



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월08일
(11) 등록번호 10-2120223
(24) 등록일자 2020년06월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 39/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0158570
(22) 출원일자 2018년12월10일
심사청구일자 2018년12월10일
(65) 공개번호 10-2019-0068488
(43) 공개일자 2019년06월18일
(30) 우선권주장
1020170168117 2017년12월08일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Cancer Biomark., 13(6):411-415(2013.1.1.)
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
류춘제
서울특별시 강남구 선릉로 221, 204동 203호(도곡동, 도곡텍슬아파트)
김민규
서울특별시 성동구 돌레21길 21-17(성수동2가)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 8 항

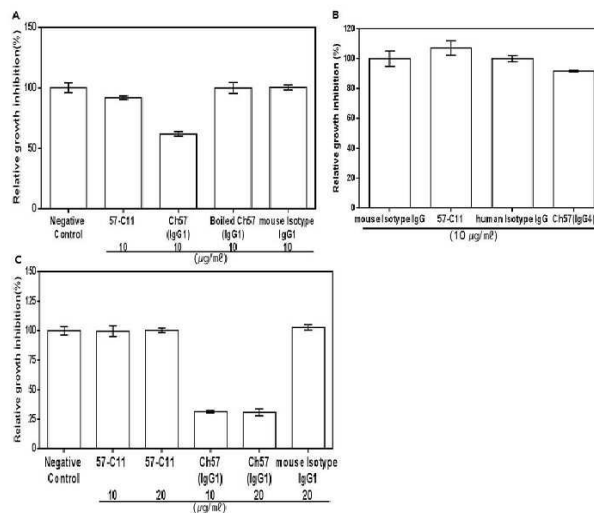
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물

(57) 요약

본 발명은 키메라 항체, 이를 포함하는 의약 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 4의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 불변 영역을 포함함으로써, 항체는 다양한 암세포 표면에 특이적으로 인식/결합하며, 암세포 표면 HNRPU1 단백질을 인식하며 HNRPU1 단백질을 세포내부로 끌고 들어가는 내부화 할 수 있으며, 면역 반응 유발이 최소화된 키메라 항체 및 이를 포함하는 의약 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
 A23V 2200/308 (2013.01)
 A23V 2250/5434 (2013.01)
 A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자

최홍서

서울특별시 광진구 동일로54길 11-7(군자동)

김원태

서울특별시 광진구 동일로34길 20, 202호(군자동)

이현민

경기도 포천시 소흘읍 무림3길 16

양재철

서울특별시 중구 청구로4길 30, 102호(신당동, 청구드림아파트)

(56) 선행기술조사문헌

Mol Cell., 45(4):505-516(2012.2.24.)
 Cell Death Dis., 8(6):e2862(2017.6.8.)
 KR1020150062507 A
 KR1020140071736 A
 KR1020100039204 A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2B4008610
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(미래부)
 연구과제명 암세포에서 표면 발현하는 HNRPU1의 기능분석 및 암 치료 표적으로써 평가
 기 여 율 7/10
 주관기관 세종대학교 산학협력단
 연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A9C6918220
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오. 의료기술개발
 연구과제명 신규 전환인자 발굴을 통한 순수 인간만능줄기세포 유도 및 기전규명
 기 여 율 3/10
 주관기관 세종대학교 산학협력단
 연구기간 2017.04.01 ~ 2018.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 4의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 항체의 중쇄는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 항체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 서열번호 7의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 중쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 항체의 경쇄는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 항체의 중쇄는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 경쇄는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항체.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 암세포 표면에 HNRPU1 단백질을 발현하는 암세포에 의한 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 암은 피부암 또는 신경아세포종인 의약 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 항체는 항암제와 접합된 것인 의약 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 다양한 암세포에 대하여 세포사멸을 유도하여 암세포 성장을 억제하는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 전체 사망 원인의 제 1 위를 차지하는 질환이며, 현재 행해지고 있는 치료는 수술 요법을 주체로 방사선요법과 화학요법을 조합시킨 것이다. 최근의 새로운 수술법의 개발이나 새로운 항암제의 발견에도 관계없이 일부의 암을 제외하고 암의 치료 성적은 그다지 향상되어 있지 않은 것이 현 상황이다. 최근 분자 생물학이나 암 면역학의 진보에 따라 암에 특이적으로 반응하는 항체류, 세포장해성 T세포에 의해 인식되는 암 항원류를, 암 항원을 인코딩하는 유전자류 등이 동정되어 있고, 암 항원류를 타겟으로 한 특이적 암 치료법으로의 기대가 높아지고 있다.

[0003] 1970년대 배아조직을 주사한 생쥐에서 암세포 (피부암, 간암, 위암 등) 이식이나 발암물질을 주입해도 암이 생기는 것을 관찰하였으며, 이 현상은 배아조직에 존재하는 분자로 배아발생 동안에 발현하다 성인조직에는 최소로 존재하고 암 발생시 다시 발현되는 Oncofetal 항원 때문이라고 생각하였다. Oncofetal 항원들은 배 발생 이후에 성인에서 최소로 조절됨으로 이를 분리하기는 실제로 쉽지 않고, Embryonic/fetal tissue의 면역주사를 통한 암백신 개발은 분자 기전의 이해부족, 윤리적 문제등으로 동물모델에 그치고 1970년대 이후 진행되지 않다가 미분화 인간배아줄기세포가 배양 가능해지면서 다시 주목을 받기 시작하였다. 2009년 코네티컷대 Zihai Li 교수팀은 인간배아줄기세포를 면역 주사한 생쥐에서 대장암세포를 주사하면 주입한 대장암에 대한 T 세포 면역과 antibody 면역반응이 유도되며 자가 면역질환 없이 대장암 발생을 억제한다는 것을 밝혔으며, 루이스빌대의 John Eaton 교수팀은 2012년 생쥐배아줄기세포를 면역 주사한 생쥐에 폐암세포를 주사하거나 발암물질로 폐암을 유도해도 폐암에 걸리지 않음을 보고하였는데, 이런 내용은 배아줄기세포 어떤 항원들이 암줄기세포의 표면 항원처럼 암 발생 억제를 위한 항원으로 작용함을 증명하는 것이다. SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, EpCAM, Cripto등의 Oncofetal 항원은 실제로 배아줄기세포의 미분화 마커로 쓰이고 있다.

[0004] 이와 같은 암세포상의 항원 단백질을 표적으로 한 암을 치료하기 위한 각종 항체 의약이 세상에 대두되어 왔다. 암 특이적 치료약으로서 일정의 약효가 얻어져 주목되고 있지만 표적이 되는 항원 단백질의 대부분은 정상 세포에도 발현되는 것이며, 항체 투여의 결과 암세포뿐만 아니라 항원이 발현되는 정상 세포도 장해되어버려 그 결과 발생하는 부작용이 문제가 되고 있다. 따라서, 암세포 표면에 특이적으로 발현되는 암 항원을 동정하여 그것을 표적으로 한 항체를 의약품으로서 사용할 수 있으면 보다 부작용이 적은 항체 의약에 의한 치료가 가능하게 될 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1758117호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 다양한 암세포들에 대하여 특이적으로 약효를 나타낼 수 있는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 1. 서열번호 4의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항체.
- [0010] 2. 위 1에 있어서, 상기 항체의 중쇄는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 항체.
- [0011] 3. 위 1에 있어서, 상기 항체는 서열번호 7의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 경쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항체.
- [0012] 4. 위 1에 있어서, 상기 항체의 경쇄는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항체.

- [0013] 5. 위 1에 있어서, 상기 항체의 중쇄는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 경쇄는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항체.
- [0014] 6. 위 1 내지 5 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물.
- [0015] 7. 위 6에 있어서, 상기 암은 피부암 또는 신경아세포종인 의약 조성물.
- [0016] 8. 위 6에 있어서, 상기 암은 표면에 HNRPUL1 단백질을 발현하는 암세포에 의한 것인 의약 조성물.
- [0017] 9. 위 6에 있어서, 상기 항체는 항암제와 접합된 것인 의약 조성물.

