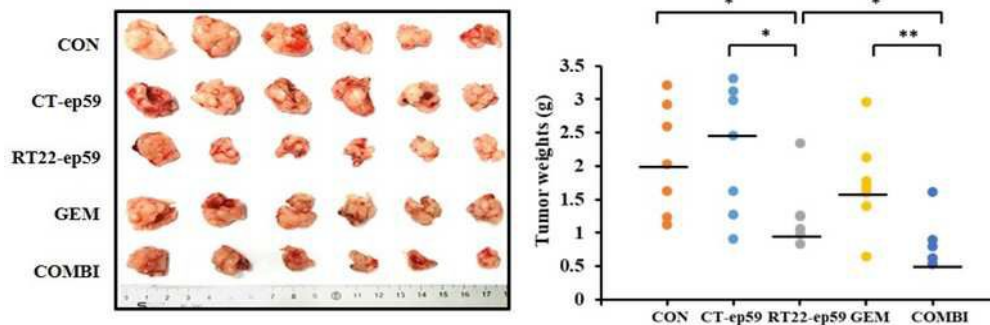
(54) 발명의 명칭 **췌장암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 췌장암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 겐시타빈(gemcitabine); 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR1, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR2 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄가변영역(V_H) 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄가변영역(V_L)을 포함하며, GTP가 결합된 Ras에 특이적으로 결합하는 항체 RT22-ep59;를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

상기 항체 및 겐시타빈은 암 세포 증식 또는 전이에 관여하는 Ras/Raf/MEK 신호전달경로 또는 PI3K/Akt 신호전달 경로를 차단하여, 암 세포의 이동 또는 침투 능력을 저해시키고 종양의 성장 또는 다른 장기로의 종양 전이를 억제함으로써, 췌장암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/04 (2018.01)

C07K 16/303 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711091061
과제번호	2019R1C1C1006542
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)
연구과제명	혈관기능 제어기반 질환 치료기술 개발
기 여 율	40/100
과제수행기관명	인하대학교의과대학부속병원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711091931
과제번호	2014R1A5A2009392
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	저산소 표적 질환 연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711083258
과제번호	2018R1A2A1A05077263
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	시스템 생물학을 이용한 췌장암의 타겟 인자 발굴 및 치료제 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

젬시타빈(gemcitabine); 및

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR1, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR2 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄가변영역(V_H) 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄가변영역(V_L)을 포함하며, GTP가 결합된 Ras에 특이적으로 결합하는 항체 RT22-ep59;를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 중쇄가변영역은,

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 항체 RT22-ep59는,

인간 IgG(immunoglobulin G) 형태인 것을 특징으로 하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 Ras는,

정상 Ras 또는 돌연변이 Ras로서, KRas, NRas 및 HRas로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

상기 젬시타빈 및 항체 RT22-ep59가 1 : (10 내지 200)의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 췌장암은,

EpCAM이 과발현된 췌장암인 것을 특징으로 하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

암 세포의 증식 또는 전이에 관여하는 Ras/Raf/MEK 신호전달경로 또는 PI3K/Akt 신호전달경로를 차단하는 것을

특징으로 하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

암 세포의 이동 또는 침투 능력을 저해시키고, 종양의 성장 또는 다른 장기로의 종양 전이를 억제시키는 것을 특징으로 하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 췌장암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 Ras-GTP 타겟 항체 및 켄시타빈을 유효성분으로 함유하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지금까지 췌장암(pancreatic cancer)은 초기 진단이 어렵고 주변 장기나 림프절로 쉽게 전이되는 특징이 있어 예후가 매우 좋지 않으며 수술로 절제하는 것이 가장 효과적인 치료법이지만, 10-20% 정도의 환자들만이 수술이 가능한 것으로 알려져 있어 암 사망률이 매우 높은 공격적인 암 종으로 분류되어 있다. 또한, 수술을 받은 환자들 중에서도 공격적인 전이가 발생하면 일반적인 화학 요법이나 방사선 요법 등의 치료가 어려웠다.

[0003] 이러한 췌장암 치료에 사용되는 많은 약물 치료법 중에서도 켄시타빈 (gemcitabine) 치료법은 지난 20년 간 췌장암 환자 치료에서 가장 일반적으로 사용되는 치료법으로 알려져 있다. 켄시타빈과 함께 다양한 약물과의 병용 치료가 췌장암에서 사용되고 있지만, 그 효과는 미미하여 췌장암 환자들의 유의적인 생존율 증가에는 영향을 미치고 있지 않다. 이후로 개발된 폴피리녹스(FOLFIRINOX)는 5-FU(5-fluorouracil), 류코보린(leucovorin), 이리노테칸(irinotecan) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)의 4가지 약물의 조합으로 구성되어 있으며, 켄시타빈 단독과 비교하여 췌장암의 중앙 생존율을 증가시켰으며, 마찬가지로 알부민이 결합된 파클리탁셀(paclitaxel)과 켄시타빈의 병용 치료도 켄시타빈 단독과 비교하여 췌장암에서 중앙 생존율을 증가시키는 효과를 보였다. 하지만, 최종적으로 장기 생존율을 확인하였을 때 이러한 약물의 병용 치료의 효과는 미미했고, 약물 독성으로 인한 부작용이 발생하기도 하였다. 따라서 췌장암 환자들에게는 이를 대체할 치료 방법 또는 보다 표적화된 약물 전달 방법이 필요한 상황이다.

[0004] 한편, 라스(Ras) 종양 유전자는 암 세포의 증식, 분화 또는 생존의 조절에 필요한 신호 전달 네트워크이다. Ras 유전자 중에서도, KRas는 췌장암 환자의 약 95%를 차지하는 가장 일반적인 발암성 돌연변이이다. Ras 유전자의 돌연변이가 암세포의 성장에 중요한 역할을 한다는 사실을 착안하여 이를 표적하기 위한 다양한 항암제를 개발하고자, 막에 결합되어 있는 KRas를 분리시키거나 KRas와 GTP의 결합을 방지하고 KRas의 하위 신호전달 경로를 억제하는 등의 발암성의 KRas를 억제하려는 시도들은 계속되어 왔다. 하지만 이러한 시도들은 KRas의 구조적 특성 및 Ras와 GTP 사이의 높은 친화력으로 인해 매우 어려운 것으로 판명되었고, 현재 췌장암 치료에 임상적으로 사용되는 약물은 거의 없는 실정이다. 이에 대한 대안으로, Ras 단백질의 하위 신호 과정을 표적하는 항암제들을 개발하고자 많은 연구가 되어 왔으나 여러 가지 피드백 작용과 약물에 대한 저항성 등이 발생하여 그 효과를 볼 수 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2007-0104673호 (2007.10.26. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 췌장암 치료에 유용한 Ras 표적 항체 및 항암제를 포함하는 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 겐시타빈(gemcitabine); 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR1, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR2 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄가변영역(V_H) 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄가변영역(V_L)을 포함하며, GTP가 결합된 Ras에 특이적으로 결합하는 항체 RT22-ep59;를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 항체 RT22-ep59와 겐시타빈을 포함하는 약학 조성물은 암 세포 증식 또는 전이에 관여하는 Ras/Raf/MEK 신호전달경로 또는 PI3K/Akt 신호전달경로를 차단하여, 암 세포의 이동 또는 침투 능력을 저해시키고 종양의 성장 또는 다른 장기로의 종양 전이를 억제할 수 있다.

