



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0017151  
(43) 공개일자 2025년02월04일

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 35/15</i> (2025.01)<br/> <i>A61K 35/17</i> (2025.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)<br/> <i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>G01N 33/569</i> (2017.01)<br/> <i>G01N 33/574</i> (2006.01) <i>G01N 33/577</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/> <i>C07K 16/2896</i> (2013.01)<br/> <i>A61K 35/15</i> (2025.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-0094780<br/> (22) 출원일자 2024년07월18일<br/> 심사청구일자 2024년07월18일</p> <p>(30) 우선권주장<br/> 1020230095530 2023년07월21일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인<br/> <b>세종대학교산학협력단</b><br/> 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>류춘제</b><br/> 서울특별시 서초구 고무래로 35, 106동 3203호 (반포동, 반포리체아파트)</p> <p><b>임근표</b><br/> 서울특별시 강동구 상암로3길 77, 103동 2004호 (암사동, 삼성 광나루 아파트)<br/> (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/> <b>특허법인리체</b></p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

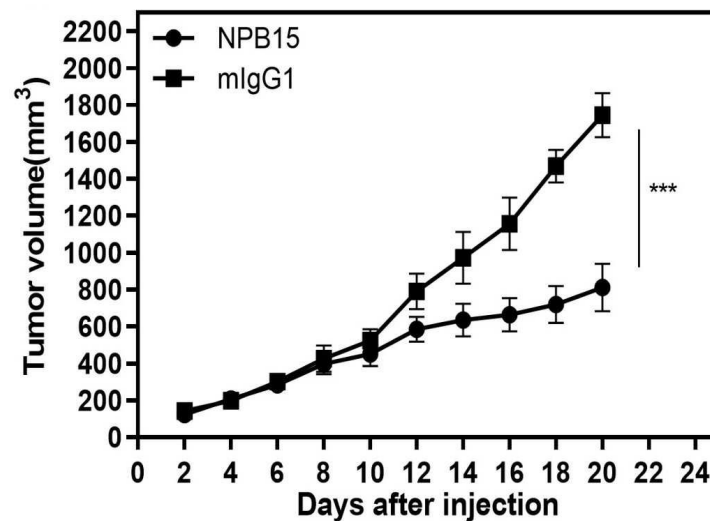
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 항 CD98 단일클론항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 순수인간만능줄기세포, 준인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 암줄기세포 표면의 CD98에 표면적으로 결합하는 단일클론항체 NPB15, 이를 생산하는 하이브리도마, 이를 이용한 미분화 만능줄기세포의 검출용 조성물, 이를 이용한 암 예방/치료용 약학 조성물, 이를 이용한 암 진단용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도21b



(52) CPC특허분류

*A61K 35/17* (2025.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*G01N 33/56966* (2013.01)

*G01N 33/574* (2013.01)

*G01N 33/577* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

(72) 발명자

**한산하**

서울특별시 광진구 광나루로15길 7-16, 201호 (군자동)

**한세인**

서울특별시 은평구 불광로2길 27, 201동 506호 (불광동, 불광롯데캐슬)

**최홍서**

서울 광진구 동일로54길 11-7, 204호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711127322                           |
| 과제번호        | 2016M3A9C6918220                     |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                            |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                               |
| 연구사업명       | 바이오·의료기술개발(R&D)                      |
| 연구과제명       | 신규 전환인자 발굴을 통한 순수 인간만능줄기세포 유도 및 기전규명 |
| 과제수행기관명     | 세종대학교 산학협력단                          |
| 연구기간        | 2021.01.01 ~ 2021.03.31              |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2, 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2, 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 암줄기세포 표면의 CD98에 결합하는 항체.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 인간 IgG1 불변영역으로부터 유래한 중쇄 불변영역 및 인간 kappa 불변영역으로부터 유래한 경쇄 불변영역을 더 포함하는 항체.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 영역을 포함하는 항체.

#### 청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 미분화 만능줄기세포의 검출용 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 항체에 접합된 항암 물질을 더 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 항암 물질은 상기 항체에 결합하는 2차 항체를 거쳐 접합된 것인 암의 예방 또는 치료

용 약학 조성물.

#### 청구항 10

청구항 7에 있어서, NK-cell, 대식세포, 및 호중구로 이루어진 군에서 적어도 하나를 더 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 11

청구항 7에 있어서, 상기 암은 CD98 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 12

청구항 7에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 배아 암종, 췌장암, 골육종, 피부암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 13

청구항 1의 항체를 생산하는 하이브리도마.

#### 청구항 14

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 암 진단용 조성물.

#### 청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 암은 CD98 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암 진단용 조성물.

#### 청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 배아 암종, 췌장암, 골육종, 피부암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암 진단용 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 CD98에 특이적으로 결합하는 단일클론항체에 대한 것으로, 구체적으로는 인간 만능줄기세포와 간암을 포함하는 다양한 암세포 표면에 발현하는 CD98을 인식하는 단일클론항체와 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마, 상기 단일클론항체를 포함하는 미분화 만능줄기세포의 제거, 분리, 분석용 조성물과 상기 단일클론항체를 포함하는 항암 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 인간만능줄기세포(human pluripotent stem cells; hPSC)는 무제한 증식과 몸을 구성하는 모든 세포로 분화할 수

있는 능력을 가진 세포이다. 첫 번째 인간 만능줄기세포인 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cell; hESC)는 1998년 미국 James Thomson 박사팀에 의해 인간 냉동 배아에서 확립되었고, 2007년에는 일본 Shinya Yamanaka 박사팀에 의해서 유전자 도입에 의해 인간 배아줄기세포와 유사한 인간 유도만능줄기세포(human Induced Pluripotent Stem Cell; hiPSC)가 확립되었다. Cambridge 대학의 Austin Smith 교수는 포유류의 만능 줄기세포를 다시 두 세 가지 다른 상태로 분류하고 수정란이 자궁에 착상하기 전과 후로 나누어서 착상 전(pre-implantation epiblast) 또는 착상 후 상배엽(post-implantation epiblast)에서 각각 다른 만능줄기세포를 분리할 수 있으며, 착상 전 만능줄기세포를 순수(naive) 만능성, 그리고 착상 후를 준(primed) 만능성이라고 명명하였다. 순수 상태와 준 상태 만능줄기세포는 세포모양, 성장속도, 분화능력, 메틸화 정도, 생식선 전송(germline transmission) 능력 등에서 차이가 많은데, 준 상태는 크게 편편한 상태로 자라며 성장속도가 느리나, 순수 상태는 작은 돔(dome) 모양으로 자라며 트립신으로 단일세포로 떼어도 잘 자라고, 성장속도가 빠르며, 발생단계에서 아직 편중되지 않은 상태로 더 많은 세포로 분화능력이 기대되고, 메틸화 정도가 더 낮고, 생식선 전송능력이 더 탁월한 발생 초기 만능줄기세포로 알려졌으며, 준 인간만능줄기세포에서 다양한 배양 조건에 따라 순수 인간만능줄기세포로 유도할 수 있다.

[0004] 암이 줄기세포에서 발생할 수 있다는 첫 번째 아이디어는 19세기 초이며 Durante와 Conheim에 의해 암의 "Embryonal Rest hypothesis"으로 공식적으로 제시되어, 배아 조직의 잔해가 성인 장기에 남아있다가 암으로 발생한다고 제안하였다. 배아 발생동안에 활발히 발현하다 성인 조직에는 최소로 존재하고 암 발생시 다시 발현되는 분자들을 oncofetal antigen이라고 부르며, Oncofetal antigen들은 현재 암의 진단이나 치료에 쓰이는 중요한 표적분자로, CA-125, CEA, AFP, cancer/testes antigen, POA등 실제 임상에서 진단 마커로 사용되고 있으며, 그 외에도 Cripto-1, Glypican-3, 5T4, M2A 등이 oncofetal antigen으로 알려지고 있으며, 또 이들을 표적하는 항체는 암 치료용 항체로 개발되고 있다. 그러나 인간 배아에 대한 윤리적 문제로 oncofetal antigen 연구가 쉽지 않았지만 1998년에 인간 배아줄기세포가 확립되고 배양이 가능하면서 5T4, Cripto, EpCAM등의 인간 배아줄기세포 표면 oncofetal antigen이 발굴되었다. 최근 연구에서 인간 배아줄기세포(hESC)나 인간 유도만능줄기세포(hiPSC) 등 hPSC를 면역주사한 생쥐에서 colon cancer, lung cancer, breast cancer, mesothelioma, melanoma에 대한 억제력을 확인하여 hPSC에 존재하는 oncofetal antigen을 인식하는 단일클론항체는 실제로 같은 항원을 발현하는 암세포 발생을 저지할 수 있다는 것이 증명되었다. 따라서 hPSC에서 oncofetal antigen 연구를 통해 암줄기세포나 암세포 특이적인 분자를 발굴할 수 있으며 이런 전략을 통한 암 치료용 표적 분자들이 개발되고 있다.

[0005] CD98 (SLC3A2, 4F2)은 solute carrier family protein으로 아미노산 전달체의 구성요소이며 L-type amino acid transporter 1(LAT1/SLC7A5) 또는 cystine/glutamate transporter(xCT/SLC7A11) 와 같은 또 다른 solute carrier family protein과 쌍을 이루어 기능한다. CD98은 항체에 의해 결합된 항원을 생화학적으로 분석하여 발견하였다. CD98은 아미노산 전달체로 세포 안, 밖으로 아미노산을 전달하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 대표적으로 LAT1과 쌍을 이루어 분지사슬 아미노산(Branched chain amino acid, BCAA)과 방향성 아미노산(Aromatic amino acid, AAA)을 세포 안으로 전달하여 세포주기와 뉴클레오타이드 풀 유지에 중요한 역할을 하며 LAT1의 감소는 세포의 증식 감소에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또 다른 기능으로는 xCT와 쌍을 이루어 cystine을 세포안으로 전달하는 역할을 한다. Cystine은 세포내의 글루타치온(Glutathione, GSH)를 합성하는 재료로 세포 내 활성산소를 환원시켜주어 산화 환원 균형을 유지하여 세포를 보호하는데 중요한 역할을 수행한다.

[0006] 세포 대사에 필수적인 CD98은 대다수의 세포와 조직에서 고르게 분포하지만 최근 연구를 통해서 암세포에서 과발현되어 세포증식, 발암, 이동에 중요하다는 것이 밝혀졌다. CD98의 과발현은 폐암과 간암을 비롯한 다양한 암에서 진행성 종양과 전체 생존율에서 나쁜 예후와 밀접한 상관관계가 있다. 최근 연구에 의하면 다양한 암에서 화학요법 저항 암세포나 방사선 요법 저항 암세포에서 CD98이 특히 과발현하고 있다는 증거도 보고되었다. 이는 CD98이 암 줄기세포성과 밀접한 관련이 있다는 의미이며 두경부암과 구강인두암에서 암줄기세포 마커로 제시된 바가 있다. 따라서 CD98은 다양한 암종에서 면역치료요법의 매력적인 표적으로 평가된다. 실제로 CD98을 표적하는 단일클론항체와 그것의 인간화 항체(IGN523)는 아미노산 수송을 막거나 apoptosis를 통한 세포사멸을 유발하여 급성 골수성백혈병 치료에 효과를 있음을 보여주었다.

[0007] CD98 단백질의 항암 타겟으로서의 우수함에도 불구하고 CD98 단백질은 암뿐만 아니라 다양한 세포와 조직에서 다양하게 분포한다. 따라서 정상세포 표면의 CD98을 인식하는 항체치료제는 다양한 면역 부작용을 초래할 수 있다. 하지만 CD98은 글리코실화 반응이 많이 일어나는 단백질이고 글리코실화반응이 많이 일어나는 단백질의 경우 정상 세포와 암세포에서 당질화 수준의 차이가 발생하여 구조적 차이를 갖는다. 최근 당질화 패턴을 인식하여 암 특이적 분자에만 결합하는 항체에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. CD98의 경우에도 정상세포와 암

세포 사이에 당질화를 포함한 단백질 수식에서 차이가 있을 것으로 보인다. 실제로 정상적인 백혈구에는 결합하지 않고 다발성골수종 환자의 골수종세포 표면의 CD98에 특이적으로 존재하는 high mannose-type N-glycan 결합하는 단일클론항체가 보고되었다. 이 항체는 정상조직에 대한 결합력이 현저히 낮으며 암세포에만 특이적으로 결합하여 항체 의존성 세포 사멸(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC) 및 보체 의존성 세포 사멸(Complement-Dependent Cytotoxicity, CDC)에 의한 항암 효과를 보여주었다. 인간 항체 라이브러리에서 탐색한 CD98에 대한 항체는 생쥐 xenograft모델에서 간암, 림프종, 췌장암, 대장암등에서 대식세포에 의한 ADCC 및 항체 의존성 세포 포식작용(Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis, ADCP)을 통한 항암효과를 보여주었으며, pH가 낮은 암 미세환경에서 CD98에 대한 보다 높은 친화도를 보이는 인간 항체로 다시 디자인하여 정상조직에 대한 부작용을 현저히 줄일 수 있었다. 또한 CD98은 조절성 T 세포(Regulatory T cell, Treg)에도 발현이 높은 것으로 확인되며 Treg 표면의 CD98분자가 또 다른 Treg 세포의 CD147과 상호작용하여 Treg의 Foxp3의 발현을 유지시켜주는 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. Foxp3는 Treg의 안정성을 올려주어 더 오래 세포가 생존하고 기능하게 돕는 역할을 하며, Treg 세포는 숙주의 면역 기능을 억제하여 암 성장을 촉진한다. 따라서 Treg 세포 표면의 CD98을 항체로 억제하는 방법으로도 항암 면역치료제 개발이 가능할 것으로 생각된다.

[0008] 우리는 순수 인간 만능줄기세포를 생쥐에 주사하여 제조한 단일클론항체 군중에서 순수 인간만능줄기세포와 준인간 만능줄기세포에 동시에 결합하는 항체 NPB15를 제조하였다. NPB15 항체가 인식하는 항원은 만능줄기세포를 분화시킬 때 발현이 현저히 감소하여 미분화 인간 만능줄기세포 특이적인 특성을 보였다. NPB15 항체는 정상세포인 말초 혈액 단핵구나 간세포에는 결합하지 않지만 인간 배아암, 간암, 폐암 세포에는 잘 결합하였다. NPB15 항원을 분석한 결과 CD98 (SLC3A2, 4F2)이었으며, CD98를 인식하는 NPB15항체는 인간만능줄기세포와 암세포에서 동시에 발현하는 Oncofetal epitope를 인식하는 새로운 항체로 암치료용 항체로 개발할 수 있을 것이라고 가정하였다. 간암과 폐암세포에서 CD98의 기능을 평가한 결과 CD98은 암세포 성장, 생존, 이동을 촉진하였으며 암줄기세포성 특성을 보여 주었다. 그리고 NPB15가 잘 결합하는 암세포일수록 더 높은 성장과 생존능을 보여주었으며, NPB15를 암세포에 처리할 경우 현저한 항체 의존성 세포 독성 효과 (ADCC)를 보여주었다. 실제로 누드마우스에 간암세포를 이식한 생쥐 이중 암 이식 모델에서 NPB15를 주사할 경우 효과적인 항암효과를 보여 주었다. 따라서 NPB15는 암치료용 항체로 개발될 수 있는 항체임을 확인하여 이 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 2344948호  
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제 2235935호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 인간 순수 만능줄기세포, 인간 준 만능줄기세포, 암세포 및 암줄기세포 표면에 발현하는 CD98 단백질을 인식하는 단일클론항체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 상기 단일클론항체의 기능을 활용한 미분화 인간만능줄기세포 마커로 미분화 만능줄기세포의 검출용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명은 상기 단일클론항체의 기능을 활용한 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 암 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 본 발명은 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0016] 1. 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine

region 1; HCDR1), 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2, 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 상보성 결정영역 1(light chain complementary determine region 1; LCDR1), 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2, 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.

- [0017] 2. 위 1에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.
- [0018] 3. 위 1에 있어서, 상기 항체는 순수 인간만능줄기세포(human naive pluripotent stem cells), 준 인간만능줄기세포(human prime pluripotent stem cells), 인간 암세포 및 암줄기세포 표면의 CD98에 결합하는 항체.
- [0019] 4. 위 1에 있어서, 인간 IgG1 불변영역으로부터 유래한 중쇄 불변영역 및 인간 kappa 불변영역으로부터 유래한 경쇄 불변영역을 더 포함하는 항체.
- [0020] 5. 청구항 1에 있어서, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 영역을 포함하는 항체.
- [0021] 6. 위 1 내지 5 중 어느 하나의 항체를 포함하는 미분화 만능줄기세포의 검출용 조성물.
- [0022] 7. 위 1 내지 5 중 어느 하나의 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0023] 8. 위 7에 있어서, 상기 항체에 접합된 항암 물질을 더 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0024] 9. 위 8에 있어서, 상기 항암 물질은 상기 항체에 결합하는 2차 항체를 거쳐 접합된 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0025] 10. 위 7에 있어서, NK-cell, 대식세포, 및 호중구로 이루어진 군에서 적어도 하나를 더 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0026] 11. 위 7에 있어서, 상기 암은 CD98 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0027] 12. 위 7에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 배아 암종, 췌장암, 골육종, 피부암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0028] 13. 위 1의 항체를 생산하는 하이브리도마.
- [0029] 14. 위 1 내지 5 중 어느 하나의 항체를 포함하는 암 진단용 조성물.
- [0030] 15. 위 14에 있어서, 상기 암은 CD98 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암 진단용 조성물.
- [0031] 16. 위 14에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 배아 암종, 췌장암, 골육종, 피부암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암 진단용 조성물.

## 발명의 효과

- [0033] 본 발명의 단일클론항체는 인간 순수 만능줄기세포, 인간 준 만능줄기세포, 암세포 및 암줄기세포 표면에 발현하는 CD98 단백질을 인식할 수 있다. 이 항체는 미분화 인간만능줄기세포 마커를 인식하는 항체로 미분화 만능줄기세포의 검출용 조성물 등에 사용할 수 있다. 또한 이 항체는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 암 진단용 조성물 등에 사용할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1a는 준 인간만능줄기세포(primed H9)를 2i/L/F/A배지에서 작은 둥형태의 순수 인간만능줄기세포(naive H9 (2i/L/F/A))로 전환된 모양을 보여준 것이다.
- 도 1b는 유세포분석을 통하여 primed 인간만능줄기세포 마커인 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24와 naive 인간만능줄기세포 marker인 CD7, CD77, CD130 발현을 primed H9 및 naive H9 (2i/LF/A) 세포에서 보여준 그림이다(실선은 각 단일클론항체이고, 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다).

도 1c는 NPB15 하이브리도마 세포배양액을 Protein G agarose bead를 이용한 친화성 크로마토그래피 방법을 통해 NPB15항체를 정제한 그림으로 왼쪽은 전기영동 후 CBB R-250 용액으로 염색을 통하여 확인한 것이고, 오른쪽은 웨스턴 블랏팅 후에 NPB15항체를 mIgG-(H+L)-HRP 2차 항체를 이용하여 확인한 것이다. 여기서 HC는 immunoglobulin heavy chain, LC는 immunoglobulin light chain을 의미한다.

도 2는 준 인간만능줄기세포, 2i/L/F/A, 2i/L/X/F/P배지에서 유도한 순수 인간만능줄기세포, 생쥐 배아섬유아세포(MEF),  $10^{-5}$  M Retinoic acid(RA)를 7일 처리한 H9 세포에서 NPB15의 발현 정도를 유세포분석기로 확인한 그림이다.

도 3은 인간배아암세포(NT2/D1, 2102Ep), 간암세포(Huh7, HepG2, SNU387, SNU449, PLC/PRF/5, SK-Hep1), 비소세포폐암세포(NCI-H460, A549), 정상 간세포(Hepatocyte), 말초혈액단핵구(PBMC)에서 NPB15의 발현 정도를 유세포분석기로 확인한 그림이다.

도 4a는 바이오틴(biotin)으로 세포표면을 표지한 NT-2/D1, 2102Ep, A549세포를 NPB15로 면역침강 후 SDS-PAGE Gel에서 전개하고, 니트로셀룰로오즈 막으로 옮긴 후 streptavidin-horse raddish peroxidase(SA-HRP)로 NPB15 항원의 크기를 확인한 그림이다.

도 4b는 A549 세포를 NPB15로 면역 침강 후 CBB 염색을 한 뒤 LC-MS/MS 분석을 진행하기 위해 목표하는 항원의 크기를 표시한 그림이다.

도 4c는 LC-MS/MS 결과로 얻은 펩타이드 서열이 Lymphocyte activation antigen(CD98)의 아미노산 서열과 일치하는 부분을 표시한 그림이다.

도 5a는 바이오틴으로 표지한 A549세포를 NPB15로 면역침강 후 SDS-PAGE Gel에서 전개한 후 니트로셀룰로오즈 막으로 옮긴 후 SA-HRP로 NPB15 항원의 크기를 확인한 그림이다.

도 5b는 도 5a와 동일한 막을 상업적 항-CD98 항체로 웨스턴 블랏팅하여 NPB15가 면역침강한 항원이 항-CD98 항체에 인식됨을 확인한 그림이다.

도 5c 및 5d는 HEK293FT세포에 FLAG Tag를 가진 CD98-FLAG발현벡터를 외부형질도입 시켜준 뒤, Control mouse IgG1, NPB15, 항-CD98와 항-FLAG로 각각 면역 침강후 항-CD98과 항-FLAG로 동일한 위치에서 항원이 확인되는 것을 확인하여 NPB15가 직접 CD98을 인식하여 면역침강한다는 것을 확인한 그림이다. 화살표는 CD98을 지시한다.

도 6a는 인간 간암세포주(SNU-449, Huh7세포)와 인간폐암세포주(NCI-H460)에 CD98 siRNA(siCD98)을 이용하여 CD98을 녹다운한 뒤 웨스턴 블랏팅을 통해 CD98 발현의 감소를 확인한 그림이다.

도 6b는 CD98 녹다운 암세포들에서 세포표면의 CD98 발현의 감소를 유세포 분석기를 통해 확인한 그림으로 isotype는 control isotype antibody이고, siCon은 control 녹다운한 세포이다.

도 6c는 CD98이 녹다운된 암세포 (siCD98)에서 암세포 성장을 관찰하기 위하여 세포수를 측정하여 음성대조군 (siCon) 세포수와 비교한 것이다 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

도 7a, 7b 및 7c는 CD98 녹다운 SNU-449, Huh7, NCI-H460 세포를 PI와 Annexin V로 염색하여 apoptosis를 측정 한 결과이다.

도 7d, 7e 및 7f는 도 7a 내지 7c의 결과를 정량적인 그래프로 표현하여 CD98 녹다운 암세포들에서 세포사멸이 증가한 것을 표현한 그림이다 (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , ns, not significant).

도 8a는 CD98 녹다운 SNU-449, Huh7, NCI-H460세포로 clonogenic survival assay를 진행한 후 생존하여 형성된 colony를 crystal violet으로 염색한 그림이다.

도 8b, 8c 및 8d는 도 8a의 결과를 Image J로 정량하여 통계처리한 결과이다 (\*\*  $p < 0.001$ ).