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 항체는 다양한 암세포 표면에 특이적으로 인식/결합할 수 있어, 이들에 대한 특이적인 약효를 나타낼 수 있다.
- [0020] 본 발명의 항체는 암세포의 성장을 현저히 억제할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 항체는 암세포 표면 HNRPUL1 단백질을 인식하며 HNRPUL1 단백질을 세포내부로 끌고 들어가는 내부화(internalization) 특징을 갖는다. 이에 항암제와 접합하여 치료 효과를 더욱 극대화 할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 항체는 인간화되어 면역반응 유발이 현저히 경감되었다.
- [0023] 본 발명의 의약 조성물은 면역반응 유발을 최소화하면서 세포 표면에 HNRPUL1 단백질을 발현하는 다양한 암종에 대하여 우수한 약효를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 A375 암세포에 FBS (소태아 혈청) 존재/부재에서 57-C11과 anti-HNRPUL1 항체를 처리하여 다양한 신호 전달 분자들의 발현을 분석한 것이다. A375에 항체 57-C11, anti-HNRPUL1, control 항체 mIgG 처리하고 신호전달 경로 단백질인 AKT1/2/3, ERK1/2, GSK-3 β , β -catenin와 loading control로 GAPDH를 분석한 것이다.
- 도 2는 생쥐항체인 57-C11 항체의 가변영역 유전자를 PCR로 증폭하여 인간 항체불변영역 유전자를 함유하고 있는 pCMV-dhfr 벡터에 클로닝한 것이다. 도2A는 클로닝한 인간불변영역유전자 IgG1를 함유하는 발현벡터 pCMV-dhfr을 보여주고 2B는 클로닝한 인간불변영역유전자 IgG4를 함유하는 발현벡터 pCMV-dhfr을 보여준다.
- 도 3은 Ch57 항체를 HEK293-T에서 발현한 다음 세포배양 상층액에서 Protein G-agarose로 분리하고 분리한 항체를 SDS-PAGE 후에 CBB 염색하였으며 (A), 웨스턴 블라팅을 수행한 후 anti-human IgG-HRP 분석하여 인간항체임을 증명한 것이다(B).
- 도 4는 A375세포 표면을 biotin으로 표지한 후 세포추출액을 만들고 여기에 57-C11항체와 키메라 Ch57를 사용하여 면역침강을 수행한 것으로 항-HNRPUL1항체로 웨스턴을 수행한 결과로 면역침강된 HNRPUL1 isoform 인 120, 80, 45kDa이 검출되고(A), 또한 이들을 streptavidin-HRP로 검출하여 세포표면 단백질이라는 것을 증명한 것이다(B).
- 도 5는 A549, A375, SH-SY5Y암세포를 isotype control항체, 57-C11, Ch57 항체로 flow cytometry로 분석한 것이다.
- 도 6는 isotype control항체, 57-C11, boiled Ch57, Ch57 (IgG1), Ch57 (IgG4) 항체에 의하여 A375 성장이 억제되는 효과를 나타낸 것으로서, 항체의 음성대조군으로는 비 특정 생쥐 isotype IgG과 boiled Ch57를 사용하였고, 키메라항체 Ch57 (IgG1)과 Ch57 (IgG4)를 배양 중인 A375 세포에 36시간 10 μ g/ml로 처리하여 세포성장을 측정하거나 (A, B), 48시간 동안 10 또는 20 μ g/ml 로 처리한 후, A375 성장 정도를 대조군에 비해 백분율로 표현한 것이다.
- 도 7은 생쥐 isotype IgG1, 57-C11, boiled Ch57 (IgG1), Ch57 (IgG1) 항체에 의하여 A375 암세포의 세포사멸을 PI와 annexin V 발현으로 관찰한 것이다.
- 도 8은 생쥐 isotype IgG1, 사람 isotype IgG, 57-C11, Ch57 (IgG1), Ch57 (IgG4), 항체에 의하여 SH-SY5Y 성장이 억제되는 효과를 나타낸 것으로서, 항체의 음성 대조군으로는 비특정 생쥐 isotype IgG1 와 사람 isotype IgG를 사용하였고, 배양 중인 세포에 키메라 항체 Ch57 (IgG1)과 Ch57 (IgG4)을 36시간 10 μ g/ml 동안 처리한 후, SH-SY5Y 성장 정도를 대조군에 비해 백분율로 표현한 것이다.

도 9는 mouse isotype IgG1, 57-C11, Ch57 항체처리에 의한 SH-SY5Y 암세포의 세포사멸을 PI와 annexin V 발현으로 관찰한 것이다,

도 10은 57-C11, Ch57 (IgG1) 항체가 A375 암세포 표면에서 세포 내부로의 이동을 관찰한 것이다.

도 11은 Ch57(IgG1) 항체의 중쇄의 아미노산 서열이다.

도 12는 Ch57 항체의 경쇄의 아미노산 서열이다.

도 13은 Ch57(IgG4) 항체의 중쇄의 아미노산 서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은 서열번호 4의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항체를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 키메라 항체는 항원성 부위 (에피토프)를 인식하는 항체 가변영역은 생쥐에서 왔지만 나머지 대부분의 불변영역은 인간 유전자에서 와서 암환자에 치료용으로 주입할 때 부작용을 나타낼 수 있는 면역반응 유발을 현저히 경감시킨 항체이다.
- [0030] 본 발명의 항체는 서열번호 4의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 5의 중쇄 불변 영역을 포함한다. 서열번호 4의 서열은 마우스 57-C11 항체의 중쇄 가변 영역에 해당하는 것이고, 서열번호 5의 서열은 human IgG1 유래의 서열이다.
- [0031] 본 발명의 항체의 중쇄는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 서열번호 1의 아미노산 서열은 서열번호 3의 신호 아미노산 서열과 서열번호 4 및 5의 서열로 이루어진 서열이다.
- [0032] 본 발명의 항체는 서열번호 7의 경쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 서열번호 7의 서열은 마우스 57-C11 항체의 경쇄 가변 영역에 해당하는 것이고, 서열번호 8의 서열은 human Ck 유래의 서열이다.
- [0033] 본 발명의 항체의 경쇄는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 서열번호 2의 아미노산 서열은 서열번호 6의 신호 아미노산 서열과 서열번호 7 및 8의 서열로 이루어진 서열이다.
- [0034] 본 발명의 항체는 효소, 형광 물질, 방사선 물질 및 단백질 등과 접합된 것일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니며, 항체에 상기 물질을 접합하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다.
- [0035] 본 발명의 키메라 항체는 암세포 표면의 HNRPUL1 단백질을 인식할 수 있어, 암세포의 성장을 억제할 수 있고, 이에 암의 예방 또는 치료용 조성물로서 활용될 수 있다.
- [0036] 치료 대상인 암은 예를 들면 피부암, 신경아세포종 등일 수 있고, 보다 구체적으로는 피부암일 수 있다.
- [0038] 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 의약 조성물은 전술한 항체를 포함하며, 대상인 암은 전술한 암일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 의약 조성물은 상기 기작에 따라 치료될 수 있는 것이라면 모든 암이 제한 없이 그 대상이 될 수 있고, 예를 들면 피부암, 신경아세포종일 수 있다. 구체적으로, 세포 표면에 HNRPUL1를 발현하는 암세포에 의한 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 피부암세포 A375, 신경아세포종 SH-SY5Y에 의한 암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는 것은 아니다.
- [0041] 전술한 바와 같이 본 발명의 항체는 암세포 내부로 들어갈 수 있으므로(internalization), 항암제 등의 세포 살상 약물과 접합체 형태로 사용시에 항암능을 극대화 할 수 있다.
- [0042] 항체에 접합될 수 있는 항암제로는 당 분야에 공지된 항암제가 제한없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 엘로티닙(TARCEVA(TM), Genentech/OSI Pharm.), 보르테조밐(VELCADE(TM), Millenium Pharm.), 폴베스트란트(FASLODEX(TM), Astrazeneca), 수텐트(SU1 1248, Pfizer), 레트로졸(FEMARA(TM), Novartis), 이마티닙 메실레이트(GLEEVEC(TM), Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), 옥살리플라틴(Eloxatin(TM), Sanofi), 5-FU (5-플루오로우라실), 류코보린, 라파마이신(Sirolimus, RAPAMUNE(TM), Wyeth), 라파티닙(GSK572016, GlaxoSmithKline), 로나파르닙(SCH 66336), 소라페닙(BAY43-9006, Bayer Labs.), 및 게피티닙(IRESSA(TM), Astrazeneca), AG 1478, AG 1571 (SU 5271; Sugen), 티오테파 및 CYTOXAN(TM) 시클로스포스파미드와 같은 알킬