[0009] 이에, 상기 항체 및 겐시타빈을 병용함으로써, EpCAM이 과발현된 췌장암을 보다 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명의 실험예 1에 따라 RT22-ep59 및 RT11-i의 Ras 타겟 효능을 ELISA로 분석한 것이다.

도 2는 본 발명의 실험예 2에 따라 췌장암 세포주에서의 EpCAM의 발현을 확인한 것이다.

도 3은 본 발명의 실험예 3에 따라 EpCAM 발현 차이에 따른 췌장암 세포주에서 RT22-ep59의 효능을 확인한 것이다.

도 4는 본 발명의 실험예 4에 따라 RT22-ep59와 병용할 췌장암 치료 약물 선정을 위해 MTT 분석으로 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 실험예 5에 따라 겐시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 췌장암 세포의 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 실험예 6에 따라 면역형광염색법을 통해 겐시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 췌장암 세포에서 신호전달경로 단백질의 발현 저해 효과를 확인한 것이다.

도 7은 본 발명의 실험예 7에 따라 겐시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 췌장암 세포의 이동 능력 저해 효과를 확인한 것이다.

도 8은 본 발명의 실험예 8에 따라 겐시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 췌장암 세포의 침투 능력 저해 효과를 확인한 것이다.

도 9는 본 발명의 실험예 9에 따라 동물실험을 통해 겐시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 종양의 크기 및 무게를 측정한 것이다.

도 10은 본 발명의 실험예 10에 따라 동물실험에서 면역조직화학염색법을 통해 겐시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 다른 장기로의 종양 전이 억제 효과를 확인한 것이다.

도 11은 본 발명의 실험예 11에 따라 면역형광염색법, 면역조직화학염색법, 및 TUNEL 실험법을 통해 겐시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 유전자의 선택적 저해 효과를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하고, 췌장암의 치료 효과가 우수한 신규 항암 치료제에 관해 연구하던 중, Ras와 GTP가 결합되어 있는 특정 형태만을 표적하는 RT22-ep59라는 항체 제제의 약물을 개발하였고, 이는 일반적인 항체 제제의 최대 단점인 세포 내 표적화가 가능하여 세포 내에 존재하는 Ras를 표적할 수 있으며, 또한, 고형 암에서 발현이 높은 것으로 알려져 있는 상피세포 마커인 EpCAM을 특이적으로 인식하도록 개발되어

암 세포 특이적으로 타겟할 수 있음을 확인하였다.

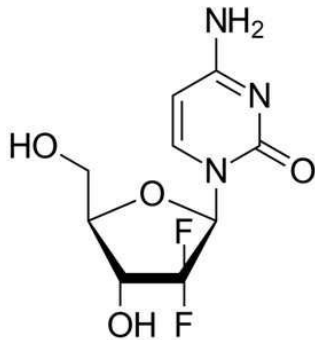
[0012] 이러한 Ras-GTP 타겟 항체 RT22-ep59와 췌장암에서 가장 일반적으로 사용되는 약물인 겐시타빈을 병용 투여하면, Ras/Raf/MEK 및 PI3K/Akt 신호전달경로를 차단하여 암 세포의 생존, 증식, 전이 등이 효과적으로 억제됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0014] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0016] 본 발명은 겐시타빈(gemcitabine) 및 항체 RT22-ep59를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 "겐시타빈(gemcitabine)"은 하기 화학식 1로 표시되는 피리미딘 유사체로서, DNA 복제에 필요한 dCTP의 합성에 관여하는 리보뉴클레오타이드 환원효소(ribonucleotide reductase)를 억제하고 DNA 폴리머라아제 α/ϵ 을 저해하여 세포 성장을 억제하는 항 대사약물(antimetabolite)의 일종이다.

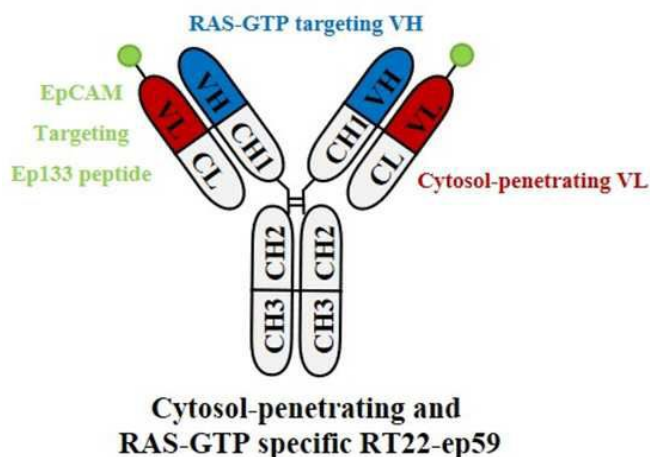
[0018] [화학식 1]



[0019]

[0021] 상기 항체 RT22-ep59는 본 발명자가 2018년 11월 16일 출원한 "세포의 세포질에 침투하여 세포내 활성화된 Ras를 억제하는 항체 및 이의 용도 (출원번호: 10-2018-0141770)"에 기재된 RT22-ep59 제조 방법에 따라 제조된 것으로, 하기 구조식 1의 형태로 표시될 수 있다.

[0022] [구조식 1]



[0023]

[0025] 상기 항체 RT22-ep59는 GTP(guanosine triphosphate)가 결합된 Ras(Rat Sarcoma virus)에 특이적으로 결합하는 항체로, 보다 상세하게는, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR1, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR2 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 CDR3

을 포함하는 중쇄가변영역(V_H) 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄가변영역(V_L)을 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 중쇄가변영역은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0027] 하기 표 1은 상기 항체 RT22-ep59의 중쇄가변영역(서열번호 1)의 아미노산 서열이다.

표 1

RT22 VH	10	20	30	40	50 52a
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFMSWVRQAPGKGLEWVSYSRTSHTTY				
	60	70	80 82a	90	100a 110
	YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFKMDYWGQGTTLTVSS				

[0030] 하기 표 2는 상기 항체 RT22-ep59의 중쇄가변영역의 CDR 서열이다.

표 2

CDR	서열	번호
RT 22 VH - CDR1	DFSMS	서열번호 2
RT 22 VH - CDR2	YISRTSHTTYADSVKG	서열번호 3
RT 22 VH - CDR3	GFKMDY	서열번호 4

[0033] 하기 표 3은 상기 항체 RT22-ep59의 경쇄가변영역(서열번호 5)의 아미노산 서열이다.

표 3

hT4-59 VL	1	10	20	abcde f	30	40	50
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLN SRDGKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW						
	60	70	80	90	100		
	ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYWWMYTFGQGTKEIKR						

[0036] 상기 항체 RT22-ep59의 중쇄가변영역 또는 경쇄가변영역은 세포 막 단백질 EpCAM(epithelial cell adhesion molecule)을 표적하는 펩타이드가 융합될 수 있고, 바람직하게는 경쇄가변영역이 EpCAM 표적 펩타이드 EP133과 융합되어, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0038] 하기 표 4는 EpCAM 표적 펩타이드가 융합된 경쇄가변영역(서열번호 6)의 아미노산 서열이다.

