

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 3월 7일 (07.03.2024)



WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/048978 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/009849

(22) 국제출원일:

2023년 7월 11일 (11.07.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0111246 2022년 9월 2일 (02.09.2022) KR

10-2023-0089400 2023년 7월 10일 (10.07.2023) KR

(71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울특별시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).

(72) 발명자: 서성욱 (SEO, Sung Wook); 06351 서울특별시 강남구 일원로 81, Seoul (KR). 최지윤 (CHOI, Ji Yoon); 06351 서울특별시 강남구 일원로 81, Seoul (KR). 심다미 (SHIM, Da Mi); 06351 서울특별시 강남구 일원로 81, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 정진 (JUNGJIN IP LAW FIRM); 08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

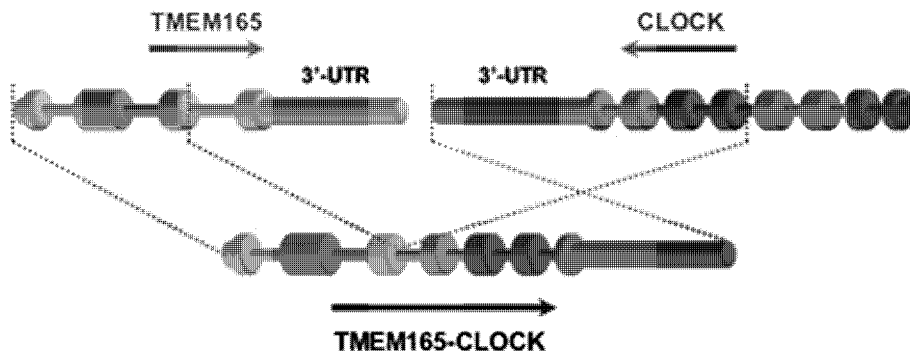
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL TMEM165-CLOCK EPITOPE AND ANTIBODY THERETO

(54) 발명의 명칭: 신규한 TMEM165-CLOCK 에피토프 및 이에 대한 항체



(57) Abstract: The present invention relates to a TMEM165-CLOCK antibody epitope, an antibody specifically binding thereto or an antigen-binding fragment of the antibody, and a composition comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, for diagnosing, preventing, or treating cancer. The TMEM165-CLOCK antibody epitope according to the present invention is an antigen-binding region having a novel sequence identified from TMEM165-CLOCK, which is a fusion gene specifically expressed in cancer cells. The antibody thereto has been confirmed to have a high binding force with respect to TMEM165-CLOCK, and thus can be usefully employed to diagnose, prevent, or treat cancer associated with TMEM165-CLOCK expression.

(57) 요약서: 본 발명은 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프 및 이에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 진단, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프는 암세포 특이 발현 융합유전자 TMEM165-CLOCK로부터 확인한 신규한 서열의 항원 결합 부위이며, 이에 대한 항체는 TMEM165-CLOCK에 결합력이 높음을 확인하였으므로, TMEM165-CLOCK의 발현과 관련된 질환인 암의 진단, 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.



WO 2024/048978 A1

명세서

발명의 명칭: 신규한 TMEM165-CLOCK 에피토프 및 이에 대한 항체

기술분야

- [1] 본 발명은 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프 및 이에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 진단, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 현재까지 암 진단 방법은 조직 샘플의 채취 및 내시경 검사와 같은 침습적인 방법으로 이루어지고 있다. 특히, 조직검사는 질병이 의심되는 부위의 일부를 적출해 현미경으로 관찰하는 방식으로 이루어지고 있다. 따라서, 조직 샘플을 채취하기 위해 침이나 펀치, 내시경 또는 복강경을 이용하기 위해서는, 인체를 절개하여야 하므로, 환자가 느끼는 불편함이 적지 않을 뿐 아니라 흉터가 남고 회복하는데 오랜 시간이 걸린다.
- [3] 또한, 현재까지 진행되고 있는 암의 치료는 대부분 수술로써 병소를 절제해 내는 것이며, 특히 완치를 목표로 하는 경우 외과적인 절제방법이 유일하다. 이러한 외과적 절제에 있어, 완치를 목표로 하는 수술에서는 가능한 한 넓은 범위를 포함하여 절제하는 것이 원칙이나 수술 후 광범위한 절제로 인한 후유증을 고려하여 그 절제 범위를 정하기도 한다. 다만 이러한 경우에도 암이 다른 장기에 전이되었을 경우에는 근치수술이 불가능하며, 따라서 이 때에는 항암제투여 등 다른 방법을 택하게 되는데 현재까지 시판되고 있는 항암제는 일시적인 증상의 완화나 절제술 후 재발의 억제와 생존기간을 연장하는 일시적 효과만 있을 뿐, 근본적인 암의 치료에 있어서는 한계가 있고, 항암제 투여에 따른 부작용 및 경제적인 부담으로 환자에게 이중적 고통을 주기도 한다.
- [4] 따라서 암을 치료하기 위해서는, 치료 이전의 단계에서 높은 민감도와 특이도를 가진 암의 진단 방법의 개발이 무엇보다 중요하며, 이러한 진단은 암의 초기에 발견될 수 있는 것이어야 한다. 나아가 구체적 암에 대한 예후를 예측하여 맞춤형 진단 및 치료가 요구되고 있다.
- [5] 한편, 암 유전자 변이는 염색체 전좌(chromosomal translocation)에 의해 일어나며, 이는 서로 다른 유전자가 융합되어 발현되는 융합 유전자(fusion gene)의 발생을 야기시킨다. 즉, 융합유전자는 염색체 재배열(전좌, 삭제, 역위), trans-splicing, read-through event에 의해 형성되는 하이브리드 유전자이다. 융합유전자는 다양한 종양의 발생 및 활성 기전에 관련이 있다고 알려져 있다. 또한, 같은 암종이라고 하더라도 환자마다 암의 다양성 (tumor heterogeneity)을 가지는데 융합유전자는 개인별 맞춤치료를 위한 암의 다양성을 구분하는 기준을 제시함으로써 분자표적 약물을 개발하는데 도움이 될 수 있다. 따라서, 융합유전자의 특정 발현은

암을 예측하고 진단하거나 암의 치료에 있어 효과적인 예후 예측용 표지자로서 유용한 정보로 사용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 피부섬유육종, 지방 육종, 미분화다형성 육종, 골연골종과 같은 다양한 육종암 조직에서 융합유전자 TMEM165-CLOCK의 특이 발현을 확인하였으며, 육종암 외 유방암, 전립선암, 폐암 세포주에서 TMEM165-CLOCK의 높은 발현이 확인됨에 따라 상기 융합유전자 TMEM165-CLOCK를 암세포 분자표지로 제시할 수 있음을 확인하였다. 이에 TMEM165-CLOCK의 신규한 서열을 이용하여 에피토프 및 이에 특이적으로 결합하는 항체를 제작하고 일실시예를 통해 상기 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 이용하여 암의 진단, 예방 또는 치료 용도로 활용할 수 있음을 확인하였다.
- [7] 이에 본 발명의 과제는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프 및 이에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다.
- [8] 또 다른 과제는 TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 진단용 조성물 및 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 또 다른 과제는 TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 목적하는 시료와 반응시키는 단계;를 포함하는, 암 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 또 다른 과제는 TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프를 제공한다.
- [12] 상기 에피토프는 서열번호 3으로 표시되는 TMEM165 단백질의 300-321번째 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.
- [13] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [14] 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv, Fv, scFv 이량체, 디아바디(diabody) 및 선형 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [15] 상기 항체는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [16] 상기 항체는 단일쇄 항체(scFv)일 수 있다.
- [17] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 TMEM165-CLOCK 특이적 단일쇄 항체(scFv) 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

- [18] 또한 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [19] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [20] 또한 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [21] 또한 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [22] 상기 암은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [23] 또한 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [24] 상기 암은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [25] 상기 조성물은 PBMC 세포 또는 NK 세포를 더 포함할 수 있다.
- [26] 또한 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 목적하는 치료와 반응시키는 단계;를 포함하는, 암 진단 방법을 제공한다.
- [27] 상기 암은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [28] 또한 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [29] 본 발명에 따른 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프는 암세포 특이 발현 융합유전자 TMEM165-CLOCK로부터 확인한 신규한 서열의 항원 결합 부위이며, 이에 대한 항체는 TMEM165-CLOCK에 결합력이 높음을 확인하였으므로, TMEM165-CLOCK의 발현과 관련된 질환인 암의 진단, 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [30] 도 1은 정상 세포와 다양한 육종 조직에서의 TMEM165-CLOCK 발현 수준을 나타낸 도이다. 상단이미지 - 레인 1 및 2: 정상 조직, 레인 3: 피부섬유육종(DFSP; Dermatofibrosarcoma protuberans), 레인 4: 미분화다형성육종(UPS; Undifferentiated pleomorphic sarcoma), 하단이미지 - 레인 1: 피부섬유육종(DFSP; Dermatofibrosarcoma protuberans), 레인 2: 지방육종(Low-grade liposarcoma), 레인 3: 미분화다형성육종(UPS; Undifferentiated pleomorphic sarcoma), 레인 4: 거대세포종양(Giant cell tumor), 레인 5: 골연골종(Osteochondroma).

- [31] 도 2는 육종암 외 암세포에서의 TMEM165-CLOCK 발현 수준을 나타낸 도이다. 레인 1: NCI-H1299, 레인 2: NCI-H1437, 레인 3: NCI-H1793, 레인 4: HCC827, 레인 5: NCI-H23.
- [32] 도 3은 TMEM165(상단) 및 TMEM165-CLOCK fusion(하단)의 염기서열 차이(a), 아미노산 서열 차이(b), TMEM165-CLOCK 단백질 개략도(c), 합성 펩타이드의 3D 구조(d)를 나타낸 도이다. 도 3A에서, 하단 이미지의 TMEM165***CLOCK** 서열과 비교하기 위해 상단 이미지의 TMEM165 서열 중간 부분의 ATG로 시작되는 서열을 볼드체로 표시하였다. 하단 이미지의 TMEM165***CLOCK** 서열은 * 기호를 기준으로 좌측은 TEME165, 우측은 **CLOCK** 서열로 구분될 수 있다.
- [33] 도 4는 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 이용한 TMEM165-CLOCK 과발현 육종암 세포주의 면역염색발광을 나타낸 도이다.
- [34] 도 5는 면역활성화 PBMC 세포 및 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 이용한 TMEM165-CLOCK 과발현 육종암 세포주의 세포사멸(a) 및 면역활성화 NK 세포 및 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 이용한 TMEM165-CLOCK 과발현 육종암 세포주의 세포사멸(b)을 나타낸 도이다.
- [35] 도 6은 TMEM165-CLOCK 특이 항체 처리에 의한 a: 육종암 세포주(KHOS/NP), b: TMEM165-CLOCK 과발현 안정화 세포주(KHOS/NP_TMEM165-CLOCK) 및 c: 폐암 세포주(NCI-H1793)의 세포 증식(cell proliferation) 억제를 나타낸 도이다.
- [36] 도 7은 종양이 유도된 마우스 모델에 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 처리한 실험군(TMEM165-CLOCK Ab.)의 종양 성장 억제를 나타낸 도이다. a:마우스 종양 비교 이미지, b: 정량화 그래프.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 본 발명자들은 육종암, 정상 조직을 포함하여 총 54개의 조직으로 약 3만개의 인간 유전자를 토대로 다양한 육종암 조직에서 공통적으로 발현되는 유의한 융합유전자 TMEM165-CLOCK을 발굴하였다.
- [38] 상기 융합유전자는 TMEM165 유전자가 정방향(5'→3'), CLOCK 유전자가 역방향으로 결합한 형태였으며 이 유전자를 육종암 특이적 항원으로 이용할 수 있음을 유추하고 서열을 분석하였다.
- [39] TMEM165-CLOCK(도 3b의 Fusion)은 NCBI에 보고된 등록번호 NM_018475.5의 Homo sapiens transmembrane protein 165(도 3a의 TMEM165)의 아미노산 서열과 1-299번째까지 동일하였고 300-321번째 아미노산 서열에 차이가 있음을 확인하였다. 본 명세서에서 상기 도 3b의 TMEM165-CLOCK(Fusion) 서열을 서열번호 3으로 표시하였다. 상기 TMEM165-CLOCK의 말단 300-321 aa의 서열 GSFSPWLILHACSDGKGHLERN(서열번호 1)을 항원특정부위로 결정하고 이를 이용하여 펩타이드 제작을 하였다.
- [40] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프를 제공한다.

