



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0021139
(43) 공개일자 2025년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/16 (2006.01)

G01N 33/569 (2017.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/28 (2013.01)

C12N 5/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0100927

(22) 출원일자 2023년08월02일

심사청구일자 2023년08월02일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

한양대학교 산학협력단

서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)

(72) 발명자

류춘제

서울특별시 서초구 고무래로 35, 106동 3203호 (반포동, 반포리체아파트)

임근표

서울특별시 강동구 상암로3길 77, 103동 2004호 (암사동, 삼성 광나루 아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인리채

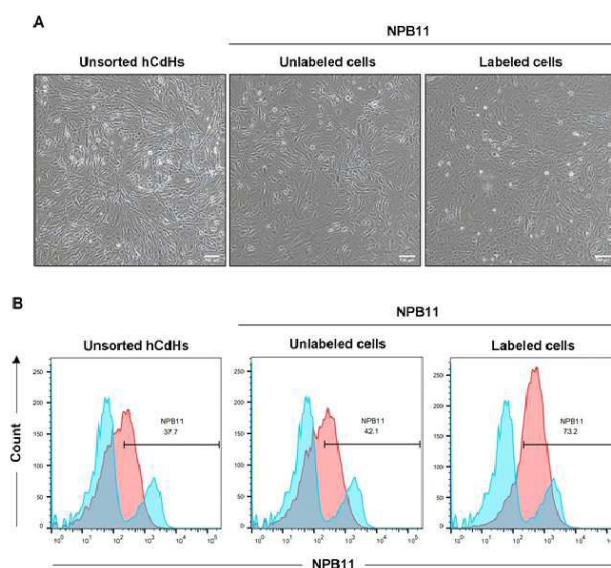
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 항 PODXL 단일클론항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 간 줄기세포 및 인간 암세포 표면의 PODXL에 특이적으로 결합하는 PODXL 항체, 이를 생산하는 하이브리도마, 이를 이용하는 인간만능줄기세포 또는 간 줄기세포의 검출용 조성물 및 암 진단용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 33/56966 (2013.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

(72) 발명자

최문주

서울특별시 중랑구 봉우재로43길 18 (상봉동)

한세인

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

최동호

서울특별시 강남구 도곡로43길 21, 101동 1303호 (역삼동, 래미안그레이트)

신지현

서울특별시 성동구 한림말길 10-14, 203호 (옥수동)

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 인간만능줄기세포유도 및 기전규명
기 여 율	51/100
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711177406
과제번호	21A0401L1-12
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명	범부처재생의료기술개발사업
연구과제명	차세대 간줄기세포 특이적 표면 마커발굴을 통한 분화유지 효율 향상 기술개발
기 여 율	49/100
과제수행기관명	한양대학교 산학협력단
연구기간	2022.02.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2) 및 서열번호 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 4의 경쇄 상보성 결정영역 1(LCDR1), 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2) 및 서열번호 6의 경쇄 상보성 결정영역 3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 PODXL 항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7의 서열을 갖는 것인, PODXL 항체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8의 서열을 갖는 것인, PODXL 항체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 PODXL은 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포의 표면 마커인, PODXL 항체.

청구항 5

청구항 1의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

청구항 5에 있어서, HCDR1을 인코딩하는 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드; HCDR2를 인코딩하는 서열번호 10의 폴리뉴클레오티드; HCDR3을 인코딩하는 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드; LCDR1을 인코딩하는 서열번호 12의 폴리뉴클레오티드; LCDR2을 인코딩하는 서열번호 13의 폴리뉴클레오티드; 및 LCDR3을 인코딩하는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

청구항 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.

청구항 9

청구항 1의 항체를 생산하는 하이브리도마.

청구항 10

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 PODXL이 발현된 세포 검출용 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 PODXL이 발현된 세포는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 암세포 및 간 줄기세포인, PODXL이 발현된 세포 검출용 조성물.

청구항 12

청구항 10의 조성물을 포함하는 PODXL이 발현된 세포 검출 키트.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 세포는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포인, PODXL이 발현된 세포 검출 키트.

청구항 14

청구항 1의 항체를 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 암은 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 인간배아암, 신경모세포종, 자궁암, 신장암, 전립선암, 유방암, 대장암, 위암, 담도암, 신장암, 방광암, 난소암 및 뇌종양으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 암 진단용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PODXL에 특이적으로 결합하는 단일클론항체에 대한 것이다.

[0002] 본 발명은 인간 만능줄기세포, 인간 간 줄기세포 및 간암을 포함하는 다양한 암세포 표면에 발현하는 PODXL을 인식하는 단일클론항체와 이 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마, 이 단일클론항체를 포함하는 진단키트 및 이 단일클론항체를 포함하는 인간 만능줄기세포와 인간 간 줄기세포 분리 또는 분석용 조성물과 항암 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 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 가지 다른 상태로 분류하고 수정란이 자궁에 착상하기 전과 후로 나뉘어서 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. James Thomson 박사팀과 Shinya Yamanaka 박사팀에 의해서 먼저 확립된 인간만능줄기세포는 준 만능성 (primed pluripotency) 줄기세포로 순수 만능성 (naive pluripotency)과 다른 특성을 보인다. 순수 만능줄기세포와 준 만능줄기세포는 세포모양, 성장속도, 분화능력, 메틸화 정도, 생식선 전승(germline transmission)능력 등에서 차이가 많은데, 준 상태는 크게 편평한 상태로 자라며 성장속도가 느리나, 쉽게 분화를 유도할 수 있으며, 순수 상태는 작은 돔(dome) 모양으로 자라며 트립신으로 단일세포로 떼어도 잘 자라고, 성장속도가 빠르며, 편중되지 않은 상태로 더 많은 세포로 분화능력이 기대되고, 생식선 전승능력이 더 좋은 만능줄기세포로 알려졌다. 준 만능줄기세포와 순수 만능줄기세포는 배양방법에 따라 서로 전환이 가능한데 배양법이 잘 확립된 준 인간만능줄기세포에서 LIF와 다양한 화학적 억제제를 이용하여 순수 인간만능줄기세포로 유도하는 배양방법이 많은 연구 그룹에 의해 보고되었다.

[0005] 인간 순수 만능줄기세포는 인간의 착상 전 배아를 연구할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 준 만능줄기세포와 비교할 때, 트립신 처리에 의한 단일세포배양이 가능하여 초보자도 배양하기 편하고, 유전자 편집(gene edition)이 쉬운 장점이 있어 실용화를 촉진할 수 있는 만능줄기세포로 기대된다. 하지만 아직 연구 초기단계로 인간 순수만능줄기세포 특성이 각각의 방법에 따라 서로 달라 정확한 순수 만능성 상태와 특성에 대한 표준화가 되어있지 않다. 따라서 각각의 배양방법에서 순수 상태, 준 상태, 중간 (intermediate) 상태 등이 혼재되어 있고 순수 상태 인간 만능줄기세포를 순수하게 분리하여 이용할 수 있는 마커 (marker)들에 대한 연구와 표준화가 필요한 상황이다. 영국 Cambridge대학의 Peter Rugg-Gunn 팀은 486종의 세포표면 마커를 인식하는 항체들을 사용하여 순수 상태와 준 상태 인간 만능줄기세포를 구별하여 인간 순수 만능줄기세포에서 양성인 CD7, CD75, CD77, 및 CD130 마커를 찾아냈다고 발표하였고, 현재 많은 연구그룹에서 인용하는 표면마커로 사용되고 있다.

[0006] Sialomucin의 CD34 계열의 구성원인 PODXL-like protein 1(PODXL)은 일반적으로 인간 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 초기 조혈전구세포, 성인 혈관 내피 및 신장 podocyte에서 발현하며 다양한 암의 진단 및 치료에서 중요한 분자이다. PODXL은 생쥐 및 인간 초기 발달에 필수적인 역할을 하며 유전자 녹다운 시 배아단계에서 사망을 초래한다. PODXL은 기능적으로 세포부착을 억제하고 이동성과 침습성을 향상시키는 역할을 한다. 다양한 암의 진행에 대한 PODXL의 임상적 의의가 연구되어 왔으며, 실제로 고환암에서 PODXL은 줄기세포 마커로 최초로 발견되었다. PODXL은 혈관내피세포와 신장 등 일부 정상적인 조직에서 발현하지만 대부분의 정상세포에서 거의 발현하지 않으며, 다양한 인간 종양에서는 비정상적으로 높게 발현하여 그 발현은 불량한 예후의 지표로 사용된다. 실제로 PODXL은 종양 세포의 이동성 및 침습성을 강화하여 전이를 촉진하는데 필수적인 역할을 한다. PODXL은 조혈 전구체 세포뿐만 아니라 AML, ALL등 백혈병 전구체세포에서 발현된다. PODXL은 비정상적 후생유전학적 변화로 인해 소세포폐암종(SCLC)에서 보편적으로 발현되며, 암줄기세포 표면 표지자로서 역할을 한다. PODXL은 또한 악성 교모세포종의 암줄기세포 마커로 알려저서 암세포의 줄기세포성에 관여하는 것으로 보인다. 따라서 PODXL은 대장암, 췌장암을 포함한 다양한 암세포의 진단 및 치료용 표적으로 평가받고 있으며 실제로 PODXL을 표적하는 항체를 이용한 면역 항암제 개발이 활발하다.

[0007] 간 이식은 만성 간 질환을 치료할 수 있는 유일한 치료법이다. 줄기세포를 이용한 재생 의학은 이러한 문제를 극복하기 위한 가장 유용한 기술로 여겨진다. 따라서 환자의 줄기세포를 이용하여 간 재생에 필요한 신세포를 생산하는 세포를 얻고자 하는 연구가 활발하다. 간 재생을 위한 간세포는 유도만능줄기세포(iPSCs), 직접 리프로그래밍된 세포 및 작은 간세포에서 유도할 수 있지만 만성 간 질환에 대한 확실한 치료 가능성에 대해서는 여전히 많은 연구가 필요한 실정이다. 최근에 설치류에서 화학 물질에 의해 유도된 간 전구세포는 다양한 종류의 간 질환에 대한 세포 치료 및 약물 검사를 개발할 수 있는 잠재적인 원천이 되고 있다. 상기와 같은 다양한 간 줄기세포 유형에 대한 특이적 마커들이 제시되고 있지만, 실제로 각각을 명확하게 구분할 수 있는 마커들이 알려진 바가 없다. 뿐만 아니라 이들은 대부분 동물 모델에서 얻은 결과들이기 때문에 인체 유래 세포에서는 증명하기 어려워 실제 인간 간세포 증식에 관한 연구는 제한적인 실정이다. 우리는 인체 유래 일차 간세포에다 저분자 화합물을 처리하여 증식 능력이 뛰어난 간 줄기세포로 전환하는 데 성공하였다. 하지만 모든 세포가 완전히 동일하게 전환된 상태가 아니므로 전체 세포군에서 간 줄기세포로 효율적으로 전환된 세포의 분리를 위해서는 간 줄기세포의 특이적인 표면 마커 발굴이 필수적이다. 하지만 아직까지 간 줄기세포를 순수하게 분리해낼 수 있는 마커가 발굴되지 않았다. 우리는 이 발명에서 만능줄기세포 표면분자들을 인식하는 단일클론항체 라이브러리를 사용하여 간 줄기세포를 분리할 수 있는 항체를 발굴하고자 하였다. 이런 발굴 전략은 간 재생에 중요한 간 줄기세포의 기원으로 초기 배아 발생에 중요한 역할을 하는 배아줄기세포가 간 발생 과정 이후에도 간에 남아 있다가 간 손상시 활성화되어 간세포를 재생하는 줄기세포이며 간세포 외에도 담도세포, 췌장, 내장 세포 등을 재

생하는 줄기세포로 기능하는 것이라는 가정에 기반한 것이다. 간 줄기세포는 성인 간에 남은 배아줄기세포의 배아 잔류물일 가능성이 있으며, 인간 배아줄기세포에 특이적인 항체 라이브러리를 사용하여 간 줄기세포에 특이적인 항체를 발굴할 수 있고 이 항체를 사용하면 간 줄기세포의 신규 표면 마커를 발굴해 낼 수 있기 때문이다.

[0008] 우리는 준 만능줄기세포에서 순수 인간만능줄기세포로 유도하고, 그 세포들을 직접 생쥐에 주사하여 순수 인간 만능줄기세포에 대한 단일클론항체 라이브러리를 제조하고 항체에 대한 항원을 분석하여 순수 인간만능줄기세포의 표면 마커를 발굴하였다. 그 결과로 제조한 NPB11 항체는 순수 인간만능줄기세포와 준 만능줄기세포에 동시에 결합하는 범 만능성 줄기세포 표면마커 특성을 보였다. NPB11의 항원은 인간 준 만능줄기세포를 분화를 유도할 경우 그 발현이 현저히 감소하고 정상세포인 말초혈액단핵구나 간세포에는 발현하지 않지만 간암세포를 비롯한 배아암세포와 폐암세포에서 높게 발현하였다. NPB11이 인식하는 항원을 분석한 결과 PODXL이었다. PODXL은 이미 TRA-1-60, TRA-1-81처럼 미분화 인간만능줄기세포 마커로 사용되고 있으며, NPB11 항체도 PODXL상의 시알릭산 당을 인식하는 새로운 항체로 범용적인 인간만능줄기세포 표면 마커로 사용할 수 있다. 또한 정상 간세포에서는 발현하지 않고 간암세포에서만 발현하는 PODXL 형태를 인식하여 간암을 포함한 다양한 암의 진단 및 치료용 항체로 사용이 가능하다. 또한 NPB11항체는 화합물로 유도한 간 줄기세포 혼합물에서 간 줄기세포를 효율적으로 선별할 수 있는 항체임이 증명되어 혼합물에서 간 줄기세포를 효율적으로 분리할 수 있는 항체로 사용할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2344948호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제2107602호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 간 줄기세포, 및 암세포 표면의 PODXL 단백질을 인식하는 단일클론항체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 PODXL 단일클론항체를 포함하는 인간만능줄기세포 또는 간 줄기세포를 분리하기 위한 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0013] 본 발명은 PODXL 단일클론항체를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 1. 서열번호 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2) 및 서열번호 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 4의 경쇄 상보성 결정영역 1(LCDR1), 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2) 및 서열번호 6의 경쇄 상보성 결정영역 3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 PODXL 항체.