도 9a는 CD98 녹다운 (siCD98) SNU-449세포로 Wound healing assay를 수행하여 스크래치가 채워지는 정도를 음성대조군 (siCon)과 12시간 후에 비교한 것 그림이다.

도 9b는 도 9a의 과정을 반복하여 스크래치 영역을 Image J로 정량하여 통계처리하여 비교한 것이다.

도 9c는 CD98 녹다운 (siCD98) Huh7세포로 Wound healing assay를 수행하여 스크래치가 채워지는 정도를 음성대조군 (siCon)과 12시간 후에 비교한 것 그림이다.

도 9d는 도 9c의 과정을 반복하여 스크래치 영역을 Image J로 정량하여 통계처리하여 비교한 것이다 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns, not significant).

도 10a는 SNU-449와 NCI-H460를 NPB15로 표지한 후 항원의 발현이 높은 상위30% 그룹과 낮은 하위 30% 그룹을 유세포 분석의 히스토그램에서 표시한 그림이다.

도 10b는 NPB15의 발현이 높은 그룹과 낮은 그룹의 세포로 각각 clonogenic survival assay를 진행하여 colony를 crystal violet으로 염색한 결과이다.

도 10c 및 10d는 도 10b에서 colony의 개수를 측정하여 그래프로 정량화하여 CD98 상위그룹에서 콜로니 생존율이 증가함을 보여준 그림이다 (\*\*  $p < 0.001$ ).

도 11a는 CD98 녹다운 SNU-449 세포에서 암줄기세포 마커 CD44 발현의 변화를 유세포분석기로 확인한 결과이다.

도 11b는 CD98 녹다운 NCI-H460 세포에서 CD44 발현의 변화를 유세포분석기로 확인한 결과이다.

도 11c는 도 11a의 결과를 정량화한 결과이다(\*\*  $p < 0.001$ ).

도 11d는 도 11b의 결과를 정량화한 결과이다(\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ ).

도 11e는 CD98 녹다운 SNU-449, Huh7, NCI-H460세포에서 암줄기세포 마커인 ALDH 활성을 측정 비교한 결과이다 (\*\*  $p < 0.01$ ).

도 11f는 인간 간암세포주 Huh7세포에서 CD98 siRNA(siCD98)을 이용하여 CD98을 녹다운한 뒤 웨스턴 블랏팅을 통해 CD98 발현감소를 확인하고 같은 세포에서 암줄기세포 마커인 EpCAM이 감소한 것을 확인한 그림이다.

도 11g는 도 11f의 실험 결과를 반복 후 통계처리한 것이다 (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ ; ns, not significant).

도 12a는 간암세포 Huh7를 암줄기세포 특성을 가지는 종양 구형체 (tumorsphere)로 배양한 그림이다.

도 12b는 부착성 Huh7세포와 종양구 Huh7세포에서 유세포분석기로 NPB15와 더불어 암줄기세포 마커인 CD133, EpCAM의 발현 증가를 비교한 것이다.

도 12c는 도 12b의 결과를 정량한 것이다(\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

도 13a는 NPB15 중쇄를 PCR로 증폭한 결과를 아가로스젤에서 확인한 결과이다.

도 13b는 NPB15의 경쇄를 PCR로 증폭한 결과이다.

도 13c는 NPB15 중쇄를 클로닝하기 위해 pBluescript KS+ 벡터를 EcoR I 과 Sal I 제한효소를 처리하여 절단한 결과이다.

도 13d는 NPB15 경쇄를 클로닝하기 위해 pBluescript KS+ 벡터를 HindIII 과 Sal I 제한효소를 처리하여 절단한 결과이다.

도 14는 NPB15의 가변 영역 중쇄부분을 클로닝하여 시퀀스를 분석한 결과를 DNA와 아미노산서열로 표시한 결과이다. CDR에 해당되는 부분을 진한 글씨로 표시하였다.

도 15는 NPB15의 가변영역 경쇄부분을 클로닝하여 시퀀스를 분석한 결과를 DNA와 아미노산서열로 표시한 결과이다. CDR에 해당되는 부분을 진한 글씨로 표시하였다.

도 16a는 NPB15의 중쇄 가변영역과 분비를 위한 신호 펩타이드를 PCR을 통해 연결시켜준 것을 아가로스젤에서 확인한 결과이다.

도 16b는 신호서열이 연결된 중쇄 가변영역 부분(화살표)의 벡터에 클로닝을 확인하기 위해 pdCMV-dhfr Vector를 제한효소 EcoR I 과 Apa I 으로 절단한 것을 확인한 결과이다.

도 16c는 NPB15의 경쇄 가변영역과 신호 펩타이드를 PCR을 통해 연결시켜준 것을 아가로스젤에서 확인한 결과이다.

도 16d는 신호서열이 연결된 경쇄 가변영역 부분(화살표)의 벡터에 클로닝을 확인하기 위해 pdCMV-dhfr Vector를 제한효소 HindIII와 BsiW I 으로 절단한 것을 확인한 결과이다.

도 17은 NPB15항체의 중쇄 가변영역과 인간 IgG1 불변영역을 연결한 키메라 항체의 중쇄 아미노산 서열(서열번호

호 9)을 나타낸 것이다.

도 18은 NPB15항체의 경쇄 가변영역과 인간 kappa 불변영역을 연결한 키메라 항체의 경쇄 아미노산 서열(서열번호 10)을 나타낸 것이다.

도 19a는 키메라 NPB15항체 발현백터를 HEK293FT 도입한 후 세포배양액에서 protein G-agarose로 키메라 항체를 정제한 후 SDA-PAGE 겔에서 Coomassie brilliant blue(CBB)로 염색한 결과로 Control로 human IgG를 사용하였다.

도 19b는 도 19a를 니트로셀룰로소막으로 옮겨서 항-anti human IgG-HRP항체로 웨스턴블랏팅을 수행하여 인간 항체임을 증명한 결과이다.

도 19c는 간암세포주 Huh7에 대한 유세포분석을 통해서 NPB15와 Chi-NPB15가 동일하게 간암세포에 결합하는 것을 보여준 그림이다.

도 20은 키메라 항체 NPB15가 간암세포에 결합하여 ADCC신호를 유발할 수 있는지 관찰하기 위하여 ADCC reporter assay kit(Promega)를 사용하여 Huh7 세포에 Human IgG를 control 항체와 키메라 NPB15를 시리얼로 희석하여 결합시키고 ADCC 신호를 증폭하는 Jurkat을 공동배양하여 발광하는 빛을 측정하여 키메라 항체 NPB15가 ADCC 신호를 유발하는 것을 측정한 그림이다(\* p <0.05; \*\*\* p value <0.001).

도 21a는 간암 세포인 Huh7 세포를 이중 이식한 누드마우스 모델에서 NPB15의 항암 효과를 관찰하는 실험 과정을 나타낸 모식도이다.

도 21b는 간암 세포인 Huh7 세포를 이중 이식한 누드마우스에 mIgG1 isotype control 항체를 주사한 대조군과 NPB15를 주사한 실험군에서 암 부피 변화를 관찰한 것이다(\*\*\* p value <0.001).

도 21c는 항체 투여 후 20일차에 마우스를 희생시켜 수확한 암 덩어리의 크기를 비교한 결과이다. mIgG1 isotype control 항체를 주사한 대조군과 NPB15를 주사한 실험군 간 암 덩어리의 크기를 비교하였다.

도 21d는 mIgG1 isotype control 항체를 투여한 대조군과 NPB15를 투여한 실험군에서 암의 무게를 비교한 것으로, 암의 크기를 2-way ANOVA를 통해 비교했으며 암의 무게는 Student's t-test를 통해 비교했다(\* p value <0.05).

도 21e는 항체 주사 시 부작용 여부를 확인하기 위해, 항체 투여 이후 mIgG1 isotype control 항체를 투여한 대조군과 NPB15를 투여한 실험군의 체중 변화를 측정한 결과이다.

도 22a는 간암 세포인 Huh7 세포를 이중 이식한 누드마우스 모델에서 Chi-NPB15의 항암 효과를 관찰하는 실험 과정을 나타낸 모식도이다.

도 22b는 간암 세포인 Huh7 세포를 이중 이식한 누드마우스에 hIgG1 isotype control 항체를 주사한 대조군과 Chi-NPB15를 주사한 실험군에서 암 부피 변화를 관찰한 것이다(\*\*\* p value <0.001).

도 22c는 항체 주사 시 부작용 여부를 확인하기 위해, 항체 투여 이후 hIgG1 isotype control 항체를 투여한 대조군과 Chi-NPB15를 투여한 실험군의 체중 변화를 측정한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하 본 발명을 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적인 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 의미를 따른다.

[0037] 본 발명은 서열번호 1을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1; HCDR1), 서열번호 2를 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 상보성 결정영역 1(light chain complementary determine region 1; LCDR1), 서열번호 5를 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체에 관한 것이다.

[0038] 본 발명의 단일클론항체는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 암세포 및 암줄기세포의 CD98 단백질에 결합할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 상기 순수 인간만능줄기세포(naive human pluripotent stem cell)는 착상 전의 인간만능줄기세포를

의미하는 것으로, naive 또는 ground 상태의 만능성을 가진다고 말한다. 착상 후의 인간만능줄기세포는 준 (primed) 상태의 만능성을 가지는 준 인간만능줄기세포(primed human pluripotent stem cell)를 의미한다. 상기 순수 인간만능줄기세포는 도 1a에서 볼 수 있듯이, 작은 돔 모양으로 개별 세포들이 분리되어 성장한다는 측면에서 평평한 콜로니와 유사한 형태로 성장하는 준만능줄기세포와 구별된다. 순수 인간만능줄기세포를 좀 더 세분할 경우 상기 ground 상태의 줄기세포, 그리고 중간 단계인 intermediate, formative 또는 naive-like 상태의 순수 만능성을 가지는 줄기세포로 나뉘질 수 있다.

[0040] 상기 암세포는 CD98를 세포 표면에 발현하는 암세포라면 제한 없이 본 발명의 암세포에 해당한다. 예를 들면, 간암, 폐암, 인간배아암, 배아 암종, 췌장암, 골육종, 피부암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암, 신장암, 유방암, 대장암, 위암, 담도암, 방광암, 난소암, 뇌종양 등이 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 2종 배아암종세포주 (NT2/D1, 2102Ep), 2종 폐암세포주(A549, NCI-H460), 6종 간암세포주(SNU-449, PLC/PRF/5, HepG2, Huh7, SNU-387, SK-Hep1)에 본 발명의 항체를 처리하고 플로우 사이토메트리(flow cytometry) 분석을 수행하였을 때, 본 발명의 항체가 상기 세포주에 강하게 결합하는 것을 확인하였다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 상기 암줄기세포는 CD98을 세포 표면에 발현하는 암줄기세포라면 제한없이 본 발명의 암줄기세포에 해당한다. 예를 들면, 간암의 암줄기세포일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 항체가 암줄기세포의 특성을 가진 간암세포를 특이적으로 인식하는 것을 확인하였다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명의 항체는 상기 서열번호 1 내지 3의 HCDR 및 서열번호 4 내지 6의 LCDR 서열을 갖는 것이라면 그 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 서열은 한정되지 않는다. 예를 들면 서열번호 7을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄 가변영역 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 상기 서열번호 7은 도 13에 나타난 중쇄 가변영역 서열을 의미하는 것이고, 상기 서열번호 8은 도 14에 나타난 경쇄 가변영역 서열을 나타낸다.

[0044] 서열번호 1 내지 8은 표 1에 나타난 것과 같다.

표 1

[0045]

| 서열 번호 | 아미노산 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 2     | Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Asn Met Lys Gly                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 3     | Asp Arg Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 4     | Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu His                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 5     | Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 6     | Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 7     | Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu<br>Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp<br>Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly<br>Gly Ser Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Asn Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg<br>Asp Asn Val Arg Asn Asn Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp<br>Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Asp Arg Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr<br>Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala |
| 8     | Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln<br>Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr<br>Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<br>Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser<br>Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val<br>Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys<br>Leu Glu Ile Lys Arg                                     |

[0047] 본 발명은 인간 IgG1 불변영역으로부터 유래한 중쇄 불변영역 및 인간 kappa 불변영역으로부터 유래한 경쇄 불변영역을 더 포함하는 항체를 제공한다.

[0048] 본 발명은 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 영역을 포함하는 항체를 제공한다.

[0049] 본 발명은 마우스-인간 키메라 항체(Chi-NPB15)를 제공한다.

- [0050] 본 발명에서 항체는 구체적으로 단일클론항체를 의미하는 것일 수 있고, 본 발명에서 단일클론항체란 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)에 대해서 지시되어 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 본 발명의 단일클론항체는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포 및 암세포의 세포 표면 분자인 CD98에 특이적으로 결합하므로, 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포 및 암세포의 세포 표면 분자를 인식하는 단백질 분자이다.
- [0051] 항원의 특정 에피토프를 인식하여 항원-항체 복합체를 형성하는 항체의 주요 부위는 중쇄 및 경쇄의 가변 영역, 특히 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)이 이러한 복합체 형성에 기여하므로, 본 발명은 상기한 본 발명의 단일클론항체의 가변 영역, 특히 CDR을 포함하는 이의 키메릭 항체, 인간화 항체 등을 본 발명의 범위에 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 일 실시예에서 마우스-인간 키메라 항체(Chi-NPB15)를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 단일클론항체의 가변 영역, 특히 CDR이 동일한 이상, IgG1 내지 IgG4의 IgG 서브클래스(subclass) 등도 본 발명의 범위에 포함된다. 또한, 본 발명은 상기한 바와 같은 결합 특성을 갖는 한, 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편들을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 등이 있다.
- [0052] 본 발명은 상기 항체를 포함하는 미분화 만능줄기세포의 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0053] 상기 미분화 만능줄기세포는 분화되지 않은 인간 만능줄기세포이다. 미분화 만능줄기세포는 순수 인간만능줄기세포 또는 준 인간만능줄기세포일 수 있다. 상기 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포에 대해서는 상기 설명과 같다.
- [0054] 상기 검출은 미분화 만능줄기세포를 확인 또는 분리할 수 있는 것이다. 상기 항체는 미분화 만능줄기세포의 특이적인 마커를 인식하므로, 상기 항체를 포함한 조성물을 가지고 미분화 줄기세포를 분리 또는 제거할 수 있다. 검출용 조성물은 미분화 만능줄기세포 제거용 조성물, 미분화 만능줄기세포 분리용 조성물, 미분화 만능줄기세포 분석용 조성물으로도 표현 가능하다.
- [0055] 본 발명은 상기 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0056] 상기 암은 CD98을 세포 표면에 발현하는 암세포에 의하여 발생하는 암이라면 관계없이 상기 조성물을 암의 예방 또는 치료 용도로서 사용할 수 있다. 예를 들면, 간암, 폐암, 배아 암종, 췌장암, 골육종, 피부암, 인간배아암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암, 대장암, 위암, 담도암, 신장암, 방광암, 난소암, 뇌종양 등이 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 간암세포 SNU-449, Huh7와 폐암세포 NCI-H460에 대해서 본 발명의 조성물을 처리하였을 때 항암 효과가 있는 것을 확인하였다. 다만, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 상기 암은 CD98을 세포 표면에 발현하는 암줄기세포에 의하여 발생하는 암이라면 관계없이, 상기 조성물을 암의 예방 또는 치료 용도로서 사용할 수 있다. 암줄기세포에 의해 발생하는 암의 경우, 치료 후 재발이 빈번하고, 항암제 저항성을 보이는 경우가 많다. 본 발명의 항체는 암줄기세포 표면의 CD98을 특이적으로 인식할 수 있어, 본 발명의 항체를 포함하는 상기 조성물은 암의 재발 억제에 대한 효능을 가져, 효과적인 암의 예방 또는 치료 용도로 사용 가능하다.
- [0058] 상기 암의 예방 및 치료 용도는 항체 의존적 세포 매개 세포 독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity; 이하 ADCC) 기전에 의하는 것일 수도 있다. ADCC는 종양이나 바이러스 항원에 항체가 부착되면 Fc 감마 수용체(Fc gamma receptor; FcγR)를 발현하는 면역세포들에 의하여 매개되는 것으로, 항체가 부착된 세포를 인식하여 면역반응을 일으켜 항원을 제거한다. 예를 들면, 대식세포(macrophage)와 호중구(neutrophil)의 경우, Fc 영역을 인식하여 식세포작용(phagocytosis)을 통해 항원을 발현하는 세포를 제거하고, NK cell(natural killer cell)은 Fc 영역을 인식하여 그랜자임(granzyme)을 분비하여 항원을 발현하는 세포를 제거한다. 본 발명의 상기 약학 조성물은 앞서 언급한대로, CD98을 발현하는 암세포와 특이적으로 결합할 수 있어, IgG1의 형태로 제조한 항체를 조성물에 포함하여 처리 시 상기 ADCC 기전에 의하여 항체와 결합한 CD98 양성 암세포를 사멸시켜 암의 예방 및 치료 효과를 보일 수도 있다.
- [0059] 상기 암의 예방 및 치료 용도는 면역 체크포인트 억제제 치료(immune checkpoint inhibitor therapy; 이하 ICI therapy) 기전에 의하는 것일 수도 있다. 암세포는 면역기능을 억제하거나 T 세포 면역관용(immunotolerance) 또는 면역편집(immune-editing) 등의 기전을 통해 면역세포에 의한 암세포 제거 기전을 회피한다. ICI는 회피기전 중 하나로서, 암세포 파괴를 방해하는 단백질을 세포 표면에 발현하여, 억제 면역 체크포인트를 활성화시켜 면역세포의 공격을 회피한다. ICI therapy는 이러한 억제 면역 체크포인트를 활성화시키는 단백질과 결합하는

항체가 해당 단백질의 기능을 억제함으로써, 면역세포에 의한 암세포 사멸 기전을 활성화하는 원리의 치료방법에 해당한다. 본 발명의 상기 약학 조성물은 앞서 언급한대로, 억제 면역 체크포인트의 기능을 수행하는 CD98에 대해 특이적으로 결합할 수 있으므로, 상기 항체의 CDR을 포함하는 IgG4를 처리시, 항체 NK cell, 대식세포 및 호중구에 의한 암세포 사멸을 유도할 수도 있다.

[0060] 본 발명에서 상기 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 항체와 항암 물질을 접합한 것일 수 있고, 접합은 링커(linker) 서열 또는 항체에 결합하는 2차 항체(secondary antibody)에 의하여 이루어질 수도 있다.

[0061] 본 발명에서 상기 2차 항체는 항원에 결합하는 다른 항체(1차 항체)의 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하는 것으로, 표적 항원에 직접 결합하는 1차 항체와는 결합하는 대상에 차이가 있는 용어에 해당한다. 본 발명에서 링커 서열은 항암물질과 항체를 연결하기 위하여 사용되는 것으로, 예를 들면 링커 서열을 상기 항체의 Fc 서열에 부착하고, 링커 서열과 항암물질을 연결하여 항체-링커-항암물질(antibody-linker-drug) 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 상기 링커 또는 상기 2차 항체는 모두 본 발명의 상기 항체와 항암 물질을 결합시키기 위한 용도로 사용하는 것으로, 항체와 약물을 접합시키기 위한 용도라면 2차 항체 서열 또는 링커 서열과 무관하게 당업자가 사용하는 방식에 의하여 사용이 가능하다.

[0062] 본 발명에서 상기 항암 물질은 당 분야에 공지된 항암 물질이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면, 엘로티닙(TARCEVA(TM), Genentech/OSI Pharm.), 보르테조미프(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 알킬화제; 부술판, 임프로술판 및 피소술판과 같은 알킬 술포네이트; 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리에틸로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토게닌(특히 볼라타신 및 볼라타시논); 캄토테신(합성 유기체 토포테칸을 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(그것의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유기체를 포함); 크립토피신(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1을 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티닌; 스포기스타틴; 질소머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비신, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 예네티 항생제와 같은 항생제(예를 들어, 칼리키아미신, 특히 칼리키아미신 감마1I 및 칼리키아미신 오메가1I(Angew Chem Intl. Ed. Engl.(1994) 33:183-186); 다이네미신 A를 포함하는 다이네미신; 클로드로네이트와 같은 비스포스포네이트; 에스페라미신; 및 네오키노스타틴 발색단 및 관련된 색소단백질 예네티 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 클로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 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, 페폴로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질, 예컨대 메토평렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토평렉세이트, 프테로프테린, 트리메토평렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시타딘, 6-아자우리딘, 카르보푸르, 시타라빈, 디테옥시우리딘, 독시플루리딘, 예노시타빈, 플록스우리딘; 안드로젠, 예컨대, 칼우스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄과 같은 항-아드레날; 프롤린산과 같은 폴산 보충제; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노에불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미딘; 엘립티늄 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; 리족산; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아조산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아

민; 트리코테센(특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 Ala 및 안구이딘); 우레탄; 빈테신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, TAXOL(TM) 파클리탁셀(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.), ABRAXANETM 무-크레모포르, 파클리탁셀의 알부민-유전자 조작된 나노입자 조제물(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.), 및 TAXOTERE(TM) 도세탁셀(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로르안부실; GEMZAR(TM) 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 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); 레티노산과 같은 레티노이드; 카페시타빈; 및 어떤 상기의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함할 수 있다.

[0063] 항암 물질을 접합하여 약학 조성물을 사용하는 경우, 항체-약물 콘주게이트(antibody-drug conjugate; 이하 ADC) 방식의 작용기전에 의하여 암의 예방 또는 치료를 유도할 수도 있다. 상기 ADC는 항체에 약물을 접합시켜서 주입하는 방법으로서 항체에 특이적으로 결합하는 항원을 발현하는 세포에서 항체의 내부화(internalization)를 유도함으로써 세포 내부로 약물을 전달하여 세포 특이적으로 약물을 전달하는 원리의 치료 방법에 해당한다.

[0064] 본 발명의 약학 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 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 소화관내, 국소, 실 하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 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 제제화제를 포함할 수 있다. 또한, 상기 항체 분자는 사용 전에 적절한 무균 액체로 재조정하여 사용할 수 있는 건조된 형태로 제제화 될 수도 있다.

[0066] 본 발명의 약학 조성물의 유효성분으로서 상기 항체는 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.01 내지 50 mg/kg 체중, 바람직하게는 0.1 내지 20mg/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.

[0067] 본 발명은 본 발명의 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방, 진단 또는 치료 방법을 제공한다.

[0068] 본 발명은 본 발명의 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방, 진단 또는 치료 방법을 제공한다.

[0069] 투여는 적절한 방법 및 적절한 투여량으로 개체에게 본 발명의 항체 또는 약학 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 항체 또는 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구 내 또는 피내(intradermal) 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.

[0070] 개체는 암이 발병되었거나 발병될 수 있는 동물, 그 외 암의 진단을 위한 정보를 제공받고자 하는 동물을 의미한다. 상기 동물은 포유류일 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 또한, 본 발명은 상기 항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다.

