



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0163543
(43) 공개일자 2024년11월19일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
 <i>A61K 47/68</i> (2017.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/50</i> (2017.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07K 16/2803</i> (2013.01)
 <i>A61K 47/6803</i> (2023.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-0060780
 (22) 출원일자 2024년05월08일
 심사청구일자 2024년05월08일
 (30) 우선권주장
 1020230059919 2023년05월09일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 세종대학교산학협력단
 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)</p> <p>(72) 발명자
 류춘제
 서울특별시 서초구 고무래로 35, 106동 3203호 (반포동, 반포리체아파트)</p> <p>이정호
 서울특별시 성북구 북악산로 913, 104동 1502호 (돈암동, 풍림아파트)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인리체</p> |
|--|--|

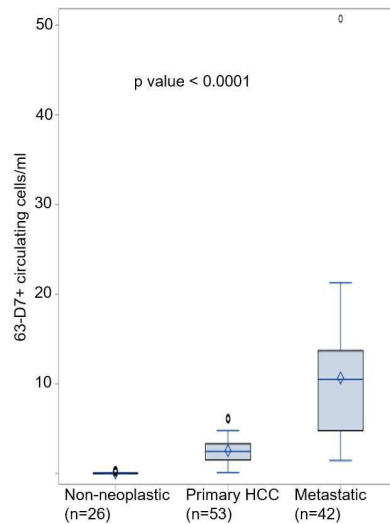
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **항 PTGFRN 단일클론항체 및 그 용도**

(57) 요약

본 발명은 혈중 암세포 수준 판단, 암 치료 또는 예방, 암 전이 예후 예측 및 항암제 스크리닝을 위한 항 PTGFRN 단일클론항체에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2 및 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2 및 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체에 관한 것이다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

(72) 발명자

이현민

경기도 포천시 소흘읍 무림3길 16

서효선

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

천유진

서울특별시 광진구 광나루로12길 17, 602호

최문주

서울특별시 중랑구 봉우재로43길 18 (상봉동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711186816
과제번호	2022R1A2C1010132
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	PTGFRN 발현을 통한 간암 세포의 생존 및 면역회피 기전
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2 및 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2 및 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항 PTGFRN 단일클론항체에 약물이 접합된 항체-약물 컨쥬게이트.

청구항 5

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항 PTGFRN 단일클론항체를 포함하는 암의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 암은 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중피종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 갑상선암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종, 신경모세포종, 교모세포종 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택되는, 암의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항 PTGFRN 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마.

청구항 8

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항 PTGFRN 단일클론항체를 포함하는 PTGFRN 검출용 조성물.

청구항 9

개체로부터 분리된 시료에 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하는 단계를 포함하

는 암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

개체로부터 분리된 시료에 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하는 단계를 포함하는 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈장, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 뇨, 점막액, 양수로 이루어진 군에서 선택되는, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 시료에 EpCAM에 특이적으로 결합하는 물질을 처리하는 단계를 더 포함하는, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 물질은 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 14

청구항 10에 있어서, 상기 혈중 암세포는 상피-중간엽 전이되거나 상피-중간엽 전이 진행 중인 혈중 암세포인, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 15

청구항 10에 있어서, 상기 혈중 암세포는 상피성 세포 또는 중간엽성 세포가 아닌, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 16

청구항 10에 있어서, 상기 혈중 암세포는 간암, 폐암, 대장암, 감상선암, 췌장암, 악성 흑색종, 유방암, 신경모세포종 또는 교모세포종 환자의 혈액 내 혈중 암세포인, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 17

청구항 10에 있어서, 상기 혈중 암세포는 B7-H3(CD276) 단백질을 더 발현하는, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 18

개체로부터 분리된 시료에 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하여 PTGFRN을 검출하는 단계를 포함하는 암 전이 예후 예측에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 검출된 PTGFRN의 수준이 대조군 대비 높으면 대조군 대비 암 전이 예측이 더 나쁜 것이라는 정보를 제공하는 단계를 더 포함하는, 암 전이 예측 예측에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 20

항암 약물을 투여 받은 환자로부터 분리된 시료에 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하여 PTGFRN을 검출하는 단계를 포함하는 항암 약물의 효능 스크리닝 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 검출된 PTGFRN의 수준이 대조군 대비 낮으면 대조군 대비 상기 항암 약물의 암 전이 억제 효능이 더 우수할 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는, 항암 약물의 효능 스크리닝 방법.

청구항 22

PTGFRN에 결합하는 물질을 포함하는 혈중 암세포 검출용 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 혈중 암세포 수준 판단, 암 치료 또는 예방, 암 전이 예측 예측 및 항암제 스크리닝을 위한 항 PTGFRN 단일클론항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 간세포암(Hepatocellular carcinoma, HCC)은 간암의 90% 이상을 차지하며, 암으로 인한 사망률 가운데 세번째를 차지한다. 간세포암의 주요 치료법은 외과적 절제, 초기 간세포암에만 적용되는 국소 절제 또는 간 이식 등이 있다. 그러나 초기 간세포암 진단 당시 대부분의 환자는 이미 진행된 병기로 발견되어 경동맥 화학색전술과 같은 완화적 치료, tyrosine kinase inhibitor를 이용한 전신 치료, 선택적인 내부 방사선 치료를 통해서만 생존이 유한하게 연장된다. 하지만 간세포암은 재발률이 유난히 높아 치료 효과가 만족스럽지 못하다. 현재 간세포암의 진단 및 모니터링은 주로 혈청 바이오마커 검출, 병리학적 검사 및 영상 분석에 의존하지만 일반적인 혈청 마커로 쓰는 AFP는 58-66% 정도로 진단 성능이 좋지 않으며, AFP를 또 다른 마커인 des-gamma-carboxy-prothrombin(DCP)와 조합하여 진단할 때도 민감도는 82% 정도에 불과하다. 그리고 영상 및 병리 검사는 진단 정확도 및 민감도에 한계가 있어 간세포암의 진단 및 모니터링을 위한 더 나은 접근 방식이 필요하다.

[0004] 혈중 암세포(Circulating tumor cell, CTC)란 암환자의 말초 혈액에서 발견되는 암세포로, 혈액을 통해 이동하는 암세포를 말한다. 전이는 대다수의 암 관련 사망의 직접적인 원인이 될 수 있고, 혈중 암세포는 이런 전이현상에 씨앗이 되는 것으로 암을 퍼트리는 세포이다. 이들은 homo-, hetero-클러스터를 이루어 면역세포로부터 회피하고 내외부의 억제 신호를 회피하여 전이를 하며, 이들의 발현 정도는 암의 생존율과 연관이 있다. 말초 혈액에서 혈중 암세포의 수가 증가하는 것은 암 환자에서 전이가 진행되는 것을 의미하므로, 혈중 암세포를 암 전이 진단 마커로 사용할 수 있는 방법이 개발되었다. 또한 혈중 암세포는 암 환자의 좋지 않은 예후와 관련되어 있다. 혈중 암세포의 검출은 조직검사와 달리 액상 조직검사(Liquid biopsy)를 통해 간단한 방법으로 암의 진단이 가능하므로, 암 진단의 새로운 대안으로 제시되고 있다. 그리고 동물 모델을 통해 혈중 암세포는 암 초기부터 원발암에서 혈액을 통해 전파된다는 것이 알려졌고, 간세포암에서도 전이가 관찰되지 않는 초기 단계부터 혈

중 암세포는 검출된다. 따라서 혈중 암세포 진단을 통한 간세포암의 조기발견 방법 및 관리 방법이 제안되었다. 하지만 혈중 암세포는 그 수가 매우 적어 실제로 혈액에서 효율적으로 분리해내기 쉽지 않다. 또한 다양한 암종에서 각기 다른 혈중 암세포가 나와서 이동할 것으로 추정되므로, 크기가 다양하고 수가 매우 적은 혈중 암세포를 정확히 검출 및 분리해내기는 쉽지 않다. 현재까지 혈중 암세포들은 EpCAM을 이용한 Cell search system, 세포 크기 및 물리적 특성에 기인한 microfluidics system, 유세포 분석기를 통해 분리하여 연구하고 있지만, 혈중 암세포들의 다양성으로 인해 백혈구와 비슷한 크기의 혈중 암세포들도 존재하고, 물리적인 특성으로 분리할 수 없는 세포들도 존재하므로, 간세포암의 특성을 반영하는 표면 바이오 마커를 이용한 혈중 암세포 분리가 중요하다.

[0005] 다양한 암의 혈중 암세포를 분리할 수 있는 마커로 현재 미국 FDA 승인을 받은 마커로는 상피성 세포 유래(epithelial origin)인 Epithelial Cell Adhesion Molecule(EpCAM)이 있다. 그러나 간은 상피성 유래 기관임에도 대다수의 간세포나 간세포암이 EpCAM 음성이며, 실제로 면역조직화학적 방법으로 염색 시 간세포암 조직의 15-30% 정도만이 EpCAM 양성으로 나타난다. 따라서 간세포암에서 EpCAM과 다른 마커로, 아시알로페투인(asialofetuin)을 사용하여 여기에 결합하는 아시알로글리코프로테인 수용체(asialoglycoprotein receptor, ASGPR) 양성 혈중 암세포를 검출하는 방법이 사용되었는데, 간세포암 환자 85명에서 5 ml 혈액당 1개 이상 혈중 암세포가 검출되는 비율은 69명으로 약 81% 정도였다. 하지만 ASGPR로 검출된 혈중 암세포 수와 간세포암 전이 사이에 병기와 관련된 뚜렷한 연관성은 없었다. 한편, EpCAM이 간세포암의 전이를 유도하거나 치료의 재발을 유도하는 간암줄기세포의 마커라는 연구 결과를 통해, 줄기세포 특성을 나타내는 EpCAM 양성 혈중 암세포에 대한 관심이 간세포암 분야에서 대두되었다.

[0006] 중국의 Fudan 대학은 수술 전 간세포암 환자 123명 중 7.5 ml 혈액당 EpCAM 양성 혈중 암세포가 2개 이상 검출되는 환자는 51명으로 41%에 불과했지만, 수술 후 재발되는 비율은 혈중 암세포 2개 이하 환자들과 비교했을 때 87.5% 대 15.5% 로 월등히 높았다. 다른 연구에서도 간세포암 환자 59명 중 7.5 ml 혈액당 EpCAM 양성 혈중 암세포 1개 이상 검출되는 환자는 18명으로 31%에 불과했지만, EpCAM 양성 혈중 암세포가 중간 이상 병기에서 관찰되며 생존율과 밀접한 관계가 있음을 밝혀냈다. 또 다른 연구에서도 EpCAM 기반 혈중 암세포 검출 방법을 사용하여 간세포암 환자 50명에서 7.5 ml 혈액당 혈중 암세포가 1개 이상 검출되는 비율은 14명으로 28%에 불과했으며, 전반적으로 EpCAM 기반 혈중 암세포 검출방법은 검출 비율이 50%가 넘지 않음을 알 수 있는데, 이는 암이 전이과정에서 일어나는 상피-중간엽 전이 등으로 인해 EpCAM 발현이 감소하기 때문이며, EpCAM 기반 혈중 암세포 검출 방법의 근본적인 한계이다.

[0007] 상피-중간엽 전이(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)란, 부착 성을 가지는 상피성(epithelial) 암세포가 이동성과 침윤성을 가지는 중간엽성(mesenchymal) 암세포로 전이(transition)되는 과정 전체를 말한다. EMT 과정을 거칠 때, 상피성 세포 마커들은 하향 조절(down-regulation) 될 수 있으므로, 상피성 세포 마커에만 의존하여 혈중 암세포를 검출하는 경우, 대부분의 혈중 암세포가 검출되지 않을 수 있다. 실제로 EpCAM을 마커로 사용하여 혈중 암세포를 검출할 경우 폐암, 유방암, 자궁경부암, 비인두암 등에서는 전체 혈중 암세포 중에서 50-70% 정도만 검출할 수 있고, 간암의 경우에는 검출되는 혈중 암세포가 전체의 25%에 불과하다. 간암에서 혼합 및 중간엽성 마커를 가진 혈중 암세포를 검출하여 분석한 결과, 혈중 암세포가 많을 경우 더 강력한 침습 능력을 가지며 이러한 환자는 높은 임상 단계를 나타냈다. 또한 간세포암 환자 214명의 말초 혈액에서 혈중 암세포 및 혈중 암세포 클러스터를 수집하여 분석한 결과, 혈중 암세포 클러스터는 전반적 생존율(overall survival, OS)이나 무진행생존율(progression-free survival, PFS) 밀접하게 연관되어 있고 불량한 예후를 보여줬다는 결과도 발표되었다.

[0008] 한편 최근에는 EMT는 가역적이고 일시적일 수 있고, 세포가 완전한 EMT를 통해 중간엽성 세포로 전환되기보다 부분적인 EMT가 일어난다는 연구 결과가 발표되고 있다. 실제로 대부분의 혈중 암세포는 상피성과 중간엽성을 모두 가지는 중간 형태의 하이브리드 E/M 상태(hybrid epithelial/mesenchymal state) 또는 부분적인 표현형(phenotype)을 가지는 상태로 알려져 있으며, 이들은 클러스터를 이루는 성질이 있고 면역회피능력을 가져 숙주의 면역시스템을 회피할 수 있다고 알려져 있다. 따라서 환자의 모든 혈중 암세포를 검출해내기 위해서는, 상피성 혈중 암세포뿐만 아니라, EMT 표현형을 나타내는 혈중 암세포, 부분적인 EMT를 나타내는 혈중 암세포, 그리고 전혀 새로운 형태의 혈중 암세포를 모두 검출할 수 있는 마커를 발굴할 필요가 있다.

[0009] PTGFRN(Prostaglandin F2 Receptor Negative Regulator, EWI-F, CD9P-1, CD315)은 Immunoglobulin superfamily로 I형 막관통 단백질(transmembrane protein)으로, Prostaglandin F2 Receptor에 음성적으로 작용한다. PTGFRN은 tetraspanin, integrin, 신호전달 효소 및 proteoglycan 등으로 이루어진 Tetraspanin Enriched Microdomain(TEM)의 구성요소이며, CD9 및 CD81과 같은 tetraspanin 단백질과 상호작용을 한다.

PTGFRN은 엑소솜에서 구조단백질로서 많이 발현되어 있어, 이를 통한 엑소솜의 분리 기능이 연구되고 있다. 이외에도 PTGFRN의 발현은 근육세포의 재생, 신경교종의 성장, 전이 등에 관여한다. PTGFRN은 신경아교종을 포함하는 많은 암세포에서 상향 조절(up-regulation)되는 분자로서, 악성 뇌종양인 교모세포종(glioblastoma multiforme, GBM)에서 과발현 되어 PI3K-AKT 신호전달을 통해 세포 성장과 방사선 저항성을 촉진한다고 알려져 있다.

[0010] 본 발명자들은 인간배아줄기세포의 표면에 결합하는 70종의 단일클론항체를 제조하였으며 이들 중 하나인 63-D7는 인간배아줄기세포와 배아암세포뿐만 아니라 간암세포를 포함한 다양한 인간 암세포 표면에 잘 결합하였으며, 정상세포인 인간 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 태아 폐섬유아세포(fetal lung fibroblast, MRC5) 및 정상 간세포에는 결합하지 않았다. 이 발명에서 63-D7항체가 간암 환자에서 혈중 암세포를 인식한다는 것을 알아낸 후, 그 표적 분자가 PTGFRN임을 밝혔다. 63-D7은 간암, 폐암, 대장암, 갑상선암 및 췌장암세포에서 PTGFRN을 인식하였다. 간암세포를 이용한 생존능, invasion, migration 실험에서 PTGFRN 유전자 발현을 억제하면 암세포의 클론성 생존, 이동, 침입을 억제하여 결론적으로 암의 전이를 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한 간암 환자 95명을 대상으로 한 분석에서 63-D7 항체는 혈중 암세포를 92명(97%, 92/95)에서 검출할 수 있으며, 전이 또는 재발하는 환자의 경우에는 그 검출할 수 있는 비율이 더욱 증가함을 관찰하였다. 그리고 63-D7이 인식하는 PTGFRN은 혈중 암세포에서 약물 저항성 및 면역 회피와 관련된 B7-H3 (57.6%), MVP (31.9%), TGF β R1 (51.8%), PD-L1 (37.8%), PD-L2 (17.5%) 및 CD47 (38.1%)와 높은 비율로 함께 발현하여, PTGFRN의 발현이 전이나 재발과 밀접하게 연관됨을 보여주었으며, 이들 분자들을 통해 암세포의 면역 회피를 유도할 수 있음을 제시한다. 또한 63-D7이 간암세포와 췌장암세포에서 내부화를 유도하는 항체임을 밝혔으며, 실제로 이런 특성을 통해 Antibody-Drug Conjugate(ADC)를 이용하여 간암세포 사멸을 유도함으로써 63-D7를 향후 암 치료제로 개발할 수 있음을 제시한다. 또한 63-D7을 처리한 간암세포에서 간암세포의 침윤성이 증가함을 확인할 수 있었으므로 63-D7 항체 자체는 간암세포의 이동과 침윤성을 촉진하는 아고니스틱 항체(agonistic antibody)이다. 이러한 성질을 활용하여 63-D7 항체를 원발암에서 암세포의 이동을 촉진하여 초기 원발암 발생을 예방하거나 원발암 성장을 방해하는데 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Choi HS, et al., Cell Tissue Res. vol. 333, pp. 197-206, 2008

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 암세포의 표면 분자 마커로서 PTGFRN의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0014] 본 발명은 PTGFRN에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 63-D7을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0015] 본 발명은 단일클론항체 63-D7의 암세포에서 이동성 및 침윤성을 증가시키는 PTGFRN에 대한 아고니스틱 항체로서의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0016] 본 발명은 혈중 암세포의 표면 분자 마커로서 PTGFRN의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 PTGFRN에 특이적으로 결합하는 물질로서 단일클론항체 63-D7를 이용하여 PTGFRN 단백질을 분리, 정제 또는 검출하는 상기 단일클론항체의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 1. 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2 및 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2 및 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3을 포함

하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체.

- [0020] 2. 위 1에 있어서, 중쇄 가변영역은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체.
- [0021] 3. 청구항 1에 있어서, 경쇄 가변영역은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체.
- [0022] 4. 위 1 내지 3 중 어느 하나의 항 PTGFRN 단일클론항체에 약물이 접합된 항체-약물 컨주게이트.
- [0023] 5. 위 1 내지 3 중 어느 하나의 항 PTGFRN 단일클론항체를 포함하는 암의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [0024] 6. 위 5에 있어서, 암은 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중피종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 갑상선암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종, 신경모세포종, 교모세포종 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택되는, 암의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [0025] 7. 위 1 내지 3 중 어느 하나의 항 PTGFRN 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마.
- [0026] 8. 위 1 내지 3 중 어느 하나의 항 PTGFRN 단일클론항체를 포함하는 PTGFRN 검출용 조성물.
- [0027] 9. 개체로부터 분리된 시료에 위 1 내지 3 중 어느 하나의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하는 단계를 포함하는 암의 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [0028] 10. 개체로부터 분리된 시료에 위 1 내지 3 중 어느 하나의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하는 단계를 포함하는 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.
- [0029] 11. 위 10에 있어서, 시료는 혈액, 혈장, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 뇨, 점막액, 양수로 이루어진 군에서 선택되는, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.
- [0030] 12. 위 10에 있어서, 시료에 EpCAM에 특이적으로 결합하는 물질을 처리하는 단계를 더 포함하는, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.
- [0031] 13. 위 12에 있어서, EpCAM에 특이적으로 결합하는 물질은 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.
- [0032] 14. 위 10에 있어서, 혈중 암세포는 상피-중간엽 전이되거나 상피-중간엽 전이 진행 중인 혈중 암세포인, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.
- [0033] 15. 위 10에 있어서, 혈중 암세포는 상피성 세포 또는 중간엽성 세포가 아닌, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.
- [0034] 16. 위 10에 있어서, 혈중 암세포는 간암, 폐암, 대장암, 갑상선암, 췌장암, 악성 흑색종, 유방암, 신경모세포종 또는 교모세포종 환자의 혈액 내 혈중 암세포인, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.
- [0035] 17. 위 10에 있어서, 혈중 암세포는 B7-H3(CD276) 단백질을 더 발현하는, 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법.
- [0036] 18. 개체로부터 분리된 시료에 위 1 내지 3 중 어느 하나의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하여 PTGFRN을 검출하는 단계를 포함하는 암 전이 예후 예측에 필요한 정보 제공 방법.
- [0037] 19. 위 18에 있어서, 검출된 PTGFRN의 수준이 대조군 대비 높으면 대조군 대비 암 전이 예후가 더 나쁜 것이라는 정보를 제공하는 단계를 더 포함하는, 암 전이 예후 예측에 필요한 정보 제공 방법.
- [0038] 20. 항암 약물을 투여 받은 환자로부터 분리된 시료에 위 1 내지 3 중 어느 하나의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하여 PTGFRN을 검출하는 단계를 포함하는 항암 약물의 효능 스크리닝 방법.
- [0039] 21. 위 20에 있어서, 검출된 PTGFRN의 수준이 대조군 대비 낮으면 대조군 대비 상기 항암 약물의 암 전이 억제 효능이 더 우수할 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는, 항암 약물의 효능 스크리닝 방법.
- [0040] 22. PTGFRN에 결합하는 물질을 포함하는 혈중 암세포 검출용 조성물.