[0016] 2. 위 1에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7의 서열을 갖는 것인, PODXL 항체.

[0017] 3. 위 1에 있어서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8의 서열을 갖는 것인, PODXL 항체.

[0018] 4. 위 1에 있어서, PODXL은 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포의 표면 마커인, PODXL 항체.

[0019] 5. 위 1의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

[0020] 6. 위 5에 있어서, HCDR1을 인코딩하는 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드; HCDR2를 인코딩하는 서열번호 10의 폴리뉴클레오티드; HCDR3을 인코딩하는 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드; LCDR1을 인코딩하는 서열번호 12의 폴리

뉴클레오타이드; LCDR2을 인코딩하는 서열번호 13의 폴리뉴클레오타이드; 및 LCDR3을 인코딩하는 서열번호 14의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

- [0021] 7. 위 5에 있어서, 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오타이드 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드.
- [0022] 8. 위 5의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 벡터.
- [0023] 9. 위 1의 항체를 생산하는 하이브리도마.
- [0024] 10. 위 1 내지 4 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 PODXL이 발현된 세포 검출용 조성물.
- [0025] 11. 위 10에 있어서, PODXL이 발현된 세포는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포인, PODXL이 발현된 세포 검출용 조성물.
- [0026] 12. 위 10의 조성물을 포함하는 PODXL이 발현된 세포 검출 키트.
- [0027] 13. 위 12에 있어서, 세포는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포인, PODXL이 발현된 세포 검출 키트.
- [0028] 14. 위 1의 항체를 포함하는 암 진단용 조성물.
- [0029] 15. 위 14에 있어서, 암은 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 인간배아암, 신경모세포종, 자궁암, 신장암, 전립선암, 유방암, 대장암, 위암, 담도암, 신장암, 방광암, 난소암 및 뇌종양으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 암 진단용 조성물.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 PODXL 항체는 순수 및 준 인간 만능줄기세포에 동일한 정도로 결합하지만 분화된 세포에는 결합하지 않는 범용적인 미분화 만능줄기세포 선별용으로 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 PODXL 항체는 PODXL을 발현하는 많은 암에서 진단 용도로 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 PODXL 항체를 이용하여 화합물 유래 간 줄기세포를 선별할 수 있다. 간 줄기세포는 고효율의 간세포와 담즙 상피세포로 분화할 수 있는 이분화능을 가지고 있어 간 재생을 위한 간 줄기세포의 공급원으로 제공될 수 있고 간 질환 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1의 A는 준 인간만능줄기세포(primed H9)를 2i/L/F/A배지에서 유도한 후 작은 덩어리의 순수 인간만능줄기세포(naive H9 (2i/L/F/A))로 전환된 모양을 보여준 것이다.
- 도 1의 B는 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry) 분석을 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 1의 C는 NPB11 하이브리도마 세포배양액을 Protein G agarose bead를 이용한 친화성 크로마토그래피 방법을 통해 NPB11항체를 정제한 그림으로 도면의 왼쪽은 전기영동 후 PageBlue 염색을 통하여 확인한 것이고, 도면의 오른쪽은 웨스턴 블라팅후에 NPB11항체를 mIgG-(H+L)-HRP 2차 항체를 이용하여 확인한 것이다. 여기서 mIgG은 공지의 mouse Immunoglobulin, HC는 immunoglobulin heavy chain, LC는 immunoglobulin light chain을 의미한다.
- 도 1의 D는 순수만능줄기세포 (naive H9 (2i/L/F/A))를 면역주사하여 만든 단일클론항체중에서 NPB11항체의 준 인간만능줄기세포 (primed H9), 순수 인간만능줄기세포 (naive H9 (2i/L/F/A)), 생쥐 배아섬유아세포(MEF), 10^{-5} M Retinoic acid (RA-H9)를 7일 처리하여 분화를 유도한 H9 세포에 대한 결합정도를 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)로 확인한 것이다.

도 2의 A는 인간배아암세포(NT-2/D1, 2102Ep), 간암세포(Huh7, HepG2, SNU387, SNU449, PLC/PRF/5, SK-Hep1), 비소세포폐암세포(A549, NCI-H460), 말초혈액단핵구(PBMC)에 대한 NPB11 결합정도를 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)로 확인한 것으로, 핑크색 바탕은 음성 대조군이고 하늘색은 NPB11이 결합하는 정도를 나타낸 것이다.

도 2의 B는 화합물 유래 인간 간 줄기세포 (human CdHs, hCdHs)와 정상 인간 간세포(Human Hepatocytes)에 대해 음성대조군 항체 (mIgG isotype)와 NPB11의 결합정도를 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)로 분석한 것으로, 핑크색은 음성 대조군이고 하늘색은 NPB11이 실제로 결합한 정도를 나타낸 것이다.

도 3의 A 및 B는 바이오틴으로 세포표면을 표지한 NT-2/D1 (A), A549세포 (B)를 NPB11로 면역침강 후 SDS-PAGE Gel에서 전개하고, 니트로셀룰로오즈 막으로 옮긴 후 streptavidin-horse raddish peroxidase(SA-HRP)로 NPB11 항원의 크기를 확인한 것이다.

도 3의 C는 A549 세포를 NPB11로 면역 침강 후 CBB 염색을 한 뒤 LC-MS/MS 분석을 진행하기 위해 목표하는 항원의 크기를 표시한 것이다.

도 3의 D는 LC-MS/MS 결과로 얻은 펩타이드 서열이 PODXL-like protein 1(PODXL)의 아미노산 서열과 일치하는 부분을 표시한 것이다.

도 4의 A는 바이오틴으로 세포표면 분자만 표지한 A549세포를 NPB11로 면역침강 후 SDS-PAGE Gel에서 전개한 후 니트로셀룰로오즈 막으로 옮긴 후 공지의 상업적 항-PODXL 항체로 웨스턴 블랏팅하여 NPB11가 면역 침강한 항원이 항-PODXL 항체에 인식됨을 확인한 것이다.

도 4의 B는 A와 동일한 막을 SA-HRP로 분석하여 NPB11 항원이 세포표면 항원임을 확인한 것이다.

도 4의 C는 A549 세포와 NT-2/D1 세포를 siPODXL를 이용하여 녹다운 후 NPB11의 항원의 발현 양 감소를 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry) 분석으로 확인한 것이다.

도 4의 D 및 E는 HEK293T세포에 FLAG Tag를 가진 PODXL-FLAG 발현백터를 외부형질도입 시켜준 뒤, Input, Control mouse IgG, NPB11, 항-PODXL와 항-FLAG로 각각 면역 침강 후 항-PODXL과 항-FLAG로 동일한 위치에서 항원이 확인되는 것을 확인하여 NPB11가 직접 PODXL을 인식하여 면역 침강한다는 것을 확인한 그림이다. 빨간 화살표는 면역침강된 PODXL을 가르킨다.

도 5의 A는 SK-Hep1세포 용해액을 Neuraminidase (neu) 또는 O-glycosidase (O-gly)를 처리하여 시알릭산 (sialic acid) 당을 포함하는 당들을 제거한 후 Enzyme-linked lectin adsorption ELISA assay를 통해 시알릭산 당의 제거 정도를 biotin이 결합되어 있는 렉틴과 streptavidin-HRP를 사용하여 정량적으로 분석한 결과이다 (** $p < 0.0001$; ns, not significant을 의미한다).

도 5의 B는 SK-Hep1 세포를 Neuraminidase (neu) 또는 O-glycosidase (O-gly)를 처리하여 시알릭산 (sialic acid) 당을 제거 후 세포를 용해하고 용해액을 SDS-PAGE 겔에서 분석하고 웨스턴 블랏팅 후에 바이오틴이 연결된 Sambucus Nigra Lectin를 이용하여 시알릭산 당에 결합정도를 분석한 것이다. 세포용해액에서 α -tubulin을 웨스턴으로 분석하여 같은 양의 단백질을 사용했음을 보여준 것이다.

도 5의 C는 도 5의 B처럼 세포를 Neuraminidase (neu) 또는 O-glycosidase(O-gly)를 처리하여 당을 제거한 세포에 대한 NPB11의 결합력을 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)로 분석한 것이다.

도 5의 D는 상대적인 결합력을 보여주는 MFI값으로 도 5의 C의 결과를 통계 처리한 결과이다 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns, not significant을 의미한다).

도 6의 A는 인간 간세포로부터 화합물을 처리하여 세포분화 과정에서 0일, 7일 동안 배양된 인간 간세포의 형태학적 변화를 나타낸 것이다. 스케일 바는 100 μm 이다.

도 6의 B는 화합물 처리 조건에서 0일, 7일 동안 배양된 인간 간세포에서 간 줄기세포 마커의 상대적 유전자 발현 수준의 정량적 비교 결과(데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로 나타냄)를 나타낸 것이다.

도 7은 화합물 유래 인간 간 줄기세포 (hCdHs), 섬유화된 화합물 유래 간 줄기세포 (Fibrotic hCdHs), 마우스 기원 화합물 유래 간 줄기세포 (mCdHs), 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs), 인간 일차 간세포 (human Primary Hepatocytes, hPHs), 마우스 일차 간세포 (Mouse Primary Hepatocytes, mPHs), 인간 진피 섬유화 세포 (Human Dermal Fibroblasts, HDF),

인간 신생아 표피 섬유화 세포 (Neonatal Human Foreskin Fibroblasts, hNuFF)에 대해 NPB11 항체를 이용한 면역세포화학 분석 결과(스케일 바=50 μ m)를 나타낸 것이다.

도 8의 A는 화합물 유래 간 줄기세포를 NPB11에 의해 분리된 음성/양성 세포군의 형태학적 변화 (스케일 바=100 μ m)를 나타낸 것이다.

도 8의 B는 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry) 분석을 통해 본 발명의 단일클론항체 NPB11으로 분리된 화합물 유래 간 줄기세포의 분리 효율을 나타낸 것으로, 하늘색은 음성 대조군, 핑크색은 NPB11 결합한 정도를 나타낸다.

도 9는 NPB11에 의해 분리된 음성/양성 세포군에서 간 줄기세포 마커의 상대적 유전자 발현 수준의 정량적 비교 결과(데이터는 평균±표준 편차로 나타냄)를 나타낸 것이다 (** p<0.01; **** p<0.0001을 의미한다).

도 10의 A는 NPB11 중쇄를 PCR로 증폭한 결과를 아가로스젤에서 확인한 것이다.

도 10의 B는 NPB11의 경쇄를 PCR로 증폭한 결과를 아가로스젤에서 확인한 것이다.

도 10의 C는 NPB11 중쇄 클로닝을 확인하기 위해 중쇄가 클로닝된 pBluescript KS+ 벡터를 EcoRI 과 Sal I 제한효소를 처리하여 절단한 결과이다.

도 10의 D는 NPB11 경쇄 클로닝을 확인하기 위해 경쇄가 클로닝된 pBluescript KS+ 벡터를 HindIII 과 Sal I 제한효소를 처리하여 절단한 결과이다.

도 11은 단일클론항체 NPB11 중쇄 유전자 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)를 진한 글씨로 표시한 그림이다.

도 12는 단일클론항체 NPB11 경쇄 유전자 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)를 진한 글씨로 표시한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 본 발명은 서열번호 1의 중쇄 상보성 결정 영역 1(Heavy chain Complementary Determine Region 1, HCDR1), 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2) 및 서열번호 3의 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 4의 경쇄 상보성 결정영역 1(Light chain Complementary Determine Region 1, LCDR1), 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2) 및 서열번호 6의 경쇄 상보성 결정영역 3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 PODXL 항체에 관한 것이다.
- [0037] PODXL은 포도칼릭신-유사 단백질 1(Podocalyxin like protein 1)을 의미한다. 본 발명에서 'PODXL 항체'는 PODXL 단백질을 항원으로 인식하는 항체를 의미하며 '항-PODXL 항체' 및 'PODXL 단일클론항체'도 같은 의미이다.
- [0038] 'PODXL 항체'에는 상보성 결정 부위(CDR)가 동일한 IgG1 내지 IgG4의 IgG 서브클래스(subclass)의 형태뿐만 아니라, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등의 항체 분자의 기능적 단편도 포함한다.
- [0039] 'PODXL 항체'에는 키메라 항체, 인간화 항체 등이 포함된다.
- [0040] 'NPB11 항체'는 PODXL 항체의 일 실시예이다.
- [0041] PODXL 항체는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 간 줄기세포 및 암 세포의 표면의 PODXL 단백질에 결합한다.
- [0042] 순수 인간만능줄기세포(naive human pluripotent stem cell)는 착상 전의 인간만능줄기세포를 의미하는 것으로, naive 또는 ground 상태의 만능성을 가진다. 착상 후의 인간만능줄기세포는 준(primed) 상태의 만능성을 가지는 준 인간만능줄기세포(primed human pluripotent stem cell)이다.
- [0043] 순수 인간만능줄기세포는 도 1의 A와 같이 작은 둥근 모양으로 개별 세포들이 분리되어 성장한다. 콜로니와 유사한 형태로 성장하는 준 만능줄기세포와 구별된다. 순수 인간만능줄기세포를 보다 세분할 경우 ground 상태의 줄기세포와 중간 단계인 intermediate, formative 또는 naive-like 상태의 줄기세포로 나눌 수 있다.
- [0044] 간 줄기세포는 일차 간세포(human primary hepatocytes, hPHs)에 특정 화합물을 처리하여 간세포로 분화될 수 있도록 역분화된 줄기세포를 의미한다. 간 줄기세포는 인간 화합물 유래 간 줄기세포(human chemically derived

hepatic progenitors, hCdHs)라고 할 수도 있다.