[0072] 본 발명에서 하이브리도마는 하이브리도마 세포 또는 하이브리도마 세포주를 포함하는 의미로, 2개의 다른 종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 세포로, 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol, PEG) 등 세포융합을 일으키는 물질이나 어떤 종의 바이러스를 사용하여 둘 이상의 동종 세포나 이종세포가 융합되어, 각기 다른 세포가 갖는 다른 기능을 하나의 세포 속에 통합시킨 세포 또는 세포주를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서 본 발명은 단일클론항체 NPB15를 생산하는 하이브리도마를 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 하이브리도마는 2 ×

$10^6$  개의 H9 준 인간만능줄기세포를 3일 전 마우스의 오른쪽 발바닥 먼저 주사하고 이후 동 수의 H9 준 및 순수 인간만능줄기세포를 마우스의 오른쪽과 왼쪽 발바닥에 각각 3일간격으로 7회 주입한 후, 상기 마우스의 왼쪽 오금에서 림파구를 분리하여 골수종 암세포와 융합하여 제조하였다. 단일클론항체를 분리하는 하이브리도마는 이를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.

[0073] 상기 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액(ascites fluid)으로부터 분리될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 단일클론항체의 대량 생산을 위해 하이브리도마의 배양 배지를 단백질 G-세파로오스 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 다만 상기 하이브리도마의 배양 및 정제 방법은 당 분야에 공지된 방법이라면 모두 가능한 것이고, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다. 전술한 바와 같이, 상기 항체는 암 세포의 CD98 단백질에 특이적으로 결합할 수 있다. 일반적으로, CD98 단백질은 다양한 암 세포에서 과발현되는 양상을 보이는 것이므로, 대상 세포에서 CD98 항원이 확인되면 해당 세포는 암 세포일 확률이 높다고 할 수 있다. 따라서, 상기 항체를 포함하는 조성물을 CD98를 발현하는 암세포에 처리하면 상기 항체는 암세포의 CD98 항원과 결합하여 항원-항체 복합체를 형성하게 되므로, 항체에 결합하는 암세포와 결합하지 않는 정상 세포로 분류할 수 있다.

[0075] 상기 암 진단용 조성물에 의하여 진단할 수 있는 암은 바람직하게는 CD98가 과발현하는 것으로 알려진 암, 예를 들면, 간암, 폐암, 배아 암종, 췌장암, 골육종, 피부암, 인간배아암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암, 대장암, 위암, 담도암, 신장암, 방광암, 난소암, 뇌종양 등을 들 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[0077] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

## [0079] 실시예 1: 인간 만능줄기세포의 배양 및 순수 인간 만능줄기세포의 확립

### [0080] 1-1. 인간 준 만능줄기세포의 배양

[0081] 인간 준 만능줄기세포(primed human pluripotent stem cell, Primed hPSC) H9은 Wicell Research Institute에서 제공한 프로토콜에 따라 기존에 기술된 방법에 따라 배양하였다(한국등록특허 제10-2344948, 제 10-2235935호). 먼저 임신한 CF1 생쥐의 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)를 적출 및 배양하여  $\gamma$ -조사( $\gamma$ -irradiation) 또는 mitomycin( $10\mu\text{g/ml}$ ) 처리한 후에 지지 세포(feeder cell)로 사용하였다. 20%(v/v) KOSR(knockout serum replacement), 1%(v/v) NEAA,  $0.1\text{mM}$   $\beta$ -mercaptoethanol,  $100\text{U/ml}$  penicillin-G,  $100\mu\text{g/ml}$  streptomycin,  $8\sim 12\text{ng/ml}$  bFGF를 첨가한 DMEM/F12(Invitrogen) 배지에서 배양하였고, 5~6일마다 계대 배양시에는 콜라게나아제 IV( $1\text{mg/ml}$ )로 5분 간 처리 후에 황색 틱으로 적절한 크기로 자른 후 새로운 지지 세포 위에서 배양하였다. 그 결과 크고 편평하게 자라는 배양된 준 인간만능줄기세포 모양을 볼 수 있다(도 1a).

### [0083] 1-2. 순수 인간만능줄기세포의 확립

[0084] 이하 “순수 인간만능줄기세포(naive hPSC)”라는 용어는 준 인간만능줄기세포(primed hPSC)와는 다르게 순수 인간만능줄기세포의 마커들을 발현하는 줄기세포를 의미하는 것으로서, ground 상태, 또는 intermediate, formative 같은 중간 상태의 줄기세포의 마커들을 발현하는 줄기세포를 의미한다. 준 인간만능줄기세포 H9(primed hPSC)를 이용하여 순수 인간만능줄기세포(naive hPSC)로 전환을 유도하여 배양하였으며 구체적인 프로토콜은 기존에 공지된 방법에 따른다(한국등록특허 제10-2344948호). 먼저 준 인간만능줄기세포 H9을 콜라게나아제 IV( $1\text{mg/ml}$ )로 5분 간 처리하고, 황색 틱을 이용하여 적절한 크기로 자른 후에 미리 깔아둔 MEF 위에 옮겼다. 다음날  $2\text{i/L/F/A}$  배지( $1\mu\text{M}$  PD0325901,  $3\mu\text{M}$  CHIR99021,  $1000\text{U/ml}$  hLIF,  $10\mu\text{M}$  Forskolin, Ascorbic acid( $50\text{ng/ml}$ ), bFGF( $16\text{ng/ml}$ ), 20% KOSR, KO-DMEM, 1% L-glutamine, 1% NEAA,  $0.1\text{mM}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 1x penicillin/streptomycin)(Duggal et al. Stem Cells 33:2686, 2015)에서 배양하였다. 배양 후 3~5일이내에

돔 모양의 세포로 변화였고, 3~4일 간격으로 0.05%(v/v) 트립신-EDTA 또는 accutase(StemPro)를 이용하여 계대 배양하였다. 세포 생존을 높이기 위해 최초 계대 배양할 때만 10  $\mu$ M Y-27632(Tocris)을 처리하였다. 그 결과 편평하게 자라는 배양된 준 인간만능줄기세포 모양과 비교하여 작은 돔 모양으로 자라는 순수 인간 만능줄기세포들을 볼 수 있다(도 1a). 최소 4~5회 계대 배양한 준 및 순수 인간만능줄기세포를 면역 실험에 이용하였다.

[0086] 1-3. 유세포분석에 의한 세포 표면 항원염색

[0087] 배양한 준(primed H9) 및 순수(naive H9) 인간만능줄기세포를 비교하기 위해 먼저 인간 준 만능줄기세포 마커로 알려진 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24의 발현 여부를 유세포분석기로 먼저 분석하였다. 유세포분석을 위해서 콜라게나아제 IV로 분리한 세포를 TrypLE(Invitrogen)을 이용하여 단일 세포로 떼어낸 후 40  $\mu$ m 여과기(strainer)를 통과시킨 후 한 시료 당 약  $2 \sim 3 \times 10^5$  세포를 사용하였다. SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24-PE 항체를 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBA(1%(w/v) bovine serum albumin, 0.02%(w/v) NaN<sub>3</sub> in PBS)로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-라트 IgM-FITC, 항-마우스 IgM-FITC 또는 항-마우스 IgG-FITC(BD Biosciences)를 4℃에서 30분 간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest software(BD Biosciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 결합 여부를 분석하였다. 또한 같은 방법으로 바탕 상태 순수 인간만능줄기세포 마커로 알려진 CD7, CD77, CD130 발현도 관찰하였다. 그 결과 준 인간만능줄기세포 마커들 중 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24 발현이 순수 인간만능줄기세포에서는 감소함을 관찰하였고 순수 인간만능줄기세포 마커로 알려진 CD7, CD77, CD130중에서 CD77, CD130은 naive H9에서 증가하여 2i/L/F/A 배지에서 순수 인간만능줄기세포가 유도되었음을 확인하였다 (도 1b).

[0089] 실시예 2. NPB15 하이브리도마 제조

[0090] 2-1. 순수 인간만능줄기세포에 특이적 항체 제조를 위한 면역 주사

[0091] 순수 인간만능줄기세포에 대한 단일클론항체를 제조하기 위해 생쥐 발바닥에 만능줄기세포들을 면역주사하였으며 구체적인 프로토콜은 기존에 잘 기술된 방법에 따랐다(한국등록특허 제10-2344948호). 먼저 6주 된 11 마리의 암컷 Balb/c 생쥐 오른쪽 발바닥에  $2 \times 10^6$  개의 준 인간만능줄기세포 H9 세포를 -3, 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 주사하였고, 같은 수의 순수 인간만능줄기세포 H9 세포를 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 왼쪽 발바닥에 각각 주사하고 22일 되는 날 면역주사(immunization)된 마우스를 경추 탈골한 후 왼쪽 뒷발로부터 지방과 근육 조직을 제거한 오금 림프절(popliteal lymph node)을 적출하여 표면이 울퉁불퉁한 비광택 슬라이드 글라스(frosted slide glass)를 이용하여 오금 림프절을 갈아서 단일세포화해서 준비하였다. 왼쪽 림프절 세포와 FO 미엘로마 세포를 1:5의 비율로 섞은 후, 혈청 없는 배지인 DMEM(Invitrogen)로 2번 세척한 후 1ml 50%(w/v) PEG1500(polyethylene glycol, BMS, seoul, Korea)를 1분당 25 방울이 섞이도록 넣어주었다. 1분 후 DMEM 배지를 1분간 3ml, 1분간 17ml, 1분간 20ml를 연속적으로 넣고, 5분 간 정치한 후 원심분리를 하여 세포를 모았다. 96웰 플레이트에  $2 \times 10^5$  세포/웰을 20%(v/v) FBS, 1xHAT(Sigma-Aldrich), HCS(hybridoma cloning supplement)가 포함된 DMEM 배지에서 약 2주 간 배양하였고, 샌드위치 ELISA 방법을 이용하여 항체를 생산하는 하이브리도마만을 선별하였다.

[0093] 2-2. NPB15 하이브리도마의 클로닝 및 정제

[0094] 항체가 발현되는 클론을 선별하기 위하여 샌드위치 ELISA(Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법을 사용하였다. 포획 항체(Capture antibody)인 항-마우스 IgG 또는 IgM 항체를 2  $\mu$ g/ml로 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 100  $\mu$ l을 첨가해 37℃에서 1 시간 반응시키고, 다시 항-마우스 IgG-HRP 또는 항-마우스 IgM-HRP(horseradish peroxidase, Sigma-Aldrich)의 1/5,000 희석액과 1시간 더 반응시켰다. PBST(0.05%(v/v) Tween-20 in PBS)로 3회 세척하고, OPD(o-phenylenediamine, Sigma사)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 기질 용액을 첨가한 후 492nm에서 흡광도를 측정하여 항체를 생산하는 클론을 먼저 선별하였다. 다음으로 각 클론의 배양액을 상기 FACS 분석과 같은 방법으로 먼저 순수 인간만능줄기세포에 결합하는 하이브리도마를 선별하였고 이들 중에서 준 인간만능줄기세포와 순수 인간만능줄기세포에 동시에 결합하는 하이브리도마를 33종을 추가로 선별하고 서브클로닝을 반복하여 안정적인 클론을 확보하였고 이중 항체 NPB15는 IgG1과 Kappa사슬을 가진 항체로 이 발명에서

다음 실험을 위하여 항체를 정제하였다.

[0095] 항체 정제를 위해서는 NPB15 하이브리도마 세포배양액을 사용하여 Protein G agarose bead를 이용한 방법으로 수행하였다. 이를 위해 수집한 하이브리도마 세포 배양 배지를 Protein G agarose beads (Amicogen, 한국)로 채워진 column에 넣어 항체가 Protein G agarose beads와 결합할 수 있게 한 뒤, PBS (pH8.0)으로 비드를 세척 후, 0.1M glycine (pH2.8) 10ml과 1M Tris-HCl (pH9.0)을 넣어 Protein G agarose beads에서 항체를 용출하였다. 이후 SDS-PAGE와 CBB R250 염색법을 통해 정제한 NPB15 항체의 순도를 확인하였다 (도 1c, 왼쪽). 이렇게 정제한 항체를 웨스턴 블랏팅으로 추가 분석하여 항-생쥐 항체 (goat-a-mIgG-(H+L)-HRP)를 2차 항체로 이용하는 경우 IgG chain의 중쇄사슬 (HC)과 경쇄사슬 (LC)이 검출되어 NPB15이 잘 정제되었음을 확인하였다 (도 1c, 오른쪽). 이후 정제한 NPB15항체를 사용하여 인식 항원과 특성을 분석하였다.

[0096] 상기 1-3의 실시예처럼 NPB15 항체를 사용한 유세포분석으로 NPB15는 2i/L/F/A (한국등록특허 제10-2344948호)와 2i/L/X/F/P 배지(한국등록특허 제 10-2235935호)에서 유도한 순수 인간만능줄기세포와 준 인간만능줄기세포에 동시에 결합하고 함께 배양된 생쥐 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast)에는 결합하지 않았다(도 2). 그리고 준 인간만능줄기세포를  $10^{-5}$  M 레티노산(all-trans-retinoic acid, Sigma-Aldrich)로 7일 처리하여 분화를 유도한 후 NPB15 결합여부를 분석하였을 때 현저히 감소하는 것을 볼 수 있어 NPB15 항원은 만능줄기세포에 특이적인 발현을 하고 분화가 유도될 경우 감소하는 미분화 인간만능줄기세포에 특이적인 분자임을 알 수 있었다(도 2).

[0098] **실시예 3. NPB15의 각종 암세포와 정상세포에 대한 결합 특이성 분석**

[0099] **3-1. 다양한 암세포의 배양 및 혈액세포의 분리**

[0100] 인간 배아암세포 NT-2/D1와 2102Ep를 10% FBS, 1%(v/v) NEAA, 100U/ml penicillin-G, 100 $\mu$ g/ml streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 간암세포주와 폐암세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 인간 말초혈액 단핵구 세포(human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 Ficoll-Paque Plus method(GE Healthcare, Seoul, Korea)에서 제시한 방법을 이용하여 분리하였다. 인간 간세포(human primary hepatocyte)는 Thermo Fisher Scientific(Waltham, USA)에서 구입하여 공급자의 프로토콜대로 배양하여 사용하였다. 단일클론 항체 NPB15의 각종 세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 유세포분석을 수행하였다. 다양한 암세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40 $\mu$ m 스트레이너(SPL, Pocheon, Korea)에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 세포를 ml당 약  $1 \times 10^6$ 개씩 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN<sub>3</sub> in PBS)에 섞은 후, 항체 NPB15를 4℃에서 30분간 반응시키고, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC(Invitrogen)를 4℃에서 20분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. NPB15는 2종 배아암세포주(NT-2/D1, 2102Ep), 2종 폐암세포주(A549, NCI-H460), 6종 간암세포주(SNU-449, PLC/PRF/5, HepG2, Huh7, SNU-387, SK-Hep1)에는 잘 결합하였다. 하지만 정상 인간 말초혈액단핵구(PBMC)에는 결합하지 않고 정상 간세포에도 결합하지 않았다(도 3 및 표 2). 하기 표 2는 NPB15와 다양한 세포들에 대한 결합력을 분석한 것이다.

[0101] 이런 결과는 NPB15 항체가 인식하는 항원 에피토프가 인간 정상세포인 PBMC, hepatocyte 표면에는 발현하지 않지만 인간만능줄기세포, 배아 암종세포, 폐암, 간암세포들 표면에서 잘 발현하는 것을 의미한다.

표 2

| Cell line                                                     | Cell origin                             | Reactivity by flow cytometry |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|
| Primed H9                                                     | Human embryonic stem cell, primed state | +++                          |
| Naïve H9                                                      | Human embryonic stem cell, naïve state  | +++                          |
| RA-H9                                                         | Retinoic acid-treated primed H9         | +                            |
| MEF                                                           | Mouse embryonic fibroblast              | -                            |
| NT2/D1                                                        | Human embryonal carcinoma cell          | +++                          |
| 2102Ep                                                        | Human embryonal carcinoma cell          | +++                          |
| A549                                                          | Human non-small cell carcinoma          | +++                          |
| NCI-H460                                                      | Human large cell lung carcinoma         | +++                          |
| SNU-387                                                       | Human hepatocellular carcinoma          | +++                          |
| SNU-449                                                       | Human hepatocellular carcinoma          | +++                          |
| HepG2                                                         | Human hepatocellular carcinoma          | +++                          |
| Huh7                                                          | Human hepatocellular carcinoma          | +++                          |
| PLC/PRF/5                                                     | Human hepatocellular carcinoma          | +++                          |
| SK-Hep1                                                       | Human hepatic adenocarcinoma            | +++                          |
| Hepatocyte                                                    | Human primary hepatocyte                | -                            |
| PBMC                                                          | Human peripheral blood mononuclear cell | -                            |
| Binding affinity is defined as : +++ Strong, + Weak, - Absent |                                         |                              |

[0102]

[0104]

실시예 4. NPB15가 인식하는 항원 동정

[0105]

4-1. NPB15가 인식하는 세포표면 단백질 분자의 확인

[0106]

인간 배아 암종세포주 NT-2/D1, 2102Ep 그리고 인간 폐암 세포주인 A549 표면의 바이오틴표지(biotinylation)는 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo Fisher Scientific)에서 제시한 프로토콜을 약간 수정하여 수행하였다. 100 밀리미터 세포배양 플레이트에 배양한 인간 배아 암세포 NT-2/D1을 PBS(pH 7.4)로 2회 세척한 후 0.5mg의 바이오틴이 녹아있는 찬 PBS(pH 8.0) 5ml를 넣고, 4℃에서 30분간 반응시켰다. 찬 PBS(pH 8.0)로 3회 세척한 후 바이오틴 표지된 세포는 용해 완충액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2μg/ml Aprotinin, 100μg/ml PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride), 5μg/ml Leupeptin, 1mM NaF, 1mM Na3VO4)를 이용하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 12,000 rpm 속도로 40분간 원심 분리해서 핵을 제거한 후 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. Protein G 아가로스(Amicogen, Jinju, Korea)에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위해서, 약  $2.0 \times 10^7$  개 세포의 세포 용해물에 20μl Protein G 아가로스를 넣고 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후, 원심분리를 통해 그 Protein G 아가로스를 회수하여 용해 완충액에 5회 세척한 샘플을 음성 대조군 (Con)으로 사용하였다. NPB15에 의해 인식되는 항원을 면역침강 하기 위해서는 먼저 상기 세포용해물에 20 μl Protein G 아가로스를 넣고 4℃에서 4시간 동안 더 반응시키고 Protein G 아가로스에 비특이적으로 결합하는 단백질을 먼저 원심분리하여 제거하였다. 단일클론항체 NPB15에 의해 특이적으로 인식되는 항원을 면역침강 하기 위해서는 회수한 세포 용해물 상층액에 NPB15 항체 4 μg을 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 20 μl Protein G 아가로스를 넣고 4℃에서 4시간 동안 더 반응시켰다. 원심분리로 면역 침강된 면역 혼합체를 용해 완충액에 5회 세척하고, 항체에 결합된 항원을 용출하기 위해 5X 샘플 완충액을 넣고, 100℃에서 10분간 끓였다. 음성 대조군 단백질(Con)과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블랏팅 하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.1% TBST(Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween) 로 3번 세척한 후, 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP(SA-HRP, GE healthcare)를 실온에서 1시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3

번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출 키트(Advansta)로 확인하였다. 그 결과, NPB15는 인간 배아 암종세포 NT-2/D1, 폐암 세포주인 A549의 세포 용해물에서 약 120kDa, 90 kDa의 단백질을 면역침강 시킬 수 있는 것을 확인하였다(도 4a). 그리고 다른 인간 배아암종세포 2102Ep에서는 약 120kDa의 단백질이 NPB15에 의해 면역침강되는 것을 확인하였다(도 4a).

#### [0108] 4-2. NPB15에 의해 면역 침강된 항원의 동정

[0109] 단일클론항체 NPB15에 의해 A549 세포용해액에서 면역침강된 단백질을 포함하는 폴리아크릴아마이드 겔을 PageBlue Protein Staining Solution(Thermo Fisher Scientific)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다(도 4b). 겔에서 단일클론항체 NPB15에 의해 면역침강된 단백질로 추정되는 120kDa 위치에 염색된 단백질 밴드를 잘라 LC-MS/MS(Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry) 분석을 의뢰하였다(ProteomeTech, Seoul, Korea). 분석이 완료된 매스 스펙트럼으로부터 단백질 동정을 위하여 UniProt 데이터베이스를 (<https://www.uniprot.org/>) 이용하였다. 그 결과, 단백질의 아미노산 서열이 SLC3A2(CD98hc 4F2)와 일부 일치하는 것을 확인하였다(도 4c; 서열번호 11). 밑줄 친 아미노산은 실제로 질량분석기를 통해 확인한 아미노산 서열을 표시한 것으로 CD98과 59개의 아미노산이 일치하는 것을 알 수 있다.

#### [0111] 4-3. 동정된 NPB15 항원의 검증

[0112] NPB15의 항원 단백질이 CD98인지 확인하기 위해 상업적으로 판매되고 있는 CD98에 대한 항체, 유전자 발현 벡터, siRNA를 이용하여 면역침강법, 웨스턴 블랏팅법, RNA 간섭작용에 의한 유전자 녹다운법 분석을 통해 수행하였다. 먼저 NPB15가 면역침강시킨 단백질이 CD98인지 확인하기 위해 토끼 항-CD98 단일클론항체(Cell signal technology)를 구입하여 면역침강법과 웨스턴 블랏팅을 수행하는 데 사용하였다. 상기 실시예 4-1에서 서술한 방법으로 세포표면을 바이오틴으로 표지한 A549세포 용해액을 준비하고, 이 용해액을 상기 서술한 바와 동일하게 NPB15로 면역침강을 수행하였다. 이후, 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(Con) 과 용출된 단백질을 8% SDS-PAGE를 통해 분리하고 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겨 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 토끼 항-CD98 단일클론항체( $\alpha$ -CD98)를 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후 항-토끼 IgG-HRP(1:7,000; Bethyl Laboratories)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과, NPB15에 의해 면역 침강된 90kDa, 120kDa의 단백질이 토끼 항-CD98 단일클론항체에 의해 인식됨을 확인할 수 있어 NPB15가 CD98에 결합하여 면역침강시킨다는 것을 확인하였다(도 5a). 검출된 단백질이 NPB15에 의해서 인식된 세포표면 막단백질이 맞다는 것을 확인하기 위해서 동일 나이트로 셀룰로오스 막을 SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol이 포함된 버퍼에 넣고 50℃에서 30분 반응시켜 검출 신호를 제거한 후 스트렙타비딘-HRP(SA-HRP)를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출 키트로 확인하였다. 그 결과, 단일클론항체 NPB15의 면역침강체(immunoprecipitant)가 90kDa와 120kDa에서 다시 검출되었다(도 5b). 이런 결과는 NPB15에 의해 A549 세포표면에서 면역침강된 항원은 약 90, 120kDa에 해당하는 CD98이라는 것을 말해준다.