발명의 효과

- [0042] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체 63-D7은 혈중 암세포 수준 판단, 암 치료 또는 예방, 암 전이 예후 예측 및 항암제 스크리닝에 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체는 간암을 포함하는 다양한 암세포 표면의 PTGFRN에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 이용하여, 다양한 항체-약물 컨쥬게이트를 개발하여 항암제로 사용할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체가 PTGFRN를 자극하여 암세포의 이동성 및 침윤성을 증가시킨다는 점을 활용하여, 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 원발암 세포의 이동을 촉진함으로써 원발암의 암 성장을 예방하고 억제하는 데 사용할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체는 상피성도 중간엽성도 가지지 않는 혈중 암세포를 검출할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체는 부분적으로 상피-중간엽 전이된 혈중 암세포를 검출할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체는 간암 환자에서 높은 효율로 혈중 암세포를 검출할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체에 의해 검출된 혈중 암세포는 1차 암환자에서보다 2차 전이성 암 환자에게서 더 높게 측정되어, 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 통해 암의 병기를 판단할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체는 암 세포에 내부화 될 수 있어, 암 세포 내부로 약물을 효과적으로 전달할 수 있다.
- [0051] 본 발명은 또한 혈중 암세포의 표면 마커로서 PTGFRN를 제공한다.
- [0052] 항 PTGFRN 단일클론항체는 PTGFRN 단백질과의 높은 특이적 결합을 통해 PTGFRN 단백질의 분리, 정제 및 검출에 사용될 수 있다.
- [0053] 항 PTGFRN 단일클론항체는 PTGFRN를 표면에 발현하는 상피-중간엽 전이된 혈중 암세포와 부분적 상피-중간엽성 혈중 암세포에 결합하므로 기존에는 검출할 수 없었던 혈중 암세포를 검출할 수 있다.
- [0054] 항 PTGFRN 단일클론항체는 혈중 암세포 검출을 통해 전이성 암 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1a는 유세포 분석(flow cytometry) 결과를 나타낸 그래프로서, 항체 246-D7, 247-B9와 본 발명의 단일클론항체 63-D7가 각각 인간배아줄기세포 H9, 2종의 간암세포(Huh7, HepG2), 2종의 폐암세포(A549, NCI-H358), 말초 혈액단핵구세포(PBMC)와 결합하는 정도를 보여준다. 도 1b는 도 1a의 그래프를 표로 나타낸 것이다. 도 1c는 면역세포화학염색 결과로서, 혈중 암세포 검출 여부 확인을 위해 간암환자 8명과 정상인 1명의 혈액에서 각각 바이오틴(biotin)으로 표지한 단일클론항체 63-D7, 246-D7, 247-B9와 CD45 항체를 사용해 이중염색하였고, 핵을 DAPI로 염색하였으며, 이들을 병합한 Merge를 도시하였다. 도 1d는 도 1c의 결과를 표로 나타낸 것이다.
- 도 2는 유세포 분석(flow cytometry)의 결과로서, 본 발명의 단일클론항체 63-D7가 인간만능줄기세포(H9), 인간 배아암종세포(NT2/D1) 및 간암세포(Huh7, HepG2, SNU387, SNU449)를 포함한 다양한 암세포(SK-Hep1, A549, NCI-H358, NCI-H460, NCI-H1703, NCI-H23, Colo205, HCT116, SNU790, 8505C, BxPC3, A375, MCF-7, MDA-MB-435, SH-SY5Y, U87-MG)와 인간 배아 신장세포(HEK293FT)에는 강하게 결합하지만, 골수-유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC)와 인간 피부 섬유아세포(HDF)에는 미약하게 결합하고, 인간 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC), 인간 태아 폐 섬유아세포(MRC5), 치수세포(DPC) 및 정상 간세포(Hepatocyte)에는 결합하지 않음을 보여준다. 이 때, 실선은 단일클론항체 63-D7이고 빨간 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군이다.
- 도 3a는 세포 표면을 바이오틴으로 표지한 NT-2/D1 인간 배아암줄기세포(NT-2/D1-biotin)의 세포 용출액에서 단일클론항체 63-D7를 사용하여 면역 침강시킨 단백질을 10% SDS-PAGE를 통해 분리하고, 웨스턴 블롯팅 하여 니트로셀룰로스 막으로 옮긴 후, 스트렙타비딘-HRP(SA-HRP)로 반응시켜 분석한 결과이다. 항체를 넣지 않고 동일 실험을 진행한 것(No Ab)을 음성 대조군(Con)으로 하였다. 화살표는 63-D7에 의해 면역 침강된 단백질을 나타낸다. 도 3b는 도 3a와 동일하게 면역 침강한 단백질을 10% SDS-PAGE를 통해 분리한 후, 폴리아크릴아마이드 젤을 PageBlue로 염색한 결과이다. 1X는 3 mg 세포 용출액을 사용한 것이고 3x는 그것의 3배 양을 사용한 것

이다. 이후 도 3b의 점선 상자 내부의 단백질을 내려내어 LC-MS/MS를 수행하였다. 도 3c는 도 3b에서 단일클론 항체 63-D7로 면역 침강한 후 회수한 단백질을 LC-MS/MS로 분석한 결과로, 63-D7 항원의 아미노산 서열 중 PTGFRN 단백질의 아미노산 서열과 일치하는 부분을 밑줄로 표시하였다.

도 4a는 바이오틴 표지한 인간 비소세포암 A549 세포 용출액에서 각각 생쥐 항-PTGFRN 단일클론항체 (α -PTGFRN) 및 생쥐 63-D7 단일클론항체를 사용하여 면역 침강한 단백질 및 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(No Ab)를 10% SDS-PAGE로 분리한 후 생쥐 α -PTGFRN 항체를 사용해 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과이다. 도 4b는 도 4a의 니트로셀룰로스 막을 신호 제거 용액으로 제거한 후 스트렙타비딘-HRP(SA-HRP)을 사용해 분석한 결과로 PTRFRN이 63-D7에 의해 인식되는 세포표면분자임을 확인하였다. 도 4c는 단일클론항체 63-D7의 항원이 PTGFRN임을 재 확인하기 위하여 PTGFRN-FLAG 단백질을 인간 배아 신장세포 HEK293FT에서 과발현 시킨 후 세포 용출액을 공지의 생쥐 항-FLAG 단일클론항체 (α -FLAG), 공지의 생쥐 항-PTGFRN 단일클론항체 (α -PTGFRN) 및 단일클론항체 63-D7으로 면역 침강 및 웨스턴 블롯을 수행한 결과로서, PTRFRN이 63-D7에 의해 인식되는 세포표면분자임을 검증하였다. WB는 웨스턴 블롯을 의미한다.

도 5a는 간암세포주 Huh7 및 SNU449에서 PTGFRN 녹다운(Knockdown) 실험을 수행한 결과로, 음성 대조군 siRNA(siCon) 및 PTGFRN에 대한 두 종의 siRNA(siPTGFRN#1 및 siPTGFRN#2)를 각각 처리하여 녹다운을 수행한 간암세포에서 PTGFRN mRNA의 발현을 qPCR로 분석하였다. 도 5b는 녹다운한 Huh7 및 SNU449 세포 표면의 PTGFRN을 분석하기 위해 생쥐 PTGFRN 단일클론항체 (α -PTGFRN)가 결합하는 정도를 유세포분석으로 확인한 결과이다. 실선은 단일클론항체이고 빨간색 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군(isotype) 자료이다. 도 5c는 도 5b를 통계적으로 분석한 그래프이다. 도 5d는 PTGFRN 녹다운한 Huh7 및 SNU449에서 암세포 클론원성 생존을 측정한 결과로, 세포 접종 후 8일째 생존한 세포 클론을 크리스탈 바이올렛으로 염색한 것이다. 도 5e는 5d를 통계적으로 분석한 그래프로, *은 $p < 0.05$ 인 p value를 나타낸다.

도 6a는 간암세포주 Huh7 및 SNU449에서 PTGFRN 녹다운 실험을 수행한 결과로, 음성대조군 scrambled shRNA(shScramble) 또는 두 종의 PTGFRN에 대한 shRNA(shPTGFRN#1, shPTGFRN#2)를 인간 배아 암세포 HEK293FT 트랜스펙션 한 후 렌티바이러스를 회수하여 Huh7 및 SNU449 간암세포에 처리하여 녹다운을 수행하고, PTGFRN 단백질 발현을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. 도 6b는 Huh7 및 SNU449 간암세포에서 PTGFRN 발현이 감소한 것을 유세포분석기로 분석한 결과이다. 도 6c는 도 6b를 통계 분석한 그래프이다. 도 6d는 shPTGFRN#1으로 녹다운한 SNU449에서 암세포 클론원성 생존을 측정한 결과로, 세포 접종 후 8일째 생존한 세포 클론을 크리스탈 바이올렛으로 염색하였으며, shScramble은 대조군이다. 도 6e는 6d를 통계 분석한 결과로서, ***는 대조군(shScramble)에 대해 $p < 0.005$ 인 것을 나타낸다. 도 6f는 shPTGFRN#2으로 녹다운한 SNU449에서 암세포 클론원성 생존을 측정한 결과이다. 도 6g는 도 6f의 통계 분석한 결과로서, ***는 $p < 0.005$ 인 것을 나타낸다.

도 7a는 음성 대조군 shRNA(shScramble) 또는 두 종의 PTGFRN에 대한 shRNA(shPTGFRN#1, shPTGFRN#2)를 이용하여 간암세포의 이동 정도를 측정한 결과로, PTGFRN 녹다운 간암세포 Huh7 및 SNU449를 24-well 트랜스웰 챔버에 분주한 후 이틀간 배양하여 아래의 챔버로 이동한 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하고 찍은 사진이다. 도 7b는 도 7a 실험을 3회 반복하여 통계 처리한 그래프이며, ***은 $p < 0.001$, **은 $p < 0.01$, *은 $p < 0.05$ 인 것을 나타낸다. 도 7c는 음성 대조군 shRNA(shscramble) 또는 두 종의 PTGFRN에 대한 shRNA(shPTGFRN#1, shPTGFRN#2)를 이용하여 암세포의 침입성을 측정한 결과로, PTGFRN 녹다운 간암세포 Huh7 및 SNU449를 Matrigel이 코팅된 트랜스웰 챔버에 분주한 후 이틀간 배양하여 아래층으로 침입한 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하고 찍은 사진이다. 도 7d는 도 7c 실험을 3회 반복하여 통계처리한 그래프이며, ***은 $p < 0.001$, **은 $p < 0.01$, *은 $p < 0.05$ 인 것을 나타낸다.

도 8a는 간암세포주 Huh7에서 음성대조군 scrambled shRNA(shScramble) 또는 두 종의 PTGFRN에 대한 shRNA(shPTGFRN#1, shPTGFRN#2)를 간암세포에 처리하여 녹다운을 수행하고, PTGFRN 녹다운된 간암세포를 매트릭젤(Matrigel), Collagen I, CollagenIV, 젤라틴(Gelatin)이 코팅된 12-well 세포배양 플레이트에 반응시켜 세포의 부착 정도를 분석한 결과로, 부착한 간암세포를 현미경으로 관찰한 사진이다. 도 8b는 도 8a 실험을 반복 수행한 후 현미경 사진을 Image J로 분석하여 세포의 결합 정도를 통계 처리한 그래프이다. ***은 $p < 0.001$, **은 $p < 0.01$, *은 $p < 0.05$ 인 것을 나타내며, ns는 통계적 유의성이 없음을 나타낸다. 도 8c는 간암세포주 SNU449에서 음성대조군 scrambled shRNA(shScramble) 또는 두 종의 PTGFRN에 대한 shRNA(shPTGFRN#1, shPTGFRN#2)를 간암세포에 처리하여 녹다운을 수행하고, PTGFRN 녹다운된 간암세포를 매트릭젤(Matrigel), Collagen I, Collagen IV, 젤라틴(Gelatin)이 코팅된 12-well 세포배양 플레이트에 반응시켜 세포의 부착 정도를 분석한 결과로, 부착한 간암세포를 현미경으로 관찰한 사진이다. 도 8d는 도 8c 실험을 반복 수행한 후 현미경 사진을 Image J로 분석하여 세포의 결합 정도를 통계 처리한 그래프이다. ***은 $p < 0.001$, **은 $p < 0.01$, *은 $p < 0.05$ 인 것을

나타내며, ns는 통계적 유의성이 없음을 나타낸다.

도 9a는 PTGFRN 녹다운 간암세포의 NK세포에 대한 면역회피능력을 측정한 결과로, SNU449에서 음성대조군 scrambled shRNA(shscramble) 또는 shPTGFRN#2를 간암세포에 처리하여 녹다운을 수행하고, PTGFRN 녹다운 간암세포를 NK92와 공동 배양 후 사멸되지 않고 남은 SNU449세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색한 것이다. 1:1, 2.5:1, 5:1은 이펙터 세포(effector cell)인 NK92와 타겟 세포(target cell)인 SNU449의 비율(E:T 비율)을 나타낸다. 도 9b는 도 9a의 세포를 녹인 후 OD540에서 흡광도를 측정하여 정량화 한 것을 그래프로 나타낸 것이다. 도 9c는 도 9b에서 측정한 OD540 결과를 E:T 비율로 표시하여 세포사멸 정도를 제시한 그래프이다

도 10은 음성 대조군 shRNA(shScramble) 또는 두 종의 PTGFRN에 대한 shRNA(shPTGFRN#1, shPTGFRN#2)를 이용하여 PTGFRN 녹다운 간암세포 Huh7 및 SNU449의 단백질 용출액을 통해 PTGFRN 감소에 따른 세포의 B7-H3, FAK, Src의 단백질 및 인산화된 p-FAK(Y397), p-Src(Y416) 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이고, GAPDH는 대조군이며, 숫자는 image J로 정량한 것이다.

도 11a는 HEK293FT 세포에 pcDNA3.1(+)-PTGFRN-FLAG 벡터와 pcDNA3.1(+)-PTGFRN-myc 벡터를 co-transfection 시킨 후 용출액을 얻어 한 세포내에서 같은 PTGFRN의 cis 상호작용 확인하기 위해 생쥐 항-FLAG, 토끼 항-myc, 63-D7로 면역침강하고, anti-FLAG, anti-myc 항체로 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. No Ab는 대조군이며 화살표는 면역 침강된 PTGFRN을 의미한다. 도 11b는 HEK293FT 세포에 pcDNA3.1(+)-PTGFRN-FLAG 벡터와 pcDNA3.1(+)-PTGFRN-myc 벡터를 각각 transfection 시킨 후 각각의 용출액을 섞어서 다른 세포 사이 trans 상호작용을 확인하기 위해 생쥐 항-FLAG, 토끼 항-myc, 63-D7로 면역침강하고, anti-FLAG, anti-myc 항체로 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. No Ab는 대조군이며 화살표는 면역 침강된 PTGFRN을 의미한다. 도 11c는 간암세포 SNU449에서 각각 생쥐 항-PTGFRN 단일클론항체(α -PTGFRN), 생쥐 항-63-D7 단일클론항체, 생쥐 항-SLC3A2, 생쥐 항-B7-H3로 면역 침강시킨 후 α -PTGFRN로 웨스턴 블롯팅 한 결과로, SLC3A2(CD98hc)과 B7-H3에 의해 PTGFRN이 면역 침강되는 것을 보여준다. 도 11d는 B7-H3와 PTGFRN의 상호작용을 확인하기 위해, HEK293FT 세포에 pcDNA3.1(+)-PTGFRN-myc 벡터와 pcDNA3.1(+)-B7-H3-FLAG 벡터를 co-transfection시킨 다음, 항-FLAG, 항-B7-H3, 항-myc, 63-D7로 면역 침강하고 항-myc, 항-FLAG 항체로 검출한 결과 서로 상호 작용함을 확인한 결과이다. HC는 면역글로불린(immunoglobulin) 중쇄를 의미한다. 도 11a 내지 도 11d에서 WB는 웨스턴 블롯을 의미한다.

도 12a 및 12b는 간암세포주 각각 Huh7 및 HepG2에서 63-D7 항체와 마그네틱 비드로 63-D7 양성 및 음성 세포를 sorting 한 후, Materigel-coated plate에서 세포 부착성을 측정한 결과이다. 도 12c는 Huh7를 종양구 배양하여 암줄기세포성을 증가시킨 후, 63-D7의 암세포 결합력을 암줄기세포 양성 마커인 CD133, CD44 및 EpCAM이 부착성 세포일때와 비교하여 유세포분석으로 표시한 결과이다. 도 12d는 도 12c를 통계적으로 분석한 그래프이다. ***은 $p<0.005$ 인 것을 나타낸다. 도 12e는 63-D7으로 sorting 한 간암세포주 Huh7에서 63-D7 양성 및 음성 암세포의 암줄기세포성을 보여주는 클론원성 생존을 측정한 결과로, 세포를 접종 후 8일째 생존한 세포 클론을 크리스탈 바이올렛으로 염색한 그림이다. 도 12f는 도 12e의 결과를 통계 처리한 그림이다. ***은 대조군에 대해 $p<0.005$ 인 것을 나타낸다. 도 12g는 63-D7으로 sorting 한 간암세포주 HepG2에서 63-D7 양성 및 음성 암세포의 클론원성 생존을 측정한 결과이다. 도 12h는 도 12g의 결과를 통계 처리한 그림이다. ***은 대조군에 대해 $p<0.005$ 인 것을 나타낸다.

도 13a 및 도 13b는 유세포 분석을 통해 단일클론항체 63-D7가 인간 간암세포 Huh7, HepG2, SNU449와 인간 채장 암세포 SNU213, BxPC3에 내부화(internalization)되는 것을 분석한 결과이다. 도 13a 및 도 13b에서 실선은 4℃에서 반응한 단일클론항체이고, 63-D7, 점선은 4℃에서의 반응 후 37℃에서 반응한 63-D7 항체이며, 빨간색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 도 13c는 도 13a와 동일한 실험을 3회 반복하여 각 암세포의 세포 표면에서 63-D7의 부착 정도를 상대적인 평균 형광세기로 통계적으로 처리하여 비교한 그래프이다. ****은 $p<0.001$, ***은 $p<0.005$, **은 $p<0.01$, *은 $p<0.05$ 인 것을 나타낸다. 도 13d는 도 13b와 동일한 실험을 3회 반복하여 각 암세포의 세포 표면에서 63-D7의 부착 정도를 상대적인 평균 형광세기로 통계적으로 처리하여 비교한 그래프이다. ****은 $p<0.001$, ***은 $p<0.005$, **은 $p<0.01$, *은 $p<0.05$ 인 것을 나타낸다.

도 14a 및 도 14b는 63-D7 또는 생쥐 IgG isotype항체가 처리된 Huh7 세포의 세포 생존율을 측정한 결과이다. Huh7 세포에 63-D7 또는 생쥐 isotype항체를 각각 0 nM 내지 100 nM 처리한 후, 도 14a는 α -mFc-CL-DMDM를, 도 14b는 α -mFc-CL-MMAF를 48시간 동안 처리하여 세포 생존율을 CCK-8을 이용해 측정한 것이다. 도 14a 및 도 14b에서 *은 $p<0.05$, **은 $p<0.01$, ****은 $p<0.001$ 를 나타낸다.

도 15a는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7에 의해 인식된 혈중 암세포를 검출하는 방법을 나타낸 그림으로, CD45 양성 세포들을 제거하고 남은 세포를 Dylight488 접합된 63-D7과 다른 마

커(항체)로 염색하는 방법을 나타낸 것이다. 도 15b는 PBMC에 Huh7세포를 0, 10, 30, 50, 100개씩 넣고 15a에 도시된 방법과 같이 CD45 양성 세포 제거 후 회수된 Huh7세포를 세어 회수율을 측정한 그래프이다. 도 15c는 도 15a에 도시된 방법과 같이 회수한 혈중 암세포를 Dylight649 접합된 항-마우스 IgG 및 Dylight 488 접합된 63-D7과 함께 염색을 수행한 것이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 도시한 것이다.

도 16a 내지 도 16c는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7과 항-MVP, 항-HSA, 항-PanCK, 항-E-cadherin, 항-EpCAM, 63-D7, 항-Vimentin, 항-Twist, 항-ZEB1 항체가 이중 염색된 혈중 암세포를 도시한 공초점 현미경 이미지이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 도시한 것이다.

도 17은 간암 환자 혈액(primary HCC 53명 및 metastatic HCC 42명)과 정상인 및 간염환자(non-neoplastic 26명) 혈액에서 본 발명의 단일클론항체 63-D7에 의해 인식된 모든 혈중 암세포 수(63-D7+ cells/ml)를 세 그룹 간 비교 검정(Kruskal-Wallis Test)을 통해 비교한 그래프로(p value <0.0001), 각 그룹 간에 p-value가 모두 <0.0001으로 세 그룹 간 차이에서 모두 유의성이 있음을 도시한 것이다.

도 18a는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7, 항-EpCAM, 항-Vimentin 항체로 삼중 염색된 혈중 암세포를 도시한 공초점 현미경 이미지이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 함께 도시한 것이다. BF는 명시야(bright field)를 의미한다. 도 18b는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7, 항-MVP, 항-B7-H3 항체로 삼중 염색된 혈중 암세포를 도시한 공초점 현미경 이미지이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 함께 도시한 것이다. BF는 bright field를 말하며 명시야를 의미한다. BF는 명시야(bright field)를 의미한다.

도 19는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7, 항-TGF β R1, 항-B7-H3 항체로 삼중 염색된 혈중 암세포를 도시한 공초점 현미경 이미지이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 함께 도시한 것이다. BF는 명시야(bright field)를 의미한다.

도 20a는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7, 항-ULBP1, 항-B7-H3 항체로 삼중 염색된 혈중 암세포를 도시한 공초점 현미경 이미지이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 함께 도시한 것이다. BF는 명시야(bright field)를 의미한다. 도 20b는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7, 항-MICA/B, 항-B7-H3 항체로 삼중 염색된 혈중 암세포를 도시한 공초점 현미경 이미지이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 함께 도시한 것이다. BF는 명시야(bright field)를 의미한다.

도 21a는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7, 항-PD-L1, 항-B7-H3 항체로 삼중 염색된 혈중 암세포를 도시한 공초점 현미경 이미지이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 함께 도시한 것이다. BF는 명시야(bright field)를 의미한다. 도 21b는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7, 항-PD-L2, 항-B7-H3 항체로 삼중 염색된 혈중 암세포를 도시한 공초점 현미경 이미지이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 함께 도시한 것이다. BF는 명시야(bright field)를 의미한다.

도 22는 간암 환자 혈액에서 본 발명의 PTGFRN 특이적인 단일클론항체 63-D7, 항-CD47, 항-B7-H3 항체로 삼중 염색된 혈중 암세포를 도시한 공초점 현미경 이미지이며, 핵을 염색한 DAPI, 그리고 이들을 병합한 Merge를 함께 도시한 것이다. BF는 명시야(bright field)를 의미한다.

도 23은 단일클론항체 63-D7 중쇄 유전자 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)를 진한 글씨로 표시한 그림이다.

도 24는 단일클론항체 63-D7 경쇄 유전자 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)를 진한 글씨로 표시한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 본 발명은 혈중 암세포 수준 판단, 암 치료 또는 예방, 암 전이 예후 예측 및 항암제 스크리닝을 위한 항 PTGFRN 단일클론항체를 제공한다.