[0045] 암 세포는 PODXL을 세포 표면에 발현하는 것이면 특별히 제한되지 않는다. 예컨대 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 인간배아암, 신경모세포종, 자궁암, 신장암, 전립선암, 유방암, 대장암, 위암, 담도암, 신장암, 방광암, 난소암, 뇌종양 등이 있다.

[0046] 본 발명의 PODXL 항체는 서열번호 1 내지 6의 중쇄 및 경쇄 CDR을 가지면 그 외의 서열은 특정의 것으로 한정되지 않는다. 예컨대 본 발명의 항체의 중쇄 서열은 서열번호 7의 중쇄 가변영역의 서열(도 11)을 포함하는 것일 수 있고, 본 발명의 항체의 경쇄 서열은 서열번호 8의 경쇄 가변영역의 서열(도 12)을 포함하는 것일 수 있다.

[0047] 서열번호 1 내지 8의 아미노산 서열은 표 1 과 같다.

표 1

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

[0049] 단일클론항체는 단일 항원성 부위(단일 에피토프)에 특이적 결합을 하는 단백질 분자이다. 본 발명의 단일클론항체는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 간 줄기세포 및 암세포의 세포 표면 분자인 PODXL에 특이적으로 결합한다.

[0050] 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 기여한다.

[0051] 본 발명은 PODXL 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0052] '폴리뉴클레오티드'는 '핵산', '핵산 분자' 및 '올리고뉴클레오티드'와 상호 교환적으로 사용된다.

[0053] 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 형태나 이중 가닥 나선의 리보뉴클레오사이드(아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘) 또는 데옥시리보뉴클레오사이드(데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시티민 또는 데옥시시티딘)의 인산 에스테르의 중합체 또는 포스포로티오에이트 및 티오에스테르와 같은 이의 임의의 인산 에스테르 유사체를 포함한다.

[0054] 이중 나선 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 나선이 가능하다. DNA 또는 RNA 분자는 이 분자들의 일차 및 이차 구조만을 지칭하며 어느 특정 삼차 형태에 제한되지 않는다.

[0055] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 HCDR1을 인코딩하는 서열번호 9의 폴리뉴클레오티드; HCDR2를 인코딩하는 서열번호 10의 폴리뉴클레오티드; HCDR3을 인코딩하는 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드; LCDR1을 인코딩하는 서열번호 12의 폴리뉴클레오티드; LCDR2를 인코딩하는 서열번호 13의 폴리뉴클레오티드; 및 LCDR3을 인코딩하는 서열번호 14를 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0056] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 중쇄 가변영역을 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드 및 경쇄 가변영역을 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0057] 서열번호 9 내지 16의 폴리뉴클레오티드 서열은 표 2와 같다.

표 2

[0058]

서열번호	폴리뉴클레오티드 서열
9	GGA TTC ACT TTC AGT AAC TAT GTC ATG TCT
10	ACC ATT AGT GGT AGT GAA AAT TAC ATG TAT TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGT
11	CAT GCT GGT TAC TAC GAA GGG GAA GGT ATG GAC TAC
12	AGG GCC AGC CAA AGT ATT AAC AAC AAC CTC CAC
13	TAT GCT TCC CAG TCC ATC TCT
14	CAA CAG AGT GAC AGC TGG CCT CTC ACG
15	GAA GTA AAG CTG GAG CAG TCA GGG GGA GAC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GTA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AAC TAT GTC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCG GAA AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT GGT AGT GAA AAT TAC ATG TAT TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGT CGA TTC AAC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATG TAT CAC TGT GCA AGA CAT GCT GGT TAC TAC GAA GGG GAA GGT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA
16	GAT ATT GTG ATG ACA CAA TCT ACA GCC ACA CTG TCT GTG ACT CCA GGA GAT AGC GTC AGT CTT TCC TGC AGG GCC AGC CAA AGT ATT AAC AAC AAC CTC CAC TGG TAT CAA CAA AAA TCA CAT GAG TCT CCA AGG CTT CTC ATC AAG TAT GCT TCC CAG TCC ATC TCT GGG ATC CCC TCC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA AAT TTC ACT CTC AGT ATC AGC GGT GTG GAG ACT GAA GAT TTT GGA ATG TAT TTC TGT CAA CAG AGT GAC AGC TGG CCT CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTA GAG CTG AAA CGG

[0059] 본 발명은 PODXL 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0060] '벡터'는 핵산을 시험관 내(in vitro), 생체 외(ex vivo) 또는 생체 내(in vivo) 세포로 도입하기 위한 바이러스성 및 비바이러스성 운반체를 포함한다.

[0061] 본 발명은 PODXL 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.

[0062] 하이브리도마는 2개의 다른 종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 세포이다. 하이브리도마는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 등 세포 융합을 일으키게 하는 물질이나 어떤 종의 바이러스를 사용하여 둘 이상의 동종 세포나 이종 세포가 융합되어 각기 다른 세포가 갖는 다른 기능을 하나의 세포 속에 통합시킨 세포 또는 세포주를 의미한다. 하이브리도마에는 하이브리도마 세포 또는 하이브리도마 세포주가 포함된다.

[0063] 본 발명의 일 실시예는 단일클론항체 NPB11을 생산하는 하이브리도마이다. 이는 2×10^6 개의 H9 준 인간만능줄기세포와 같은 수의 H9 순수 인간만능줄기세포를 마우스의 오른쪽과 왼쪽 발바닥에 각각 주입한 후, 마우스의 왼쪽 림프절 세포와 FO 미엘로마 세포를 융합하여 제조할 수 있다. 하이브리도마는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양될 수 있다.

[0064] 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나 통상의 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 정제 방법으로는 예컨대 겔 전기 영동, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등이 있다.

[0065] 본 발명의 일 실시예에서는 하이브리도마의 배양 배지를 단백질 G-아가로스 비즈를 이용한 친화성 크로마토그래피로 정제할 수 있다.

[0066] 본 발명은 PODXL 항체를 포함하는 PODXL이 발현된 세포 검출용 조성물을 제공한다.

[0067] PODXL이 발현된 세포란 어떠한 세포든지 본 발명의 PODXL 항체가 인식가능한 항원인 PODXL 단백질이 세포 표면에 발현된 세포를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 간 줄기세포 및 암세포에 결합하는 항체를 제조하였고, 이 항체의 항원이 PODXL인 것을 확인하였다. 본 발명의 PODXL 항체가 세포 표면의 PODXL을 인식하여 이와 결합하므로 항원-항체 반응에 의해 PODXL이 발현된 세포를 검출할 수 있다.

[0068] 본 발명은 PODXL 항체를 포함하는 PODXL이 발현된 세포 검출 키트를 제공한다.

[0069] 본 발명의 항체 및/또는 항체를 포함하는 조성물은 항원-항체 복합체 반응을 통해 이식될 또는 이식된 세포 중

의 인간만능줄기세포 또는 간 줄기세포를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라, 인간만능줄기세포 또는 간 줄기세포를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.

[0070] 검출 키트는 본 발명의 PODXL 항체 및 면역학적 분석에 사용되는 통상적인 도구, 시약 등을 포함한다. 통상적인 도구, 시약은 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0071] 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는 PBS 등의 완충액과 같은 가용성 담체; 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합과 같은 불용성 담체일 수 있다.

[0072] 항원-항체 복합체 형성은 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블랏팅(Western Blotting), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

[0073] 본 발명은 PODXL 항체를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다. PODXL 항체는 암세포의 PODXL 단백질에 특이적으로 결합하고, PODXL 단백질은 다양한 암세포에서 과발현되는 양상을 보이므로 대상 세포에서 PODXL 항원이 확인되면 해당 세포는 암세포일 확률이 높다.

[0074] PODXL 항체를 포함하는 조성물을 PODXL을 발현하는 암세포에 처리하면 PODXL 항체는 암세포의 PODXL 항원과 결합하여 항원-항체 복합체를 형성하므로 PODXL 항체에 결합하는 암세포와 PODXL 항체에 결합하지 않는 정상 세포로 분류할 수 있다.

[0075] 이하 본 발명을 실시예로 보다 구체적으로 설명한다.

[0077] 실시예 1. 인간 만능줄기세포의 배양 및 순수 인간 만능줄기세포의 확립

[0078] 인간 준 만능줄기세포 (primed human pluripotent stem cell. Primed hPSC) H9은 Wicell Research Institute에서 제공한 프로토콜에 따라 기존에 기술된 방법에 따라 배양하였다 (Choi et al., PLoS One. 17(6):e0269547). 먼저 임신한 CF1 생쥐의 배아 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast, MEF)를 적출 및 배양하여 γ -조사(γ -irradiation) 또는 mitomycin (10 μ g/ml) 처리한 후에 지지 세포(feeder cell)로 사용하였다. 20%(v/v) KOSR (knockout serum replacement), 1%(v/v) NEAA, 0.1mM β -mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin-G, 100 μ g/ml streptomycin, 8~12ng/ml bFGF를 첨가한 DMEM/F12 (Invitrogen) 배지에서 배양하였고, 5~6일마다 계대 배양시에는 콜라게나아제 IV (1mg/ml)로 5분 간 처리 후에 황색 틱으로 적절한 크기로 자른 후 새로운 지지 세포 위에서 배양하였다. 준 인간만능줄기세포 H9(primed hPSC)를 이용하여 순수 인간만능줄기세포 (naive hPSC)로 전환을 유도하여 배양하였으며 구체적인 프로토콜은 기존에 공지된 방법에 따랐다. 먼저 준 인간만능줄기세포 H9을 콜라게나아제 IV (1 mg/ml)로 5분 간 처리하고, 황색 틱을 이용하여 적절한 크기로 자른 후에 미리 깔아 둔 MEF 위에 옮겼다. 다음날 2i/L/F/A 배지(1 μ M PD0325901, 3 μ M CHIR99021, hLIF(1000U/ml), 10 μ M Forskolin, Ascorbic acid(50ng/ml), bFGF(16ng/ml), 20% KOSR, KO-DMEM, 1% L-glutamine, 1% NEAA, 0.1mM β -mercaptoethanol, 1x penisillin/streptomycin) (Duggal et al. Stem Cells 33:2686,2015)에서 배양하였다. 배양 후 3~5일 이내에 돔 모양의 세포로 변하였고, 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 μ M Y-27632 (Tocris)을 처리하였다. 그 결과 편평하게 자라는 배양된 준 인간만능줄기세포 모양과 비교하여 작은 돔 모양으로 자라는 순수 인간 만능줄기세포들을 볼 수 있었다 (도 1의 A). 순수 인간만능줄기세포를 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)로 분석해본 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 1의 B). 이렇게 확립한 순수만능줄기세포를 사용하여 항체 라이브러리를 제조하기 위한 면역주사 실험에 사용하였다.

[0080] 실시예 2. NPB11 하이브리도마 제조

[0081] 2-1. 순수 인간만능줄기세포에 특이적 항체 제조를 위한 면역 주사

[0082] 순수 인간만능줄기세포에 대한 단일클론항체를 제조하기 위해 생쥐 발바닥에 만능줄기세포들을 면역주사하였으며 구체적인 프로토콜은 기존에 잘 기술된 방법에 따랐다. 먼저 6주 된 11 마리의 암컷 Balb/c 생쥐 오른쪽 발바닥에 2×10^6 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 근육조직을 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 2×10^5 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 하이브리도마 만을 선별하였다.

[0084] 2-2. NPB11 하이브리도마의 클로닝 및 인간만능줄기세포 결합분석

[0085] 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 $2 \mu\text{g/ml}$ 로 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 $100 \mu\text{l}$ 을 첨가해 37°C 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_2O_2 가 포함된 기질 용액을 첨가한 후 492nm에서 흡광도를 측정하여 항체를 생산하는 클론을 먼저 선별하였다. 다음으로 각 클론의 배양액을 가지고 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry) 분석으로 먼저 순수 인간만능줄기세포에 결합하는 하이브리도마들을 선별하였고 이들 중에서 준 인간만능줄기세포와 순수 인간만능줄기세포에 동시에 결합하는 하이브리도마들을 추가로 선별하였으며 서브클로닝을 반복하여 안정적인 클론을 확보하였다. 이들 중에서 항체 NPB11은 Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit (BD Biosciences)를 사용하여 isotyping을 수행한 결과 IgG2b와 κ 사슬을 가진 단일클론항체로 분류되었다.

[0086] 이후 NPB11 하이브리도마 세포배양액을 사용하여 Protein G agarose bead를 이용한 NPB11항체를 대량 정제하여 모든 실험에 사용하였다. 이를 위해 수집한 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 PageBlue염색법을 통해 정제한 NPB11항체의 순도를 확인하였다 (도 1의 C 왼쪽). 이렇게 정제한 항체를 웨스턴 블라팅으로 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 NPB11이 잘 정제되었음을 확인하였다 (도 1의 C 오른쪽).