- [41] 상기 TMEM165-CLOCK은 인간 유래인 것이나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 에피토프는 서열번호 3으로 표시되는 TMEM165-CLOCK 단백질의 300-321번째 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.
- [42] 본 발명에서 "에피토프(Epitope)"는 항원결정기 또는 항원 결정 부위(antigenic determinant)로 칭할 수 있으며 항체, B 세포, T 세포 등의 면역계가 항원을 식별하게 해주는 항원의 특정한 부분이다. 구체적으로 에피토프는 특정 항체에 의해 인식되는 항원결합부위의 아미노산 잔기 세트, 또는 T 세포에서는 T 세포 수용체 단백질 및/또는 주요 조직적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex, MHC) 수용체에 의한 인식에 필요한 잔기를 의미한다. 본 발명에 따른 에피토프는 항체, T 세포 수용체 또는 HLA 분자에 의해 인식되는 부위를 형성하는 분자로, 일차, 이차 및 삼차 펩타이드 구조, 또는 전하를 의미한다. 또한 본 발명의 에피토프보다 크며 본 발명의 에피토프를 포함하는 단리 또는 정제된 단백질 또는 펩타이드 분자는 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 본 발명에서 용어 에피토프 또는 펩타이드는 종종 혼용되어 사용될 수 있다.
- [43] 본 발명은 상기 에피토프를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공할 수 있다. 구체적으로 상기 TMEM165-CLOCK 에피토프 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(aligned)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [44] 따라서, 상기 서열번호 1로 표시되는 서열과 높은 상동성을 갖는 아미노산 서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상의 높은 상동성을 가지면서 본 발명의 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프로서의 기능을 동등하게 나타낼 수 있는 아미노산 서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [45] 또한 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조법 발현 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공할 수 있다.
- [46] 본 발명은 다른 양태로 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [47] 상기 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프는 전술한 바와 같다.
- [48] 상기 'TMEM165-CLOCK 항체 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체'는 TMEM165-CLOCK 단백질에 특이적으로 결합하여 이를 검출할 수 있는 항체를 의미한다. 상기 항체는 TMEM165-CLOCK 특이 항체, 항 TMEM165-CLOCK 단클론 항체 또는 TMEM165-CLOCK 항체와 혼용되어 사용될 수 있다.

- [49] 상기 용어 '특이적으로 결합(Specifically binding)'은 당해 기술분야에서 통상적으로 알려진 "특이적으로 인식(specifically recognizing)"의 의미와 동일한 것으로서 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 항원-항체 복합체를 형성할 수 있으며 또한 면역학적 반응을 하는 것을 의미할 수 있다.
- [50] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 TMEM165-CLOCK 단백질의 300-321번째 아미노산 서열, 즉 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TMEM165-CLOCK를 검출 또는 이를 특이적으로 표적화하기 위한 목적으로 활용될 수 있다.
- [51] 본 발명에서 항체는 전체(whole) 항체 형태일 뿐 아니라 항원 결합 기능을 보유하고 있는 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 상기 기능적인 단편의 예는 구체적으로 (i) 경쇄의 가변역역(VL) 및 중쇄의 가변영역(VH)과 경쇄의 불변역역(CL) 및 중쇄의 첫번째 불변 영역(CH1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편; (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv 분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody) 등을 포함한다.
- [52] 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 항체는 단클론 항체, 다클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함할 수 있다.
- [53] 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv, Fv, scFv 이량체, 디아바디(diabody) 및 선형 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [54] 본 발명에서 용어 '단클론 항체(monoclonal antibody)'는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도의 특이적인 항체를 의미한다. 단클론 항체는 단세포군 항체, 모노클로날 항체 또는 단일클론 항체라고 불리기도 한다. 통상적으로, 상이한 에피토프(항원 결정기)들에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론 항체와는 다르게, 단클론 항체는 항원상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 단클론 항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 또한 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 또 다른 장점을 갖는다.

- [55] 본 발명에서 항 TMEM165-CLOCK 단클론 항체는 당해 기술 분야에 공지된 다양한 방법을 통해 제조될 수 있다. 일 예로서, 화학적 펩타이드 합성방법으로 제조될 수 있고, 상기 단클론 항체를 코딩하는 유전자를 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 증폭하거나 공지된 방법으로 합성한 후 발현 벡터에 클로닝하여 발현시켜서 제조될 수도 있으며, 상기 단클론 항체의 면역원을 동물에 주사하여 얻어진 림프구로부터 유래된 하이브리도마 세포주를 사용하여 제조될 수도 있다.
- [56] 본 발명의 일실시예에 따르면, 파지 디스플레이(Phage display) 기법을 사용하여 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 확립하였다. 다양한 육종암 조직에서 공통된 발현을 확인한 융합유전자 TMEM165-CLOCK을 클로닝하여 TMEM165-CLOCK 단백질을 정제하고 이를 인간 scFv 항체 파지 표면제시 라이브러리에 반응시켜 TMEM165-CLOCK에 특이적으로 결합한 scFv-파지를 추출해 E-coli에 감염 및 증폭시키는 바이오패닝을 수행하였다. 상기 '바이오패닝(Bio-panning)'이란 파지의 외벽(coat)에 펩타이드를 발현(display)하는 파지 라이브러리로부터 항원(바이러스 외피 단백질), 효소, 세포표면 리셉터 등의 표적 분자와 결합하는 성질을 지닌 펩타이드를 표면에 발현하고 있는 파지만을 선택해 내는 과정을 일컫는다. 이와 같은 패닝 과정을 수행한 후 결합능이 큰 파지 항체군에서 단클론 항체를 선별하였으며, 이의 ELISA 분석을 수행하여 결합능이 우수한 항체를 한 번 더 선별하였다. 선별된 단클론 항체의 phagemid DNA를 얻은 후 single chain Fv(scFv)의 5', 3'-올리고뉴클레오티드를 이용하여 서열 분석을 진행하고 양방향에서 읽힌 서열의 공통부위를 중합하여 서열번호 2로 표시되는 TMEM165_CLOCK 항체 서열을 확립하였다.
- [57] 본 발명에 따른 항체는 이에 제한되는 것은 아니나, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 바람직하게는 단일쇄 항체(scFv)일 수 있다. 또한 바람직하게 본 발명의 항체는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 TMEM165-CLOCK 특이적 단일쇄 항체(scFv) 또는 이의 항원결합 단편일 수 있다.
- [58] 상기 'scFv(single chain fragment variable)'는 유전자 재조합을 통해 항체의 가변 영역만을 발현시켜 만든 단쇄항체를 말하며, 항체의 VH 영역과 VL 영역을 짧은 펩타이드 사슬로 연결한 단일쇄 형태의 항체를 말한다. 상기 용어 "scFv"는 달리 명시되지 않거나, 문맥상 달리 이해되는 것이 아니라면, 항원 결합 단편을 비롯한 scFv 단편을 포함하고자 한다. 이는 통상의 기술자에게 자명한 것이다.
- [59] 본 발명에 따른 에피토프, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본 명세서에 기재된 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물들도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하,

크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

[60] 본 발명은 다른 양태로 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 아미노산을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조할 발현 벡터 및 상기 벡터를 숙주세포에 공동-형질전환하여 제조한 형질전환체에 관한 것이다.

[61] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 전술한 바와 같이 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 본 발명에서 상기 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 4로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있고, 상기 서열번호 4로 표시되는 염기서열과 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미할 수 있다.

[62] 상기 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 항체의 경쇄 및 중쇄 또는 그의 단편을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 폴리뉴클레오티드의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA) 분자일 수 있다.

[63] 상기 발현 벡터의 제작 시에는, 상기 항체를 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(inhancer) 등과 같은 발현 조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.

[64] 본 발명에 따른 발현 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 발현 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에셰리키아속(*Escherichia* sp.)균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙

주가 바실러스속(*Bacillus* sp.)균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(*yeast*)인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [65] 또한 발현 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현 벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.
- [66] 본 발명에 따른 상기 발현 벡터를 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 대장균 또는 효모 세포 등에 형질전환시킨 후, 형질전환된 숙주세포를 배양함으로써 본 발명에 따른 항체를 대량 생산할 수 있다. 숙주세포의 종류에 따른 적절한 배양 방법 및 배지 조건 등은 당해 분야의 통상의 기술자에게 알려진 공지 기술로부터 당업자가 용이하게 선택할 수 있다. 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*) 또는 바실러스 서브틸러스(*Bacillus subtilis*)와 같은 원핵생물일 수 있다. 또한, 사카로마이세스 세르비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모, 곤충 세포, 식물 세포, 동물 세포로부터 유래한 진핵 세포일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 동물 세포는 자가 또는 동종 이계 동물 세포일 수 있다. 자가 또는 동종 이계 동물 세포에 도입하여 제조된 형질전환체는 개체에 투여되어 암을 치료하는 세포치료 등에 이용될 수도 있다. 상기 숙주세포로의 발현벡터 도입 방법은 당업자에게 공지된 어느 방법을 사용해도 무방하다.
- [67] 본 발명은 다른 양태로 상기 TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [68] 본 발명에 따른 TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합단편은 암세포에서 특이적으로 발현되는 TMEM165-CLOCK에 특이적으로 결합할 수 있으므로, 이들을 검출, 진단하기 위한 목적으로 사용될 수 있다. 즉, 상기 조성물은 서열번호 3으로 표시되는 TMEM165-CLOCK 항체를 포함하고, 시료와 항체가 반응함으로써 나타내는 시그널을 분석하여 암 발생의 여부를 진단할 수 있다. 구체적으로 상기 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프 및 이에 특이적으로 결합하는 본 발명에 따른 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합물, 즉 항원-항체 복합체의 형성 여부를 확인하는 과정을 통해 암을 진단할 수 있다. 상기 시그널은 항체에 결합된 효소 예를 들어 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 또는 사이토크롬 P450을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [69] 상기 항원-항체 복합체의 형성은 통상적인 면역분석 방법에 따라 측정할 수 있으며, 상기 TMEM165-CLOCK 단백질에 대한 항체를 이용한 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 면역블롯(immunoblotting), 웨스턴블롯(westernblotting), 면역조직화학염색법(immunocytochemistry) 또는 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)를 통해 검출 측정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [70] 상기 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 암의 발생 유무를 진단할 수 있다. 즉, 의심되는 개체로부터 분리한 시료에서 본 발명의 TMEM165-CLOCK 단백질이 과발현되어 시그널이 정상 개체로부터 분리한 시료보다 강하게 나오는 경우에는 암을 진단할 수 있다.
- [71] 상기 암은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [72] 본 발명의 일실시예에 따르면, 피부섬유육종, 지방 육종, 미분화다형성 육종, 골연골종과 같은 다양한 육종암 조직에서 융합유전자 TMEM165-CLOCK의 특이 발현을 확인하였으며, 육종암 외 유방암, 전립선암, 폐암 세포주에서 TMEM165-CLOCK의 높은 발현이 확인됨에 따라 상기 융합유전자 TMEM165-CLOCK를 암세포 분자표지로 제시할 수 있음을 확인하였다. 이에 본 발명에 따른 TMEM165_CLOCK 특이 항체를 이용하여 암이 의심되는 환자의 시료에서 상기 항원-항체 복합체의 형성 수준을 측정하면 암의 발병 여부를 진단할 수 있다. 일구현예로 TMEM165_CLOCK 특이 항체를 이용한 세포면역화학염색법(ICC)을 실시하여 정상 세포주 및 육종암 세포주 KHOS/NP에 대한 TMEM165-CLOCK 특이항체-항원친화력을 평가하였을 때 KHOS/NP 세포주에서만 특이적으로 녹색 형광의 염색이 관찰되는 것을 확인할 수 있어 본 발명에 따른 TMEM165-CLOCK 특이 항체가 암세포 분자표지 TMEM165_CLOCK를 검출할 수 있으며, 이를 통해 육종암을 진단할 수 있음을 제시하였다.
- [73] 이에 본 발명은 다른 양태로 상기 TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 목적하는 시료와 반응시키는 단계를 포함하는, 암 진단 방법에 관한 것이다.
- [74] 상기 암은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [75] 본 발명은 또 다른 양태로 TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 암은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [76] 본 발명에 따른 상기 조성물은 PBMC 세포 또는 NK 세포를 더 포함할 수 있다.
- [77] 본 발명의 TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역세포의 면역성을 증가시켜 보다 효과적인 암세포 사멸을 유도할 수 있으며, 특히 TMEM165-CLOCK가 과발현되어 있는 암의 치료에 효과적으로 활용될 수 있다. 따라서 본 발명의 TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역치료제, 예컨대 PBMC 세포 또는 NK 세포와 함께 암세포에 처리하는 경우, 보다 효과적인 암 예방 또는 치료효과를 달성할 수 있다.

