



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0057593
(43) 공개일자 2025년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0003027
(22) 출원일자 2024년01월08일
심사청구일자 2024년01월08일
(30) 우선권주장
1020230139068 2023년10월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대
학교내)
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학
교)
(72) 발명자
류춘제
서울특별시 서초구 고무래로 35, 106동 3203호 (반포동, 반포리채아파트)
최문주
서울특별시 중랑구 봉우재로43길 18 (상봉동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

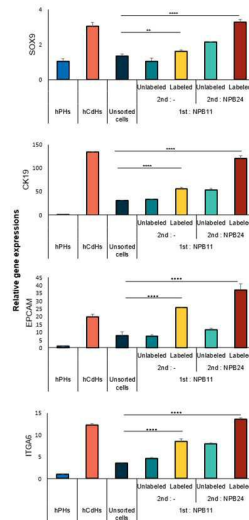
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 간 줄기세포에 대한 단일클론항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 간 줄기세포에 대한 단일클론항체 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 소정의 상보성 결정영역을 가져 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 간 줄기세포 및 인간 암세포 표면의 IP3R3에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이의 세포 검출 및 암 진단 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도22



(52) CPC특허분류

C12N 5/16 (2013.01)

G01N 33/56966 (2013.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

(72) 발명자

서효선

경기도 동두천시 강변로 160, 101동 1501호 (송내동, 송내아이파크)

최홍서

서울특별시 광진구 동일로54길 11-7, 204호 (군자동)

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 인간만능줄기세포 유도 및 기전규명

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 분화 유지 효율 향상 기술개발

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 단일클론항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7의 서열을 갖는 단일클론항체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8의 서열을 갖는 단일클론항체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포의 표면 마커인 IP3R3에 결합하는 단일클론항체.

청구항 5

청구항 1의 단일클론항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

청구항 5에 있어서, HCDR1을 인코딩하는 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드; HCDR2를 인코딩하는 서열번호 12의 폴리뉴클레오티드; HCDR3을 인코딩하는 서열번호 13의 폴리뉴클레오티드; LCDR1을 인코딩하는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드; LCDR2를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드; 및 LCDR3을 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열번호 17의 폴리뉴클레오티드 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열번호 18의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

청구항 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 9

청구항 1의 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마.

청구항 10

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 단일클론항체를 포함하는 IP3R3 발현 세포 검출용 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 IP3R3 발현 세포는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포인 IP3R3 발현 세포 검출용 조성물.

청구항 12

청구항 10의 조성물을 포함하는 IP3R3 발현 세포 검출 키트.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포를 검출용 IP3R3 발현 세포 검출 키트.

청구항 14

청구항 1의 단일클론항체를 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 암은 인간 배아암, 폐암, 췌장암 또는 간암인, 암 진단용 조성물.

청구항 16

청구항 1의 단일클론항체를 시료에 처리하는 단계; 및 PODXL 항체를 상기 시료에 처리하는 단계를 포함하고, 상기 PODXL 항체는 서열번호 19의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 20의 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2) 및 서열번호 21의 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 22의 경쇄 상보성 결정영역 1(LCDR1), 서열번호 23의 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2) 및 서열번호 24의 경쇄 상보성 결정영역 3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 간 줄기세포의 선별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포표면 IP3R3에 결합하는 단일클론항체에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 인간 만능줄기세포 (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 만능줄기세포를 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 편편한 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.

[0004] 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.

[0005] 칼슘 이온(Ca^{2+})은 증식, 분화, 분비, 염증, 수정, 근육 수축, 유전자 전사, 대사, 세포사멸 및 자가포식과 같은 다양한 세포 기능을 조절한다. 외부 자극에 의해 형성된 Inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)가 소포체의 세포내 Ca^{2+} 방출 채널인 Inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R)에 결합하면 소포체에서 Ca^{2+} 가 방출되어 신호가 전달되고 다양한 기능이 수행된다. IP3R에는 다른 유전자에 의해 코딩되는 유형1(ITPR1/IP3R1), 유형2(ITPR2/IP3R2), 유형3(ITPR3/IP3R3)의 3종의 다른 IP3R이 있다. IP3R은 약 2700개의 아미노산 길이를 가지며 3개의 큰 영역으로 나눌 수 있으며, N 말단에 있는 세포질 리간드 결합 영역, 중간에 있는 조절 및 결합 영역, 6개의 막관통 나선을 형성하며 이온채널을 형성하는 C 말단 부분으로 나뉜다. IP3R 동형체는 75%의 상동성을 갖고 있지만 조직 분포와 기능이 다르다. IP3R1은 주로 신경계에서 발현되는 가장 보편적인 동형체이고, IP3R2는 매우 제한된 발현 패턴을 가지며 심근세포, 간세포, 분비 세포 및 혈액 세포에서 발현되며, IP3R3은 일반적으로 빠르게 분열하는 세포에서 발현되며 정상 간세포에서는 발현하지 않는다.

[0006] Ca^{2+} 신호전달은 세포 증식과 세포사멸을 함께 조절한다. 따라서 IP3R 및 Ca^{2+} 신호전달의 조절 장애는 암세포 성장, 이동, 증식 및 생존을 포함한 많은 발암과정과 연관되어 있다. 지금까지 세포사멸 과정에서 IP3R의 관여는 주로 IP3R1과 IP3R2에 할당되었지만, IP3R3 발현변화는 다양한 암발생에 관여한다. 흥미롭게도, IP3R3은 암이 진행되는 동안 세포사멸 촉진과 생존 촉진을 위한 Ca^{2+} 신호 전달을 모두 가지고 있다. 먼저 IP3R3은 소포체-미토콘드리아 접촉 부위의 미토콘드리아에 Ca^{2+} 신호를 전달하여 세포사멸을 유도함으로써 종양 발생을 억제한다. 높은 IP3R3 단백질 수준은 종양억제 인자인 BAP1과 PTEN에 의해 유지된다. BAP1은 IP3R3을 탈유비퀴틴화하고, PTEN은 FBXL2와 경쟁하여 FBXL2 의존성 유비퀴틴화로부터 IP3R3을 보호하여 IP3R3 매개 pro-apoptotic Ca^{2+} 신호 전달을 촉진한다. 그러나 일부 연구에서는 IP3R3이 anti-apoptotic 활성을 유도하여 암세포에서 세포 증식, 생존, 이동 및 침입을 유도하는 것으로 나타났다. IP3R3발현이 올라가서 세포사멸을 촉진되는 상황에 대처할 수 있는 경우, 소포체-미토콘드리아 접촉 부위의 높은 IP3R3 발현은 세포사멸에 대한 저항성과 증식촉진의 원인이 될 수 있으며 이를 통해 투명세포 신장암, 담관암 및 간세포암에서 오히려 암발생을 촉진할 수 있다. 또한 IP3R3은 CD44 발현을 조절하여 방광암 세포에서 암 줄기세포성 표현형을 유지하며, Ca^{2+} 유도에 의한 RELB 발현으로 세포 생존 및 Anoikis에 대한 저항성을 유도하여 대장암 세포의 간 전이를 촉진한다. 따라서 IP3R3은 세포사멸을 촉진하는 Ca^{2+} 신호전달을 촉진하거나 생존 및 증식을 촉진하는 Ca^{2+} 신호전달을 촉진함으로써 복잡한 기능을 보여준다. 따라서 IP3R3가 결보기에 서로 충돌하는 기전을 동시에 가지는 것은 IP3R3 기

능의 많은 부분이 여전히 알려지지 않은 상태라는 것을 시사한다.

[0007]

Integrin은 세포막의 당단백질 수용체로 cell-matrix 또는 cell-cell adhesion을 매개하고 유전자 발현 및 세포 성장을 조절하는 신호를 전달한다. Integrin $\beta 4$ (ITGB4, CD104)는 다른 integrin과 달리 긴 cytoplasmic tail을 가지며 integrin $\alpha 6$ 와 함께 integrin $\alpha 6\beta 4$ 형태로 laminin에 결합해 hemidesmosome을 형성한다. ITGB4는 일반적으로 암에서 높게 발현하며 anchorage-independent growth와 invasion를 촉진하여 암발달을 촉진한다. Integrin $\beta 4$ 는 HGF에 의해 활성화된 Met에 의해 인산화 되면서 Shp2-Src-ERK 신호전달경로를 활성화하여 anchorage-independent growth를 촉진한다. ITGB4는 간암에서 EGFR함께 FAK-AKT 신호전달 경로 활성화를 통해 간암의 폐로 전이를 촉진한다. ITGB4는 또한 Slug발현을 통해 간암의 이동, 침입, 전이를 촉진한다. ITGB4의 발현이 높을수록 삼중음성 유방암, 췌장암, 비소세포 폐암에서 나쁜 예후를 보인다. ITGB4는 전립선암에서 암세포의 재발과 암 줄기세포성을 유지하는 분자이기도 하다. ITGB4는 또한 삼중음성 유방암에서 부분적인 중간엽성을 보이는 암줄기세포 마커로 알려졌으며 ZEB1과 TAp63 α 에 의해 발현이 조절되며 암 치료후에도 재발을 진단할 수 있는 중요한 분자이다.

[0008]

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 신뢰할 수 있는 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 간세포에 저분자 화합물을 처리하여 증식능력이 뛰어난 화합물 유래 간 줄기세포(human chemically derived hepatic progenitors, hCdHs)로 전환하는데 성공하였다. 하지만 모든 세포가 완전히 동일하게 전환된 상태가 아니므로 전체 세포군에서 간 줄기세포로 효율적으로 전환된 세포의 분리를 위해서는 간 줄기세포의 특이적인 표면마커 발굴이 필수적이다. 하지만 아직까지 간 줄기세포를 순수하게 분리해낼 수 있는 마커가 발굴되지 않았다. 우리는 이 발명에서 인간 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 세포등을 재생하는 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.

[0009]

본 발명자들은 준 만능줄기세포에서 기존에 알려진 방법대로 2i/L/X/F/P배지를 사용하여 순수 인간만능줄기세포로 유도하고, 그 세포들을 직접 생쥐에 주사하여 순수 인간만능줄기세포에 결합하는 단일클론항체 라이브러리를 제조하였다. 그들 항체군중에서 NPB24항체는 순수 인간만능줄기세포와 준 만능줄기세포에 동시에 결합하는 범용적인 만능성 줄기세포 표면마커 특성을 보인다. NPB24는 정상 세포인 말초혈액단핵구나 간세포에는 결합하지 않지만 간줄기세포 hCdHs나 간암을 포함한 다양한 암세포 표면에 잘 결합한다. NPB24 항원을 분석한 결과 NPB24는 간줄기세포, 배아암세포, 폐암, 간암세포에서 IP3R3를 면역침강시키는 항체임을 보여준다. 또한 NPB24는 같은 세포들에서 IP3R3와 더불어 ITGB4도 함께 면역 침강시킬 수 있으며 이는 IP3R3와 ITGB4사이의 물리적인 결합에 의한 것임을 보여준다. 우리는 이 발명에서 NPB24 항체를 이용할 경우 화합물로 유도한 간 줄기세포 혼합물에서 간 줄기세포를 효율적으로 분리할 수 있는 항체임을 보여준다. 특히 PODXL을 인식하는 항체 NPB11 (대한민국 특허출원 제10-2023-0100927호) 조합하여 사용할 경우 높은 효율로 혼합물에서 간 줄기세포만을 분리할 수 있으며 이렇게 분리한 간줄기세포는 섬유화 유발 세포가 현저히 제거되어 간줄기세포 이식에 적절한 줄기세포임을 제시한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 2235935호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제 2107602호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 신규 단일클론항체를 제공하는 것을 목적으로 한다.
[0013] 본 발명은 신규 단일클론항체를 포함하는 세포 검출용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
[0014] 본 발명은 신규 단일클론항체를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 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 단일클론항체.
[0017] 2. 위 1에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7의 서열을 갖는 단일클론항체.
[0018] 3. 위 1에 있어서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8의 서열을 갖는 단일클론항체.
[0019] 4. 위 1에 있어서, 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포의 표면 마커인 IP3R3에 결합하는 단일클론항체.
[0020] 5. 위 1의 단일클론항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.
[0021] 6. 위 5에 있어서, HCDR1을 인코딩하는 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드; HCDR2를 인코딩하는 서열번호 12의 폴리뉴클레오티드; HCDR3을 인코딩하는 서열번호 13의 폴리뉴클레오티드; LCDR1을 인코딩하는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드; LCDR2를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드; 및 LCDR3을 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드.
[0022] 7. 위 5에 있어서, 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열번호 17의 폴리뉴클레오티드 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열번호 18의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드.
[0023] 8. 위 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
[0024] 9. 위 1의 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마.
[0025] 10. 위 1 내지 4 중 어느 하나의 단일클론항체를 포함하는 IP3R3 발현 세포 검출용 조성물.
[0026] 11. 위 10에 있어서, IP3R3 발현 세포는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포인 IP3R3 발현 세포 검출용 조성물.
[0027] 12. 위 10의 조성물을 포함하는 IP3R3 발현 세포 검출 키트.
[0028] 13. 위 12에 있어서, 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 인간 암세포 및 간 줄기세포를 검출용 IP3R3 발현 세포 검출 키트.
[0029] 14. 위 1의 단일클론항체를 포함하는 암 진단용 조성물.
[0030] 15. 위 14에 있어서, 암은 인간 배아암, 폐암, 췌장암 또는 간암인, 암 진단용 조성물.
[0031] 16. 위 1의 단일클론항체를 치료에 처리하는 단계; 및 PODXL 항체를 상기 치료에 처리하는 단계를 포함하고, PODXL 항체는 서열번호 19의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 20의 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2) 및 서열번호 21의 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 22의 경쇄 상보성 결정영역 1(LCDR1), 서열번호 23의 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2) 및 서열번호 24의 경쇄 상보성 결정영역

3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 간 줄기세포의 선별 방법.

발명의 효과

- [0033] 본 발명의 단일클론항체는 순수 및 준 인간 만능줄기세포에 결합하고, 중간엽 줄기세포, 간세포 및 말초 혈액 단핵구에는 결합하지 않으므로 만능줄기세포 선별 수단으로 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 단일클론항체는 세포 표면의 IP3R3에 결합한다. 표면에 IP3R3를 발현하는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포 및 간 줄기세포의 검출 수단으로 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 단일클론항체는 암 세포의 표면에 발현된 IP3R3에 결합하므로 암의 진단 용도로 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 단일클론항체는 화합물 유래 간 줄기세포를 선별할 수 있다. 선별된 간 줄기세포는 고효율의 간세포와 담즙 상피세포로 분화할 수 있는 이분화능을 가지고 있으며 간 재생을 위한 간 줄기세포의 공급원으로 제공될 수 있어 간 질환 치료에 유용하다. 특히 NPB11 항체 (대한민국 특허출원 제10-2023-0100927호)와 함께 사용되는 경우 보다 효과적으로 간 줄기세포를 선별할 수 있으며, 이렇게 선별된 간 줄기세포는 섬유화가 현저히 제거되어 간 질환 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1A는 인간 만능줄기세포(hPSC)인 H9세포를 준 인간만능줄기세포 (primed H9)와 순수 인간만능줄기세포(naive H9)로 유도하는 3종의 배양배지 (2i/L/X/F/P, 2i/L/F/A, 5i/LAF)에서 배양한 것으로 순수 인간만능줄기세포 배지에서는 작은 돔(dome) 모양의 순수 H9 세포의 모양을 볼 수 있다.
- 도 1B는 준 인간만능줄기세포 (primed H9), 2i/L/F/A 또는 5i/LAF 배지에서 유도한 순수 인간만능줄기세포 (naive H9), 생쥐 배아섬유아세포 (MEF), 10^{-5} M Retinoic acid (RA-H9)를 7일 처리하여 분화를 유도한 H9 세포에서 NPB24의 발현 정도를 플로우 사이토메트리 (flow cytometry)로 확인한 것이다. 빨간 바탕은 음성대조군을 표현하며 실선은 NPB24가 결합하는 것을 나타낸 것이다.
- 도 2는 플로우 사이토메트리 (flow cytometry) 분석을 통해서 본 발명의 NPB24 항체가 각종 세포주 또는 일차 세포 (primary cell)에 결합하는 정도를 보여준다. 인간 배아암종세포 (NT-2/D1, 2102EP), 인간 배아신장세포 (HEK293FT), 인간 폐암세포 (A549, NCI-H460, Calu-3), 인간 췌장암세포 (PANC-1, BxPC-3, SNU-213), 인간 간암세포 (HepG2, Huh-7, SNU-387, SNU-449)등 대부분의 암세포 표면에서 NPB24 항체가 결합하는 정도를 보여준다. 또한 NPB24은 골수유래 중간엽 줄기세포 (BM-MSC), 정상 인간 간세포 (human primary hepatocytes, hPHs)와 말초 혈액 단핵구(PBMC)에는 결합하지 않지만 인간 간 줄기세포 (hCdHs)의 표면에 결합하는 것을 보여준다.
- 도 3은 NPB24의 항체 유전자를 클로닝하는 것으로 A는 NPB24 하이브리도마 세포의 cDNA로 부터 NPB24 항체의 중쇄, 경쇄의 가변영역의 DNA를 PCR을 통해 증폭한 것이다. B는 NPB24 항체 중쇄의 가변영역을 pBluescript KS+ 벡터에 클로닝하고 EcoR I 과 Sal I 제한효소로 절단하여 확인한 결과이다. C는 NPB24 항체 경쇄의 가변영역을 pBluescript KS+ 벡터에 클로닝하고 HindIII 과 Sal I 제한효소로 절단하여 확인한 결과이다.
- 도 4는 NPB24 중쇄 유전자 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)를 밑줄로 표시한 것이다.
- 도 5는 단일클론항체 NPB24 경쇄 유전자 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)를 밑줄로 표시한 그림이다.
- 도 6은 NPB24 하이브리도마 세포배양액에서 NPB24를 정제한 그림이고, A는 mouse IgM prepaced column (LigaTrap)을 통해 정제한 NPB24를 전기영동 후 PageBlue 염색을 통하여 순도를 확인한 것이다. B는 A에서처럼 정제된 NPB24를 웨스턴 블라팅후에 mIgM (μ chain-specific)-HRP 2차 항체를 이용하여 확인한 것으로 NPB24는 IgM 항체의 μ chain을 가지는 IgM 항체임을 확인한 것이다. C는 Protein G agarose beads로 정제한 NPB24를 전기영동 후 PageBlue 염색을 통하여 확인한 것이다. D는 C의 NPB24를 웨스턴 블라팅후에 mIgG-(H+L)-HRP 2차 항체를 이용하여 확인한 것으로 NPB24는 Kappa chain을 포함하지만 IgG heavy chain을 가지지 않는 항체임을 확인하는 것이다. E는 C의 NPB24 항체를 mIgM (μ chain-specific)-HRP 2차 항체를 이용하여 확인한 것으로

NPB24는 IgM 항체의 μ chain을 가지는 IgM 항체임을 재확인하는 것이다. HC는 immunoglobulin heavy chain, LC는 immunoglobulin light chain을 의미한다.

도 7은 키메라 NPB24 항체 제작을 위한 PCR에 의한 유전자 증폭그림으로, A는 중쇄 leader 서열(HC-SP1,2) 및 가변영역의 DNA 증폭 (VH1,2)이고, B는 재조합 PCR을 이용한 중쇄 signal peptide (SP) 서열과 가변영역 (VH)의 연결 그림이고, C는 경쇄 SP 서열 (LC-SP1,2) 및 가변영역 (Vk1,2)의 DNA 증폭이고, D는 재조합 PCR을 이용한 경쇄 SP서열과 가변영역 (Vk)의 연결그림이다.

도 8은 키메라 NPB24 항체 발현백터를 제조한 그림으로, A는 EcoR1/Apa1에 의해 절단된 키메라 NPB24 항체 중쇄 가변영역 (VH) 및 vector DNA이고, B는 HindIII/BsiWI에 의해 절단된 키메라 NPB24 항체 경쇄 가변영역 (Vk) 및 vector DNA그림이고, C는 완성된 키메라 NPB24 발현 벡터이다.

도 9는 키메라 NPB24 항체 아미노산 서열을 나타낸 것으로 A는 키메라 중쇄 아미노산 서열(서열번호 9), B는 키메라 경쇄 아미노산서열(서열번호 10)을 나타낸 것으로 신호서열과 항체 중쇄 및 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 NPB24 생쥐 단일클론항체의 가변영역과 인간 중쇄 불변영역(A)과 인간 경쇄 불변영역(B)이 바르게 연결된 것을 확인한 것이다.