[0058] 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2 및 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2 및 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3을

포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체를 제공한다.

- [0059] 본 명세서에서 "항체"라는 용어는 완전한 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편(즉, "항원 결합 부위") 또는 단일쇄를 포함한다. 항체란 다이설파이드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질, 또는 그 항원 결합 부분을 말한다.
- [0060] 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 상기 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본 명세서에서 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 상기 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, 즉 CL로 이루어진다. 상기 VH 영역 및 VL 영역은 골격구조 영역(FR)이라 불리는 더 보존된 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 영역(CDR)이라 불리는 과가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다.
- [0061] 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단에서 카복시 말단으로 하기 순서로 배열되는 3개의 CDR 및 4개의 FR, 즉 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 이루어진다. 상기 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 상기 항체의 불변 영역은 숙주 조직 또는 인자[면역계의 각종 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 전형적 보체계의 제1 성분(C1q)을 포함함]에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.
- [0062] VH 영역에 포함되는 CDR은 중쇄 상보성 결정영역1(heavy chain complementary determine region 1, HCDR1), HCDR2 및 HCDR3라 하고, VL 영역에 포함되는 CDR은 경쇄 상보성 결정영역 1(light chain complementary determine region 1, LCDR1), LCDR2 및 LCDR3라 한다.
- [0063] 본 명세서에서 항체의 "항원 결합 부위"(또는 간단히 "항체 일부분")라는 용어는 항원(예를 들어, PTGFRN)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 항체의 항원 결합 기능은 전체 길이 항체의 단편에 의해서도 발휘될 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0064] 항체의 "항원 결합 부분"이란 용어에 포함되는 결합 단편의 예로는 (i) Fab 단편, 즉 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성되는 1가 단편; (ii) F(ab')₂ 단편, 즉 힌지 영역에서 다이설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성되는 Fd 단편; (iv) 항체의 한쪽 팔의 VL 및 VH 도메인으로 구성되는 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 구성되는 dAb 단편[Ward et al., (1989) Nature 341:544-546]; 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 (vii) 경우에 따라 합성 링커에 의해 연결될 수 있는 2개 이상의 분리된 CDR의 조합을 포함한다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인, 즉 VL 및 VH는 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 재조합법을 이용하여, VL 영역과 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자[단일쇄 Fv(scFv)라 함]를 형성한 단일 당단백질체로 만들 수 있는 합성 링커에 의해 이들을 연결할 수 있다. 이러한 단일쇄 항체도 또한 항체의 "항원 결합 부위"이라는 용어에도 포함되는 것으로 한다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 알려진 통상의 기법을 이용하여 얻을 수 있으며, 이 단편을 완전한 항체와 동일한 방식으로 유용성이 있는지에 대해 스크리닝한다. 항원 결합 부분은 재조합 DNA 기법, 또는 완전한 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 제조할 수 있다.
- [0065] 본 명세서에서 항체는 단일클론항체 또는 다클론 항체일 수 있다. 항체는 당업계에 공지된 인간화 항체의 제조를 위한 다양한 기법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0066] 본 명세서에서 "단일클론항체"라는 용어는 단일 결합 특이성을 나타내고 특정 에피토프에 대해 친화성을 나타내는 항체를 말한다.
- [0067] 본 명세서에서 PTGFRN 특이적인 단일클론항체는 효율적으로 사실상 무한한 양으로 매우 정제된 형태로 제조될 수 있다. PTGFRN 특이적인 단일클론항체는 PTGFRN의 특정 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0068] 본 명세서에서 PTGFRN에 결합하는 항체로, 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 비인간화 동물로부터 얻은 불멸화된 세포에 융합된 B세포의 바이러스 또는 암 유전자 형질전환, 인간 항체 유전자의 라이브리리를 이용한 파지 디스플레이 기법, 체세포 하이브리드화 기법 등을 사용하여 제조할 수 있다. 단일클론항체를 생산하기 위한, 면역화 프로토콜 및 면역화된 비장 세포의 단리 및 융합 기법을 비롯한 동물계에서의 하이브리도마 생산 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0069] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 방사종(radionuclides), 형광원(fluorescours) 및 효소(enzymes) 등에 의해 표지화될 수 있다.
- [0070] 본 명세서에서 "에피토프" 또는 "항원 결정 부위"라는 용어는 면역글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항원의 한 부위를 말한다. 에피토프는 인접된 아미노산으로부터 형성될 수도 있고 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 비인접 아미노산으로부터 형성될 수도 있다. 인접된 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 일반적으로 변성

용매에 노출되어도 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 변성 용매로 처리시 일반적으로 상실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간적 입체구조로 적어도 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간적 입체구조를 결정하는 방법으로는 당업계에서 공지된 기법 및 본 명세서에 기재된 기법, 예를 들어 x선 결정학적 분석 및 2차원 핵 자기 공명을 들 수 있다. 이와 관련하여, 예를 들어 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)]을 참조할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 상기 에피토프(또는 항원 결정 부위)는, 더 큰 아미노산 분절(예를 들어, 3차원 구조를 갖는 단백질)에 내에 있을 때에도 에피토프/항원 결정 부위에 대한 친화성의 추가적인 증가가 관찰되지 않는다는 점에서 입체 에피토프로서 기능한다.

[0071] 본 명세서에서 사용되는 "단위형(isotype)"이란 용어는 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 클래스(예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 말한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 단일클론항체는 IgG1 단위형이다.

[0072] 본 발명은 인간 배아줄기세포 세포 표면에 결합하는 단일클론항체를 제조하고, 제조한 항체 중 인간 배아줄기세포, 배아암세포 및 다양한 암세포 표면에 결합하면서, 정상세포인 인간 말초 단핵구 세포 또는 인간 간세포에는 결합하지 않는 단일클론항체 63-D7의 항원을 탐색하였다.

[0073] 본 발명에서 63-D7 단일클론항체가 세포표면 단백질 PTGFRN(Prostaglandin F2 Receptor Negative Regulator, CD315)를 인식함을 밝혔다. 또한, 63-D7 단일클론항체가 인식하는 PTGFRN는 간암, 폐암, 대장암, 췌장암 및 갑상선암 등의 세포주에서 발현됨을 확인하였다.

[0074] 본 발명에서 간세포암 환자 95명 대상으로 실험한 결과 63-D7 단일클론항체가 97%의 효율로 혈중 암세포를 검출할 수 있음을 확인하였다. 63-D7 항체는 EMT 마커인 Vimentin과 1차 HCC에서 약 53%, 2차 HCC에서 약 28%의 비율로 함께 발현되므로, 63-D7 항체를 EMT 표현형을 나타내는 혈중 암세포 검출에 사용할 수 있음을 확인하였다. 또한 63-D7이 인식하는 혈중 암세포는 EpCAM과 Vimentin 모두를 발현하지 않는 중간 형태의 혈중 암세포도 검출할 수 있으며, 구체적으로 1차 HCC에서 약 46%, 2차 HCC에서 약 72%의 비율로 발현이 확인되었다.

[0075] 따라서, 63-D7 항체는 기존의 EpCAM 마커 기반 혈중 암세포 진단 기술로는 확인할 수 없던 중간 형태 표현형 및 EMT 표현형의 혈중 암세포를 모두 검출해낼 수 있는 새로운 마커임을 알 수 있다.

[0076] PTGFRN(Prostaglandin F2 Receptor Negative Regulator, EWI-F, CD9P-1, CD315)은 Immunoglobulin superfamily로 I형 막관통 단백질(transmembrane protein)으로, Prostaglandin F2 Receptor에 음성적으로 작용한다. 본 명세서에서 PTGFRN은 전장 서열, 동등한 기능을 수행하는 단편 또는 PTGFRN의 연속된 아미노산 서열(예컨대, 도 3c에 개시된 PTGFRN 아미노산 서열)을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0077] PTGFRN은 척추동물, 더 구체적으로, 인간 또는 마우스 유래 PTGFRN일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0078] 본 발명은 중쇄 가변영역은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체를 제공한다.

[0079] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체 클론 63-D7에 의해 생성된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열번호 1)과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단일쇄 가변영역(scFv)을 포함하는 항체일 수 있다.

[0080] 본 발명은 경쇄 가변영역은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항 PTGFRN 단일클론항체를 제공한다.

[0081] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체는 클론 63-D7에 의해 생성된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열번호 2)과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단일쇄 가변영역(scFv)을 포함하는 항체일 수 있다.

[0082] 본 발명은 본 발명의 PTGFRN 단일클론항체에 약물이 접합된 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate, ADC)를 제공한다.

[0083] 본 발명의 단일클론항체는 다양한 암세포에서 PTGFRN의 세포 내부화를 촉진할 수 있으므로, 항체-약물 컨쥬게이트에 사용되는 항체로써 적합하다.

[0084] 항체-약물 컨쥬게이트에서 약물은 종류에 제한 없이 목적에 따라 당업자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 공지된 항암 약물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 컨쥬게이트하는 방식은 항체와 약물을 접합시킬 수 있는 것이라면 당업계 공지의 방법으로 제한 없이 선택될 수 있다.

- [0085] 본 발명은 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 포함하는 암의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0086] 본 발명은 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 포함하는 암의 치료, 예방 또는 진단 방법을 제공한다.
- [0087] 본 명세서에서 암은 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중피종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 갑상선암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종, 신경모세포종, 교모세포종 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0088] 전이성 암은 암이 발병한 하나의 기관에서 림프절을 포함한 다른 기관으로 전이되는 암이다. 암이 발병한 기관에 존재하는 암은 원발암(primary cancer)이라 한다. 전이는 전이되는 조직에 따라 뇌 전이, 뼈 전이, 간 전이, 또는 폐 전이일 수 있다. 전이성 암은 악성 종양일 수 있다. 악성 종양은 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중피종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종, 피부암, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0089] 본 발명의 단일클론항체는 상기 암의 아고니스틱 항체(agonistic antibody)로서, 암세포 표면의 PTGFRN를 자극하여 암세포의 이동과 침윤성을 촉진시킬 수 있다. 또한, 상기 단일클론항체는 원발암에서 암세포의 이동을 촉진하여 초기 원발암의 발생을 예방하거나 성장을 방해할 수 있다.
- [0090] 본 발명은 상기 항 PTGFRN 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.
- [0091] 본 명세서에서 하이브리도마는 하이브리도마 세포 또는 하이브리도마 세포주를 포함하는 것일 수 있다. 상기 하이브리도마는 2개의 다른 종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 세포로, 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol, 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. 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마는 이를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.
- [0092] 본 발명은 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 포함하는 PTGFRN 검출용 조성물을 제공한다.
- [0093] 상기 항원-항체 복합체는 검출 표지체(detection label)를 이용하여 검출할 수 있다. 예컨대, 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미세입자(microparticle), 레독스 분자 또는 방사선동위원소 등에서 선택될 수 있으며, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0094] 본 발명은 분리된 시료에 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하는 단계를 포함하는 암의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0095] 본 명세서에서 개체는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.
- [0096] 본 명세서에서 생물학적 시료는 생물로부터 수득된 시료를 말한다. 생물학적 시료는 예를 들면 혈액, 혈장, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 뇨, 점막액, 양수, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0097] 본 명세서에서 PTGFRN에 특이적으로 결합하는 물질은 항-PTGFRN 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 앵타머일 수 있다. 앵타머는 표적 분자에 결합하는 올리고핵산 또는 펩타이드를 말한다.
- [0098] 본 발명은 개체로부터 분리된 시료에 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하는 단계를 포함하는 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0099] 예를 들어, 개체로부터 분리된 생물학적 시료와 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 접촉시켜 상기 시료 중 혈중 암세포와 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 결합시키는 단계; 반응 혼합물로부터 상기 혈중 암세포를 검출하는 단계; 및 상기 혈중 암세포가 검출된 경우 상기 개체를 전이성 암에 걸렸거나 걸릴 확률이 높은 것으로 판별하는 단계를 포함하는 전이성 암 진단에 필요한 정보를 제공할 수 있다.
- [0100] 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체는 PTGFRN에 특이적으로 결합할 수 있으므로, PTGFRN을 검출할 수 있고, 또한, 상기 조성물을 이용하여 PTGFRN의 분리 또는 정제가 가능하다. 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 PTGFRN 단백질을 분리, 정제 또는 검출할 수 있다.
- [0101] 항원-항체 복합체란 시료 중의 PTGFRN의 존재 또는 부재를 확인하기 위한 상기 PTGFRN와 이를 인지하는 단일클론항체의 결합물을 의미한다. 항원-항체 복합체는 검출 표지체(detection label)를 이용하여 검출할 수 있다. 예컨대, 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미세입자(microparticle), 레독스 분자 또는 방사선동위원소 등에

서 선택될 수 있으며, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

- [0102] 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment), 또는 섬광계수법(scintillation counting method) 등을 사용하여 검출할 수 있다. 예컨대, 유세포 분석법(flow cytometry), 면역세포화학법, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역측정법(ELISA), 웨스턴 블롯팅(Western Blotting), 면역침강 분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 단백질 칩(protein chip) 등에 의해 검출할 수 있다. 보다 구체적으로, 소량의 목적 단백질을 회수하는데 유용한 면역침강법(immune precipitation) 및 면역블롯팅을 통해 검출할 수 있다.
- [0103] 구체적으로, 항원-항체 복합체를 효소면역측정법(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하여 검출할 수 있다. 상기 ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지를 하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다.
- [0104] 혈중 암세포(Circulating tumor cell, CTC)는 종양 침윤(tumor invasion) 과정을 거쳐 혈액 중에 존재하여 체내를 순환하는 회소의 종양세포이다. 혈중 암세포는 암의 전이 및 재발에 관여하는 인자로 알려져 있다. 혈중 암세포는 상피-중간엽 전이된 혈중 암세포일 수 있다.
- [0105] 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition, EMT)는 상피 세포가 세포 극성 및 세포간 부착을 상실하고 중간엽 세포로 전환되어 이동성 및 침윤성 세포가 되는 과정이다. 상피-중간엽 전이는 중배엽 형성 및 신경관 형성을 포함하는 많은 발달 과정에 필수적인 과정이고, 상처 치료, 장기 섬유증(organ fibrosis), 및 암 진행 중 전이의 개시에 일어나는 것으로 알려져 있다.
- [0106] 혈중 암세포는 상피-중간엽 전이된 혈중 암세포, 상피-중간엽 전이되지 않은 혈중 암세포 또는 상피-중간엽 전이 진행 중인 혈중 암세포일 수 있고, 바람직하게는 상피-중간엽 전이되거나 상피-중간엽 전이 진행 중인 혈중 암세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0107] 혈중 암세포는 상피성 세포(epithelial cell)도 또는 중간엽성 세포(mesenchymal cell)도 아닌 세포일 수 있다.
- [0108] 본 명세서에서 혈중 암세포의 검출은 생물학적 시료로부터 혈중 암세포와 PTGFRN에 특이적으로 결합하는 물질이 결합한 복합체를 분리하는 것을 포함한다. 검출 방법은 전자 현미경 관찰, 미세여과, 원심분리, 미세유동, 면역염색(immunostaining), 면역침강(immunoprecipitation), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 유세포 분석(flow cytometry), FACS(fluorescence activated cell sorting), 또는 이들의 조합을 포함한다. 또한, 검출 방법은 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR), 전기 영동, 노던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0109] 또한, 본 발명의 일 구체 예에 따르면, PTGFRN은 간암, 폐암, 대장암, 췌장암, 갑상선암 세포주에서 발현이 확인되며, 간세포암 환자의 97%의 비율로 혈중 암세포가 검출되었다. 동시에, 또한 EMT 마커인 Vimentin과 1차 HCC에서는 약 53%, 2차 HCC에서는 약 28% 동시에 발현이 확인되므로, EMT 표현형을 나타내는 혈중 암세포 검출에 유용하며 전이성 암 진단에 사용할 수 있음을 확인하였다. 또한 63-D7이 인식하는 혈중 암세포는 EpCAM과 Vimentin 모두를 발현하지 않은 중간형태 혈중 암세포에도 1차 HCC에서는 약 46%, 2차 HCC에서는 약 72% 동시에 발현이 확인되어 기존의 EpCAM 마커 기반 혈중 암세포 진단 기술의 단점을 보완하여 혈중 암세포 검출에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0110] 혈중 암세포는 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중피종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택되는 원발성 암 유래일 수 있다.
- [0111] 본 발명은 개체로부터 분리된 시료에 EpCAM에 특이적으로 결합하는 물질을 처리하는 단계를 더 포함하는 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다. 본 발명은 상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 물질은

항-EpCAM 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다.

- [0112] EpCAM은 상피성 세포에서 Ca^{2+} 의존성 동형(homotypic) 세포간 부착을 매개하는 막관통 당단백질이다. EpCAM은 세포 신호 전달, 이동, 증식, 및 분화에 관련된 것으로 알려져 있다. EpCAM은 인간 또는 마우스 EpCAM일 수 있다. 예를 들면, EpCAM은 GenBank Accession No. NP_002345의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 예를 들면, EpCAM은 GenBank Accession No. NM_002354의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드일 수 있다. EpCAM에 특이적으로 결합하는 물질은 항-EpCAM 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 전술한 바와 같다.
- [0113] 본 발명의 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법에서 혈중 암세포는 상피-중간엽 전이되거나 상피-중간엽 전이 진행 중인 혈중 암세포일 수 있다.
- [0114] 본 발명의 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법에서 혈중 암세포는 하이브리드 E/M 상태일 수 있다.
- [0115] 본 발명의 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법에서 혈중 암세포는 상피성 세포도 중간엽성 세포도 아닐 수 있다.
- [0116] 본 발명의 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법에서 혈중 암세포는 간암, 폐암, 대장암, 갑상선암, 췌장암, 악성 흑색종, 유방암, 신경모세포종 또는 교모세포종 환자의 혈액 내 혈중 암세포일 수 있다.
- [0117] 본 발명의 혈중 암세포 수준 판단에 필요한 정보 제공 방법에서 혈중 암세포는 B7-H3(CD276) 단백질을 더 발현할 수 있다.
- [0118] 본 발명은 개체로부터 분리된 시료에 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하여 PTGFRN을 검출하는 단계를 포함하는 암 전이 예후 예측에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0119] 본 발명은 검출된 PTGFRN의 수준이 대조군 대비 높으면 대조군 대비 암 전이 예후가 더 나쁜 것이라는 정보를 제공하는 단계를 더 포함하는 암 전이 예후 예측에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0120] 본 발명은 항암 약물을 투여 받은 환자로부터 분리된 시료에 본 발명의 항 PTGFRN 단일클론항체를 처리하여 PTGFRN을 검출하는 단계를 포함하는 항암 약물의 효능 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0121] 본 발명은 검출된 PTGFRN의 수준이 대조군 대비 낮으면 대조군 대비 상기 항암 약물의 암 전이 억제 효능이 더 우수할 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는 항암 약물의 효능 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0122] 본 발명은 PTGFRN에 결합하는 물질을 포함하는 혈중 암세포 검출용 조성물을 제공한다.
- [0123] 본 발명은 PTGFRN에 결합하는 물질을 포함하는 PTGFRN 단백질 분리, 정제, 검출 및 농도 검출용 조성물을 제공한다.
- [0124] 본 발명의 혈중 암세포 검출용 조성물은 상피 세포 접착 분자(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)에 특이적으로 결합하는 물질을 더 포함할 수 있다.
- [0125] 본 발명의 혈중 암세포 검출용 조성물에서 PTGFRN에 결합하는 물질은 항 PTFGRN 항체 또는 앵타머 일 수 있다. 항 PTFGRN 항체는 단일클론항체 또는 다클론항체일 수 있다.
- [0126] 혈중 암세포는 간암, 폐암, 대장암, 갑상선암, 췌장암, 흑색종, 유방암, 신경모세포종 또는 교모세포종 환자의 혈액 내 혈중 암세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 혈중 암세포는 상피-중간엽 전이되거나 상피-중간엽 전이 진행 중인 혈중 암세포일 수 있다. 혈중 암세포는 하이브리드 E/M 상태일 수 있다.
- [0127] 본 발명의 혈중 암세포 검출용 조성물에서 PTGFRN에 결합하는 물질은 본 발명의 항 PTFGRN 항체일 수 있다.
- [0128] 본 발명의 혈중 혈중암세포 검출용 조성물은 키트 형태로 포함될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0129] 본 발명의 혈중암세포 검출용 조성물은 마이크로어레이의 형태로 포함될 수 있다. 마이크로어레이에 있어서, 상기 단일클론항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 콰이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법

또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0130] 본 발명은 PTGFRN에 결합하는 물질을 포함하는 암 전이 모니터링용 조성물을 제공한다. 상기 물질은 PTGFRN의 수준을 측정할 수 있는 것이라면 제한되지 않는다.

[0132] 실시예 1. 암세포주 배양 및 연구 윤리

[0133] 1-1. 암세포주 배양

[0134] 인간 배아줄기세포 H9는 위스콘신대학 연구소(Wicell Research institute)에서 구입하여 제공된 프로토콜에 따라 배양하였다. 배양에 사용된 배지는 DMEM/F12(Invitrogen, Seoul, Korea), 20%의 녹아웃(Knockout) SR(Invitrogen), 0.1 mM의 β -머캅토에탄올(mercaptoethanol)(Sigma, St Luis, MO, USA), 2 mM의 글루타민(glutamine)(Invitrogen), 0.1 mM의 비필수 아미노산(Invitrogen), 100 U/ml의 페니실린(penicillin) G(Sigma), 100 μ g/ml의 스트렙토마이신(streptomycin)(Sigma), 4 ng/ml의 bFGF(PeproTech, Rocky Hill, NJ)을 섞어 만들었다. 인간배아암세포 NT-2/D1는 ATCC(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하고 제공된 프로토콜에 따라 배양하였다. 인간 간암(Huh7, HepG2, SNU387, SNU449), 비소세포폐암(A549, NCI-H358, NCI-H460, NCI-H1703, NCI-H23), 갑상선암(SNU-790)는 Korea Cell Line Bank(KCLB, 서울, 한국)에서 구입하였다. 인간 정상 폐 태아 섬유아세포(MRC5), 대장암(Colo205), 췌장암(BxPC3)는 ATCC에서 구입하고, 인간 간세포는 Termo Fisher Scientific(Waltham, USA)에서 구입해서 제공된 프로토콜에 따라 배양하였다.