- [78] 상술한 바와 같이, TMEM165-CLOCK은 암세포나 암 조직에서 과발현되어 있음을 확인하였으며, 본 발명에 따른 TMEM165-CLOCK 항체 또는 이의 단편을 이용한 TMEM165-CLOCK의 억제제는 암을 억제하기 위하여 유용하게 사용될 수 있다.
- [79] 일구현예로 항체 특이적 면역성을 증가시킨 PBMC 세포와 함께 TMEM165_CLOCK 특이 항체를 이용한 형광 유세포 분석법(FACS), 그리고 항체 특이적 면역성을 증가시킨 NK 세포와 함께 TMEM165_CLOCK 특이 항체를 이용한 루시퍼라제 활성 분석법(luciferase activity)을 실시하여 TMEM165-CLOCK를 보유하고 있는 육종암 세포주에 TMEM165_CLOCK 특이 항체를 처리할 경우 세포 사멸이 증가함을 확인하였다.
- [80] 일구현예로 육종암 세포주, TMEM165-CLOCK 과발현 안정화 세포주 및 폐암 세포주를 대상으로 TMEM165_CLOCK 특이 항체를 처리할 경우 세포 증식(cell proliferation)이 억제됨을 확인하였다.
- [81] 일구현예로 TMEM165-CLOCK 과발현 안정화 세포주를 경골내 주사한 마우스에 TMEM165_CLOCK 특이 항체를 처리할 경우 종양의 크기 증가가 억제됨을 확인하였다.
- [82] 상술한 구현예에 따르면 TMEM165_CLOCK 특이 발현 세포주 및 이를 이용한 동물 실험을 통해 본 발명의 TMEM165_CLOCK 특이 항체가 치료 효과를 나타내며 육종암 또는 폐암 세포주에 대한 세포 증식 억제 및 사멸 효과를 확인함으로써 본 발명의 TMEM165_CLOCK 특이 항체는 TMEM165_CLOCK 과발현을 갖는 암종이라면 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [83] 상기 암종은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [84] 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [85] 본 발명에 따른 상기 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 갈화 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예

를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calciumcarbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성 용제, 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오 지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [86] 본 발명에 따른 상기 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하 주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [87] 상기 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 갈화 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.
- [88] 본 발명에 따른 항체는 암환자의 치료를 위하여 단독 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제와 병행하여 사용될 수 있다. 본 발명이 적용 가능한 개체는 척추동물이고 바람직하게는 인간을 포함하는 포유 동물이다.
- [89] 본 발명은 또 다른 양태로, TMEM165-CLOCK 특이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법에 관한 것이다.
- [90] 상기 방법은 상술한 조성물을 이용하므로, 공통된 내용의 반복 기재를 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[91]

발명의 실시를 위한 형태

- [92] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[93]

[94] 실시예 1: TMEM165-CLOCK 융합유전자 스크리닝 및 발현 확인

[95] 1-1. 육종(Sarcoma) 특이 융합유전자 스크리닝

[96] 기관윤리위원회로부터 승인된 인체유래물연구동의서를 획득한 환자로부터 육종암 및 정상 검체를 수집하였다(IRB File No. 2020-02-015-014). 수집한 54개

의 육종암, 정상 조직에서 총 RNA를 추출하고 NGS 분석을 진행한 다음 Defuse, FusionCatcher, Arriba 프로그램의 알고리즘을 활용하여 육종(Sarcoma) 특이적 융합유전자를 발굴하였다.

- [97] 표 1에 나타낸 바와 같이 45개의 육종암 조직 중 TMEM165-CLOCK 융합유전자가 9개(20%)의 육종암 조직에서 발현되고 9개의 정상 조직에서는 전혀 발현되지 않은 것을 확인하고 TMEM165-CLOCK는 육종암 조직 특이성 신생물질(새로운 단백질)을 발현할 것으로 예측하였다.

- [98] [표1]

Fusion transcripts	Sarcoma tumors (n=45)	Normal tissue (n=9)
TMEM165-CLOCK	9(20%)	0(0%)

- [99]

- [100] 1-2. TMEM165-CLOCK의 육종 조직 발현 검증

- [101] 상기 결과를 통해 TMEM165-CLOCK이 육종암을 진단하는 마커로 활용가능할 것으로 예상하고 다양한 종류의 육종 조직에서 PCR을 수행하여 TMEM165-CLOCK 융합유전자의 발현을 확인하였다. TMEM165-CLOCK 융합유전자의 융합 접합(fusion junction) 구간이 포함되도록 정방향, 역방향 프라이머를 제작(바이오닉스, 서울, 한국)하여 PCR 반응에 이용하였다.

- [102] PCR primer F:GCTCTTACATTAACATTCT(서열번호 5),

- [103] PCR primer R:AGTCATCTCAAAGTTCAA(서열번호 6)

- [104] 도 1에 정상 세포와 다양한 육종 조직에서의 TMEM165-CLOCK 발현 수준을 나타냈다. 도 1의 상단 이미지를 살펴보면, 정상조직(레인 1 및 레인 2)과 비교하였을 때 레인 3의 피부섬유육종(Dermatofibrosarcoma protuberans) 및 레인 4의 미분화다형성육종(UPS) 조직에서 TMEM165-CLOCK 융합유전자가 현저히 발현되는 것을 확인할 수 있다.

- [105] 또한 도 1의 하단 이미지를 살펴보면, 레인 1의 피부섬유육종(Dermatofibrosarcoma protuberans), 레인 2의 지방육종(Low-grade liposarcoma), 레인 3의 미분화다형성육종(UPS), 레인 4의 거대세포종양(Giant cell tumor) 및 레인 5의 골연골종(Osteochondroma) 조직에서 TMEM165-CLOCK 융합유전자의 높은 발현 수준이 확인되었다.

- [106] 상기와 같은 결과를 통해 TMEM165-CLOCK 융합 유전자가 피부섬유육종, 지방육종, 미분화다형성육종, 골연골종과 같은 다양한 육종암에서 발현됨을 확인하였다.

- [107]

- [108] 1-3. TMEM165-CLOCK의 육종암 외 암 세포주 발현 확인

- [109] 실시예 1-2와 동일한 방법으로 PCR 반응을 수행하여 육종암을 포함한다양한 암 세포주에서 TMEM165-CLOCK 융합유전자의 발현 정도를 확인하였다.

- [110] 도 2a에서 보는 바와 같이, 레인 1 내지 4의 육종암 세포주(KHOS/NP, U2OS, MG63 143B), 레인 5의 유방암 세포주(SK-BR3) 및 레인 6의 전립선암 세포주(PC3)에서 TMEM165-CLOCK 융합유전자의 특이 발현이 나타나는 것을 확인하였다.
- [111] 또한 도 2b를 살펴보면, 폐암세포주(NCI-H1299, NCI-H1437, NCI-H1793, HCC827, NCI-H23)에서 TMEM165-CLOCK 융합유전자의 발현이 확인되었다.
- [112] 상기와 같은 결과를 통해, TMEM165-CLOCK 융합 유전자가 육종암, 전립선암, 유방암, 폐암에서 높게 발현되어 있으며, 이들을 검출할 수 있는 제제가 상기 암종을 진단할 수 있음을 확인하였다.

[113]

[114] **실시예 2: 표적 항원 펩타이드의 합성**

- [115] TMEM165-CLOCK를 검출할 수 있는 제제를 생산하기 위하여, 이를 제조하기 위한 표적 항원을 제조하였다. TMEM165 유전자는 정방향(5'→3'), CLOCK 유전자는 역방향으로 전사되어 결합된 형태의 TMEM165-CLOCK 융합유전자의 서열을 정렬하였다. 도 3a를 살펴보면, NGS 분석을 진행 후 분석 프로그램의 알고리즘에 의해 예측되어진 TMEM165-CLOCK의 염기서열(서열번호 4) 말단 부분의 파란색 표시(하단 이미지 * 기호의 우측)에 나타낸 바와 같이 NCBI에 보고된 TMEM165(Homo sapiens transmembrane protein 165; NM_018475.5)의 서열(상단 이미지)과 상이한 것을 확인할 수 있다. 아울러 도 3b에 나타낸 바와 같이 TMEM165-CLOCK의 아미노산 서열(서열번호 3)을 비교하여 볼 때 1-299번째 아미노산까지 동일하고 300-321번째 아미노산 서열이 상이한 것을 확인할 수 있다. 상기 차이가 있는 300-321번째 아미노산까지의 서열(하기 서열번호 1)을 항원 특정 부위로 결정하고 펩타이드 제작(세렌텍, 한국)을 진행하였다.

- [116] TMEM165 300-321 aa: GSFSPWLILHACSDGKGHLERN (서열번호 1)

- [117] 서열 분석 결과를 바탕으로 상기 펩타이드 서열 'GSFSPWLILHACSDGKGHLERN(서열번호 1)'을 고체상 펩타이드 합성(Solid Phase Peptide Synthesis) 방법을 이용하여 C-말단부터 합성을 수행하였다. 펩타이드 합성 시 2종류의 캐리어 단백질(BSA, KLH)을 접합(Conjugation)하여 파지 디스플레이(phage display)용으로 제작하여 최종 에피토프(Epitope)를 얻었다. 도 3c에 TMEM165-CLOCK의 개략도 및 도 3d에 합성 펩타이드의 3D 구조를 나타냈다.

[118]

[119] **실시예 3: TMEM165-CLOCK 특이 항체 개발**

[120] 3-1. 항 TMEM165-CLOCK 단클론 항체의 scFv 제작 및 선별

- [121] 단쇄가변단편(Single-chain variable fragment; scFv) 항체 라이브러리를 디스플레이하는 파지를 구축하고 실시예 2에서 합성한 에피토프에 대해 바이오패닝(Biopanning)을 수행하였다. 파지디스플레이 라이브러리의 경우 바이오니아(한국)에서 제공하는 인간 라이브러리를 선택하여 진행하였다.