표 4

hT4-ep59 MG VL	1	10	20	30	40	50	60
	EHLHCLGSLCWPMGSSNDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLN SRDGKNYLAWY						
	70	80	90	100	110	120	
	QQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYWWMY						
	130						
	TFGQGTKEIKR						

- [0041] 상기 항체 RT22-ep59는 인간 IgG(immunoglobulin G) 형태일 수 있고, 세포 내의 Ras-GTP를 표적할 수 있으며, 상기 Ras는 정상 Ras 또는 돌연변이 Ras로서, KRas, NRas 및 HRas로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있는 바, 아이소타입 또는 돌연변이 여부와 상관없이 Ras 단백질에 속하면서, GTP와 결합하여 활성화되어 있는 상태이면 모두 결합이 가능하다.
- [0042] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 항체 RT22-ep59는 기존 RT11-i 항체와 비교했을 때 Ras 타겟 효능이 더욱 향상되는 것으로 확인할 수 있었고, 이에 보다 우수한 항암 치료 효과를 가질 수 있으며, 특히, 상기 항체 RT22-ep59는 EpCAM을 타겟함으로써 EpCAM이 과발현된 암 세포를 표적하는데 효과적일 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 젬시타빈 및 항체 RT22-ep59가 1 : (10 내지 200)의 중량비로 포함될 수 있으며, 상기 범위내로 포함될 때 젬시타빈 및 항체 RT22-ep59의 체장암에 대한 항암 효과가 극대화되므로 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 젬시타빈 및 항체 RT22-ep59를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 암 세포의 증식 또는 전이에 관여하는 Ras/Raf(Rapidly accelerated fibrosarcoma)/MEK(Mitogen-activated protein kinase kinase) 신호전달경로 또는 PI3K(Phosphoinositide 3-kinase)/Akt(Protein kinase B, PKB) 신호전달경로를 차단할 수 있고, 암 세포의 이동 또는 침투 능력을 저해시키며, 종양의 성장 또는 다른 장기로의 종양 전이를 억제할 수 있다.
- [0047] 이를 이용하여 체장암을 예방 또는 치료할 수 있으며, 바람직하게는 EpCAM이 과발현된 체장암을 보다 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 실험예에 따르면, AsPC-1, HPAC 및 Capan-2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 체장암 세포주에서 EpCAM이 과발현됨을 확인할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 붕해제, 용제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 젬시타빈 및 항체 RT22-ep59의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.
- [0052] 본 발명에 따른 약학 조성물은 어떠한 제형으로든 적용될 수 있고, 보다 상세하게는 통상의 방법에 따라 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0053] 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0054] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0055] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0056] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 치료 효능의 증진을 위해 칼슘이나 비타민 등을 더 첨가할 수 있다.

- [0058] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0059] 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.
- [0060] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명에 따른 약학 조성물은 궤장암이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여할 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따른 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피부 도포, 호흡기내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 약학 조성물은 궤장암의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른 약물 치료 등과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0066] 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.
- [0068] <실시예 1> 겐시타빈 및 Ras-GTP 타겟 항체 RT22-ep59
- [0069] 1. 약물 준비
- [0070] 겐시타빈(gemcitabine)은 동아제약에서 겐시트를 구입하였으며, 실험 시 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)에 녹여 사용하였다.
- [0071] 5-FU(5-fluorouracil)는 시그마(Sigma-Aldrich)에서 구입하였으며, 실험 시 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 사용하였다.
- [0072] 이리노테칸(irinotecan)은 보령제약에서 캠프토 용액을 구입하여 사용하였다.
- [0073] 2. 항체 RT22-ep59 및 CT-ep59의 제조
- [0074] 본 발명에 따른 Ras-GTP 타겟 항체, RT22-ep59는 본 발명자가 2018년 11월 16일 출원한 "세포의 세포질에 침투하여 세포내 활성화된 Ras를 억제하는 항체 및 이의 용도 (출원번호: 10-2018-0141770)"에 기재된 RT22-ep59 제조 방법에 따라 제조하였다. 하기 실험예에서는 항암 활성을 측정하기 위한 RT22-ep59를 사용하였으며, 실험 시 항체 보관 용액인 히스티딘 버퍼(histidine buffer, pH 7.4)에 녹여 사용하였다.
- [0076] <실험예 1> Ras-GTP 타겟 항체 RT22-ep59 및 RT11-i의 Ras 타겟 효능 비교
- [0077] 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 RT22-ep59의 효능을 확인하기 전에 앞서, 기존에 발표된 Ras 타겟 항체인 RT11-i와 비교하여 RT22-ep59의 Ras 타겟 효능을 효소결합 면역흡착검사(ELISA)를 통해 확인하였다.
- [0078] RT22-ep59와 RT11-i 항체, 그리고 KRas G12D GTP의 유사체인 KRas G12D GppNHp 항원을 각각 1, 10, 100nM의 농도로 처리하였고, KRas G12D GDP 항원은 항체와 함께 100nM의 농도로 결합시켜, RT22-ep59 및 RT11-i 항체와 KRas G12D GTP 또는 GDP와의 결합능을 ELISA를 통해 분석하였으며, 이의 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0079] 도 1을 참조하면, 상기 ELISA 분석을 통해 본 발명에 따른 RT22-ep59는 기존에 발표된 RT11-i와 비교하여 동일

한 조건 하에 농도에 따른 KRas G12D GppNHp 항원과의 결합능이 향상된 결과를 보였으며, GDP 항원과의 결합능은 반대로 감소되는 것으로 나타났다. 이를 통해, RT22-ep59는 기존 RT11-i 항체와 비교하여 Ras 타겟 효능을 높여 더욱 효과적으로 항암 효능을 보일 것으로 예상된다.

[0081] <실험예 2> RT22-ep59 처리를 위한 췌장암 세포주에서 EpCAM 발현 확인

[0082] 본 발명에 따른 Ras 타겟 항체 RT22-ep59의 효능을 확인하기 전에 앞서, 췌장암 세포주에서 EpCAM 발현을 확인하였다. 또한, EpCAM 발현에 따라 RT22-ep59 처리에 따른 차이가 보이는지 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0084] 1. 췌장암 세포주의 준비

[0085] 췌장암 세포주인 AsPC-1, HPAC, Capan-2, PANC-1 및 MIA PaCa-2, 양성 대조군으로 사용된 대장암 세포주인 LoVo, 비교를 위해 사용된 암세포가 아닌 일반 세포 HPNE 및 HUVEC 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC Manassas, VA)에서 구매하여, 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% 항생제(antibiotics)가 포함된 배지에서 5% CO₂와 37℃에서 습도가 유지되는 인큐베이터에서 배양하였다.

[0087] 2. 웨스턴 블롯을 통한 EpCAM 발현 확인

[0088] 항체 RT22-ep59에 의한 효능 차이를 확인하기 위해, 먼저 항체 RT22-ep59 처리 전 췌장암 세포주에서의 EpCAM의 발현을 확인하였다.

[0089] 구체적으로는, 본 실험예 2의 1에서 준비된 다양한 췌장암 세포주 및 대조군으로 사용된 세포들에서 단백질을 추출한 후, 정량하여 같은 농도에서 EpCAM에 대한 웨스턴 블롯을 수행하였으며, 이의 결과를 도 2에 나타내었다.

[0090] 다양한 췌장암 세포주에서 EpCAM 발현을 확인한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, AsPC-1, HPAC 및 Capan-2에서 EpCAM의 발현이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 일반 세포에서는 EpCAM의 발현이 현저히 낮음을 확인할 수 있었다.

[0091] 따라서, 하기 실험에서는 EpCAM 발현이 다른 췌장암 세포주에서 RT22-ep59의 처리에 따른 차이가 있는지 실험하였다.