화제; 부술판, 임프로술판 및 피포술판과 같은 알킬 술포네이트; 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리에틸로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토게닌(특히 블라타신 및 블라타시논); 캄토테신(합성 유기체 토포테칸을 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그것의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유기체를 포함); 크립토포신(특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1을 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코닥티인; 스포기스타틴; 질소머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노뱌비신, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 에네딘 항생제와 같은 항생제(예를 들어, 칼리키아미신, 특히 칼리키아미신 감마II 및 칼리키아미신 오메가 II(Angew Chem Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); 다이네미신 A를 포함하는 다이네미신; 클로드로네이트와 같은 비스포스포네이트; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련된 색소단백질 예네딘 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 클로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 테토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN(TM) 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신을 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 C와 같은 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질, 예컨대 메토크세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 테노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대, 갈우스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스타놀과 같은 항-아드레날; 프롤린산과 같은 폴산 보충제; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노에불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티니움 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 나이트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도피필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(TM) 폴리사카라이드 복합체(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아조산; 트리아지쿠온; 2',2'-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, TAXOL(TM) 파클리탁셀(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.), ABRAXANEM 무-크레모포르, 파클리탁셀의 알부민-유전자 조작된 나노입자 조제물(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), 및 TAXOTERE(TM) 도세탁셀(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로르안부실; GEMZAR(TM) 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토크세이트; 시스플라틴 및 카르보플라틴과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE(TM) 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라아제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레니노산과 같은 레티노이드; 카페시타빈; 및 어떤 상기의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 의약 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 희석제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 담체로는 단백질, 폴리펩타이드, 리포솜, 다당, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체 및 불활성 바이러스 입자와 같이 천천히 대사되는 거대분자를 들 수 있다. 예를 들면, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트 및 셀페이트와 같은 무기산의 염; 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트와 같은 유기산의 염과 같은 약제학적으로 허용 가능한 염; 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체; 및 수화제, 유화제 또는 pH 완충물질과 같은 보조적 물질을 사용할 수 있다.

[0044] 본 발명의 의약 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제, 바람직하게는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당 업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 경구, 또는 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 소화관내, 국소, 설 하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 이러한 목적에 적합한 제형으로는 정제, 환제, 당제 (dragee), 산제, 캡슐제, 시럽제, 용액제, 겔제, 현탁제, 에멀전, 마이크로에멀전 등의 다양한 경구투여용 제제 및 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입제, 및 하이포스프레이 (hypospray)와 같은 분무제 등과 같은 비경구투여용 제제가 바람직하다. 주사 또는 주입용 제제의 경우에는, 현탁액, 용액 또는 에멀전 등의 형태를 취할 수 있고, 현탁화제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제 화제를 포함할 수 있다. 또한, 상기 항체 분자는 사용 전에 적절한 무균 액체로 재조정하여 사용할 수 있는 건조된 형태로 제제화 될 수도 있다.

[0046] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분으로서 상기 항체는 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.01 내지 50 mg/kg 체중, 바람직하게는 0.1 내지 20 mg/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 예방 또는 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별, 약제 조합, 반응 민감성 및 치료에 대한 내성/반응 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해해야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0047] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0049] **실시예 1. 암세포의 배양**

[0050] 피부암세포 A375, 신경아세포종 (Neuroblastoma) SH-SY5Y는 MEM 배지(Hyclone)에 10% 소태아혈청 (WelGene)을 사용하여 배양하였고, 폐암세포 A549는 RPMI1640 배지(WelGene)에 10% 소태아혈청 (WelGene)을 사용하여 배양하였다.

[0052] **실시예 2. 세포표면 HNRPUL1의 피부암 세포주 A375에서의 신호전달기전 분석**

[0053] 피부암 세포주인 A375 세포를 2×10^5 개씩 각각의 6well plate에 분주한다. 분주한 세포는 10% 소태아혈청이 들어있는 MEM(hyclone, 미국) 배지에서 37°C 5% CO₂ 농도가 유지되는 인큐베이터에서 배양한다. 배양 후 세포의 배지를 10% 소태아 혈청이 없는 배지로 교체하여 배양한 이후에 생쥐 항체 IgG (mIgG), 57-C11과 토끼 항-HNRPUL1 항체를 각각 10 μ g/ml로 넣고 반응시키거나, 추가로 FBS를 다시 넣어 신호전달경로를 자극한 다음, FBS가 있을 때와 없을 때, 그리고 항체 생쥐 항체 mIgG, 57-C11과 항-HNRPUL1 항체 처리한 것으로 나누어서 분석하였다. 각각의 세포를 찬 PBS (pH7.4)로 3회 세척한 후 세포용해 완충액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2 μ g/ml 아프로타닌, 100 μ g/ml PMSF, 및 5 μ g/ml 류펩틴, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄)를 이용하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후 12,000rpm 속도로 40분간 원심분리해서 핵을 제거한 후 상층액을 샘플로 준비하였다. 추출한 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블라팅하였다. 막을 실온에서 2시간 블라킹 완충용액 (5% bovine serum albumin, 1X TBS (10mM Tris-HCl, pH 7.4 150mM NaCl), 0.1% Tween 20)을 이용하여 블로킹하였다. 0.1% TBST (1X TBS, 0.1% Tween 20)로 3번 세척한 후, 각각의 항체들을 상기 블라킹 용액에 넣고 밤새 4°C에서 반응시켰다. 사용된 항체는 다음과 같다. GSK-3 β , ERK1, Akt1/2/3, β -catenin, (Santa Cruz Biotechnology), phospho-ERK1/2 (threonine 202/tyrosine204), phospho-Akt (serine 473), phospho-GSK-3 β (serine 9) (Cell Signaling Technology), GAPDH(Cusa bio). 0.1% TBST (1X TBS, 0.1% Tween 20)로 3번 세척한 후, anti-mouse IgG-horse radish peroxidase (HRP) 또는 anti-rabbit IgG-horse radish peroxidase (HRP) (1:4,000; GE healthcare)를 실온에서 1시간 더 반응시키고 단백질을 ECL 검출 키트(GE healthcare)로 확인하였다. GAPDH의 발현양은 같은 양의 단백질을 사용하여 분석하였다는 비교 대조군으로 사용하였다. 그 결과 57-C11과 항-HNRPUL1 항체를 처리하면 inhibitory phosphorylation 인 p-GSK3 β (S9)과 β -catenin의 발현이 FBS 존재함에도 불가하고 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 1). 이런 현상은 두 항체를 동시에 처리할 때 가장 현저하게 나타났다. 이런 결과는 Wnt 억제하는 GSK-3 β 가 더 활성화 돼서 Wnt를 통한 세포 성장을 억제하는 것을 의미하며 실제로 Wnt 다운스트림인 β -catenin이 감소함으로써 증명된다. 결과적으로 세포표면의 HNRPUL1은 Wnt/ β -catenin을 통해 피부암세포 성장을 촉진한다는 것을 알 수 있다.