- [122] 구체적으로, 합성된 펩타이드 서열 'GSFSPWLILHACSDGKGHLERN(서열번호 1)'을 항원으로 항체 라이브러리의 파지가 고정된 표적과 함께 배양한 다음 항원에 결합하지 않은 파지를 걸러냈다. 항원에 결합하는 클론 풀(Clone pool)이 형성되면 높은 친화성을 나타내는 파지를 추출하고 싱글 콜로니를 구분하여 각각 접종하였다. 추출한 파지는 *E.coli* 숙주 세포와 함께 배양되어 감염(infection) 및 증폭(amplification)이 된 상태이므로 감염된 박테리아의 콜로니를 플레이트에서 배양하였다. 각 콜로니에서 생성된 단일클론 scFv에 대해 상기 에피토프를 이용하여 ELISA를 진행하고 O.D 값이 1.0 이상 나오는 클론(Positive clone)을 선별하였다.
- [123]
- [124] 3-2. 항 TMEM165-CLOCK 단클론 항체의 서열 분석
- [125] 상기 선별한 클론으로부터 제조된 단클론 항체의 Phagemid DNA를 얻은 scFv의 5', 3'-올리고뉴클레오타이드를 이용하여 서열 분석을 진행하였다. 양방향에서 읽힌 서열의 공통부위를 종합하여 scFv의 최종 서열을 파악 (ABI3730XL, Sanger-method sequencing, Phred Score ≥ 20)하고 하기 서열번호 2로 표시되는 TMEM165_CLOCK 항체 서열을 확립하였다.
- [126] Anti- TMEM165_CLOCK scFv 폴리펩타이드(서열번호 2):
 ELELTQPPSVSAAPGQEV TISCSGGNSNLGKNAASWYQQ
 VPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGL
 QTGDEADYYCGTWD SRLRGWVF GGGTQLTVLGGGSSRSSS
 SGGGGSGGGGQVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFG
 DYAMSWVRQAPGKGLEWVG FIRSKAYGGTTEYAASVKGRF
 TISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRSARRSLNSGY
 FDYWGQGT LVT VSSASPTSPKVTSG
- [127]
- [128] 실시예 4: TMEM165-CLOCK 특이 항체를 이용한 육종암 진단
- [129] 상기 실시예 3을 통해 제조된 TMEM165_CLOCK 항체를 이용한 세포면역화학염색법(ICC)을 실시하여 TMEM165-CLOCK 특이항체-항원친화력을 평가하였다.
- [130] 먼저 인간 제대 정맥 내피세포 HUVEC 세포 2.5×10^4 cell/well, 육종암 세포주 KHOS/NP세포 5×10^4 cells/well를 접종 후 37°C 인큐베이션에서 밤새 배양하였다. 75 μ l의 opti-MEM 배지(Gibco)에 TMEM165-CLOCK 플라스미드 DNA 1 μ g과 플러스 시약 1 μ l를 넣고, 75 μ l의 opti-MEM 배지(Gibco)에 4 μ l의 리포펙타민 LTX(Invitrogen, 미국)을 넣은 후 섞어 20분 반응 후 KHOS/NP 세포에 처리하고 37°C 인큐베이션에서 배양하고 4시간 후 배지를 교체하였다. 그 다음 48시간 37°C 인큐베이션에서 배양 후 4% 파라포름알데히드를 이용하여 RT에서 10분 동안 고정시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 그리고 나서 0.5% Tx-100을 이용하여 RT

에서 10분동안 세포투과(Permeabilize)시키고 PBS로 3회 씻어냈다. 그 다음 5% BSA로 RT에서 30분동안 블로킹 후 항체를 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 RT에서 3-4시간 반응시키고 PBS로 3회 세척하였다. 2차 항체(Alexa fluor 488 goat anti-human IgG, Invitrogen, 미국)를 1:500 비율로 RT에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고 DAPI가 포함된 마운팅 용액을 떨어뜨려 마운팅(Mounting)한 다음 공초점 현미경을 통해 세포를 관찰하였다.

- [131] 도 4에서 왼쪽의 HUVEC 세포는 TMEM165_CLOCK 융합 유전자의 발현이 없는 정상 세포주이고 가운데 KHOS/NP 세포주는 TMEM165_CLOCK 융합유전자를 발현하는 육종암 세포주, 우측의 세포주는 KHOS/NP 세포주에 TMEM165_CLOCK 융합유전자를 과발현 시킨 세포주이다. 이를 살펴보면 TMEM165_CLOCK 융합유전자가 발현되는 KHOS/NP 및 KHOS/NP_TM165_CLOCK 세포주에서만 특이적으로 녹색 형광의 염색이 관찰되는 것을 확인할 수 있어 본 발명에 따른 TMEM165-CLOCK 특이 항체가 TMEM165_CLOCK를 검출할 수 있으며, 이를 통해 육종암을 진단할 수 있음을 확인하였다
- [132]
- [133] 실시예 5: TMEM165-CLOCK 특이 항체를 이용한 암세포 억제
- [134] 5-1. 육종암 세포 사멸
- [135] 실시예 3을 통해 제조된 TMEM165-CLOCK 특이 항체가 PBMC세포의 항체 특이적 면역성을 증가시켜 TMEM165_CLOCK 발현 암세포를 특이적으로 파괴시키는 것을 형광 유세포 분석법(FACS; Fluorescence-activated cell sorting)을 이용하여 확인하였다.
- [136] 육종암 세포주 KHOS/NP_control_luc(대조군), 육종암 세포주에 TMEM165_CLOCK 융합유전자를 과발현 시킨 KHOS/NP_TM165-CLOCK_luc(실험군) 세포(EMEM 배지, hyclone)를 100 mm dish에서 70~80%일 때 CFSE(dojindo, 일본)로 37°C에서 20분 염색하였다. 대조군 KHOS/NP_control_luc 및 실험군 KHOS/NP_TM165-CLOCK_luc 세포를 3×10^5 cells/100 mm dish에 접종하고 PBMC(stemexpress, 미국)을 1:1 비율로 공배양(접종)한 다음 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 dish 및 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 처리하지 않은 dish를 37°C 인큐베이션에서 밤새 배양하였다.
- [137] 그 다음 세포를 수확하여 FVD(Fixable Viability Dye eFluor™ 780, Invitrogen, 미국)로 4°C에서 20분 염색하고 2% FBS가 포함된 PBS로 2회 세척 후 FACS를 이용하여 세포 사멸을 측정하였다.
- [138] 도 5a의 가운데 이미지(Ab_0 $\mu\text{g/ml}$)는 항체를 넣어주지 않은 경우이며 이 때 7.4 %의 세포 사멸이 관찰되나, 항체를 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 경우의 오른쪽 이미지(Ab_0.1 $\mu\text{g/ml}$)를 살펴보면 세포 사멸이 45.5 %로 증가되는 것을 확인할 수 있다.

- [139] 이는 TMEM165-CLOCK 특이 항체가 PBMC세포의 항체 특이적 면역성을 증가시켜 TMEM165_CLOCK 발현 암세포에 대한 암세포 사멸 활성을 증가시킬 수 있음을 보여주는 결과이다.
- [140]
- [141] 실시예 3을 통해 제조된 TMEM165-CLOCK 특이 항체가 NK세포의 항체 특이적 면역성을 증가시킬 수 있는지, 세포생존도를 루시퍼라제 활성도(luciferase activity)를 통하여 확인하였다.
- [142] 육종암 세포주에 TMEM165_CLOCK 융합유전자를 과발현 시킨 KHOS/NP_TM165-CLOCK_luc 세포를 1×10^4 cells/96 well 플레이트에 접종하였다. 그 다음 NK-92 세포(MyeloCult H5100 media, Stemcell Technologies, 캐나다)를 1:1 비율로 공배양(접종)하고 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 $5 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 96 well 플레이트 및 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 처리하지 않은 96 well 플레이트를 37°C 인큐베이션에서 밤새 배양하였다. 그 다음 세포를 수확하여 루시퍼라제 활성도를 측정(promega, 미국)하였다.
- [143] 도 5b의 암세포 생존율을 살펴보면, TMEM165-CLOCK를 과발현시킨 KHOS/NP_TM165-CLOCK_luc의 경우 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 처리하지 않은 Ab._0과 비교하여 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 $5 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 Ab._5에서 항체에 의한 세포 생존율의 감소가 20% 나타나는 것을 확인하였다.
- [144]
- [145] 5-2. 육종암 및 폐암 세포 증식 억제
- [146] 육종암 세포주(KHOS/NP), TMEM165-CLOCK 과발현 안정화 세포주(KHOS/NP_TM165-CLOCK) 및 폐암 세포주(NCI-H1793)를 3×10^3 cell/96 well로 seeding 하여 24시간이 지난 후 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 MTS assay를 실시하였다.
- [147] 도 6의 a~c를 살펴보면, 육종암 세포주(KHOS/NP), TMEM165-CLOCK 과발현 안정화 세포주(KHOS/NP_TM165-CLOCK) 및 폐암 세포주(NCI-H1793) 모두 TMEM165-CLOCK 특이 항체 처리에 의해 세포 증식(cell proliferation)이 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있다.
- [148] 실시예 5를 통해 본 발명에 따른 TMEM165-CLOCK 특이 항체는 육종암, 폐암 세포의 증식 억제 및 사멸 유도를 할 뿐만 아니라 TMEM165-CLOCK 과발현 세포의 성장을 억제함으로써 TMEM165-CLOCK 과발현을 갖는 암세포에 대해 치료적 유용성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [149]
- [150] **실시예 6: TMEM165-CLOCK 특이 항체를 이용한 종양 억제**
- [151] 실시예 3을 통해 제조된 TMEM165-CLOCK 특이 항체의 항종양 효과를 in vivo 에서 규명하였다.

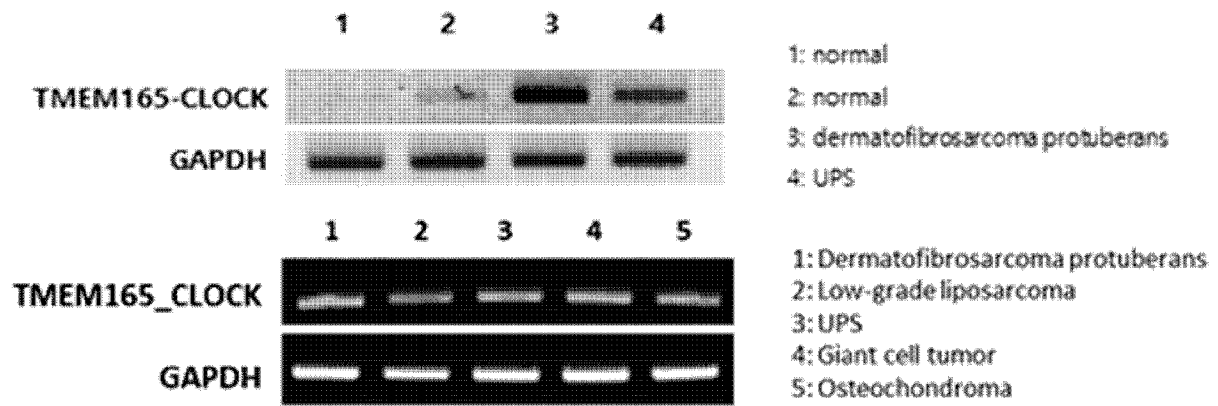
- [152] TMEM165-CLOCK 과발현 안정화 세포주를 6주령 balb/c-nude 마우스에 1×10^5 cells/mouse로 정강이뼈(tibia bone)내에 주사하였다. 대조군(Control)은 1 x PBS를 주입하고, 실험군(TMEM165-CLOCK Ab.)은 TMEM165-CLOCK 특이 항체를 0, 3, 6, 9일(총 4회) 0.4 mg농도로 주입한 다음, 13일차까지 종양의 크기를 비교하였다.
- [153] 도 7의 a 및 b를 살펴보면, 대조군(Control)은 종양 크기의 시간 의존적 증가가 현저히 높은 것과 비교하여 실험군(TMEM165-CLOCK Ab.)은 종양 크기의 증가가 낮게 나타남을 확인하였다.
- [154] 실시예 6을 통해 본 발명에 따른 TMEM165-CLOCK 특이 항체는 TMEM165-CLOCK 과발현을 갖는 암종에 대해 직접적인 항종양 효과를 나타냄을 입증하였다.