[0092]

[0093] <실험예 3> 췌장암 세포주의 EpCAM 발현 차이에 따른 RT22-ep59의 효능 확인

[0094] EpCAM 발현에 따른 RT22-ep59의 효능을 췌장암 세포주에서 확인하기 위해 EpCAM 발현이 높은 췌장암 세포주 AsPC-1, HPAC 및 Capan-2와 EpCAM 발현이 낮은 췌장암 세포주 PANC-1 및 MIA PaCa-2 세포에 대한 세포 생존율 평가를 3D 배양에 의한 MTS 분석을 통해 수행하였다.

[0095] 구체적으로는, 상기 실험예 2의 1에서 준비된 AsPC-1, HPAC, Capan-2, PANC-1 및 MIA PaCa-2 세포주에 상기 실시예 1에서 준비된 2 μM 농도의 RT22-ep59를 48시간 마다 처리하여 총 일주일 동안 처리하였다. 이후, 각 반응 배양물에 대한 MTS 실험법을 수행하였다. RT22-ep59의 처리에 따른 췌장암 세포 생존율 평가 결과를 비교하기 위하여, MTS 실험법을 통해 산출된 측정값의 수치를 분석하였으며, 이의 결과를 도 3에 나타내었다.

[0096] 도 3을 참조하면, RT22-ep59를 처리한 세포의 생존율은 EpCAM 발현에 따라 차이를 보였다. EpCAM 발현이 높은 세 가지 세포주 AsPC-1, HPAC 및 Capan-2 에서는 RT22-ep59 처리에 의해 모두 유의적으로 세포 생존율이 저해되는 것으로 나타났다. 반면, EpCAM 발현이 낮은 PANC-1 및 MIA PaCa-2 에서는 유의적인 저해 활성이 나타나지 않았다.

[0097] 따라서, 본 발명에 따른 RT22-ep59는 암세포의 세포 외 영역에 많이 존재하는 EpCAM을 타겟하여 EpCAM 발현이 높은 다양한 암세포의 생존율을 저해시키는 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

- [0099] <실험예 4> RT22-ep59와의 병용 처리를 위한 다양한 췌장암 치료제 스크리닝
- [0100] 본 발명에 따른 RT22-ep59와의 병용 처리를 위한 췌장암 치료제를 선정하기 위해, 먼저 AsPC-1, HPAC, PANC-1 및 MIA PaCa-2 췌장암 세포주에서 췌장암 치료제로 알려져 있는 5-FU, 이리노테칸, 젬시타빈을 단독 처리하여 MTT 에세이를 통해 세포 생존율 평가를 수행하였다.
- [0101] 구체적으로는, 상기 실험예 2의 1에서 준비된 네 가지 췌장암 세포주에 상기 실시예 1에서 준비한 각각의 췌장암 치료제를 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 μ M 농도로 72시간 동안 처리한 뒤, MTT를 처리하여 세포 생존율을 측정하였고, MTT 실험법을 통해 산출된 측정값의 수치를 분석하였으며, 이의 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0102] 도 4를 참조하면, 5-FU 및 이리노테칸은 EpCAM 발현에 따른 세포 생존율의 차이를 보이지 않았다. 하지만, 젬시타빈을 처리한 세포에서는 EpCAM 발현에 따라 세포 생존율에서 차이를 보였다. EpCAM 발현이 높은 HPAC 및 AsPC-1 세포주에서는 세포 생존율의 저해 효과가 크지 않았지만, EpCAM 발현이 낮은 MIA PaCa-2 및 PANC-1 세포주에서는 세포 생존율을 크게 저해시키는 결과를 보임으로써, 젬시타빈은 EpCAM 발현이 높은 세포에서 항암 효과가 감소되는 것으로 나타났다.
- [0103] 따라서, 본 발명에 따른 항체 RT22-ep59와의 병용 처리를 위한 약물로 EpCAM 발현이 높은 세포에서 저항성을 보이는 젬시타빈을 선정하여 두 약물의 병용 처리 효능을 확인하였다.
- [0105] <실험예 5> 젬시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 췌장암 세포의 3D 배양에 의한 MTS 에세이 및 구체 크기 측정을 통한 세포 생존율 확인
- [0106] 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 췌장암 세포 생존율을 알아보기 위하여, EpCAM 발현이 높은 두 가지 췌장암 세포주인 HPAC 및 AsPC-1 세포주에 대한 세포 생존율 평가를 수행하였다.
- [0107] 먼저, 젬시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리한 췌장암 세포들에 대한 세포 생존율을 종래 공지된 MTS 실험법으로 측정하였다.
- [0108] 구체적으로는, 상기 실험예 2의 1에서 준비된 췌장암 세포주인 HPAC 및 AsPC-1 세포주에 100nM 농도의 젬시타빈 및 2 μ M 농도의 RT22-ep59를 48시간 마다 처리하여 일주일 동안 병용 처리하였다 (실험군). 이후, 각 반응 배양물에 대한 MTS 실험법을 수행하였다. 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리에 따른 췌장암 세포 생존율 평가 결과를 비교하기 위하여, MTS 실험법을 통해 산출된 측정값의 수치를 분석하였으며, 이의 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0109] 도 5를 참조하면, 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59를 병용 처리한 실험군은 단독 처리군 보다 두 가지 췌장암 세포주인 HPAC 및 AsPC-1 세포주의 세포 생존율을 모두 유의적으로 저해시켰다.
- [0110] 따라서, 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리는 췌장암 세포의 생존율을 저해시키는 효과가 우수하며, 췌장암 세포의 증식을 저해하는 효과 또한 우수함을 확인할 수 있다.
- [0112] <실험예 6> 젬시타빈 및 RT22-ep59 병용 처리에 의한 췌장암 세포에서 신호전달경로 단백질의 발현 저해 효과 확인
- [0113] 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리에 의한 Ras/Raf/MEK 및 PI3K/Akt 신호전달경로 차단 효과를 알아보기 위하여, Ras 및 신호전달경로의 단백질, 즉 phospho-BRaf, CRaf, MEK 및 Akt에 대한 면역형광분석법을 수행하였다.
- [0114] 구체적으로는, 상기 실험예 2의 1에서 준비된 췌장암 세포주인 AsPC-1 세포주에 상기 실시예 1에서 준비된 100nM 젬시타빈 및 5 μ M RT22-ep59를 6시간 동안 단독 처리(단독 처리군) 또는 병용 처리(실험군)한 후, Ras와 phospho-BRaf, CRaf, MEK 및 Akt에 대한 면역형광분석법을 수행하였다. 이들의 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0115] 도 6을 참조하면, 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59를 병용 처리한 실험군은 단독 처리군에 비해 Ras와 phospho-BRaf, CRaf, MEK 및 Akt 단백질 수치가 현저히 감소되는 것으로 나타났다.
- [0116] 따라서, 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59는 병용 처리됨으로써, 암세포의 증식 및 전이에 관여하는 Ras/Raf/MEK 신호전달경로 및 PI3K/Akt 신호전달경로를 모두 차단하므로, 암을 예방 또는 치료하는 효과가 우수

함을 확인할 수 있다. 또한, 상기 젬시타빈 및 RT22-ep59의 우수한 신호전달경로 차단 효과는 병용 처리에 따른 시너지 효과에 의한 것임을 알 수 있다.

<실험예 7> 젬시타빈 및 RT22-ep59를 병용 처리에 의한 췌장암 세포에서 세포의 이동 능력의 저해 효과 확인

본 발명의 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리에 의한 세포의 이동 능력을 알아보기 위하여, 마이그레이션 분석 (Migration assay)을 수행하였다.