[0055] **실시예 3. 57-C11 항체 가변 영역 유전자를 이용한 키메라 항체 Ch57 제조**

[0056] 상기에서 세포표면의 HNRPUL1은 Wnt/ β -catenin을 통해 피부암 세포 성장을 촉진하였으며 Wnt/ β -catenin은 많은 암세포의 세포성장 신호전달 경로로 세포표면 HNRPUL1은 암치료용 표적으로 응용될 수 있다. 쥐에서 얻은 HNRPUL1을 인식하는 57-C11 항체를 면역부작용이 적은 암치료용 키메라 항체로 개발하기 위해서 57-C11항체 유전자와 사람 항체의 불변부와 결합된 키메라 항체를 만들었다. 먼저 쥐에서 얻은 57-C11의 중쇄와 경쇄의 유전자를 PCR (polymerase chain reaction)을 통해 약 400bp 와 390bp에 해당하는 DNA를 Gel extraction kit

(FAVORGEN, 대만) 이용하여 DNA를 분리하였고, 증쇄와 경쇄의 신호단백질 유전자를 PCR을 통해 각 약 100bp 에 해당하는 DNA를 Gel extraction kit (FAVORGEN, 대만)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 각각의 증쇄와 경쇄 그리고 각 증쇄 경쇄에 해당하는 신호단백질과의 유전자 연결을 위하여, recombinant PCR을 통해 증쇄와 증쇄 신호 서열이 연결된 유전자와, 경쇄와 경쇄 신호서열이 연결된 유전자를 얻어 1% 아가로스 젤에 전개시켜 확인한 결과 약 500bp에 해당하는 DNA를 Gel extraction kit (FAVORGEN, 대만) 를 이용하여 DNA를 분리하였다. 이 57-C11 증쇄 가변영역 유전자를 사람의 증쇄 불변 영역(IgG1) 유전자를 포함하고 있는 pCMV-dhfr 벡터에 EcoR I 과 Apa I 자리에 클로닝하고, 57-C11 경쇄 가변영역 유전자는 pCMV-dhfr을 Hind III와 BsiW I 자리에 클로닝하였다(도 2A). 위와 마찬가지로 증쇄 불변 영역(IgG4) 유전자를 포함하고 있는 pCMV-dhfr 벡터에 EcoRI과 ApaI 자리에 클로닝 하고 57-C11 경쇄 가변영역 유전자는 pCMV-dhfr을 Hind II와 BsiW I 자리에 클로닝하였다(도 2B). 최종 벡터 DNA는 대장균 DH5 α 에 CaCl $_2$ 방법으로 형질 전환 한 다음, 증쇄의 경우 약 500bp 크기의 DNA삽입물을 가진 클론, 경쇄 경우도 약 500 bp 크기를 가진 대장균 클론들을 선발하였다. 항체 유전자들의 DNA 염기 서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 50 μ g/ml의 앰피실린이 함유된 5ml의 LB배지에서 밤새 배양한 후 Alkaline lysis 방법을 통해 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 확인하였다. 증쇄 및 경쇄 가변영역 cDNA의 염기서열이 57-C11 유전자와 동일한지 확인하였고, 또한 인간 증쇄와 경쇄 불변영역 유전자에 바르게 연결되어있음을 확인하였다 (키메라 항체 전체 아미노산 서열 1, 2, 3).

[0058] **실시예 4. Ch57 항체의 정제 및 확인**

[0059] 57-C11 생쥐 가변영역과 인간 불변영역으로 연결된 키메라 항체를 Ch57라고 명명하고 이 키메라 항체를 생산하고 정제하기 위하여, 먼저 인간 배아신장세포인 HEK293T 세포 주를 150mm 배양 접시에 1x10 7 세포를 20mL의 MEM (Hyclone, 미국) 배지에 배양한다. 배양한 세포에 4 μ g의 항체유전자를 가진 pCMV-dhfr 발현벡터와 20 μ l의 Polyethyleneimine과 섞어준 뒤, 트랜스펙션 최적화 배지 500 μ L와 섞어 골고루 세포 배양 배지위에 뿌려주었다. 다음날 세포 배지의 상층액을 수집하고, 새로운 배지를 채워 세포주로부터 발현되어 나온 항체를 수집하고 수집한 배지 상층액을 Protein G agarose beads (Amicogen, 한국)이 Packing 되어 있는 Column에 넣어주어 항체가 Protein G agarose beads와 결합 할 수 있게 한 뒤, PBS (pH8.0)으로 비드를 세척하고, 0.1M glycine(pH2.8) 10ml과 1M Tris-HCl (pH9.0)을 이용하여 항체를 Protein G agarose beads에서 용출하여, Ch57 키메라 항체를 정제하고, 이것을 SDS-PAGE과 Coomassie blue 염색법을 통해 항체를 확인 하였다 (도 3A). 실제로 이 항체가 인간 불변영역의 항체를 가진 키메라항체인지 확인하기 위해 Western blotting을 수행할 때 anti-human IgG-HRP를 사용하여 검출한 결과 인간 항체임을 확인할 수 있었다 (도 3B).

[0061] **실시예 5. Ch57 항체의 항원 동정에 대한 실험**

[0062] Ch57 항체가 인식하는 항원이 세포 표면에 존재하는 HNRPUL1 인지 확인하기 위하여 80% 정도로 건강하게 자란 암세포 A375 세포가 자란 plate를 찬 PBS(pH7.4)로 1번 세척하였다. 세척 이후에 Ez-link-NHS-biotin(Thermo, 미국)을 0.001 g/ml 농도로 찬 PBS (pH 8.0)에 녹여, 5 ml의 Biotin 수용액을 A375 세포주와 반응 시켰다. 20 분간 4 $^{\circ}$ C에서 반응 시킨 후, 찬 PBS(pH 8.0)으로 3번 세척 후, 세포용해 완충액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2 μ g/ml 아프로티닌, 100 μ g/ml PMSF, 및 5 μ g/ml 류펩틴, 1mM NaF, 1mM Na $_3$ VO $_4$)를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 후 12,000rpm 속도로 40분간 원심분리해서 핵을 제거한 후 상층액을 샘플로 준비하였다. 준비한 샘플에 Protein-G agarose beads(Amicogen, 한국) 20 μ l를 넣고 3시간 Pre-clearing (PC) 과정을 한 후 원심 분리하여 상층액은 새로운 튜브에 옮겨 담은 뒤 바닥에 침전된 Protein G agarose beads는 Sample buffer를 이용하여 샘플을 준비하고, 상층액을 옮겨 담은 새 튜브에 각각 57-C11 항체와 Ch57 항체 5 μ g씩 넣어 12시간 이상 4 $^{\circ}$ C에서 반응 시킨다. 반응 후 항체를 침전시키기 위하여, Protein G agarose beads를 20 μ l 넣고 3시간 이상 반응 시킨다. 3시간 이후에 Protein G agarose beads를 원심분리하여 침전 시키고, 상층액을 제거한 뒤, Bead 를 세포용해 완충액으로 5번 세척을 하고, Bead 에서 항원단백질을 분리하기 위하여, Sample buffer를 이용하여 샘플을 준비하였다. 준비 한 샘플을 추출한 단백질을 12% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블라팅하였다. 막을 실온에서 2시간 블라킹 완충용액 (5% 탈지분유, 1X TBS (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl), 0.1% Tween 20)을 이용하여 블로킹하였다. 0.1% TBST (1X TBS, 0.1% Tween 20)로 3번 세척한 후, 1차 항체로 항-HNRPUL1 항체를 반응 시키고 0.1% TBST로 3회 세척 후 2차 항체인 α -rabbit IgG-HRP(1:5000)을 실온에서 1시간 더 반응시키고, 단백질을 ECL 검출 키트 (philkorea, 한국)로 확인하였으며, 이 멤브레인을 스트렙타비딘 홀스래디쉬퍼옥시데이즈(1:4000)으로 한번 더 단백질 검출 확인 하였다. 그 결과 항-HNRPUL1 항체는 57-C11과 Ch57항체로 면역침강 (IP) 한 샘플에서 세종류의 HNRPUL1 isoform인 120kD, 80kD, 45kD 단백질을 인식하는 것을 확인하였으며 (도 4A), 이들 단백질이 세포

표면에 발현하는 단백질이라는 것을 streptavidin-HRP로 57-C11과 Ch57로 면역침강한 샘플에서만 확인하여 재확인하였다 (도 4B).