[0087] 정제한 단일클론항체 NPB11의 인간만능줄기세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 구체적으로, 준 H9과 순수 H9 세포를 콜라게나아제 IV($1\mu\text{g/ml}$)를 이용하여 5분 동안 처리해서 세포를 떼어내고, PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후, TrypLE 용액(Invitrogen)을 넣고 실온에서 3분간 반응시켜 떼어내고 10% fetal bovine serum (VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 $40 \mu\text{m}$ 스트레이너 (SPL, Pocheon, Korea)에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 각 단일세포를 ml당 약 1×10^6 개씩 PBA (1% bovine serum albumin, 0.02% NaN₃ in PBS)에 섞은 후, 항체 NPB11을 4°C 에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC (Invitrogen)를 4°C 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. 플로우 사이토메트리 (Flow cytometry) 분석을 통해 NPB11은 순수 인간만능줄기세포와 준 인간만능줄기세포에 동시에 결합하고 함께 배양된 생쥐 배아섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast)에는 결합하지 않았다 (도 1의 D). 그리고 준 인간만능줄기세포를 10^{-5} M 레티노산 (all-trans-retinoic acid, Sigma-Aldrich) 로 7일 처리하여 분화를 유도한 후 NPB11 결합여부를 분석하였을 때 결합하지

않는 것을 볼 수 있다 (도 1의 D). 이런 결과는 NPB11항원이 순수 및 준 만능줄기세포에 범용적으로 발현을 하고 분화가 유도될 경우 감소하는 항원임을 제시한다. 따라서 NPB11 항체는 범용적인 인간만능줄기세포 표면 마커를 인식하는 항체로 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[0089] 실시예 3. NPB11의 다양한 세포에 대한 결합분석

[0090] 3-1. NPB11의 각종 암세포에 대한 결합 분석

[0091] 인간 배아암세포 NT-2/D1를 10% FBS, 1%(v/v) NEAA, 100U/ml penicillin-G, 100 μ g/ml streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 간암세포주 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 프로토콜 대로 배양하여 사용하였다. 단일클론항체 NPB11의 각종 세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토 미트리(Flow Cytometry)를 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 μ m 스트레이너 (SPL, Pocheon, Korea)에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 각 단일세포를 ml당 약 1×10^6 개씩 PBA (1% bovine serum albumin, 0.02% NaN₃ in PBS)에 섞은 후, 항체 NPB11를 4℃에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 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. NPB11는 2종 배아암종세포주 (NT2/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 않았다 (도 2의 A, 표 3).

표 3

[0092]

Cell line	Cell origin	Reactivity by flow cytometry
Primed H9	Human embryonic stem cell, primed state	+++
Naive H9	Human embryonic stem cell, naive state	+++
RA-H9	Retinoic acid-treated primed H9	-
NT-2/D1	Human embryonal carcinoma stem cell	+++
2102Ep	Human embryonal carcinoma stem cell	+++
HEK 293T	Human embryonic kidney cell	+++
Huh7	Human hepatocellular carcinoma	+
HepG2	Human hepatocellular carcinoma	-
SNU-387	Human hepatocellular carcinoma	+
SNU-449	Human hepatocellular carcinoma	++
SK-Hep1	Human hepatic adenocarcinoma	+++
PLC/PRF/5	Human hepatocellular carcinoma	++
A549	Human non-small cell carcinoma	+++
NCI-H460	Human non-small cell carcinoma	++
PBMC	Human peripheral blood mononuclear cell	-
hCdHs	Human chemically derived hepatic progenitors	++
Hepatocytes	Human primary hepatocytes	-
Binding affinity is defined as : +++ strong, ++, medium, + weak, - negative		

[0094] 3-2. NPB11의 인간 화합물 유래 간 줄기세포 및 간세포에 대한 결합분석

[0095] 인간 화합물 유래 간 줄기세포 (human chemically derived hepatic progenitors, hCdHs)(Y. Kim, et al. J Hepatol 70:97, 2019 및 한국등록특허 제 2107602호)에 특이적인 표면마커를 발굴하기 위해 우리는 상기 실시예 2-2에서 제조한 만능줄기세포 표면분자들을 인식하는 단일클론항체 라이브러리를 포함하여 인간 만능줄기세포를 인식하는 항체라이브러리 163종을 사용하였으며 (Choi et al., PLoS One. 17(6):e0269547), 이들 항체를 사용

하여 hCdHs에 대한 결합 여부를 탐색하였다. hCdHs에 대한 항체들의 결합 정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. hCdHs를 0.05% Trypsin-EDTA (Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40 µm 스트레이너 (SPL, Pocheon, Korea)에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 각 단일세포를 ml당 약 1×10^6 개씩 PBA (1% bovine serum albumin, 0.02% NaN₃ in PBS)에 섞은 후, 각각의 항체들을 4℃에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 반응하는 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. 항체라이브러리 가운데 NPB11은 정상 인간 간세포 (Primary hepatocyte) 에는 결합하지 않지만 인간 간 줄기세포 (hCdHs)의 표면에 결합하였다 (도 2의 B, 표 3). 이런 결과는 NPB11 항체가 인식하는 항원이 인간 정상세포인 PBMC, hepatocyte 표면에는 발현하지 않지만 인간만능줄기세포, 인간 화합물 유래 간 줄기세포에 발현하는 분자이며, 인간 배아암종세포, 폐암, 간암세포들 표면에서 발현하는 분자임을 말해준다.

[0097] 실시예 4. 단일클론항체 NPB11가 인식하는 항원 동정

[0098] 4-1. NPB11이 인식하는 세포표면 단백질 분자의 확인

[0099] 인간 배아 암종세포주 NT-2/D1 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 녹아 있는 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, 2 µg/ml Aprotinin, 100 µg/ml PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride), 5 µg/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 2×10^7 개 세포의 세포 용해물에 20 µl Protein G 아가로스를 넣고 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후, 원심분리를 통해 Protein G 아가로스를 회수하여 용해 완충액에 5회 세척한 샘플을 음성 대조군으로 사용하였다. 단일클론항체 NPB11에 의해 인식되는 항원을 면역침강 하기 위해서 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 NPB11에 의해 특이적으로 인식되는 항원을 면역침강 하기 위해서 회수한 세포 용해물 상층액에 NPB11 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 단백질과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블랏팅하였다. 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 3번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출 키트(Advansta)로 확인하였다. 그 결과, NPB11는 인간 배아암종세포 NT2/D1, 폐암 세포주인 A549의 세포 용해물에서 약 200kDa의 단백질을 면역 침강하는 것을 확인하였다 (도 3의 A, B).

[0101] 4-2. NPB11에 의해 면역 침강된 항원의 동정

[0102] NPB11에 의해 A549 세포용해액에서 면역침강된 단백질을 포함하는 폴리아크릴아마이드 젤을 PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Fisher Scientific)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다 (도 3의 C). 젤에서 NPB11에 의해 면역침강된 단백질로 추정되는 200kDa 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 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 ProFound 검색엔진 (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)을 이용하였다. 그 결과, 단백질의 아미노산 서열이 Podocalyxin like protein 1 (PODXL, Gp200, PCLP)과 일부 일치하는 것을 확인하였다 (도 3의 D). 밀줄 친 아미노산은 실제로 질량분석기를 통해 확인한 아미노산 서열을 표시

한 것으로 PODXL과 37개의 아미노산이 일치하는 것을 알 수 있다.

[0104] 4-3. NPB11 항원의 검증

[0105] NPB11의 항원 단백질이 PODXL인지 확인하기 위해 상업적으로 판매되고 있는 PODXL에 대한 항체, 유전자 발현 벡터, siRNA를 이용하여 면역침강법, 웨스턴 블랏팅법, RNA 간섭작용에 의한 유전자 녹다운법 분석을 통해 수행하였다. NPB11이 면역침강시킨 단백질이 PODXL인지 확인하기 위해 공지의 토끼 항-PODXL 단일클론항체 (Cell signal technology)를 구입하여 면역침강법과 웨스턴 블랏팅을 수행하는 데 사용하였다. 상기 실시예 4-1에서 서술한 방법으로 바이오틴-표지된 세포 용출액을 준비하고, 이 용출액을 상기 서술한 바와 동일하게 NPB11로 면역침강하였다. 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-PODXL 단일클론항체 (α -PODXL)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, NPB11에 의해 면역 침강된 약 200 kDa의 세포표면 단백질이 토끼 항-PODXL 단일클론항체에 의해 인식됨을 확인할 수 있어 NPB11가 PODXL에 결합하여 면역침강시킨다는 것을 확인하였다 (도 4의 A). 검출된 단백질이 NPB11에 의해서 인식된 세포 표면 막단백질이라는 것을 확인하기 위해서 동일 나이트로 셀룰로오스 막을 SDS와 β -mercaptoethanol이 포함된 완충액에 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, NPB11의 면역침강제(immunoprecipitant)가 200kDa과 일부 분해된 분자 (~110, 120kDa)에서 다시 검출되었다 (도 4의 B). 이런 결과는 NPB11에 의해 A549 세포표면에서 면역침강된 항원은 약 200kDa에 해당하는 PODXL이라는 것을 말해준다.

[0106] 다음으로 PODXL을 siRNA로 녹다운후에 NPB11결합력이 감소하는지 관찰하기 위하여 PODXL에 대한 siRNA를 구입하여 A549 세포와 NT-2/D1 세포에서 트랜스펙션하여 RNA 간섭작용에 의한 PODXL 녹다운을 유도하였다. 50nM의 음성 대조군(negative control) siRNA(siCon; Genolution, 한국), 50nM PODXL siRNA (siPODXL, 5420-1, Bioneer, 한국), 그리고 Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)를 각각 TOM (Welgene, 한국)에 희석하고 5분간 상온에 두었다. 이후, 각각의 siRNA 희석액과 RNAiMAX 희석액을 섞어 20분간 상온에서 반응시켰다. 6웰 플레이트에 웰당 1×10^5 개의 세포주를 깔고 siRNA-RNAiMAX 희석액을 넣어 72시간 동안 배양했다. 트랜스펙션으로부터 72시간 후, 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(Corning)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 상기 실시예 3처럼 NPB11항체를 사용하여 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)로 분석하였다. PODXL이 녹다운된 세포는 NPB11로 표지 후 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry) 분석을 통해서 NPB11의 결합력이 감소함을 확인하였고 이를 통해 PODXL 녹다운으로 NPB11의 결합력을 감소시킬 수 있음을 확인하였다 (도 4의 C). 이는 NPB11이 PODXL을 인식한다는 것을 다시 제시한다.

[0107] NPB11가 PODXL을 직접 인식하여 면역침강시키는 것인지 간접 인식하여 침강시키는 것인지 구별하기 위해 PODXL 유전자 발현 벡터 pCMV3-SLC3A2-Flag (Sino Biological)를 구입하여 인간 배아 신장 세포 HEK293T에서 Flag tag이 달린 재조합 PODXL을 과발현시키고, 이 세포의 용해물을 마우스 항-Flag 단일클론항체 (Invitrogen)와 토끼 항-PODXL 항체 (α -PODXL)를 사용해 면역 침강과 웨스턴 블랏을 수행하였다. HEK293FT에서 PODXL을 과발현하기 위해 6-웰의 세포배양용 플레이트에 웰당 3.5×10^5 개 HEK293FT 세포를 24시간 배양하고, 공지의 pCMV3-PODXL-Flag 벡터 DNA 2 μ g을 PEI (Polyetherimide) 6 μ g과 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 바와 동일하게 NPB11, 항-PODXL 항체 (α -PODXL), 항-Flag 항체로 면역침강 후 항체를 넣지 않고 면역 침강한 음성 대조군 단백질(Con)과 용출된 단백질 자체 대조군(Input)을 8% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겼다. 이 막은 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹을 하였다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 공지의 마우스 항-Flag 단일클론항체 또는 토끼 항-PODXL 항체 (α -PODXL)을 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 NPB11, 토끼 항-PODXL 항체 (α -PODXL), 마우스 항-Flag 항체 의해 면역 침강된 각각의 단백질을 모두 공지의 항-Flag 항체 (α -Flag)(도 4의 D, 빨간 화살표)와 항-PODXL 항체 (α -PODXL) (도 4의 E, 빨간 화살표)에 의해 인식됨을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 본 발명

의 단일클론항체 NPB11가 인간 폐암세포주 A549의 표면에 존재하는 PODXL 단백질을 직접 인식하는 항체임을 검증하는 것이다.