도 10은 Chi-NPB24 항체를 정제하고 정제한 Chi-NPB24를 이용하여 hCdHs에 대한 결합을 분석한 그림으로, A는 인간 항체 IgG 대조군 및 키메라 항체 Chi-NPB24를 대상으로 SDS-PAGE 및 PageBlue염색을 수행한 결과이고 B는 상기 항체들을 대상으로 웨스턴 블랏팅을 수행한 결과로, 2차 항체는 인간 항체의 IgG 감마 사슬과 카파 사슬에 결합하는 것을 이용한 것이다. HC는 immunoglobulin heavy chain, LC는 immunoglobulin light chain을 의미한다. C는 Chi-NPB24를 이용한 플로우 사이토메트리 (flow cytometry) 결과로 NPB24와 동일하게 human primary hepatocytes (hPHs) 표면에는 결합하지 않지만 hCdHs, NT-2/D11, 2102Ep, A549, SNU449, SNU387 세포에 결합하는 것을 확인한 것이다.

도 11은 NPB24 항체가 면역침강하는 항원을 확인하는 그림으로 A는 바이오틴으로 세포표면을 표지한 2102Ep 세포용출액을 NPB24로 면역 침강 후 SDS-PAGE Gel에서 전개하고, 니트로셀룰로오즈 막으로 옮긴 후 streptavidin-horse raddish peroxidase(SA-HRP)로 NPB24 항원의 크기(화살표)를 확인한 그림이고, B는 2102Ep 세포를 NPB24로 면역 침강 후 PageBlue 염색을 한 뒤 LC-MS/MS 분석을 진행하기 위해 목표하는 항원의 크기(화살표)를 표시한 그림이고, C는 LC-MS/MS 결과로 얻은 펩타이드 서열이 Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (ITPR3)의 아미노산 서열과 일치하는 부분을 빨간색으로 표시한 그림이다.

도 12는 2102Ep(A), A549 (B), SNU-449 (C), hCdHs (D), fetal liver유래 hCdHs (E) 세포에서 NPB24, α -IP3Rs, α -IP3R3, Chi-NPB24 항체를 이용한 표적항원 면역침강 후 공지의 토끼 α -IP3Rs 또는 토끼 α -IP3R3 항체를 이용하여 면역침강된 단백질을 확인하는 그림이다. A는 2102EP 세포에서의 NPB24 (M)로 면역침강 후 웨스턴 블랏팅에서 IP3R1, IP3R2, IP3R3의 3종 단백질을 인식할 수 있는 α -IP3Rs 항체를 이용하여 확인한 결과, NPB24 항체가 IP3Rs 단백질을 침강시키는 것을 확인한 것이다. B에서는 폐암세포인 A549에서 Protein G bead를 통해 정제한 NPB24(G) 항체, Ligatrap column을 통해 정제한 NPB24(M) 항체, 키메라 NPB24 항체 Chi-NPB24, α -IP3Rs, α -IP3R3 항체로 면역침강한 단백질이 모두 IP3R3 항체에 의해 인식되어 NPB24 항체가 IP3R3 단백질을 침강시키는 것을 확인한 것이다. C에서는 간암세포인 SNU-449에서 NPB24(G), NPB24(M), Chi-NPB24 모두에서 α -IP3Rs나 α -IP3R3 항체와 동일하게 IP3R3 단백질을 침강시키는 것을 확인한 그림이다. D에서는 성간세포 유래 hCdHs 세포에서 NPB24(G), NPB24(M), Chi-NPB24에 의해 침강된 단백질이 IP3R3 항체와 동일한 단백질을 침강시키는 것을 확인한 그림이다. E에서는 인간 태아 간에서 분리하여 유도한 fetal liver 유래 hCdHs 세포에서 NPB24(G), NPB24(M), Chi-NPB24 등의 NPB24 항체군들에 의해 침강된 단백질들이 IP3R3 항체에 의해 검출되는 것을 확인한 그림이다. 화살표는 항체에 의해 면역침강된 IP3R3를 가리킨다.

도 13은 HEK293FT세포에 FLAG Tag를 가진 ITPR3-FLAG 발현백터를 외부형질도입 시켜준 뒤, Input, Isotype 항체, NPB24 (도14A) 또는 Chi-NPB24 (도14B), 항-IPRR3, 항-FLAG으로 각각 면역 침강 후 항-IP3R3과 항-FLAG로 동일한 위치에서 항원이 확인되는 것을 확인하여 NPB24와 키메라 항체인 Chi-NPB24 항체가 직접 IP3R3를 인식하여 면역 침강한다는 것을 확인한 그림이다. 화살표는 항체에 의해 면역침강된 IP3R3를 가리킨다.

도 14는 NPB24 항체가 면역 침강하는 항원을 확인하는 그림으로 A는 바이오틴으로 세포표면을 표지한 2102Ep 세포용출액을 NPB24와 Chi-NPB24로 면역 침강 후 SDS-PAGE Gel에서 전개하고, 니트로셀룰로오즈 막으로 옮긴 후 streptavidin-horse raddish peroxidase(SA-HRP)로 NPB24 항원의 크기를 확인한 그림이고, B는 2102Ep 세포를 NPB24로 면역 침강 후 PageBlue 염색을 한 뒤 LC-MS/MS 분석을 진행하기 위해 목표하는 항원의 크기를 표시한

그럼이고, C는 LC-MS/MS 결과로 얻은 펩타이드 서열이 Integrin $\beta 4$ (ITGB4)의 아미노산 서열과 일치하는 부분을 빨간색으로 표시한 그림이다.

도 15는 2102Ep (A), A549 (B), SNU-449 (C), hCdHs (D)세포에서 NPB24 및 Chi-NPB24 항체를 이용한 표적항원의 면역침강 후 공지의 토끼 α -ITGB4 항체를 이용하여 면역침강된 단백질을 확인하는 그림이다. A는 2102EP 세포에서의 NPB24 항체를 이용한 표적 단백질 침강 후 웨스턴 블라팅하고 ITGB4 항체를 이용하여 확인한 결과, Protein G 비드로 정제한 NPB24 (G) 항체, LigaTrap으로 정제한 NPB24 (M), Proetin G 비드로 정제한 키메라 NPB24 항체 (Chi-NPB24) 모두에서 ITGB4 단백질을 침강시키는 것을 확인한 것이다. 폐암세포 A549(B), 간암세포 SNU449(C), 간줄기세포 hCdHs(D) 에서도 NPB24(M) 항체를 이용하여 표적단백질 면역침강 후 웨스턴 블라팅하고 침강된 단백질을 ITGB4 항체를 이용하여 확인한 결과, 모두 ITGB4 단백질을 침강시키는 것을 확인한 그림이다. E 및 F는 A549 (E), SNU449 (F)세포에서 Chi-NPB24 항체를 이용한 표적항원 면역침강 후 공지의 토끼 α -ITGB4 항체를 이용하여 면역침강된 단백질 확인하는 그림으로 키메라 NPB24 항체(Chi-NPB24)가 NPB24와 동일하게 ITGB4 단백질을 침강시키는 것을 확인한 그림이다.

도 16는 폐암세포인 A549 세포와 간암세포인 SNU449 세포에서 토끼 α -IP3Rs, α -IP3R3, α -ITGB4 각각의 항체를 이용하여 면역침강된 단백질을 확인한 그림이다. A는 A549 세포에서 각 항체에 의해 면역침강된 단백질을 웨스턴 블라팅하여 토끼 α -IP3R3, 토끼 α -ITGB4 항체를 이용하여 확인한 결과이다. B는 SNU449 세포에서 각 항체에 의해 면역침강된 단백질을 웨스턴 블라팅하여 토끼 α -IP3R3, 토끼 α -ITGB4 항체를 이용하여 확인한 결과로 비록 ITGB4는 IP3R3을 침강시키지는 못하지만 IP3R3은 ITGB4 단백질을 침강시키는 것을 볼 수 있고 이는 IP3R3과 ITGB4 단백질이 서로 물리적으로 결합하는 것을 보여주는 것이다.

도 17은 화합물 유래 간 줄기세포 (hCdHs), 인간 일차 간세포 (human primary hepatocytes, hPHs), 화합물 유래 간 줄기세포 분화 간세포 (hCdH-Heps), 섬유화 hCdHs (Fibrotic hCdHs), 인간 진피 섬유화 세포 (Human Dermal Fibroblasts, HDF), 인간 신생아 표피 섬유화 세포 (Neonatal Human Foreskin Fibroblasts, hNuFF), 인간 체대혈 유래 중간엽 줄기세포(human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs), 지방 유래 성체줄기세포 (Adipose-derived mesenchymal stem cells, Adipose-MSCs)에 NPB24 항체를 사용한 면역세포화학염색법(Immunocytochemistry)을 통해 각 세포 표면 결합 여부를 형광으로 확인한 그림으로 빨간색 형광이 NPB24의 결합을 나타내고 Hoechst염색은 세포의 핵을 파란색으로 염색한 것이다. 스케일 바=50 μ m을 나타낸다.

도 18의 A는 화합물 유래 간 줄기세포를 NPB24 항체에 비드를 붙여 MACS로 음성(unlabeled)과 양성(labeled) 세포군으로 분리하고 형태학적 변화 (스케일 바=100 μ m)를 나타낸 것이다. B는 플로우 사이토메트리(flow cytometry) 분석을 통해서 본 발명의 NPB24으로 분리된 화합물 유래 간 줄기세포의 분리 효율을 보여준다.

도 19는 플로우 사이토메트리 (flow cytometry)로 NPB11과 Chi-NPB24를 이용하여 hCdHs를 NBP11과 Chi-NPB24로 이중염색을 수행하여 동시에 NPB11과 Chi-NPB24에 염색되는 세포군을 보여준 것이다.

도 20의 A는 화합물 유래 간 줄기세포의 순도를 높이기 위해 1차로 NPB11 항체에 비드를 붙여 MACS로 NPB11 양성세포를 분리하고 이 세포를 다시 NPB24 항체에 비드를 붙여 MACS로 2차로 추가 분리하여 분리한 음성(unlabeled)과 양성 세포군 (labeled)의 형태학적 변화 (스케일 바=100 μ m)를 나타낸 것이다. B는 플로우 사이토메트리(flow cytometry) 분석을 통해서 NPB11 항체에 의해 1차로 분리한 후에 다시 NPB24 항체에 의해 분리된 화합물 유래 간 줄기세포의 NPB24 양성세포의 분리 효율을 보여준다.

도 21은 화합물 유래 간 줄기세포의 순도를 높이기 위해 1차로 NPB11 항체에 의해 분리된 양성 세포를 NPB24 항체로 2차 분리한 음성/양성 세포군의 간 줄기세포 마커 단백질의 면역세포화학 형광분석 결과이다 (스케일 바=50 μ m).

도 22는 화합물 유래 간 줄기세포의 순도를 높이기 위해 1차로 NPB11 항체에 의해 분리된 양성 세포를 NPB24 항체로 2차 분리한 NPB11/NPB24 항체 음성/양성 세포군에서 간 줄기세포 마커의 상대적 유전자 발현 수준의 정량적 비교 결과(데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로 나타냄)를 나타낸 것이다. **은 $p<0.01$, ****은 $p<0.0001$ 을 나타낸다.

도 23은 화합물 유래 간 줄기세포의 순도를 높이기 위해 1차로 NPB11 항체에 의해 분리된 양성 세포를 NPB24 항체로 2차로 분리한 NPB11/NPB24 항체 음성/양성 세포군에서 세포 섬유화 관련 마커의 상대적 유전자 발현 수준의 정량적 비교 결과(데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로 나타냄)를 나타낸 것이다. ns는 not significant, ****은 p value <0.0001 를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 본 발명은 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 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2) 및 서열번호 6의 경쇄 상보성 결정영역 3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단일클론항체를 제공한다.
- [0040] 본 발명의 단일클론항체는 IP3R3에 결합한다. IP3R3는 IP3 receptor subtype 3를 의미한다. 본 발명에서 '단일클론항체'는 'IP3R3 항체', '항-IP3R3 항체' 및 'IP3R3 단일클론항체'로 표현될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 단일클론항체에는 상보성 결정 부위(CDR)가 동일한 IgG1 내지 IgG4의 IgG 서브클래스의 형태뿐만 아니라, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등의 항체 분자의 기능적 단편도 포함한다.
- [0042] 본 발명의 단일클론항체에는 키메라 항체, 인간화 항체 등이 포함된다.
- [0043] 일 실시예에서 본 발명의 단일클론항체는 'NPB24 항체', 'NPB24' 또는 'Chi-NPB24 항체'이다.
- [0044] IP3R3 항체는 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 간 줄기세포 및 암 세포의 표면 IP3R3 단백질에 결합한다.
- [0045] 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.
- [0046] 순수 인간만능줄기세포는 작은 돔 모양으로 개별 세포들이 분리되어 성장한다는 측면에서 콜로니와 유사한 형태로 성장하는 준 만능줄기세포와 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.
- [0047] 간 줄기세포는 일차 간세포(human primary hepatocytes, hPHs)에 특정 화합물을 처리하여 간세포로 분화될 수 있도록 역분화된 줄기세포를 의미하는 것일 수 있다. 간 줄기세포는 인간 화합물 유래 간 줄기세포(human chemically derived hepatic progenitors, hCdHs)라고 할 수도 있다.
- [0048] 암세포는 IP3R3를 세포표면에 발현하는 것이며 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 인간배아암, 신경모세포종, 자궁암, 신장암, 전립선암, 유방암, 대장암, 위암, 담도암, 신장암, 방광암, 난소암, 뇌종양 등이 있다.
- [0049] 본 발명의 IP3R3 항체는 서열번호 1 내지 6의 중쇄 및 경쇄 CDR을 가지면 그 외의 서열은 특정의 것으로 한정되지 않는다. 예컨대 본 발명의 IP3R3 항체의 중쇄 서열은 서열번호 7의 중쇄 가변영역의 서열(도 4)을 포함하는 것일 수 있고, 본 발명의 IP3R3 항체의 경쇄 서열은 서열번호 8의 경쇄 가변영역의 서열(도 5)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0050] 서열번호 1 내지 8의 아미노산 서열은 표 1과 같다.

표 1

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

8	Asp Ile Val Ile Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile His Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
---	--

- [0053] 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 IP3R3에 특이적으로 결합한다.
- [0054] 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.
- [0055] 본 발명은 IP3R3 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0056] '폴리뉴클레오타이드'는 '핵산', '핵산 분자' 및 '올리고뉴클레오타이드'와 상호 교환적으로 사용된다.
- [0057] 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥 형태나 이중 가닥 나선(helix)으로의 리보뉴클레오사이드(아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘; "RNA 분자") 또는 데옥시리보뉴클레오사이드(데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시티민 또는 데옥시시티딘)의 인산 에스테르의 중합체 형태 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 및 티오에스테르와 같은 이의 임의의 인산 에스테르 유사체를 포함한다.
- [0058] 이중 나선 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 나선이 가능하다. DNA 또는 RNA 분자는 상기 분자의 일차 및 이차 구조만을 지칭하며 어느 특정 삼차 형태에 제한되지 않는다.
- [0059] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 HCDR1을 인코딩하는 서열번호 11의 폴리뉴클레오타이드; HCDR2를 인코딩하는 서열번호 12의 폴리뉴클레오타이드; HCDR3을 인코딩하는 서열번호 13의 폴리뉴클레오타이드; LCDR1을 인코딩하는 서열번호 14의 폴리뉴클레오타이드; LCDR2를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오타이드; 및 LCDR3을 인코딩하는 서열번호 16을 포함하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0060] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 중쇄 가변영역을 인코딩하는 서열번호 17의 폴리뉴클레오타이드 및 경쇄 가변영역을 인코딩하는 서열번호 18의 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0061] 서열번호 11 내지 18의 폴리뉴클레오타이드 서열은 표 2와 같다.

표 2

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

- [0064] 본 발명은 IP3R3 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0065] '벡터'는 핵산을 시험관 내(in vitro), 생체 외(ex vivo) 또는 생체 내(in vivo) 세포로 도입하기 위한 바이러스성 및 비바이러스성 운반체를 포함한다.
- [0066] 본 발명은 IP3R3 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.
- [0067] 하이브리도마는 2개의 다른 종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 세포이다. 하이브리도마는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 등 세포융합을 일으키게 하는 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. 하이브리도마에는 하이브리도마 세포 또는 하이브리도마 세포주가 포함된다.
- [0068] 본 발명의 일 실시예는 단일클론항체를 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.
- [0069] 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.
- [0070] 본 발명의 일 실시예에서는 하이브리도마의 배양 배지를 단백질 G-agarose 비즈를 이용한 친화성 크로마토그래피로 정제할 수 있다.
- [0071] 본 발명은 IP3R3 항체를 포함하는 IP3R3가 발현된 세포 검출용 조성물을 제공한다.
- [0072] IP3R3가 발현된 세포란 어떠한 세포든 본 발명의 IP3R3 항체가 인식가능한 항원인 IP3R3 단백질이 세포 표면에 발현된 세포를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서 순수 인간만능줄기세포, 준 인간만능줄기세포, 간 줄기세포 및 암세포에 결합하는 항체를 제조하였고, 이 항체의 항원이 IP3R3 인 것을 확인하였다. 본 발명의 IP3R3 항체가 세포표면의 IB4AP를 인식하여 이와 결합하므로 항원-항체 반응에 의해 IP3R3가 발현된 세포를 검출할 수 있다.
- [0073] 본 발명은 IP3R3 항체를 포함하는 IP3R3가 발현된 세포 검출 키트를 제공한다.
- [0074] 본 발명의 항체 및/또는 항체를 포함하는 조성물은 항원-항체 복합체 반응을 통해 이식될 또는 이식된 세포 중의 인간만능줄기세포 또는 간 줄기세포를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라 인간만능줄기세포 또는 간 줄기세포를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.
- [0075] 검출 키트는 본 발명의 IP3R3 항체 및 면역학적 분석에 사용되는 통상적인 도구, 시약 등을 포함한다. 통상적인 도구, 시약은 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [0076] 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, agarose 및 이들의 조합과 같은 불용성 담체일 수 있다.
- [0077] 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), 플로우 사이토메트리(flow cytometry), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.
- [0078] 본 발명은 IP3R3 항체를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다. IP3R3 항체는 암세포의 IP3R3 단백질에 특이적으로 결합하고, IP3R3 단백질은 다양한 암세포에서 과발현되는 양상을 보이므로, 대상 세포에서 IP3R3 항원이 확인되면 해당 세포는 암세포일 확률이 높다.

- [0079] IP3R3 항체를 포함하는 조성물을 IP3R3를 발현하는 암세포에 처리하면 IP3R3 항체는 암세포의 IP3R3 항원과 결합하여 항원-항체 복합체를 형성하게 되므로, IP3R3 항체에 결합하는 암세포와 IP3R3 항체에 결합하지 않는 정상 세포로 분류할 수 있다.
- [0080] 또한 본 발명은 IP3R3 항체 및 PODXL 항체를 시료에 처리하는 단계를 포함하는 간 줄기세포의 선별 방법을 제공한다.
- [0081] PODXL 항체는 서열번호 19의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 20의 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2) 및 서열번호 21의 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 22의 경쇄 상보성 결정영역 1(LCDR1), 서열번호 23의 경쇄 상보성 결정영역 2(LCDR2) 및 서열번호 24의 경쇄 상보성 결정영역 3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [0082] PODXL은 포도칼릭신-유사 단백질 1(Podocalyxin like protein 1)을 의미한다. 'PODXL 항체'는 PODXL 단백질을 항원으로 인식하는 항체를 의미하며 '항-PODXL 항체' 및 'PODXL 단일클론항체'도 같은 의미이다.
- [0083] 'PODXL 항체'에는 상보성 결정 부위(CDR)이 동일한 IgG1 내지 IgG4의 IgG 서브클래스(subclass)의 형태뿐만 아니라, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등의 항체 분자의 기능적 단편도 포함한다.
- [0084] 'PODXL 항체'에는 키메라 항체, 인간화 항체 등이 포함된다.
- [0085] 'NPB11 항체'는 PODXL 항체의 일 실시예이다.
- [0086] 본 발명의 PODXL 항체는 서열번호 19 내지 24의 중쇄 및 경쇄 CDR을 가지면 그 외의 서열은 특정의 것으로 한정되지 않는다. 예컨대 PODXL 항체의 중쇄 서열은 서열번호 25의 중쇄 가변영역의 서열을 포함하는 것일 수 있고, PODXL 항체의 경쇄 서열은 서열번호 26의 경쇄 가변영역의 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0087] 서열번호 19 내지 26의 아미노산 서열은 표 3과 같다.