[0064] **실시예 6. Ch57 항체의 암세포 A375와 SH-SY5Y 결합특이성 확인실험**

[0065] 57-C11항체는 A549 폐암세포에는 결합하지 않고 A375 피부암세포와 SH-SY5Y 신경아세포종에는 결합하므로, 키메라 Ch57 항체도 A549에는 결합하지 않고 A375와 SH-SY5Y에 결합할 것으로 예측됨으로 A549, A375, SH-SY5Y 암세포를 Ch57 키메라 항체의 암세포 특이성을 확인하는 암세포로 사용하였다. 80% 정도로 자란 암세포 주 A549, A375, SH-SY5Y 세포를 트립신으로 처리하여 떼어주고, 이 세포를 PBS (pH7.4)로 세척 후, 각각의 세포에 57-C11(10 µg/ml), Ch57 (10 µg/ml), 그리고 생쥐와 사람 Isotype control IgG1 항체 (10 µg/ml)를 각각 포함하고 있는 PBA (0.1% BSA in PBS)를 넣고 1시간 동안 4°C에서 반응시켰다. Incubation 이후에 PBA로 세척 후, 57-C11과 mouse Isotype IgG1 이 들어있는 그룹에는 FITC 형광이 결합되어있고 mouse IgG에 대해 특이적인 α-mouse IgG-FITC (2 µg/ml) (Genetex, 미국) 항체를 넣고 human Isotype IgG과 Ch57 항체가 들어있는 그룹에는 FITC 형광이 결합되어 있고 human IgG에 대해 특이적인 α-Human IgG-FITC(2 µg/ml) (Thermo, 미국) 항체를 넣고 20분간 4°C에서 반응시켰다. 반응 이후에 PBA로 세척 후 PI (1:1000)가 들어있는 500 µL PBA로 부유한 뒤, 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD, 미국)을 가지고 항체가 항원에 특이성을 가지는지 확인하였다. Ch57는 57-C11 과 마찬가지로 표면 HNRPUL1를 발현하는 A375와 SH-SY5Y 암세포에만 특이적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0067] **실시예 7. Ch57 항체의 암세포 A375 성장 억제 실험**

[0068] 80% 정도로 건강하게 자란 암세포 주 A375 세포를 트립신으로 처리하여 떼어주고, 세포수를 헤모사이토미터 (Hemocytometer)를 이용하여 측정하였다. 세포수를 $0.3-1 \times 10^4$ 개/웰로 희석하여 96-웰 플레이트에 100 µl씩 분주한 뒤 5% CO2, 95% air가 공급되는 CO2 배양기에서 24 시간 배양하였다. 57-C11 (10 또는 20 µg/ml), Ch57 (IgG1) (10 또는 20 µg/ml), Ch57 (IgG4) (10 또는 20 µg/ml)를 포함하는 배지를 세포가 자라고 있는 웰의 배지를 제거한 후에 넣어주었다. 그리고 대조군 또한 배지를 제거한 후 생쥐 isotype IgG1 (mIgG)과 boiled Ch57 을 포함하는 새로운 배양배지로 바꾸고, 48 시간 더 배양하고 CCK-8 (DOJINDO)을 웰당 10 µl씩 빠르게 첨가하여 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 처음 1분간 잘 흔들어서 용액이 잘 섞이도록 하고 용해된 포마잔(formazan) 산물의 흡광도는 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 결과는 boiled Ch57 또는 isotype control 항체를 첨가한 것을 100%로 하였을 때의 상대적인 비율로 나타내었다. 실험은 3회 이상 측정하여 평균값을 구했다. 먼저 항체 처리 시간을 36시간으로 한 후 효과를 확인한 결과, 생쥐항체인 57-C11의 성장억제효과는 미미하였으나 키메라 항체 Ch57 (IgG1)는 약 39% 성장이 감소하였고(도 6A), 키메라 항체 Ch57 (IgG4)를 경우는 약 9% 까지만 감소하였다 (도 6B). 키메라 항체 Ch57 (IgG1)을 20 µg/ml 농도로 48시간동안 처리했을 때는 A375성장을 70%까지 억제함을 관찰할 수 있었다 (도 6C). 따라서 Ch57에서 관찰되는 성장 억제기능은 부분적으로 human IgG1 타입을 가진 Ch57 (IgG1) 특이적인 현상임을 보여준다.

[0070] **실시예 7. Ch57항체의 SH-SY5Y 세포에 대한 특이성 확인 실험**

[0071] 57-C11항체는 A375에 이어 신경아세포종 SH-SY5Y 암세포에 특이적으로 결합하므로, 이들 암세포들에 대해 Ch57 항체가 결합하는지 분석하였다. 80% 정도로 건강하게 자란 암세포주 SH-SY5Y 세포를 트립신으로 처리하여 떼어 주고, 이 세포를 PBS (pH7.4)로 세척 후, 각각의 세포에 57-C11 (10 µg/ml)과 Ch57 (10 µg/ml) 그리고 생쥐와 사람 Isotype control IgG 항체 (10 µg/ml)를 각각 포함하고 있는 PBA를 넣고 1시간 동안 4°C에서 반응시킨다. Incubation 이후에 PBA로 세척 후, 57-C11과 mouse isotype IgG이 들어있는 그룹에는 FITC 형광이 결합되어있고 mouse IgG에 대해 특이적인 α-mouse IgG-FITC (2 µg/ml) (Genetex, 미국) 항체를 넣고 human isotype IgG와 Ch57 항체가 들어있는 그룹에는 FITC 형광이 결합되어 있고 human IgG에 대해 특이적인 α-Human IgG-FITC(2 µg/ml) (Thermo, 미국) 항체를 넣고 20분간 4°C에서 반응시킨다. 반응 이후에 PBA로 세척 후 PI(1:1000)가 들어있는 500 µL PBA로 부유한 뒤, 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD, 미국)을 가지고 항체가 항원에 특이성을 가지는지 확인하였다. Ch57는 57-C11 과 마찬가지로 표면 HNRPUL1를 발현하는 SH-SY5Y 세포주에 특이적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다(도 5 아래).

[0073] **실시예 8. Ch57 키메라 항체 처리를 통한 세포 사멸 유도 확인 실험**

[0074] 2×10^5 개의 A375 세포를 6 well plates에 각각 분주하고, 다음날 1.5 µg의 생쥐 Isotype IgG1, 57-C11, boiled Ch57, Ch57 항체를 2ml의 MEM 배지에 넣고, 각각의 Well에 넣어주었다. 이를 뒤 상층액을 15ml 코니칼 튜브에 옮겨 담고, 바닥에 붙어있는 세포는 트립신을 이용하여 떼어내어 새 MEM 배지를 이용하여 트립신 활성을

중화시켰다. 그리고 원심분리하여 세포와 세포 상층액에 떠있는 세포를 침전 시킨 뒤, Annexin V apoptosis assay kit (BD, 미국)를 이용하여 세포사멸을 확인하였다. 57-C11항체와 Boiled Ch57, Isotype IgG 에서는 세포 사멸이 유도 되지 않았고, Ch57 항체를 처리한 실험군에서는 빠른 세포사멸이 일어나서 많은 세포들이 부착하지 못하고 떠버리며 19% 세포들이 죽은 세포들인 propidium iodide (PI) 단독 양성을 보이며, 또한 17.5% 세포는 사멸되어가는 과정인 early와 late apoptosis를 보였다 (도 7). 이와 같이 Ch57항체는 A375 암세포 표면의 HNRPU1을 표적하여 높은 세포사멸이 유도함으로써 암세포 성장을 억제함을 확인할 수 있다 (도 7).

[0076] **실시예 9. Ch57 키메라 항체의 SH-SY5Y 성장 억제 실험**

[0077] 80% 정도로 건강하게 자란 암세포 주 SH-SY5Y 세포를 트립신으로 처리하여 떼어주고, 세포수를 헤모사이토미터 (Hemocytometer)를 이용하여 측정하였다. 세포수를 $0.3-1 \times 10^4$ 개/웰로 희석하여 96-웰 플레이트에 100 μ l씩 분주한 뒤 5% CO₂, 95% air가 공급되는 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다. 57-C11, Ch57 (IgG1), Ch57 (IgG4) 를 포함하는 배지를 세포가 자라고 있는 웰의 배지를 제거한 후에 10 μ g/ml 농도로 넣어 주었다. 그리고 대조군 또한 배지를 제거한 후 생쥐 isotype IgG과 사람 isotype IgG을 포함하는 새로운 배양배지로 바꾸고, 36시간 더 배양하고 CCK-8 (DOJINDO)을 웰당 10 μ l씩 빠르게 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 처음 1분간 잘 흔들어서 용액이 잘 섞이도록 하고 용해된 포마잔 (formazan) 산물의 흡광도는 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm 에서 측정하였다. 결과는 isotype control 항체를 첨가한 것을 100% 하였을 때의 상대적인 비율로 나타내었다 (도 8). 실험은 3회 이상 측정하여 평균값을 구했다. 키메라 항체 Ch57 (IgG4) 는 별다른 차이를 보여주지 못하였으나, Ch57 (IgG1)은 SH-SY5Y 성장을 15%까지 억제함을 관찰할 수 있었다 (도 8).