청구범위

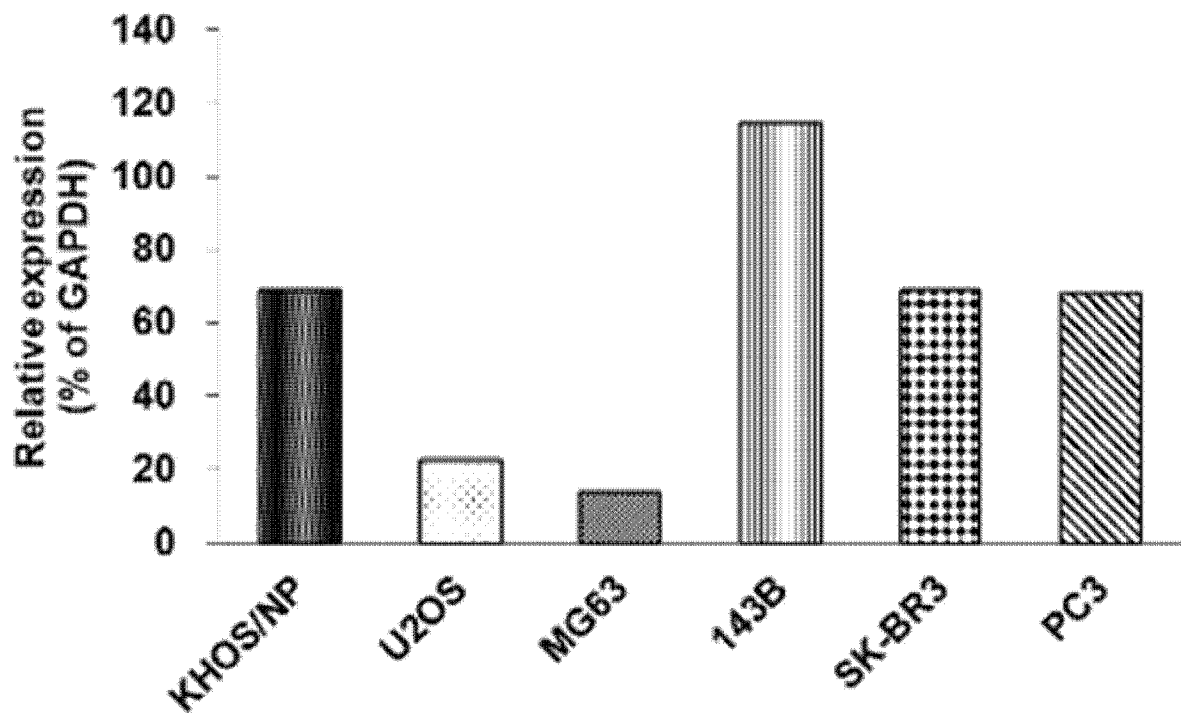
- [청구항 1] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, TMEM165-CLOCK 항체 에피토프.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 에피토프는 서열번호 3으로 표시되는 TMEM165-CLOCK 융합단백질의 300-321번째 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함하는, TMEM165-CLOCK 항체 에피토프.
- [청구항 3] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 TMEM165-CLOCK 항체 에피토프에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv, Fv, scFv 이량체, 디아바디(diabody) 및 선형 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 항체는 단일쇄 항체(scFv)인 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 7] 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 TMEM165-CLOCK 특이적 단일쇄 항체(scFv) 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 8] 제7항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 9] 제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 재조합 발현 벡터.
- [청구항 10] 제9항의 벡터로 형질전환된, 형질전환체.
- [청구항 11] 제3항 또는 제7항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암의 진단용 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 암은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것인, 암의 진단용 조성물.
- [청구항 13] 제3항 또는 제7항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 암은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것인, 암의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 조성물은 PBMC 세포 또는 NK 세포를 더 포함하는 것인, 암의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 16] 제3항 또는 제7항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 목적하는 시료와 반응시키는 단계를 포함하는, 암 진단 방법.

- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 암은 위암, 대장암, 신장암, 혈액암, 육종암, 난소암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 췌장암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것인, 암 진단 방법.
- [청구항 18] 제3항 또는 제7항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 방법.

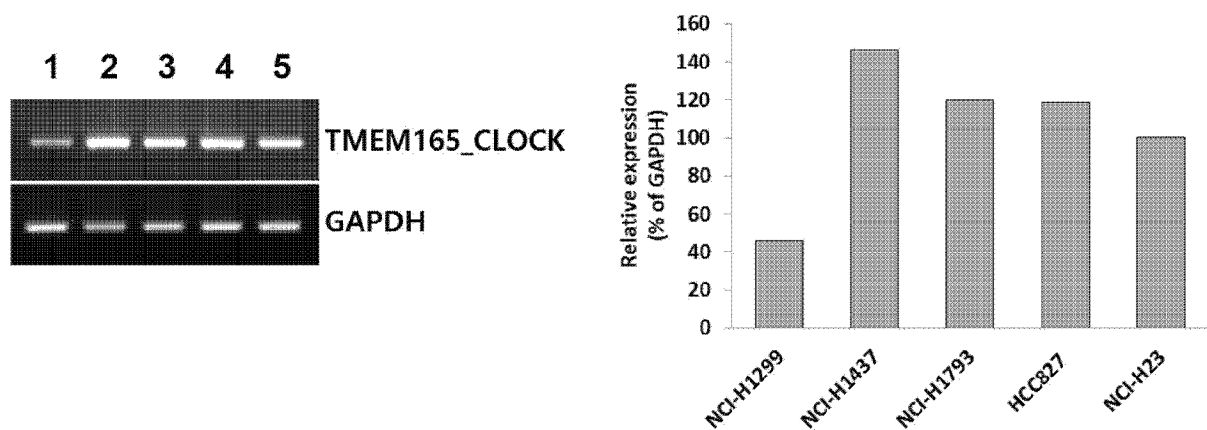
[도1]



[도2a]



[도2b]



[도3a]

Homo sapiens transmembrane protein 165 (TMEM165); transcript variant 1, mRNA
NCBI Reference Sequence: NM_018475.5

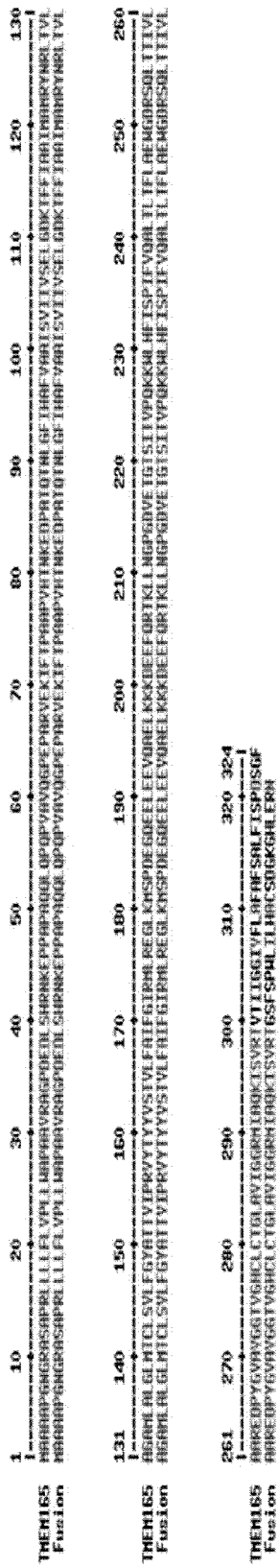
>NM_018475.5 Homo sapiens transmembrane protein 165 (TMEM165); transcript variant 1, mRNA

GACTCCAGTTTAGCCGCCGCCGGAGAGGACGGGCGCCGAGCCGGGCTGCGGACTTCGGCCTGCCCTCACCTCACTCCGCTGCTTGACCTCCCGGATGGTGTGACTGCT
CCCTAAGCGGCGCGCGCGGAGTCTGTAGGACGCCCGCGGAGGCTGTTGGGGTTCGAGGCTTCCCGTCGCCCGGCACTTCTCTTGGCGCGCCCGTGCAGCGCGCGGCCG
GCAGGCGGGATGGCGGCGCGGCTCCAGGGAACGGCGCGCATCGGCGCCCGGCTGCTTCTGCTCTTTCTGGTTCCGCTGCTGTGGGCCCCGGCTGCAGTCCGGGCGG
GCCCAGATGAAGACCTTAGCCACCGGAACAAAGAACCGCGCGCGGCCAGCAGCTGCAGCCGAGCCTGTGGCTGTGCAGGGCCCCGAGCCGGCCCGGTCGAG
AAAATATTACACCAGCAGCTCCAGTTCATACCAATAAAGAAGATCCTGCTACCCAACTAATTGGGATTTATCCATGCATTGTGCTGCCATATCAGTTATTATTGTA
TCTGAATTGGGTGATAAGACATTTTTATAGCAGCCATCATGGCAATGCGCTATAACCGCTGACCCTGCTGGCTGGTGGCAATGCTTGCCTGGGACTAATGACATGCTT
GTCAGTTTTGTTGGCTATGCCACCACAGTCATCCCAGGGTCTATACATACTATGTTTCAACTGTATTATTGCCATTTTGGCATTAGAAATGCTTCGGGAAGGCTTAA
GATGAGCCCTGATGAGGGTCAAGAGGAACTGGAAGAAGTTCAAGCTGAATTAAGAAAGAAAGATGAAGAATTTCAACGAACCAAACTTTAAATGGACCGGGAGATG
TTGAAACGGGTACAAGCATAACAGTACCTCAGAAAAAGTGGTTGCATTTTATTTCAACCAATTTTGTTCAGCTCTTACATTAACTTTAGCAGAATGGGGTATCGC
TCTCAACTAACTACAATTGATTGGCAGCTAGAGAGGACCCCTATGGTGTAGCCGTGGGTGGAACCTGTGGGCACTGCCTGTGCACGGGATTGGCAGTAATTGGAGGA
AGAATGATAGCACAGAAATCTCTGTCAAGACTGTGACAATCATAGGAGGCATCGTTTTTGGCGTTTGCATTTCTGCACTATTATAAGCCCTGATTCTGGTTTTAAACAAG
CTGTTTGTCTATATTAGTTTAAATAGGTAGTATTCTTTCTGTACATAGTGTACATTACAATAAAAGTGATGGAAAAAATCTGATTTTGTAGCACTGATTTTGTAGTTT
GACCCATTATTATGCTGAGATATAATCAITGATTCTATTTGTAACAAGGAGTTTTAAAGAAACCTGACCTTCAAGTGTGGGTTTTCTTCTCTCAACATAATTATGTAATATGGT
CCTCATTTTCTTTGGTGCAGAACCGTGTGCAGTGGGGTCTACCATGCAATTTTCTTCAAGCACTGACCCCTTTTAAAGGAATACAAATTTCTCTTCACTACCTAGGTGTTTTAA
GATGTTTACCTAAAGTTTTCTTGGGGAAGAATGAATTAATTTCTATTCTTAAACATTTCCCTGAGCCAGTAAACAGTAGTTAATCATTGGTCTTTTCAAACTAGGTGTTTAA
AAAAAGAGACATATATGATATTGCTGTTATATCAATAACATGGCACAACAAGAACTGTCTGCCAGGTCACTTCTCTCTTTTAAATGGGTAGGACCCCAATATAAAACA
GTCAATTTTGACAATGTGAATTACCAAAATTAAGAGAAATCATGAATGTATTCTATATTGAATAAACAATGTAACATAGATAACAATATAAATAAAGTGGTAT
GACCACTG