표 3

[0088]

서열 번호	아미노산 서열
19	Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Val Met Ser
20	Thr Ile Ser Gly Ser Glu Asn Tyr Met Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
21	His Ala Gly Tyr Tyr Glu Gly Glu Gly Met Asp Tyr
22	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Asn Leu His
23	Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
24	Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Leu Thr
25	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
26	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 Gly 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

- [0090] PODXL 항체와 IB4AP 항체를 같이 처리하면 간 줄기세포를 더 효과적으로 선별 또는 분리할 수 있다. PODXL 항체로 먼저 분리하고, IP3R3 항체로 분리할 경우 보다 효율적이지만, 분리 순서에 제한이 있는 것은 아니다.
- [0091] 이하, 본 발명을 실시예로 보다 구체적으로 설명한다.

[0093] 실시예1. 인간만능줄기세포의 배양 및 순수 인간만능줄기세포의 확립

[0094] 인간 준 만능줄기세포 (primed human pluripotent stem cell. Primed hPSC) H9은 Wicell Research Institute에

서 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, 100U/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. "순수 인간만능줄기세포(naive hPSC)" 라는 용어는 준 인간만능줄기세포 (primed hPSC)와는 다른 순수 인간만능줄기세포의 마커들을 발현하는 줄기세포를 의미하는 것으로서, ground 상태, 또는 intermediate, formative 같은 상태의 준 만능줄기세포와는 다른 마커들을 발현하는 줄기세포를 의미한다. 준 인간만능줄기세포 H9 (primed hPSC)를 이용하여 순수 인간만능줄기세포 (naive hPSC)로 전환을 유도하였으며 구체적인 프로토콜은 기존에 공지된 방법에 따랐다. 먼저 준 인간만능줄기세포 H9를 콜라게나아제 IV (1mg/ml)로 5분 간 처리하고, 황색 틱을 이용하여 적절한 크기로 자른 후에 미리 깔아둔 MEF 위에 옮겼다. 다음날 2i/L/X/F/P 배지 (1 μ M PD0325901, 3 μ M CHIR99021, hLIF(20ng/ml), 4 μ M XAV939, 10 μ M Forskolin, 2 μ M Purmorphamine, 20% (v/v) KOSR, DMEM/F12, 1% (v/v) L-글루타민, 1% (v/v) NEAA, 0.1mM β -머캅토에탄올, 1x 페니실린/스트렙토마이신) (Zimmerlin et al., 2016, Development 143:4368), 2i/L/F/A 배지 (1 μ M PD0325901, 3 μ M CHIR99021, hLIF(1000U/ml), 10 μ M Forskolin, 아스코르브산(50ng/ml), bFGF(16ng/ml), 20% (v/v) KOSR, KO-DMEM, 1% (v/v) L-글루타민, 1% (v/v) NEAA, 0.1mM β -머캅토에탄올, 1x 페니실린/스트렙토마이신) (Duggal et al., 2015, Stem Cells 33:2686), 또는 5i/LAF 배지 (DMEM/F-12 and Neurobasal (1:1) medium, 1X N2 supplement, 1X B27 supplement, 1% NEAA, 1 mM GlutaMAX, Penicillin-streptomycin, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 50 μ g/mL BSA, 0.5% KSR, 10 ng/mL bFGF, 20 ng/mL Activin A, 20 ng/mL recombinant human LIF, 1 μ M PD0325901 (MEKi), 0.5 μ M IM-12 (GSKi), 0.5 μ M SB590885 (B-Rafi), 1 μ M WH-4-023 (SRCi), 10 mM Y-27632 (ROCKi))(Bruno Di Stefano et al., 2018, Nature methods, 15, 732-749) 배양액으로 교체하였다. 2i/L/X/F/P 배지에서 5% (v/v) 산소 배양기에서 배양한 인간 순수 만능줄기세포는 3~5일 후 돔 모양의 순수만능줄기세포 형태로 변하였고, 2i/L/F/A와 5i/LAF배지에서도 돔모양의 순수만능줄기세포로 변하는 것을 확인하였다 (도 1A). 확립된 순수 만능줄기세포 H9 세포는 3~4일 간격으로 0.05% (v/v) 트립신-EDTA (Welgene, Gyeongsan, Korea)를 이용하여 계대 배양하였다 (Choi et al., PLoS One. 17(6):e0269547 (한국등록 특허 제 10-2235935호, 제10-2344948호). 이렇게 확립한 순수만능줄기세포를 사용하여 항체 라이브러리를 제조하기 위한 면역주사 실험에 사용하였다.

[0096] 실시예 2. NPB24 하이브리도마 제조

[0097] 2-1. 순수 인간만능줄기세포에 특이적 항체 제조를 위한 면역주사

[0098] 순수 인간만능줄기세포에 대한 단일클론항체를 제조하기 위해 생쥐 발바닥에 2i/L/X/F/P 배지에서 유도한 순수 인간만능줄기세포들을 면역 주사하였으며 구체적인 프로토콜은 기존에 잘 기술된 방법에 따랐다 (한국등록특허 제 2235935호). 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 하이브리도마를 선별하였다.

[0100] 2-2. 순수 만능줄기세포에 대한 결합 특이성 분석 및 NPB24클론 선발

[0101] 항체가 발현되는 클론을 선발하기 위하여 샌드위치 ELISA(Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법

을 사용하였다. 포획 항체(Capture antibody)인 항-마우스 IgG 또는 IgM 항체를 2 $\mu\text{g/ml}$ 로 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 100 μl 을 첨가해 37°C에서 1 시간 반응시키고, PBST (0.05% (v/v) Tween-20 in PBS)로 3 회 세척 후 다시 항-마우스 IgG-HRP 또는 항-마우스 IgM-HRP(horseradish peroxidase, Sigma-Aldrich)의 1/5,000 희석액과 1시간 더 반응시켰다. PBST로 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 flow cytometry 분석을 통해 먼저 순수 인간만능줄기세포에 결합하는 하이브리도마를 선별 하였고 이들 중에서 준 인간만능줄기세포와 순수 인간만능줄기세포에 동시에 결합하는 하이브리도마를 선별하였 다. 만능줄기세포에 대한 flow cytometry 분석을 위해서는 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum (VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40 μm 스트레 이너 (SPL, Pocheon, Korea)에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 각 단일세포를 ml당 약 1×10^6 개씩 PBA (1% bovine serum albumin, 0.02% NaN_3 in PBS)에 섞은 후, 항체 상층액을 4°C에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC 또는 항-마우스 IgM-FITC (Invitrogen)를 4°C에서 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. 그 결과로 준 인간만능줄기세포와 순수 인간만능줄기세포에 동시에 결합하는 하이브리도마를 33종 선별하였으며 이들을 2회 이상 서브클로닝하여 안정 적인 클론을 확보하였다. 이들 항체중에서 단일클론항체 NPB24는 생쥐 배아섬유아세포(MEF)에는 결합하지 않지만 준 인간만능줄기세포와 순수 인간만능줄기세포(2iL/F/A, 5i/LAF)에 동시에 결합하였다 (도 1B). 준 인간만능 줄기세포를 10^{-5} M 레티노산 (all-trans-retinoic acid, Sigma-Aldrich)으로 7일 처리하여 분화를 유도한 후 NPB24 결합 여부를 분석하였을 때 여전히 잘 결합하였다(도 1B). 이런 결과로 볼 때 NPB24 항원은 순수 및 준 만능줄기세포에서 발현하고 준 만능줄기세포가 분화되어도 발현을 유지하는 항원임을 알 수 있다. Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit(BD Biosciences)를 사용하여 공급자에 프로토콜에 맞춰 isotyping을 수행 한 결과 NPB24는 IgM과 κ 사슬을 가진 단일클론항체임을 알 수 있다 (표 4).

표 4

Isotyping	Heavy chain						Light chain	
	α -IgG1	α -IgG2a	α -IgG2b	α -IgG3	α -IgM	α -IgA	α -Ig κ	α -Ig λ
Positive antigen mixture	1.37	1.345	1.225	1.241	1.206	1.249	1.164	1.22
NPB24	0.165	0.117	0.113	0.159	1.188	0.111	1.152	0.078

실시예 3. NPB24의 각종 암세포와 정상세포에 대한 결합 특이성 분석

NPB24의 각종 세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)를 상기 실시예 2-2 처럼 수행하였다. 다양한 암세포와 정상세포를 0.05% Trypsin-EDTA (Welgene)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40 μm 스트레이너(SPL)에 통과시켜 단일세포로 준비 하였다. 각 단일세포를 ml당 약 1×10^6 개씩 PBA에 섞은 후, 항체 NPB24를 4°C에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2 번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgM-FITC (Invitrogen)를 4°C에서 20분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur 또는 FACSCanto와 FlowJo 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI (propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. NPB24는 배아 암세포(NT-2/D1, 2102Ep), 인간 폐암 세포(A549, NCI-H460, Calu-3), 인간 췌장암세포(BxPC-3), 인간 간암세포(Huh7, SNU387, SNU449)표면에 결합하 였다. 또한 화합물로 유도한 인간 간 줄기세포 (hCdHs)의 표면에 잘 결합하였지만 골수유래 중간엽 줄기세포 (BM-MSC), 정상 인간 간세포 (human primary hepatocytes, hPHs)에는 결합하지 않고 정상 말초혈액 단핵구에 도 결합하지 않았다 (도 2, 표 5). 이런 결과를 바탕으로 NPB24를 이용한 상피성 표현형의 새로운 hCdHs 표면마 커 발굴 가능성을 분석하였다.

표 5

Cell lines		Surface binding
Primed H9	Human embryonic stem cell, primed state	+++
Naive H9	Human embryonic stem cell, naive state	+++

MEF	Mouse embryonic fibroblast	-
RA-H9	Retinoic acid-treated primed H9	+++
NT-2/D1	Human embryonal carcinoma stem cell	+++
2102Ep	Human embryonal carcinoma stem cell	+++
HEK293FT	Human embryonic kidney cell	-
A549	Human non-small cell lung carcinoma	+++
NCI-H460	Human non-small cell lung carcinoma	+++
Calu-3	Human non-small cell lung carcinoma	++
PANC-1	Human pancreatic adenocarcinoma cell	-
BxPC-3	Human pancreatic adenocarcinoma cell	++
SNU-213	Human pancreatic adenocarcinoma cell	-
HepG2	Human hepatocellular carcinoma cell	-
Huh7	Human hepatocellular carcinoma cell	+++
SNU-387	Human hepatocellular carcinoma cell	++
SNU-449	Human hepatocellular carcinoma cell	+++
hCdHs	Human chemical-derived hepatic progenitors	+++
hPHs	Human primary hepatocytes	-
PBMC	Human peripheral blood mononuclear cell	-
BM-MSC	Human bone marrow-mesenchymal stem cell	-
+++ , strong binding; ++ , medium binding; + , weak binding; - , no binding		

[0108] 실시예 4. NPB24의 항체유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

[0109] NPB24항체의 특성을 분석하고 항원 결합부위를 분석하기 위해 먼저 항체 유전자를 클로닝하고 Complementarity Determining Region(CDR) 부위의 염기서열을 결정하였다. 구체적으로, 왕성하게 자라는 하이브리도마 NPB24 세포 클론 5×10^6 개를 원심 분리하여 수확한 후 RNAiso plus reagent (TaKaRa, Otsu, Japan) 로 공급자의 프로토콜에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 얻어진 전체 RNA는 OD260nm 값을 측정하여 RNA 양을 정량하였다. 전체 RNA를 PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa)을 넣어 역전사중합효소 연쇄반응혼합액을 만들어 cDNA를 합성하였다. 항체 유전자를 클로닝하기 위해서는 알려진 중합효소연쇄반응 프라이머를 변형한 후 사용하였다 (Wang, et al 2000, J. Immunol. Methods 233:167). 상기에서 합성된 cDNA로 항체 중쇄(Heavy chain) 클로닝을 위해서는 IgM 아형 항체인 NPB24의 불변 영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 염기서열 IgM:5'-gga gtc gac GAC ATT TGG GAA GGA CTG ACT CTC-3' 올리고뉴클레오타이드 10 pmole과 중쇄 가변영역 N말단에 해당하는 프라이머인 염기서열 5'MH1: 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC-3'과 5'MH2: 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3' 올리고뉴클레오타이드를 넣고 연쇄 중합반응혼합액을 만들었다. 경쇄 (light chain) 클로닝을 위해서는 카파 사슬(kappa chain) 불변 영역에 해당하는 프라이머인 3'Ck: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'를 사용하였다. 중합효소연쇄반응 생산물의 효율적인 클로닝을 위하여 경쇄의 경우는 3'프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였고, 5'-프라이머의 경우 HindIII 제한효소자리를 부여하였다. 중쇄의 경우에는 5'-프라이머에는 EcoRI, 3'-프라이머에는 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄 및 경쇄 반응액을 각각 섞은 후 먼저 95℃에서 1분, 35℃ ~ 45℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 30회 반응시킨 결과 약 400bp의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 증폭하였다 (도 3A). 증폭해낸 NPB24 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 중합효소 연쇄반응물을 중쇄는 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄는 HindIII 와 SalI으로 처리한 후 1.0% (w/v) agarose 겔에 전개시켜 FavorPrep Gel™PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan)을 이용하여 약 400bp 와 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, USA)로 연결하고 대장균 DH5 α 에 RbCl₂ 방법으로 형질 전환하였다. 그 결과 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA삽입물을 가진 클론, 경쇄의 경우 약 390bp 크기를 가진 대장균 클론들을 선발하였다 (도 3B, 3C). 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 50 μg/ml의 암피실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA-Spin plasmid mini prep kit(Intron, Korea)를 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의

염기서열을 Nucleotide sequencing(Bionics, Korea) 통해 확인하였다. 확인한 중쇄 및 경쇄 DNA 염기서열을 아미노산으로 번역 후 항체 구조에 따른 항원 인식 결정 부위인 CDR부분을 Kabat넘버링을 통해 정리하여 서열에 CDR 1, 2, 3으로 표시하였다. 항체서열을 비교 분석한 결과, NPB24 항체의 중쇄는 서브그룹 IIB에 속하고 (도 4), 경쇄는 서브그룹 III에 속하는 기능적인 항체구조를 가진 것을 확인하였다 (도 5).

[0111] 실시예 5. NPB24항체의 정제

[0112] NPB24 하이브리도마 세포배양액 속의 항체만을 특이적으로 획득하기 위하여 mouse IgM prepaced column (LigaTrap, USA) affinity 크로마토그래피 방법을 통해 공급자의 프로토콜에 맞춰 단일클론항체 IgM을 분리 및 정제하였다. 구체적으로 하이브리도마 세포배양액을 Column내의 beads와 잘 결합시키기 위하여 Sample Diluent buffer (50mg/ml Adipic Acid, 4.0M NaCl, pH 5.8) 용액과 4:1의 비율로 혼합하였다. 이 후 튜브연동식 펌프와 Column을 결합한 후 0.2ml/min의 속도로 희석한 세포배양액을 통과시켰다. Beads에 결합한 생쥐 IgM 항체만을 특이적으로 분리하기 위하여 약 10 ~ 15 ml의 Wash buffer (10mg/ml Adipic Acid, 800mM NaCl, pH 5.8)를 이용하여 column 내의 beads를 세척 후 Elution buffer (500mM Sodium Acetate, pH 3.8) 10ml 과 Neutralization buffer (3.0M Tris-Base, pH 11.1) 1.25ml을 이용하여 생쥐 IgM 항체만을 특이적으로 용출하였다. 이후 SDS-PAGE와 PageBlue염색법을 통해 정제한 NPB24 (mIgM) 항체의 순도를 확인하였다 (도 6A). 또한, 염소의 항-생쥐 중쇄 항체(goat- α -mIgM- μ chain-specific-HRP, Invitrogen)를 2차 항체로 이용하여 웨스턴 블랏팅을 통해 검출한 결과, 상기 NPB24 항체는 생쥐 IgM 항체의 μ chain(75kDa)을 가지고 있는 항체인 것을 확인할 수 있고 쉽게 55 kDa로 분해되는 것을 확인하였다 (도 6B).

[0113] Protein G agarose beads를 이용한 NPB24항체 정제과정도 또한 진행하였다. 이를 위해 수집한 세포 배양 배지를 Protein G agarose beads (Amicogen, Korea)로 채워진 column에 넣어 주어 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) 1ml을 넣어 Protein G agarose beads에서 항체를 용출하였다. 이후 SDS-PAGE와 PageBlue염색법을 통해 정제한 NPB24 키메라 항체의 순도를 확인하였다 (도 6C). 항-생쥐 항체 (goat- α -mIgG-(H+L)-HRP)를 2차 항체로 이용하는 경우 IgG chain은 검출되지 않았으며 약 25kDa의 kappa chain 만이 검출되어 NPB24는 IgG (gamma chain)을 가지고 있지 않은 IgM 타입의 항체임을 확인할 수 있었다 (도 6D). 염소의 항-생쥐 중쇄 IgM 항체(goat- α -mIgM- μ chain-specific-HRP, Invitrogen)를 2차 항체로 이용한 웨스턴 블랏팅에서는 IgG 중쇄가 아닌 IgM 중쇄 (75, 55kDa)항체를 검출할 수 있어, 상기 NPB24 항체는 생쥐 IgM 항체의 μ chain을 가지고 있는 항체인 것을 확인할 수 있다 (도 6E).

[0115] 실시예 6. NPB24의 CDR을 가지는 키메라 Chi-NPB24항체의 설계 및 발현 벡터 제조

[0116] NPB24항체는 mouse IgM type으로 사용에 불편함으로 항체 응용성을 증가시키기 위해 중쇄와 경쇄 가변영역 전체는 생쥐 항체로부터 유래하고, 불변영역은 인간 항체 IgG1으로부터 유래하는 키메라 항체(chimeric antibody)를 제조하였다. 키메라 항체를 제조하기 위하여, 먼저 생쥐 유래의 NPB24 항체의 중쇄 및 경쇄 유전자를 대상으로, PCR을 수행하고 FavorPrep Gel™PCR Purification Kit(Favorgen)을 이용하여 약 400 bp와 390 bp의 DNA를 분리하였다. 그리고 중쇄 유전자 앞에 붙인 신호 펩타이드 서열(SP, signal peptide)을 합성하기 위하여 pdCMV-dhfr 벡터(한국 특허출원 제 10-2021-0079629호)를 주형으로 하여 h2B7-H.C-SLIC-5' (5'-GCC AGT GTG CTG GAA TTC ACT CTA ACC-3') 프라이머와 NPB24-Chu-HC-SP-3' (5'-CTT AAC TTC GGA GTG GAC ACC TGT AGT TA-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그리고 NPB24의 중쇄 가변영역을 증폭하기 위해 중쇄 가변영역의 DNA를 주형으로 하여 NPB24-Chi-HC-VH-5' (5'-GTC CAC TCC GAA GTT AAG CTG GAG-3') 프라이머와 NPB24-Chi-HC-3' (5'-CCT TGG TGG AGG CTG CAG AGA CAG TGA C-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다 (도 7A). 다시 중쇄 신호 펩타이드 서열과 NPB24 항체의 중쇄 가변 영역을 연결하기 위해, 상기 PCR로 제조한 DNA를 섞어 주형으로 하고 h2B7-H.C-SLIC-5' 프라이머와 H2B7-HC-SLIC-3' (5' -AAG ACC GAT GGG CCC TTG GTG GAG-3') 프라이머를 이용하여 recombinant PCR을 수행하였다. PCR 결과물을 1% agarose 겔에 전개시킨 결과 중쇄 가변영역(VH) 과 중쇄 신호 펩타이드(SP) 서열이 연결된 약 450bp에 해당하는 DNA를 확인할 수 있었다 (도 7B). 이를 FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit(Favorgen)를 이용하여 분리하고 EcoRI 과 ApaI으로 처리한 후 다시 한번 FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit을 이용하여 분리하였다. 이를 인간의 중쇄 불변영역 (IgG1) 유전자를 포함하고 있는 pdCMV-dhfr 벡터 (한국 특허출원 제 10-2021-0079629호)의 EcoRI과 ApaI 자리에 T4 DNA 연결효소(NEB)를 사용하여 삽입하였다 (도 8A, 8C).