[0113] NPB15가 CD98을 직접 인식하여 면역침강시키는 것인지 간접 인식하여 침강시키는 것인지 구별하기 위해 CD98 유전자 발현 벡터 pCMV3-SLC3A2-Flag(Sino Biological)를 구입하여 인간 배아 신장 세포 HEK293FT에서 Flag tag이 달린 재조합 CD98을 과발현시키고, 이 세포의 용해물을 마우스 항-Flag 단일클론항체(Invitrogen)와 토끼 항-CD98 단클론항체( $\alpha$ -CD98)를 사용해 면역침강과 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. HEK293FT에서 CD98을 과발현하기 위해 6-웰의 세포배양용 플레이트에 웰당  $3.5 \times 10^5$ 개 HEK293FT 세포를 24시간 배양하고, 공지의 pCMV3-CD98-Flag 벡터 DNA 2 $\mu$ g를 PEI(Polyetherimide) 6 $\mu$ g와 섞어 상온에서 20분간 반응한 혼합물을 세포 배양 배지에 첨가해 트랜스펙션 했다. 이후 48시간 추가 배양한 세포로부터 상기 실시예 4-1에서 서술한 용해 방법으로 세포 용해물을 준비하였다. 이 세포 용해물을 상기 서술한 한 것처럼 isotype mIgG1를 넣은 대조군 (mIgG1), NPB15, 항-Flag 항체, 항-CD98 항체( $\alpha$ -CD98)로 각각 면역침강 후 각각의 면역 침강체를 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(Con)과 함께 8% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겼다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹을 하였다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 공지의 마우스 항-Flag 단일클론항체 또는 토끼 항-CD98 단일클론항체( $\alpha$ -CD98)를 각각 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 항-마우스 IgG-HRP(1:10,000; Millipore) 또는 항-토끼 IgG-HRP(1:10,000)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출 키트로 확인하였다. 그 결과 NPB15와, 마우스 항-Flag 단일클론

항체, 토끼 항-CD98 항체( $\alpha$ -CD98)에 의해 면역 침강된 각각의 단백질 모두 공지의 항-CD98 항체( $\alpha$ -CD98)(도 5c)와 항-Flag 항체( $\alpha$ -Flag)(도 5d)에 의해 인식됨을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 본 발명의 단일클론항체 NPB15가 인간 폐암세포주 A549의 표면에 존재하는 CD98 단백질을 직접 인식하는 항체임을 검증하는 것이다.

## [0115] 실시예 5. CD98 항원의 기능 분석

### [0116] 5-1. 간암세포주에서 CD98 녹다운(Knockdown) 및 세포증식 분석

[0117] NPB15의 항원인 CD98이 간암세포의 이동, 생존 및 성장에 어떻게 영향을 미치는지 분석하기 위해서 CD98유전자를 표적하는 siRNA를 이용하여 간암세포주에서 유전자 녹다운을 진행하였다. CD98에 대한 siRNA(Bioneer, Daejeon, Korea)를 구매하여 간암세포주 SNU-449, Huh7과 폐암세포주 NCI-H460에 트랜스펙션 했다. 50nM의 음성 대조군(negative control) siRNA(siCon; Genolution, Seoul, Korea)와 CD98에 대한 siRNA(siCD98), Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)를 각각 TOM(Welgene, Gyeongsan, Korea)에 희석하고 5분간 상온에 두었다. 이후, 각각의 siRNA 희석액과 RNAiMAX 희석액을 섞어 20분간 상온에서 반응시켰다. 6웰 플레이트에 웰당  $1.5 \times 10^5$  -  $3.0 \times 10^5$  개의 암세포주를 깔고 siRNA-RNAiMAX 희석액을 넣어 24시간 동안 배양했다. 24시간 후, 동일한 방법으로 두 번째 트랜스펙션을 반복하고 48시간을 추가적으로 배양했다. 첫 번째 트랜스펙션으로부터 72시간 후, 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 상기 실시예 4-1의 세포 용해 완충액으로 용해한 다음 5X 샘플 완충액을 넣고, 100℃에서 10분간 끓였다. siCon 단백질과 siCD98 단백질을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블랏팅하였다. 그 결과 siRNA로 녹다운한 간암세포 SNU-449, Huh7, 그리고 폐암세포주 NCI-H460에서 음성대조군으로 사용하는  $\alpha$ -tubulin에 비해 CD98단백질이 각각 약 99.9, 72, 80%까지 감소하는 것을 볼 수 있고 이것은 녹다운이 효과적으로 진행되었음을 말해준다(도 6a). 다음으로 녹다운 암세포들에서 세포표면 CD98의 발현을 상기 실시예 3처럼 NPB15를 사용한 유세포분석을 수행하였다. 그 결과 세포표면 CD98의 발현이 모든 암세포에서 현저히 감소하여 CD98의 녹다운에 의한 결과를 볼 수 있다(도 6b). CD98 녹다운된 간암세포 SNU-449, Huh7과 폐암세포 NCI-H460에서 암세포 증식(proliferation)을 분석하기 위해서 상기처럼 녹다운 암세포를 48시간 배양후에 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 100×g에서 5분 동안 원심분리하여 회수하였다. 1ml PBS에 현탁된 다음 1:1비율로 0.4% Trypan Blue용액과 혼합하여 실온에서 3분 동안 반응 후에 세포를 hemocytometer에 올리고 현미경으로 염색되지 않은 살아있는 세포만을 계수하였다. 그 결과 모든 암세포에서 CD98을 녹다운 할 경우 세포수 감소를 관찰할 수 있었다(도 6c). 이 결과는 CD98이 암세포 증식에 필요함을 제시한다.

### [0119] 5-2. CD98 녹다운(Knockdown) 암 세포주에서 암세포 증식 및 세포 사멸 측정

[0120] CD98 녹다운된 간암세포 SNU-449, Huh7과 폐암세포 NCI-H460에서 세포 사멸(apoptosis)을 분석하기 위해서 녹다운된 세포를 대상으로 annexin V assay를 진행하였다. 세포 사멸을 분석하기 위해 암세포주 SNU-449, Huh7, NCI-H460를 0.05% Trypsin(Welgene)을 이용하여 단일 세포로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 40 $\mu$ m 여과기(strainer)를 통과시킨 후 한 시료 당 약  $2 \sim 3 \times 10^5$  세포를 사용하였다. 잔여 물질을 제거하기 위해 PBS(pH7.4)로 2번 세척 후 propidium iodide 와 annexin V-FITC로 실온에서 15분 반응시켜 사멸된 세포를 염색하였다. 그 결과 CD98 녹다운 SNU-449에서 annexin V와 PI 둘다 양성 세포가 약 15%에서 31%로 약 6% 정도 증가하는 것을 확인하였고(도 7a 및 7d), CD98 녹다운 Huh7에서는 annexin V와 PI 둘다 양성 세포가 별차이가 없지만 annexin V 양성세포는 약 10%에서 46%로 약 36%로 증가하였다(도 7b 및 7e). CD98 녹다운 NCI-H460에서는 annexin 양성세포는 음성대조군에서 약 15% 더 높지만 annexin V와 PI 둘다 양성 세포는 20%에서 44%로 약 24% 정도 CD98 녹다운에서 현저히 증가하여 세포사멸이 CD98 녹다운에서 더 증가함을 알 수 있다(도 7c 및 7f). 이러한 결과는 CD98이 감소한 암세포가 세포사멸(apoptosis)이 더 활발히 일어난다는 것을 보여주는 자료로 CD98이 세포의 사멸 방지에 중요한 분자임을 말해준다.

### [0122] 5-3. CD98 녹다운 암 세포주에서 암세포 클론원성 생존분석

[0123] 간암, 폐암세포의 생존 및 증식에서 CD98의 역할을 조사하기 위해, 상기의 CD98 녹다운 SNU-449, Huh7, NCI-

H460 세포를 사용하여 클론원성 생존 분석(clonogenic survival assay)을 수행하였다. 상기의 실시예 5-1을 통해 제조한 CD98 녹다운 SNU-449, Huh7, NCI-H460 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40  $\mu$ m 스트레이너(SPL, Pocheon, Korea)에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 6웰 플레이트에 웰당  $1.0 \times 10^4$  개씩 깔아서 세포들이 흩어져서 단일세포로 부착하도록 하고 10일 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양 후 형성된 콜로니(colony)를 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하고 전체 콜로니의 수를 Image J 프로그램으로 분석하고 같은 실험을 3회 반복하여 세포의 콜로니 형성 능력을 통계적으로 나타냈다(도 8a). CD98 녹다운은 SNU-449, Huh7, NCI-H460 콜로니의 수와 크기를 각각 약 70%, 97%, 61% 감소시켰다(도 8b 내지 8d). 이런 결과는 CD98이 저밀도 파종 스트레스 하에서 간암세포 생존을 향상시키고 증식을 촉진하는 중요한 세포 표면 분자라는 것을 증명한다.

[0125] 5-4. CD98 녹다운 암 세포주에서 암세포 이동 분석

[0126] 암세포의 전이에서는 필수적인 이동능력에서 CD98의 역할을 조사하기 위해서 상기의 CD98 녹다운 SNU-449, Huh7 세포를 사용하여 Wound healing assay를 수행하였다. 상기의 실시예 5-1을 통해 제조한 CD98 녹다운 SNU-449, Huh7 세포를 24 well plate에서 웰당  $1.5 \times 10^5$  점종하고 밤새 인큐베이션하여 세포가 배양용기의 90%를 채우도록 하였다. 파종 다음날 노란색 피펫 팁을 사용하여 세포 단층을 긁어 스크래치 상처를 만들었다. 세포 파편을 제거하기 위해 배양 배지를 흡인하고 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고 배지를 5% FBS로 교체하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 스크래치는 스크래치 후 0시간과 12시간에 사진을 찍고 스크래치 영역은 이미지 J로 정량화하였다. 12시간 후에 음성대조군 (siCon)의 스크래치 영역은 약 34% 감소한 반면에 CD98 녹다운한 SNU-449 세포 (siCD98)에서는 스크래치 영역이 약 8%정도 감소하였다(도 9a 및 9b). 비슷하게 Huh7 세포에서도 12시간 후에 음성대조군 (siCon)의 스크래치 영역은 약 24% 감소한 반면에 CD98 녹다운한 Huh7 세포 (siCD98)에서는 스크래치 영역이 약 6%정도 감소하였다(도 9c 및 9d). 이런 결과는 CD98결핍에 의한 암세포의 이동능력의 저하에 의한 결과로 CD98이 암세포의 이동을 촉진하는 중요한 세포 표면 분자라는 것을 증명한다.

[0128] 실시예 6. NPB15에 의한 CD98-high/low 암세포 분리 및 암세포 클론원성 생존 능력 비교분석

[0129] CD98의 발현이 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 인간 간암세포인 SNU-449과 폐암세포인 NCI-H460를 단일클론항체 NPB15로 CD98이 높게 발현하는 상위 30% 세포(CD98-high)와 낮게 CD98을 발현하는 하위 30% 세포(CD98-low)로 sorting 하여 분리한 후 각각의 세포군의 클론원성 생존 분석(clonogenic survival assay)을 수행하여 비교하였다. 암세포 sorting을 위해서 먼저 각각의  $3.0 \times 10^7$  개의 세포를 0.05% Trypsin-EDTA로 떼어내고 10% fetal bovine serum을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40  $\mu$ m 스트레이너에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 잔여물질 제거를 위해 PBS(pH7.4)로 2회 세척 후, 실시예3의 방법으로 NPB15에 결합하게 만들어주었다. 이후 Cell sorter(BD bioscience, BD FACSARIAIII)를 이용하여 CD98 발현 상위 30%의 세포와 하위 30%세포를 각각 따로 분리하였다(도 10a). 분리된 세포는 실시예 5-3과 동일한 방법으로 6웰 플레이트에 웰당  $1.0 \times 10^4$  개씩 깔아서 세포들이 흩어져서 단일세포로 부착하도록 하고 10일 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 10일 후 형성된 콜로니의 크기와 수를 분석하기 위해서 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다(도 10b). 염색된 세포 콜로니를 Image J 프로그램을 이용하여 분석하고 같은 실험을 3회 반복하여 정량화하였다(도 10c 및 10d). 간암세포주인 SNU-449에서는 CD98-low군에서 CD98-high 군에 비해 클론원성 생존 능력이 약 35% 감소하는 것을 확인하였다(도 10c). 폐암세포주인 NCI-H460에서는 CD98-low군에서 CD98-high 군에 비해 클론원성 생존능력이 약 39% 감소하였다 (도 10d). 이런 결과는 CD98발현이 높을수록 암세포 생존과 암줄기세포성이 높으며, 본 발명의 NPB15에 의한 NPB15-high 암세포는 NPB15-low 암세포에 비해 암의 생존과 암 줄기세포성(cancer stemness)이 높은 세포이라는 것을 제시한다.

[0131] 실시예 7. NPB15 양성 암세포의 암줄기세포성 분석

[0132] 7-1. CD98 녹다운(Knockdown) 암 세포주에서 암 줄기세포 마커의 발현 분석

[0133] 암줄기세포는 암의 재발이나 항암제/방사선 치료에 대한 저항성을 주는 줄기세포로 CD98은 이미 두경부암에서 암줄기세포 마커로 보고되었다. 간암이나 폐암에서도 CD98이 암줄기세포 마커들과 연관성을 보이는지 보기위하

여 CD98 녹다운 암세포에서 대표적인 암줄기세포 마커인 CD44, ALDH, EpCAM, CD13 등의 발현 변화를 관찰하였다. 실시예 5에 기술한 것처럼 siRNA(siCD98)을 이용하여 SNU-449, Huh7, NCI-H460에서 CD98을 녹다운 시켰고 녹다운 세포주에서 먼저 대표적인 암줄기세포 마커인 CD44의 발현을 유세포분석기로 분석하였다. CD98이 녹아웃 되었다는 것을 검증하기 위해서 NPB15를 사용하여 siCon 트랜스팩션된 세포와 siCD98 트랜스팩션된 세포를 비교하여 siCD98이 트랜스팩션된 SNU-449와 NCI-H460에서 CD98의 발현 수준이 낮아짐을 먼저 확인하였다(도 11a 및 11b). 이어서 인간 폐암과 간암에서 CD44의 발현을 쥐 항-CD44( $\alpha$ -CD44, Biolegend) 항체를 이용하여 4℃에서 30분 결합시킨 뒤 항-쥐-IgG-FITC 항체를 2차 항체로 사용하여 4℃에서 30분 반응시킨 뒤 유세포분석기로 분석하였다. 분석 결과 간암 세포주인 SNU-449의 경우 약 49%의 CD44 발현 수준이 낮아짐이 관찰되었다(도 11a 및 11c). 폐암 세포주인 NCI-H460에서는 약 22% 정도 CD44의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 11b 및 11d). 이는 CD98이 간암과 폐암에서 암 줄기세포의 마커로써 활용될 수 있음을 시사한다. 추가적으로 암 줄기세포 마커와 연관성을 조사를 위해서 SNU-449, Huh7, NCI-H460에서 또다른 암 줄기세포 마커인 ALDH의 activity 변화를 측정하였다. ALDH의 activity 측정은 음성 컨트롤 siRNA(siCon)과 siCD98에 트랜스팩션된 CD98 녹다운된 암세포들을 각각  $1 \times 10^6$  개씩 준비한 뒤 Abcam사의 ALDH activity assay kit을 구매하여 공급자의 프로토콜에 따라 진행하였다. ALDH의 activity에 변색된 마이크로플레이트는 흡광도 측정기를 이용하여 OD450nm에서 측정하였다. 측정 결과 CD98 녹다운 SNU-449, Huh7, NCI-H460에서 각각 약 19, 18, 22%의 ALDH의 activity 감소가 관찰하였다(도 11e). 이는 CD98이 간암과 폐암에서 암 줄기세포의 마커로써 활용될 수 있음을 다시 제시한다. 또다른 간암줄기세포 마커인 EpCAM의 발현을 항-EpCAM 항체 (AbCam)을 사용하여 실시예 4-1처럼 웨스턴블랏팅으로 분석하였으며 CD98이 녹다운된 Huh7에서는 약 60% 정도의 EpCAM발현이 감소하였음을 확인하였다(도 11f 및 11g). 이러한 결과는 CD98이 간암과 폐암에서도 암 줄기세포성 유지에 중요한 분자임을 제시한다.

[0135]

## 7-2. 종양구(Tumorsphere) 배양에서 NPB15 결합분석

[0136]

인간 간암 세포주인 Huh7을 이용해 암줄기세포 특성을 가진 종양구(tumorsphere)를 만들기 위해 종양구 배지(50X B27, 20ng/ml EGF, 20ng/ml bFGF, DMEM/F12)를 만들었다. 40  $\mu$ m 세포 스트레이너에 거른 뒤, 24 웰 ultra-low attachment 플레이트(Corning)에 각 웰 당  $2.0 \times 10^5$  개씩 접종하고 37° C 인큐베이터에서 48시간 동안 배양했다. 48시간 후, 종양구가 잘 형성된 것을 관찰했다(도 12a). 계대배양을 위해서는 각 웰에 있는 세포를 50ml 튜브에 전부 모은 뒤, 세포 펠렛이 가라앉을 때까지 상온에서 10분간 두었다. 10분 후 상층액을 조심스럽게 제거하고 배지(RPMI 1640, 10% FBS, 1% Antibiotic Antimycotic) 1ml을 넣고 펠렛을 풀어준 뒤 1.5ml 튜브에 모았다. PBS(pH 7.4)로 세척하고 원심분리로 회수한 세포에서 PBS를 제거하고 신선한 배지 1ml을 넣어 세포를 풀어준 다음 Trypsin-EDTA 400ul를 넣고, 상온에서 3분간 두었다. 15ml 튜브에 신선한 미디어(media) 9ml을 준비하고, 1.5ml 튜브에 있는 세포액을 넣어 섞어준 다음 1500rpm으로 3분간 원심분리하였다. 24웰 ultra-low attachment 플레이트(Corning)에 각 웰 당  $2.0 \times 10^5$  개씩 접종하고 37° C 인큐베이터에서 24시간 동안 추가로 배양했다. 동일하게 Trypsin-EDTA를 이용하여 부착성 세포와 종양구 세포를 떼어낸 후 각각  $1.5 \times 10^5$  개씩 준비한 뒤, 상기된 실시예 3-1과 유세포분석을 진행했다. NPB15, 암줄기세포 마커인 CD133(Abcam), EpCAM(Santa Cruz Biotechnologies)를 일차 항체로 사용하여 원래의 부착성(Adherent) 세포와 종양구 세포에서 NPB15와 암줄기세포 마커의 결합정도를 유세포분석기로 비교하였다. 그 결과 간암의 암줄기세포 마커들인 CD133과 EpCAM이 종양구에서 증가하는 것을 볼 수 있으며 NPB15의 결합도 종양구에서 현저히 증가하는 것을 볼 수 있었다(도 12b 및 12c). 이런 결과는 NPB15 항체는 암줄기세포 특성을 가진 간암세포를 특이적으로 인식하는 항체라는 것을 제시한다.

[0138]

## 실시예 8. 단일클론항체 NPB15 항체 유전자 및 아미노산 분석

[0139]

### 8-1. 단일클론항체 NPB15 유전자 클로닝

[0140]

왕성하게 자라는 하이브리도마 NPB15 세포  $5 \times 10^6$  개를 원심 분리하여 수확한 후 찬 PBS로 세척하고 RNAiso plus reagent(TaKaRa, Otsu, Japan)으로 공급자의 프로토콜에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 얻어진 전체 RNA의 A260을 측정하여 RNA 양을 정량하였다. 전체 RNA 1  $\mu$ g 당 1 unit의 DNase I (TaKaRa)을 넣고 37℃에서 30분 동안 반응해 잔여의 DNA를 제거한 후 50mM EDTA 1  $\mu$ l를 넣고 85℃에서 5분 동안 반응해 DNase I를 불활성화 하고 전체 RNA를 변성시켰다. 전체 RNA와 Prime Script RT reagent Kit(TaKaRa)를 사용해 역전사중합효소 연쇄반응혼

합액을 만들고 공급자의 프로토콜에 따라 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로 중쇄 클로닝을 위해서는 IgG1 불변 영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 5'-gga gtc gac ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'(서열번호 12)인 올리고뉴클레오타이드 25 pmole과 중쇄항체 가변영역 N말단에 해당하는 프라이머인 염기서열 5'MH1 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC-3'(서열번호 13) 25pmole과 5'MH2 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3'(서열번호 14) 올리고뉴클레오타이드 25pmole을 넣어 연쇄 중합반응혼합액을 만들었다. 경쇄 클로닝을 위해서는 카파사슬 불변영역에 해당하는 프라이머인 5'-ggg gtc gac GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3'(서열번호 15) 올리고뉴클레오타이드와 카파사슬 가변영역 N 말단에 해당하는 프라이머인 5'MK 5'-cgg aag ctt GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3'(서열번호 16)과 각각을 사용하였다. 중합효소연쇄반응 생산물의 효율적인 클로닝을 위하여 중쇄의 경우는 5'-프라이머 말단에 EcoRI, 3'-프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 경쇄의 경우는 5'-프라이머 말단에 HindIII, 3'-프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄 또는 경쇄의 중합효소반응 프라이머와 lunit의 i-pfu DNA Polymerase(iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 각각 섞은 후 먼저 95℃에서 5분동안 1회 반응하고 95℃에서 1분, 35℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 30회 반응시켰다. 그 결과 중쇄 가변영역에 해당하는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 400bp, 경쇄 가변영역 해당하는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 390bp에 해당하는 위치에서 증폭된 DNA를 얻을 수 있었다(도 13a 및 13b).

## [0142] 8-2. NPB15 단일클론항체 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

[0143] 상기 실시 예에서 증폭해낸 NPB15 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 중합효소연쇄반응 산물을 중쇄는 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄는 HindIII와 SalI으로 처리한 후 1.0 %(w/v) 아가로스 젤에 전개시켜 FavorPrep GEL PCR Purification Kit(Favorgen, Pingtung, Taiwan)로 약 400bp와 390bp에 해당하는 DNA를 분리하였다. 중쇄유전자를 클로닝할 벡터로 사용할 pBluescript KS+를 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄유전자 클로닝 벡터로는 pBluescript KS+를 HindIII와 SalI으로 처리한 다음 FavorPrep GEL PCR Purification Kit로 분리하였다. 이 두 DNA를 T4 DNA 연결효소(New England Biolab, Massachusetts, U.S.A)로 연결하고 대장균 DH5α에 CaCl<sub>2</sub> 방법으로 형질 전환하였다. 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 100μg/ml의 암피실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA-Spin plasmid mini prep kit(Intron, 한국)를 사용하여 공급자의 프로토콜에 따라 플라스미드 DNA를 분리하고 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 대장균 클론(도 13c), 경쇄의 경우 약 390bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 대장균 클론들을 선별하였다(도 13d). 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 Nucleotide sequencing(Bionics, Seoul, Korea)을 통해 확인하였다. 중쇄 및 경쇄 DNA의 염기서열을 아미노산으로 번역 후 항체 구조에 따른 항원인식결정 부위를 Kabat numbering을 통해 정리한 결과 중쇄는 subgroup II에 해당하고 경쇄는 subgroup V에 해당하였다. 각 서열에 항원 결합 부위인 CDR1, 2, 3를 진한 색으로 표시하였다(도 14 및 15).