[0079] **실시예 10. Ch57 키메라 항체 처리를 통한 SH-SY5Y 세포 사멸 유도 확인 실험**

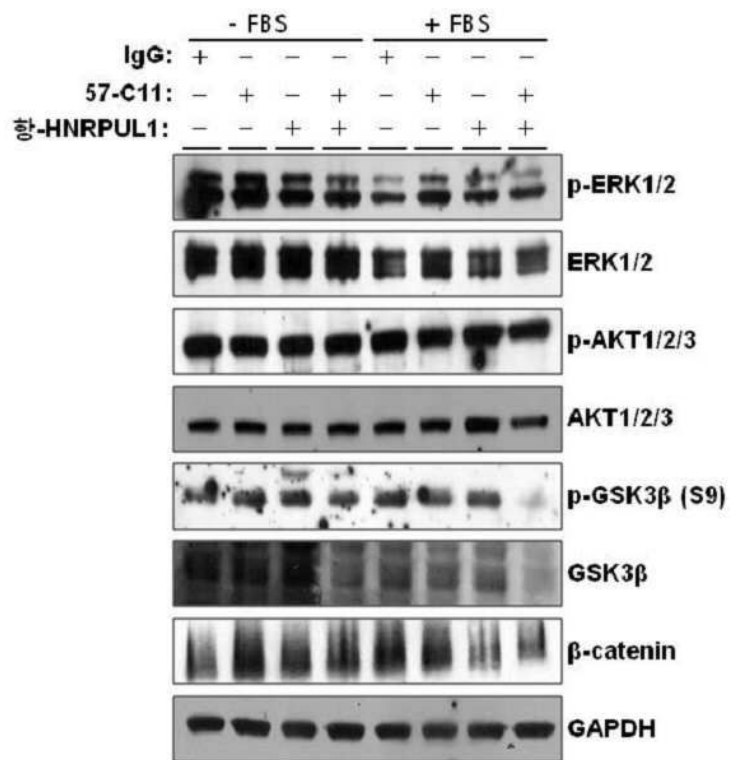
[0080] 2×10^5 개의 SH-SY5Y 세포를 6 well plates에 각각 분주하고, 다음날 1.5 μ g의 생쥐 Isotype IgG1, 57-C11, Ch57 항체를 2ml의 MEM 배지에 넣고, 각각의 Well에 넣어주었다. 이를 뒤 상층액을 15ml 코니칼 튜브에 옮겨 담고, 바닥에 붙어있는 세포는 트립신을 이용하여 떼어내어 새 MEM 배지를 이용하여 트립신 활성을 중화시켰다. 그리고 원심분리하여 세포와 세포 상층액에 떠있는 세포를 침전 시킨 뒤, Annexin V apoptosis assay kit (BD, 미국)를 이용하여 세포사멸을 확인하였다. 생쥐 IgG1 isotype과 57-C11에서는 세포사멸이 유도 되지 않았지만 Ch57 (IgG1) 항체를 처리한 실험 군에서는 빠른 세포사멸이 일어나서 많은 세포들이 부착하지 못하고 떠버리며 60.4% 세포들이 죽은 세포들인 propidium iodide (PI) 단독 양성을 보이며, 또한 32% 세포는 사멸되어가는 과정인 early와 late apoptosis를 보였다 (도 9). 이와 같이 Ch57 (IgG1) 항체는 SH-SY5Y 암세포 표면의 HNRPU1을 표적하여 높은 세포사멸이 유도함으로써 SH-SY5Y 암세포 성장을 억제함을 확인할 수 있다 (도 9).

[0082] **실시예 11. Ch57 키메라 항체의 암세포 내부로의 Internalization 확인 실험**

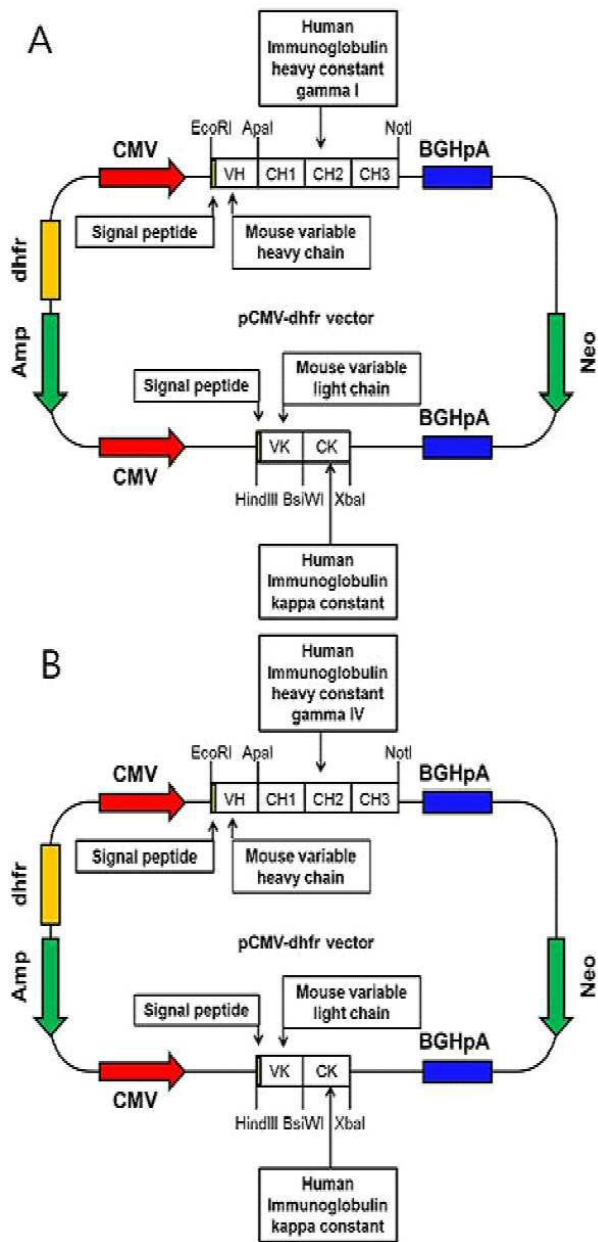
[0083] 80% 정도로 자란 암세포 주 A375세포를 트립신으로 처리하여 떼어주고, 이 세포를 PBS(pH7.4)로 세척 후, Counting 하여 1×10^5 세포씩 MEM 배지 (10%FBS)에 넣고 57-C11(10 μ g/ml), Ch57 (10 μ g/ml), 그리고 생쥐와 사람 Isotype control IgG 항체 (10 μ g/ml)를 각각 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 MEM 배지 (10%FBS)로 3번 세척 후, MEM 배지를 넣고 57-C11과 Ch57 항체를 반응시킨 실험군은 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고, 나머지 대조군은 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 대조군과 실험군을 PBA(pH7.4)로 3번 세척 후, 57-C11과 mouse Isotype IgG이 들어있는 그룹에는 FITC 형광이 결합되어있고 mouse IgG에 대해 특이적인 α -mouse IgG-FITC (2 μ g/ml) (Genetex, 미국) 항체를 넣고 human Isotype IgG과 Ch57 항체가 들어있는 그룹에는 FITC 형광이 결합되어 있고 human IgG에 대해 특이적인 α -Human IgG-FITC(2 μ g/ml) (Thermo, 미국) 항체를 넣고 20분간 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 반응 이후에 PBA로 세척 후 PI (1:1000)가 들어있는 500 μ L PBA로 부유한 뒤, 유세포 분석기인 FACS Calibur (BD, 미국)을 통하여 57-C11 항체와 Ch57항체가 암세포 안으로 이동하는 것을 표면에서의 결합의 감소를 통해 확인할 수 있었다(도 10).