[0117] 경쇄 유전자 앞에 붙일 신호 펩타이드 서열(SP)을 합성하기 위하여 pdCMV-dhfr 벡터를 주형으로 하여, h2B7-L.C-SILC-5' (5'-ATA GGG AGA CCC AAG CTT CGG CAC GAG CAG A-3') 프라이머와 NPB24-Chi-LC-SP-3' (5'-GAT CAC AAT ATC TCC TTC AAC ACC AGA CA-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그리고 NPB24 항체의 경쇄 가변영역을 증폭하기 위해 경쇄 가변 영역의 DNA를 주형으로 NPB24-Chi-L.C-vk-5' (5'-GTT GAA GGA GAT ATT GTG ATC ACC CAA TC-3') 프라이머와 Chi63-B6-LC-SLIC-3' (5'-TGG TGC AGC CAC CGT ACG TTT GAT TTC CA-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다 (도 7C). 다시, 경쇄 신호 펩타이드 서열(SP) 과 NPB24 항체의 경쇄 가변 영역(Vk)을 연결하기 위해, 상기 PCR로 제조한 DNA를 섞어 주형으로 하고 h2B7-L.C-SLIC-5' 프라이머와 Chi63-B6-LC-SLIC-3' 프라이머를 이용하여 recombinant PCR을 수행하였다. PCR 결과물을 1% agarose 겔에 전개시킨 결과 경쇄 가변영역(Vk)과 경쇄 신호펩타이드 서열(SP)이 연결된 약 430bp에 해당하는 DNA를 확인할 수 있었다 (도 7D). 이를 FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit를 이용하여 분리하고 HindIII와 BsiwI로 처리한 후 다시 한번 FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit을 이용하여 분리하였다. 이를 중쇄의 유전자가 삽입된 pdCMV-dhfr-Chi-NPB24-HC 벡터의 HindIII와 BsiwI 자리에 클로닝하여 인간 경쇄 불변영역(Ck) 유전자와 연결되도록 하고 'pdCMV-dhfr-Chi-NPB24'이라 명명하였다 (도 8B, 8C). 최종 벡터 DNA는 대장균 DH5 α에 RbCl₂ 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)를 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 확인하였다 (Bionics). pdCMV-dhfr-Chi-NPB24의 키메라 항체의 중쇄 가변영역의 아미노산 서열은 기존 NPB24 중쇄 가변영역의 아미노산 서열과 동일하였고, 신호 펩타이드 서열 및 인간 중쇄 불변영역 서열에 바르게 연결되어 있음을 확인하였다 (도 9A, 서열번호 9). 또한 pdCMV-dhfr-Chi-NPB24의 키메라 항체의 경쇄 가변영역의 서열은 기존 NPB24 경쇄 가변영역의 서열과 동일하였고, 신호 펩타이드 서열 및 인간 중쇄 불변영역 서열에 바르게 연결되어 있음을 확인하였다 (도 9B, 서열번호 10).

[0118] 상기 NPB24 생쥐 가변영역과 인간 불변영역으로 연결된 키메라 항체를 Chi-NPB24라고 명명하고 이 키메라 항체를 생산하고 정제하기 위하여, 먼저 인간 배아신장세포인 HEK293FT 세포주 1×10^7 개를 150mm 배양 접시에 20ml의 DMEM(Biowest, France) 배지를 이용하여 배양했다. 50 µg의 pdCMV-dhfr-Chi-NPB24 발현 벡터와 75 µl의 Polyethyleneimine (1mg/ml, Polysciences, USA)를 섞어준 뒤, 트랜스펙션 최적화 배지(TOM™ Medium, Welgene) 500 µl 와 섞어 배양한 세포의 세포 배양 배지 위에 뿌려주었다. 48시간 동안 배양한 후, 매 24시간마다 세포 배양 배지를 수집하여 항체를 정제했다. 수집한 세포 배양 배지를 Protein G agarose beads(Amicogen)로 채워진 column에 넣어주어 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 Chi-NPB24 키메라 항체의 순도를 확인하였다 (도 10A). 또한, 염소의 항-인간 중쇄 항체(goat-α-hIgG-gamma chain-HRP, Invitrogen)와 염소의 항-인간 경쇄 항체 (goat-α-hIgG-kappa chain-HRP, Bethyl, USA)를 2차 항체로 이용하여 웨스턴 블랏팅을 통해 검출한 결과, 상기 키메라 항체는 인간 항체의 불변영역을 포함하는 항체인 것을 확인할 수 있었다 (도 10B). 정제한 NPB24 키메라 항체의 활성 확인을 위하여 2102Ep와 인간 간 줄기세포 (hCdHs)의 세포 표면 결합능을 상기 실시예 3처럼 플로우 사이토메트리 (flow cytometry)로 확인하였다. NPB24 키메라 항체 또한 생쥐 NPB24 항체와 동일하게 human primary hepatocytes (pPHs)에 결합하지 않고 hCdHs, NT-2/D1, 2102Ep, A549, SNU387, SNU449 세포표면에 특이적으로 결합하는 것을 플로우 사이토메트리로 확인하여 키메라 Chi-NPB24가 기능적인 인간화 항체임을 확인하였다 (도 10C).

[0120] 실시예 7. NPB24가 인식하는 세포표면 단백질 분자의 확인

[0121] 7-1. NPB24에 의해 면역 침강되는 분자 확인

[0122] NPB24 항체가 세포표면의 어떤 항원을 인식하는지 분석하기 위하여 먼저 2102Ep 세포표면을 바이오틴으로 표지하였다. 인간 배아 암세포주 2102Ep 표면의 바이오틴표지 (Biotinylation)는 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific)에서 제시한 프로토콜을 약간 수정하여 수행하였다. 100mm 세포배양 플레이트에 배양한 인간 배아 암세포 2102Ep를 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, 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 agarose (Amicogen)에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위해서, 약 2.0×10^7 개 세포의 세포 용출액에 20 µl Protein G agarose를 넣고 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후, 원심분리를 통해 그 Protein G agarose를 회수하여 용해 완충액에 5회 세척한 샘플을 음성 대조군으로 사용하였다. NPB24에 의해 인식되는 항원을 면역침강 하기 위해서 Protein G agarose에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거한 세포 용출액에 항체 4 µg을 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 20 µg Protein G agarose를 넣고 4℃에서 4시간 동안 더 반응시켰다. 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 8% 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 3번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출 키트(Advansta)로 확인하였다. 그 결과, NPB24는 인간 배아암종세포 2102Ep세포 용출액에서 약 ~280, ~160, ~80kDa의 단백질을 면역 침강하는 것을 확인하였다 (도 11A).

[0124] 7-2. NPB24에 의해 면역 침강된 280kDa 항원의 동정

[0125] NPB24에 의해 면역침강된 단백질을 포함하는 폴리아크릴아마이드 젤을 PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다(도 11B). 젤에서 NPB24에 의해 면역침강된 단백질로 추정되는 280kDa에 위치한 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 Rockefeller 대학에서 개발한 ProFound 검색엔진 (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)과 UniProt 데이터베이스 (<https://www.uniprot.org/>)를 이용하였다. 그 결과, 5개 펩타이드의 아미노산 서열이 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (IP3R3, ITPR3) 와 일치하는 것을 확인하였다 (도 11C).

[0127] 7-3. NPB24 항원 IP3R3 분석

[0128] NPB24가 IP3R3/ITPR3를 인식하여 면역침강시킬수 있는지 확인하기 위해 상업적으로 판매되고 있는 IP3Rs 또는 IP3R3에 대한 항체들을 이용하여 분석을 수행하였다. 먼저 NPB24가 면역침강시킨 단백질이 IP3R3 인지 확인하기 위해 3종의 IP3R (IP3R1, IP3R2, IP3R3)을 모두 인식할 수 있는 토끼 항-IP3Rs 다클론항체 (cell signaling)와 IP3R3만을 인식하는 토끼 항-IP3R3 항체 (Bethyl)을 이용하여 면역침강법과 웨스턴 블랏팅을 수행하는 데 사용하였다. 1% Triton X-100 용해 완충액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 2 µg/ml Aprotinin, 100 µg/ml PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride), 5 µg/ml Leupeptin, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄)을 이용하여 상기 실시예 7-1에서 서술한 방법으로 2102Ep에서 세포 용출액을 준비하고, 이 용출액을 상기 서술한 실시예 7-1처럼 유사하게 NPB24 항체를 이용하여 면역침강하였다. 이후, 항원을 인식하지 않는 Isotype control IgM 항체를 이용한 면역침강 음성대조군과 함께 6% 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, 항-IP3Rs 항체를 4℃에서 밤새 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 항-토끼 IgG-HRP (1:10,000)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 이 후 0.1% TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출 키트로 확인하였다. 그 결과, NPB24가 침강시킨 약 280 kDa 면역침강제 단백질이 IP3Rs 항체에 의해 검출되는 것을 확인할 수 있었다 (도 12A).

[0129] NPB24항체가 IP3R3를 면역침강시키는지 다른 세포에서도 다시 확인하기 위하여 폐암세포 A549, 간암세포 SNU449에서 상기 실시예 7-1처럼 세포 용해완충액으로 세포 용출액을 준비하여 면역침강을 수행하였다. 음성대조군으로 사용하는 항체는 Protein G bead로 분리한 NPB24 (G)의 경우는 mIgG Isotype 항체를, LigaTrap으로 분리한 NPB24 (M) 경우는 mIgM Isotype 항체를, Chi-NPB24경우는 hIgG Isotype 항체를 이용하여 함께 면역침강하였다. 양성대조군으로 항-IP3Rs과 항-IP3R3 항체를 이용하여 면역침강을 수행하고 모든 면역침강체와 세포용출액 자체(input)도 함께 6% 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, rabbit anti-IP3R3 항체 (Bethyl)을 이용하여 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 항-토끼 IgG-HRP (1:10,000)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 이 후 0.1% TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출 키트로 확인하였다. 그 결과 음성대조군을 제외하고 NPB24(G), NPB24(M), Chi-NPB24, IP3Rs, IP3R3 모든 항체에서 침강된 약 280 kDa 사이의 단백질이 IP3R3 항체에 의해 검출되는 것을 확인할 수 있었다 (도 12B, 12C). 특히 폐암세포인 A549 (도 12B)보다 간암세포인 SNU449 (도 12C)에서 NPB24에 의해 보다 효율적으로 많은 IP3R3가 면역침강되는 것을 볼 수 있다. 이런 결과는 NPB24가 2102Ep, A549, SNU449에서 IP3R3를 특이적으로 결합하여 면역침강시킬 수 있다는 것을 제시한다 (도 12B, 12C).

[0130] 간줄기세포 (hCdHs) 에서도 NPB24가 IP3R3를 면역침강하는지 확인하기 위하여 상기 실시예 7-1에서 서술한 방법으로 hCdHs 세포 (도 12D)와 fetal liver에서 분리하여 유도한 fetal liver 유래 hCdHs (도 12E) 에서도 세포 용출액을 준비하고, 이 용출액을 상기 서술한 실시예 7-1처럼 NPB24(G), NPB24(M), 또는 Chi-NPB24 항체와 항-IP3R3 항체를 이용하여 면역침강하였다. 그 결과 NPB24 (G), NPB24 (M), Chi-NPB24 항체가 항-IP3R3 항체처럼 ~300 kDa에 위치하는 IP3R3 단백질을 침강시키는 것을 확인하였다 (도 12D, 12E).

[0131] NPB24항체가 IP3R3를 직접 인식하여 면역침강시키는 것인지 간접 인식하여 침강시키는 것인지 구별하기 위해 IP3R3 (ITPR3) 유전자 발현 벡터 pcDNA3.1-ITPR3-(k)DYK (GenScript, Accession version: XM_011514577.3)을 준비하여 인간 배아 신장 세포 HEK293FT에서 FLAG tag이 달린 재조합 IP3R3를 과발현시키고, 이 세포의 용해물을 마우스 항-FLAG 단일클론항체 (MBL)와 토끼 항-IP3R3 항체, NPB24 항체군을 사용하여 면역 침강과 웨스턴 블라팅을 수행하였다. HEK293FT에서 IP3R3를 과발현하기 위해 6-웰의 세포배양용 플레이트에 웰당 3.5×10^5 개의 HEK293FT 세포를 24시간 배양하고, 준비한 벡터 DNA 2 μ g을 PEI (Polyetherimide) 6 μ g과 섞어 상온에서 20 분간 반응한 혼합물을 세포 배양 배지에 첨가해 트랜스펙션을 실행하였다. 이후 72시간 추가 배양한 세포로부터 상기 실시예 7-1에서 서술한 용해 방법으로 세포 용해물을 준비하였다. 준비한 세포 용해물을 상기 서술한 바와 동일하게 NPB24 (G) 항체, Chi-NPB24 항체, 항-IP3R3 항체, 항-FLAG 항체 (α -DDDDK)로 면역 침강을 실시하였으며, 음성대조군으로 NPB24 (G)의 경우 mIgG Isotype 항체, Chi-NPB24 경우는 hIgG Isotype 항체를 이용하여 함께 면역침강하였다. 침강된 단백질은 6% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 상기 실시예 7-3에서 서술한 방법으로 웨스턴 블라팅을 진행하였으며 항-IP3R3, 항-FLAG (α -DDDDK) 항체를 이용하여 침강된 단백질을 확인하였다. 그 결과 NPB24 (G), 항-IP3R3, 항-FLAG (α -DDDDK) 항체에 의해 면역 침강된 각각의 단백질이 모두 항-IP3R3, 항-FLAG (α -DDDDK) 항체에 의해 인식됨을 관찰할 수 있었다 (도 13A). 또한 Chi-NPB24, 항-IP3R3, 항-FLAG (α -DDDDK) 항체에 의해 면역 침강된 각각의 단백질도 모두 항-IP3R3, 항-FLAG (α -DDDDK) 항체에 의해 인식됨을 관찰할 수 있었다 (도 13B). 이 결과는 본 발명의 단일클론항체 NPB24와 이를 키메라 항체로 변경한 Chi-NPB24 항체 모두가 인간 폐 또는 간암세포주 표면에 존재하는 IP3R3 단백질을 직접 인식하는 항체임을 검증하는 것이다.

[0133] 7-4. NPB24가 인식하는 80kDa 분자의 동정

[0134] 상기 실시예 7-1과 동일하게 2102Ep 세포표면을 바이오틴으로 표지하고 세포 용해물을 준비한 다음 다시 약 4 μ g의 NPB24 및 Chi-NPB24 항체를 사용하여 인식되는 항원을 면역 침강하였다. 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, 7-1결과와 동일하게 인간 배아암종세포 2102Ep세포 용출액에서 약 ~280, ~160, ~80kDa의 단백질을 NPB24 및 Chi-NPB24가 동시에 면역 침강하는 것을 확인하였다 (도 14A). 이중에서 약 80kDa 위치에서 염색된 단백질 밴드(도 14B)를 잘라 LC-MS/MS (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry) 분석을 의뢰하였다 (ProteomeTech, Seoul, Korea). 분석이 완료된 매스 스펙트럼으로부터 단백질 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 ProFound 검색엔진 (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)과 UniProt 데이터베이스(<https://www.uniprot.org/>)를 이용하였다. 그 결과, 단백질의 아미노산 서열이 integrin β 4 (ITGB4, CD104) 와 일부 일치하는 것을 확인하였다 (도 14C). 밑줄 친 아미노산은 실제로 질량분석기를 통해 확인한 아미노산 서열을 표시한 것이다.

[0136] 7-5. NPB24의 ITGB4 면역침강 분석

[0137] NPB24가 면역침강시킨 단백질이 ITGB4인지 확인하기 위해 토끼 항-ITGB4 다클론항체 (Abcam), 랫드 항-ITGB4 항

체 (Thermo Fischer Scientific)을 이용하여 면역침강법과 웨스턴 블라팅을 수행하였다. 상기 실시예 7-1에서 서술한 방법으로 2102Ep에서 세포 용출액을 준비하고, 이 용출액을 상기 서술한 실시예 7-1처럼 동일하게 NPB24(G), NPB24(M), 키메릭 NPB24항체를 이용하여 면역침강하였다. 음성대조군으로써 NPB24에 대해서는 특정 항원을 인식하지 않는 mIgG, mIgM isotype 항체를 이용하고 Chi-NPB24에 대해서는 hIgG1을 사용하여 면역침강한 샘플을 사용하였고, 양성 대조군으로써 용출된 단백질 용액 자체 (input)을 함께 6% SDS-PAGE를 통해 분리하고 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겨 웨스턴 블라팅을 수행하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, rabbit anti-ITGB4 항체 (Abcam)을 이용하여 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 항-토끼 IgG-HRP (1:10,000)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 이 후 0.1% TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출 키트로 확인하였다. 그 결과 NPB24와 Chi-NPB24항체 모두 ~210kDa ITGB4 단백질을 침강시키는 것을 확인하였다 (도 15A). 따라서 도 14에서 NPB24에 의해 면역침강된 약 80 kDa 단백질은 210kDa ITGB4단백질의 분해산물이나 isotype 단백질로 보인다.

[0138] NPB24항체가 ~210kDa 크기의 ITGB4를 면역침강시키는지 다른 세포에서도 다시 확인하기 위하여 폐암세포 A549와 간암세포 SNU449에서 상기 실시예 7-1처럼 세포 용출액을 준비하였다. 음성대조군으로 NPB24경우 mIgM 면역침강제와 양성대조군으로 A549 세포용출액 자체 (input)와 항-ITGB4 항체를 사용하였으며 침강제를 6% SDS-PAGE를 통해 분리하고 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겨 웨스턴 블라팅을 수행하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, rabbit anti-ITGB4 항체 (Abcam)을 이용하여 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 항-토끼 IgG-HRP (1:10,000)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 이 후 0.1% TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출 키트로 확인하였다. 그 결과 NPB24와 항-ITGB4 항체 모두가 ~210kDa의 항-ITGB4 항체에 의해 인식되는 단백질을 A549와 SNU449에서 침강시키는 것을 확인하였다 (도 15B, 15C). 이런 결과는 NPB24항체가 ITGB4에 결합하여 면역침강시킨다는 것을 제시한다.

[0139] 간줄기세포에서도 NPB24가 ITGB4를 면역침강하는지 확인하기 위하여 상기 실시예 7-1에서 서술한 방법으로 hCdHs에서도 세포 용출액을 준비하고, 이 용출액을 상기 서술한 실시예 7-1처럼 NPB24 항체와 항-ITGB4 항체를 이용하여 면역침강하였다. 그 결과 NPB24항체가 항-ITGB4 항체처럼 ~210kDa ITGB4 단백질을 침강시키는 것을 확인하였다 (도 15D). 한편 NPB24와 같은 항원을 인식하는 Chi-NPB24항체도 ITGB4를 면역침강시키는지 확인하기 위해서 상기 실시예 7-1에서 서술한 방법으로 A549, SNU449 세포에서 세포 용출액을 준비하고, 이 용출액을 상기 서술한 실시예 7-1처럼 Chi-NBP24 항체와 항-ITGB4 항체를 이용하여 면역 침강하였다. 그 결과 Chi-NPB24항체가 항-ITGB4 항체처럼 ~210kDa ITGB4 단백질을 침강시키는 것을 확인하였다 (도 15E, 15F). 이런 결과는 NPB24가 2102Ep, A549, SNU449, hCdHs에서 ITGB4에 결합하여 면역침강시킬 수 있다는 것을 제시한다.

[0141] 실시예 8. IP3R3와 ITGB4 단백질의 상호작용 분석

[0142] 단일클론항체 NPB24에 의해 함께 면역침강되는 단백질들인 IP3R3와 ITGB4 단백질간의 연관성을 확인하기 위해 상업적으로 판매되고 있는 IP3Rs, IP3R3, ITGB4에 대한 항체들을 이용하여 분석을 수행하였다. 1% Triton X-100 용해 완충액 (25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 2μg/ml Aprotinin, 100μg/ml PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride), 5μg/ml Leupeptin, 1mM NaF, 1mM Na3VO4)을 이용하여 상기 실시예 7-1에서 서술한 방법으로 A549와 SNU449 각각의 세포에서 세포 용출액을 준비하고, 이 용출액을 상기 서술한 실시예 7-1처럼 유사하게 IP3Rs, IP3R3, ITGB4 항체들을 이용하여 각각 면역침강하였다. 이후 웨스턴 블라팅을 수행하고 IP3R3 또는 ITGB4 항체를 일차항체를 이용하고 2차 항체로 항-토끼 IgG-HRP (1:10,00)을 이용하여 면역침강된 단백질을 검출하였다. 그 결과 A549 (도 16A) 및 SNU449 세포주 (도 16B)에서 IP3R3 또는 IP3Rs 항체를 이용하여 타겟 단백질을 면역침강 시키는 경우 ITGB4 단백질 또한 함께 침강되는 것을 확인하였다. 이런 결과는 IP3R3와 ITGB4가 세포표면에서 서로 상호작용하여 물리적으로 함께 복합체를 이루고 있어 NPB24 항체로 IP3R3가 면역 침강할 때 ITGB4도 함께 면역 침강되었음을 알 수 있다.