[0109] 실시예 5. NPB11 항체의 PODXL 에피토프 분석

[0110] 5-1. 렉틴 ELISA를 통한 세포표면 시알릭산 당단백질 분석

[0111] PODXL은 많은 시알릭산 (sialic acid) 당, O-glycosylation, N-glycosylation에 의해 많은 당으로 덮여 있다. NPB11이 잘 결합하는 간암세포주인 SK-Hep1 세포를 상기 실시예 4-1의 용해완충액으로 처리한 다음 O-glycosidase (O-gly)(#P0733S, New England Biolab) 또는 α 2-3,6,8 Neuraminidase (neu)(#P0720S, New England Biolab)를 처리하여 PODXL에서 당들을 제거하였다. 시알릭산 당이 얼마나 제거되었는지는 효소 처리된 SK-Hep1 세포 용해액과 biotin이 붙은 렉틴을 사용해 렉틴 ELISA(Enzyme-linked lectin adsorption assay)를 수행하여 분석하였다. SK-Hep1 세포 용해액 50 μ g에 아무것도 처리하지 않은 비교군과, neuraminidase (neu)만을 처리한 것, O-glycosidase (O-gly)만을 처리한 것, 그리고 두 가지 효소 모두 처리한 것을 비교했다. 효소는 각각 1 μ l씩 처리했고 총 볼륨에 맞게 Glyco buffer2 (B3704SVIAL, New England Biolabs)를 넣고 증류수로 총량을 맞췄다. 그리고 37°C 인큐베이터에서 3시간 동안 반응시켰다. 3시간 후, 샘플들을 96 well 플레이트에 각 웰 당 당단백질 50 μ g을 코팅 버퍼(0.1 M Sodium Carbonate, pH 9.6) 100 μ l에 넣고 밤새 코팅하였다. 다음날, 각 웰 당 PBST(1X PBS +0.05% tween 20) 200 μ l로 세 번 세척하고, 휴지 위에 잘 털어냈다. 비특이적인 곳에 결합하지 않도록 블라킹 버퍼(SP-5040-125, Carbo-Free™ Blocking Solution (10x Concentrate))를 2X로 희석하여 상온에서 2시간 동안 블라킹하였다. 2시간 뒤, 같은 방법으로 세척했다. 그리고 biotin이 결합되어 있는 렉틴을 PBST에 희석하여 각 웰 당 0.5 μ g씩 100 μ l 분주한 뒤, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 뒤, 같은 방법으로 세척했다. 발색 반응을 확인하기 위해 HRP가 결합된 Streptavin을 TBST(1X TBS+0.05% tween 20)에 1:10000으로 희석하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 뒤, 같은 방법으로 세척했다. 그리고 발색 반응 기질로 OPD(O-Phenylenediamine dihydrochloride, P1526-10G, SigmaAldrich)를 사용했다. OPD기질 솔루션(OPD, 10 μ l, H2O2 4 μ l, Phosphate-citrate buffer (pH 5.0)로 10ml로 맞춤)을 각 웰당 100 μ l씩 분주한 뒤 상온에서 15분 반응시켰다. 그리고 plate reader를 이용하여 OD 492nm에서의 흡광도를 측정하여 결과를 3회 이상 반복후에 도출했다. ***은 p value<0.0001을 의미한다. 그 결과 아무것도 처리하지 않은 대조군과 neu를 처리한 것, O-gly를 처리한 것 사이에 차이가 있으며 두 효소에 의해 시알릭산 당이 제거되었음을 알 수 있다 (도 5의 A). 그리고 neu와 o-gly를 동시에 처리한 군에서 시알릭산 당이 세포 표면에서 가장 많이 제거되었음을 알 수 있다 (도 5의 A).

[0113] 5-2. Neuraminidase 및 O-glycosidase처리한 세포표면 당단백질의 웨스턴 블라팅 분석

[0114] NPB11이 인식하는 세포표면 PODXL 에피토프(epitope)에 시알릭산 당이 관여할 가능성이 있는지 분석하기 위하여 왕성하게 자라는 SK-Hep1 세포를 7×10^5 개를 0.05% Trypsin을 처리하여 살아있는 상태로 수확한 뒤 반응 용액(Ca2+/Mg2+ free DMEM/F12 (Sigma), 2mM CaCl2, 0.1% BSA)으로 3번 세척하였다. 마지막으로 반응 용액에 세포를 부유시킨 뒤 O-glycosidase (O-gly)(#P0733S, New England Biolab) 또는 α 2-3,6,8 Neuraminidase (neu)(#P0720S, New England Biolab)를 처리한 뒤 37°C에서 90분 반응시켜 O-glycan과 시알릭산 당을 세포 표면에서 제거하였다. 반응시킨 세포는 PBS (pH 7.4)로 2번 세척 후 상기 실시예 4-1처럼 1% NP-40 용해 완충액을 사용하여 용해시켰다. 이후 세포 용출액을 SDS-PAGE를 통해서 단백질을 분리한 후, 니트로셀룰로오즈 막에 옮긴 뒤 Carbo-free blocking reagent (Vector laboratories)에 실온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 결합을 막았다. 이후 0.1% TBST로 3번 세척 후 바이오틴이 결합되어 있는 Sambucus nigra lectin (B-1305-2, Sambucus Nigra Lectin (SNA, EBL), Biotinylated, Vectorlabs)을 실온에서 2시간 반응시켜 세포표면 단백질에서 시알릭산 당이 남아있는 단백질을 검출하였다. Sambucus nigra lectin이 결합한 단백질은 Streptavidin-HRP (SA-HRP)를 이용하여 검출하였다. 그 결과 neu처리시에 lectin 결합력이 감소하고 O-gly와 neu를 동시에 처리할 경우 가장 많이 감소함으로 두 효소를 동시에 처리시에 가장 많이 세포 표면에서 시알릭산 당이 제거된다는 것을 확인하였다 (도 5의 B).

[0116] 5-3. 당이 제거된 세포 표면 PODXL과 NPB11의 결합력 분석

[0117] 실시예 5-1과 5-2에서 분석한 것처럼 세포 표면 단백질의 O-glycan과 시알릭산 당을 제거한 세포를 사용하여 NPB11의 결합정도를 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)로 분석하였다. 효소들을 처리한 SK-Hep1 세포를 회수한 뒤에 3 µg의 NPB11을 4℃에서 30분 반응시켜 NPB11이 SK-Hep1 세포에 결합할 수 있게 한 뒤 anti-mIgG-FITC에 30분 반응시켜 형광 표지 후 상기 실시예 3처럼 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)를 통해서 NPB11의 결합력을 분석하였다. 분석 결과는 t-test: two-sample assuming equal variances로 분석하였다 (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001). 그 결과 O-gly를 처리할 때는 큰 차이가 없으나 neu에 의해 시알릭산 당이 제거되었을 때 NPB11의 결합력이 약화되는 것을 확인할 수 있으며 O-gly와 neu를 동시에 처리할 때 NPB11의 세포 결합력이 가장 약하다는 것을 알 수 있다 (도 5의 C, D). 이는 NPB11가 인식하는 에피토프는 PODXL의 O-glycan상에는 없지만 최소한 시알릭산 당에 존재하거나 시알릭산 당의 존재에 영향을 받는다는 것을 의미한다.

[0119] 실시예 6. 화합물 유래 간 줄기세포의 확립 및 특성 분석

[0120] 6-1. 인간 일차 간세포의 분리

[0121] 일차 간세포(human primary hepatocytes, hPHs)는 2단계 콜라게나제 관류법을 사용하였으며, 단계 1에서 간은 37℃에서 5분 동안 칼슘 킬레이트제로서 EDTA로 구성된 용액 A로 관류되었다. 2단계에서 간은 37℃에서 8분 동안 트립신 저해제와 콜라게나제로 구성된 용액 B로 관류되었다. 이어서, 간을 추출하고 접시에서 잘게 잘랐다. 일차 간세포를 Williams의 Medium E(Gibco, NY, USA)로 세척하고 25% Percoll(GE Healthcare, Bucks, UK)로 처리하였다.

[0123] 6-2. 화합물 유래 간 줄기세포의 확립

[0124] 인간 화합물 유래 간 줄기세포 (human chemically derived hepatic progenitors, hCdHs)를 생성하기 위해, 본 발명자들이 이전에 보고한 간행물(Y. Kim, K. Kang, S. B. Lee, D. Seo, S. Yoon, S. J. Kim, K. Jang, Y. K. Jung, K. G. Lee, V. M. Factor, J. Jeong, D. Choi, J Hepatol 2019, 70, 97.) 및 한국등록특허 제 2107602호에 설명된 방법을 준수하였다. William의 배지에서 24시간 동안 배양한 인간 일차 간세포 (human primary hepatocytes, hPHs)를 10mM 니코틴아마이드(Sigma-Aldrich, MO, USA), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco), 20ng/mL HGF(Peprotech, UJ, USA), 20ng/mL EGF (Peprotech) 및 4 µM A83-01(Gibco) 및 3 µM CHIR99021(StemCell Technologies)가 첨가된 DMEM/F12(Gibco, CA, USA)에서 37℃, CO₂ 세포 배양기에서 7일 동안 배양하였으며 매일 배지를 교체하였다. 그 결과 화합물 유래 간 줄기세포의 형태학적 세포 특징을 갖는 것을 볼 수 있다 (도 6의 A).

[0126] 6-3. mRNA 분리 및 RT-PCR을 통한 화합물 유래 간 줄기세포의 특성 분석

[0127] 화합물 유래 간 줄기세포의 특성을 검증하기 위해, 간 줄기세포 마커 유전자 발현을 qPCR을 이용하여 분석하였다. 트리졸 시약(Gibco)을 사용하여 총 RNA를 분리하였으며 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche, PA, USA)로 1 µg의 RNA 샘플을 역전사하고 qPCR PreMix(Dyne bio, Korea) 10 µl, cDNA 1 µl 및 올리고 뉴클레오티드 프라이머(표 4)를 사용하여 CFX Connect Real-Time PCR Detection system(Bio-rad, CA, USA)에서 실시간 PCR을 수행하였다. 반응은 각 유전자에 대해 세 번씩 반복 분석하였다. PCR 사이클은 95℃ 20초, 60℃ 40초의 40 사이클로 구성된다. 용융 곡선 및 용융 피크 데이터를 획득하여 PCR 산물을 특성화하였다. 인간 일차 간세포 대비 화합물 유래 간 줄기세포에서 간 줄기세포 유전자 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (도 6의 B).

표 4

[0128]

유전자	프라이머	프라이머 서열(5'-3')
CK19	정방향	TTCCGGACCAAGTTTGAGAC(서열번호 17)
	역방향	CCTCGTGGTTCTTCTTCAGG(서열번호 18)
EPCAM	정방향	GAACAATGATGGGCTTATG(서열번호 19)
	역방향	TGAGAATTCAGGTGCTTTT(서열번호 20)
SOX9	정방향	GAGGAAGTCGGTGAAGAACG(서열번호 21)
	역방향	ATCGAAGGTCTCGATGTTGG(서열번호 22)

ITGA6	정방향	TCGCTGGGATCTTGATGCTTGC(서열번호 23)
	역방향	TGAGCATGGATCTCAGCCTTGTGA(서열번호 24)
CD90	정방향	CTAGTGGACCAGAGCCTTCG(서열번호 25)
	역방향	ACAGGGACATGAAATCCGTG(서열번호 26)
CD44	정방향	CATCTACCCAGCAACCCTA(서열번호 27)
	역방향	CTGTCTGTGCTGTCGGTGAT(서열번호 28)
ALB	정방향	CACAGAATCCTTGGRGAAACAGG(서열번호 29)
	역방향	ATGGAAGGTGAATGTTTCAGCA(서열번호 30)
GAPDH	정방향	TGCACCACCAACTGCTTAGC(서열번호 31)
	역방향	GGCATGGACTGTGGTCATGAG(서열번호 32)

[0130] 실시예 7. 면역세포화학법에 의한 NPB11의 화합물 유래 간 줄기세포에 대한 결합 특이성 분석

[0131] NPB11 항체가 화합물 유래 간 줄기세포 특이적 항체임을 추가로 검증하기 위해, 화합물 유래 간 줄기세포 (hCdHs), 섬유화된 화합물 유래 간 줄기세포 (Fibrotic hCdHs), 마우스 기원 화합물 유래 간 줄기세포 (mCdHs), 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs), 인간 일차 간세포 (human Primary Hepatocytes, hPHs), 마우스 일차 간세포 (Mouse Primary Hepatocytes, mPHs), 인간 진피 섬유화 세포 (Human Dermal Fibroblasts, HDF), 인간 신생아 표피 섬유화 세포 (Neonatal Human Foreskin Fibroblasts, hNuFF)에 NPB11 항체를 세포면역화학염색법(Immunocytochemistry)을 이용하여 표면 결합 여부를 확인하였다. 세포는 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde, PFA)에 15분 반응시켜 고정시킨 후 PBS 로 3회 세척한다. DPBS 와 2% BSA를 포함한 용액을 이용하여 1시간 블로킹하고 NPB11 항체 20 μ g을 넣고 4℃에서 빛을 차단한 채 12시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후, Dylight 633-conjugated anti-mouse IgG(Invitrogen) 1:200 비율로 희석한 용액과, Hoechst33342 (1:1000, Molecular Probes, USA) 1:1000 비율로 희석한 용액을 실온에서 빛을 차단한 채 1시간 동안 반응시켰다. 세포는 TCS SP5 공초점 현미경(Leica, Germany)을 사용하여 이미지화하였다. NPB11은 인간 화합물 유래 간 줄기세포의 표면에 특이적으로 결합하는 것을 볼 수 있었다 (도 7).

[0133] 실시예 8. NPB11 항체를 이용한 간 줄기세포 분리

[0134] 8-1. NPB11 항체를 이용한 간 줄기세포의 분리

[0135] T175 flask에 배양된 화합물 유래 간 줄기세포를 TrypLE(Gibco)를 이용하여 부착된 세포를 모아 원심분리하였다. 1×10^6 세포 당 NPB11 항체 20 μ g을 PBS 버퍼(2mM EDTA, 0.5% BSA) 100 μ l에 넣어 4℃, 30분 동안 반응시킨 후 PBS 버퍼 1ml을 넣고 300 xg, 10분 동안 원심 분리하여 세포를 3번 세척한다. Anti-Mouse IgG Microbeads(130-048-402, Miltenyi Biotec) 10 μ l를 PBS 버퍼와 함께 세포에 넣어 4℃, 15분 동안 반응시킨 후 PBS 버퍼 1ml을 넣어 3번 세척하고 PBS 500 μ l를 넣어서 세포 분리를 위해 준비한다. MACS[®] MultiStand (130-042-303, Miltenyi Biotec), MidiMACS[™] Separator (130-042-302, Miltenyi Biotec) 및 LS Columns (130-042-401, Miltenyi Biotec)를 이용하여 세포 500 μ l를 column에 로딩하여 NPB11 항체 음성 세포군과 양성 세포군으로 분리하였다. 2일 마다 배지를 교체하며 5일 동안 배양 후 세포 모양을 관찰하였고 NPB11 항체 양성 세포군에서 화합물 유래 간 줄기세포 모양을 유지하는 것을 관찰하였다 (도 8의 A, Labeled cells).