## [0145] 실시예 9. 생쥐-인간 키메라 Chi-NPB15 항체의 발현 벡터 제조

[0146] 생쥐 유래의 단일클론항체를 인간에 사용할 경우 면역 부작용을 일으킬 가능성이 있다. 이를 극복하기 위해 생쥐 유래의 단일클론항체를 면역부작용이 적은 생쥐-인간 키메라 항체(Chimeric antibody)로 제작하여 치료용 항체로써 사용할 수 있다. 생쥐 유래 단일클론항체 NPB15의 생쥐-인간 키메라 항체(Chi-NB15)를 개발하기 위해 NPB15 항체 유전자와 인간 항체의 불변부를 결합하였고, 이를 발현 벡터에 클로닝 하여 항체 생산을 위한 Chi-NPB15 항체의 발현 벡터를 제조했다. 먼저 생쥐에서 얻은 NPB15의 중쇄와 경쇄의 유전자를 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 약 400bp와 390bp에 해당하는 DNA를 Gel extraction kit(FAVORGEN, 대만)을 이용하여 DNA를 분리하였다. 중쇄 유전자 앞에 불일 신호 펩타이드 서열(signal peptide)을 합성하기 위하여 pdCMV-dhfr 벡터(한국 등록특허 제 2120223호)를 주형으로 하여 h2B7-HC-SLIC-5'(5'-GCC AGT GTG CTG GAA TTC ACT CTA ACC-3')(서열번호 17) 프라이머와 NPB15-Chi-HC-SP-3'(5'-CTG CAC CTG GGA GTG GAC ACC TGT AGT TA-3')(서열번호 18) 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그리고 NPB15의 중쇄 가변영역을 증폭하기 위해 중쇄 가변영역의 DNA를 주형으로 하여 NPB15-Chi-HC-SP-5'(5'-GTC CAC TCC CAG GTG CAG CTG CAG-3')(서열번호 19) 프라이머와 NPB15-chi-HC-3'(5'-CCT TGG TGG AGG CTG AGG AGA CTG TGA G-3')(서열번호 20) 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 다시, 중쇄 신호 펩타이드 서열과 NPB15 항체의 중쇄 가변 영역을 연결하기 위해, 상기 PCR로 제조한 DNA를 섞어 주형으로 하고 h2B7-HC-SLIC-5' 프라이머와 H2B7-HC-SLIC-3'(AAG ACC GAT GGG CCC TTG GTG GAG-3')(서열번호 21) 프라이머를 이용하여 recombinant PCR을 수행하였다. PCR 결과물을 1% 아가로스 젤에 전개시

킨 결과 중쇄 가변영역과 중쇄 신호펩타이드 서열이 연결된 약 450bp에 해당하는 DNA를 확인할 수 있었다(도 16a). 이를 FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit(Farvorgen, 대만)를 이용하여 분리하고 EcoRI 과 ApaI으로 처리한 후 다시 한 번 FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit을 이용하여 분리하였다. 이를 인간의 중쇄 불변 영역(IgG1) 유전자를 포함하고 있는 pdCMV-dhfr 벡터의 EcoRI과 ApaI 자리에 T4 DNA 연결효소(NEB, 미국)을 사용하여 삽입하였다(도 16b).

[0147] 경쇄 유전자 앞에 붙일 신호 펩타이드 서열(signal peptide)을 합성하기 위하여 pdCMV-dhfr 벡터를 주형으로 하여, h2B7-LC-SLIC-5'(5'-ATA GGG AGA CCC AAG CTT CGG CAC GAG CAG A-3')(서열번호 22) 프라이머와 NPB15-Chi-LC-SP-3'(5'-CAT CAC AAT ATC TCC TTC AAC ACC AGA CA-3')(서열번호 23) 프라이머를 쌍으로 PCR을 수행하였다. 그리고 NPB15 항체의 경쇄 가변영역을 증폭하기 위해 경쇄 가변 영역의 DNA를 주형으로 NPB15-Chi-LC-SP-5'(5'-GTT GAA GGA GAT ATT GTG ATG ACA CAG TC-3')(서열번호 24) 프라이머와 Chi-NPB15-LC-SLIC-3'(5'-TGG TGC AGC CAC CGT ACG TTT GAT TTC CA-3')(서열번호 25) 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 다시, 경쇄 신호 펩타이드 서열과 NPB15 항체의 경쇄 가변 영역을 연결하기 위해, 상기 PCR로 제조한 DNA를 섞어 주형으로 하고 h2B7-LC-SLIC-5' 프라이머와 Chi-NPB15-LC-SLIC-3' 프라이머를 이용하여 recombinant PCR을 수행하였다. PCR 결과물을 1% 아가로스 겔에 전개시킨 결과 경쇄 가변영역과 경쇄 신호펩타이드 서열이 연결된 약 430bp에 해당하는 DNA를 확인할 수 있었다(도 16c). 이를 FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit를 이용하여 분리하고 HindIII와 BsiwI으로 처리한 후 다시 한 번 FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit을 이용하여 분리하였다. 이를 중쇄의 유전자가 삽입된 pdCMV-dhfr-chi-NPB15-HC 벡터의 HindIII와 BisWI 자리에 클로닝하여 인간 경쇄 불변영역(Ck) 유전자와 연결되도록 하고(도 16d), 최종 Chimeric NPB15항체 발현 벡터를 'pdCMV-dhfr-chi-NPB15'이라 명명하였다. 최종 벡터 DNA는 대장균 DH5α에 RbC12 방법으로 형질 전환한 다음 약 450bp 크기의 중쇄 유전자 삽입물을 가진 클론 및 약 430bp 크기의 경쇄 유전자 삽입물 가진 대장균 클론들을 선발하였다. 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 50 μg/ml의 암피실린이 함유된 5ml의 LB배지에서 밤새 배양한 후 DNA-spin™ Plasmid DNA purification kit(INTRON, 한국)을 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 확인하였다(Bionics, 한국). pdCMV-dhfr-chi-NPB15의 중쇄 및 경쇄 가변영역의 DNA 염기서열이 기존 NPB15 가변영역의 유전자 서열과 동일하였고, 신호펩타이드 서열 및 인간 중쇄와 경쇄 불변영역 유전자에 바르게 연결되어 있음을 확인하였다(도 17 및 도 18).

#### [0149] 실시예 10. 생쥐-인간 키메라항체 Chi-NPB15의 발현, 정제 및 활성분석

[0150] NPB15 생쥐 가변영역과 인간 불변영역으로 연결된 키메라 항체를 Chi-NPB15라고 명명하고 이 키메라 항체를 생산하고 정제하기 위하여, 먼저 인간 배아신장세포인 HEK293FT 세포주를 150mm 배양 접시에  $1 \times 10^7$  세포를 20ml의 DMEM(Biowest, 프랑스) 배지에 배양했다. 50 μg의 pdCMV-dhfr-Chi-NPB15 발현 벡터와 75 μl의 Polyethyleneimine(1mg/ml)를 섞어준 뒤, 트랜스펙션 최적화 배지 500 μl 와 섞어 배양한 세포의 세포 배양 배지 위에 뿌려주었다. 24시간 동안 배양한 후, 세포 배양 배지를 수집하여 항체를 정제했다. 수집한 세포 배양 배지를 Protein G agarose beads(Amicogen, 한국)로 채워진 column에 넣어주어 항체가 Protein G agarose beads와 결합할 수 있게 한 뒤, PBS(pH8.0)으로 비드를 세척 후, 0.1M glycine(pH 2.8) 10ml과 1M Tris-HCl(pH9.0)을 넣어 Protein G agarose beads에서 항체를 용출하였다. SDS-PAGE와 코마시 블루(Coomassie blue) 염색법을 통해 정제한 Chi-NPB15 키메라 항체의 순도를 확인하였다(도 19a). 또한, 염소의 항-인간 항체(goat-α-hIgG-HRP, Invitrogen, 미국)를 2차 항체로 이용하여 웨스턴 블랏팅을 통해 검출한 결과, 상기 키메라 항체는 인간 항체의 불변영역을 포함하는 항체인 것을 확인할 수 있어 생쥐항체 가변영역과 인간 불변영역을 가진 키메라 항체가 적절히 제조되었음을 보여준다(도 19b). 다음으로 분리한 Chi-NPB15항체가 항체 활성이 보이는지를 분석하기 위하여 간암세포주 Huh7에 대하여 NPB15와 chi-NPB15항체를 사용하여 결합할 수 있는지 상기 실시예 3-1처럼 유세포분석기로 분석하였다. 그 결과 두 항체가 모두 동일하게 Huh7세포에 잘 결합하는 것을 관찰하여 키메라 항체 Chi-NPB15는 NPB15와 비슷한 활성을 가진 항체라는 것을 확인하였다(도 19c).

#### [0152] 실시예 11. 키메라 Chi-NPB15 항체의 간암세포에서 항체 의존성 세포 독성

[0153] 생쥐 항체 NPB15의 가변영역과 인간 IgG1 불변영역을 가진 키메라 Chi-NPB15 항체를 활용하여 간암세포주인 Huh7에서 NPB15의 세포 의존성 세포 독성(ADCC)을 측정하였다. 측정을 위해 실험 하루 전 먼저 96well white plate(SPL)의 외곽의 36웰을 제외한 안쪽 60 웰에 37,500개의 인간 간암 세포주 Huh7 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI-1640(Biowest) 배지 100 μl를 이용하여 분주 후 24시간동안 배양하였다. 다음날 아침 배양배지 95 μl를 제거

하고 ADCC kit(Promega, G7010)에 포함된 ADCC assay buffer(1.4ml low IgG serum+33.6ml RPMI) 25 $\mu$ l를 안쪽 60웰에, 바깥쪽 36웰에는 75 $\mu$ l를 처리하고 항체의 serial dilution을 수행함. serial dilution은 각 hIgG isotype control 및 NPB15 인간 키메라 항체를 100 $\mu$ g/ml 에서부터 1/3씩 ADCC assay buffer에 dilution했으며 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1 0.03, 0.01 및 no antibody까지 10개의 웰을 3번씩 수행했다. 각 항체 희석액을 25 $\mu$ l씩 각 웰에 처리한 후 3.6ml ADCC assay buffer에 thawing한 630 $\mu$ l ADCC bioassay effector cell을 희석하여 만든 cell suspension을 25 $\mu$ l씩 처리하여 E:T ratio를 12:1로 설정하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 6시간 배양함. 6시간 후 plate를 상온에서 15분간 두어 온도를 낮추고 미리 준비한 Bio-Glo luciferase assay reagent를 안쪽 60웰에 각 75 $\mu$ l씩, 바깥쪽 36웰에 75 $\mu$ l씩(blank control) 처리한 후 5분간 반응 후 luminescence를 측정하였다. 실험 결과, 음성대조군인 hIgG1 이소타입 항체와 비교해볼때 Chi-NPB15 항체에서는 5  $\mu$ g/ml이상의 농도에서부터 현저히 luminescence가 증가하는 것을 확인하였고 (도 20), 이는 NPB15항체는 CD98의 표적을 통한 ADCC에 의해 간암세포의 사멸을 유도할 수 있다는 것을 제시한다.

# [0155] 실시예 12. 인간 간암세포 이중 생쥐모델에서 NPB15 항암효과 분석

[0156] 앞선 실시예에서 확인된 NPB15 항체의 기능에 기반하여, CD98을 발현하는 암에 대한 예방 또는 치료에 NPB15 항체를 사용할 수 있는지를 in vivo에서 확인하였다. 간암 동물 모델을 구축하기 위하여 면역결핍 누드(Balb/c nu/nu) 생쥐(Nara biotech, 한국)를 구매하였으며, 간암세포주 이중 이식 누드마우스 모델을 구축하여 암세포 성장을 확인했다.

[0157] 간암세포인 Huh7 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고, 10% FBS(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화하고, 원심분리한 후 cell counting을 진행했다. 한 마리당 7.5X10<sup>6</sup>개의 세포를 PBS(pH 7.4):Matrigel(Corning) 1:1 희석액 200 $\mu$ l에 현탁 시킨 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 1주일간 사육실에서 안정화시킨 5주령 암컷 Balb/C-nu 누드마우스(나라바이오) 12 마리 각각의 등 쪽 옆구리(dorsal flank)에 피하주사 하여 이중 이식했다.

[0158] 50 mm<sup>3</sup> 이상의 크기를 가지는 암이 관찰된 생쥐 중 6마리에는 mIgG1 isotype control 항체를 주사하였고, 다른 6마리에는 NPB15를 10 mg/kg의 용량으로 꼬리 정맥 주사를 통해 2일 간격으로 20 일간 투여했다 (도 21a). 각 날짜별 암의 부피는 1/2\*장축\*단축<sup>2</sup>으로 계산하여 측정했다.

[0159] 그 결과, NPB15를 투여한 생쥐는 대조군인 mIgG1를 투여한 생쥐에 비해 암 성장이 현저히 억제됨을 관찰하였다 (도 21b). 항체 투여 후 20일차에 희생시킨 생쥐에서 수확한 암의 크기를 비교했을 때, NPB15를 투여한 생쥐에서 수확한 암은 mIgG1를 투여한 대조군에 비해 크기가 작은 것을 확인하였다 (도 21c). 또한, 누드마우스에서 얻은 암덩어리를 채취하여 무게를 비교했을 때, NPB15를 주사한 누드마우스의 암의 무게가 더 작은 것을 확인하였다 (도 21d). 추가적으로, 항체 주사로 인한 부작용을 관찰하기 위해 마우스의 체중을 측정한 결과, mIgG1군과 NPB15군 간 차이가 없었다 (도 21e). 이러한 결과로부터 NPB15가 in vivo에서 부작용 없이 암의 성장을 감소시킬 수 있고, NPB15를 in vivo에서 암의 예방 및 치료 용도로 사용할 수 있음을 확인하였다.

# [0161] 실시예 13. 인간 간암세포 이중 생쥐모델에서 Chi-NPB15 항암효과 분석

[0162] 앞선 실시예에서 확인한 NPB15 항체의 기능에 더하여, NPB15를 기반으로 제작한 Chi-NPB15 항체를 CD98을 발현하는 암세포에 대한 예방 또는 치료 용도로 사용할 수 있는지를 in vivo에서 확인하였다. 간암세포주 이중 이식 누드마우스 모델에 인간 isotype control(Human IgG)과 인간 마우스 키메라 항체 Chi-NPB15를 주사하여 이용하여 암세포 성장 억제여부를 비교하였다.

[0163] 간암세포인 Huh7 세포를 Tryple<sup>TM</sup> Express(Gibco, Seoul, Korea)로 떼어내고, 10% FBS(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화하고, 원심분리한 후 cell counting을 진행했다. 한 마리당 7.5X10<sup>6</sup> 개의 세포를 PBS(pH 7.4):Matrigel(Corning) 1:1 희석액 200 $\mu$ l에 현탁 시킨 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 1주일간 사육실에서 안정화시킨 5주령 암컷 Balb/C-nu 누드마우스(나라바이오)의 등 쪽 옆구리(dorsal flank)에 피하주사 하여 이중 이식했다. 50 mm<sup>3</sup> 이상의 암이 관찰된 생쥐 중 3마리에는 hIgG isotype control항체를, 5마리에는 Chi-NPB15 키메라 항체를 각각 10 mg/kg의 용량으로 꼬리 정맥 주사를 통해 21일간 총 7회, 3일 간격으로 투여했다

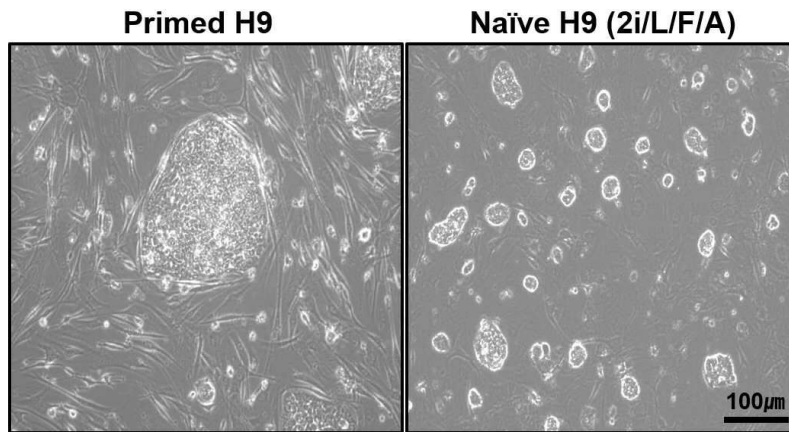
(도 22a). 각 날짜별 암의 부피는  $1/2 \times \text{장축} \times \text{단축}^2$ 으로 계산하여 측정했다.

[0164]

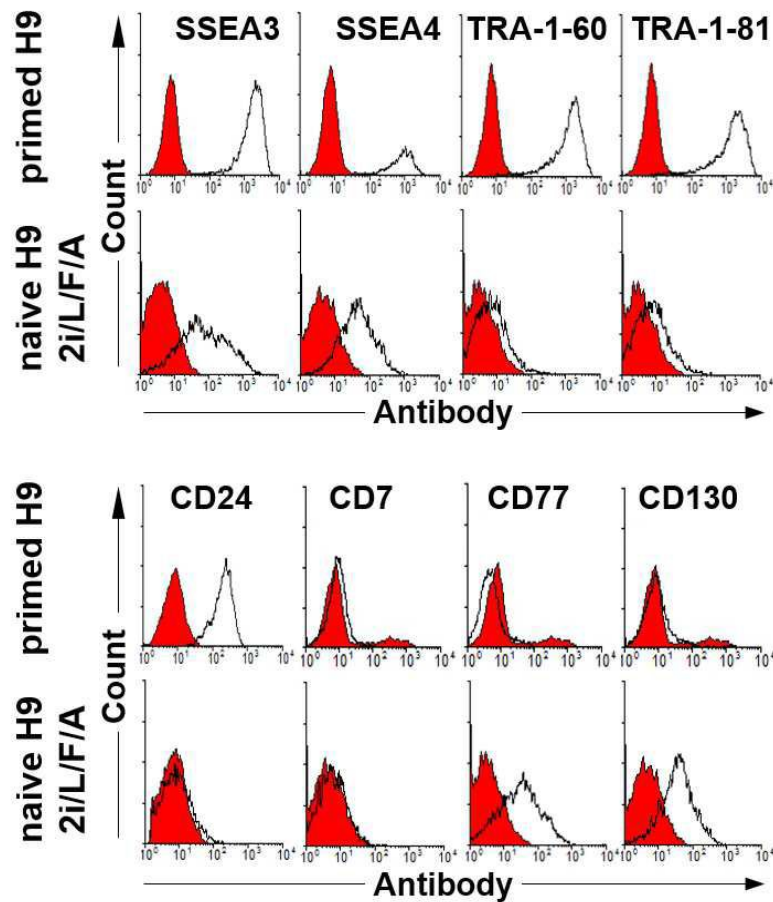
그 결과, Chi-NPB15를 투여한 생쥐도 또한 hIgG를 투여한 대조군에 비해 암 성장이 억제됨을 관찰하였다(도 22b). 항체 주사로 인한 부작용을 관찰하기 위해 생쥐의 체중을 측정한 결과, hIgG군과 Chi-NPB15군 간 차이가 없었다(도 22c). 이러한 결과로부터 Chi-NPB15가 in vivo에서 부작용 없이 암의 성장을 감소시킬 수 있고, Chi-NPB15를 in vivo에서 암의 예방 및 치료 용도로 사용할 수 있음을 확인하였다.

도면

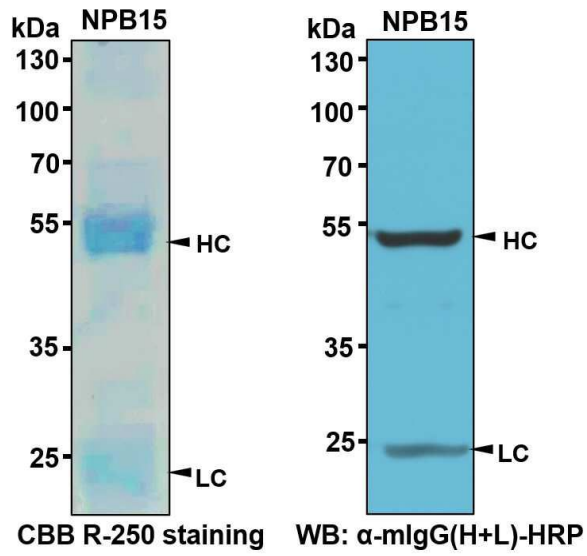
도면1a



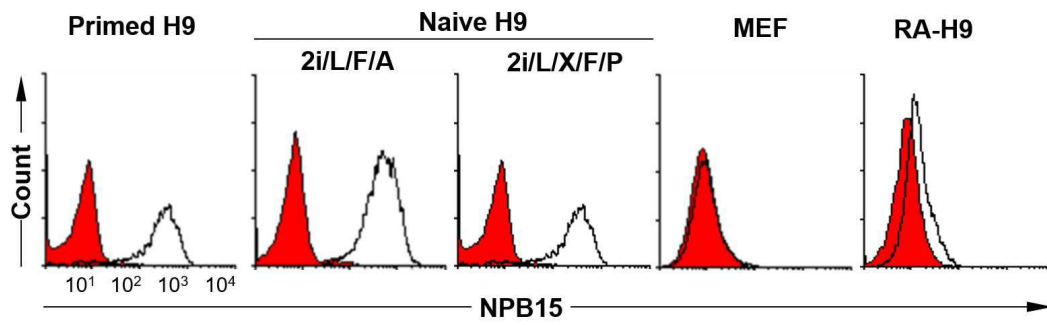
도면1b



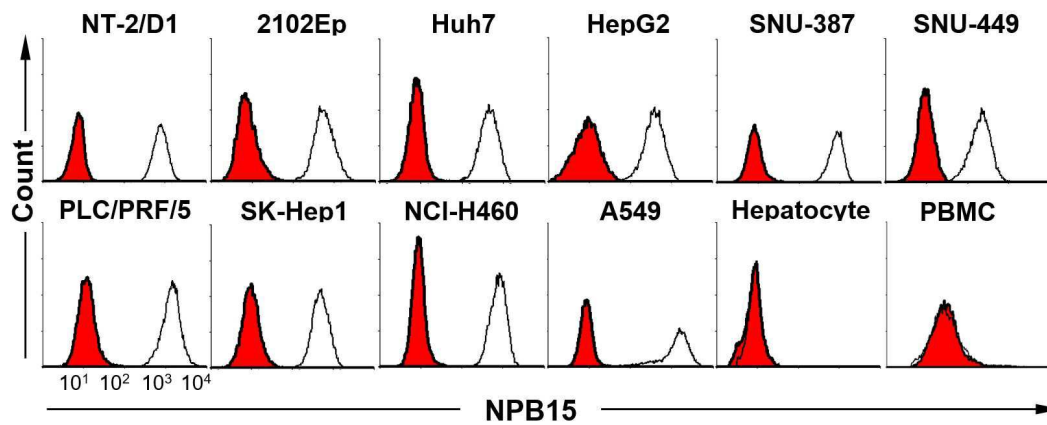
도면1c



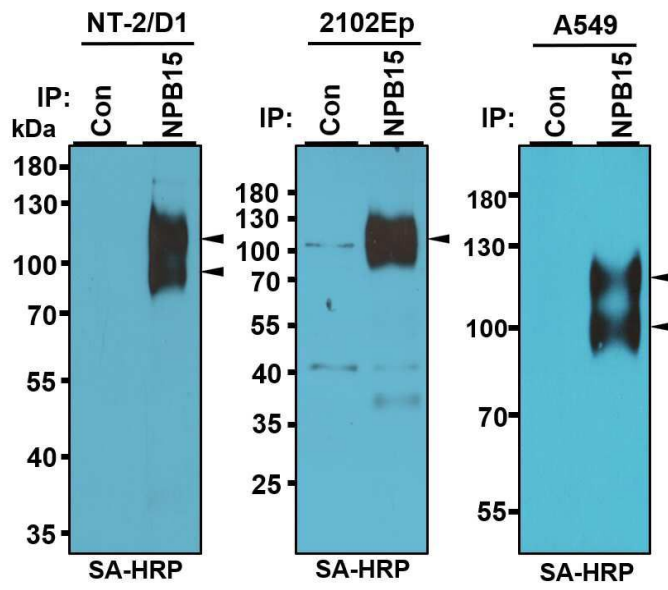
도면2



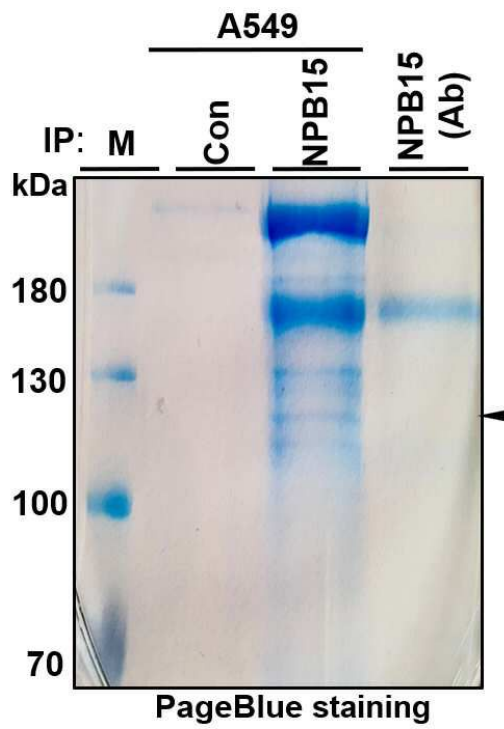
도면3



도면4a



도면4b



도면4c

AAA35536.1 Mass: 58040 Score: 65 Matches: 5(2) Sequences: 5(2) emPAI: 0.16  
lymphocyte activation antigen [Homo sapiens]