[0136] 1-2. 연구 윤리 및 환자의 동의

[0137] 인간 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 Ficoll-Paque Plus method (GE Healthcare, Seoul, Korea)에서 제공된 방법을 이용하여 농배 구배 원심력(Ficoll-Paque gradient centrifugation)을 통해 기증자로부터 분리하였다. 간암 환자의 혈액 채취는 서울 삼성병원 외과에서 간암 절제를 시행하는 간암 환자로부터 동의서를 받은 후, 헤파린(heparin) 코팅된 튜브로 수집하였고, 모든 과정은 서울 삼성병원 IRB를 거쳐 승인되었으며, 선의로 세종대학교에 전달되어 세종대학교에서 분석하였다. 암 진행 단계 분석은 암에 관한 미국암연합위원회(American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2010))가 지정한 기준을 사용하였다.

[0139] 실시예 2. 63-D7 항체의 선발

[0140] 이전 연구(Choi HS, *et al.*, *Cell Tissue Res.* vol. 333, pp. 197-206, 2008)에서 제조한 인간배아줄기세포에 특이적인 항체 70종 중에서, 간암세포 두 종(Huh7, HepG2)과 폐암세포 두 종(A549, NCI-H358)에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 유세포 분석(Flow cytometry)을 수행하였다. 구체적으로 Huh7, HepG2, A549, NCI-H358 암세포를 0.05% 트립신(trypsin)을 처리하여 세포를 떼어내고 PBS(pH 7.4)로 세척한 후, 단일세포로 분리하기 위해 40 μ m 스트레이너(strainer, BD Biosciences)를 이용하여 필터하였다. 이때 인간배아줄기세포(H9), 인간말초단핵구세포(PBMC)도 함께 분석에 사용하였다. 세포 5×10^5 cell을 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN_3 in PBS, pH7.4)에 섞은 후, 항체들을 각각 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 반응하는 항-마우스 IgG-FITC(BD Biosciences)를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACS Calibur와 Cell Quest software(BD sciences)를 이용하여 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 그 결과로 인간배아줄기세포(H9), 간암세포주(Huh7, HepG2), 폐암세포주(A549)에 결합하고 PBMC에는 결합하지 않은 63-D7, 246-D7, 247-B9 항체를 선발하였다 (도 1a, 도 1b). 이 중에서 246-D7과 247-B9은 상피성 폐암세포주인 NCI-H358에 결합하지만 63-D7은 결합하지 않았다. 항체들의 특성을 분석하기 위해서 63-D7, 246-D7, 247-B9 항체를 프로테인 G-아가로스 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 정제한 항체들을 각각 DSB-XTM Biotin Protein Labeling Kit (Molecular Probes, Seoul, Korea)를 사용하여 제공한 프로토콜에 따라 biotin을 붙였다.

[0141] 세 가지 항체가 간암 환자의 혈액에서 혈중 암세포를 검출할 수 있는지 탐색하기 위하여, 건강한 성인 1명과 간암(hepatocellular carcinoma, HCC) 환자 8명으로부터 실시예 1-2과 같은 방법으로 혈액에서 PBMC를 분리하였다. 회수된 PBMC 세포는 폴리-L-라이신이 코팅된 슬라이드에 세포 수에 따라 2~4개에 나누어 붙였다. 준비된 슬라이드는 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)로 상온에서 10분간 처리하여 세포를 고정시켰다. 세포 염색에서 사용하는 모든 PBS에서는 세포 손실을 방지하기 위하여 항상 1mM Ca^{2+} , 0.5mM Mg^{2+} 을 포함한 PBS(pH 7.4)를 사용하였다. PBS로 세척한 후, 블로킹 용액(10% 말 혈청, 0.1% BSA, PBS, pH 7.4)으로 1시간 동안 세포를 블로킹하였다. 그리고, 마우스 항체인 CD45 항체(BD Biosciences, Seoul Korea)로 실온에서 빛을 차단한 채 1시간 동안 반응시키고, 이어서 anti-mouse IgG-Alexa488(Invitrogen, 1:3000)을 실온에서 빛을 차단한 채 1시간 더 반응시켰다. PBS(pH 7.4)로 세척한 후, 각 항체들이 인식하는 항원을 염색하기 위해 5 μg 의 63-D7-biotin, 246-D7-biotin, 247-B9-biotin 항체를 각각 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$ 실온에서 빛을 차단한 채 12시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후, Cy3-conjugated streptavidin (Vector Laboratories, BURLINGAME, CA, USA, 1:3000)으로 실온에서 빛을 차단한 채 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)를 이용하여 핵을 염색하였다. 혈액에서 회수한 세포에서 항체들에 양성인 혈중 암세포를 셀 때, 혈액 때문에 생기는 비특이적인 결합을 제거하기 위해 DAPI-양성인 세포만 세어 그 수를 계산하였다. 그 결과, 정상인의 혈액에서는 검출되지 않지만 대부분의 간암환자 혈액에서는 항체 양성인 세포가 검출되었으며 특히 63-D7 항체는 8명 환자중에서 6명에게서 총 51개 혈중 암세포를 검출할 수 있어 추가 분석이 필요한 항체로 선정하였다 (도 1c, 도 1d).

[0143] 실시예 3. 유세포 분석기를 통한 다양한 세포에 대한 63-D7 결합 분석

[0144] 단일클론항체 63-D7가 배아줄기세포(H9), 간암(Huh7, HepG2), 폐암(A549, NCI-H358) 외에도, 다양한 암세포와 정상세포에 결합하는지 확인하기 위하여 배아암(NT2/D1), 전이성 간암(SNU387, SNU449), 폐암 (NCI-H460, NCI-H1703, NCI-H23), 대장암(Colo205, HCT116), 갑상선암 (SNU790), 췌장암(BxPC3)을 포함하는 다양한 암세포(SK-Hep1, 8505C, A375, MCF-7, MDA-MB-435, SH-SY5Y, U87-MG)와 인간 배아 신장세포(HEK293FT), 골수-유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC), 인간 피부 섬유아세포(HDF), 인간 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC), 정상 폐 태아 섬유아세포로 알려진 MRC5, 치수세포(DPC) 및 정상 간세포(Hepatocyte)를 사용하여 유세포 분석(Flow cytometry)을 수행하였다. 구체적으로 세포를 0.05% 트립신을 처리해서 세포를 떼어내고 PBS(pH 7.4)로 세척한 후, 단일세포로 분리하기 위해 40 μm 스트레이너(strainer, BD Biosciences)를 이용하여 필터하였다. 세포 5×10^5 cell을 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN_3 in PBS, Ph 7.4)에 섞은 후, 63-D7 항체를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC(BD Biosciences)를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACS Calibur와 Cell Quest software(BD sciences)를 이용하여 프로피디움 요오드 화물(propidium iodide, PI)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, 63-D7 항체는 간암세포를 포함한 다른 모든 암세포에 결합하지만 상피성 폐암세포 H358에는 결합하지 않는다. 그리고 정상세포인 PBMC, 치수세포 (DPC) 및 MRC5에는 결합하지 않고 정상 간세포에도 결합하지 않는 것을 볼 수 있어 암세포 특이적인 결합력을 보여준다(도 2). 실험 결과는 도 2와 하기의 표 1에 나타나 있다.

표 1

[0145]

Cell lines	63-D7
H9	++
NT2/D1	+
HepG2	++
Huh7	+++
SNU-387	++
SNU-449	++
SK-Hep-1	+
A549	++
NCI-H358	-
NCI-H460	++
NCI-H1703	+

NCI-H23	Human non-small cell lung adenocarcinoma	+
Colo205	Human colorectal adenocarcinoma	+++
HCT116	Human colorectal carcinoma	+++
SNU-790	Human thyroid carcinoma	++
8805C	Human thyroid carcinoma	++
BxPC-3	Human pancreatic carcinoma	+++
A375	Human melanoma	+++
MCF-7	Human breast adenocarcinoma	++
MDA-MB-435	Human breast metastatic carcinoma	+++
SH-SY-5Y	Human neuroblastoma, Bone	+
U87-MG	Human glioblastoma	+++
HEK293FT	Human embryonic kidney cell	+++
BM-MSC	Human bone marrow-mesenchymal stem cell	+
HDF	Human dermal fibroblast cell	+
PBMC	Human peripheral blood mononuclear cells	-
MRC5	Human normal Lung fibroblast	-
DPC	Human dental pulp cells	-
Hepatocyte	Human normal hepatocyte	-

[0147] **실시예 4. 항체 63-D7이 결합하는 항원 분리**

[0148] 63-D7 항체가 인식하는 세포 표면 항원을 분석하기 위해 세포 표면 단백질을 바이오틴으로 표지한 후, 63-D7로 침전시켜 분리하는 면역침강법(Immunoprecipitation)을 시행하였다. 잘 결합하는 NT-2/D1 암세포를 PBS(pH 7.4)로 2회 세척한 후, NHS-Sulfo-LC-biotin(Pierce)를 PBS(pH 8.0)에 녹인 용액을 넣어 4 °C에서 30분간 반응시킨 후 PBS(pH 8.0)으로 2회 세척하였다. 이후 용해 완충액(25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2 µg/ml aprotinin, 100 µg/ml PMSF, 5 µg/ml leupeptin, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄)을 이용하여 4 °C에서 30분간 반응시킨 후, 12,000 rpm 속도로 40분간 원심분리해서 핵을 제거하고 사용하기 전까지 -70 °C에서 보관하여 단백질 용액을 준비하였다. 준비된 단백질 용액에 단백질-G-플러스 아가로스(Merck millipore, Darmstadt, Germany)를 가한 후, 비특이적으로 결합하는 분자들을 제거하기 위해 약 1×10^7 cell의 세포 추출물에 20 µl 단백질-G-아가로스를 넣고 4 °C에서 2시간 동안 반응시킨 후 원심분리를 통해 단백질-G-플러스 아가로스에 결합하는 분자들은 제거하고, 나머지 상층액을 회수하여 63-D7에 결합하는 분자들을 면역침강하는 데 사용하였다. 63-D7에 의해 인식되는 표면항원을 면역침강 하기 위해서 회수한 상층액에 항체 5µg을 넣고 4 °C에서 12시간 동안 반응시킨 후, 20 µl 단백질-G-플러스 아가로스를 넣고 4 °C에서 3시간 동안 더 반응시켰다. 면역침강된 면역 혼합체를 용해 용액을 이용해서 5회 세척하였다. 이후 항체에 결합된 항원을 용출(elution)하기 위해 5×샘플 완충액을 넣고, 100 °C에서 10분간 끓인 후 10% SDS-PAGE를 이용하여 전개하고, 니트로셀룰로스 막으로 웨스턴 블롯팅을 하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 2시간 동안 블로킹 한 후, PBST[0.05%의 트윈 20을 첨가한 인산 완충액(PBS), pH 7.4]로 3번 세척하고, 웨스턴 막을 스트렙타비딘-HRP(Streptavidin-HRP, GE healthcare)로 실온에서 1시간 반응시켜 바이오틴 표지되어 63-D7에 의해 면역침강된 표면항원에 결합하도록 하였다. 이후 PBST로 세척한 후, 결합된 단백질을 ECL 검출 키트(GE healthcare)로 확인하였다. 도 3a에 나타난 바와 같이, NT-2/D1 세포에서 63-D7 항체는 약 130 kDa 크기의 바이오틴에 의해 표지된 표면항원을 인식하여 면역침강 시킴을 알 수 있다(도 3a).

[0150] **실시예 5. 항체 63-D7에 의해 면역침강된 항원의 동정 및 검증**

[0151] **5-1. 항체 63-D7에 의해 면역침강된 항원의 동정**

[0152] 63-D7에 의해 인식되는 항원을 동정하기 위해, 63-D7에 의해 면역침강된 단백질을 포함하는 폴리아크릴아마이드 젤을 PageBlue Protein Staining Solution(Thermo Fischer Scientific)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다(도 3b). 젤에서 63-D7에 의해 면역침강된 단백질로 추정되는 130 kDa 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 록펠러(Rockefeller) 대학에서 개발한 ProFound 검색 엔진(http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)을 이용하였다. 그 결과, 63-D7이 인식하는 항원 단백질이 Homo sapiens Prostaglandin F2 receptor negative regulator(PGFRN)임을 확인하였다(도 3c). 도 3c의 밑줄 친 아미노산은 실제로 질량분석기를 통해 확인한 펩타이드를 표시한 것으로, PGFRN과 71개의 아미노산이 일치함을 보여준다.

5-2. 항체 63-D7에 의해 면역침강된 항원의 검증

단일클론항체 63-D7의 항원 단백질이 PGFRN인지 확인하기 위해, 상업적으로 판매되고 있는 PGFRN에 대한 항체, 유전자 발현 벡터, siRNA 및 shRNA를 이용하여 면역침강, 웨스턴 블롯팅, RNA 간섭작용에 의한 유전자 녹다운 및 유세포 분석을 수행하였다.

단일클론항체 63-D7이 면역침강시킨 단백질이 PGFRN인지 확인하기 위해, 생쥐 항-PGFRN 단일클론항체(α -PGFRN, R&D system)를 구입하여 면역침강법과 웨스턴 블롯팅을 수행하는 데 사용하였다. 상기 실시예 4에서 서술한 방법과 같이 바이오틴으로 표지한 A549 세포에서 세포용출액(150 μ g)을 준비하고, 이 용출액을 상기 서술한 바와 동일하게 단일클론항체 63-D7(5 μ g)과 α -PGFRN(2.5 μ g)으로 면역침강하였다. 이후, 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(No Ab)과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE를 통해 분리하고, 니트로셀룰로스 막으로 옮겨 공지의 생쥐 α -PGFRN 항체로 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 그 결과, 63-D7 및 α -PGFRN에서 면역침강된 약 130kDa PGFRN이 동시에 검출되어, 이들이 PGFRN을 인식하여 면역침강시킬 수 있음을 확인하였다(도 4a). 이 막을 Stripping solution (100 mM 2ME, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH6.7)에서 50 °C에서 30분간 살살 흔들며 반응시키고, 10분간 상기 PBST로 2회 세척하고 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.1% PBST로 3번 세척한 후, 스트렙타비딘-HRP(SA-HRP, 1:5000)를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 그리고 PBST로 3번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출 키트로 확인하였다. 그 결과, 63-D7, α -PGFRN의 면역침강제에서 세포 표면 PGFRN과 동일하게 약 130 kDa 크기의 PGFRN이 검출되었다(도 4b). 이러한 결과는 63-D7이 세포 표면 PGFRN에 결합한다는 것을 보여준다.

항체 63-D7가 PGFRN을 직접 인식하여 면역침강시키는 것인지 간접 인식하여 침강시키는 것인지 구별하기 위한 실험을 수행하였다. PGFRN 유전자 발현 벡터 pcDNA3.1(+)-PGFRN-DYK(GeneScript, Piscataway, NJ, USA)를 구입하여 인간 배아 신장 세포 HEK293FT에서 FLAG tag가 달린 재조합 PGFRN을 과발현 시킨 후, 이 세포 용해물을 마우스 항-FLAG 단일클론항체(α -FLAG)(Invitrogen), 생쥐 항-PGFRN 단일클론항체(α -PGFRN)(AbCAM), 63-D7를 사용해 면역 침강과 웨스턴 블롯을 수행하였다. 인간 배아 신장 세포 HEK293FT에서 PGFRN을 과발현하기 위해, 우선 6-웰의 세포배양용 플레이트에 웰당 2.5 X 10⁵개 HEK293FT 세포를 24시간 배양하고, 상기 pcDNA3.1(+)-PGFRN-DYK 벡터 DNA 2 μ g을 PEI(Polyetherimide) 6 μ g(DNA:PEI=1:3)과 섞어 상온에서 20분간 반응한 혼합물을 세포 배양 배지에 첨가해 트랜스펙션(Transfection) 했다. 이후 72시간 동안 추가 배양한 세포로부터 상기 실시예 4에서 서술한 용해 방법과 같이 세포 용해완충액을 이용하여 세포 용해물을 준비하였다. 이 세포 용해물을 상기 서술한 바와 동일하게 63-D7과 항-FLAG 항체, α -PGFRN로 면역 침강 후 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(No Ab)과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 이 막은 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹을 하였다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 공지의 마우스 항-FLAG 항체, 또는 α -PGFRN, 63-D7를 4 °C에서 16시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 항-마우스 IgG-HRP(1:10,000; Millipore)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출 키트로 확인하였다(도 4c). 그 결과, 항-FLAG, α -PGFRN, 63-D7에 의해 면역 침강된 각각의 단백질 모두 항-FLAG (도 4c 위), α -PGFRN (도 4c 중간), 63-D7 (도 4c 아래)에 의해 인식됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로부터 본 발명의 단일클론항체 63-D7이 인간 배아암세포주 NT-2/D1의 표면에 존재하는 PGFRN 단백질을 직접 인식하는 항체임이 검증되었다.

실시예 6. 간암세포에서 PGFRN의 기능 분석

6-1. 간암세포주에서 siRNA를 이용한 녹다운(knockdown)

항체 63-D7의 항원인 PGFRN이 간암세포의 성장에 어떻게 영향을 미치는지 알아보기 위해, 간암세포주 Huh7과 SNU449에서 PGFRN을 타겟으로 하는 두 종의 siRNA(Bioneer, Daejeon, Korea)를 구매하여 일시적인 녹다운을

유도하였다. 6웰 플레이트에 8.0×10^5 cells/well로 세포를 분주한 후 다음날 100 nM의 음성 대조군(negative control) siRNA(siCon)(Genolution, Seoul, Korea)와 PTGFRN에 대한 두 종의 siRNA(siPTGFRN#1, siPTGFRN#2)(표 2), Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)를 각각 TOM(Welgene, Gyeongsan, Korea)에 희석하고 5분간 상온에 두었다. 이후, 각각의 siRNA 희석액과 RNAiMAX 희석액을 섞어 20분간 상온에서 반응시켰다. siRNA-lipofectamine 혼합액을 각 세포의 배지를 교체한 후 넣어주고 24시간 동안 반응시켰다. 24시간이 지난 시점에서 배지를 새로운 배양 배지로 교체하고 48시간을 추가적으로 배양하였다. 트랜스펙션 후 72시간이 지난 시점에서 세포를 0.05% 트립신-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어낸 후 10%의 Fetal bovine serum(Corning)을 포함하는 배양배지로 중화시키고, PBS(pH 7.4)를 이용해 두 번 세척하였다. 이후 3.0×10^5 개의 세포를 RNAiso(Takara)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 RNA를 분리한 후, PrimeScript(Takara)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. 이후, PTGFRN을 타겟으로 하는 프라이머와 GAPDH를 타겟으로 하는 프라이머, Power SYBR Green PCR Master Mix(applied biosystem)을 이용하여 qPCR을 진행했으며 GAPDH를 레퍼런스 유전자로 사용하였다. 사용한 프라이머의 구체적인 서열은 하기 표 2에 나타나 있다.

표 2

[0162]

Name	Sequence	Reference /Supplier
Primers for human PTGFRN	Forward: 5'-ACAACAGCTGGGTGAAAAGC-3' (서열번호 9) Reverse: 5'-TTTCATTGGGACTGGAGAGG-3' (서열번호 10)	
Primers for human GAPDH	Forward: 5'-ACAGCGACACCCACTCCTCC-3' (서열번호 11) Reverse: 5'-GAGGTCCACCACCTGTTGC-3' (서열번호 12)	
siControl	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUtt-3' (서열번호 13)	
siPTGFRN#1	5'-CUCCUACAUUACUGGUtt-3' (서열번호 14)	Bioneer #5738
siPTGFRN#2	5'-GUCCCAAUGAAACGAAGUAtt-3' (서열번호 15)	Bionics #2079
shScramble	Tet-pLKO-puro-Scrambled	Addgene #47541
shPTGFRN#1	5'- ctagcGCCTTTGATGTGTCTGGTTTt act agt AAACCAGGACACATCAAA GGCTTTTg-3' (서열번호 16)	TRCN0000057448
	5'- aat t cAAAAAGCCTTTGATGTGTCTGGTTTact agt aAAACCAGGACACA TCAAAGGCG-3' (서열번호 17)	
shPTGFRN#2	5'- ctagcCCTATTGAGATAGACTTCCAAt act agt TTGGAAGTCTATCTCAAT AGGTTTTg-3' (서열번호 18)	TRCN0000057452
	5'- aat t cAAAAACCTATTGAGATAGACTTCAAact agt aTTGGAAGTCTATC TCAATAGGg-3' (서열번호 19)	

[0164]

그 결과, 녹다운한 암세포에서는 음성대조군에 비해 Huh7과 SNU449에서 85-88% 과 71-72%의 PTGFRN mRNA의 감소 효율을 나타내었다 (도 5a). 또한 PTGFRN이 녹다운 된 세포를 이용하여 상기 실시예 3과 같이 유세포 분석(flow cytometry)을 진행한 결과, PTGFRN을 녹다운한 세포에서는 63-D7 항체의 결합이 Huh7과 SNU449 각각에서 51-75% 과 71-78% 정도 감소하는 것을 관찰할 수 있어 PTGFRN 발현이 성공적으로 녹다운 되었음을 알 수 있다

(도 5b, 도 5c).

[0166] **6-2. siRNA 및 shRNA를 이용한 PTGFRN 녹다운 간암세포에서 암세포 클론원성 생존분석**

[0167] 다음으로, 간암세포의 생존 및 증식에서 PTGFRN의 역할을 조사하기 위해, 상기의 PTGFRN 녹다운 Huh7 세포와 SNU449 세포를 사용하여 클론원성 생존 분석(clonogenic survival assay)을 수행하였다. 상기의 실험을 통해 제조한 PTGFRN 녹다운 Huh7 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(Corning)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40 μ m 스트레이너(SPL, Pocheon, Korea)에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 6웰 플레이트에 웰당 2.0×10^3 개씩 깔아 세포들이 흩어져서 단일세포로 부착하도록 하고 14일 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후, 형성된 콜로니(colony)를 0.5%(w/v)크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하고 전체 콜로니의 수를 분석하였다. PTGFRN 녹다운 Huh7 세포와 SNU449 세포에서 클론원성 생존 분석을 한 결과, 각각 41-43% 및 29-35% 감소하는 것을 볼 수 있다(도 5d, 도 5e). 이러한 결과는 PTGFRN이 저밀도의 스트레스 하에서 간암세포 생존을 향상시키고 증식을 촉진하는 중요한 세포 표면 분자임을 보여준다.