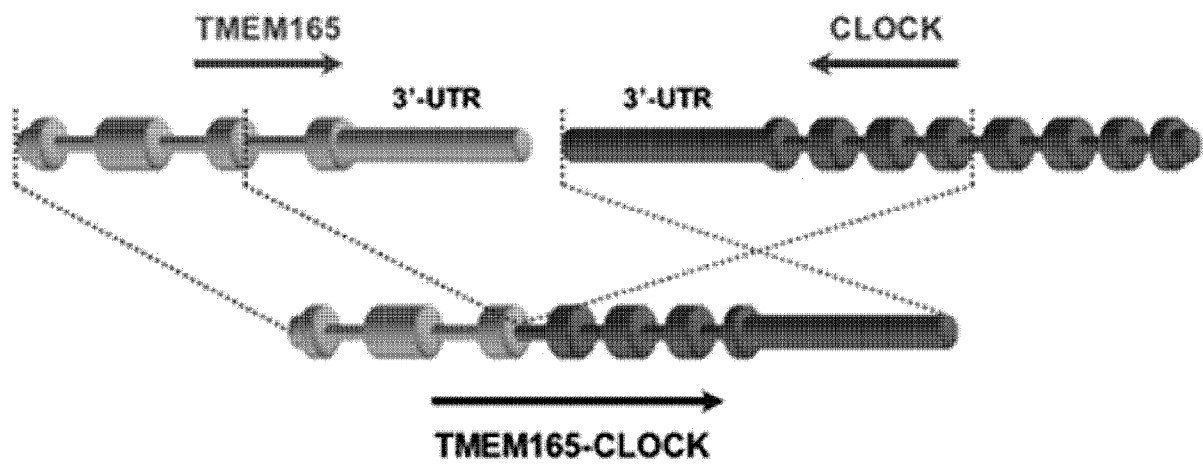
TMEM165**CLOCK* (NGS 분석을 진행 후 분석 프로그램의 알고리즘에 의해 예측되어진 서열정보)

ATGGCGGCGCGGCTCCAGGGAACGGCGCGCATCGGCGCCCCGGCTGCTTCTGCTCTTTCTGGTTCCGCTGCTGTGGGCCCCGGCTG
CGGTCCGGGCGCGCCAGATGAAGACCTTAGCCACCGGAACAAAGAACCGCGCGCGCGCCGAGCAGCTGCAGCCGCGAGCCTGTG
GCTGTGCAGGGCCCCGAGCCGGCCCGGTCGAGAAAAATTTACACCAGCAGCTCCAGTTCATACCAATAAAGAAGATCCTGCTACC
CAAACTAATTTGGGATTTATCCATGCATTTGTGCTGCCATATCAGTTATTATTGTATCTGAATTGGGTGATAAGACATTTTTATAGC
AGCCATCATGGCAATGCGCTATAACCGCTGACCCTGCTGGCTGGTGAATGCTTGCCTTGGGACTAATGACATGCTTGTCAAGTTTTG
TTTGGCTATGCCACCACAGTCATCCCAGGGTCTATACATACTATGTTTCAACTGTATTATTGCCATTTTGGCATTAGAAATGCTTCGG
GAAGGCTTAAAGATGAGCCCTGATGAGGGTCAAGAGGAACTGGAAGAAGTTCAAGCTGAATTAAGAAGAAAGATGAAGAATTTT
AACGAACCAAACTTTTAAATGGACCGGGAGATGTTGAAACGGGTACAAGCATAACAGTACCTCAGAAAAAGTGGTTGCATTTTATTT
CACCCATTTTGTTCAGCTCTTACATTAACATTCTTAGCAGAATGGGGTGATCGCTCTAACTAACTACAATTGATTGGCAGCTAGA
GAGGACCCCTATGGTGTAGCCGTGGGTGGAACGTGCGGCACTGCTGTGCACGGGATTGGCAGTAATTGGAGGAAGAATGATAGC
ACAGAAAAATCTCTGTCAAGACTG*GTAGTTTCTCTCCCTGGCTCATCTTGCATGCTTGTCTGATGGAAAAGGTCACCTGGAAGGAA
CTGA

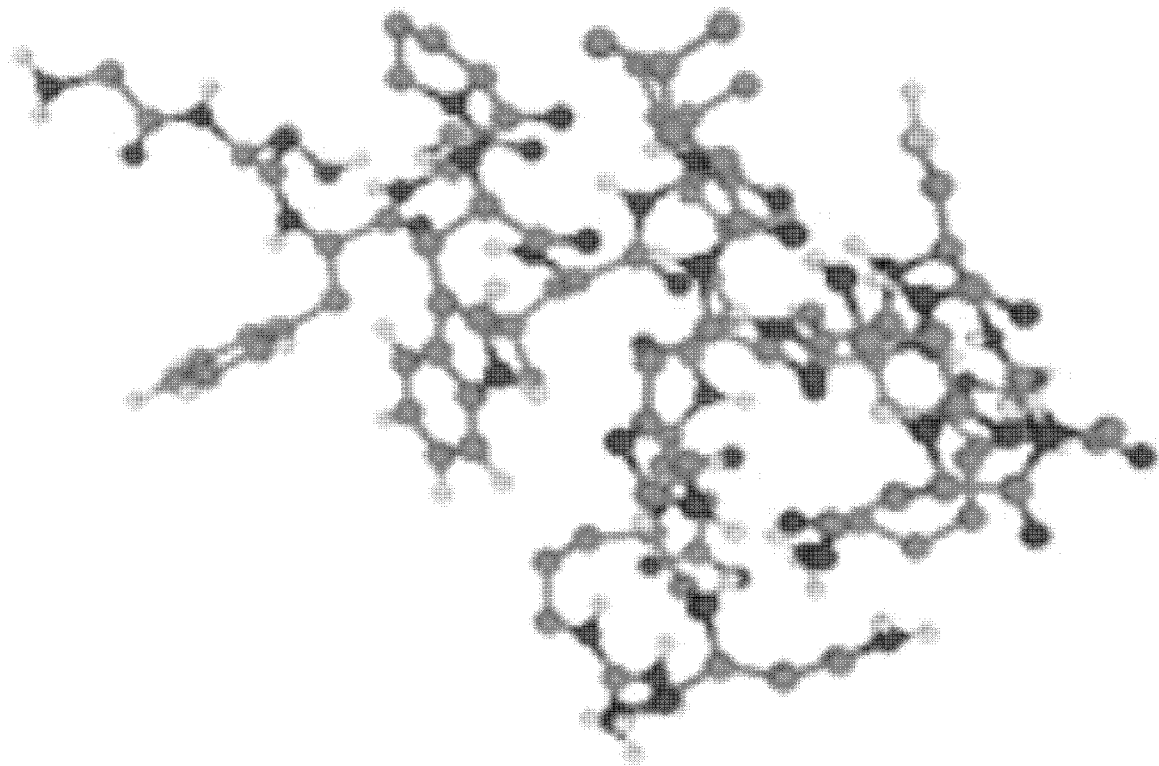
[도3b]



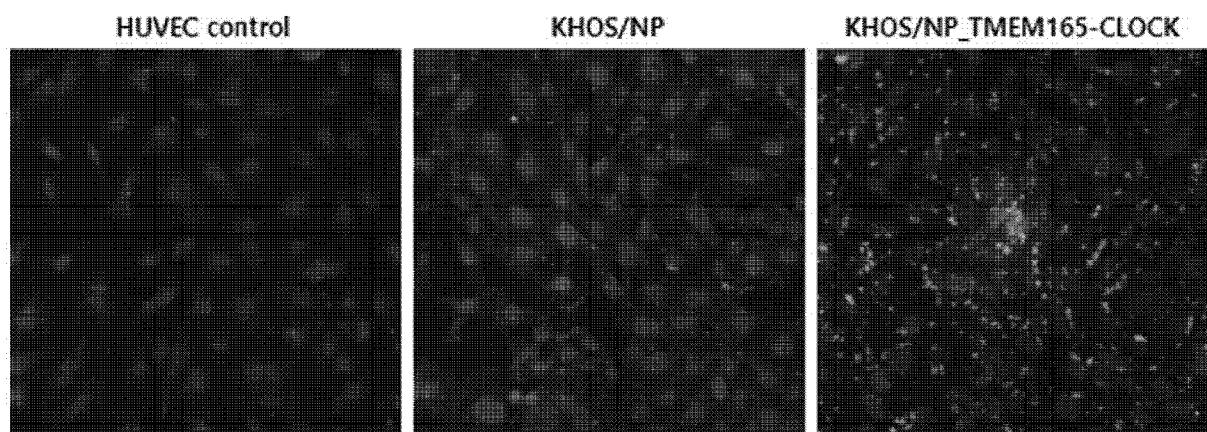
[도3c]



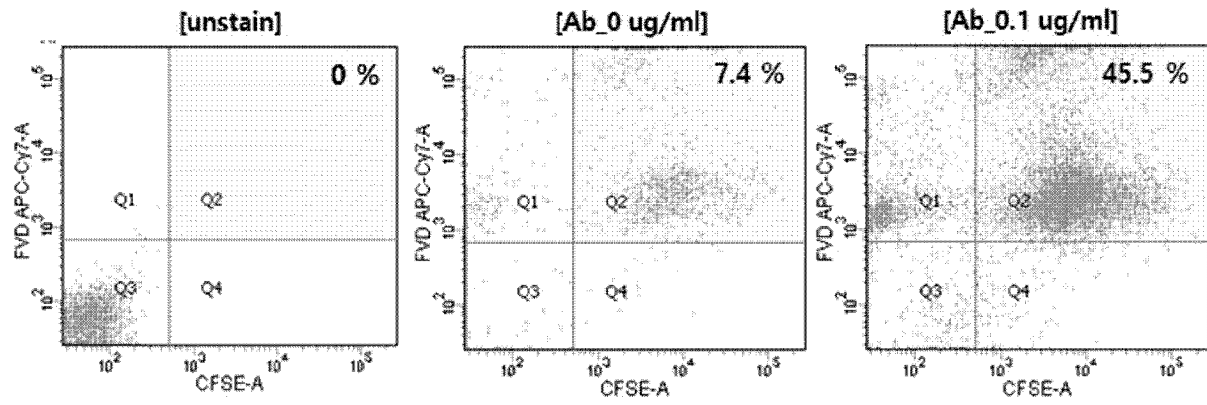
[도3d]



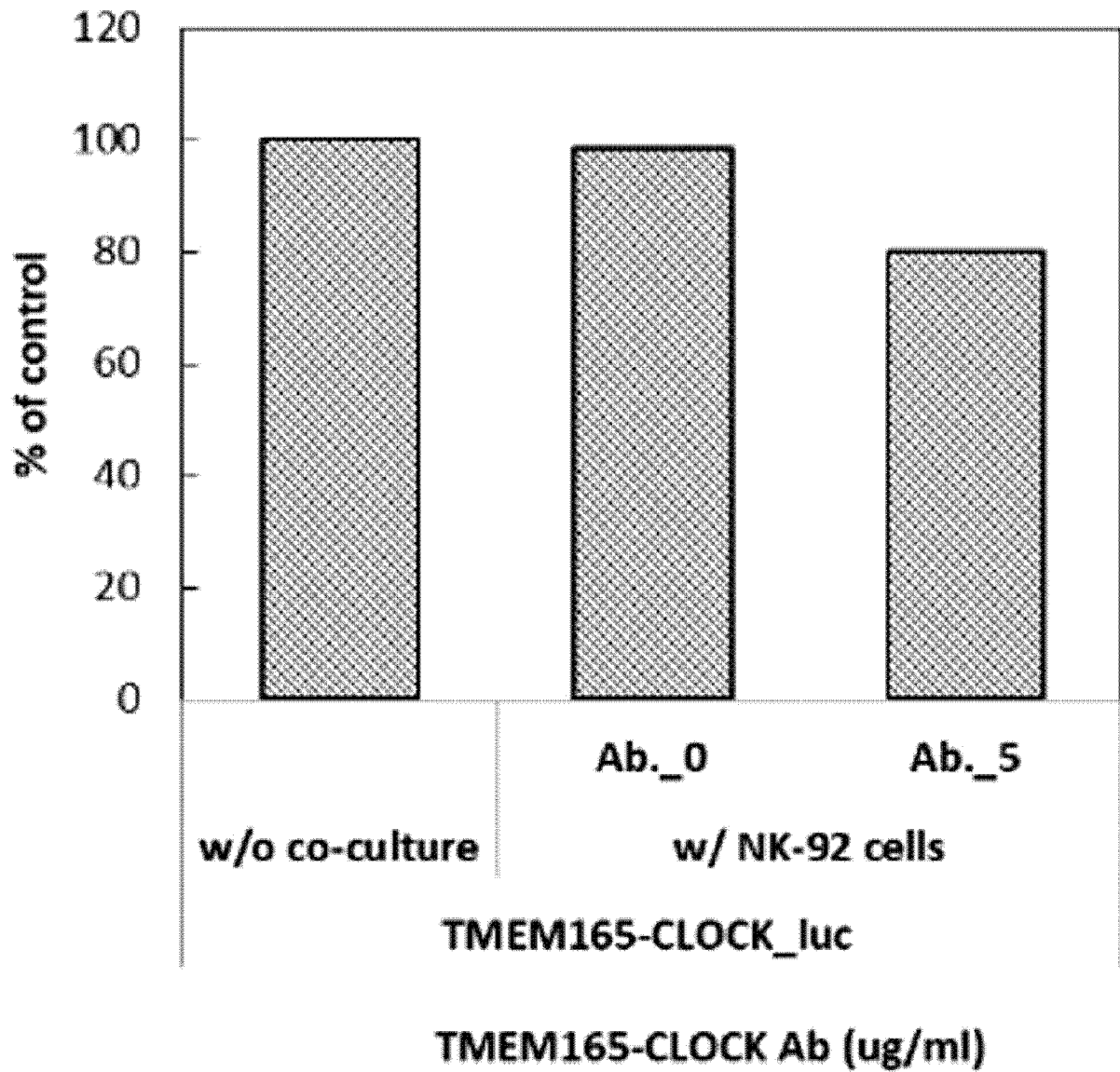
[도4]