[0144] 실시예 9. 면역세포화학법에 의한 NPB24의 화합물유래 간 줄기세포 (hCdHs) 특이성 분석

[0145] 9-1. 인간 일차 간세포의 분리

[0146] 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.

[0148] **9-2. 화합물 유래 간 줄기세포 (hCdHs)의 확립**

[0149] 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 제10-2107602에 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 μ M A83-01(Gibco) 및 3 μ M CHIR99021(StemCell Technologies)가 첨가된 DMEM/F12(Gibco, CA, USA)에서 37°C, CO₂ 세포 배양기에서 7일 동안 배양하였으며 매일 배지를 교체하였다.

[0151] **9-3. 면역세포화학법에 의한 NPB24 화합물 유래 간 줄기세포(hCdHs) 특이성 분석**

[0152] NPB24항체가 화합물 유래 간 줄기세포 특이적 항체임을 검증하기 위해, 화합물 유래 간 줄기세포 (hCdHs), 인간 일차 간세포 (human Primary Hepatocytes, hPHs), 화합물 유래 간 줄기세포 분화 간세포 (hCdH-Heps), 섬유화 hCdHs (Fibrotic hCdHs), 인간 진피 섬유화 세포 (Human Dermal Fibroblasts, HDF), 인간 신생아 표피 섬유화 세포 (Neonatal Human Foreskin Fibroblasts, hNuFF), 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs), 지방 유래 성체줄기세포 (Adipose-derived mesenchymal stem cells, Adipose-MSCs)에 NPB24 항체를 면역세포화학염색법(Immunocytochemistry)을 이용하여 표면 결합 여부를 확인하였다. 세포는 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde, PFA)에 15분 반응시켜 고정시킨 후 PBS로 3회 세척한다. PBS와 2% BSA를 포함한 용액을 이용하여 1시간 블로킹하고 NPB24 항체 20 μ g을 넣고 4°C에서 빛을 차단한 채 12시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후, Dylight 633-conjugated anti-mouse IgM(Invitrogen) 1:200 비율로 희석한 용액과, Hoechst33342 (Molecular Probes) 1:1000 비율로 희석한 용액을 실온에서 빛을 차단한 채 1시간 동안 반응시켰다. 세포는 TCS SP5 공초점 현미경(Leica, Germany)을 사용하여 이미지화 하였다. NPB24는 화합물 유래 간 줄기세포의 표면에 특이적으로 결합하는 것을 볼 수 있다 (도 17).

[0154] **실시예 10. NPB24 항체를 이용한 화합물 유래 간 줄기세포 (hCdHs) 분리**

[0155] **10-1. NPB24 항체를 이용한 화합물 유래 간 줄기세포 (hCdHs) 분리**

[0156] T175 flask에 배양된 hCdHs를 TrypLE(Gibco)를 이용하여 부착된 세포를 떼어내고 원심분리하여 모았다. 1×10^6 세포 당 NPB24 항체 20 μ g을 PBS 버퍼 (2mM EDTA, 0.5% BSA) 100 μ l에 넣어 4°C, 30분 동안 반응시킨 후 PBS 버퍼 1ml을 넣고 300g, 10분 동안 원심분리하여 세포를 3번 세척했다. Anti-Mouse IgM Microbeads(130-047-302, Miltenyi Biotec) 10 μ l를 PBS 버퍼와 함께 세포에 넣어 4°C, 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 NPB24 항체 음성세포군(unlabeled)과 양성세포군 (labeled)으로 분리하였다. 2일 마다 배지를 교체하며 5일 동안 배양 후 세포 모양을 관찰하였고 NPB24 항체 양성세포군에서 hCdHs의 대표적인 모양을 유지하는 것을 관찰하였다 (도 18A).

[0158] **10-2. 플로우 사이토메트리(Flow cytometry) 분석에 의한 NPB24 항체 음성/양성 세포군에서 세포 분리 효율 분석**

[0159] 분리된 NPB24 항체 음성/양성 세포군에서 세포 분리 효율을 분석하기 위해 NPB24 항체를 이용하여 플로우 사이토메트리로 분석하였다. 분석을 위해서 분리되지 않은 간 줄기세포, NPB24 항체 음성세포군(unlabeled), NPB24 항체 양성세포군(labeled) 시료 당 약 2×10^5 세포를 사용하였다. 2×10^5 세포 당 NPB24항체 4 μ g을 PBS 버퍼

(2% BSA) 100 μ l에 넣어 4℃, 1시간 반응시킨 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척하고 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgM-FITC(BD Biosciences)를 4℃, 1시간 반응시켰다. PBS 버퍼로 2번 세척한 후, FACS Canto II (BD Biosciences) 장비를 이용하여 분석하였다. NPB24 항원이 존재하는 세포는 분리하지 않은 간 줄기세포에서는 22.1%, NPB24 음성세포군에서는 30%, NPB24 양성세포군에서는 58.3%가 존재하는 것을 확인하였다 (도 18B). 이 결과는 NPB24항체를 사용한 MACS방법으로 hCdHs세포를 보다 효율적으로 분리할 수 있다는 것을 제시한다.

[0161] 실시예 11. NPB11, NPB24 항체를 이용한 화합물 유래 간 줄기세포 (hCdHs) 분리

[0162] 11-1. NPB11, Chi-NPB24항체 조합을 이용한 화합물 유래 간 줄기세포 (hCdHs) 분석

[0163] 플로우 사이토메트리로 만능줄기세포에 대한 항체라이브러리를 사용하여 화합물 유래 간 줄기세포에 결합하는 항체를 선별하는 과정에서는 간 줄기세포에는 결합하지만 정상 간세포에는 결합하지 않은 항체로 NPB11과 NPB24를 선발하였다. NPB11과 NPB24의 인간화 항체인 Chi-NPB24가 hCdHs에 결합하는 것을 확인하였으며(도 2, 도 10C), 두 항체의 조합을 사용할 경우 간 줄기세포의 분리효율을 더 증가시킬 수 있을 것임으로 두 항체를 동시에 hCdHs에 결합시켜 분석하기 위하여 NPB24 대신 Chi-NPB24를 사용하여 다른 색의 형광으로 염색한 NPB11/Chi-NPB24항체 이중염색 flow cytometry 분석으로 두 항체에 의해 동시에 염색되는 hCdHs를 분석하였다. 먼저 상기 실시예 3처럼 hCdHs세포를 ml당 약 1×10^6 개씩 PBA (1% bovine serum albumin, 0.02% NaN₃ in PBS)에 섞은 후, 항체 NPB11을 4℃에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-Alexa660 (Invitrogen)를 4℃에서 20분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, Chi-NPB24 항체를 4℃에서 30분간 반응시키고 항-인간 IgG-FITC (Invitrogen)를 4℃에서 20분간 더 반응시켰다. 세척 후에 FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 NPB11과 Chi-NPB24로 이중 염색된 hCdHs 비율을 확인하였다. 그 결과 전체 hCdHs세포군에서 약 13.3%세포군이 NPB11과 Chi-NPB24에 이중 염색되는 것을 확인하였으며(도 19), 이런 결과는 두 가지 항체를 사용할 경우 최대 13.3%의 NPB11과 NPB24 이중 양성인 hCdHs를 분리할 수 있다는 것을 제시한다.

[0165] 11-2. NPB11, NPB24 항체를 이용한 화합물 유래 간 줄기세포 (hCdHs) 분리

[0166] hCdHs 분리 효율을 높이기 위해 NPB11 항체를 이용하여 1차 분리 후, 분리된 세포를 NPB24 항체를 이용하여 2차 분리를 진행하였다. T175 flask에 배양된 hCdHs를 TrypLE(Gibco)를 이용하여 부착된 세포를 모아 원심분리한다. 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 300g, 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 음성세포군과 양성 세포군으로 분리하여 6웰 플레이트에 배양하였다. NPB11 항체 양성세포군을 TrypLE를 이용하여 부착된 세포를 모아 원심분리한다. 1×10^5 세포 당 NPB24 항체 2 μ g을 PBS 버퍼 (2mM EDTA, 0.5% BSA) 100 μ l에 넣어 4℃, 30분 동안 반응시킨 후 PBS 버퍼 1ml을 넣고 300g, 10분 동안 원심분리하여 세포를 3번 세척한다. Anti-Mouse IgM Microbeads(130-047-302, 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), MiniMACS[™] Separator (130-042-102, Miltenyi Biotec) 및 MS Columns (130-042-201, Miltenyi Biotec)를 이용하여 세포 500 μ l를 column에 로딩하여 NPB24 항체 음성세포군과 양성세포군으로 분리한다. 2차 분리 후 NPB24 항체 양성세포군(labeled)에서 음성세포군(unlabeled)과 비교해볼 때 보다 순수하게 hCdHs의 대표적인 모양을 가진 세포들만 관찰할 수 있었다 (도 20A).

[0168] 11-3. Flow cytometry분석을 통해 분리된 NPB24 양성 세포군의 분리 효율 분석

[0169] 실시예 11-2에서 NPB11 항체를 이용한 1차 분리와 NPB24 항체를 이용한 2차 분리 후에 회수한 분리한 hCdHs를 Flow cytometry를 통해 분리효율을 분석하였다. NPB24 양성세포는 분리하지 않은 간 줄기세포에서는 24.4%,

NPB11로 1차로 분리한 세포에서는 54.3%, 그리고 NPB24로 2차 분리한 후에는 약 91%까지 증가하는 것을 확인하였다 (도 20B).

[0171] 실시예 12. NPB11/NPB24 항체의 음성/양성세포군의 간 줄기세포 특성 분석

[0172] 12-1. 면역세포화학염색법을 이용한 간 줄기세포 특성 분석

[0173] 분석할 세포는 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde, PFA)에 15분 반응시켜 고정시킨 후 PBS 로 3회 세척한다. PBS 와 2% BSA를 포함한 용액을 이용하여 1시간 블로킹하고 NPB11, NPB24 항체 20 µg, 간 줄기세포 마커 EPCAM(ab71916, Abcam), SOX9(ab185966, Abcam)을 넣고 4℃에서 빛을 차단한 채 12시간 동안 반응시켰다. PBS 로 세척한 후, Dylight 633-conjugated anti-mouse IgG(Invitrogen) 또는 Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG(Invitrogen)를 1:200 비율로 희석한 용액과, Hoechst33342 (Molecular Probes, USA) 1:1000 비율로 희석한 용액을 실온에서 빛을 차단한 채 1시간 동안 반응시켰다. 세포는 TCS SP5 공초점 현미경(Leica, Germany)을 사용하여 이미지화 하였다. NPB11/NPB24 항체조합으로 분리한 음성 세포군에서는 NPB11, NPB24 항체가 염색된 세포와 안된 세포가 혼재되어 있지만 양성 세포군에서는 거의 대부분의 세포가 NPB11과 NPB24에 의해 염색되었다. 또한, 간 줄기세포 마커 EPCAM, SOX9 단백질도 NPB11/NPB24 항체조합으로 분리한 양성 세포군에서 대부분의 세포가 염색되어 두 항체조합을 사용할 경우 hCdHs 간 줄기세포군을 현저히 증가시킬 수 있음을 알 수 있다 (도 21).

[0175] 12-2. mRNA 분리 및 RT-PCR을 통한 NPB11/NPB24 항체 음성/양성 세포군의 hCdHs 간 줄기세포 특성 분석

[0176] NPB11, NPB24 항체 음성/양성세포군에서 hCdHs 간 줄기세포의 특성을 검증하기 위해, 간 줄기세포 마커 유전자 발현을 qPCR을 이용하여 분석하였다. 트리줄 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 올리고뉴클레오타이드 프라이머(표 6)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 취득하여 PCR 산물을 특성화하였다. 정량적 데이터는 추론 통계치 (p 값)와 함께 평균±표준 편차(SD)로 분석하였다. 통계적 유의성은 **p<0.01, ****p<0.0001 로 설정한 유의미한 양측 t-검정으로 평가하였다. 그 결과 간 줄기세포 마커 유전자인 SOX9, CK19, EPCAM, ITGA6은 1차 NPB11, 2차 NPB24 항체에 의해 분리된 양성 세포군에서 유전자 발현이 현저히 증가하는 것을 관찰하였다 (도 22). 이것은 NPB11/NPB24 항체 양성 세포군에서 간 줄기세포 특성이 더욱 증가되었음을 의미한다.

표 6

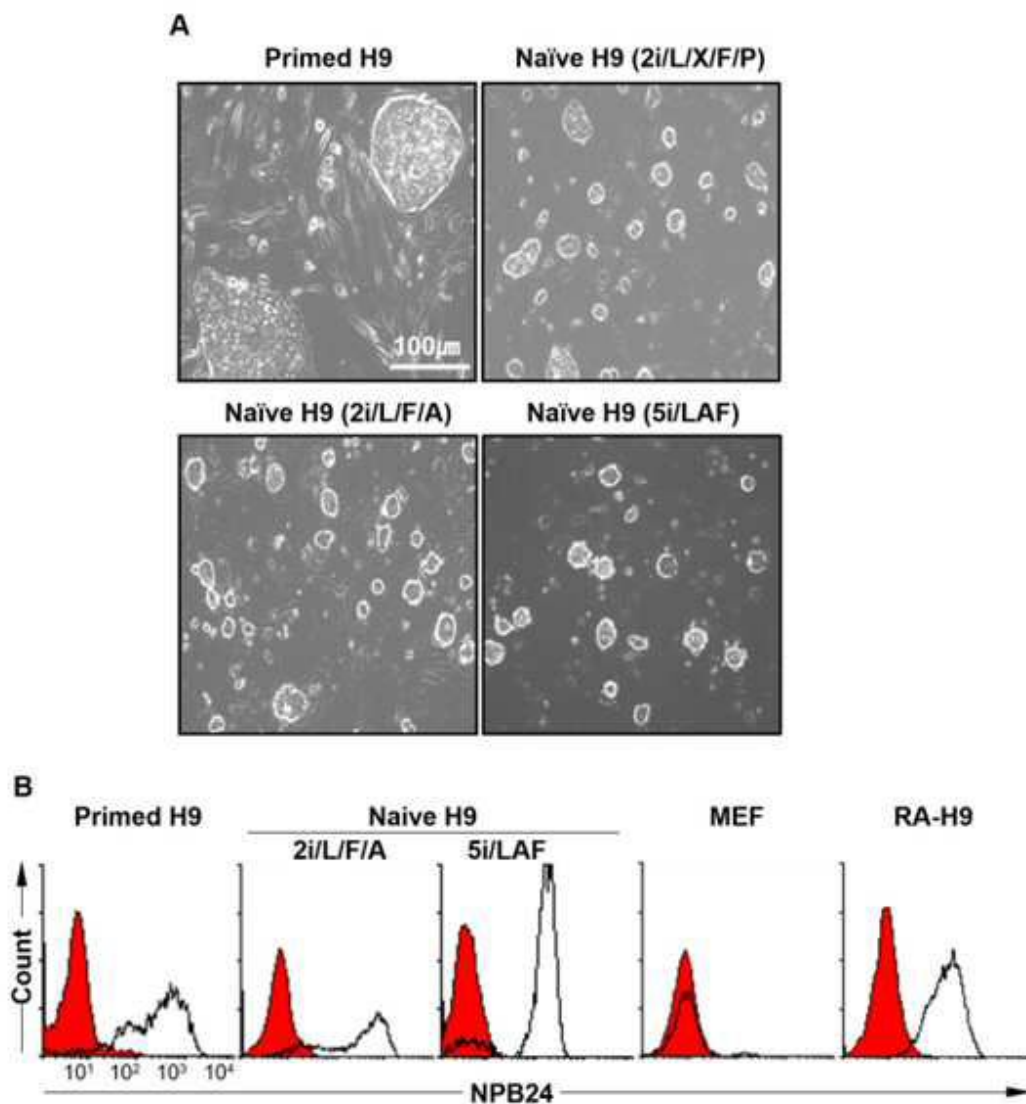
유전자	프라이머	프라이머 서열(5'-3')
CK19	정방향	TTCCGGACCAAGTTTGAGAC(서열번호 27)
	역방향	CCTCGTGGTTCTTCTCAGG(서열번호 28)
EPCAM	정방향	GAACAATGATGGGCTTTATG(서열번호 29)
	역방향	TGAGAATTCAGGTGCTTTTT(서열번호 30)
SOX9	정방향	GAGGAAGTCGGTGAAGAACG(서열번호 31)
	역방향	ATCGAAGGTCTCGATGTTGG(서열번호 32)
ITGA6	정방향	TCGCTGGGATCTTGATGCTTGC(서열번호 33)
	역방향	TGAGCATGGATCTCAGCCTTGTA(서열번호 34)
α-SMA	정방향	GACAATGGCTCTGGGCTCTGTAA(서열번호 35)
	역방향	CTGTGCTTCGTCACCCACGTA(서열번호 36)
COL1A	정방향	CCCGGGTTTCAGAGACAACCTC(서열번호 37)
	역방향	TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC(서열번호 38)
GAPDH	정방향	TGCACCACCAACTGCTTAGC(서열번호 39)
	역방향	GGCATGGACTGTGGTCATGAG(서열번호 40)

[0179] 12-3. NPB11/NPB24 항체에 의해 분리된 간 줄기세포 항체 양성 세포군의 세포 섬유화 분석

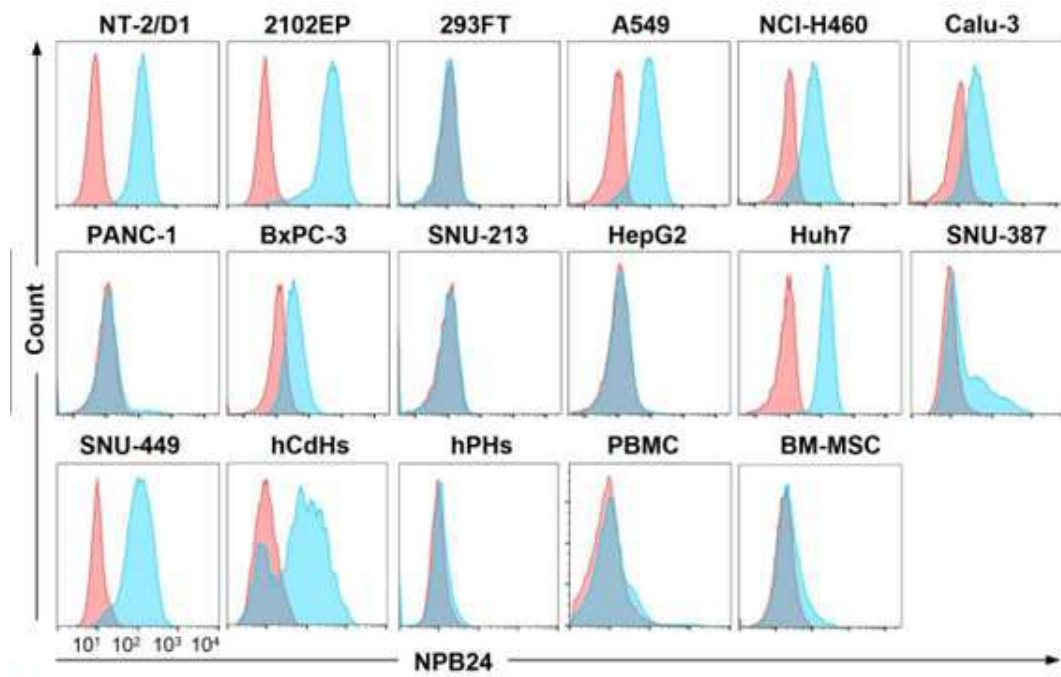
[0180] 화합물 유래 간 줄기세포의 NPB11, NPB24 항체 음성/양성세포군에서 세포 섬유화를 분석하기 위해, 섬유화 마커 유전자 발현을 qPCR을 이용하여 분석하였다. 실시예 12-2의 분석방법을 따랐다. 정량적 데이터는 추론 통계치(p 값)와 함께 평균±표준 편차(SD)로 실시하였다. 통계적 유의성은 ****p<0.0001, ns는 not significant로 설정한 유의미한 양측 t-검정으로 평가하였다. 분리하지 않은 간 줄기세포에서 증가된 섬유화 마커 유전자 α -SMA, COL1A은 1차 NPB11, 2차 NPB24 항체 양성 세포군에서 유전자 발현이 현저히 감소하는 것을 확인하였다 (도 23). 이런 결과는 NPB11과 NPB24항체를 사용하여 간 줄기세포를 분석할 경우 섬유화를 유발하는 세포를 현저히 제거할 수 있음을 제시하는 것이다.