[0168] 항체 63-D7의 항원인 PTGFRN이 간암세포의 클론원성 생존에 장기적으로 어떻게 영향을 미치는지 분석하기 위해, 지속적으로 PTGFRN 유전자를 표적하는 shRNA를 이용하여 간암세포주에서 지속적인 유전자 녹다운을 진행하였다. 음성 타겟 scramble과 PTGFRN을 타겟으로 하는 shRNA 서열#1과 #2 (TRCN0000057448, TRCN0000057452)를 EZ-tet-PLKO벡터(Addgene, 85996)에 삽입하여 인간 배아신장세포 HEK293FT세포에 psPAX2, pMD2G와 함께 트랜스펙션 하였다(표 2). 트랜스펙션 후 약 48시간, 72시간의 세포배양액을 회수하여 간암세포주 Huh7, SNU449에 감염시켰다. 일주일간 10% Fetal bovine serum(Corning) 및 2 μ g/ml의 puromycin(Gibco)이 포함된 RPMI-1640 medium으로 타겟 유전자가 삽입된 세포를 선별하였다. 선별이 끝난 후의 세포를 10% Fetal Bovine Serum(Corning)과 100ng/ml의 doxycycline(Sigma)이 포함된 RPMI-1640배지로 배양하여 녹다운을 유도한 후, 72시간 배양하였다. 배양된 세포는 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(Corning)을 포함하는 세포 배양 배지로 중화한 후 수확하였다. 수확한 세포에서 PTGFRN 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과, Huh7과 SNU449 각각에서 57-84% 과 88-89%로 PTGFRN발현이 감소함을 관찰하였다(도 6a). 같은 세포를 상기 실시예 3의 유세포 분석방법으로 63-D7의 결합을 분석한 결과 두 종의 shPTGFRN(shPTGFRN#1, shPTGFRN#2)에 의해 간암세포 Huh7 및 SNU449 모두에서 세포표면 PTGFRN발현이 각각 44-49% 및 52-61%로 녹다운이 잘 되었음을 확인할 수 있었다(도 6b, 도 6c). 이 중에서 SNU449세포를 사용하여 상기와 동일하게 클론원성 생존분석을 수행하였으며, 그 결과, shPTGFRN#1에 의해서는 90% 감소하고 (도 6d, 도 6e) shPTGFRN#2에 의해서는 47% 감소하는 것을 관찰하였다 (도 6f, 도 6g). 이러한 결과는 PTGFRN이 간암세포에서 지속적으로 암줄기세포성을 제공하며, 간암세포 생존을 향상시키고 증식을 촉진하는 중요한 세포 표면 분자라는 것을 보여준다.

[0170] **6-3. PTGFRN 녹다운 간암 세포주에서 암세포 이동 및 침윤성 분석**

[0171] 다음으로 간암세포의 이동 및 전이에 있어 PTGFRN의 역할을 조사하기 위해, 상기의 shPTGFRN#1, shPTGFRN#2로 PTGFRN을 녹다운 한 Huh7과 SNU449 세포를 사용하여 트랜스웰 실험을 수행하였다. 상기의 실험을 통해 제조한 PTGFRN 녹다운 Huh7 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene)로 떼어내고 10% fetal bovine serum (Corning)을 포함하는 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40 μ m 스트레이너(SPL)에 통과시켜 단일 세포로 준비하였다.

[0172] 세포의 이동성을 평가하기 위해, 3.0×10^4 의 세포를 RPMI1640 배지에 희석한 후 트랜스웰 챔버에 넣어 주고, 아래에 10% Fetal Bovine Serum (Corning)이 포함된 RPMI-1640배지를 chemoattractant로 이용해 이동을 유도하였다. 이후 5% CO₂, 95% air가 공급되는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 37시간 동안 배양한 후 PBS(pH 7.4)로 두 번 세척하고, 이동하지 않은 세포를 면봉으로 제거한 다음 4% PFA로 고정하였다. 고정된 세포는 0.5%의 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였으며 3번 반복하여 통계적으로 나타났다. 그 결과 PTGFRN 녹다운 된 Huh7세포 경우 72%, SNU449 세포의 경우 74-85% 이동성이 감소하였다(도 7a, 도 7b).

[0173] 간암세포의 전이를 위한 침윤성을 알아보기 위해 250 μ g/ml의 Matrigel이 희석된 RPMI-1640 용액 0.1ml를 트랜스웰에 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 코팅한 후 위 실험과 동일하게 수행하였다. PTGFRN 녹다운 된 Huh7 세포의 경우 82-93%, SNU449 세포의 경우 57-91% 침윤성이 감소하였다(도 7c, 도 7d).

[0174] 이와 같이, PTGFRN의 결핍은 Huh7 및 SNU449 세포 모두에서 이동성과 침윤성을 감소시켰으며 이러한 결과는 PTGFRN이 간암세포에서 전이에 중요한 이동과 침윤성을 촉진하는 중요한 세포 표면 분자라는 것을 보여준다.

[0176] 6-4. PTGFRN 녹다운 간암세포의 세포 확산 분석

[0177] PTGFRN이 녹다운된 간암세포 Huh7과 SNU449가 여러 세포외기질(Extracellular Matrix, ECM)에 잘 결합하는지 분석하기 위해서, 세포 확산 분석(Cell Spreading assay) 실험을 수행하였다. 세포 확산 실험을 위해서 200 μ g/ml의 Matrigel, 20 μ g/ml의 Collagen I, 20 μ g/ml의 Collagen IV, 0.1%의 Gelatin을 코팅한 후 2시간 동안 5% CO₂, 95% air가 공급되는 37 °C 배양기에서 배양하였다. 이후 PTGFRN 녹다운 간암세포 Huh7과 SNU449를 준비하여 5.0 X 10⁴ cell/ml 농도로 희석한 후, PBS(pH 7.4)로 2회 세척한 플레이트에 분주하여 20-60분간 배양하였다. 이후 4% Paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정하고, PBS(pH 7.4)로 세척한 후 세포의 사진을 현미경으로 관찰하였다. 현미경으로 관찰한 세포의 사진을 Image J 프로그램을 이용하여 분석하였다. Huh7 세포 분석에서 shScramble에서는 세포가 바닥에 붙어 퍼진 모양의 세포(spread cell)가 많지만, 두 종의 shPTGFRN에서는 세포가 바닥에 잘 붙지 못하여 세포 모양이 동글동글하게 떠있는 것(unsread cell)이 많은 것을 볼 수 있다(도 8a, 도 8b). 동일한 실험을 PTGFRN 녹다운 SNU449 세포에서는 수행한 결과 세포외기질에 대한 결합이 감소함을 알 수 있다(도 8c, 도 8d). 같은 실험을 3회 반복한 결과를 통계적으로 분석해보면, Huh7에서는 shPTGFRN 종류에 상관없이 녹다운의 경우에는 Matrigel을 제외한 Collagen I, Collagen IV 및 Gelatin 세포외기질에서 간암세포의 세포확산능이 감소하는 것을 관찰하였다(도 8b). SNU449에서는 shPTGFRN#2 녹다운 경우 Matrigel에 대한 세포확산능에서는 차이가 없지만, 나머지 세 종류의 세포외기질에 대해서는 세포확산능이 감소하는 것을 관찰할 수 있다(도 8d). 이러한 결과는 PTGFRN이 간암세포의 대부분의 세포외기질에 대한 부착 및 확산에 중요함을 보여준다.

[0179] 6-5. PTGFRN 녹다운 간암세포의 NK 세포에 대한 면역회피능력 분석

[0180] 암세포는 면역세포의 세포독성을 회피할 때 잘 자랄 수 있기 때문에, 대부분의 진행성 암세포는 면역 체크포인트 분자(immune checkpoint molecule)를 발현하여 자신을 공격하는 면역세포들의 공격을 피할 수 있는 능력을 가진다. 간암세포에서 발현하는 PTGFRN 분자가 면역회피에 중요한 역할을 하는 면역 체크포인트 분자로서 역할을 하는지 확인하기 위하여, 상기의 shScramble 및 shPTGFRN#2를 이용해 만든 PTGFRN 녹다운 SNU449 세포와 NK 세포주인 NK92를 공동 배양할 때 세포독성 정도를 분석하였다.

[0181] 상기의 실험을 통해 제조한 PTGFRN 녹다운 SNU449 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(Corning), 200 ng/ml 독시사이클린(doxycycline)(Sigma)을 포함하는 세포 배양 배지로 중화한 후, 12웰 플레이트에 웰당 2.0 X 10⁴개씩의 세포를 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 하루 배양하였다. 하루 뒤, 400 U/ml IL2(Peprotech), 10% fetal bovine serum(Corning), 200 ng/ml 독시사이클린(sigma)을 포함한 배지에 이펙터 세포(effector cell, NK92):타겟 세포(target cell, shPTGFRN-SNU449)의 비율(E:T 비율)을 각각 1:1, 2.5:1 및 5:1로 하여 섞은 후 분주하고, 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 2일 동안 배양하였다. 배양 후에 부유하는 NK92 세포를 세척하여 제거하고 바닥에 붙어 생존한 SNU449 타겟 세포를 0.5%(w/v) 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다. 플레이트를 건조한 후, 크리스탈 바이올렛을 50% 에탄올, 0.1M sodium citrate 용액에 녹여 540nm에서 흡광도(OD540)를 측정하였다. 상대적인 OD540을 비교했을 때, shPTGFRN#2는 낮은 클론원성 생존능으로 인해 shScramble에 비해 약 50% 더 낮은 OD540을 보여주고 있으며, NK92와 공동 배양시에는 추가적으로 다시 약 50% 더 낮은 OD540을 보여준다(도 9a, 도 9b). 이러한 결과는 NK세포에 의한 간암세포의 사멸이 PTGFRN이 결핍될 때 더욱 증가한다는 것을 보여준다. 다음으로 E:T 비율을 1:1, 2.5:1 및 5:1로 하여 NK세포의 수를 증가시켰을 때 간암세포의 사멸 정도를 다음 수식을 이용해 분석하였다.

[0182] [수식]

[0183]
$$\text{NK cytotoxicity (\%)} = \{1 - (\text{target OD value} / \text{No NK OD value})\} \times 100$$

[0184] 그 결과, NK92 세포 수가 증가할수록 간암세포의 사멸 정도가 증가하는 것을 볼 수 있다(도 9c). 이러한 결과는 PTGFRN이 암세포에서 면역 체크포인트 분자로 작용해 NK세포에 의한 세포사멸을 억제함으로써 암세포에 숙주의 면역을 회피하는 능력을 제공하는 것으로 보인다.

[0186] **6-6. 간암에서 PTGFRN의 결핍에 따른 신호전달 물질의 변화 분석**

[0187] 상기 실시예 6-3과 같이 녹다운 된 세포를 이용하여 암의 전이에 있어 중요한 주요 신호전달물질인 FAK 및 Src 와 면역관문 분자로 알려진 B7-H3의 발현을 확인하였다.

[0188] 녹다운 된 세포를 회수하여 인산완충용액(Ph 7.4)로 두 번 세척한 후, RIPA lysis buffer(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholate)를 이용해 세포를 용해시켰다. 이후 4 °C, 12000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 상등액을 5X 샘플 완충액과 섞어 단백질 샘플을 준비하였다. 이후 8-10%의 SDS-PAGE 겔에서 분리하고 니트로셀룰로스 막으로 옮기는 웨스턴 블롯팅을 진행하였다. 5%의 탈지분유를 이용하여 블로킹하고, 각각의 타겟 항체인 토끼 항 PTGFRN 다클론항체(abcam, 97567), 토끼 항 B7-H3 다클론항체 (sinobiological, 11188-RP02), 토끼 항 FAK 다클론항체(Cell Signaling Technology, 3285), 토끼 항 p-FAK 다클론항체(CST, 3283), 토끼 항 Src 단일클론항체(CST, 2109), 토끼 항 p-Src 단일클론항체(CST, 6943), 토끼 항 GAPDH 다클론항체(CSB, PA00025A0Rb)를 5%의 BSA에 섞어 4 °C에서 16시간 동안 반응시켰다. 0.1% TBST(Tris-Buffered Saline, 0.1% tween)로 10분간 3번의 세척 후, 항 토끼 IgG-HRP(1:12,000)와 실온에서 한시간 동안 반응시킨 후, 타겟 단백질을 ECL 검출 키트(Advansta)로 확인하였다(도 10).

[0189] 그 결과, PTGFRN의 감소는 면역관문 조절 분자인 B7-H3의 발현을 감소시키고, FAK 신호전달 경로인 p-FAK 및 p-Src의 발현을 감소시켰다. 이러한 결과로부터 PTGFRN은 FAK 신호전달경로를 통해 암세포의 이동 및 침윤성을 조절한다는 것을 알 수 있다.

[0191] **6-7. 세포막에서의 PTGFRN 사이의 cis 및 trans 결합 측정**

[0192] 세포막에서 발현하는 PTGFRN이 세포 사이의 cluster를 이루는데 기여한다면, 혈중 암세포에 발현되는 PTGFRN이 암세포의 성장이나 생존 면역회피성에 도움을 줄 것이다. 이를 관찰하기 위해, 6웰 플레이트에 웰당 2.5×10^5 개의 세포를 분주한 후, 다음 날 12 μg의 PEI, pcDNA3.1(+)-PTGFRN-FLAG 벡터와 pcDNA3.1(+)-PTGFRN-myc 벡터를 함께 각각 4 μg씩 되도록 TOM(Welgene)에 희석한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이후, PEI를 희석한 용액과 벡터를 희석한 용액을 섞어 실온에서 20분간 반응시킨 후, 한 HEK293FT 세포에 함께 처리하고 24시간을 37 °C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 또한, pcDNA3.1(+)-PTGFRN-FLAG 벡터와 pcDNA3.1(+)-PTGFRN-myc 벡터를 각각 준비해서 두개의 HEK293FT 세포 웰에 따로 반응시킨 후, 24시간이 지난 시점에서, 새로운 배양 배지로 교체하여 48시간을 더 배양하고, 실시예4와 같은 방법으로 세포 용해 완충액을 처리하여 세포 용출액을 준비하였다. BCA(Thermo)를 이용하여 각각의 세포 용출액을 50 μg씩 준비하고, 각 용출액을 생쥐 항-FLAG 단일클론항체, 토끼 항-myc tag 단일클론항체, 생쥐 63-D7 항체를 이용하여 면역침강시킨 후 항-FLAG 단일클론항체, 토끼 항-myc tag 단일클론항체로 웨스턴 블롯팅하여 분석하였다.

[0193] 그 결과, PTGFRN을 함께 발현시킨 세포 용출액에서는 FLAG과 myc tag이 모두 검출되지만 (도 11a), 각각을 단일로 트랜스펙션 한 후 섞어서 면역침강을 진행했을 때는 항-myc항체에 면역침강된 PTGFRN에서는 FLAG-tag된 PTGFRN이 검출되지 않고 항-FLAG항체에 면역침강된 PTGFRN에서는 myc-tag된 PTGFRN이 검출되지 않았다 (도 11b). 따라서 이를 통해 PTGFRN이 세포막에서 trans- 보다는 cis-형태로 서로 상호작용함을 확인할 수 있다.

[0195] **6-8. 세포막에서의 PTGFRN 결합물질 분석**

[0196] 세포막에서 PTGFRN과 결합을 하는 다른 단백질들을 찾기 위해, 상기 실시예 4와 같이 SNU449 세포 용출액을 준비한 후, 생쥐 항-PTGFRN 단일클론항체, 생쥐 63-D7 단일클론항체, 생쥐 항-SLC3A2 단일클론항체, 생쥐 항-B7-H3 단일클론항체를 이용하여 면역침강시킨 후, 생쥐 항 PTGFRN 단일클론항체 (α-PTGFRN)를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 진행한 결과 PTGFRN은 SLC3A2(CD98hc)와 B7-H3 (CD276) 과 결합함을 확인하였다(도 11c).

[0197] B7-H3는 암세포에서의 면역관문 조절 물질로 알려져 있으므로, B7-H3와 PTGFRN의 상호작용을 다시 한번 검증하기 위해서 6웰 플레이트에 HEK293FT 세포를 웰당 2.5×10^5 의 세포 수로 분주한 후, 다음날 12 μg의 PEI, myc tag을 가진 PTGFRN 벡터(pcDNA3.1(+)-PTGFRN-myc)와 FLAG-tag을 가진 PTGFRN 벡터(pcDNA3.1(+)-B7-H3-FLAG)를 함께 각각 4 μg씩 되도록 TOM(Welgene, Gyeongsan, Korea)에 희석한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이후, PEI를 희석한 용액과 상기의 벡터를 희석한 용액을 섞어 실온에서 20분 반응시키고, HEK293FT세포에 처리하여

트랜스펙션 하고 24시간동안 37 °C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 24시간이 지난 후 새로운 배양배지로 교체하고 48시간을 더 배양한 후 실시예 4와 같이 세포 용출액을 준비하였다. BCA(Thermo Fischer Scientific)를 이용하여 각각의 세포 용출액을 50 µg씩 준비한 후, 항-FLAG, 항-B7-H3, 항-myc, 63-D7로 면역침강하였다. 면역침강물을 항-myc, 항-FLAG 항체로 검출한 결과 항-FLAG 항체에 의한 면역침강물에서 PTGFRN이 검출되고 항-myc항체에 의한 면역침강물에서 B7-H3가 검출되었으므로 PTGFRN과 B7-H3가 서로 물리적으로 결합하여 상호작용함을 알 수 있다(도 11d). 이러한 결과는 면역관문 조절 분자로 알려진 B7-H3를 통해서 PTGFRN이 면역조절에 관여할 것을 제시한다.

[0199] 실시예 7. 63-D7 양성 간암세포의 부착성, 암줄기세포성 및 클론원성 분석

[0200] 63-D7의 항원 PTGFRN이 간암세포의 부착에 어떻게 영향을 미치는지 분석하기 위해서, 63-D7항체로 Huh7과 HepG2 세포를 63-D7 양성과 음성으로 마그네틱 비드를 사용하여 sorting하였다.

[0201] Sorting을 하기 위해서 63-D7-biotin 항체를 Neutravidin-접합된 마그네틱 비드(Thermo Fishcer Scientific)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분리하였다. 항체에 붙은 세포는 63-D7(+), 붙지 않은 세포는 63-D(-)로 분리하여 준비하였다. 다음으로 Matrigel로 12웰 플레이트를 코팅하고, 최소 1시간 동안 5% BSA를 포함하는 무혈청 DMEM/F12 배지에서 37 °C에서 블로킹하였다. 63-D7 (+), 63-D7(-) 간암세포를 웰당 10⁵개 세포로 접종하고 37 °C에서 6시간 동안 반응하였다. 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해, 플레이트를 PBS(pH 7.4)로 세척하였다. 부착 세포를 실온에서 30분간 2% 에탄올 중 0.5% 크리스탈 바이올렛(Sigma-Aldrich)으로 염색하고, 염색된 세포는 0.1% SDS에 용해한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 63-D7(+) Huh7 세포는 63-D7(-) Huh7 세포에 비해 43% 부착력이 증가하였고, 63-D7(+) HepG2 세포는 63-D7(-) HepG2 세포에 비해 245% 부착력이 증가하여, 63-D7 양성 간암세포가 음성 간암세포보다 세포외기질에 대한 부착력이 현저히 우수함을 제시한다 (도 12a, 도 12b).

[0202] 한편 63-D7 항원 양성 암세포가 암줄기세포성(Cancer stemness)을 가져서 암의 재발과 약물저항성을 유발하는데 연관되는지 관찰하기 위하여 암줄기세포성이 증가하도록 유도하는 종양구(tumorsphere)를 배양하였다. 종양구를 생성하기 위해서 부착하여 자라는 Huh7 간암세포를 트립신-EDTA (Welgene, 대구, 한국)로 분리하고 40 µm 스트레이너를 통해 여과한 후 실온에서 3분 동안 1500 rpm으로 원심 분리하였다. 이 세포를 부착성이 아주 낮은 플레이트(Corning, SEOUL, KOREA)에 2.1 x 10³ 세포/cm²로 접종하고 20 ng/ml 섬유아세포 성장인자(FGF2, R&D시스템, 서울, 한국), 20 ng/ml 표피상장인자(EGF, PeproTech, 서울, 한국) 및 1 x B27 보충제(Life Technologies)가 보충된 DMEM/F12 배지(Corning)에서 배양하였다. 배지는 3일마다 교체하였으며 최소 9일 이상 배양하였다. 대표적인 간암줄기세포 마커로 알려진 CD133, CD44 및 EpCAM과, 63-D7 항원인 PTGFRN 분자의 발현 여부를 상기 실시예 3과 같은 방법으로 유세포 분석법을 통해 분석하였다. 그 결과 암줄기세포성이 증가한 종양구 배양에서 암줄기세포 양성 마커들인 CD133, CD44, EpCAM이 부착성 세포일때와 비교할 때, 각각 약 33%, 43%, 59%로 증가하고 이때 63-D7의 결합도 61%로 함께 증가하는 것을 볼 수 있다 (도 12c, 도 12d). 이러한 결과는 63-D7 항원인 PTGFRN가 새로운 간암줄기세포 마커로 작용한다는 것을 제시한다.

[0203] 63-D7 양성 간암세포가 간암줄기세포성을 보여주는지 추가로 분석하기 위하여 위와 동일하게 63-D7으로 sorting한 간암세포를 사용하여, 실시예 6-2과 같이 암줄기세포성을 보여주는 클론원성 생존실험을 수행하였다. 그 결과, Huh7에서는 492%(도 12e, 도 12f), HepG2에서는 56% 클론원성이 증가하는 것을 관찰하였다(도 12g, 도 12h). 이런 결과는 63-D7 양성 간암세포가 음성 간암세포에 비해 현저한 암줄기세포성을 보이며 클론원성 생존능력이 우수한 암줄기세포 성질을 가진다는 것을 제시한다.

[0205] 실시예 8. 간암 및 hepatocellular carcinoma 세포에서 63-D7처리 후 내부화 분석

[0206] 항체를 처리했을 때, 항체가 암세포의 내부로 내부화 (internalization)되는 것은 항체-약물 컨주게이트 (antibody-drug conjugate, ADC)를 통한 항암 항체 치료제 개발에서 핵심 전제조건이다. 단일클론항체 63-D7의 각종 암세포에 대한 세포막 내부화(internalization)를 확인하기 위해, 유세포 분석(Flow Cytometry)를 수행하였다.