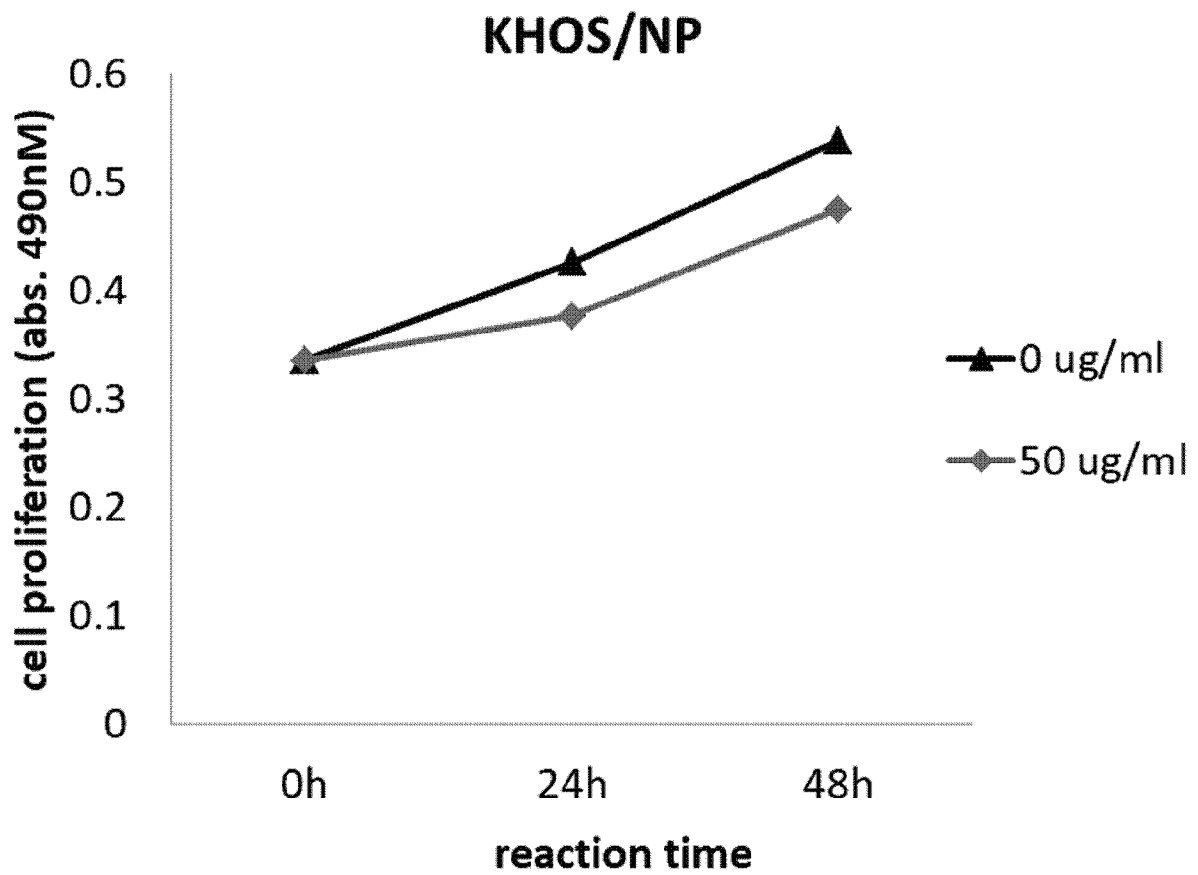
[도5a]



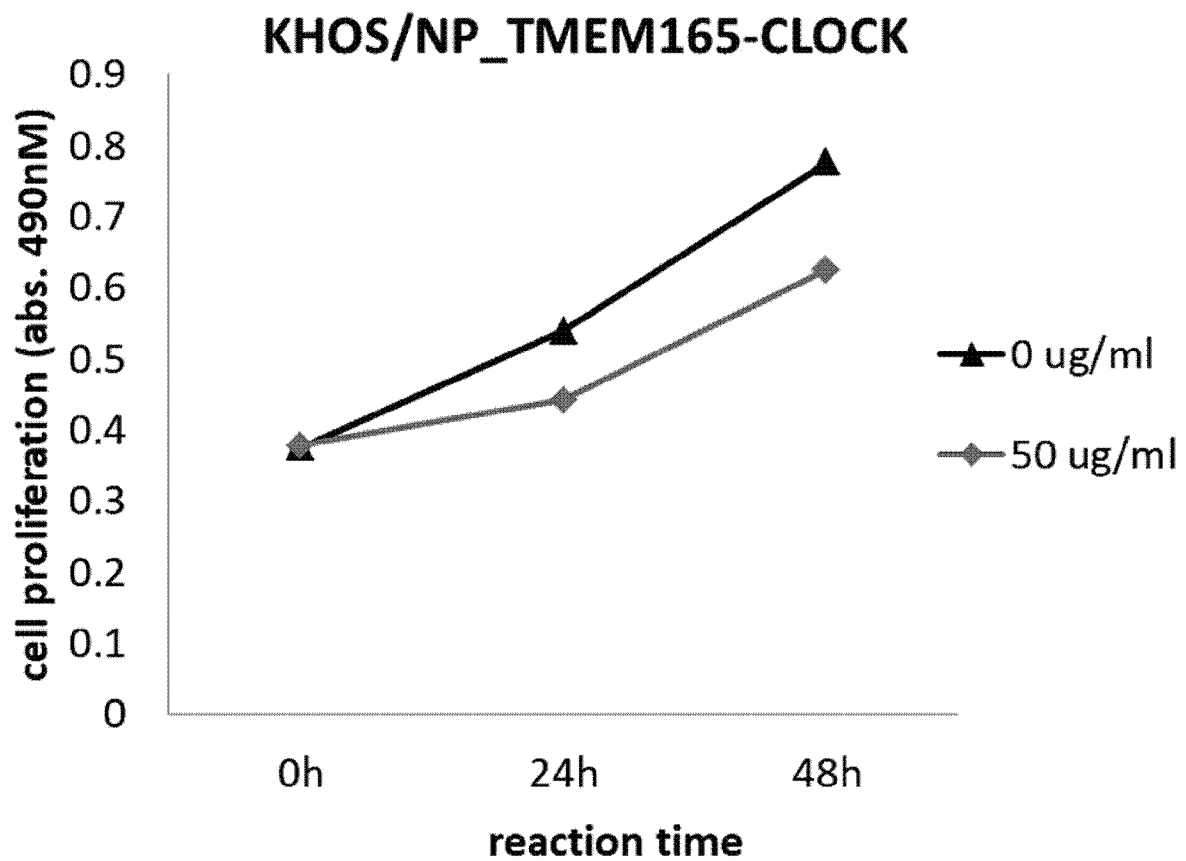
[도5b]



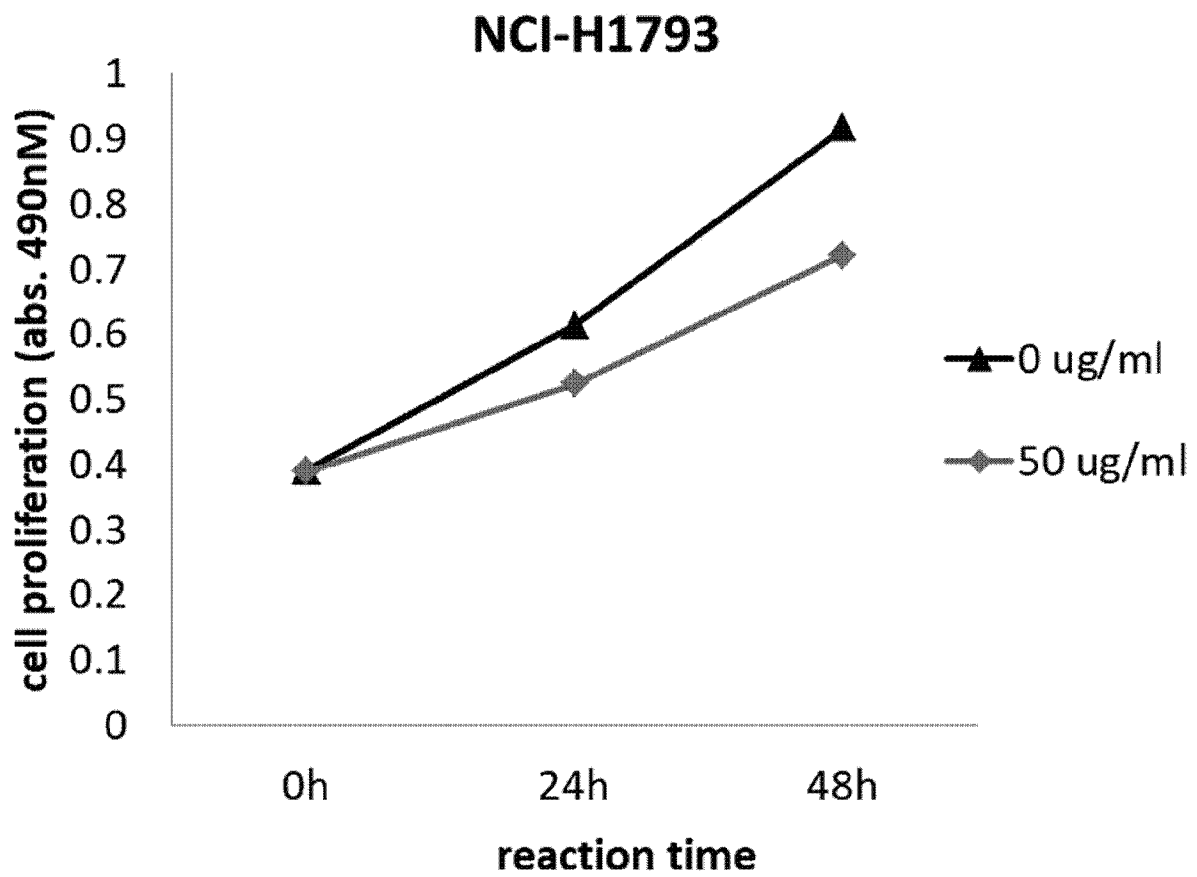
[도6a]