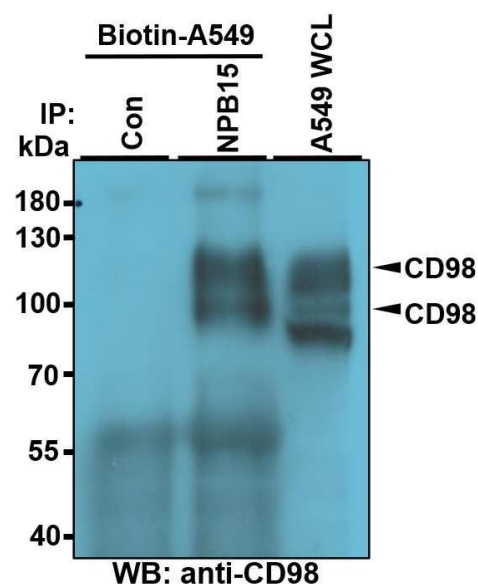
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

| Query | Observed | Mr(expt)  | Mr(calc)  | ppm  | Miss | Score | Expect | Rank | Unique | Peptide             |
|-------|----------|-----------|-----------|------|------|-------|--------|------|--------|---------------------|
| ✓ 74  | 602.3909 | 1202.7672 | 1202.6659 | 84.2 | 0    | 25    | 1.1    | 1    | U      | R.VILDLTPTNYR.G     |
| ✓ 98  | 686.4792 | 1370.9438 | 1370.8286 | 84.1 | 0    | 31    | 0.038  | 1    | U      | R.LLTSFLPAQLLR.L    |
| ✓ 114 | 743.9522 | 1485.8899 | 1485.7674 | 82.4 | 1    | 15    | 34     | 1    | U      | K.IKVAEDEAEAAAAAK.F |
| ✓ 119 | 753.4488 | 1504.8831 | 1504.7522 | 87.0 | 0    | 56    | 0.0021 | 1    | U      | K.QQSEDPGSLLSLFR.R  |

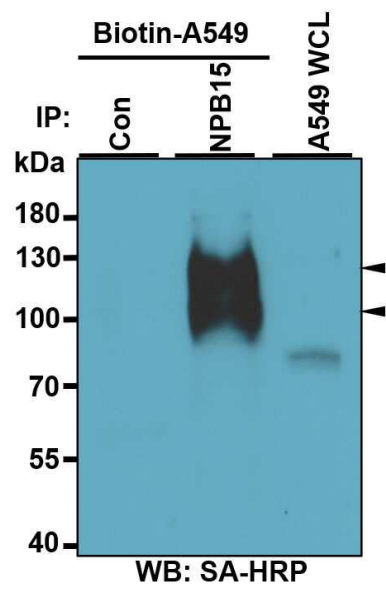
  

|     |             |            |            |            |             |
|-----|-------------|------------|------------|------------|-------------|
| 1   | MELQPPEASI  | AVVSIPRQLP | GSHSEAGVQG | LSAGDDSELG | SHCVAQTGLE  |
| 51  | LLASGDPLPS  | ASQNAEMIET | GSDCVTQAGL | QLLASSDPPA | LASKNAEVTG  |
| 101 | TMSQDTEVDM  | KEVELNELEP | EKQPMNAASG | AAMSLAGAEK | NGLVKIKVAE  |
| 151 | DEAEAAAAAAK | FTGLSKEELL | KVAGSPGWVR | TRWALLLLFW | LGWLGMLAGA  |
| 201 | VVITVRAPRC  | RELPAQKWWH | TGALYRIGDL | QAFQGHGAGN | LAGLKGRLDY  |
| 251 | LSSLKVKGLV  | LGPIHKNQKD | DVAQTDLLQI | DPNFGSKEDF | DSLLQSASKKK |
| 301 | SIRVILDLTPT | NYRGNSWFS  | TQVDTVATKV | KDALEFWLQA | GVDGFQVRDI  |
| 351 | ENLKDASSFL  | AEWQNITKGF | SEDRLLIAGT | NSSDLQQILS | LLESNKDILL  |
| 401 | TSSYLSDSGS  | TGEHTKSLVT | QYLNATGNRW | CSWSLSQARL | LTSFLPAQLL  |
| 451 | RLYQLMLFTL  | PGTPVFSYGD | EIGLDAAALP | GQPMFAPVML | WDESSFPDIP  |
| 501 | GAVSANMTVK  | QQSEDPGSLL | SLFRRLSDQR | SKERSLLHGD | FHAIFSAGPGL |
| 551 | FSYIRHWDQN  | ERFLVVLNFG | DVGLSAGLQA | SDLPASASLP | AKADLLLSTQ  |
| 601 | PGREEGSPL   | LERLKLEPHE | GLLRFPYAA  |            |             |