[0137] 8-2. 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry) 분석에 의한 NPB11 항체 음성/양성 세포군에서 세포표면 항원염색

[0138] 분리된 NPB11 항체 음성/양성 세포군에서 세포 분리 효율을 분석하기 위해 NPB11 항체를 이용하여 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)로 분석하였다. 분석을 위해서 분리되지 않은 간 줄기세포, NPB11 항체 음성 세포군, NPB11 항체 양성 세포군 시료 당 약 2×10^5 세포를 사용하였다. 1×10^5 세포 당 NPB11 항체 2 μ g을 PBS 버퍼 (2% BSA) 100 μ l에 넣어 4℃, 1시간 반응시킨 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척하고 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC(BD Biosciences)를 4℃, 1시간 반응시켰다. PBS 버퍼로 2번 세척한 후, FACS CantoII (BD Biosciences) 장비를 이용하여 분석하였다. 분리되지 않은 간 줄기세포는 NPB11 항원이 37.7%, NPB11 음성 세포

군은 42.1%, NPB11 양성 세포군은 73.2% 가 존재하는 것을 확인하였다 (도 8의 B).

[0140] 실시예 9. NPB11 항체 음성/양성 세포군의 간 줄기세포 특성 분석

[0141] NPB11 항체 음성/양성 세포군에서 화합물 유래 간 줄기세포의 특성을 검증하기 위해, 간 줄기세포 마커 유전자 발현을 qPCR을 이용하여 분석하였다. 분석 방법은 실시예 6-2를 따랐다. 간 줄기세포 마커 유전자인 EPCAM, SOX9, ITGA6, CK19 은 분리되지 않은 간 줄기세포에서 유전자 발현이 감소하였지만 NPB11 양성 세포군에서 다시 증가하는 것을 관찰하였다 (도 9). 이것은 NPB11 양성 세포군에서 간 줄기세포 특성이 증가되었음을 의미한다. 정량적 데이터는 추론 통계치 (p 값)와 함께 평균±표준 편차(SD)로 표시된다. 통계적 유의성은 $^{***}p<0.01$, $^{****}p<0.0001$ 로 설정한 유의미한 양측 t-검정으로 평가하였다.

[0143] 실시예 10. 단일클론항체 NPB11 항체 유전자 및 아미노산 분석

[0144] 10-1. 단일클론항체 NPB11 유전자 클로닝

[0145] 왕성하게 자라는 하이브리도마 NPB11 세포 5×10^6 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 μ g 당 1 unit의 DNase I (TaKaRa)을 넣고 37℃에서 30분 동안 반응해 잔여의 DNA를 제거한 후 50mM EDTA 1 μ 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 연쇄 반응혼합액을 만들고 공급자의 프로토콜에 따라 cDNA를 합성하였다. 항체 유전자를 클로닝하기 위해서는 알려진 중합효소연쇄반응 프라이머를 변형한 후 사용하였다 (Wang, et al 2000, J. Immunol. Methods 233:167). 합성된 cDNA로 중쇄 클로닝을 위해서는 IgG2b 불변영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 5'-gga gtc gac ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'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' 25pmole과 5'MH2 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3' 올리고뉴클레오타이드 25pmole을 넣어 연쇄 중합반응혼합액을 만들었다. 경쇄 클로닝을 위해서는 카파사슬 불변영역에 해당하는 프라이머인 5'-ggt gtc gac GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3' 올리고뉴클레오타이드와 카파사슬 가변영역 N 말단에 해당하는 프라이머인 5'MK 5'-cgg aag ctt GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3'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 1unit의 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 가변영역에 해당하는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 390bp에 해당하는 위치에서 증폭된 DNA를 얻을 수 있었다 (도 10의 A, B).

[0147] 10-2. 단일클론항체 NPB11 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

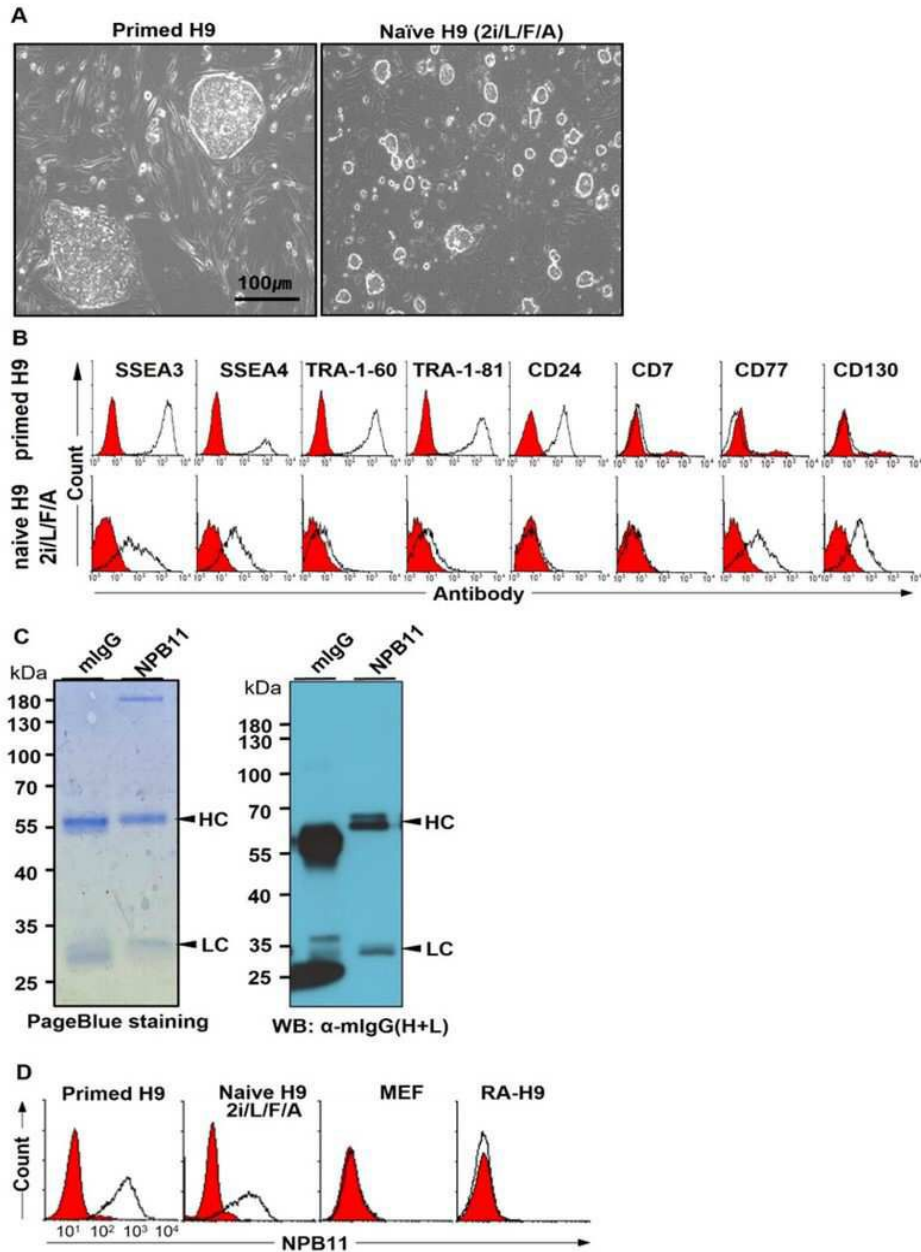
[0148] 상기 실시 예에서 증폭해낸 NPB11 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 중합효소연쇄반응 산물을 중쇄는 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄는 HindIII와 SalI으로 처리한 후 1.0 % (w/v) 아가로스 젤에 전개시켜 FavorPrep GEL PCR Purification Kit (Favorgen, Pingtung, Taiwan)로 약 400bp와 390bp에 해당하는 DNA를 분리하였다. 중쇄 유전자를 클로닝할 벡터로 사용할 pBluescript KS+를 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄유전자 클로닝 벡터로는 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 DH5 α 에 CaCl₂ 방법으로 형질 전환하였다.

[0149] 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 100 μ g/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 10의 C), 경쇄의 경우 약 390bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 대장균 클론들을 선발하였다 (도 10의 D). 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 Nucleotide sequencing(Bionics, Seoul, Korea)을 통해 확인하였다. 중쇄 및 경쇄 DNA의 염기서열을 아

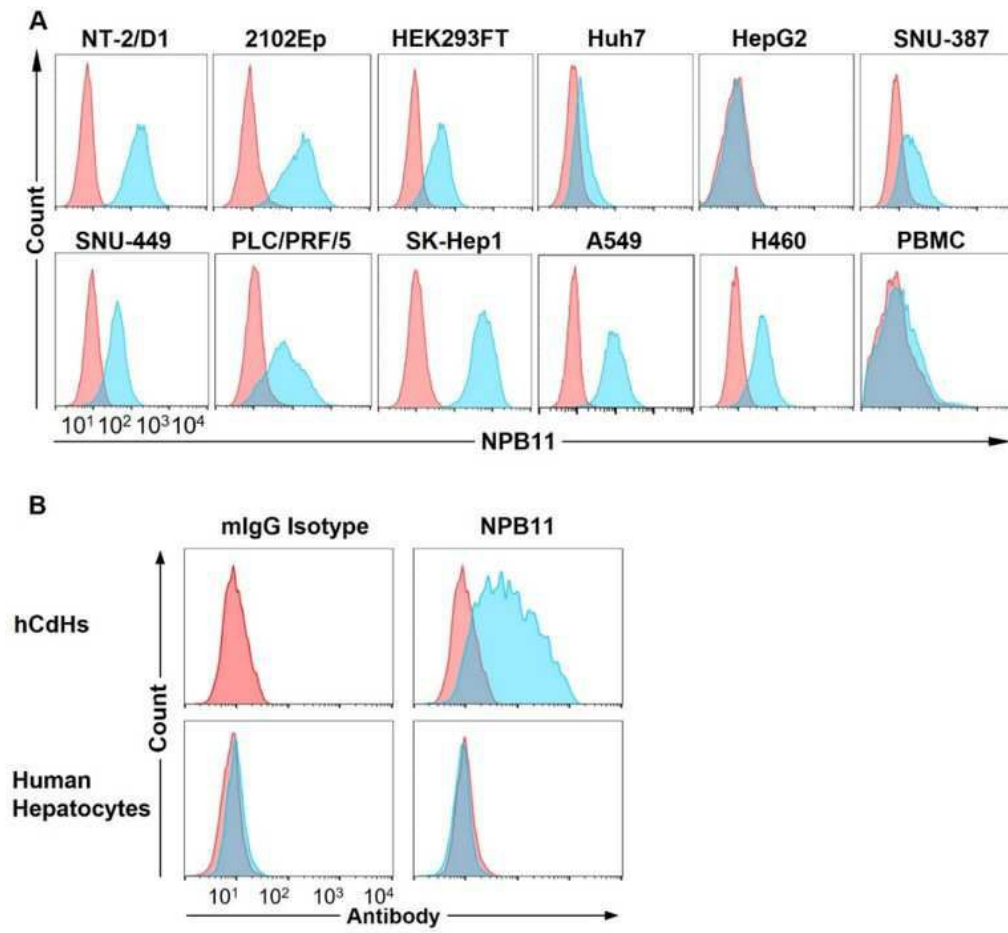
미노산으로 번역 후 항체 구조에 따른 항원인식결정 부위를 Kabat numbering을 통해 정리한 결과 중쇄는 subgroup V에 해당하고 (도 11), 경쇄는 subgroup V에 해당하는 기능적인 항체임을 확인하였다 (도 12). 각 서열에 항원 결합 부위인 CDR1, 2, 3를 진한 색으로 표시하였다 (도 11, 도 12).