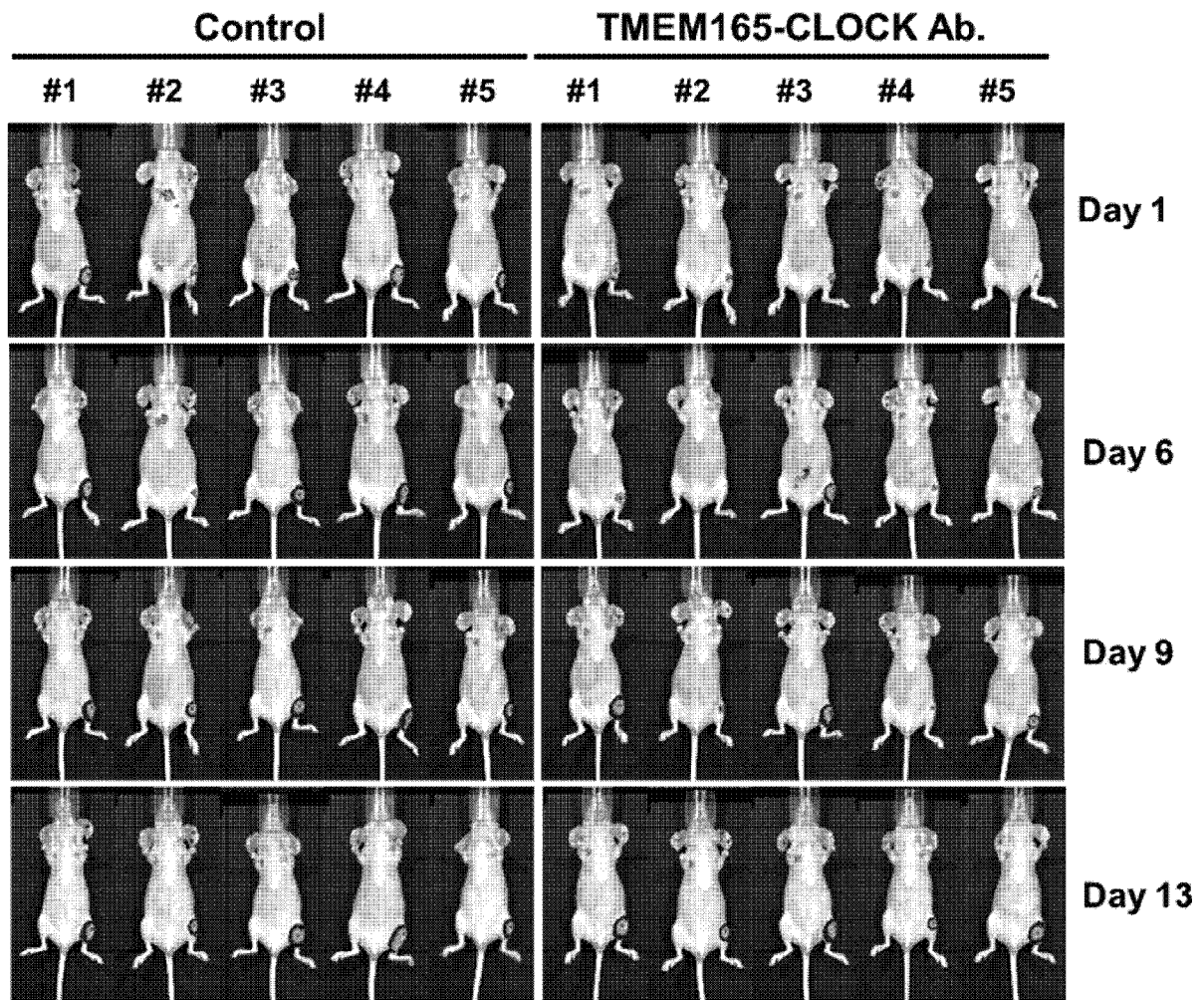
[도6b]



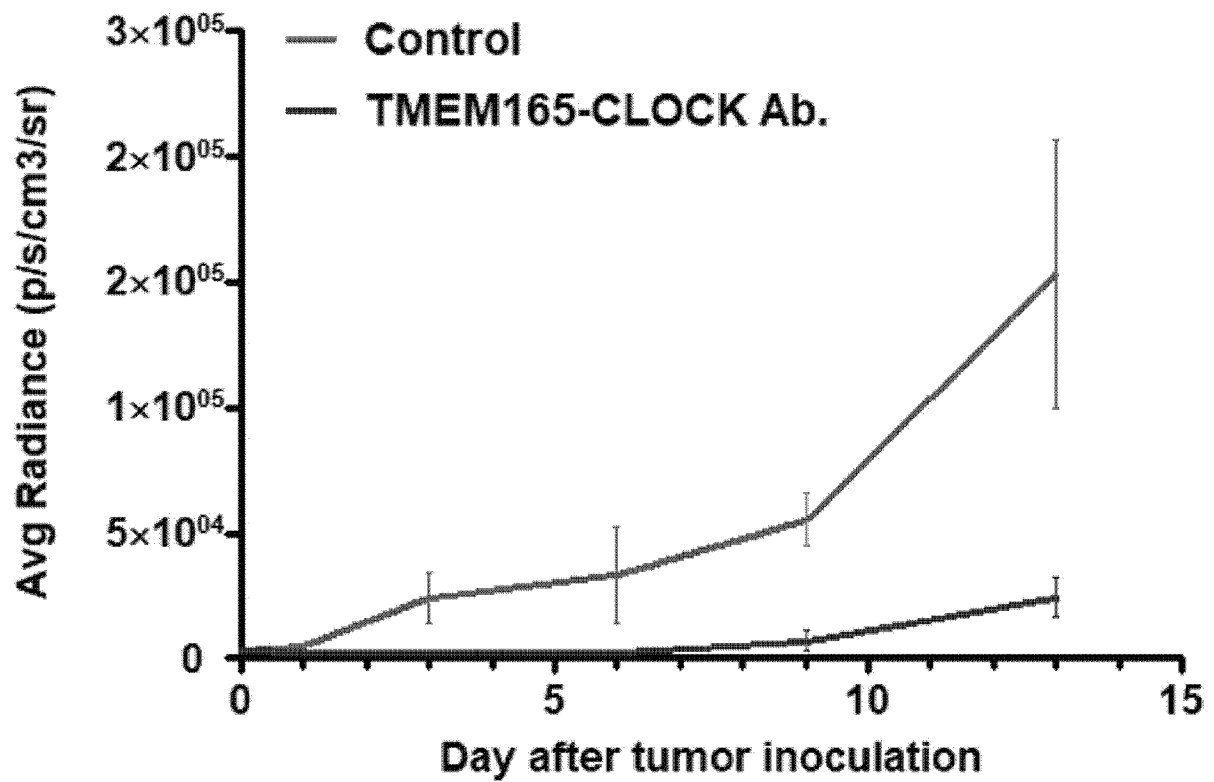
[도6c]



[도7a]



[도7b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009849

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 14/47(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/47(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: TMEM165-CLOCK 항체(TMEM165-CLOCK antibody), 에피토프(epitope), 암(cancer), 벡터(vector), 형질전환체(transformant)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RATHE, Susan K. et al. Identification of candidate neoantigens produced by fusion transcripts in human osteosarcomas. Scientific Reports. 23 January 2019 (online publication date), vol. 9, article no. 358, inner pp. 1-11 and Supplementary information. See abstract; inner pages 6, 8 and 9; and Supplemental Table S14.	1-17
Y	NCBI. Reference Sequence: XP_011532696.1. transmembrane protein 165 isoform X1 [Homo sapiens]. 05 April 2022 (publication date). See entire document.	1-17
A	SONG, Chunjiao et al. Overview of research on fusion genes in prostate cancer. Translational Cancer Research. March 2020, vol. 9, no. 3, pp. 1998-2011 and Supplementary information. See pages 1998-2007; and table S1.	1-17
A	MURALI, Pavitra et al. Novel role for the Golgi membrane protein TMEM165 in control of migration and invasion for breast carcinoma. Oncotarget. 14 July 2020 (publication date), vol. 11, no. 28, pp. 2747-2762. See pages 2747-2760.	1-17
A	LEE, Jee-San et al. TMEM165, a Golgi transmembrane protein, is a novel marker for hepatocellular carcinoma and its depletion impairs invasion activity. Oncology Reports. 2018, vol. 40, pp. 1297-1306. See pages 1297-1305.	1-17
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 October 2023		Date of mailing of the international search report 10 October 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009849

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009849

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 18 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/47(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i																	
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/47(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TMEM165-CLOCK 항체(TMEM165-CLOCK antibody), 에피토프(epitope), 암(cancer), 벡터(vector), 형질전환체(transformant)																	
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>RATHE, SUSAN K. 등, "Identification of candidate neoantigens produced by fusion transcripts in human osteosarcomas", Scientific Reports, 2019년 1월 23일(온라인 공개일), 9권, 기사번호 358, 내부페이지 1-11 및 Supplementary information 요약; 내부페이지 6, 8, 9; 및 Supplemental Table S14</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NCBI Reference Sequence: XP_011532696.1, "transmembrane protein 165 isoform X1 [Homo sapiens]", 2022년 4월 5일(공개일) 전문</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SONG, CHUNJIAO 등, "Overview of research on fusion genes in prostate cancer", Translational Cancer Research, 2020년 3월, 9권, 3호, 페이지 1998-2011 및 Supplementary information 페이지 1998-2007; 및 표 S1</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>MURALI, PAVITRA 등, "Novel role for the Golgi membrane protein TMEM165 in control of migration and invasion for breast carcinoma", Oncotarget, 2020년 7월 14일(공개일), 11권, 28호, 페이지 2747-2762 페이지 2747-2760</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	RATHE, SUSAN K. 등, "Identification of candidate neoantigens produced by fusion transcripts in human osteosarcomas", Scientific Reports, 2019년 1월 23일(온라인 공개일), 9권, 기사번호 358, 내부페이지 1-11 및 Supplementary information 요약; 내부페이지 6, 8, 9; 및 Supplemental Table S14	1-17	Y	NCBI Reference Sequence: XP_011532696.1, "transmembrane protein 165 isoform X1 [Homo sapiens]", 2022년 4월 5일(공개일) 전문	1-17	A	SONG, CHUNJIAO 등, "Overview of research on fusion genes in prostate cancer", Translational Cancer Research, 2020년 3월, 9권, 3호, 페이지 1998-2011 및 Supplementary information 페이지 1998-2007; 및 표 S1	1-17	A	MURALI, PAVITRA 등, "Novel role for the Golgi membrane protein TMEM165 in control of migration and invasion for breast carcinoma", Oncotarget, 2020년 7월 14일(공개일), 11권, 28호, 페이지 2747-2762 페이지 2747-2760	1-17
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항															
Y	RATHE, SUSAN K. 등, "Identification of candidate neoantigens produced by fusion transcripts in human osteosarcomas", Scientific Reports, 2019년 1월 23일(온라인 공개일), 9권, 기사번호 358, 내부페이지 1-11 및 Supplementary information 요약; 내부페이지 6, 8, 9; 및 Supplemental Table S14	1-17															
Y	NCBI Reference Sequence: XP_011532696.1, "transmembrane protein 165 isoform X1 [Homo sapiens]", 2022년 4월 5일(공개일) 전문	1-17															
A	SONG, CHUNJIAO 등, "Overview of research on fusion genes in prostate cancer", Translational Cancer Research, 2020년 3월, 9권, 3호, 페이지 1998-2011 및 Supplementary information 페이지 1998-2007; 및 표 S1	1-17															
A	MURALI, PAVITRA 등, "Novel role for the Golgi membrane protein TMEM165 in control of migration and invasion for breast carcinoma", Oncotarget, 2020년 7월 14일(공개일), 11권, 28호, 페이지 2747-2762 페이지 2747-2760	1-17															
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☐ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																	
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																	
국제조사의 실제 완료일 2023년10월10일(10.10.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년10월10일(10.10.2023)															
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373															

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LEE, JEE-SAN 등, "TMEM165, a Golgi transmembrane protein, is a novel marker for hepatocellular carcinoma and its depletion impairs invasion activity", Oncology Reports, 2018년, 40권, 페이지 1297-1306 페이지 1297-1305	1-17

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **18**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 18은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.