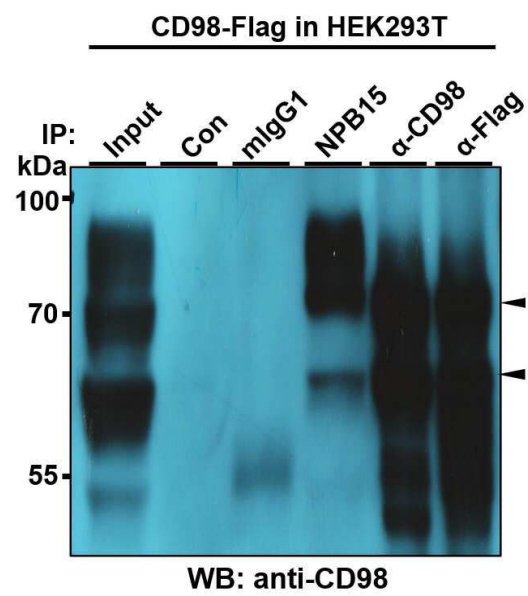
도면5a



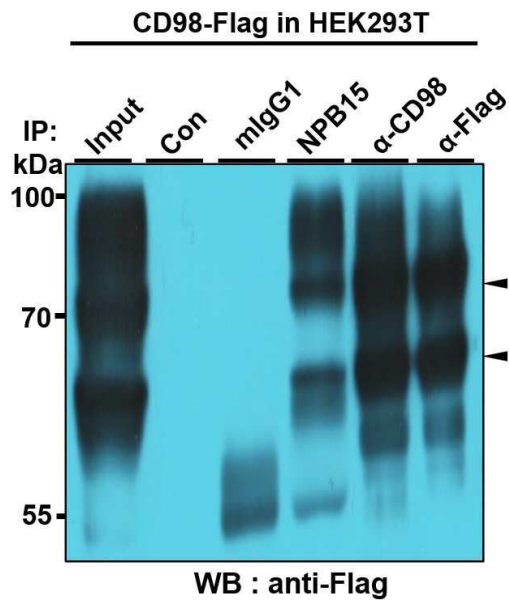
도면5b



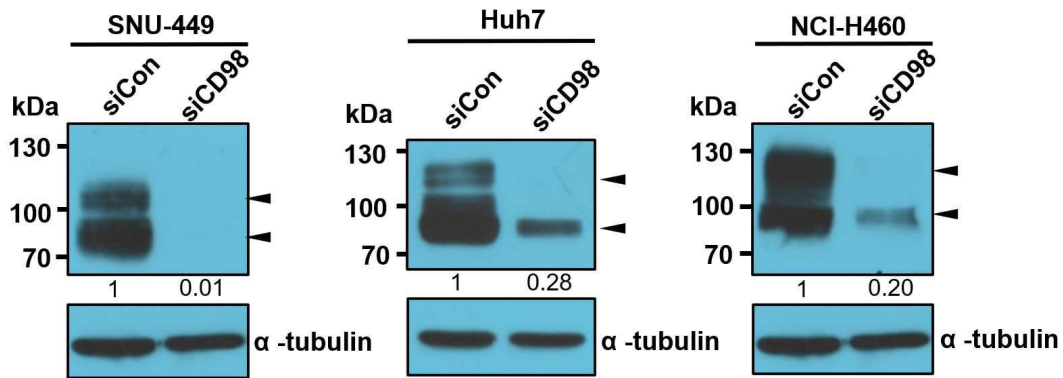
도면5c



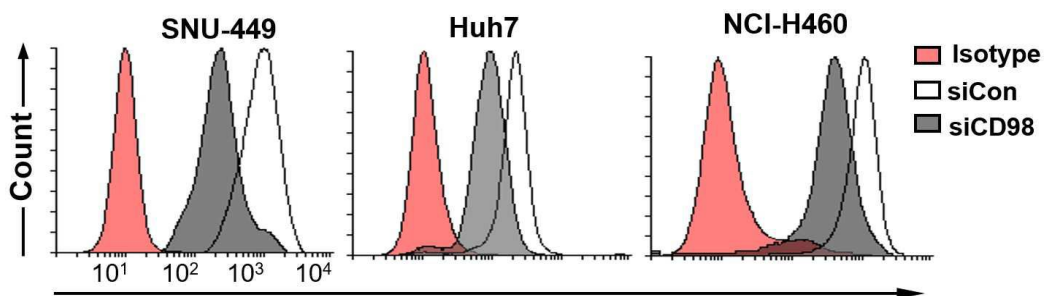
도면5d



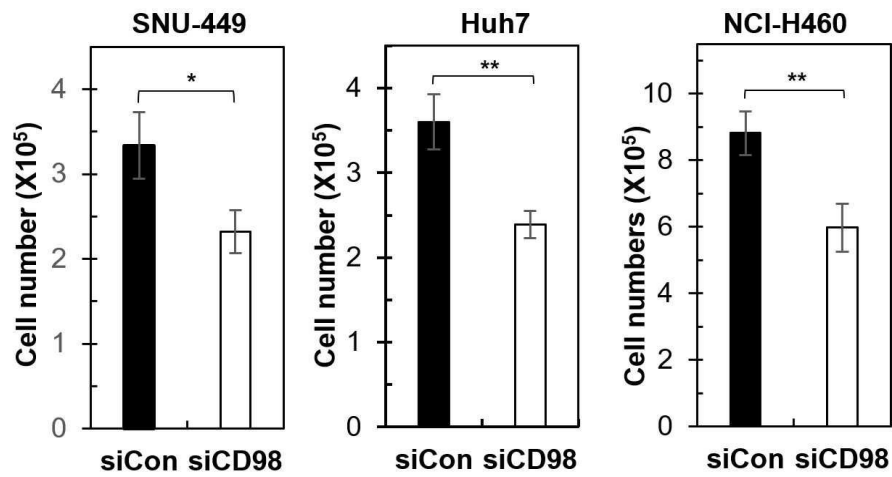
도면6a



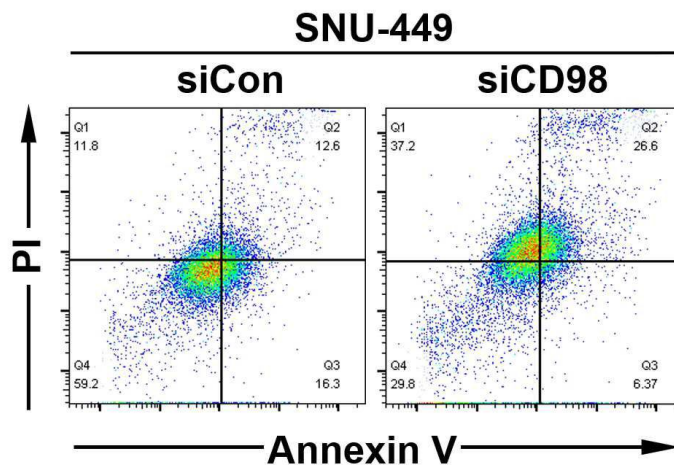
도면6b



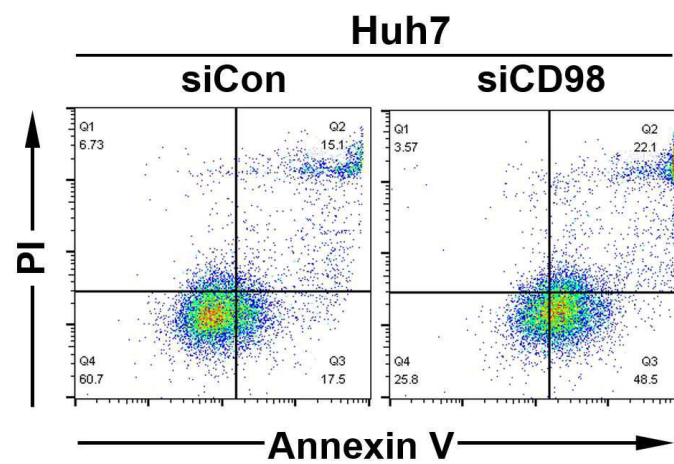
도면6c



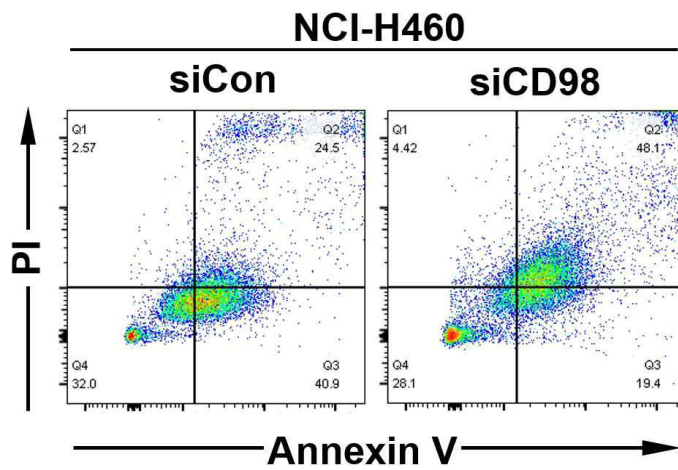
도면7a



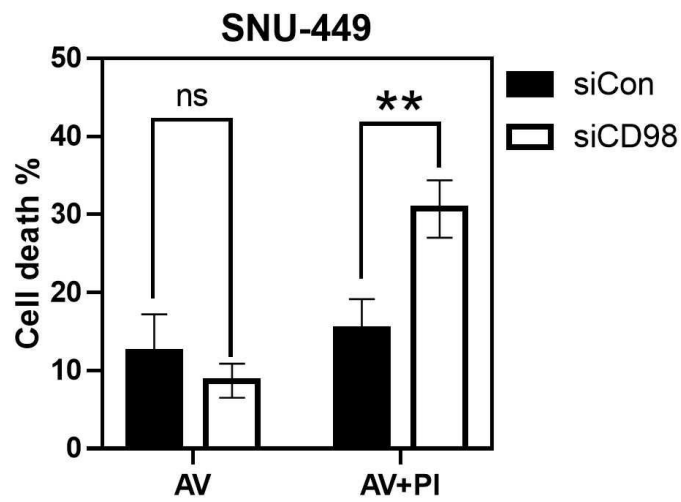
도면7b



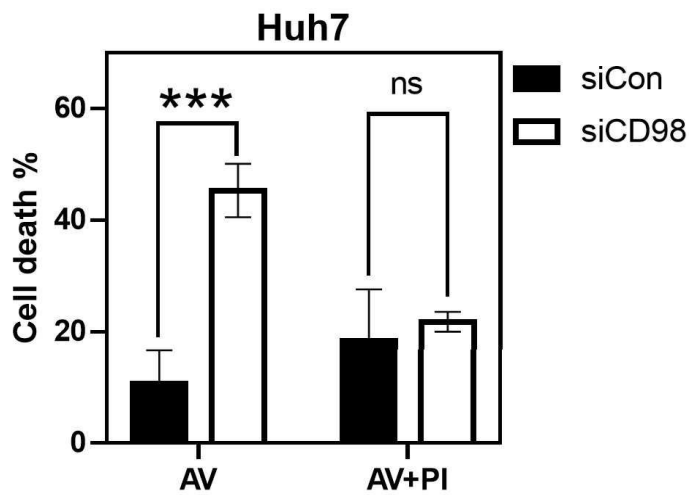
도면7c



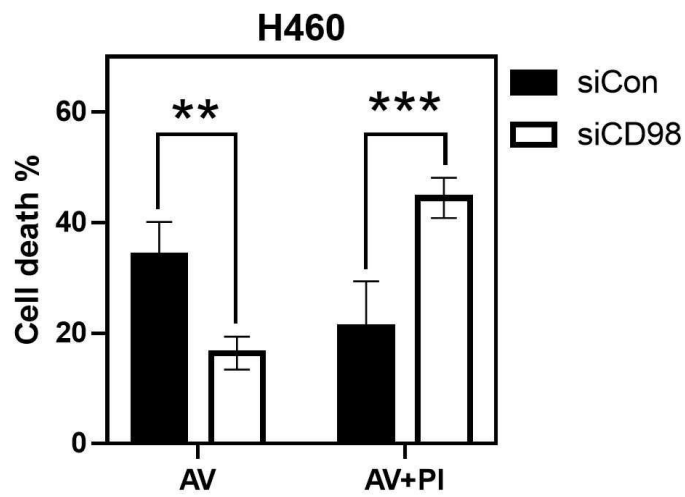
도면7d



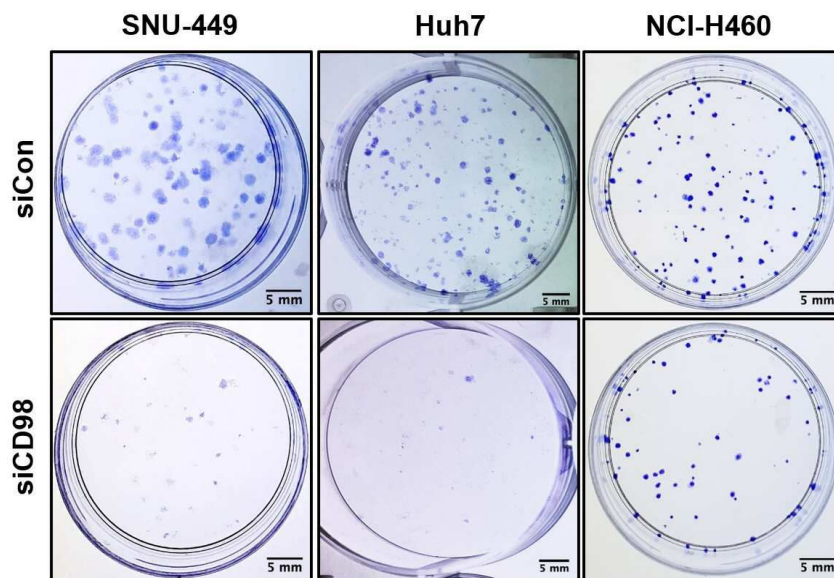
도면7e



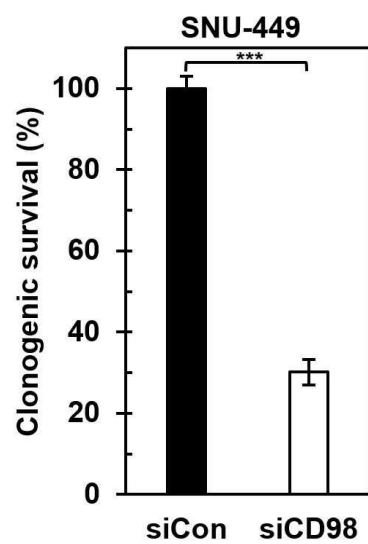
도면7f



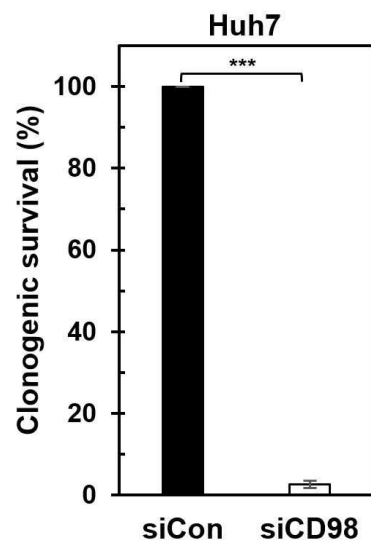
도면8a



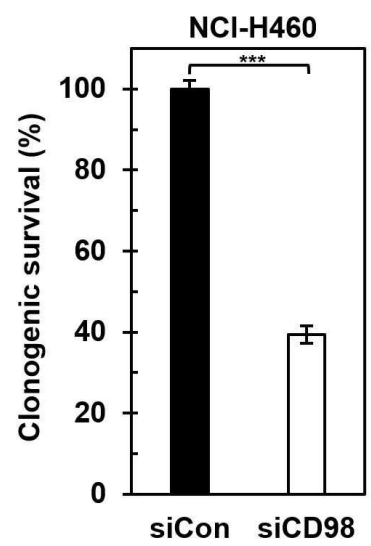
도면8b



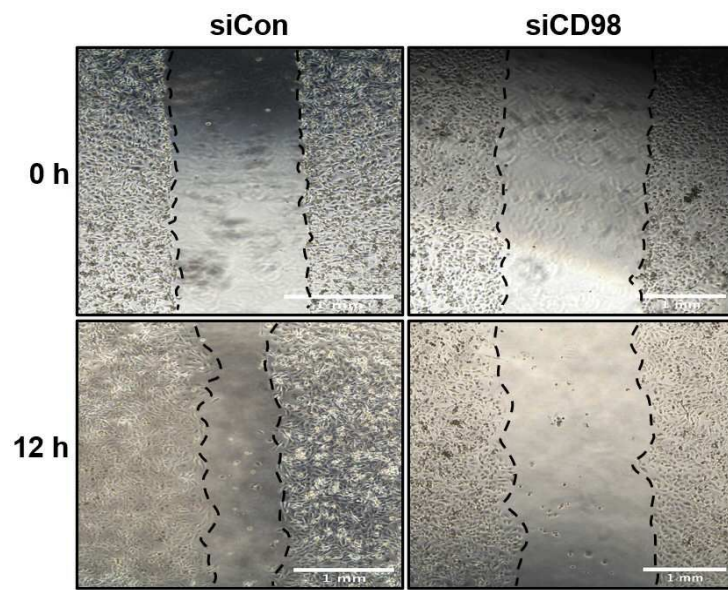
도면8c



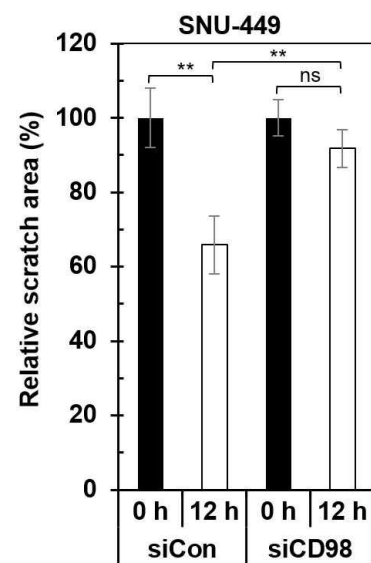
도면8d



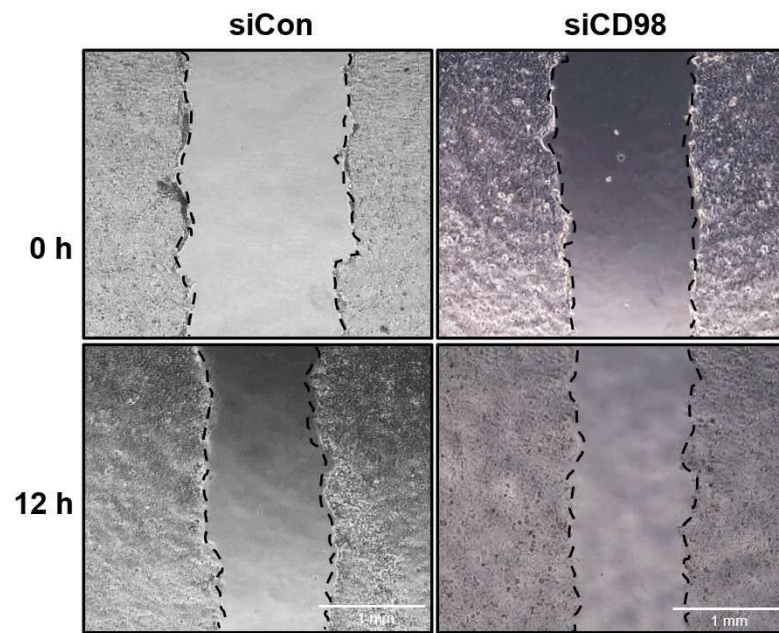
도면9a



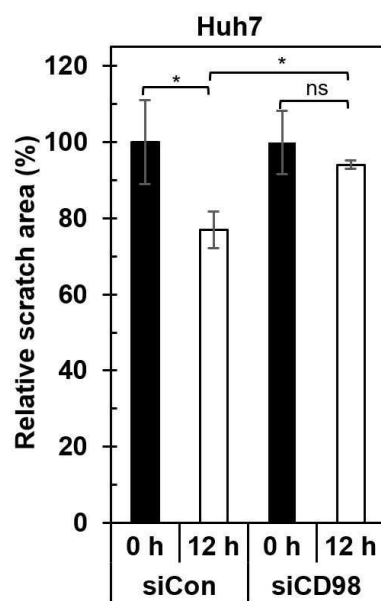
도면9b



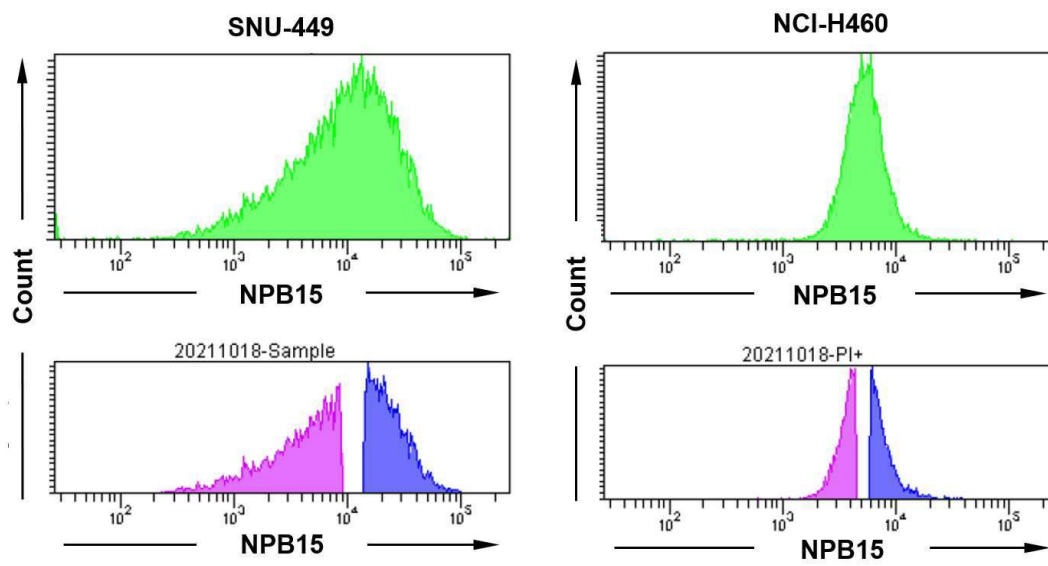
도면9c



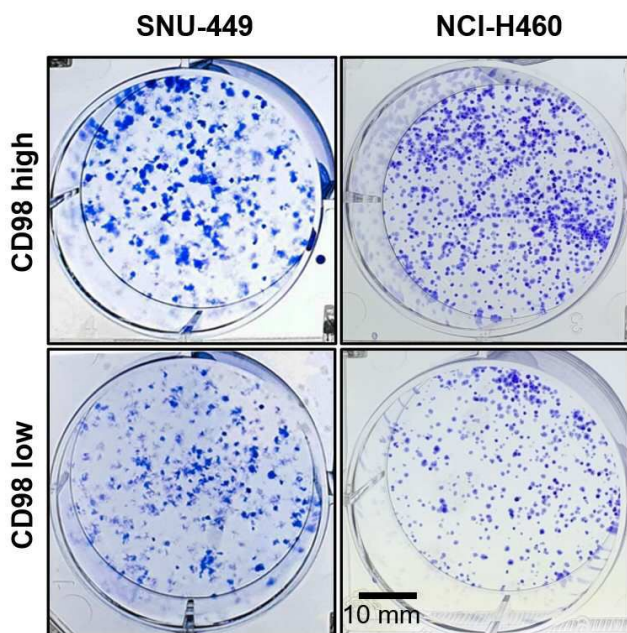
도면9d



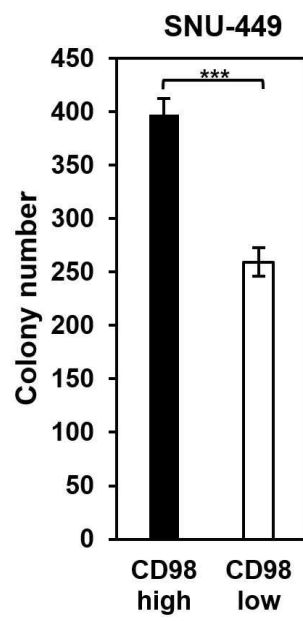
도면10a



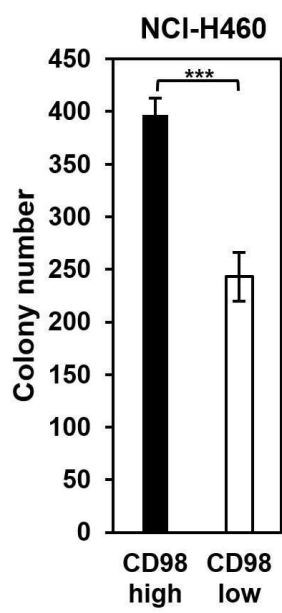
도면10b



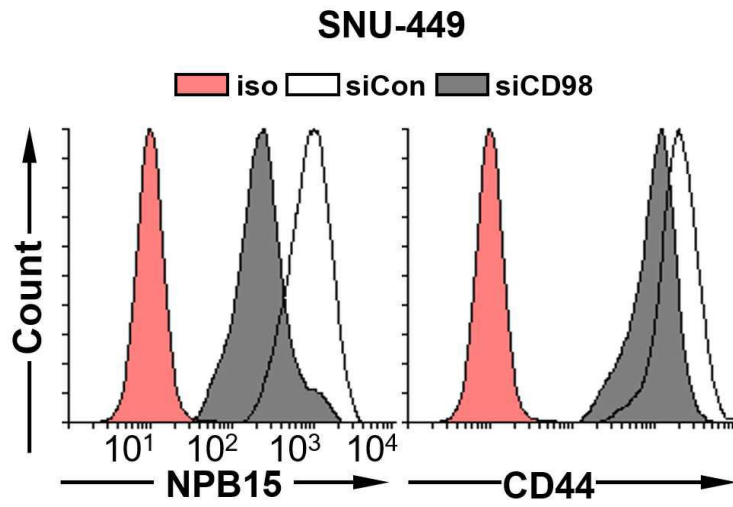
도면10c



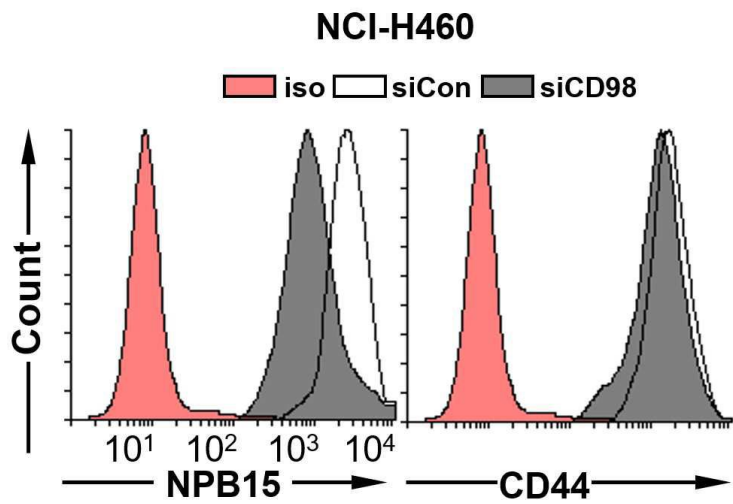
도면10d



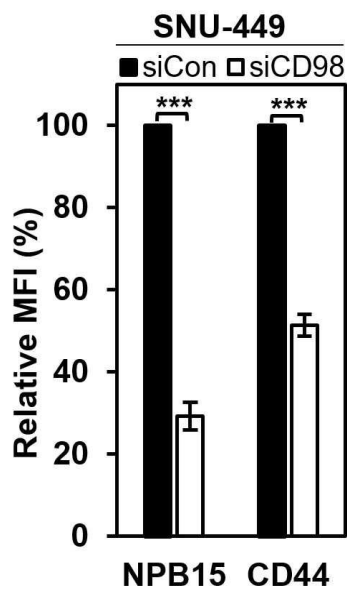
도면11a



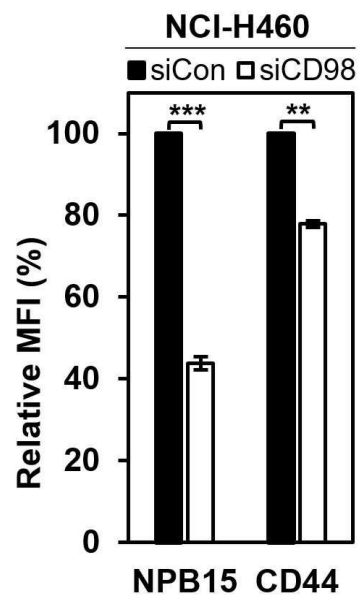
도면11b



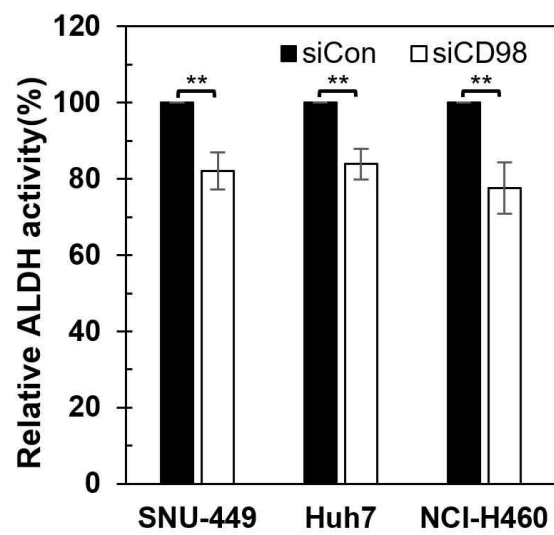
도면11c



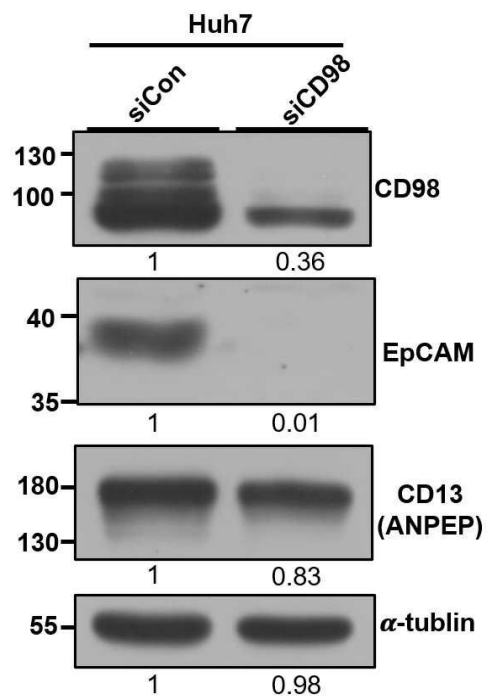
도면11d



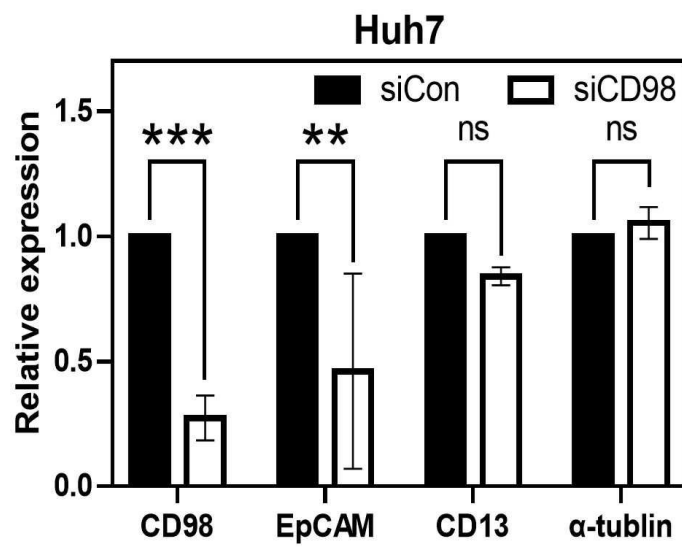
도면11e



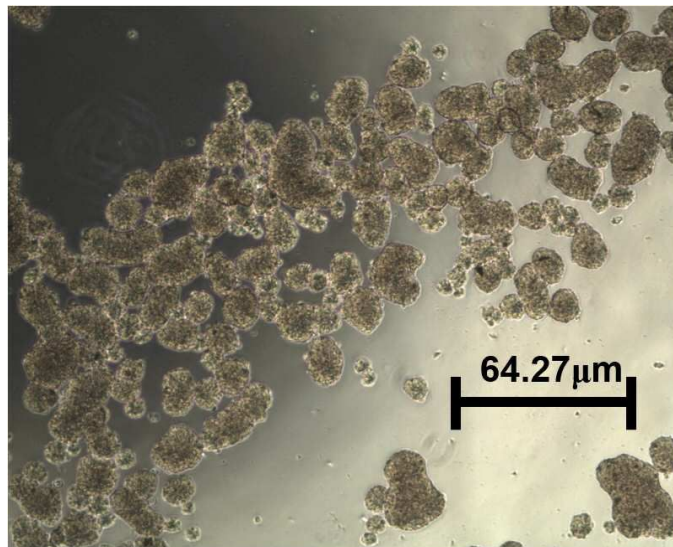
도면11f



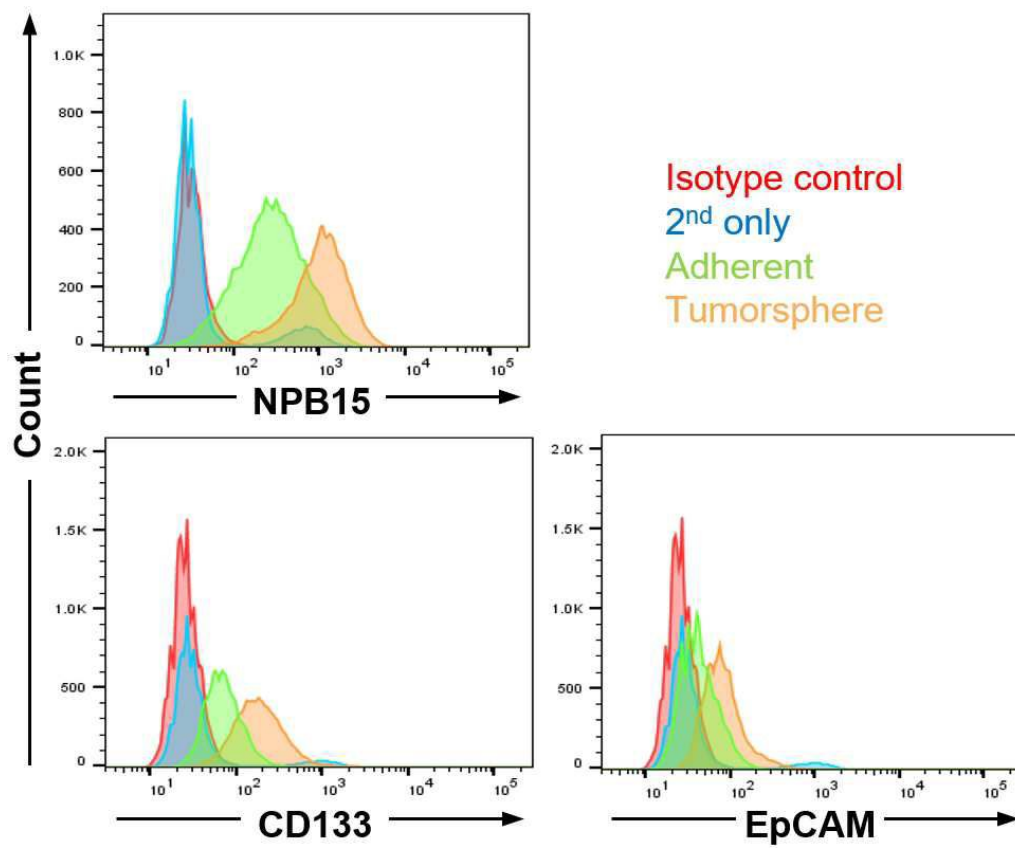
도면11g



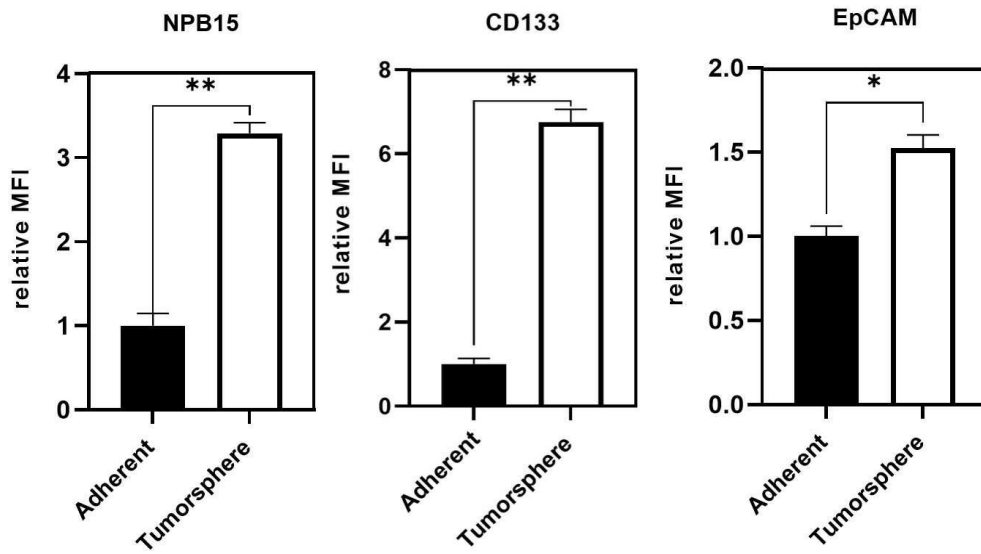
도면12a



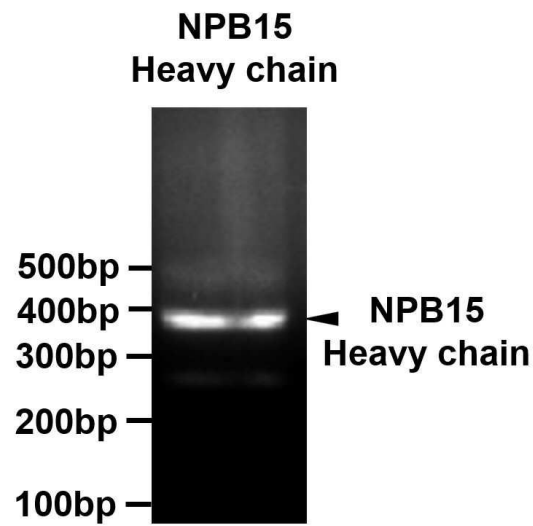
도면12b



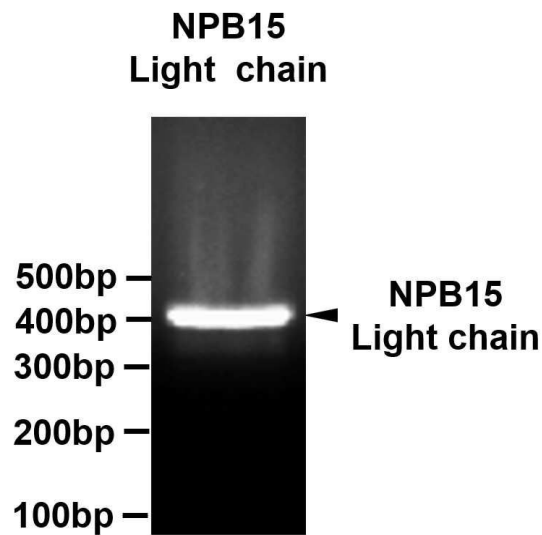
도면12c



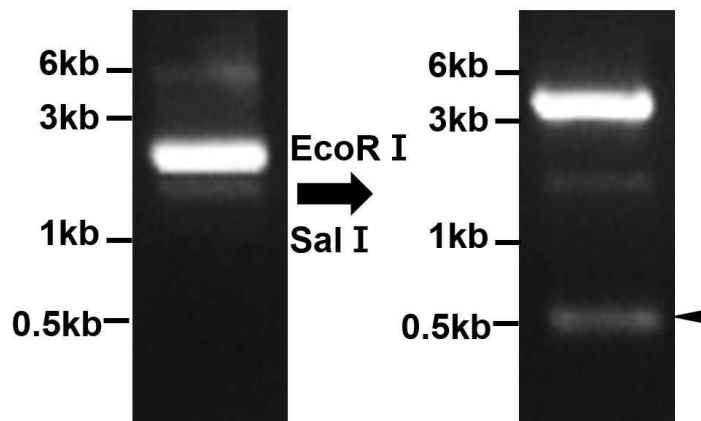
도면13a



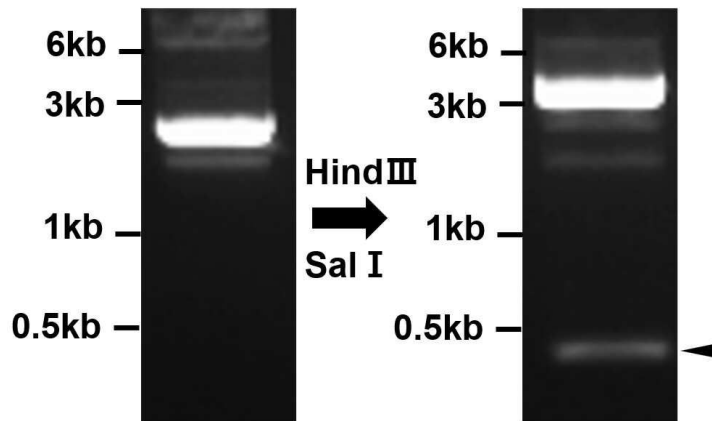
도면13b



도면13c



도면13d



도면14

Heavy chain of NPBl5 variable region : subgroup IV

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAG GTT CAG CTG CAG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC | 60 |
| Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu | 20 |