도면

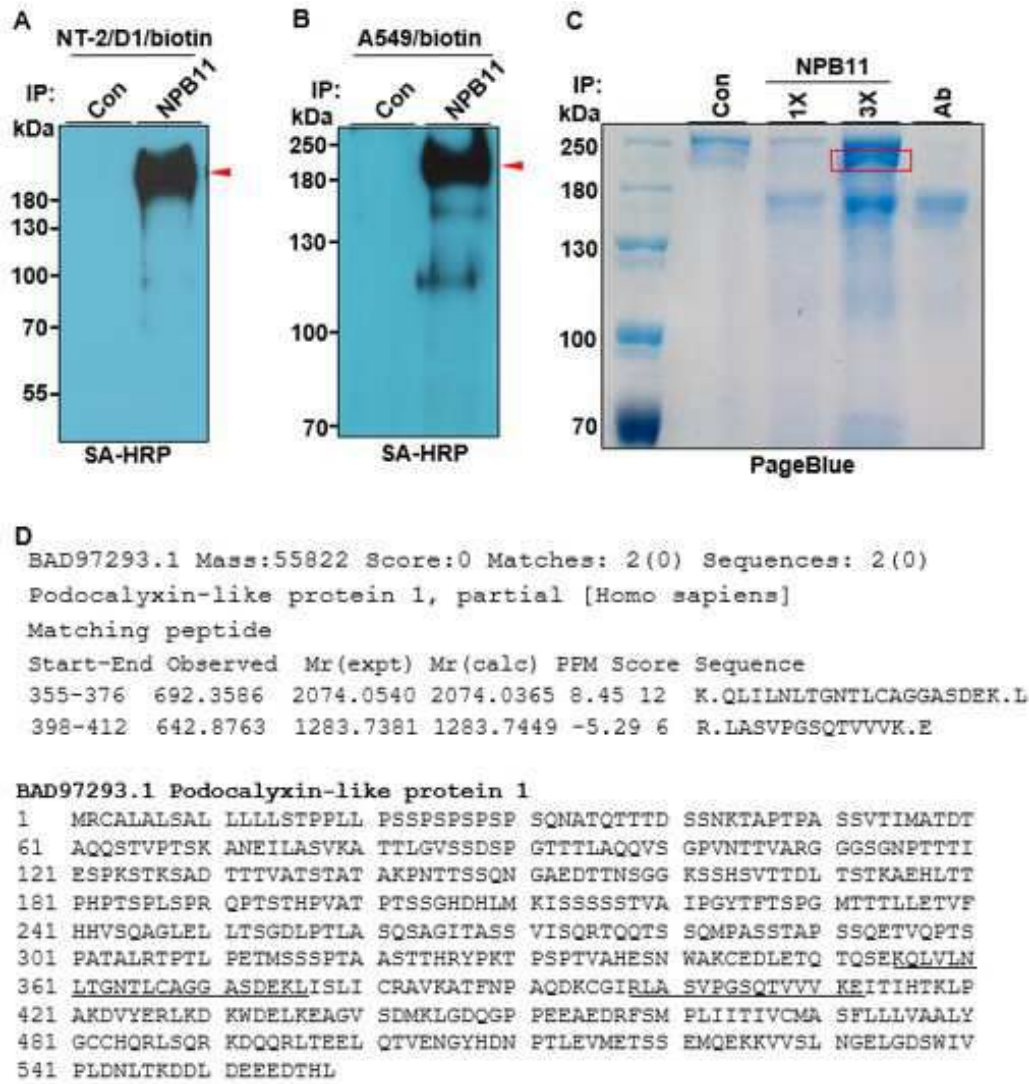
도면1



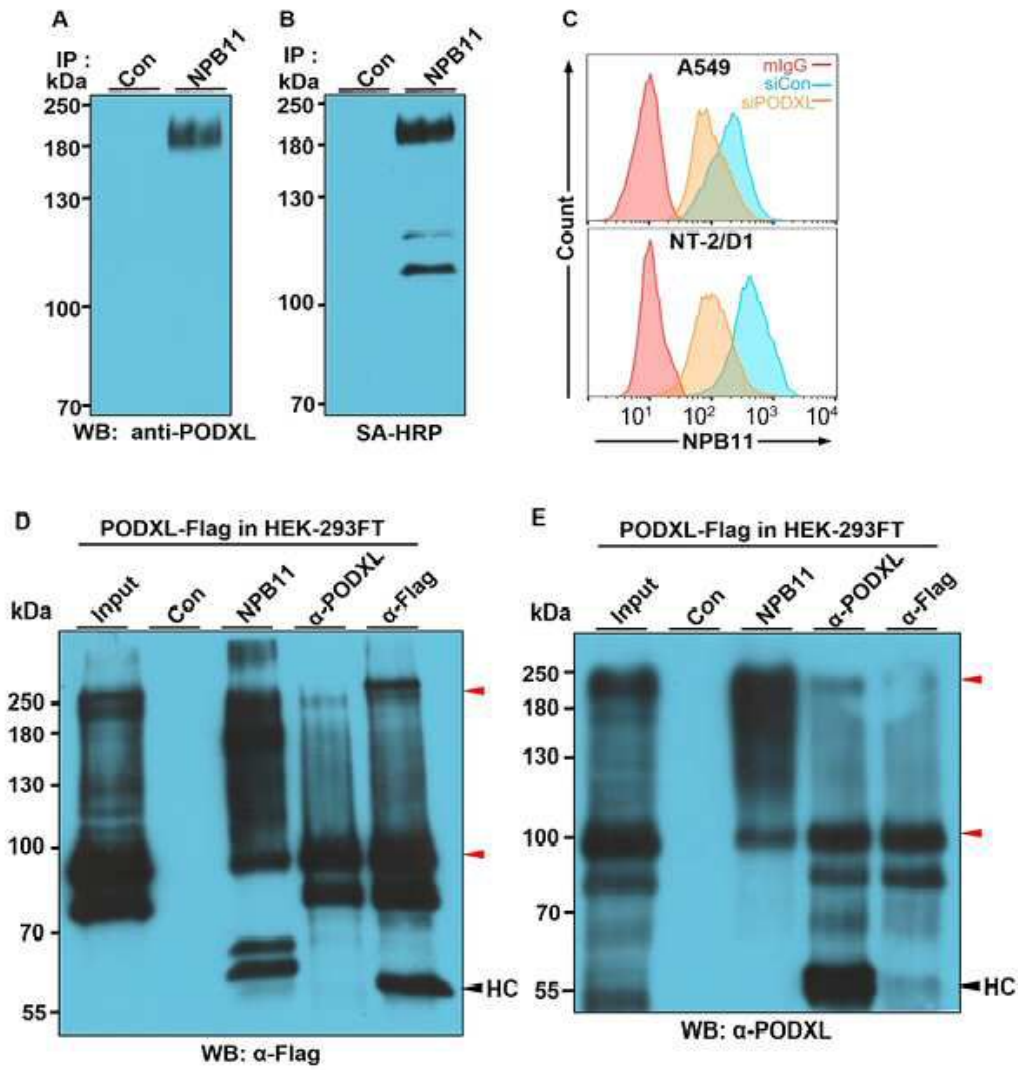
도면2



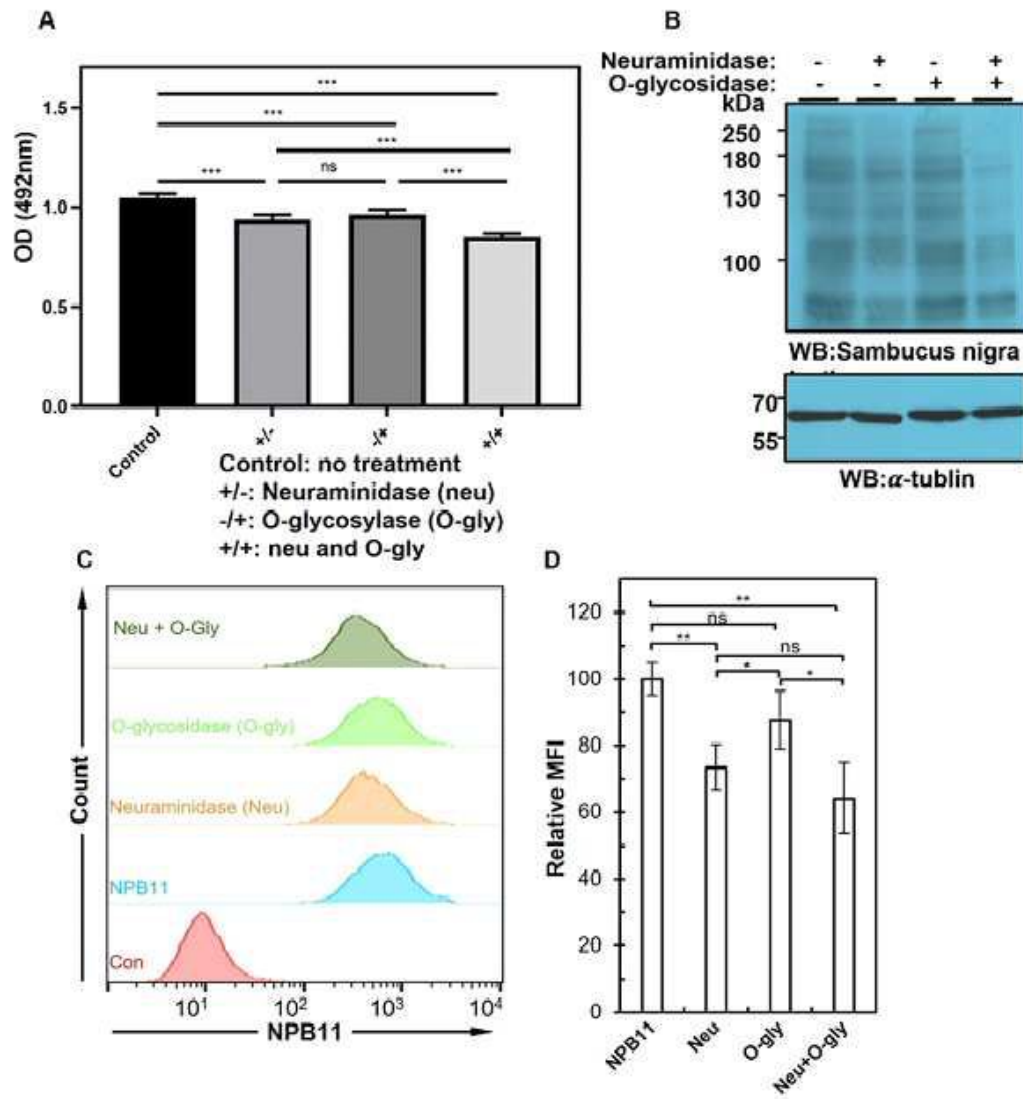
도면3



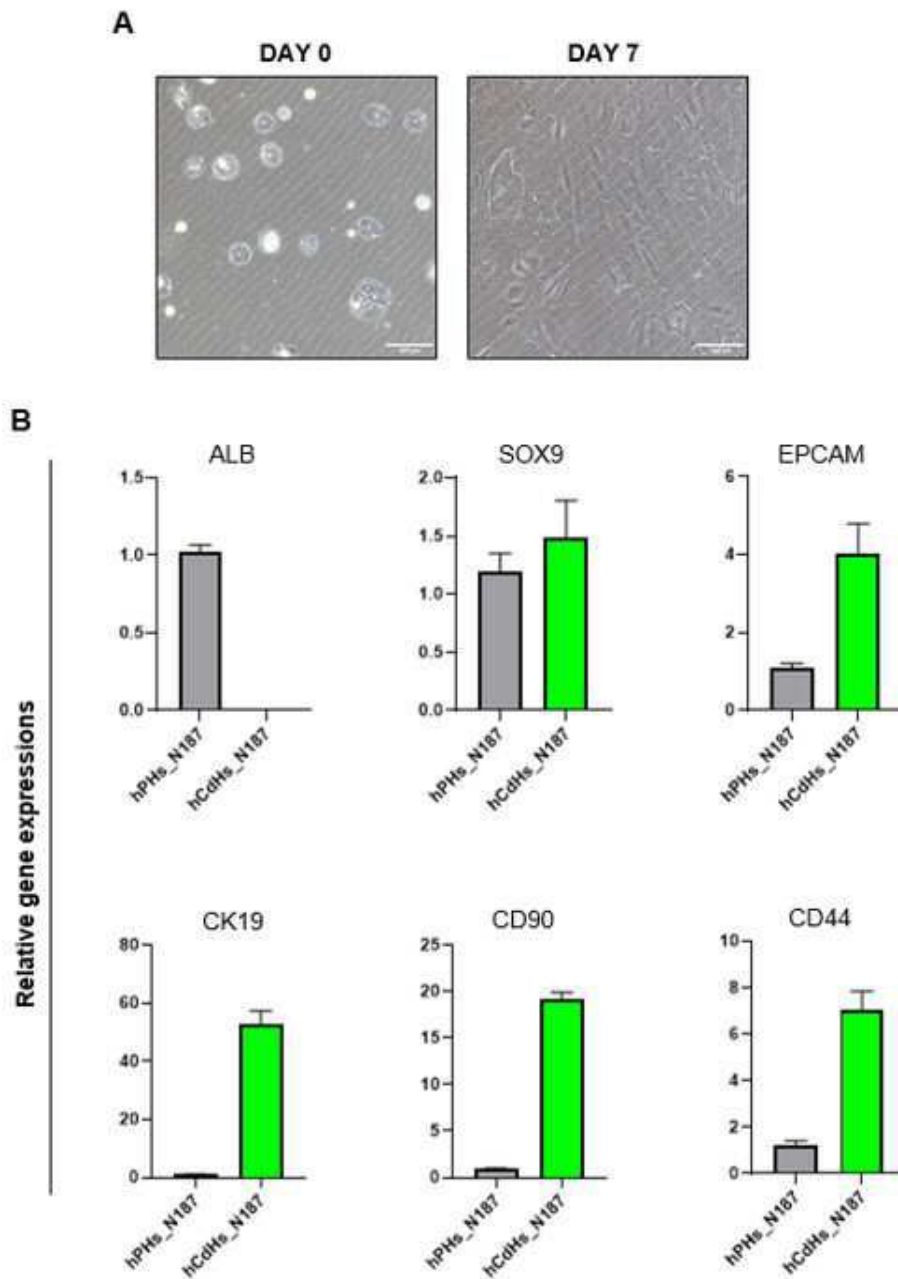
도면4



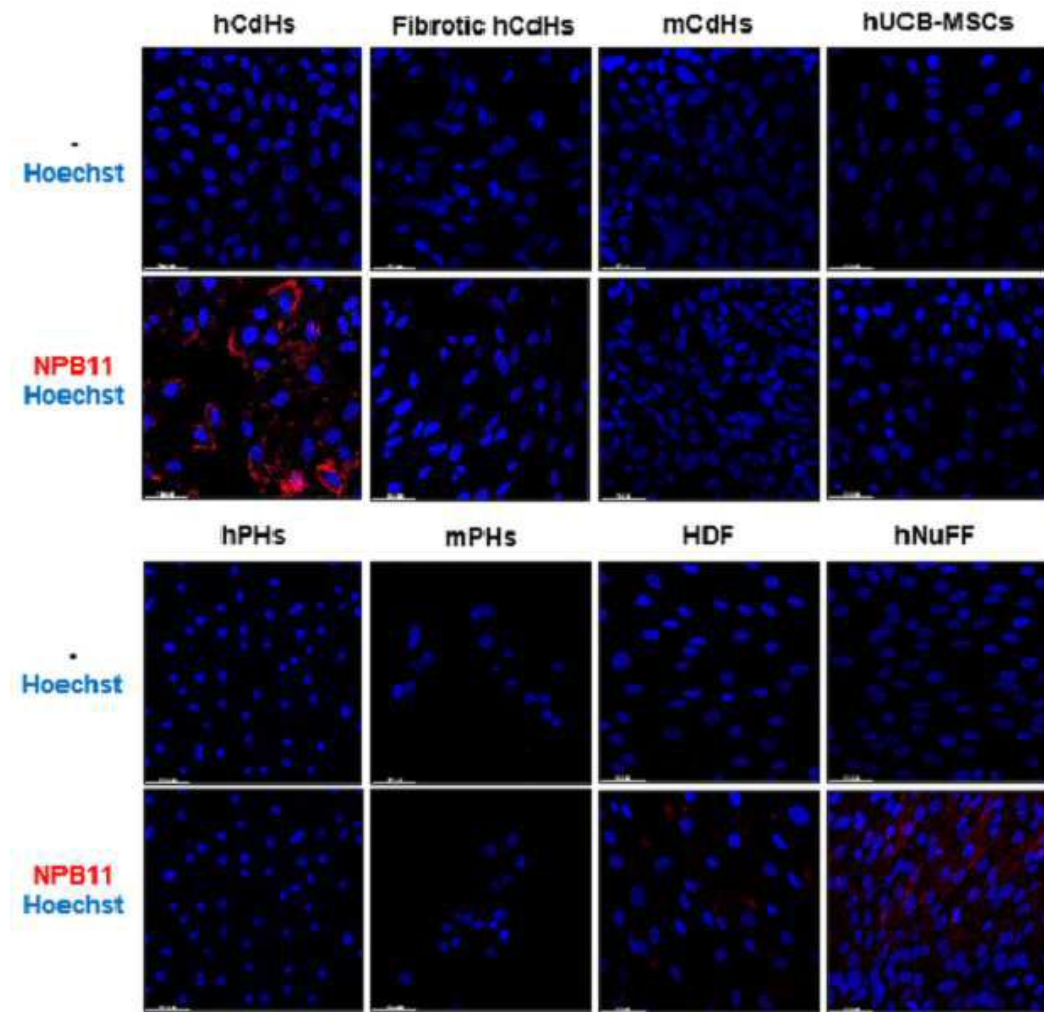
도면5



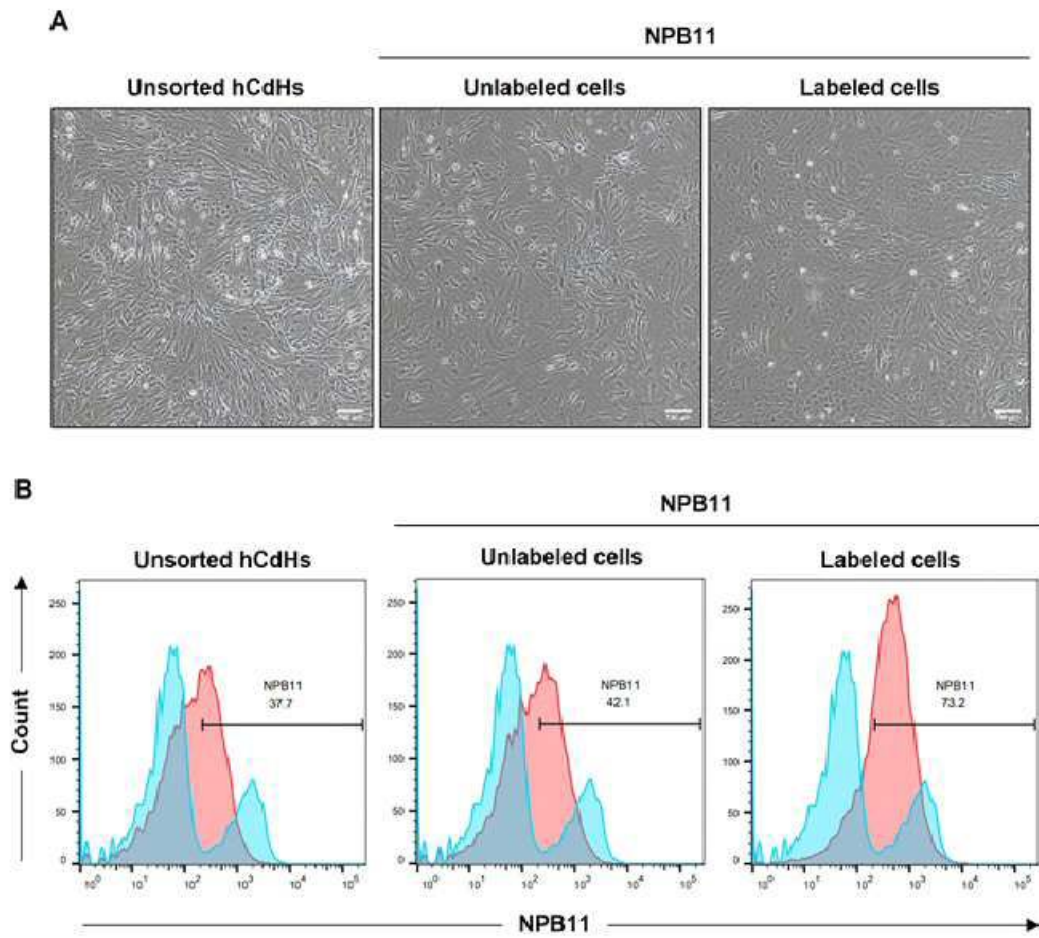
도면6



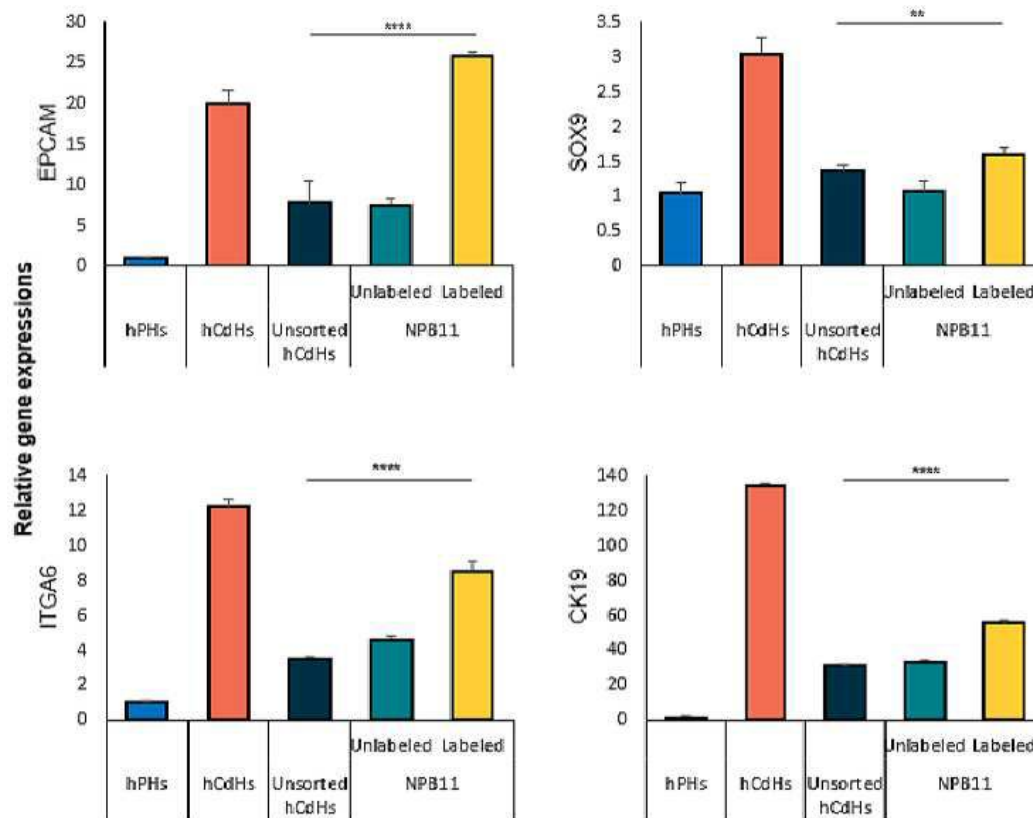
도면7



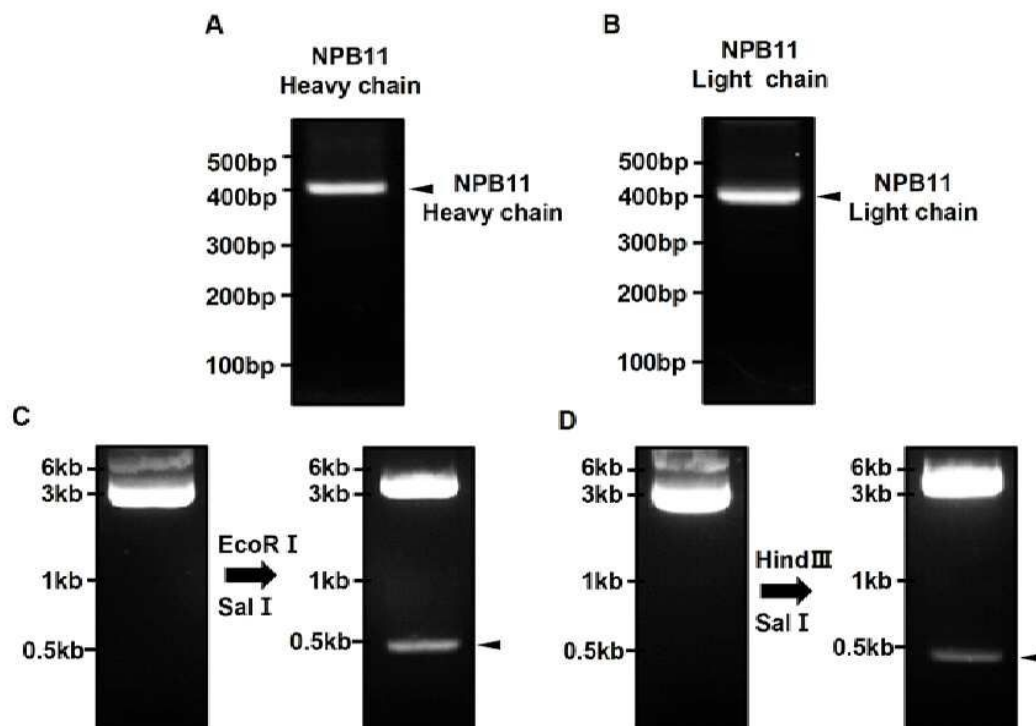
도면8



도면9



도면10



도면11

Heavy chain of NPB11 variable region : subgroup V	
GAA GTA AAG CTG GAG CAG TCA GGG GGA GAC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC 60	
Glu Val Lys Leu Glu Gln Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu 20	
CDR-H1	
TCC TGT GTA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AAC TAT GTC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT 120	
Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr 40	
CDR-H2	
CCG GAA AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT GGT AGT GAA AAT TAC ATG TAT TAT 180	
Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Ser Glu Asn Tyr Met Tyr Tyr 60	
CCA GAC AGT GTG AAG GGT CGA TTC AAC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC 240	
Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Asn Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 80	
CDR-H3	
CTG CAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATG TAT CAC TGT GCA AGA CAT GCT 300	