도면

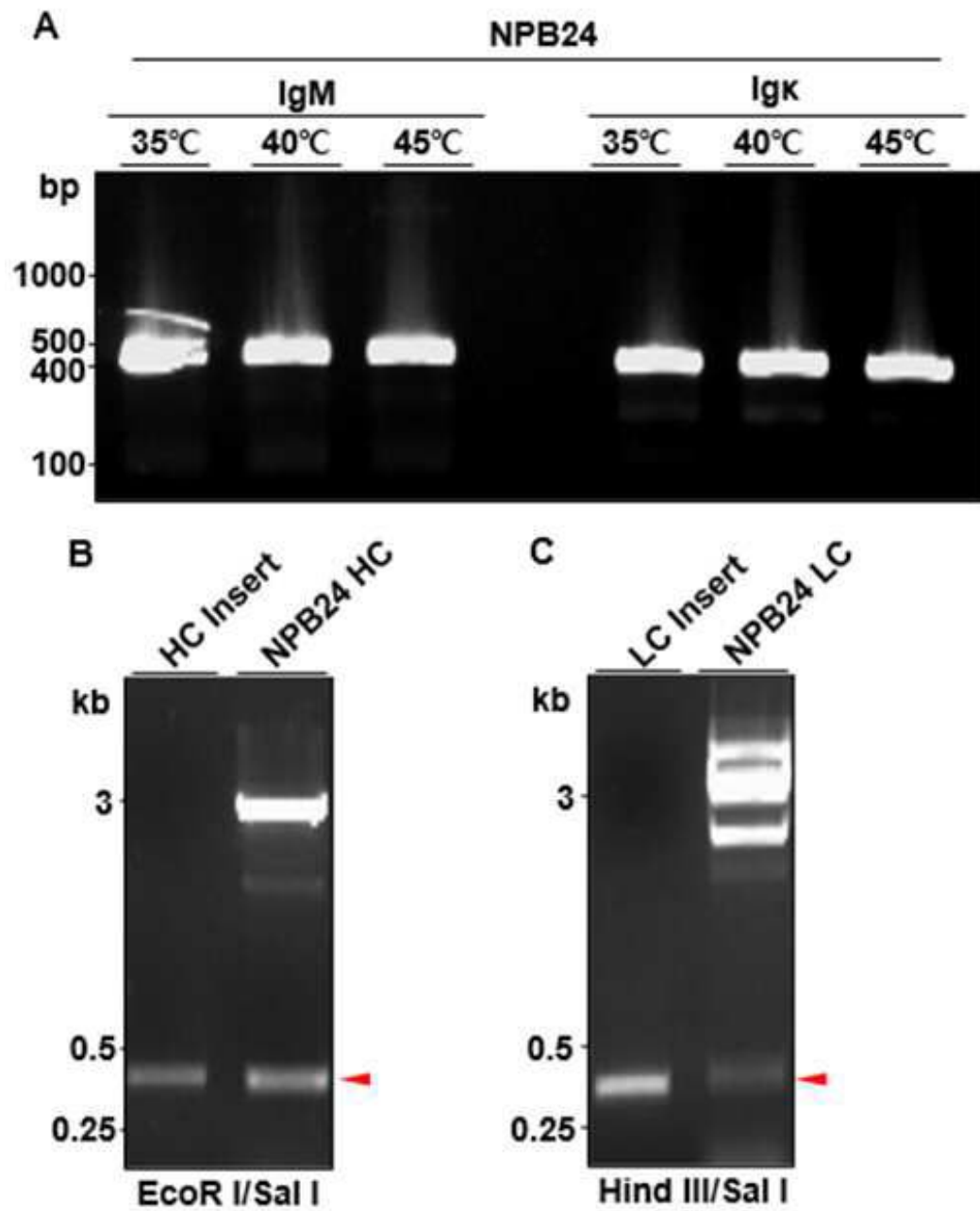
도면1



도면2



도면3



도면4

NPB24 Heavy chain variable region: Subgroup IIB

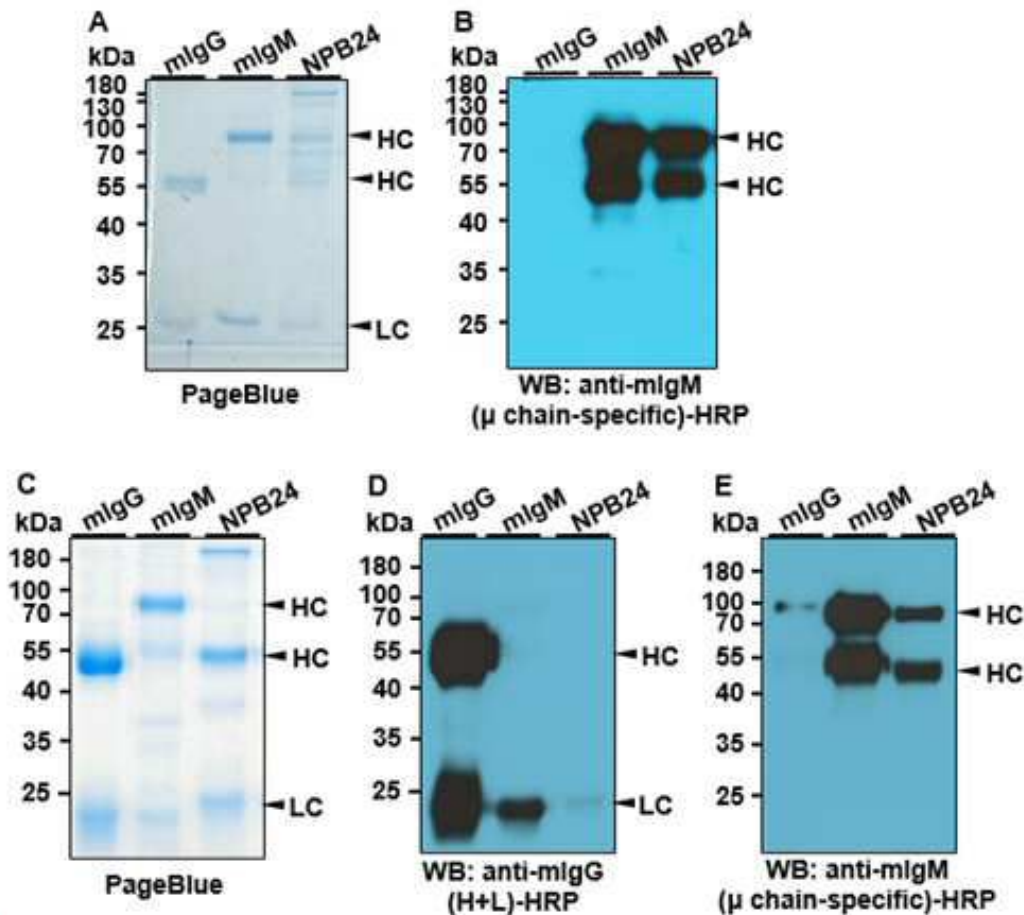
GAA GTT AAG CTG GAG GAG TCA GGA CCT GGC CTG GTG GCG CCC TCA CAG AGC CTG	54
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu	18
<u>31 CDR-H1</u>	
TCC ATC ACA TGC ACT GTC TCA GGG TTC TCA TTA ACC AGC TAT GGT GTA AGC TGG	108
Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val Ser Trp	36
<u>50 CDR-H2</u>	
GTT CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GGA GTA ATA TGG GGT GAC	162
Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp	54
<hr/>	
GGG AGC ACA AAT TAT CAT TCA GCT CTC ATA TCC AGA CTG CGC ATC AGC AAA GAT	216
Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Ala Leu Ile Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp	72
<hr/>	
AAC TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTA AAA CTG AAC AGT CTG CAA ACT GAT GAC ACA	270
Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr	90
<u>98 CDR-H3</u>	
GCC ACG TAC TAC TGT GCC AAC TAC TAT GGT TAC CCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC	324
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Asn Tyr Tyr Gly Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly	108
<hr/>	
CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	351
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	117

도면5

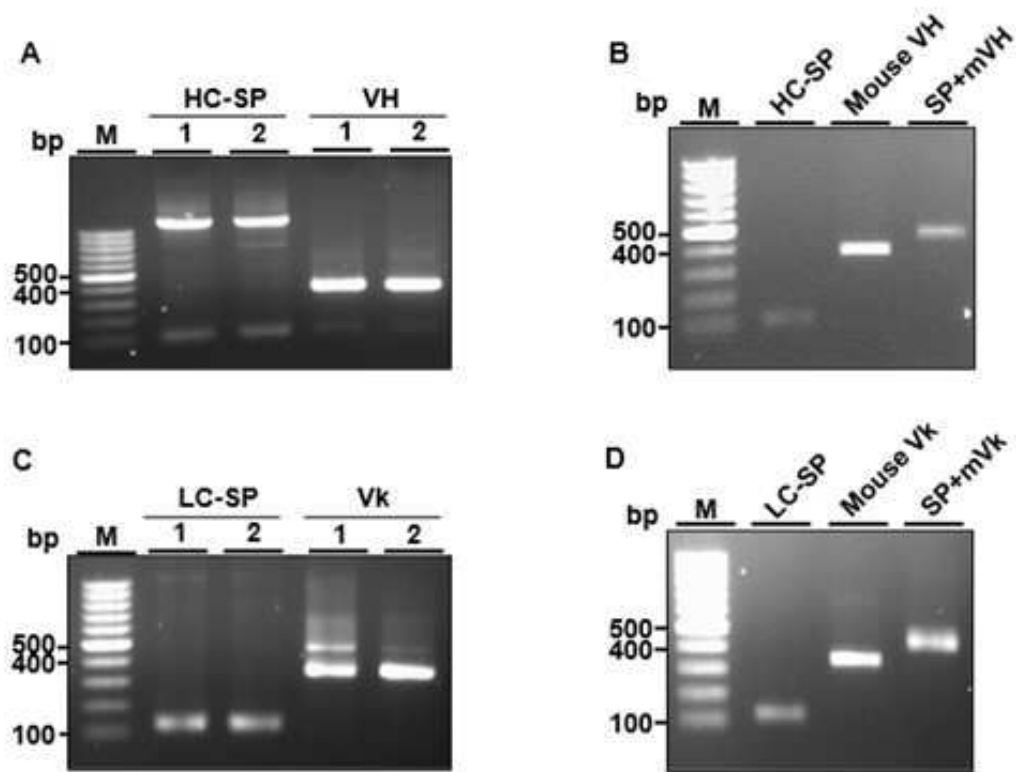
NPB24 Kappa chain variable region: Subgroup III

GAT ATT GTG ATC ACC CAA TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG	54
Asp Ile Val Ile Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys	18
24 CDR-L1	
GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TAC CAG	108
Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln	36
49 CDR-L2	
CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT CAT GAC ACC TCC AAA CTG GCT	162
Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile His Asp Thr Ser Lys Leu Ala	54
88 CDR-L3	
ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG	270
Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp	90
AGT AGT GAC CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA	318
Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	106

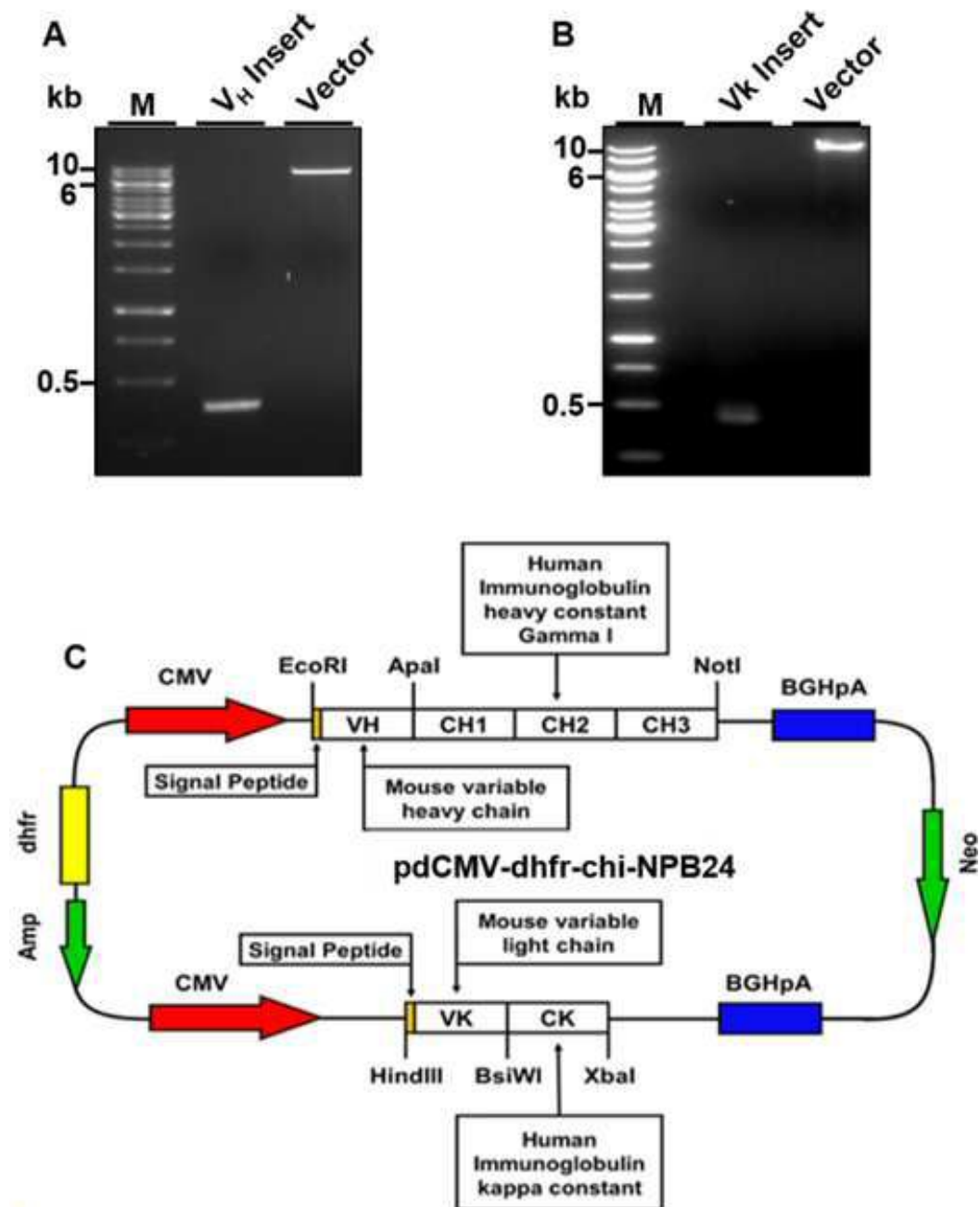
도면6



도면7



도면8



도면9

A. Chimeric antibody Chi-NPB24 중쇄 (IgG1) 아미노산 서열

```

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

검은색: 신호 펩타이드 아미노산 서열

파란색: NPB24 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (mouse), 밑줄은 CDR

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

B. Chimeric antibody Chi-NPB24 경쇄 아미노산 서열

```

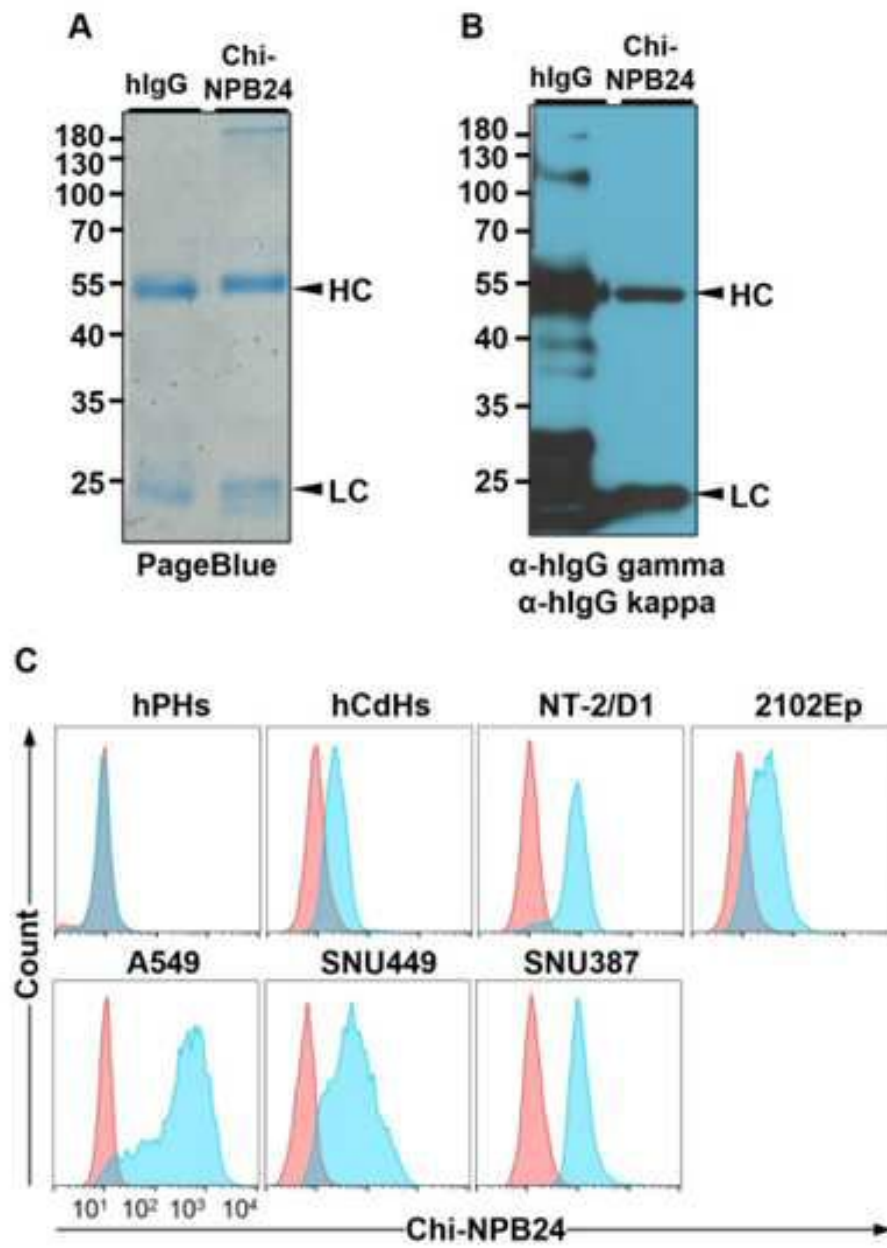
M G I K M E T H S Q V F V Y M L L W L S G V E G D I V I T Q S P
A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G
T S P K R W I H D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L
T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S D P P T F G G G T K L E
I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G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