CDR-H1

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TCC TGT GCA GCC TCT <b>GGA TTC ACT TTC AGT GAC TAT TAC ATG TAT</b> TGG GTT CGC CAG ACT | 120 |
| Ser Cys Ala Ala Ser <b>Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr</b> Trp Val Arg Gln Thr | 40  |

CDR-H2

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CCG GAA AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA <b>ACC ATT AGT GAT GGA GGT AGT TAC GCC TAC TAT</b> | 180 |
| Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala <b>Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Ala Tyr Tyr</b> | 60  |

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>CCA GAC AAT ATG AAG GGG</b> CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GTG AGG AAC AAC CTG TAC | 240 |
| <b>Pro Asp Asn Met Lys Gly</b> Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Asn Leu Tyr | 80  |

CDR-H3

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA <b>GAT AGG</b> | 300 |
| Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg <b>Asp Arg</b> | 100 |

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>GCG TAT TAC TAC GGT AGT AGC TAC GGA TTT GCT TAC</b> TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT | 360 |
| <b>Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr</b> Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr | 120 |

|             |     |
|-------------|-----|
| GTC TCT GCA | 369 |
| Val Ser Ala | 123 |

도면15

Light chain of NPB15 : subgroup V

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| GAT | ATT | GTG | ATG | ACC | CAG | TCT | CCA | CTC | TCC | CTG | CCT | GTC | AGT | CTT | GGA | GAT | CAA | GCC | TCC | 60 |
| Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Ser | Leu | Gly | Asp | Gln | Ala | Ser | 20 |

CDR-L1

|     |     |     |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |     |
|-----|-----|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ATC | TCT | TGC | <b>AGA</b> | <b>TCT</b> | <b>AGT</b> | <b>CAG</b> | <b>AGC</b> | <b>CTT</b> | <b>CTA</b> | <b>CAC</b> | <b>AGT</b> | <b>AAT</b> | <b>GGA</b> | <b>AAC</b> | <b>ACC</b> | <b>TTT</b> | <b>TTA</b> | <b>CAT</b> | <b>TGG</b> | 120 |
| Ile | Ser | Cys | <b>Arg</b> | <b>Ser</b> | <b>Ser</b> | <b>Gln</b> | <b>Ser</b> | <b>Leu</b> | <b>Leu</b> | <b>His</b> | <b>Ser</b> | <b>Asn</b> | <b>Gly</b> | <b>Asn</b> | <b>Thr</b> | <b>Phe</b> | <b>Leu</b> | <b>His</b> | <b>Trp</b> | 40  |

CDR-L2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |            |            |            |            |            |            |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| TAC | CTG | CAG | AAG | CCA | GGC | CAG | TCT | CCA | AAG | CTC | CTG | ATC | TAC | <b>AAA</b> | <b>GTT</b> | <b>TCC</b> | <b>AAC</b> | <b>CGA</b> | <b>TTT</b> | 180 |
| Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | <b>Lys</b> | <b>Val</b> | <b>Ser</b> | <b>Asn</b> | <b>Arg</b> | <b>Phe</b> | 60  |

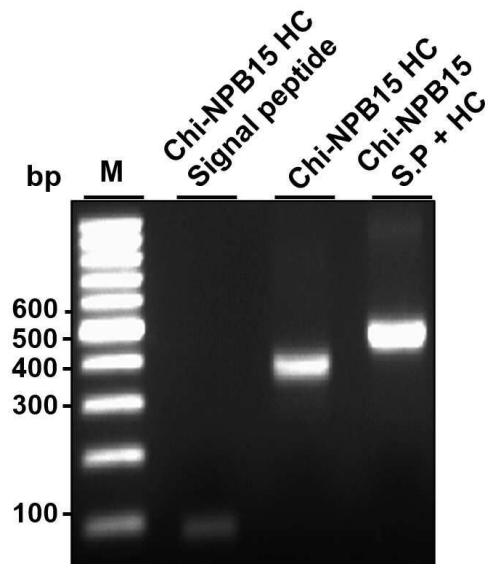
|            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>TCT</b> | GGG | GTC | CCA | GAC | AGG | TTC | AGT | GGC | AGC | GGA | TCA | GGG | ACA | GAT | TTC | ACA | CTC | AAG | ATC | 240 |
| <b>Ser</b> | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile | 80  |

CDR-L3

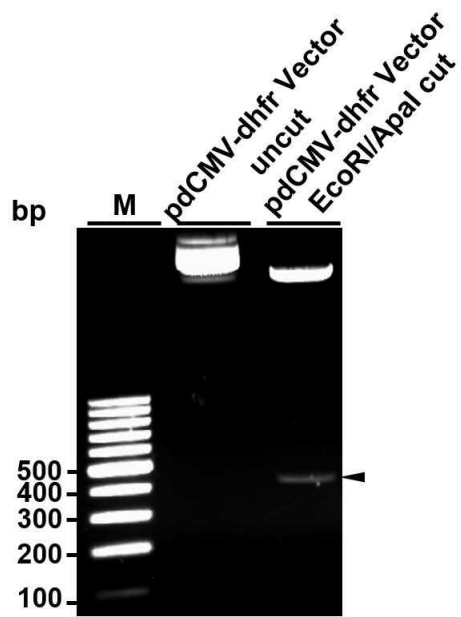
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |            |            |            |            |            |            |            |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| AGC | AGA | GTG | GAG | GCT | GAG | GAT | CTG | GGA | GTT | TAT | TTC | TGC | <b>TCT</b> | <b>CAA</b> | <b>AGT</b> | <b>ACA</b> | <b>CAT</b> | <b>GTT</b> | <b>CCG</b> | 300 |
| Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Leu | Gly | Val | Tyr | Phe | Cys | <b>Ser</b> | <b>Gln</b> | <b>Ser</b> | <b>Thr</b> | <b>His</b> | <b>Val</b> | <b>Pro</b> | 100 |

|            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>TAC</b> | <b>ACG</b> | TTC | GGA | GGG | GGG | ACC | AAG | CTG | GAA | ATA | AAA | CGG | 339 |
| <b>Tyr</b> | <b>Thr</b> | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | 113 |

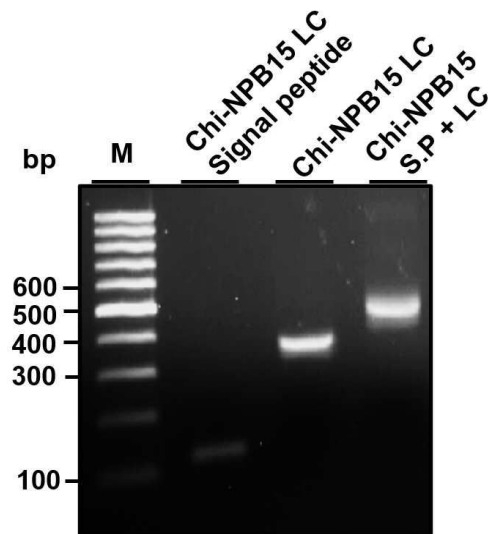
도면16a



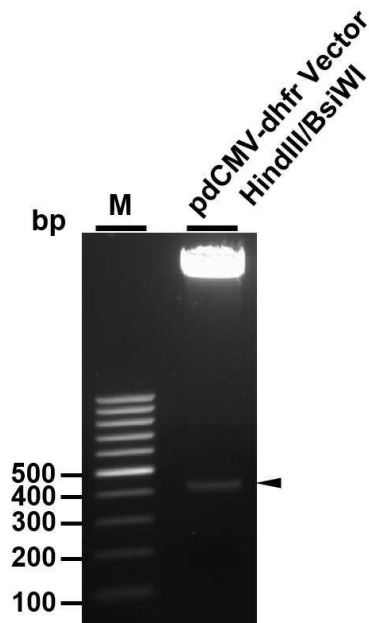
도면16b



도면16c



도면16d



도면17

Chimeric antibody Chi NPB15 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 G
G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S D Y Y M Y W V R Q T
P E K R L E W V A T I S D G G S Y A Y Y P D N M K G R F T I S
R D N V R N N L Y L Q M S S L K S E D T A M Y Y C A R D R A Y
Y Y G S S Y G F A Y W G Q G T L V T V S A 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 펩타이드 아미노산 서열

파란색: NPB15 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (mouse), 밑줄은 CDR

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

도면18

Chimeric antibody Chi NPB15 경쇄 아미노산 서열

```

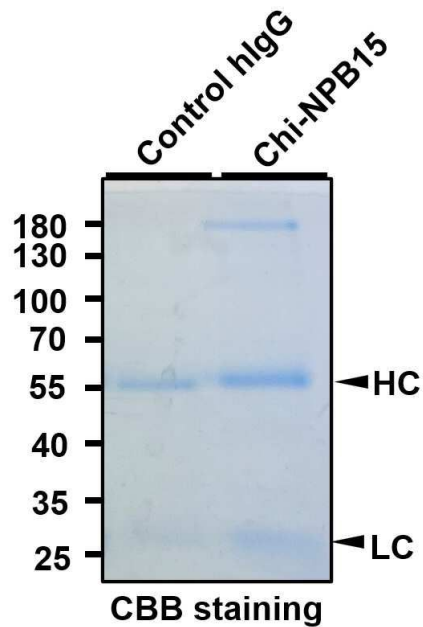
R H E Q T S M G I K M E T H S Q V F V Y M L L W L S G V E G D
I V M T Q S P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L L H S
N G N T F L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V
P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S
Q S T H V P Y T F G G G T K L E I K R T V A A P S V F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

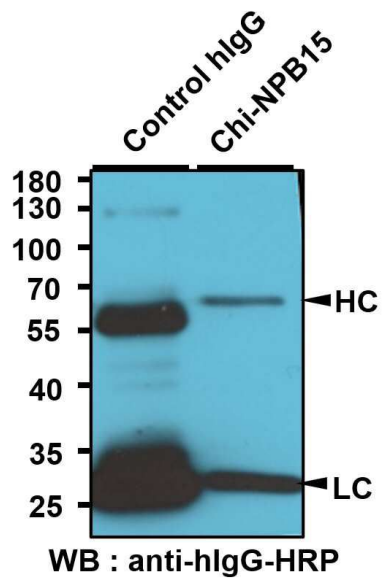
파란색: Chi NPB40 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (mouse), 밑줄은 CDR

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

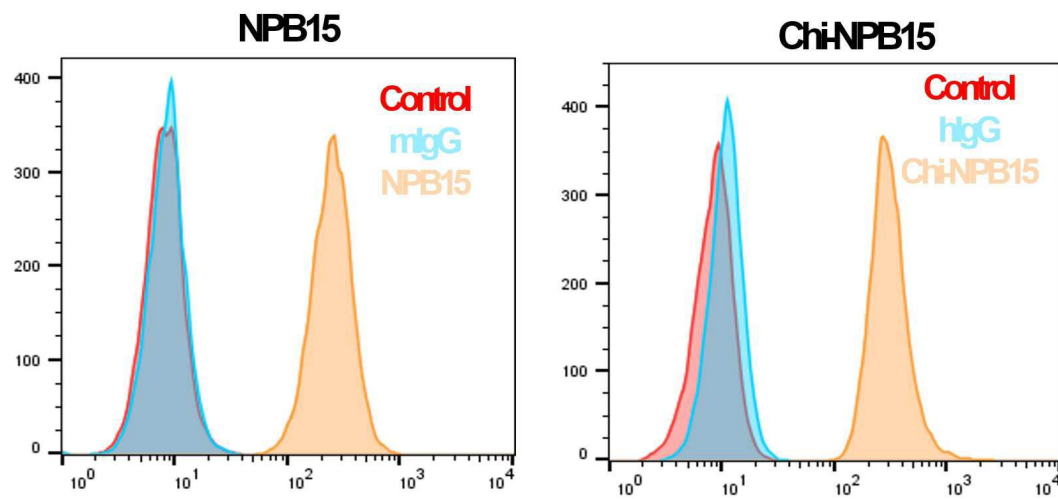
도면19a



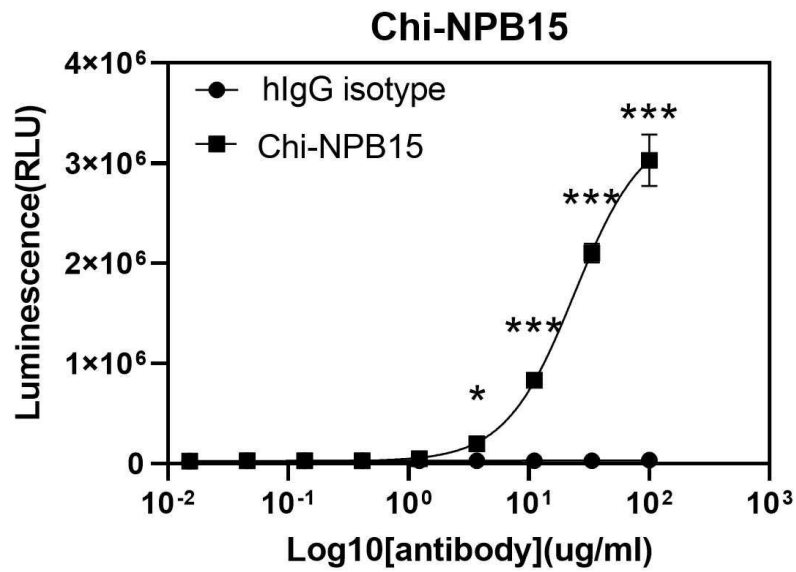
도면19b



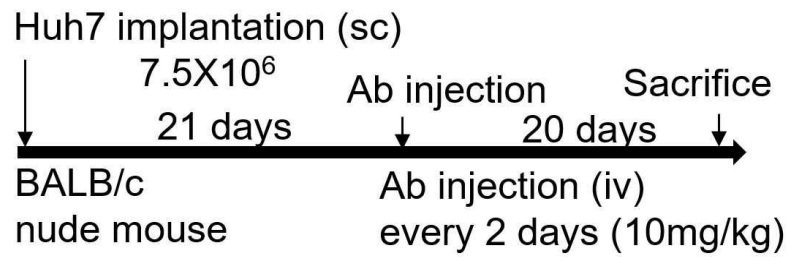
도면19c



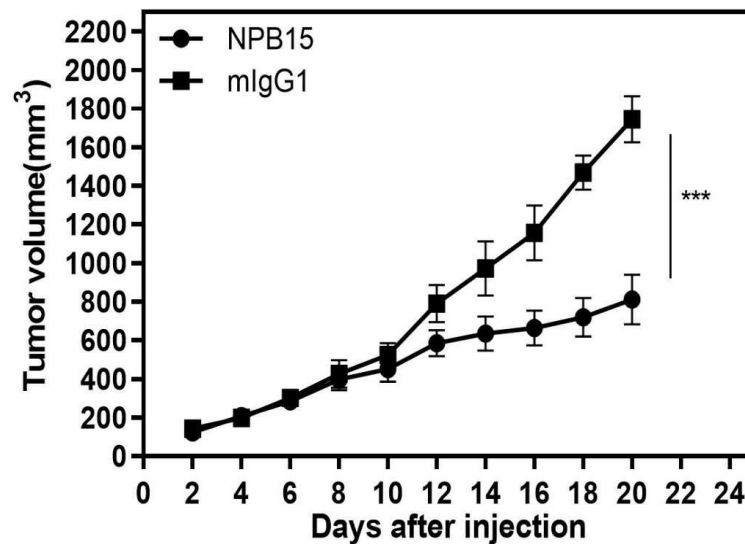
도면20



도면21a



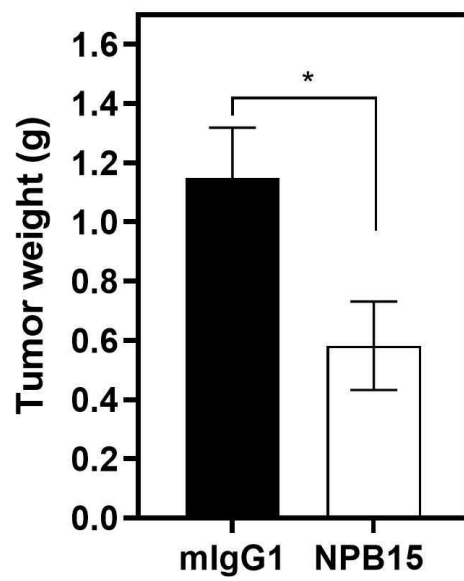
도면21b



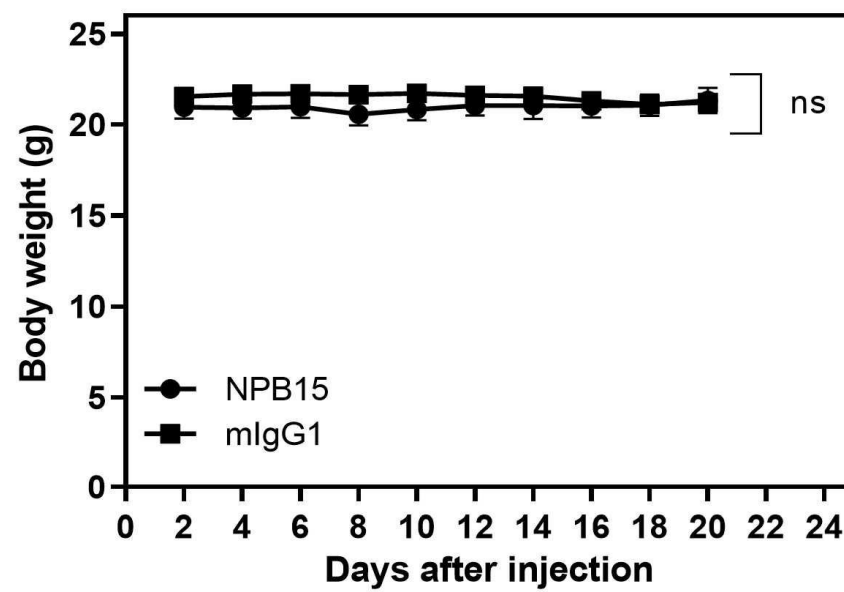
도면21c



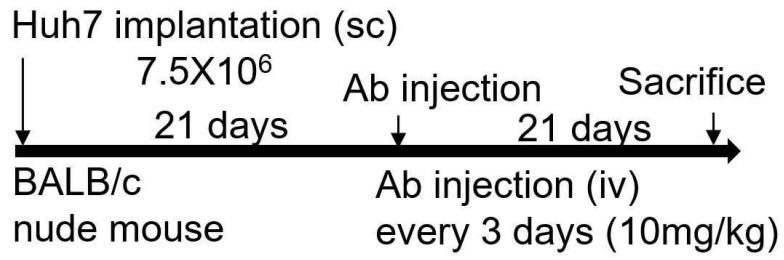
도면21d



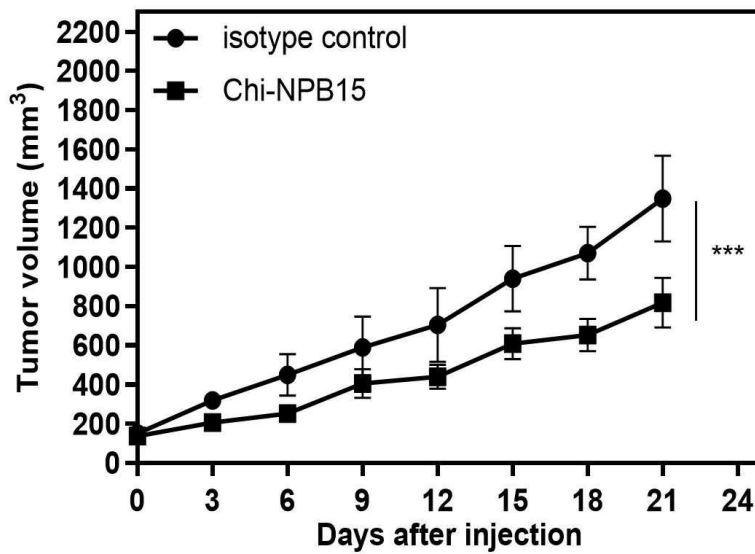
도면21e



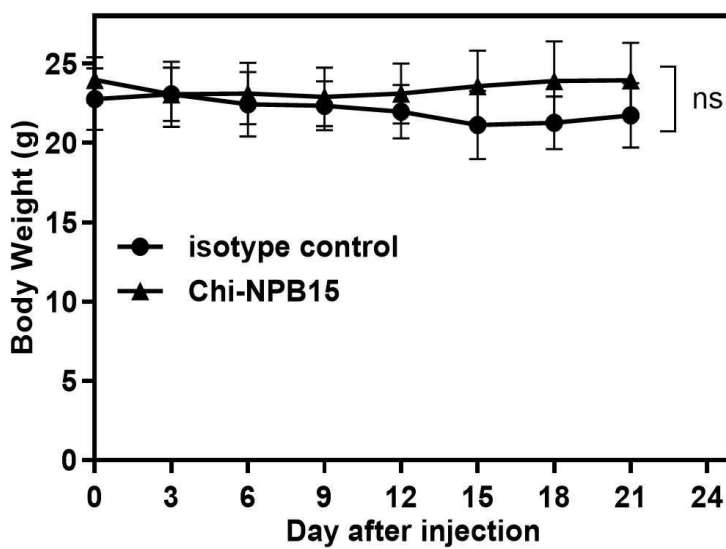
도면22a



도면22b



도면22c



## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.