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr His Cys Ala Arg His Ala 100	
GGT TAC TAC GAA GGG GAA GGT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 360	
Gly Tyr Tyr Glu Gly Glu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser 120	
TCA 363	
Ser 121	

도면12

Light chain of NPB11 variable region : subgroup V	
GAT ATT GTG ATG ACA CAA TCT ACA GCC ACA CTG TCT GTG ACT CCA GGA GAT AGC GTC AGT 60	
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Thr Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Ser Val Ser 20	
CDR-L1	
CTT TCC TGC AGG GCC AGC CAA AGT ATT AAC AAC AAC CTC CAC TGG TAT CAA CAA AAA TCA 120	
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser 40	
CDR-L2	
CAT GAG TCT CCA AGG CTT CTC ATC AAG TAT GCT TCC CAG TCC ATC TCT GGG ATC CCC TCC 180	
His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser 60	
AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA AAT TTC ACT CTC AGT ATC AGC GGT GTG GAG ACT 240	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ser Gly Val Glu Thr 80	
CDR-L3	
GAA GAT TTT GGA ATG TAT TTC TGT CAA CAG AGT GAC AGC TGG CCT CTC ACG TTC GGT GCT 300	
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala 100	
GGG ACC AAG CTA GAG CTG AAA CGG 324	
Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg 108	

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.