검은색: 신호 펩타이드 아미노산 서열

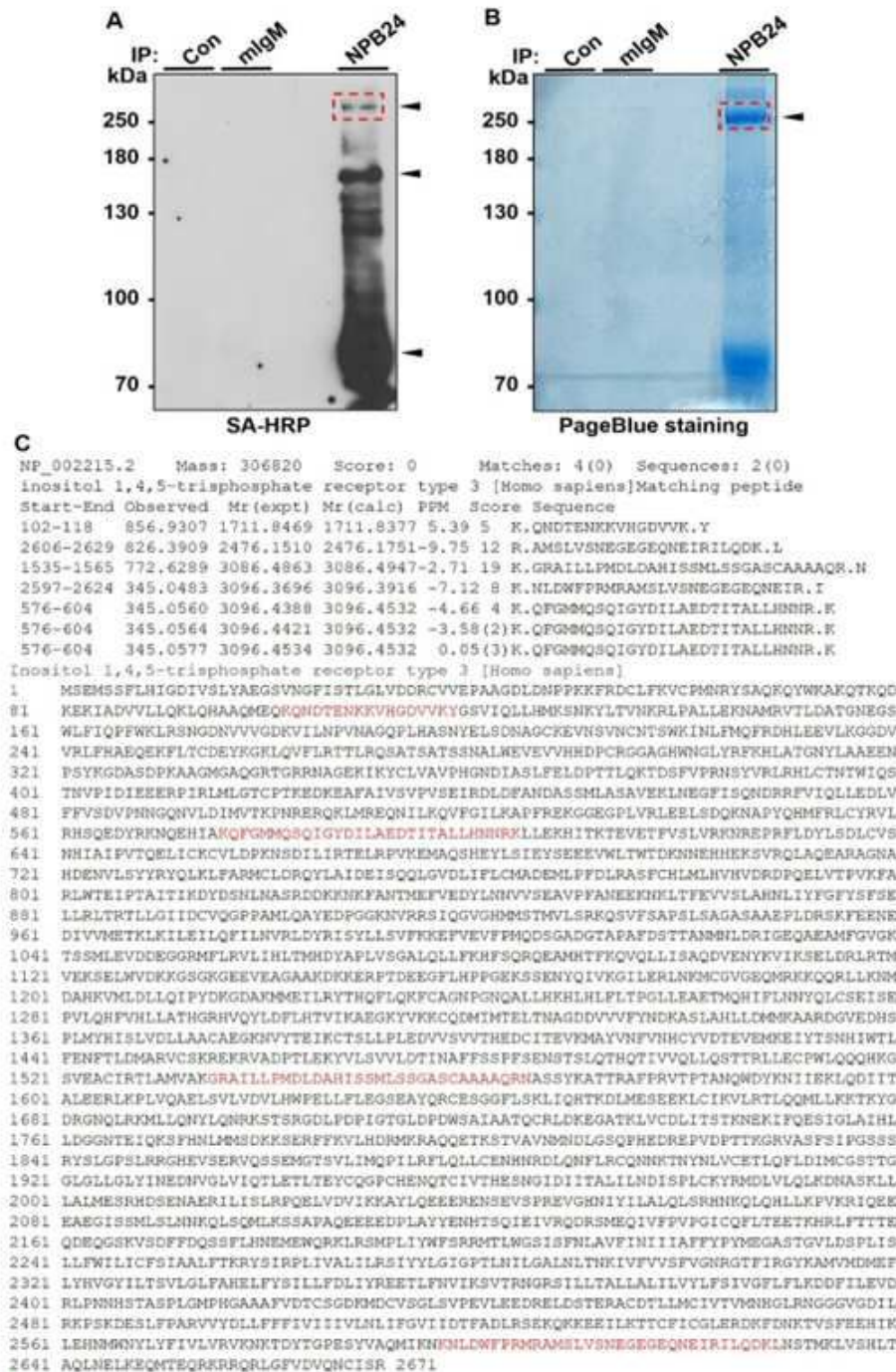
파란색: NPB24 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (mouse), 밑줄은 CDR