구체적으로는, 상기 실험예 2의 1에서 준비된 췌장암 세포주인 HPAC 및 AsPC-1 세포가 플레이트에 90% 정도 자랐을 때 상기 실시예 1에서 준비된 100nM 젬시타빈 및 2 μ M RT22-ep59를 각각 단독 또는 병용 처리한 후, 마이그레이션 분석법을 수행하여 세포의 이동 능력을 확인하였으며, 이의 결과를 도 7에 나타내었다.

도 7을 참조하면, 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59를 병용 처리한 실험군은 세포 이동 능력이 현저히 저해되는 것으로 나타났다.

따라서, 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리는 췌장암 세포에서 세포 이동 능력을 저해시키므로, 췌장암 세포의 전이를 억제하는 효과가 우수함을 알 수 있다.

<실험예 8> 젬시타빈 및 RT22-ep59를 병용 처리에 의한 췌장암 세포의 침투 능력의 저해 효과 확인

본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리에 의한 세포의 침투 능력을 알아보기 위하여, 인베이전 분석 (Invasion assay)을 수행하였다.

구체적으로는, 상기 실험예 2의 1에서 준비된 췌장암 세포주인 HPAC 및 AsPC-1 세포에 상기 실시예 1에서 준비된 10nM 또는 50nM의 젬시타빈 및 2 μ M RT22-ep59를 72시간 동안 단독 또는 병용 처리한 후, 인베이전 분석법을 수행하였으며, 이의 결과를 도 8에 나타내었다.

도 8을 참조하면, 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59를 병용 처리한 실험군은 세포 침투 능력이 현저히 저해되는 것으로 나타났다.

따라서, 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리는 췌장암 세포에서 세포 침투 능력을 저해시키므로, 췌장암 세포의 전이를 억제하는 효과가 우수함을 알 수 있다.

<실험예 9> 젬시타빈 및 RT22-ep59를 병용 처리에 의한 종양 성장 억제 효과 확인

본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리에 의한 종양 억제 효과가 생체 내에서도 유효한지 확인하기 위하여, 동물실험을 하기와 같이 수행하였다.

구체적으로는, 상기 실험예 2의 1에서 준비된 췌장암 세포주 HPAC를 6주령 수컷 BALB/c 누드 마우스에 5×10^6 세포수로 100 μ l의 PBS에 섞어 접종하였다. 종양의 크기가 50-100mm³ 되었을 때, 5개의 실험군에 7마리씩 분류하여 젬시타빈(2mg/kg)을 주당 2회 복강 주사하였고, RT22-ep59(20 mg/kg)을 주당 3회 31일 동안 혈관 내 주사하였다. 그리고 몸무게는 3일에 한번 측정하였으며, 마지막 날에 희생시켜 종양의 크기 및 무게를 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.

도 9를 참조하면, 동물 실험에서 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리가 단독 처리군에 비해 종양의 성장을 효과적으로 저해시키는 것으로 나타났다.

따라서, 본 발명에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59의 병용 투여가 동물모델에서도 효과적으로 종양의 성장을 억제시키는 효과가 우수함을 확인할 수 있다.

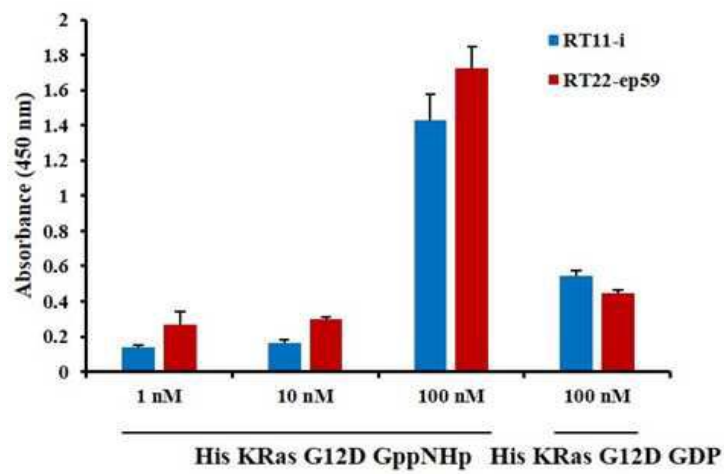
<실험예 10> 젬시타빈 및 RT22-ep59를 병용 처리에 의한 종양의 전이 억제 효과 확인

상기 실험예 9에 따른 젬시타빈 및 RT22-ep59를 병용 처리에 의한 췌장암 세포주를 이용한 동물실험을 통해 얻어진 다른 장기로 전이된 암을 면역조직화학염색법을 통해 분석하였다.

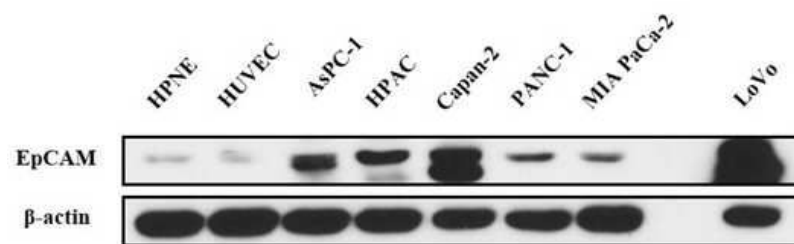
- [0138] 구체적으로는, 잼시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리를 하였을 때 다른 장기로 전이되는 것을 저해함에 따라 전이 억제 효과를 가지는지 확인하기 위하여, 파라핀 블록을 만들어 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin-eosin) 염색을 수행하였으며, 이의 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0139] 도 10을 참조하면, 간과 폐로 전이된 종양의 수를 측정하였을 때, 잼시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리가 각 장기로의 종양의 전이를 효과적으로 저해함을 확인할 수 있었다.
- [0140] 따라서, 본 발명에 따른 잼시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리가 종양의 전이를 억제하는 효과가 우수함을 알 수 있다.
- [0142] <실험예 11> 잼시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리에 의한 유전자의 선택적 저해 효과 확인
- [0143] 본 발명에 따른 잼시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리에 의한 유전자의 선택적 저해 효과를 확인하기 위하여, 면역형광염색법, 면역조직화학염색법, 및 TUNEL 실험법을 하기와 같이 수행하였다.
- [0144] 구체적으로는, 잼시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리를 하였을 때 특정 유전자를 선택적으로 저해함에 따라 종양 성장 억제 효과를 가지는지 확인하기 위하여, 파라핀 블록을 만들어 phospho-BRaf, CRaf, MEK 및 Akt 항체를 1:50 비율로 희석하여 하루 동안 처리한 후 형광이 표지된 이차 항체(fluorescent conjugate secondary antibody)를 1:100 비율로 희석하여 1시간 동안 처리하고, DAPI를 1:200 비율로 희석하여 30분 동안 처리하여 면역형광염색을 수행하였다.
- [0145] 면역조직화학염색은 Cleaved caspase-3 항체를 1:50 비율로 희석하여 하루 동안 처리한 후 비오티ن 결합(biotinylated) 이차 항체를 1:100 비율로 희석하여 1시간 동안 처리하고 ABC(Avidin-Biotin complex) kit를 사용하여 면역조직화학염색을 수행하였다.
- [0146] TUNEL 실험법 또한 마찬가지로 비특이적 반응을 감소시키기 위하여 TdT 효소를 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 이차 항체로 실온에서 30분간 반응시켜 TUNEL 염색을 수행하였다. 이 결과를 도 11에 나타내었다.
- [0147] 도 11을 참조하면, 동물 실험을 통한 면역형광분석에서는 잼시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리가 Ras의 하위 신호전달 경로를 효과적으로 저해함을 확인하였고, 면역조직화학분석 및 TUNEL 분석에서는 잼시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리가 세포 사멸을 효과적으로 유도함을 확인하였다.
- [0148] 따라서, 본 발명에 따른 잼시타빈 및 RT22-ep59의 병용 처리가 면역형광분석, 면역조직화학분석 및 TUNEL 분석에서도 효과적으로 특정 신호전달체계를 억제하고, 세포 사멸을 유도하는 효과가 우수함을 알 수 있다.
- [0150] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