[0207] 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(FBS; VWR, PA, USA)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40 µm 스트레이너에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 각 단일세포를 ml당 약

1×10^5 개씩 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN_3 in PBS)에 섞은 후, 항체 63-D7을 4 °C에서 30분간 반응시켰다. 항체의 세포 내부화를 유도하기 위해 PBA로 세포를 1회 세척한 후, 세포막 내부화가 일어날 수 있도록 세포를 100 μl 의 배양 배지에 현탁하여 30분간 37 °C에서 반응시켰다. PBA로 1번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-Alexa flour 488(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. 4 °C에서 세포 표면에 결합한 단일클론항체 63-D7의 형광세기와 37 °C에서 반응했을 때 63-D7의 형광세기의 정도를 유세포분석으로 비교할 때, 인간 간암세포 Huh7, HepG2, SNU387, SNU449와 인간 췌장암 세포인 BxPC3, SNU213에서 단일클론항체 63-D7결합이 뚜렷이 감소한 것을 볼 수 있다(도 13a, 도 13b). 이는 4 °C에서 암세포 표면에 결합한 63-D7항체가 37 °C에서 세포 활성화에 의해 세포 내부로 내부화 되어 표면에서의 결합이 감소하는 것을 의미하며, 63-D7이 ADC를 활용한 항체 치료제 개발에 응용할 수 있는 항체라는 것을 제시한다.

[0209] **실시예 9. 약물 접합 63-D7 항체의 간암세포에서 세포 독성**

[0210] 앞선 실시예 8을 통해 생쥐 IgG1 불변영역을 가진 63-D7 항체가 간암세포 표면에 결합한 후 37°C 온도 조건에서 세포에 내부화 되는 것을 확인하였다. 위 특성을 바탕으로 63-D7 항체에 항암 약물이 접합되어 있을 때, 63-D7 항체를 매개로 전달된 약물이 암세포 내에서 세포 독성을 나타낼 것으로 가정하고 이를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0211] 실험에서 약물이 접합된 mouse IgG Fc 영역 특이적인 2차 항체[anti-mouse IgG(Fc Specific) antibody-drug conjugates(ADCs)]를 사용하였다. 구체적으로는 DNA Alkylation agent인 duocarmycin이 접합된 α -mFc-CL-DMDM(AM-102DD, Moradec, 미국) 항체와 tubulin polymerization inhibitor인 monomethyl auristatin이 접합된 α -mFc-CL-MMAF(AM-102AF, Moradec) 항체를 이용하였다. 먼저 96 well plate(SPL)의 각 웰에 5,000개의 Huh7 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI-1640(Biowest, 프랑스) 배지를 이용하여 분주 후 24시간 동안 배양하였다. 다음 날 기존의 배양 배지를 제거한 다음, 여러 농도로 배양 배지에 희석된 63-D7 항체 혹은 mouse IgG isotype control (Invitrogen, 31903)을 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM, 0.01 nM로 각 웰에 분주 후 37 °C에서 10분간 항체를 세포 표면에 결합시켰다. 이후, 12.7nM의 농도의 약물이 접합된 2차 항체를 배양 배지에 희석한 다음 1차 항체를 제거하고 각 웰에 분주하였다. 세포를 48시간 동안 37 °C, 5% CO_2 조건에서 배양한 후, 세포 생존율을 알아보기 위해 Cell Counting Kit-8(CCK-8, K1018, APEX BIO, 미국)을 사용하였다. 각 웰당 10 μl 의 CCK-8을 더해 3시간 동안 반응시키고 plate reader를 이용하여 OD450nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0212] 그 결과, α -mFc-CL-DMDM ADC와 함께 100 nM의 63-D7항체를 처리한 경우 세포 생존율이 40%, 10 nM 63-D7 항체를 처리한 경우 20% 감소한 것을 확인하였다(도 14a). α -mFc-CL-MMAF를 사용하여 동일한 실험을 진행한 경우에는 100 nM에서 40%, 10nM에서 20%까지 간암 세포의 생존율이 감소하였다(도 14b). 그러나 생쥐 유래 isotype 항체를 처리한 세포의 생존율은 큰 변화를 보이지 않았다. 이는 실험에서 사용한 약물이 접합된 2차 항체가 생쥐의 Fc 영역에 특이적으로 결합하며, 생쥐 항체인 63-D7과 함께 세포 내부로 들어가 세포 독성을 유발하는 것을 증명한 것이다.

[0213] 따라서 63-D7 항체가 간암세포에 내부화 되며, 이러한 특성을 바탕으로 PTGFRN를 발현하는 간암세포 내부로 약물을 효과적으로 전달함으로써 항암 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 63-D7 항체를 사용한 ADC 전략을 이용하여 간암세포와 췌장암 세포의 세포사멸을 유도할 수 있다는 것을 제시한다.

[0215] **실시예 10. 간암환자 혈중 암세포에서 63-D7 항원 분석**

[0216] **10-1. 면역세포화학적 방법에 의한 간암환자 혈액에서 63-D7 양성 혈중 암세포의 검출**

[0217] PTGFRN이 전이에 중요한 혈중 암세포의 생물학적 특성인 간세포암(Hepatocellular carcinoma, HCC) 세포의 생존, 이동, 침입, 세포부착 및 면역회피를 촉진시킴을 확인하였다(도 5 내지 도 9). 따라서 우리는 PTGFRN가 HCC 환자에서 혈중 암세포를 감지하는 표면 마커 역할을 할 수 있다고 가정했으며, 실제로 혈중 암세포를 검출하는 예비실험에서도 그 가능성을 확인하였다(도 1b, 도 1c).

[0218] HCC 환자에서 혈중 암세포를 효율적으로 검출하기 위해 우리는 적혈구를 제거한 다음, CD45 제거 프로토콜에 의

해 CD45 양성 세포를 추가로 제거하고 남은 세포를 분석하는 전략을 선택했다(도 15c). 구체적으로, 먼저 간암 환자 혈액을 수집 후 6시간 이내에 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare, Seoul, Korea) 구매 원심분리에 의해 건강한 기증자, 간염환자, 또는 HCC 환자의 말초혈액으로부터 분리하였다. PBMC를 0.5% 소 혈청 알부민(BSA) 및 2 mM EDTA를 함유하는 PBS로 세척하고 이 완충액에 1×10^8 세포/mL의 농도로 재현탁시켰다. 이 백혈구 계열 세포에서 CD45 양성 세포의 제거에 의한 혈중 암세포의 농축은 제공된 프로토콜에 따라 Human CD45 제거 키트(EasySep®, Stem Cells Technologies, Vancouver, BC, Canada)를 사용하여 수행하였다. 먼저 항-CD45 항체를 세포 현탁액에 첨가하여 실온에서 15분간 반응시키고, 텍스트란으로 코팅된 자성 나노입자를 실온에서 10분간 세포와 함께 반응시킨 후 세포 현탁액을 실온에서 10분 동안 EasySep® big easy magnet(StemCell Technologies, Vancouver, Canada)에 넣었다. 이후, 결합되지 않은 세포 분획을 깨끗한 튜브로 옮겨 회수하고, 회수된 세포를 3,560 xg에서 5분간 원심분리하고, 400 μ l의 RPMI1640 배지에 재현탁하고, 8개의 분획으로 나누고, 최종적으로 0.1 μ g/ml의 폴리-L-리신으로 코팅된 유리 슬라이드에 접종하였다. 유리 슬라이드에 대한 세포의 자발적인 결합을 유도하기 위해, 세포를 실온에서 2-4시간 동안 반응시켰다. 결합되지 않은 세포는 고정 전에 PBS(pH 7.4)로 세척하였다. 결합된 세포를 3.7% 파라포름알데하이드(PFA)에 고정하고 공초점 현미경으로 분석하기 전에 냉장고에 보관했다.

[0219] CD45 양성 백혈구 제거 방법의 민감도와 특이성을 테스트하기 위해, 증가하는 수의 Huh7 세포를 PBMC에 첨가하고, 상기의 CD45 제거 프로토콜을 적용하여 CD45 양성인 세포를 제거하고 남은 63-D7 양성인 Huh7 세포의 수를 10% 정상 말 혈청으로 블로킹한 다음 측정하였다. 이때 Dylight488-conjugation Kit(Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 63-D7항체를 표지한 Dylight488-접합된 63-D7을 면역세포화학적 방법으로 Huh7를 염색하여 측정하였다. 탐지된 Huh7 세포 수 대 스카이킹 된 Huh7 세포 수의 선형 회귀는 0.9801의 R^2 를 산출하였다. Huh7 세포의 평균 회수율은 약 72%로, 이러한 방법을 통해 70% 이상의 세포를 검출할 수 있다는 것을 보여준다(도 15b).

[0220] CD45가 잘 제거되었는지 확인하기 위한 63-D7 및 CD45의 이중 염색을 위해서, CD45-고갈된 세포를 3.7% PFA로 고정하고, 10% 정상 말 혈청으로 블로킹한 다음 Dylight 649-접합된 항-마우스 IgG(Vector laboratories) 및 Dylight 488-접합된 63-D7로 반응시켰다. PBS로 세척한 후, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)를 이용하여 핵을 염색하였다. 형광 신호는 Leica TCS SP5 공초점 현미경(Leica Microsystems, 서울, 한국)으로 검출하였다. 그 결과 63-D7 양성인 세포는 모두 CD45 음성임을 확인하였다(도 15c의 아래 패널, 표 3). 이중 면역 형광 염색에 의한 HCC 환자의 63-D7+ 유핵 CTC에서 EMT 마커의 발현 프로파일은 하기 표 3에 구체적으로 나타나 있다.

표 3

[0221]

Markers	Primary HCC		Secondary HCC	
	Patients with marker-positive CTCs	Marker-positive CTCs	Patients with marker-positive CTCs	Marker-positive CTCs
DAPI+ (63-D7-)	ND	ND	22/22 (100%)	453/3307(13.7%)
63-D7+ CD45+	0/20 (0.0%)	0/123 (0.0%)	0/2 (0.0%)	0/24(0.0%)
63-D7+ MVP+	16/20 (80.0%)	100/363 (27.5%)	5/5(100%)	35/147(23.8%)
63-D7+ HSA+	3/4 (75.0%)	29/118 (24.6%)	2/2(100%)	21/85(24.7%)
63-D7+ PanCK+	0/4 (0.0%)	0/104 (0.0%)	0/1(0%)	0/24(0%)
63-D7+ E-cadherin+	0/1 (0.0%)	0/18 (0.0%)	ND	ND
63-D7+ EpCAM+	20/20 (100%)	46/331 (13.9%)	4/4(100%)	19/111(17.1%)
63-D7+ Vimentin+	7/8 (100%)	43/180 (23.9%)	ND	ND
63-D7+ Twist+	6/10 (60.0%)	6/189 (3.2%)	ND	ND
63-D7+ ZEB1+	3/5 (60.0%)	3/60 (5.0%)	ND	ND

[0223]

다음으로, 건강한 지원자 21명과 HCC 환자 95명(1차 HCC 환자 53명 및 2차 HCC 환자 42명)의 혈액 샘플을 상기 기술한 방법과 동일하게 CD45 양성 세포를 제거하고 남은 세포를 슬라이드에 붙여서 공초점 현미경으로 분석하였다. 간암환자(HCC, HCC(meta)), 정상인(Normal) 및 간염환자(의 혈액에서 63-D7 양성인 모든 혈중 암세포의 수를 하기 표 4에 나타냈다.

표 4

[0224]

Number	Cancer	Sex	Age	PBMC(X107)	blood(ml)	total 63-D7	63-D7/7.5ml	63-D7/ml
1	HCC	M	69	3.75	11	21	14	1.90
2	HCC	F	63	1.13	10	15	11	1.50
3	HCC	F	62	1.05	9.4	28	22	2.98
4	HCC	M	65	3.2	10	61	46	6.10
5	HCC	M	64	2.35	10.6	44	31	4.15
6	HCC	M	54	2.43	10	3	2	0.30
7	HCC	M	68	3.54	10	38	29	3.80
8	HCC	M	64	2	10.2	14	10	1.37
9	HCC	M	73	1.68	10	33	25	3.30
10	HCC	M	54	2.08	8	15	14	1.88
11	HCC	F	60	1.48	10.1	22	16	2.18
12	HCC	F	62	2.23	10.4	26	19	2.50
13	HCC	F	45	3.63	9.4	24	19	2.55
14	HCC	M	60	1.87	10.1	6	5	0.59
15	HCC	M	72	1.5	10.2	25	18	2.45
16	HCC	M	45	1.45	8	20	19	2.50
17	HCC	M	68	1.375	9	28	23	3.11
18	HCC	M	45	1.45	9.8	39	30	3.98
19	HCC	M	48	0.5	9.8	6	5	0.61
20	HCC	M	59	0.825	9.8	18	14	1.84
21	HCC	M	56	1	9	13	11	1.44
22	HCC	M	58	1.075	10	30	23	3.00
23	HCC	F	58	2.5	10.4	40	29	3.85
24	HCC	F	62	0.75	9	18	15	2.00
25	HCC	M	59	0.875	8	28	26	3.50
26	HCC	M	55	1.125	9	43	36	4.78
27	HCC	M	75	1.51	10.5	14	10	1.33
28	HCC	M	65	1.375	10	1	1	0.10
28	HCC	M	50	1.575	9.5	23	18	2.42
30	HCC	M	41	1.8	10.3	41	30	3.98
31	HCC	M	45	1.5	10.1	18	13	1.78
32	HCC	M	72	1.55	10	33	25	3.30
33	HCC	M	75	1.49	10	13	10	1.30
34	HCC	M	57	1.5	10.5	65	46	6.19
35	HCC	M	64	1.15	8.6	36	31	4.19
36	HCC	M	60	2.75	10.5	32	23	3.05
37	HCC	M	59	2.55	10	30	23	3.00
38	HCC	M	54	1.5	9	24	20	2.67
39	HCC	M	38	10	10.5	26	19	2.48
40	HCC	M	56	0.64	8.5	27	24	3.18
41	HCC	M	68	6.43	9.2	22	18	2.39
42	HCC	F	44	1.23	10	34	26	3.40
43	HCC	M	66	0.96	10.5	24	17	2.29
44	HCC	M	49	1.06	8.3	50	45	6.02
45	HCC	M	78	2.1	10.4	14	10	1.35
46	HCC	M	39	2.5	10.5	20	14	1.90
47	HCC	F	60	2.05	11	29	20	2.64
48	HCC	M	55	0.79	11	5	3	0.45
49	HCC	M	58	1	10.7	25	18	2.34
50	HCC	M	59	1.31	10.4	11	8	1.06
51	HCC	M	57	4.25	10.6	13	9	1.23
52	HCC	M	56	1.35	8.8	17	14	1.93
53	HCC	M	39	1.25	9.2	3	2	0.33
54	HCC(meta)	F	68	1.2	9.5	63	50	6.63

55	HCC(meta)	M	57	5.25	10	56	42	5.60
56	HCC(meta)	F	68	3	9.8	36	28	3.67
57	HCC(meta)	M	57	2.38	10.5	32	23	3.05
58	HCC(meta)	M	62	3.1	9.5	28	22	2.95
59	HCC(meta)	M	59	0.825	9.8	16	12	1.63
60	HCC(meta)	F	44	1.375	9	24	20	2.67
61	HCC(recu)	M	67	1.13	8.5	44	39	5.18
62	HCC(meta)	F	61	0.75	8	15	14	1.88
63	HCC(meta)	F	56	2.15	9.5	24	19	2.53
64	HCC(meta)	M	58	8.4	10.4	15	11	1.44
65	HCC(meta)	F	67	2.75	8	65	61	8.13
66	HCC(meta)	M	50	0.61	8	170	159	21.25
67	HCC(meta)	F	38	1.25	9.5	70	55	7.37
68	HCC(meta)	M	66	0.813	11	40	27	3.63
69	HCC(meta)	M	76	1.13	10.5	50	36	4.76
70	HCC(meta)	M	66	3.2	10	70	52.5	7.00
71	HCC(meta)	F	70	1.3	11	558	380.5	50.72
72	HCC	M	57	1.53	10.5	100	71.43	9.52
73	AGML	M	33	5	9	39	33	4.33
74	HCC(meta)	M		0.85	10.5	55	39.3	5.24
75	HCC(meta)	F		0.55	8.5	125	110.3	14.71
76	HCC(meta)	M		0.9	10.5	141	100.7	13.43
77	HCC(meta)	F		1.38	9	90	75.0	10.00
78	HCC(meta)	M		1.55	10	164	123.0	16.40
79	HCC(meta)	M		1.13	8.3	91	82.2	10.96
80	HCC(meta)	M		2.1	10.5	135	96.4	12.86
81	HCC(meta)	M		2.3	10.3	162	118.0	15.73
82	HCC(meta)	M		1.75	9.5	123	97.1	12.95
83	HCC(meta)	M		1.85	9.3	159	128.2	17.10
84	HCC(meta)	M		1.7	10	118	88.5	11.80
85	HCC(meta)	F		1.95	10	158	118.5	15.80
86	HCC(meta)	M		1.47	10.5	143	102.1	13.62
87	HCC(meta)	F		2.15	10.5	139	99.3	13.24
88	HCC(meta)	F		2	10.7	122	85.5	11.40
89	HCC(meta)	M		1.9	10	188	141.0	18.80
90	HCC(meta)	M		2	10.5	72	51.4	6.86
91	HCC(meta)	M		1.75	10	132	99.0	13.20
92	HCC(meta)	M		1.35	8.5	160	141.2	18.82
93	HCC(meta)	M		2.25	8.5	106	93.5	12.47
94	HCC(meta)	M		1.9	9.7	140	108.2	14.43
95	HCC(meta)	M		0.8	9.5	130	102.6	13.68
Number	Normal	Sex	Age	PBMC(X107)	blood(ml)	total 63-B6	63-B6/7.5ml	63-B6/ml
1	Normal	M	52	2.5	10.8	0	0	0.00
2	Normal	M	63	2.375	10.3	4	3	0.39
3	Normal	M	54	1.875	10.1	2	1	0.20
4	Normal	M	31	3.575	10	0	0	0.00
5	Normal	M	28	2.9	10.8	0	0	0.00
6	Normal	M	32	1.75	10.8	0	0	0.00
7	Normal	F	25	1	10.2	3	2	0.29
8	Normal	F	36	1.33	8.2	0	0	0.00
9	Normal	F	26	0.83	8	0	0	0.00
10	Normal	M	30	2.25	8.3	0	0	0.00
11	Normal	F	23	2.5	8.3	1	1	0.12
12	Normal	M	35	3.75	8.2	2	2	0.24
13	Normal	M	33	2	8.3	0	0	0.00
14	Normal	M	28	2.25	8.4	0	0	0.00
15	Normal	M	33	1.5	8.4	0	0	0.00

16	Normal	M	29	2.5	8	0	0	0.00
17	Normal	F	23	3	8.5	0	0	0.00
18	Normal	M	54	1.4	7.5	0	0	0.00
19	Normal	M	27	1	8	0	0	0.00
20	Normal	F	25	1.85	8.3	0	0	0.00
21	Normal	M	47	1.2	7.3	0	0	0.00
22	Chronic hepatitis	M	45	1.03	8.7	0	0	0.00
23	Chronic hepatitis	M	54	0.625	8.5	0	0	0.00
24	Cirrhosis	M	61	1.625	8.2	0	0	0.00
25	Cirrhosis	F	71	0.8	8	0	0	0.00
26	Acute hepatitis	F	61	7.5	8.3	0	0	0.00

[0226] 정상 성인 21명 중 5명에서 몇 개의 63-D7 양성 세포가 검출되었지만 측정된 세포 수는 매우 드물었다(≤ 0.39 cells/ml)(표 4). HCC 환자의 혈액 세포를 63-D7 및 기타 항체로 염색한 경우, 63-D7 음성이면서 DAPI 양성 세포는 13.7%로 63-D7으로 검출되지 않는 혈중 암세포도 약 14% 존재하였다 (도 15c 위 패널, 표 3). HCC 환자로부터 분리된 세포를 63-D7 및 CD45 항체로 염색했을 때, 모든 63-D7 양성 세포는 CD45 음성이었으며(도 15c 아래 패널, 표 3), 이는 63-D7이 CD45 음성이면서 DAPI 양성 혈중 암세포의 약 86%를 검출해낼 수 있음을 제시한다. 그리고 63-D7 양성 혈중 암세포의 크기는 18 μm 에서 40 μm 사이로 이질적이었고, 그들은 과염색성 핵과 높은 핵 대 세포질 비율을 가졌다(도 16a 내지 도 16c). 63-D7-양성 혈중 암세포는 모든 HCC 환자에서 검출되었고, 95명의 환자 중 92명(약 97%)이 정상 성인보다 높은 세포 수를 보였다(도 17, 표 4)($p<0.0001$). HCC 환자로부터 분리된 세포 수는 ml당 0.1~ 50.72개 범위였으며 평균은 ml당 6.13개였다(표 4). 63-D7 양성 혈중 암세포는 만성 간염(Chronic hepatitis) 및 간경변증(Cirrhosis) 환자에서는 발견되지 않으므로(표 4), 간염 등으로 인한 염증성 세포가 아니라 암 발생으로 인한 혈중 암세포임을 보여준다.

[0227] 63-D7과 임상 병리학적 변수들 사이의 연관성을 하기 표 5에 나타냈다.