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

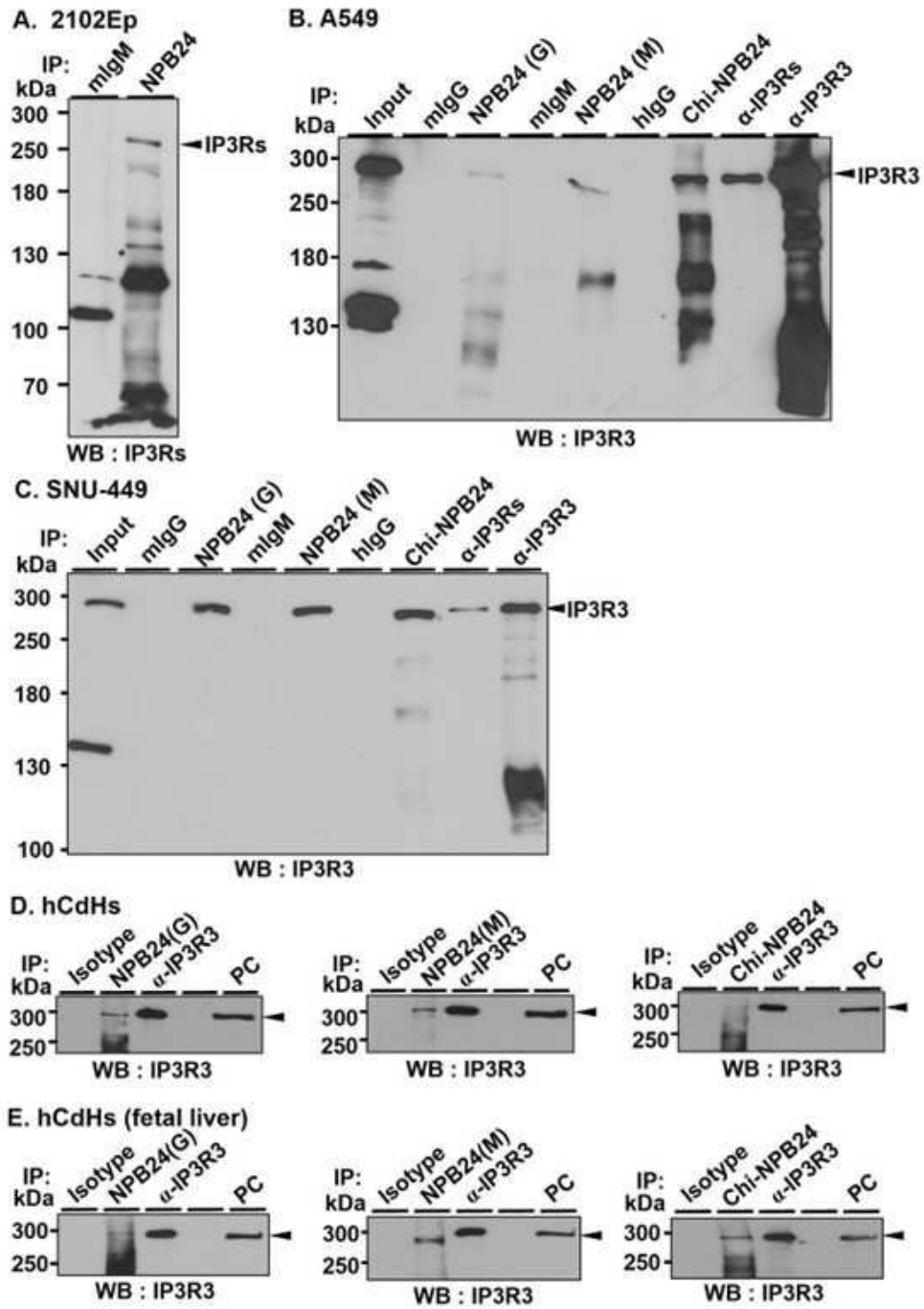
도면10



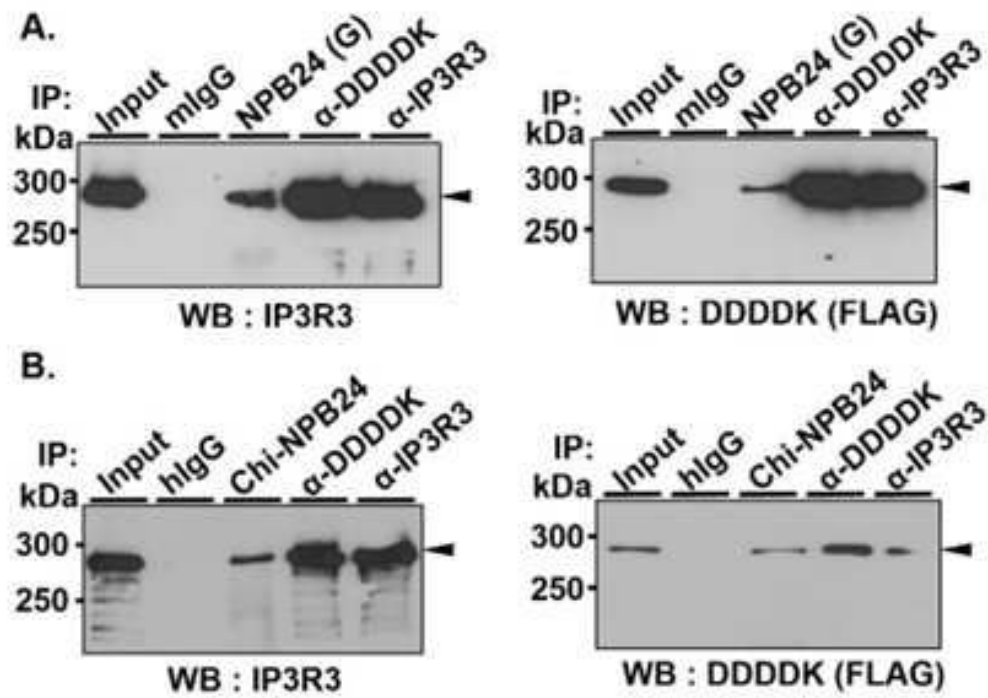
도면11



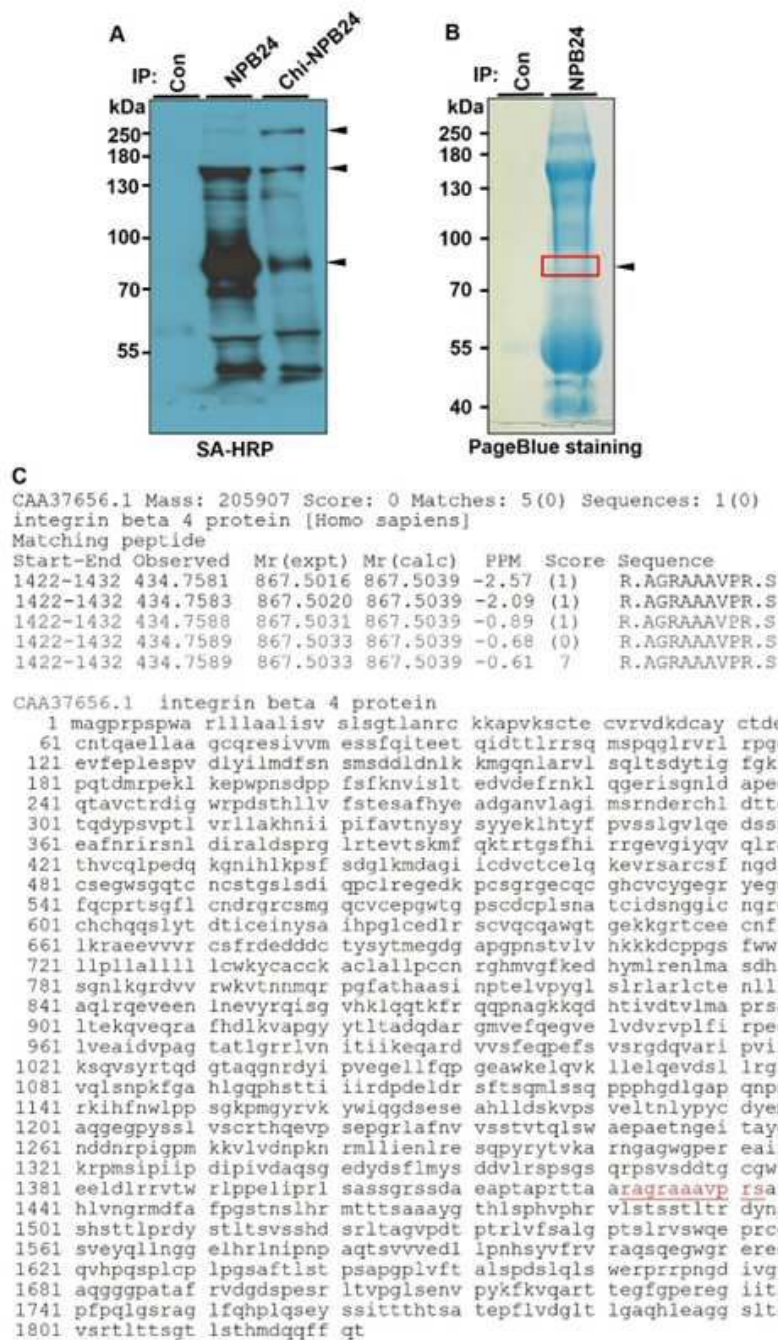
도면12



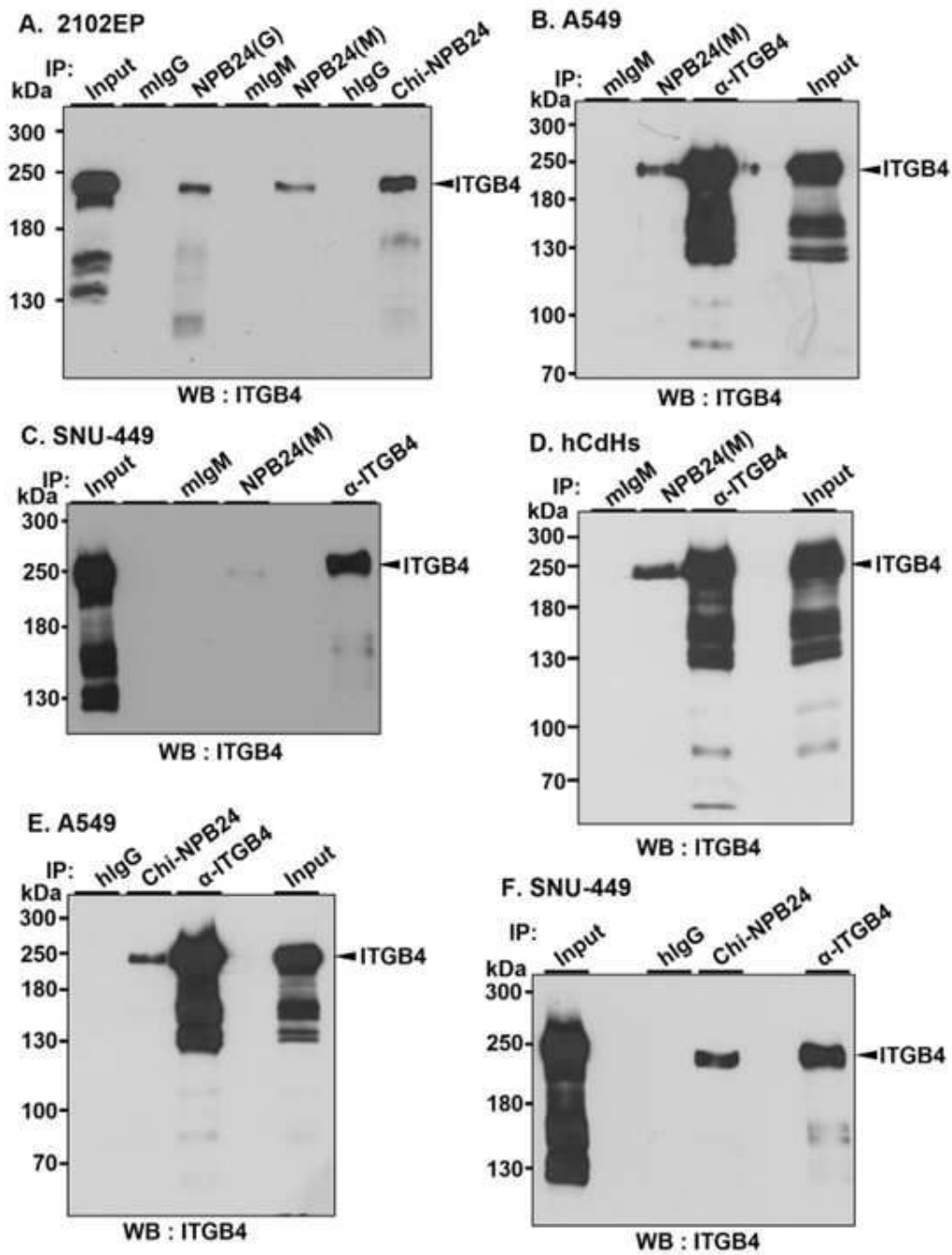
도면13



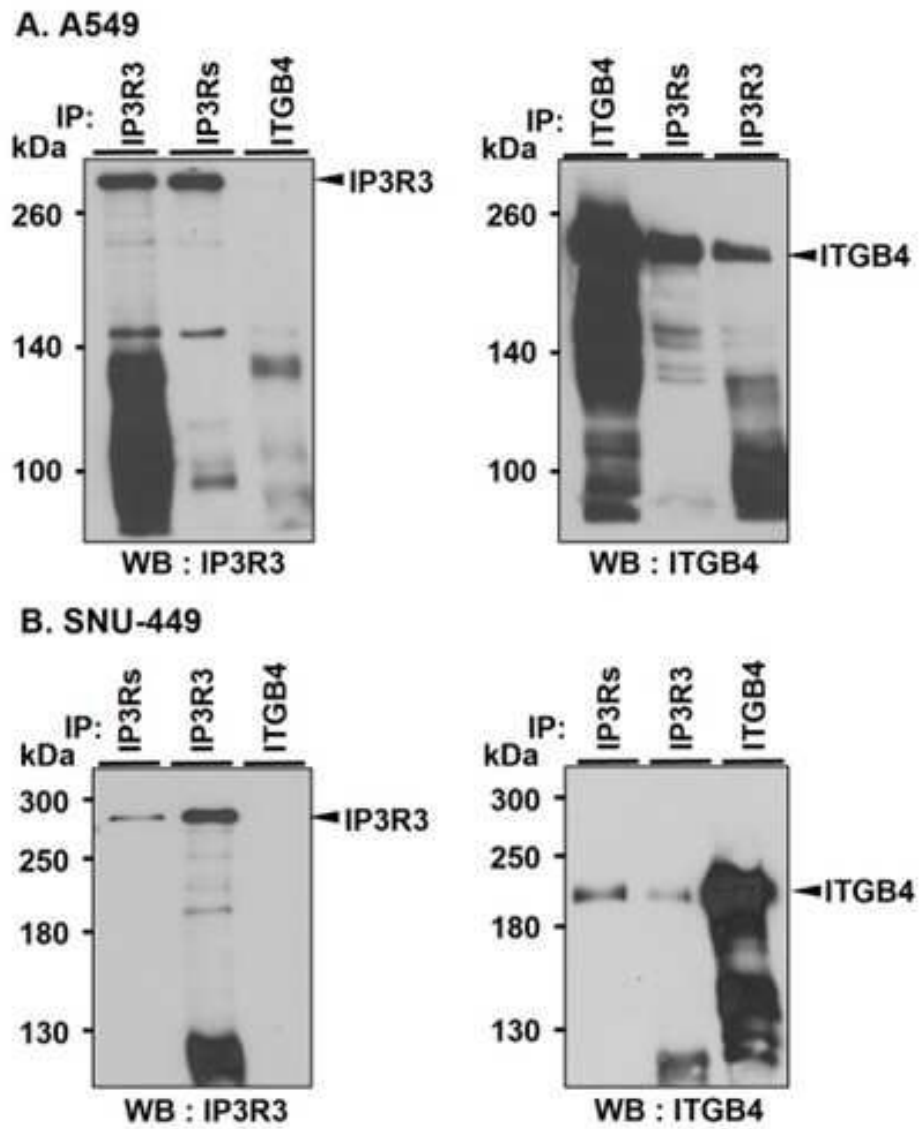
도면14



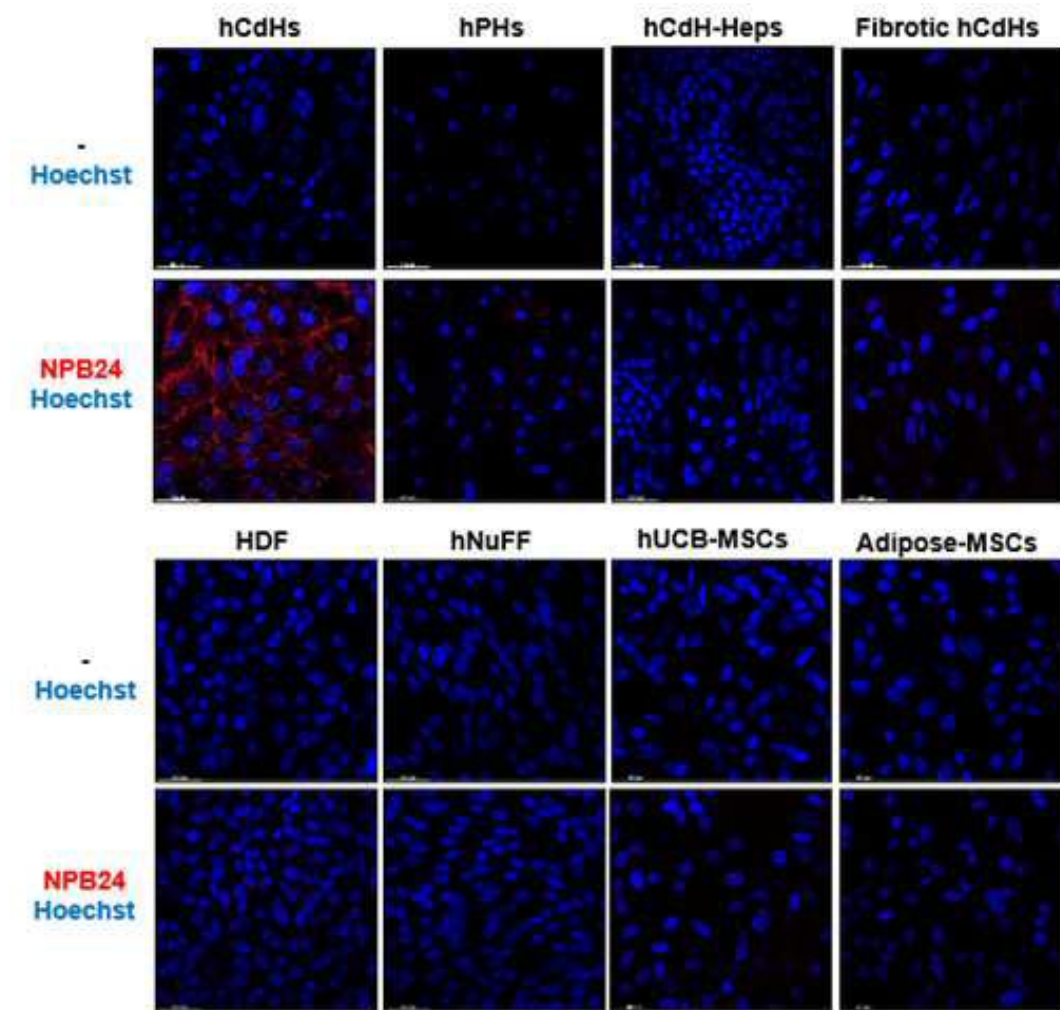
도면15



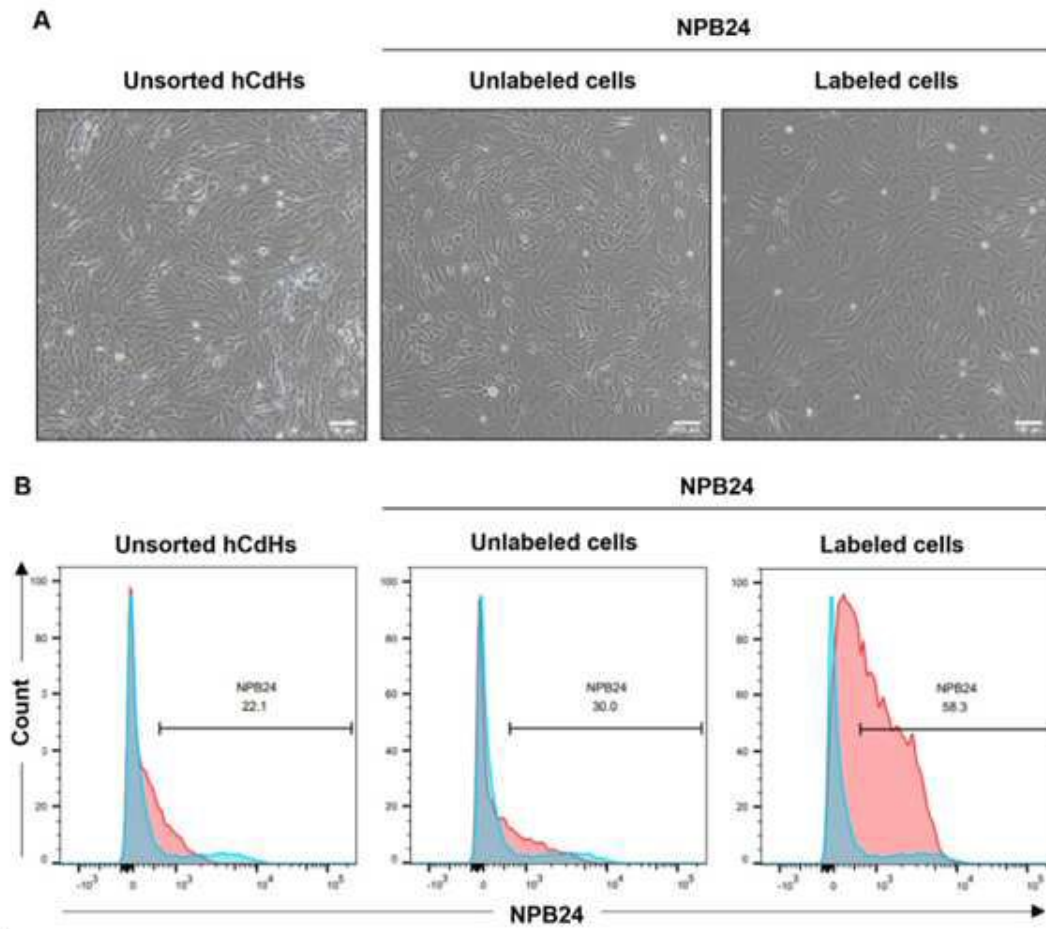
도면16



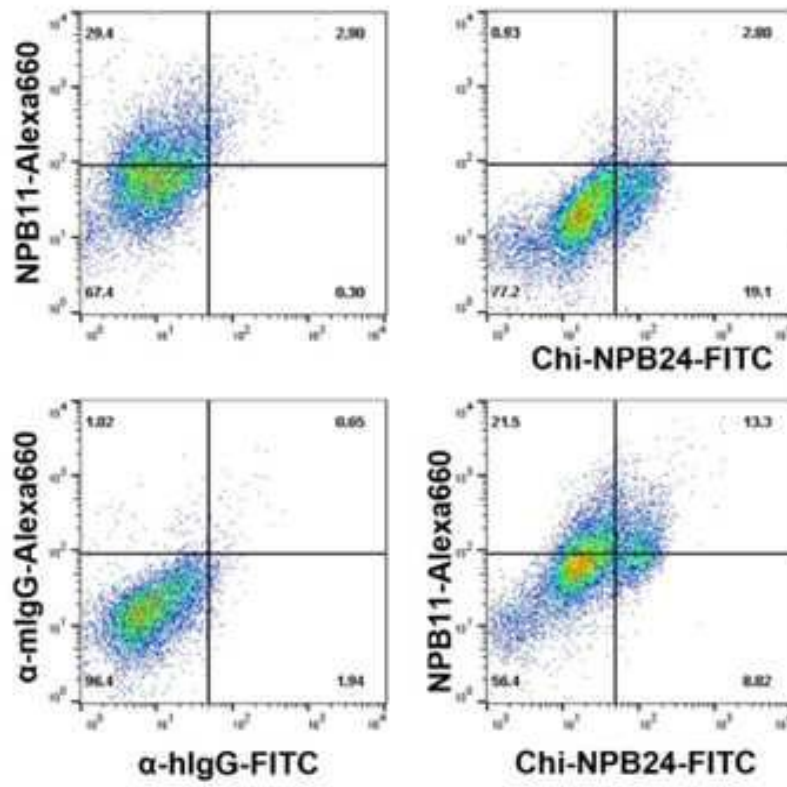
도면17



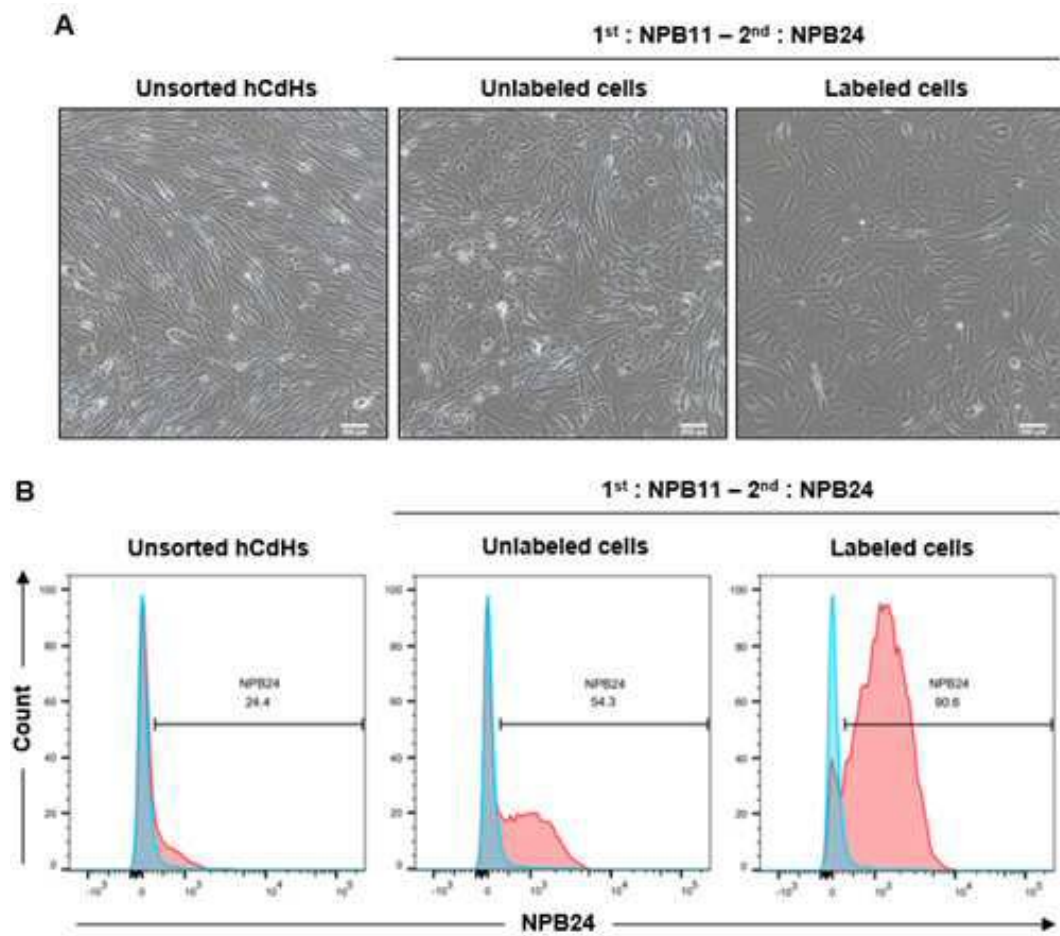
도면18



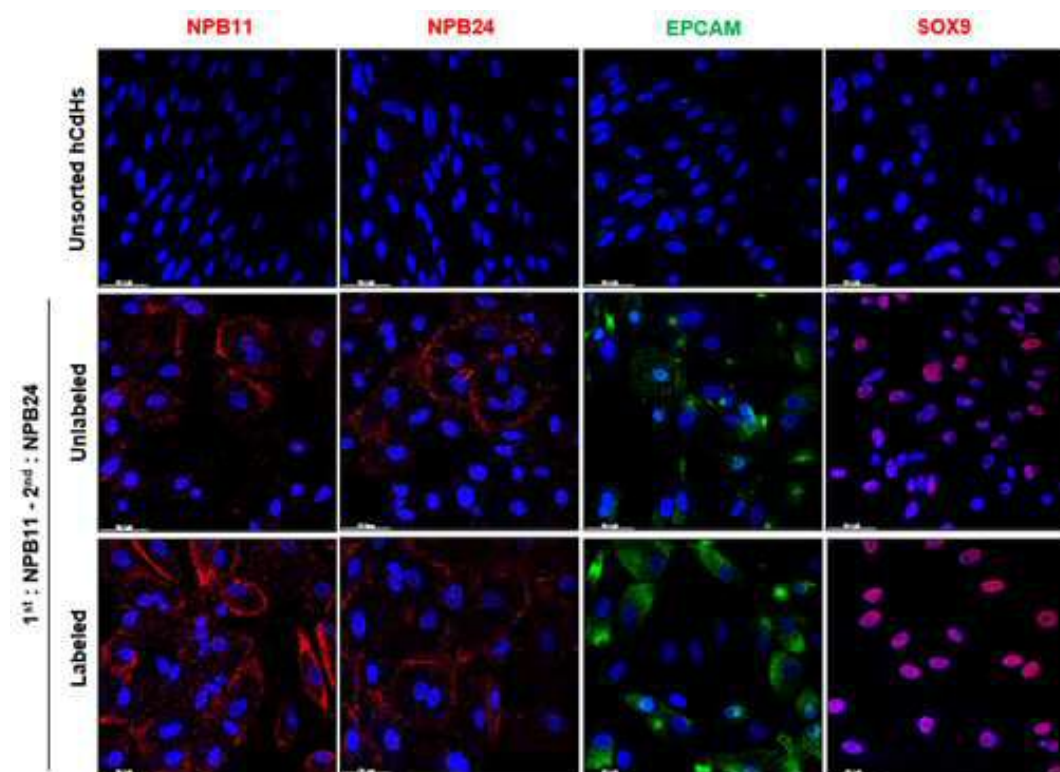
도면19



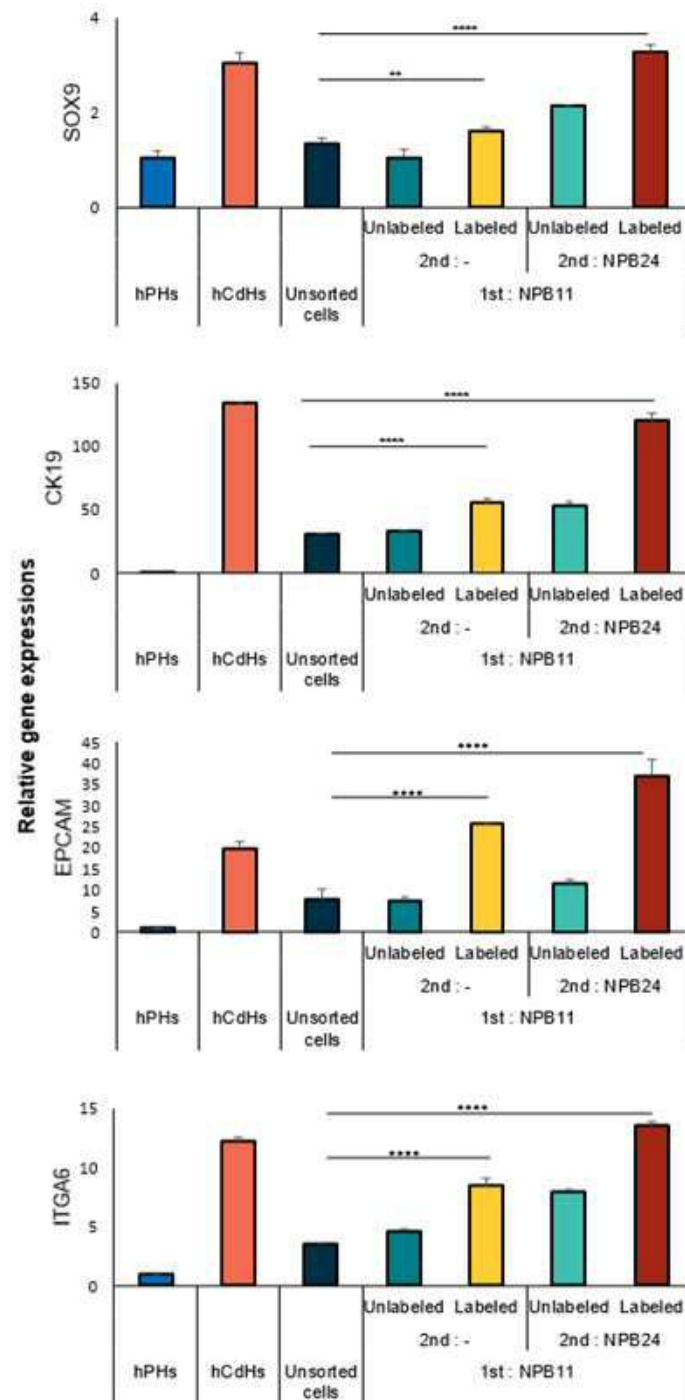
도면20



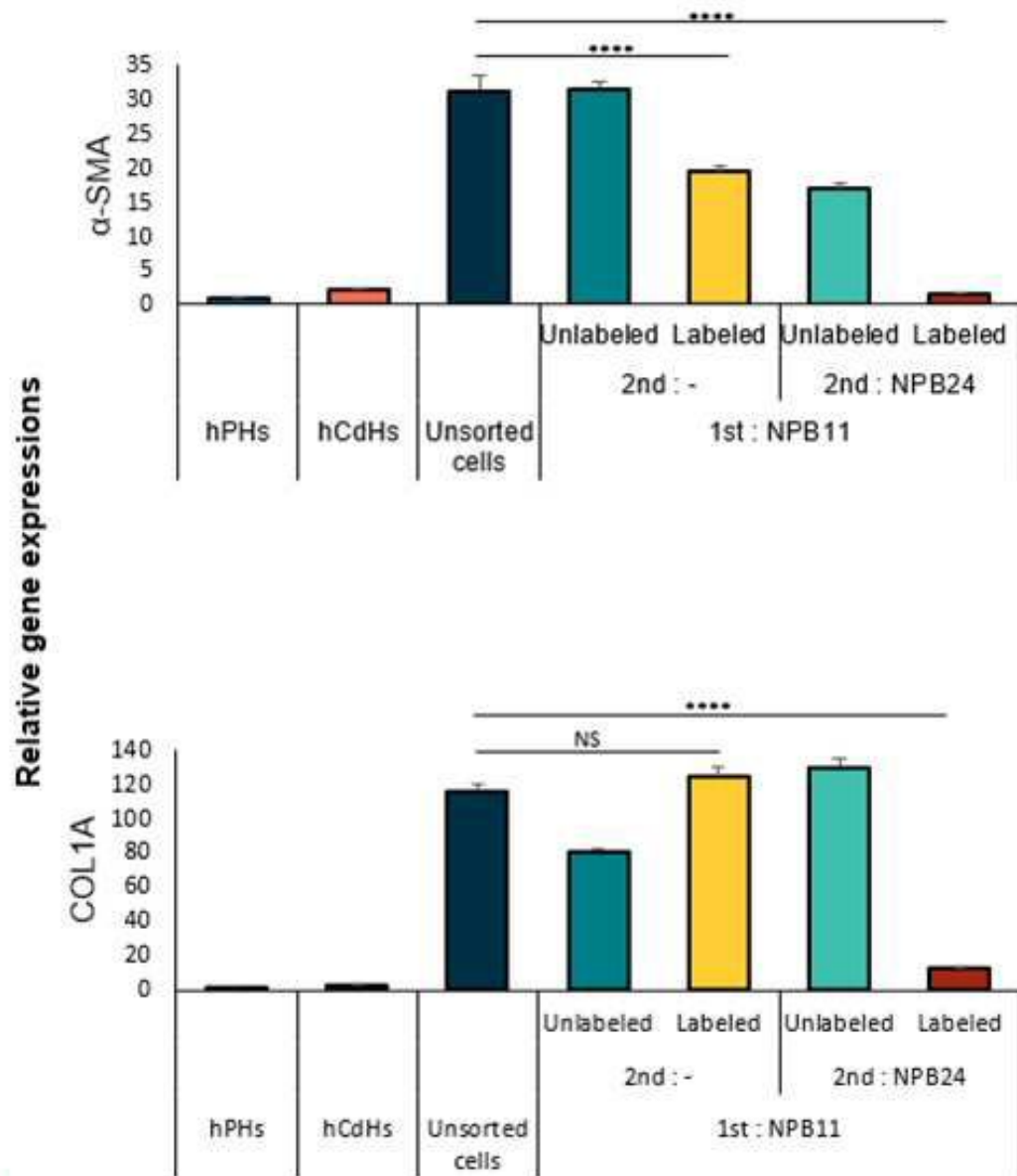
도면21



도면22



도면23



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.