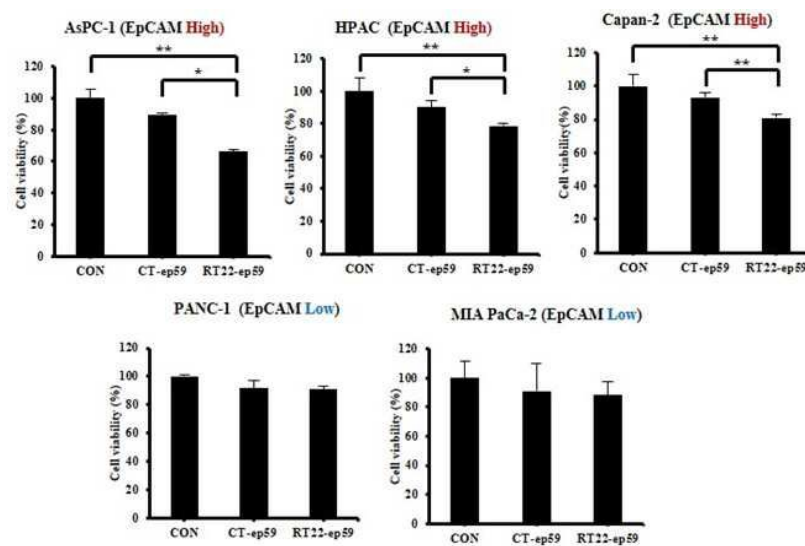
도면1



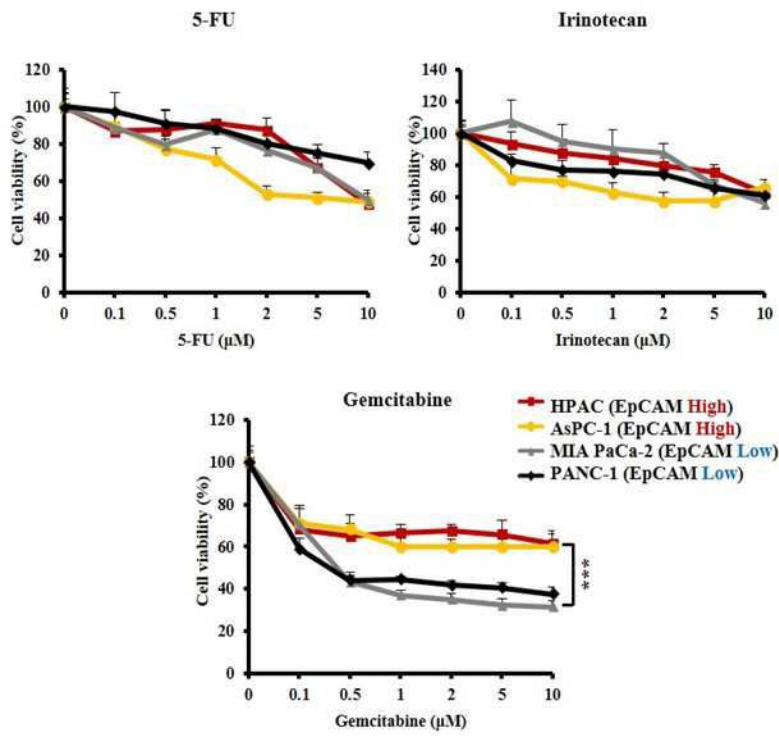
도면2



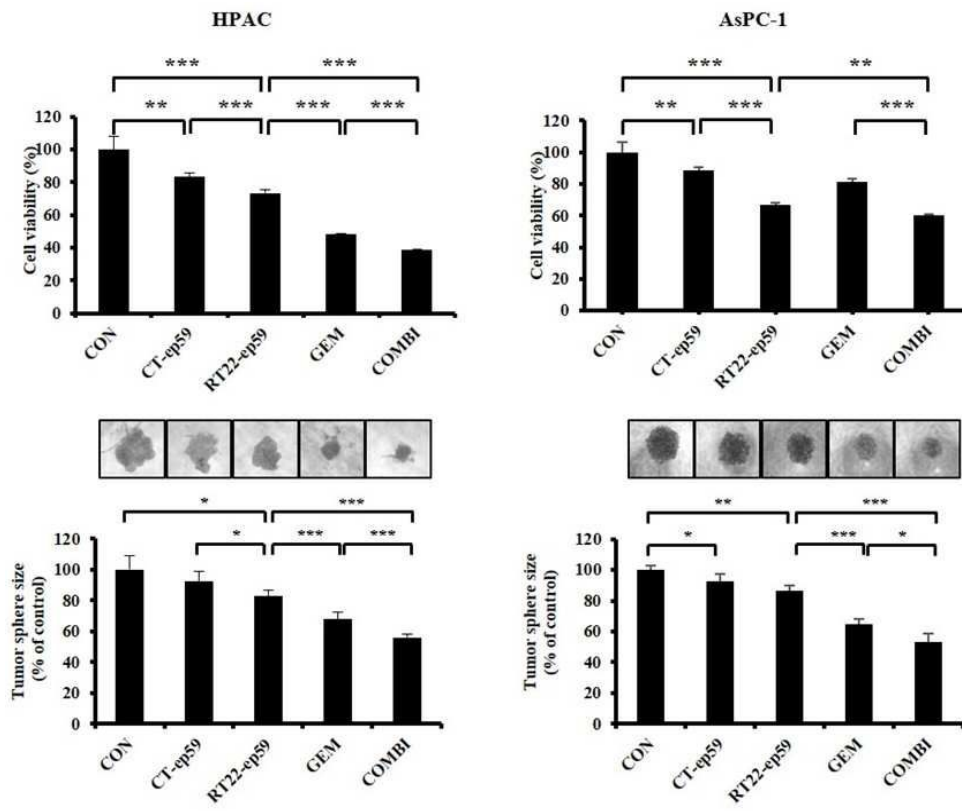
도면3



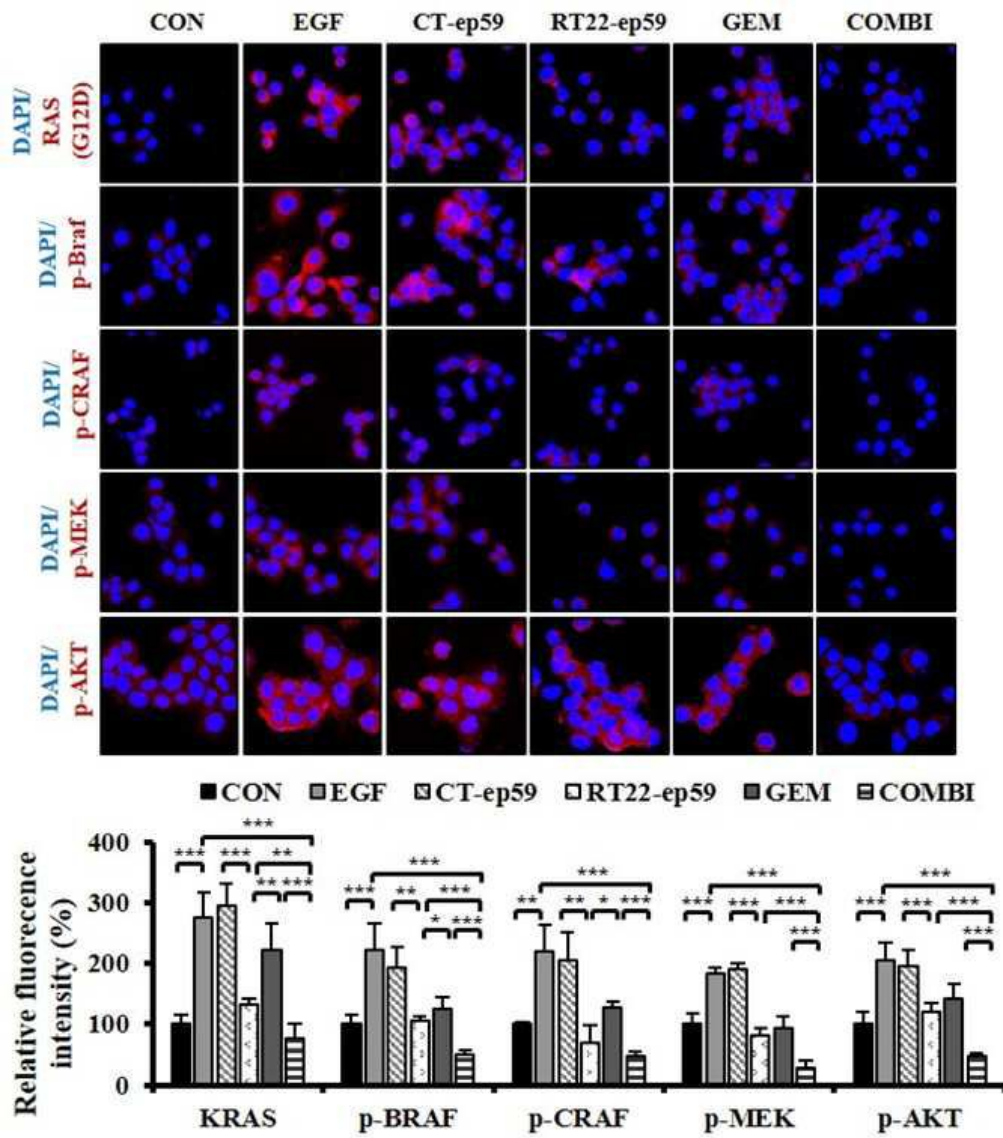
도면4



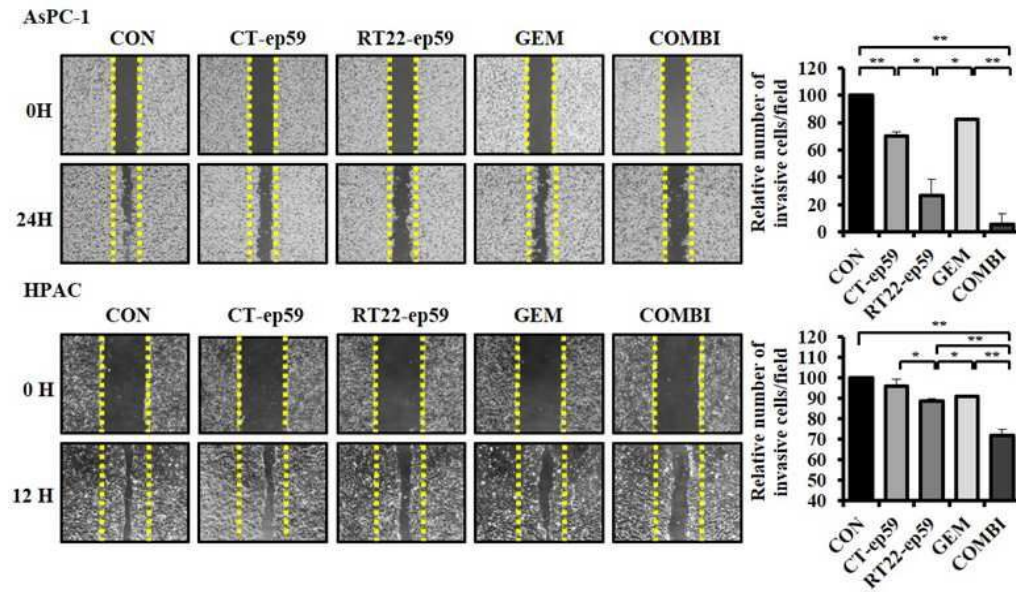
도면5



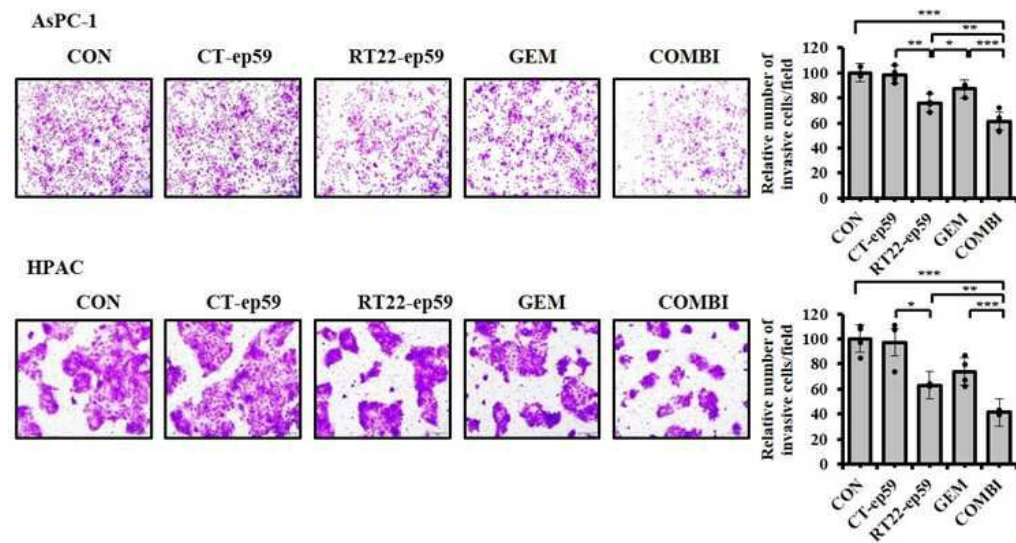
도면6



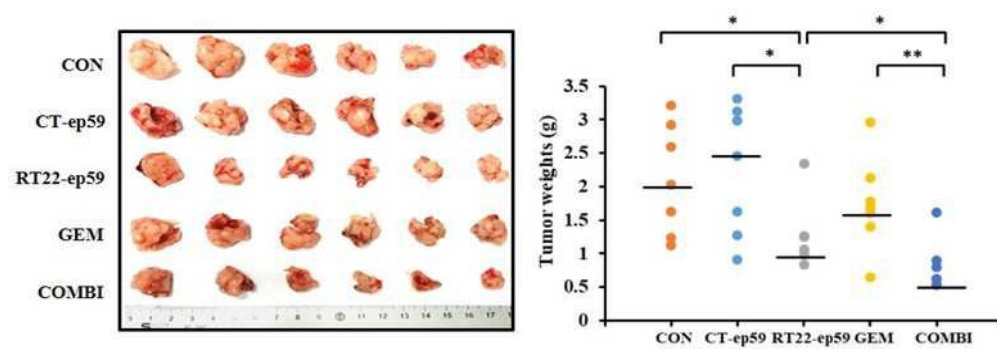
도면7



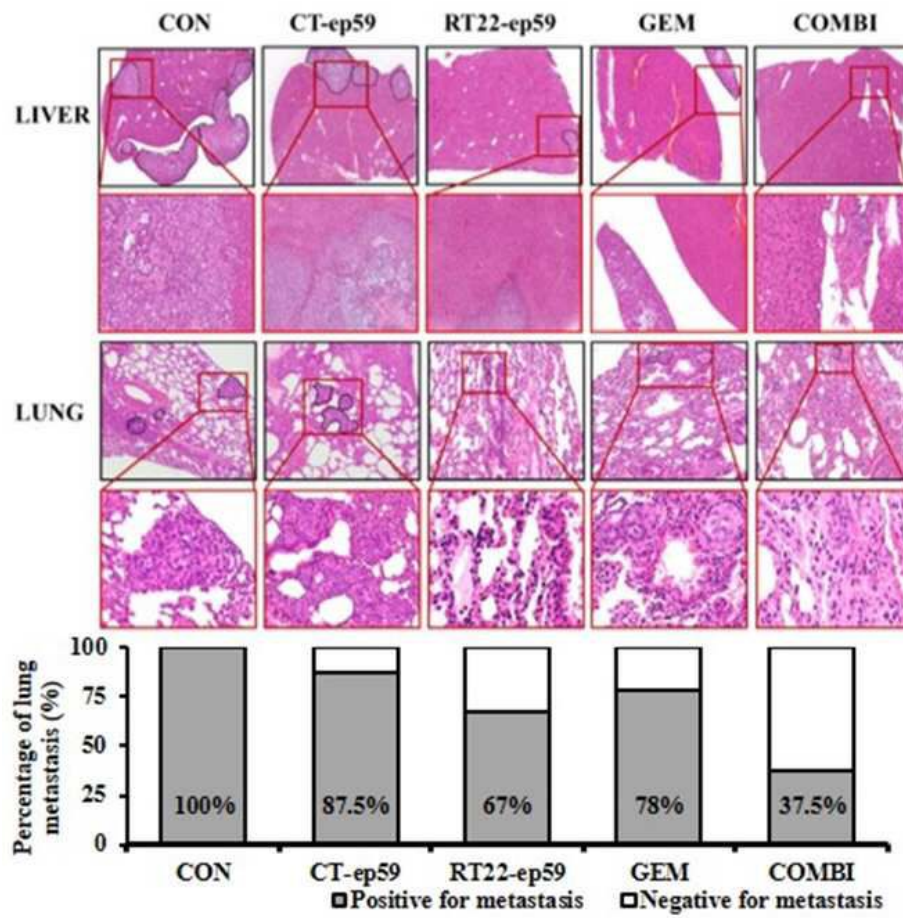
도면8



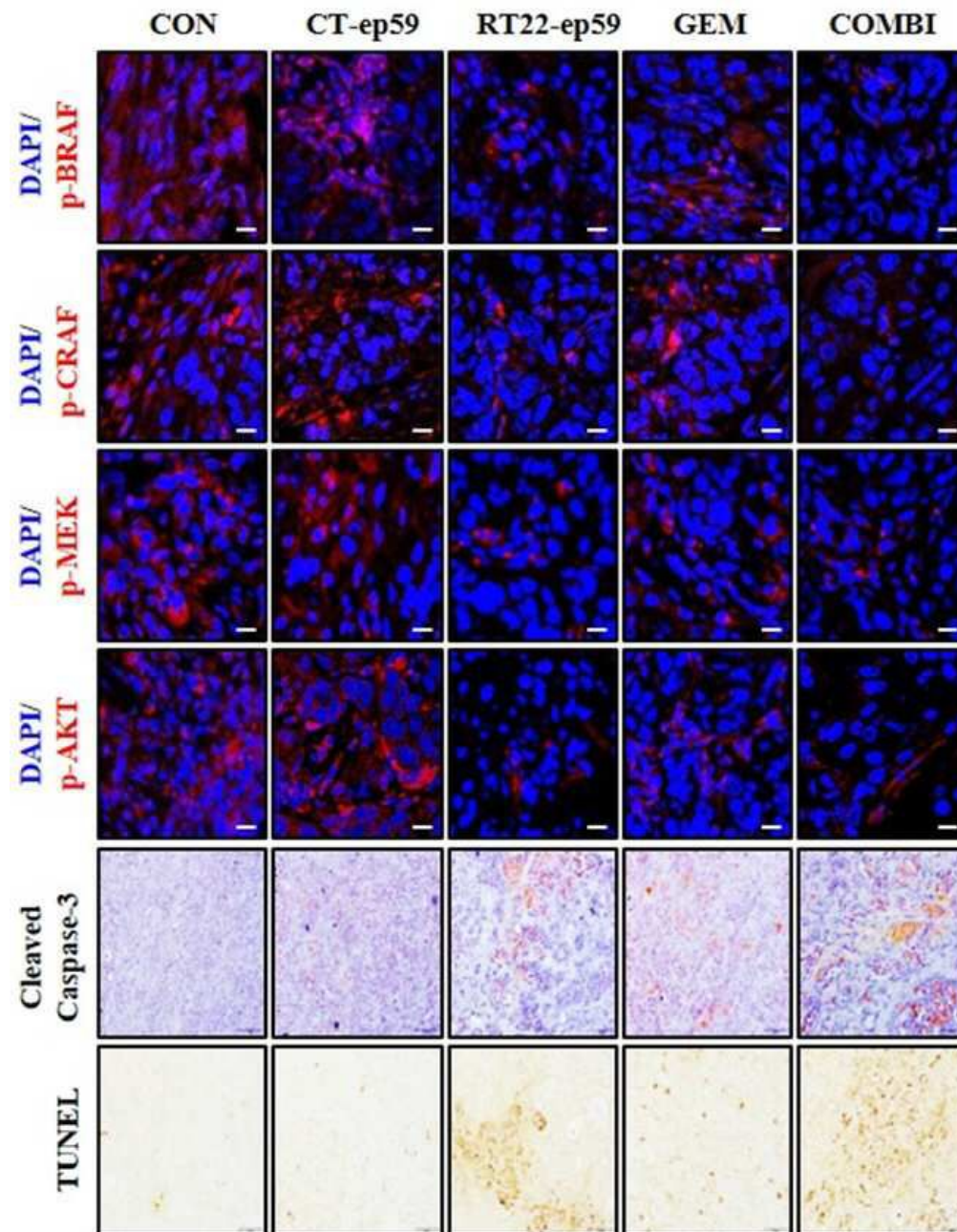
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING PANCREATIC CANCER
- <130> ADP-2020-0184
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT22 VH

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe

20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Phe Lys Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT22 VH-CDR1

<400> 2

Asp Phe Ser Met Ser

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT22 VH-CDR2

<400> 3

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT22 VH-CDR3

<400> 4

Gly Phe Lys Met Asp Tyr

1 5

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT4-59 VL

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Arg Asp Gly Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Trp Tyr Trp Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg

<210> 6

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT4-ep59 MG VL

<400> 6

Glu His Leu His Cys Leu Gly Ser Leu Cys Trp Pro Met Gly Ser Ser

1 5 10 15

Ser Asn Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

20 25 30

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

35 40 45

Asn Ser Arg Asp Gly Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys

100 105 110

Gln Gln Tyr Trp Tyr Trp Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys Arg

130