표 5

[0228]

Variable	Category	Total (n=53)	63-D7 <2.45 (n=26)	63-D7 ≥ 2.45 (n=27)	p-value
age	1: $\leq 60\text{yrs}$	33 (62.26)	16 (61.54)	17 (62.96)	0.9148
	2: $>60\text{yrs}$	20 (37.74)	10 (38.46)	10 (37.04)	
sex	1: M	44 (83.02)	23 (88.46)	21 (77.78)	0.4672
	2: F	9 (16.98)	3 (11.54)	6 (22.22)	
Edmondson grade	1: 1+2	48 (90.57)	23 (88.46)	25 (92.59)	0.6687
	2: 3+4	5 (9.43)	3 (11.54)	2 (7.41)	
Tumor_size	1: <3	28 (52.83)	14 (53.85)	14 (51.85)	0.8644
	2: 3~5	18 (33.96)	8 (30.77)	10 (37.04)	
	3: ≥ 5	7 (13.21)	4 (15.38)	3 (11.11)	
Microvessel invasion	0	17 (32.08)	14 (53.85)	3 (11.11)	0.0009
	1	36 (67.92)	12 (46.15)	24 (88.89)	
Portal vein invasion	0	51 (96.23)	25 (96.15)	26 (96.3)	1.0000
	1	2 (3.77)	1 (3.85)	1 (3.7)	
Bile duct invasion	0	52 (98.11)	25 (96.15)	27 (100)	0.4906
	1	1 (1.89)	1 (3.85)		
Intrahepatic metastasis	0	45 (84.91)	24 (92.31)	21 (77.78)	0.2501
	1	8 (15.09)	2 (7.69)	6 (22.22)	
Multicentric occurrence	0	47 (88.68)	23 (88.46)	24 (88.89)	1.0000
	1	6 (11.32)	3 (11.54)	3 (11.11)	
Serosa invasion	0	51 (96.23)	25 (96.15)	26 (96.3)	1.0000
	1	2 (3.77)	1 (3.85)	1 (3.7)	

Pathologic T stage (modified UICC, 2000)	1:pT1+pT2	19 (35.85)	14 (53.85)	5 (18.52)	0.0073
	2:pT3+pT4	34 (64.15)	12 (46.15)	22 (81.48)	
Pathologic T stage (AJCC, 2010)	1:pT1+pT2	51 (96.23)	25 (96.15)	26 (96.3)	1.0000
	2:pT3a	2 (3.77)	1 (3.85)	1 (3.7)	
Etiology	1:HBV	48 (90.57)	22 (84.62)	26 (96.3)	0.1917
	2:HCV+other	5 (9.43)	4 (15.38)	1 (3.7)	
Child-Pugh class	1:A	50 (94.34)	24 (92.31)	26 (96.3)	0.6104
	2:B+C	3 (5.66)	2 (7.69)	1 (3.7)	
Clinical Stage (AJCC)	1:1+2	51 (96.23)	25 (96.15)	26 (96.3)	1.0000
	2:3a	2 (3.77)	1 (3.85)	1 (3.7)	
Clinical stage (UICC)	1:1+2	20 (37.74)	15 (57.69)	5 (18.52)	0.0033
	2:3+4	33 (62.26)	11 (42.31)	22 (81.48)	
Milan_Criteria	0	40 (75.47)	20 (76.92)	20 (74.07)	0.8096
	1	13 (24.53)	6 (23.08)	7 (25.93)	
AFP(ng/ml)	1:≤8.1	28 (52.83)	15 (57.69)	13 (48.15)	0.4865
	2:>8.1	25 (47.17)	11 (42.31)	14 (51.85)	
PIVKA II(mAU/ml)	1:<40	31 (58.49)	13 (50)	18 (66.67)	0.2183
	2:≥40	22 (41.51)	13 (50)	9 (33.33)	

[0230] 53명의 1차 원발성 간암 환자에 대한 임상병리학적 분석에서 63-D7 양성 혈중 암세포의 수와 진행성 종양 병기 그룹 사이에서 미세혈관 침입, 병리학적 단계 및 임상적 단계에서 통계적으로 유의한 상관관계가 있고, 63-D7 양성 암세포 경우 미세혈관침입이 일어나고 병리학적 및 임상학적 단계에서 더 나쁜 단계로 진입한 환자라는 것을 말해준다(표 5).

[0231] 이는 63-D7 양성 혈중 암세포 수가 클수록 병리학적 및 임상학적으로 나쁜 상태라는 것을 의미한다. 환자 집단을 1차 원발성 간세포암종과 2차 전이성 및 재발성 간세포암종으로 나누었을 때, 2차 전이성 및 재발성 간세포암종 환자군에서 1차 원발성 간세포암종에 비해 63-D7 양성 혈중 암세포의 세포수가 더 증가하였다(도 17, 표 4)($p<0.0001$). 따라서 63-D7 양성 혈중 암세포의 수(정상 vs 1차 HCC = ≤ 0.39 vs 2.54 cells/ml)는 1차 HCC 환자를 진단할 수 있는 우수한 진단 마커이며(표 4), 전이되거나 재발되면 더욱 그 수(평균 10.7 cells/ml)(표 4)가 증가하는 질병 진행과 밀접한 관련이 있는 우수한 진단 마커임을 보여준다.

[0233] 10-2. 이중염색에 의한 63-D7 양성 혈중 암세포의 특성 분석

[0234] 63-D7 양성 혈중 암세포의 특성을 추가적으로 분석하기 위해, 세포를 63-D7 및 다양한 항체로 동시에 염색했다.

[0235] 혈중 암세포를 63-D7 및 다양한 표면 마커들을 이용해 이중염색을 하기 위해서는, CD45 고갈 세포를 3.7% PFA로 고정하고, 10% 정상 말 혈청으로 블로킹한 다음 항-MVP(Aviva systems, San Diego, CA, USA), 항-CD44 (BD bioscience, Seoul, Korea), 항-CD90(BD bioscience), Alexa 555-접합된 항-EpCAM(BD Biosciences), Alexa 555-접합된 항-E-cadherin(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 및 항-HSA(Novus, Littleton, 콜로라도, 미국)를 각각 세포와 반응시키고, Dylight 650-접합된 항-토끼 IgG(Thermo Fischer Scientific)로 추가 반응시키고, 최종적으로 Dylight 488-접합된 63-D7으로 반응시켜 상기 실시예 10-1과 같이 염색하였다. 또한 Dylight 488-접합된 63-D7과 세포 내부 마커의 이중 염색을 위해서는, CD45-고갈된 세포를 고정하고 블로킹하기 전에 0.1% Triton X-100으로 투과시키고 항-vimentin(Santa Cruz Biotechnology), 항-Twist1(AbCAM, 케임브릿지, 영국), 항-ZEB1(AbCAM), 또는 Phycoerythrin 접합된 항-panCK 항체(BD biosciences, San Jose, CA, USA)를 반응시켰다. 이후 세포를 1차 항체의 접합 상태에 따라 Dylight 650-접합된 항-토끼 IgG(Thermo Fischer Scientific)와 함께 배양하고 최종적으로 Dylight 488-접합된 63-D7과 함께 반응시켜 형광 신호는 Leica TCS SP5 공초점 현미경 (Leica Microsystems)으로 검출하여 분석하였다.

[0236] 우리는 이전 연구에서 세포 표면 MVP(major vault protein)가 HCC 환자의 혈중 암세포에서 약 90%에서 검출되고, 전이성 암세포에서 더욱 증가하는 현상을 발견하였다(Lee, et al., Sci Rep. vol. 7, 13201, 2017). 이에, 먼저 혈중 암세포를 63-D7과 MVP 항체로 동시에 염색해본 결과 63-D7 양성 혈중 암세포의 약

28%(100/363)가 1차 원발성 HCC 환자에서 MVP 양성이었다고, 63-D7양성 혈중 암세포의 약 24%(35/147)가 2차 HCC 환자에서 양성이었다 (도 16a, 표 3). 63-D7/HSA 염색에서는 63-D7 양성 혈중 암세포의 약 25%(50/203)가 1차 및 2차 HCC 환자 모두에서 HSA 양성이었다 (도 16a, 표 3). 63-D7/E-cadherin 염색에서 모든 혈중 암세포는 1차 HCC 환자에서 모두에서 E-cadherin 음성(0/18)이었다(도 16b, 표 3). 63-D7/panCK(pan-cytokeratin) 염색에서 모든 혈중 암세포는 1차(0/104) 및 2차 HCC 환자(0/24) 모두에서 panCK 음성이었다(도 16a, 표 3). 63-D7/EpCAM 염색에서 63-D7 양성 세포의 약 15%(67/442)가 1차 및 2차 HCC 환자 모두에서 EpCAM 양성이었다(도 16b, 표 3). 이와 같이, 상피성 마커로 잘 알려진 PanCK이나 E-cadherin은 63-D7이 인식하는 PTGFRN 양성 혈중 암세포에서는 1차 원발암이든 2차 전이성/재발성 암이든 발현하지 않음을 알 수 있어 63-D7 양성 혈중 암세포는 최소한 상피성 혈중 암세포가 아님을 알 수 있다.

[0237] 따라서, 63-D7 양성 혈중 암세포가 중간엽 표현형을 나타내는지를 알아보기 위해, 원발성 간세포암종 환자에서 대표적인 중간엽 마커 Vimentin, Twist 및 ZEB1를 1차 HCC 환자에서 관찰하였다. 63-D7 양성 혈중 암세포의 약 24%(43/180)는 vimentin 양성이었다(도 16c, 표 3). 그리고 63-D7 양성 혈중 암세포에서 Twist(3.2%, 6/189) 및 ZEB1(5%, 3/60) 양성도 작은 분획이었지만 관찰되었다(도 16c, 표 3). 따라서 63-D7 양성 혈중 암세포는 상피성 표현형과 중간엽 표현형 비중을 비교할 때는 중간엽 표현형이 현저히 우세하지만, 대부분의 경우 상피성과 중간엽성 구분이 불분명한 부분적 중간단계 세포 집단임을 알 수 있다.

[0239] 10-3. 삼중염색에 의한 63-D7 양성 혈중 암세포의 특성 분석

[0240] 1차 및 2차 HCC 환자의 63-D7 양성 혈중 암세포에서 상피성 표현형 마커와 중간엽 표현형 마커의 발현 양상을 좀 더 자세히 분석하기 위해, CD45가 고갈된 혈중 암세포를 사용하여 상피성 대표 마커인 EpCAM과 중간엽성 대표마커인 Vimentin을 사용하여 63-D7/EpCAM/vimentin에 대한 삼중 형광 염색을 수행했다(도 18a, 표 6). 삼중 형광 염색의 결과는 하기의 표 6에 구체적으로 나타냈다.

표 6

[0241]

Markers	Primary HCC		Secondary HCC	
	Patients with marker-positive CTCs	Marker-positive CTCs	Patients with marker-positive CTCs	Marker-positive CTCs
63-D7 ⁺ EpCAM ⁺ Vimentin ⁺	7/21 (33.3%)	47/518 (9.1%)	3/30 (0.1%)	3/933 (0.3%)
63-D7 ⁺ EpCAM ⁺ Vimentin ⁻	2/21 (9.5%)	3/518 (0.6%)	0/30 (0.0%)	0/933 (0.0%)
63-D7 ⁺ EpCAM ⁻ Vimentin ⁺	18/21 (85.7%)	229/518 (44.2%)	27/30 (90.0%)	255/933 (27.3%)
63-D7 ⁺ EpCAM ⁻ Vimentin ⁻	19/21 (90.5%)	239/518 (46.1%)	30/30 (100%)	675/933 (72.3%)
MVP ⁺ EpCAM ⁺ Vimentin ⁺	0/5 (0.0%)	0/144 (0.0%)	0/9 (0.0%)	0/304 (0.0%)
MVP ⁺ EpCAM ⁺ Vimentin ⁻	0/5 (0.0%)	0/144 (0.0%)	0/9 (0.0%)	0/304 (0.0%)
MVP ⁺ EpCAM ⁻ Vimentin ⁺	3/5 (60.0%)	67/144 (46.5%)	9/9 (100.0%)	151/304 (49.7%)
MVP ⁺ EpCAM ⁻ Vimentin ⁻	4/5 (80.0%)	77/144 (53.5%)	9/9 (100.0%)	153/304 (50.3%)

[0243] 63-D7, Vimentin 및 EpCAM의 삼중 염색을 위해서는 CD45 고갈된 세포를 고정하고 블로킹하기 전에 0.1% Triton X-100으로 투과시키고 항-Vimentin 항체(Santa Cruz Biotechnology)로 먼저 반응시켰다. 그런 다음 세포를 Dylight 650-접합된 항 토끼 IgG(Thermo Scientific), Alexa 555-접합된 항-EpCAM(Cell Signaling Technology) 및 Dylight 488-접합된 63-D7과 함께 반응시키고 각 단계 사이에 Ca²⁺ 및 Mg²⁺를 포함하는 PBS로 세포를 4회 세척했다. 핵은 DAPI로 염색하고 형광 신호는 공초점 현미경 (Leica Microsystems)으로 검출하였다.

[0244] 그 결과 63-D7⁺EpCAM⁺Vimentin⁺인 삼중 양성 혈중 암세포는 1차 HCC 환자에서 9.1%(47/518)인 반면, 2차 HCC 환자에서는 0.3%(3/933)였다. 상피성 세포를 대표하는 63-D7⁺EpCAM⁺Vimentin⁻ 혈중 암세포는 1차 HCC 환자에서

0.6%(3/518)인 반면 2차 HCC 환자에서는 없었다(0/933). 중간엽성 세포를 대표하는 63-D7⁺EpCAM⁻Vimentin⁺ 혈중 암세포는 1차 HCC 환자에서 44.2%(229/518)인 반면 2차 HCC 환자에서는 27.3%(255/933)였다(도 18a, 표 6).

[0245] 따라서, 1차 원발성 간암에서 63-D7 양성 혈중 암세포의 0.6%는 상피성 표현형인 반면, 53.3%(9.1%+44.2%)는 반 중간엽(EpCAM 및 vimentin 둘 다 양성) 및 중간엽성(vimentin 양성) 표현형이었다. 흥미롭게도, EpCAM도 Vimentin도 없는 부분적 중간형 표현형(partial or intermediate)인 63-D7 단일 양성 혈중 암세포는 1차 HCC 환자에서 46.1%이고 2차 HCC 환자에서는 무려 72.3% (675/933)이었다. 또한, 이러한 중간형 표현형은 모든 조사한 2차 HCC 환자(30/30 환자)에서 관찰되어, 63-D7만 발현하는 중간형 표현형은 전이 재발하는 간암환자의 핵심적인 혈중 암세포 마커임을 알 수 있다(표 6).

[0246] 이전 연구에서 MVP/EpCAM/Vimentin 삼중염색에서 MVP-양성 혈중 암세포의 51.3%가 MVP-단일 양성이었기 때문에 (Lee, Joh et al. 2017), 우리는 MVP/EpCAM/Vimentin 삼중염색을 동일한 방법으로 수행하였다. MVP 단일 양성 혈중 암세포를 1차 원발성 간암과 2차 간암으로 분류하였을 때 MVP 단일 양성 혈중 암세포는 원발성 간세포암 환자에서 53.5%, 이차성 간세포암종 환자에서 50.3%였다(표 6). 그리고 MVP 단일 양성 혈중 암세포는 모든 이차 HCC 환자(9/9 환자, 100%)에서 발견되었다(표 6).

[0247] 따라서, MVP(50.3%) 또는 63-D7(72.3%) 단일 양성 혈중 암세포는 EpCAM-음성 및 Vimentin-음성이며 모든 2차 HCC 환자에서 우세하게 나타났다. 따라서 63-D7이 인식하는 PTGFRN은 간암환자에서 상피성도 중간엽성도 뚜렷하게 보이지 않는 대부분의 혈중 암세포를 대변하는 새로운 마커이며, 특히 2차 전이성/재발성 간암환자에서는 모든 환자에서 관찰되는 우수한 진단 마커임을 알 수 있다.

[0249] 10-4. 63-D7 양성 혈중 암세포에서 면역 관문 분자의 분석

[0250] 수많은 연구에서 HCC를 포함한 다양한 암에서 B7-H3 발현과 불량한 임상결과 사이에 강한 상관관계가 있음이 확립되어 있다. 우리는 PTGFRN이 HCC 세포에서 B7-H3와 상호작용한다는 것을 실험을 통해 확인했으므로(도 11c, 도 11d), 혈중 암세포에서 PTGFRN, B7-H3 및 기타 면역 조절 분자의 발현을 삼중염색으로 분석했다.

[0251] 63-D7, B7-H3 및 면역 조절 분자의 삼중 염색을 위해 세포를 폴리-L-리신 코팅된 유리에 부착한 후 CD45가 고갈된 세포를 고정하고 블로킹하고 항-폴리 토끼 MVP항체(Aviva bioscience), ULBP1(Abcam), MICA/B(Bioss) 및 TGFβR1(Atlas)로 반응시켰다. 다음으로 Alexa 568 접합된 항-토끼 IgG(Thermo Fischer Scientific) 또는 Alexa 594-접합된 마우스 단일클론 PD-L1(Biolegend), PD-L2(Biolegend) 또는 피코에리트린-접합된 CD47(Biolegend)과 함께 반응시켰다. 그 세포를 다시 Dylight 650-접합된 항-토끼 B7-H3(Sinobiological, Beijing, China)와 Dylight 488-접합된 63-D7항체와 함께 반응시켰다. 각 단계 사이에 Ca²⁺ 및 Mg²⁺를 포함하는 PBS로 세포를 4회 세척했다. 핵은 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 염색하고 형광 신호는 Leica TCS SP5 공초점 현미경으로 검출하였다. 삼중 면역 형광 염색에 의한 2차 HCC 환자의 유핵 CTC에서 EMT 및 면역 체크포인트 마커의 발현 프로필을 하기의 표 7에 나타냈다.

표 7

[0252]

Markers	Patients with marker-positive CTCs (%)	Marker-positive CTCs (% marker/CTCs)
MVP ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	22/22 (100.0%)	57/458 (12.4%)
MVP ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	20/22 (90.9%)	54/458 (11.8%)
MVP ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	6/22 (27.3%)	15/458 (3.3%)
MVP ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻	0/22 (0%)	0/458 (0%)
MVP ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	22/22 (100.0%)	160/458 (34.9%)
MVP ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	22/22 (100.0%)	77/458 (16.8%)
MVP ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	20/22 (90.9%)	60/458 (13.1%)
MVP ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻ (DAPI only)	18/22 (81.8%)	35/458 (7.6%)

MVP⁺/total PTGFRN⁺ or B7-H3⁺/total PTGFRN⁺	111/348 (31.9%) or 217/348 (62.4%)	
TGF β R1 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	18/18 (100.0%)	140/787 (17.8%)
TGF β R1 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	18/18 (100.0%)	109/787 (13.9%)
TGF β R1 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	18/18 (100.0%)	79/787 (10.0%)
TGF β R1 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻	18/18 (100.0%)	54/787 (6.9%)
TGF β R1 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	18/18 (100.0%)	139/787 (17.7%)
TGF β R1 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	18/18 (100.0%)	93/787 (11.8%)
TGF β R1 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	18/18 (100.0%)	108/787 (13.7%)
TGF β R1 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻ (DAPI only)	16/18 (88.9%)	65/787 (8.3%)
TGF β R1⁺/total PTGFRN⁺ or B7-H3⁺/total PTGFRN⁺	249/481 (51.8%) or 279/481 (58.0%),	
ULBP1 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	1/14 (7.1%)	1/404 (0.24%)
ULBP1 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	8/14 (57.1%)	8/404 (2.0%)
ULBP1 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	11/14 (78.6%)	17/404 (4.2%)
ULBP1 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻	14/14 (100%)	26/404 (6.4%)
ULBP1 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	14/14 (100.0%)	111/404 (27.5%)
ULBP1 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	14/14 (100.0%)	102/404 (25.2%)
ULBP1 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	14/14 (100.0%)	99/404 (24.5%)
ULBP1 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻ (DAPI only)	14/14 (100.0%)	40/404 (9.9%)
ULBP1⁺/total PTGFRN⁺ or B7-H3⁺/total PTGFRN⁺	9/222 (4.1%) or 112/222 (50.5%)	
MICA/B ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	18/18 (100.0%)	116/675 (17.2%)
MICA/B ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	16/18 (88.9%)	26/675 (3.9%)
MICA/B ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	17/18 (94.4%)	29/675 (4.3%)
MICA/B ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻	18/18 (100%)	33/675 (4.9%)
MICA/B ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	18/18 (100.0%)	151/675 (22.4%)
MICA/B ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	18/18 (100.0%)	116/675 (17.2%)
MICA/B ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	18/18 (100%)	142/675 (21.0%)
MICA/B ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻ (DAPI only)	16/18 (88.9%)	65/675 (9.6%)
MICA/B⁺/total PTGFRN⁺ or B7-H3⁺/total PTGFRN⁺	142/409 (34.7%) or 267/409 (65.3%)	
PD-L1 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	22/22 (100.0%)	114/950 (12.0%)
PD-L1 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	19/22 (86.4%)	83/950 (8.7%)
PD-L1 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	20/22 (90.9%)	80/950 (8.4%)
PD-L1 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻	22/22 (100.0%)	64/950 (6.7%)
PD-L1 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	22/22 (100.0%)	176/950 (18.5%)

PD-L1 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	22/22 (100.0%)	148/950 (15.6%)
PD-L1 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	21/22 (95.5%)	208/950 (21.9%)
PD-L1 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻ (DAPI only)	20/22 (90.9%)	77/950 (8.1%)
PD-L1 ⁺ /total PTGFRN ⁺ or B7-H3 ⁺ /total PTGFRN ⁺	197/521 (37.8%) or 290/521 (55.7%)	
PD-L2 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	21/22 (95.5%)	39/719 (5.4%)
PD-L2 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	19/22 (86.4%)	30/719 (4.2%)
PD-L2 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	19/22 (86.4%)	28/719 (3.9%)
PD-L2 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻	22/22 (100.0%)	39/719 (5.4%)
PD-L2 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	22/22 (100.0%)	183/719 (25.5%)
PD-L2 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	22/22 (100.0%)	143/719 (19.9%)
PD-L2 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	22/22 (100%)	180/719 (25.0%)
PD-L2 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻ (DAPI only)	20/22 (90.9%)	77/719 (10.7%)
PD-L2 ⁺ /total PTGFRN ⁺ or B7-H3 ⁺ /total PTGFRN ⁺	69/395 (17.5%) or 222/395 (56.2%)	
CD47 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	14/14 (100.0%)	78/497 (15.7%)
CD47 ⁺ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	14/14 (100.0%)	37/497 (7.4%)
CD47 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	14/14 (100.0%)	41/497 (8.2%)
CD47 ⁺ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻	14/14 (100.0%)	35/497 (7.0%)
CD47 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁺	14/14 (100.0%)	78/497 (15.7%)
CD47 ⁻ 63-D7 ⁺ B7-H3 ⁻	14/14 (100.0%)	109/497 (21.9%)
CD47 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁺	14/14 (100.0%)	62/497 (12.5%)
CD47 ⁻ 63-D7 ⁻ B7-H3 ⁻ (DAPI only)	14/14 (100.0%)	57/497 (11.5%)
CD47 ⁺ /total PTGFRN ⁺ or B7-H3 ⁺ /total PTGFRN ⁺	115/302 (38.1%) or 156/302 (51.7%)	

[0254] 이전 연구에서 우리는 MVP가 스트레스가 많은 환경에서 HCC 세포의 생존, 증식, 이동 및 침입을 담당한다고 보고했다. 또한 B7-H3는 MVP와 상호작용하며 유방암 세포에서 암 줄기세포 농축을 촉진한다고 알려졌다. 따라서, 2차 간암 환자에서 간암 전이 및 재발 시의 PTGFRN 양성 혈중 암세포에 대해 얼마나 많은 혈중 암세포가 MVP 양성인지 알아보기 위해 혈중 암세포를 63-D7, 항-B7-H3 및 항-MVP 항체로 동시에 염색하였다(도 18b, 표 7). 총 PTGFRN 양성 혈중 암세포의 약 32%(111/348)가 MVP 양성이었고, 총 PTGFRN 양성 혈중 암세포의 약 62%(217/348)가 B7-H3 양성이었다. 따라서, PTGFRN 양성 혈중 암세포의 일부는 2차 HCC 환자의 말초 혈액에서 세포 생존, 증식, 이동 및 침입에서 B7-H3 및 MVP의 역할과 연관될 가능성이 높다.