도면

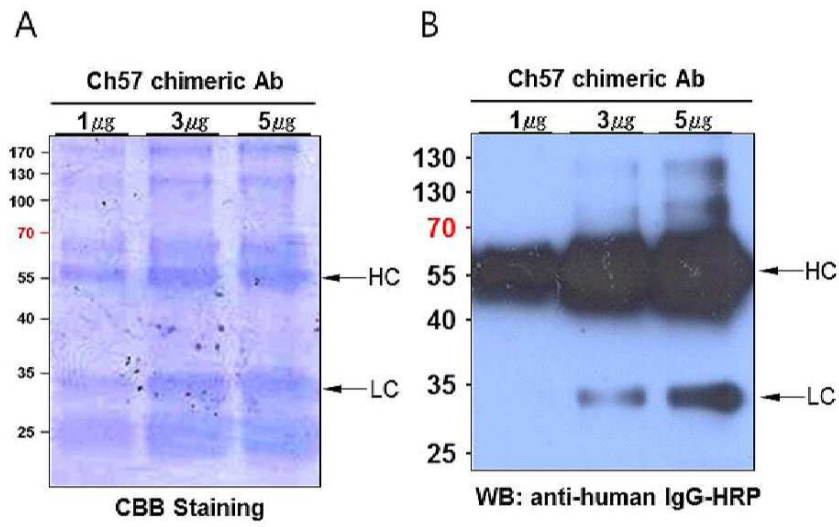
도면1



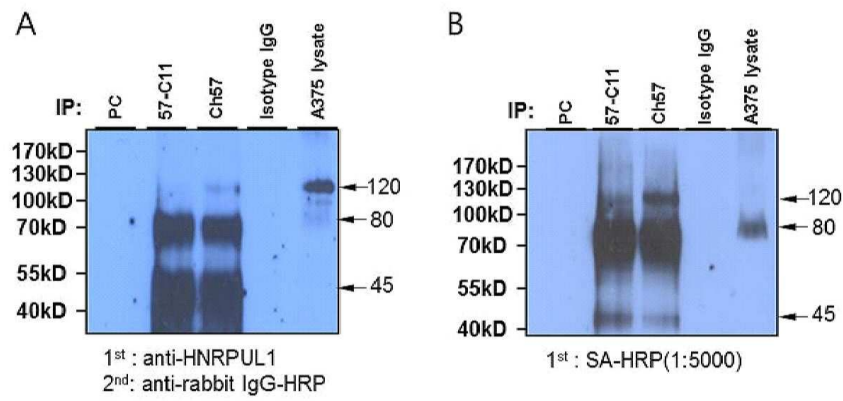
도면2



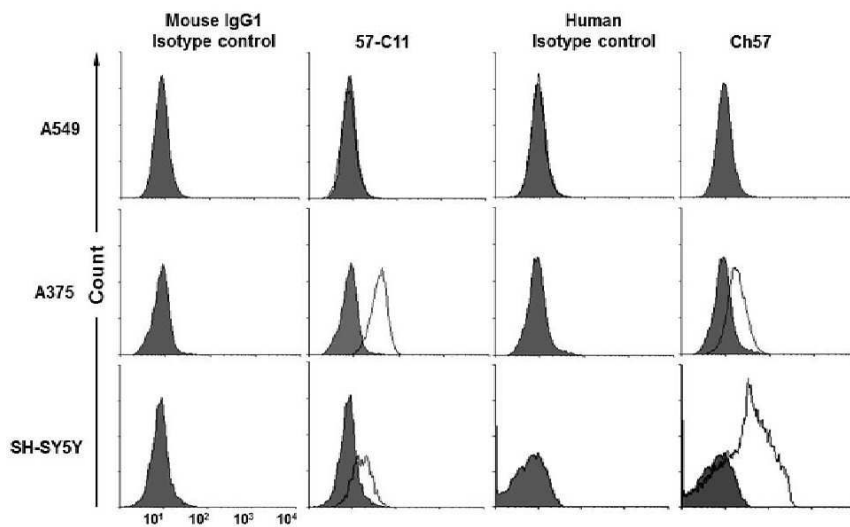
도면3



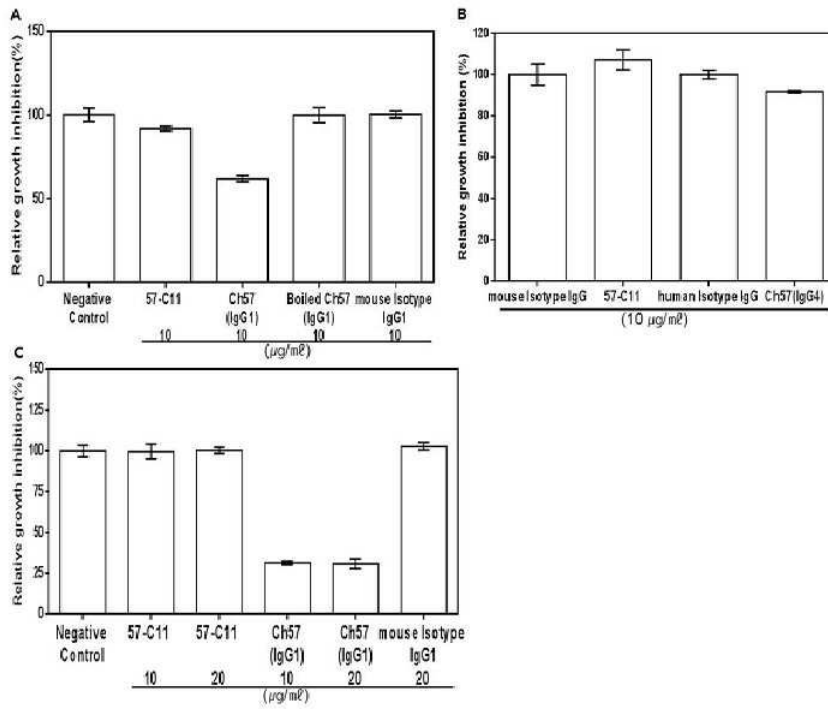
도면4



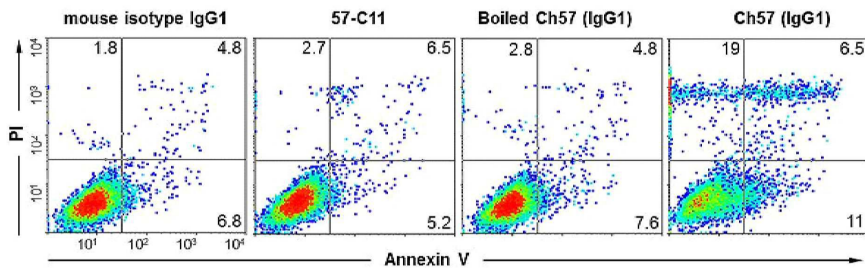
도면5



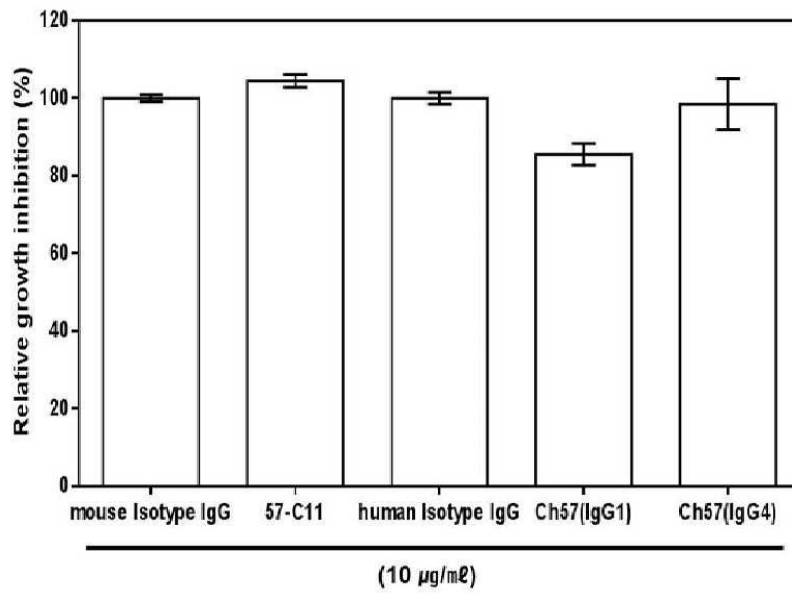
도면6



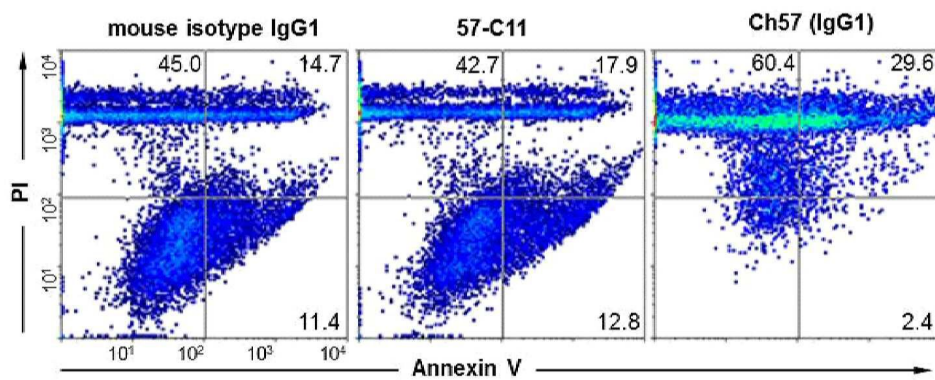
도면7



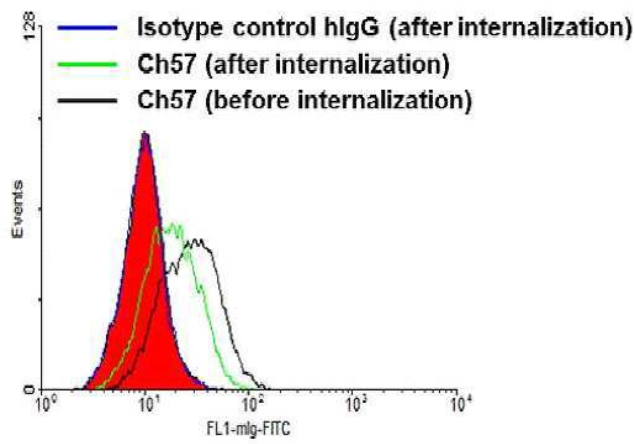
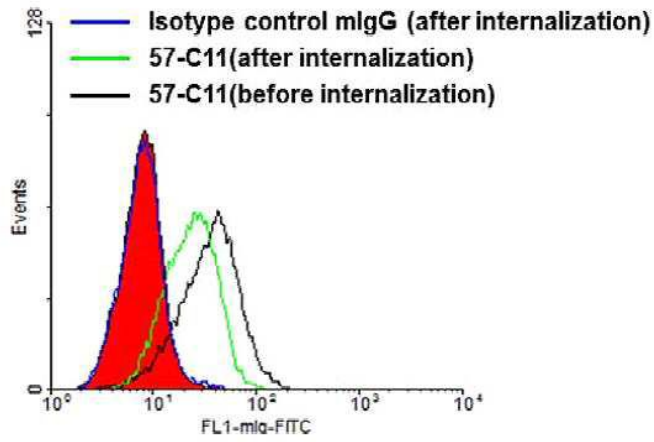
도면8



도면9



도면10



도면11

Chimeric antibody Ch57 중쇄 (IgG1) 아미노산 서열

T L T M E W S W V F L F F L S V T T G V H S Q V Q L Q E S G P
E L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T D Y I I L W V K Q S
H G K S L E W I G N I N P Y Y G S T T Y N L K F K G K A T L T
V D K S S S T A Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A R G D L T
G T F A Y W G Q G T L V T V S A A K T T P P S V Y A S T K G P
 S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
 T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
 V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E
 P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P
 K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
 V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L
 H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
 G Q E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
 Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
 W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
 STOP

검은색: 신호 아미노산 서열

파란색: 57-c11 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (mouse)

빨간색: heavy chain constant region 아미노산 서열 (human IgG1)

도면12

Chimeric antibody Ch57 경쇄 아미노산 서열

R H E Q T S M G I K M E T H S Q V F V Y M L L W L S G V E G D
I V M T Q T P K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V G T Y
V A W Y Q Q K P G Q S P K E L I Y S A S Y R Y S G V P D R F T
G S G S G T D F T L T I S N V Q S E D L A E Y F C Q Q F N S Y
P L T F G A G T K L E L Q R A D A A P T V S R T V A A P S V F
 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F
 N R G E C STOP

검은색: 신호 아미노산 서열

파란색: 57-c11경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (mouse)

빨간색: kappa chain constant region 아미노산 서열 (human Ck)

도면13

Chimeric antibody Ch57 중쇄 (IgG4) 아미노산 서열

```

T L T M E W S W V F L F F L S V T T G V H S Q V Q L Q E S G P
E L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T D Y I I L W V K Q S
H G K S L E W I G N I N P Y Y G S T T Y N L K F K G K A T L T
V D K S S S T A Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A R G D L T
G T F A Y W G Q G T L V T V S A A K T T P P S V Y A S T K G P
S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V
T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E
S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V F L F P P K P K D T
L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D
W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P
R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K A T P P V L D S D G S F F
L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y
T Q K S L S L S L G K Stop
    
```

검은색: 신호 아미노산 서열

파란색: 57-c11중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (mouse)

빨간색: heavy chain constant region 아미노산 서열 (human IgG4)

서열 목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> MEDICINAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CANCER AND HEALTH FUNCTIONAL FOOD
- <130> 2017-320
- <150> KR 10-2017-0168117
- <151> 2017-12-08
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 468
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Chimeric antibody heavy chain
- <400> 1

Asp Glu Phe Thr Leu Thr Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe

1 5 10 15

Leu Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
 20 25 30
 Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 35 40 45
 Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Ile Ile Leu Trp Val Lys Gln
 50 55 60
 Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Leu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 85 90 95
 Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr
 100 105 110
 Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Leu Thr Gly
 115 120 125
 Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 130 135 140
 Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 145 150 155 160
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 165 170 175
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 180 185 190
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 195 200 205
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 210 215 220
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 225 230 235 240
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 245 250 255
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 260 265 270

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 275 280 285
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 290 295 300

 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 305 310 315 320
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 325 330 335
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 340 345 350
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 355 360 365
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys
 465
 <210> 2
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chimeric antibody light chain
 <400> 2

Lys Leu Arg His Glu Gln Thr Ser Met Gly Ile Lys Met Glu Thr His
 1 5 10 15
 Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser Gly Val Glu Gly
 20 25 30

 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 35 40 45
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Tyr
 50 55 60
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Glu Leu Ile
 65 70 75 80
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

 100 105 110
 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Gln Arg Ala Asp Ala Ala
 130 135 140
 Pro Thr Val Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 145 150 155 160
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 165 170 175

 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 180 185 190
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 195 200 205
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 210 215 220
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 225 230 235 240
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

245 250 255

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antibody heavy chain signal amino acid

<400> 3

Asp Glu Phe Thr Leu Thr Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe

1 5 10 15

Leu Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val

20 25

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Chimeric antibody heavy chain variable region(mouse)

<400> 4

Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val

1 5 10 15

Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Ile Ile

20 25 30

Leu Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn

35 40 45

Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Leu Lys Phe Lys Gly

50 55 60

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Asp Leu Thr Gly Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr

115 120 125

<210> 5

<211> 316

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antibody heavy chain constant region(human IgG1)

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Tyr

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Glu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Gln Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

Pro Thr Val Ser

115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antibody light chain kappa chain constant region(human Ck)

<400> 8

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85

90

95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105