[0255] 최근 연구에 따르면 EMT는 암세포에 전이성, 면역억제 가능성 및 암 줄기세포성을 제공한다. 또한 EMT는 암줄기 세포 및 혈중 암세포에서 PD-L1 및 CD47과 같은 면역억제 분자의 발현을 유도할 수 있다. 63-D7 양성 혈중 암세포의 약 53%가 1차 원발성 간암 환자에서 EMT 표현형 혈중 암세포였지만, 2차 간암 환자에서는 EMT 표현형 혈중 암세포의 비율이 27.6%로 감소했다(표 6). 대신, 대부분의 63-D7 양성 혈중 암세포(72.3%)는 2차 간암 환자에서 부분/중간 표현형의 혈중 암세포였다(표 6). 최근 연구는 부분/중간 표현형 암 세포가 면역세포 세포독성을 피하고 면역 세포를 면역 억제 표현형으로 분극화 함으로써 종양면역 탈출을 매개한다고 제안한다. 따라서 부분/

중간 표현형을 가진 63-D7 양성 혈중 암세포는 2차 간암 환자에서 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

- [0256] TGF β /TGF β R1 신호는 암줄기세포에서 다중 면역억제 효과를 나타낸다. TGF β 는 또한 NK 세포 기능의 억제에 필요하다. 또한, TGF β /TGF β R1 신호는 유방 암줄기세포의 높은 전이 개시 능력을 제공한다. TGF β 1 신호전달은 또한 B7-H3 발현 증가를 통해 결장직장암에서 T 세포 매개 종양 회피를 촉진한다. 따라서 2차 간암 환자의 PTGFRN 양성 혈중 암세포에서 EMT 표현형 혈중 암세포의 수가 감소하였지만, 63-D7 양성 혈중 암세포에서 TGF β R1의 발현이 어느 정도 양성인지를 조사하였다. 혈중 암세포가 항-TGF β R1, 63-D7 및 항-B7-H3 항체로 염색되었을 때, 모든 2차 HCC 환자가 TGF β R1 양성 혈중 암세포를 보유했다(도 19, 표 7). 세부 분석 결과 전체 PTGFRN 양성 혈중 암세포의 51.8%(249/481)가 TGF β R1 양성이었고, 전체 PTGFRN 양성 혈중 암세포의 58%(279/481)가 B7-H3 양성인 것으로 밝혀져, PTGFRN 양성 혈중 암세포는 TGF β R1- 및 B7-H3-매개 면역 억제 표현형을 가질 것으로 보인다.
- [0257] PTGFRN-양성 혈중 암세포가 2차 HCC 환자에서 숙주 면역 반응과 어떻게 연관되는지 추가로 조사하기 위해, 혈중 암세포를 항-ULBP1/63-D7/항-B7-H3 항체 또는 항-MICA/B/63-D7/항-B7-H3항체로 동시에 삼중염색 했다(도 20a, 도 20b, 표 7).
- [0258] ULBP1 및 MICA/B는 NK 및 CD8 T 세포의 활성화 수용체 NKG2D에 대한 리간드로, 면역을 촉진하는 분자로 알려져 있다. ULBP1/63-D7/B7-H3 염색에서, 총 PTGFRN-양성 혈중 암세포의 4.1%(9/222)가 2차 HCC 환자에서 ULBP1-양성인 반면, 총 PTGFRN-양성 혈중 암세포의 50.5%(112/222)는 B7-H3 양성 이었다. MICA/B/63-D7/B7-H3 염색에서 모든 환자(18/18)는 MICA/B 양성 혈중 암세포를 보유했다. 2차 HCC 환자에서 전체 PTGFRN 양성 혈중 암세포의 34.7%(142/409)가 MICA/B 양성이었고, 전체 PTGFRN 양성 혈중 암세포의 65.3%(267/409)가 B7-H3 양성이었다. 이런 결과는 2차 혈중 암세포가 면역활성 분자인 ULBP1(4.1%)이나 MICA/B(34.7%)를 일부 발현하지만, 동시에 대부분 면역관문 조절분자로 알려진 B7-H3(65.3%)를 더 우세하게 발현한다는 것을 제시한다.
- [0259] PD-L1과 PD-L2는 NK 및 CD8 T 세포의 면역 억제 수용체 PD-1에 대한 잘 알려진 리간드이다. 따라서 혈중 암세포를 항 PD-L1/63-D7/항 B7-H3 항체 또는 항 PD-L2/63-D7/항 B7-H3 항체로 동시에 각각 삼중염색하였다(도 21a, 도 21b, 표 7).
- [0260] PD-L1/63-D7/B7-H3 염색에서 2차 간암 환자에서 전체 PTGFRN 양성 혈중 암세포의 37.8%(197/521)가 PD-L1 양성 이었고, 전체 PTGFRN의 55.7%(290/521)가 B7-H3 양성이었다. PD-L2/63-D7/B7-H3 염색에서는 2차 간암 환자에서 전체 PTGFRN 양성 혈중 암세포의 17.5%(69/395)가 PD-L2 양성이었고, 전체 PTGFRN의 56.2%(222/395)가 B7-H3 양성이었다(도 21a, 도 21b, 표 7). 한편 모든 환자(22/22)는 PD-L1 또는 PD-L2 양성 혈중 암세포를 보유하고 있었다.
- [0261] 마지막으로, 우리는 PTGFRN 양성 혈중 암세포가 CD47과 관련이 있는지 조사했는데, 이는 CD47이 대식세포에 대해 저항하는 "don't eat me" 신호이고 식세포 선천면역 감시를 억제하기 때문이다(Matlung, Szilagyi et al. 2017). CD47/63-D7/B7-H3 염색에서 2차 간암 환자의 경우 총 PTGFRN 양성 혈중암의 38.1%(115/302)가 CD47 양성 이었고, 51.7%(156/302)가 B7-H3 양성이었다(도 22, 표 7). 그리고 모든 환자(14/14)들은 CD47 양성 혈중 암세포를 가지고 있었다.
- [0262] 이와 같이 ULBP1(4.1%) 및 MICA/B(34.7%)와 같은 면역자극 수용체가 PTGFRN 양성 혈중 암세포에서 검출되었지만, TGF β R1(51.8%), PD-L1(37.8%), PD-L2(17.5%), CD47(38.1%) 및 B7-H3 (50.5-65.3%)과 같은 면역 관문 조절 분자가 2차 HCC 환자의 PTGFRN 양성 혈중 암세포에서 더욱 널리 검출되었다. 특히, B7-H3는 PTGFRN-양성 혈중 암세포에서 모두 우세하게(평균 57.6%) 발현되었다. 따라서 이러한 결과는 PTGFRN이 2차 간암 환자에서 혈중 암세포의 면역 회피를 담당하고, 면역 억제 수용체와 밀접하게 연관되어 발현되며 면역회피 역할을 수행할 것임을 제시한다. 이러한 결과는 혈중 암세포에서 63-D7 항체에 의해 인식되는 PTGFRN은 간암 병기나 진행을 표현하는 우수한 진단 마커로 작용할 수 있음을 제시한다.

[0264] **실시예 11. 단일클론항체 63-D7 유전자 및 아미노산 분석**

- [0265] 왕성하게 자라는 하이브리도마 63-D7 세포 5 X 10⁶ 개를 원심 분리하여 수확한 후, 차가운 PBS로 2회 세척하고 RNAiso plus reagent(TaKaRa, Otsu, Japan)으로 제조사의 프로토콜에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 전체 RNA의 A260을 Nanodrop을 통하여 측정하여 RNA 양을 정량 하였다. 전체 RNA 1 μ g당 1 unit의 DNase I (TaKaRa)을 넣고 37 °C에서 30분 동안 반응시켜 잔여의 DNA를 제거한 후, 50 mM EDTA 1 μ l를 넣고 65 °C에서 10분 동안 반응

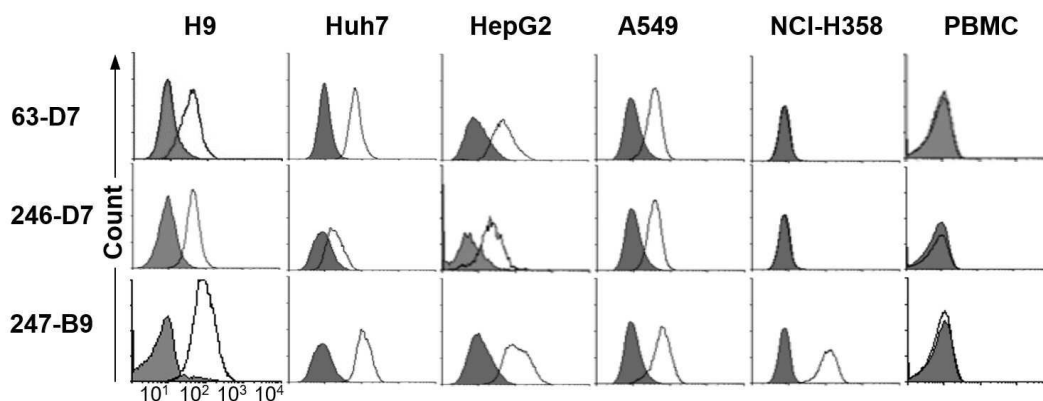
시커 DNase I를 불활성화하고 전체 RNA를 변성시켰다. 전체 RNA와 Prime Script RT reagent Kit(TaKaRa)를 사용해 역전사중합효소 연쇄반응혼합액을 만들고, 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로 중쇄 클로닝을 하기 위해서는 IgG1 불변영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 5'-gga gtc gac ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'(서열번호 20)인 올리고뉴클레오타이드 25 pmole과, 중쇄 항체 가변영역 N말단에 해당하는 프라이머인 염기서열 5'MH1 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC-3'(서열번호 21) 올리고뉴클레오타이드 25pmole 및 5'MH2 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3'(서열번호 22) 올리고뉴클레오타이드 25pmole을 넣어 연쇄 중합반응혼합액을 만들었다. 경쇄 클로닝을 위해서는 카파 사슬 불변영역에 해당하는 프라이머인 5'-ggt gtc gac GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3'(서열번호 23) 올리고뉴클레오타이드와, 카파 사슬 가변영역 N 말단에 해당하는 프라이머인 5'MK 5'-cgg aag ctt GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3'(서열번호 24) 올리고뉴클레오타이드를 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 1 unit의 i-pfu DNA Polymerase(iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 각각 섞은 후, 먼저 95 ℃에서 5분간 1회 반응하고, 95 ℃에서 1분, 35 ℃에서 1분, 72 ℃에서 1분을 한 cycle로 하여 30회 반응시켰다. 그 결과 중쇄 가변영역에 해당하는 DNA 절편으로 추정되는 길이인 약 400 bp, 경쇄 가변영역에 해당하는 DNA 절편으로 추정되는 길이인 약 390 bp에 해당하는 위치에서 증폭된 DNA를 얻을 수 있었다.

[0266] 증폭한 63-D7 유전자를 클로닝 하기 위하여, 먼저 중합효소연쇄반응 산물에 대해 중쇄는 EcoRI 및 SalI으로 처리하고, 경쇄는 HindIII 및 SalI으로 처리한 후, 1.0 %(w/v) 아가로스 겔에 전개시켜 FavorPrep GEL PCR Purification Kit(Favorgen, Pingtung, Taiwan)로 약 400 bp와 390 bp에 해당하는 DNA를 분리하였다. 중쇄유전자를 클로닝 할 벡터 pBluescript KS+를 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄유전자를 클로닝 할 벡터 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 α에 CaCl₂ 방법으로 형질 전환하였다. 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 100 µg/ml의 암피실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA-Spin plasmid mini prep kit(Intron, 한국)를 사용하여, 제조사의 프로토콜에 따라 플라스미드 DNA를 분리하고, 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 대장균 클론, 경쇄의 경우 약 390bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 대장균 클론들을 선발하였다. 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 Nucleotide sequencing(Bionics, Seoul, Korea)을 통해 확인하였다.

[0267] 중쇄 및 경쇄 DNA의 염기서열을 아미노산으로 번역한 후 항체 구조에 따른 항원인식결정 부위를 Kabat numbering을 통해 정리한 결과, 중쇄는 subgroup IIB에 해당하고(도 23) 경쇄는 subgroup V(도 24)에 해당하였다. 각 서열에 항원 결합 부위인 CDR 1, 2, 3를 진한 글씨로 표시하였다. 항체의 아미노산 서열을 BLAST로 비교해본 결과 63-D7은 기존에 알려지지 않은 새로운 항체임을 확인하였다.

도면

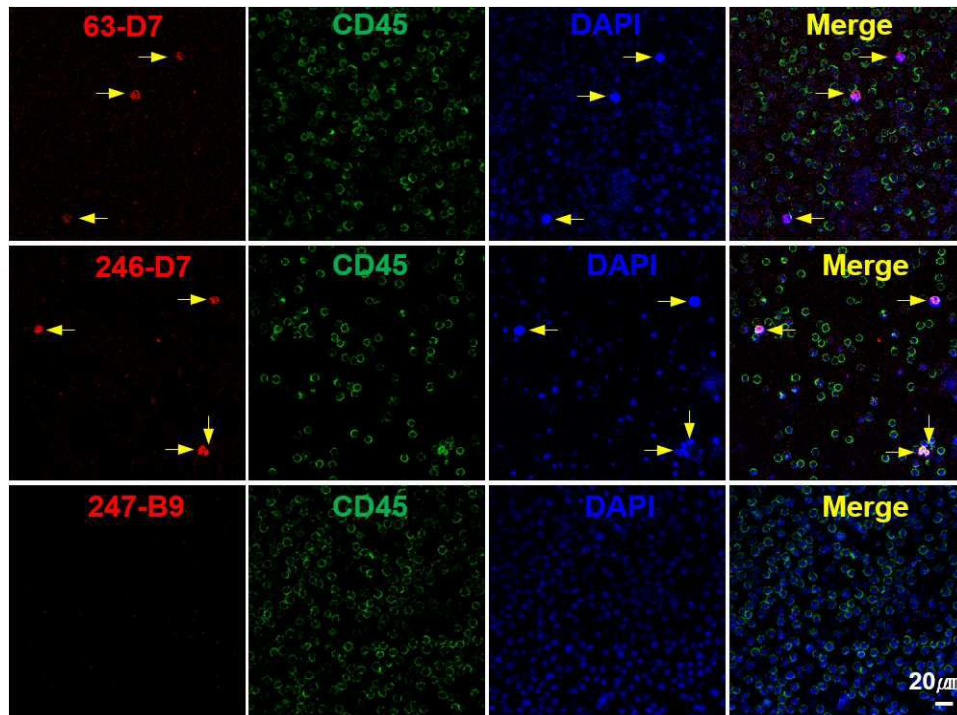
도면1a



도면1b

MAb	Isotype	H9	Huh7	HepG2	A549	H358	PBMC
63-D7	IgG1, κ	++	+++	+++	++	-	-
246-D7	IgG1, κ	++	+	++	++	-	-
247-B9	IgG1, κ	+++	+++	++	++	+++	-

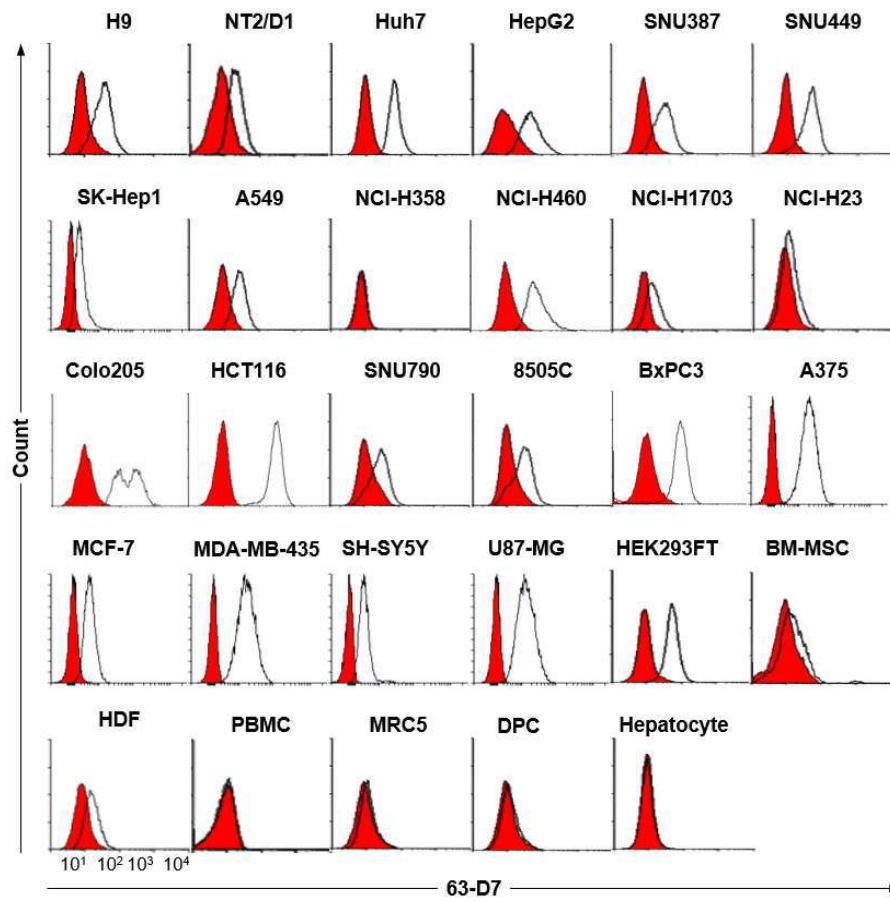
도면1c



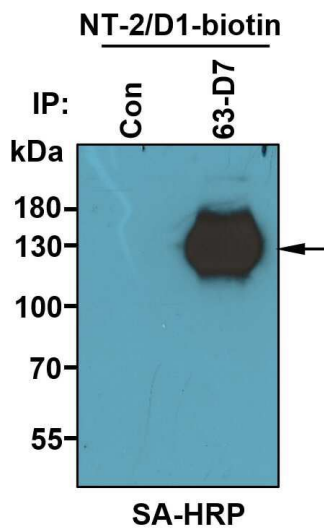
도면1d

patient	age	sex	treat	pAJCC	capsule invasion	distant metastasis	63-D7	246-D7	247-B9
normal	31	M					0	0	0
#1	56	M	TACE				3	0	0
#2	42	M		pT1	Yes	No	21	40	0
#3	73	M		pT2	Yes	No	11	4	0
#4	63	M		pT2	Yes	No	11	3	0
#5	57	M	RFA				0	0	15
#6	74	M		pT1	Yes	No	0	0	0
#7	53	M		pT2	No	No	3	0	16
#8	59	M		pT1	Yes	No	2	0	0

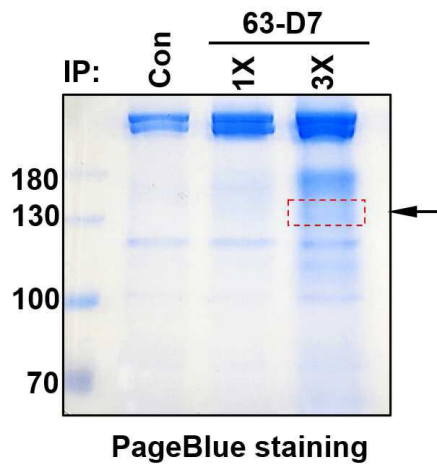
도면2



도면3a



도면3b



도면3c

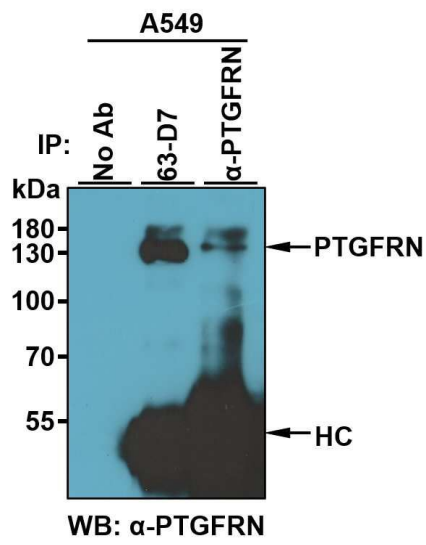
BAC11104.1 Mass:100286 Score:40 Matches:8(1) Sequences: 5(1)
Prostaglandin F2 receptor negative regulator isoform X1[Homo sapiens]
Matching peptide

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	PPM	Score	Sequence
150-159	488.7400	975.4654	975.4661	-0.71	7	R.EGEPFELR.C
319-330	530.7576	1059.5006	1059.5019	-1.17	36	R.MPDSTLPGSR.V
319-330	538.7549	1075.4952	1075.4968	-1.45	11	R.MPDSTLPGSR.V+Oxidation (M)
194-205	541.8007	1081.5868	1081.5880	-1.06	7	R.SVLALTHEGR.F
194-205	361.5367	1081.5883	1081.5880	0.25	8	R.SVLALTHEGR.F
416-431	774.3615	1546.7084	1546.7086	-0.10	17	K.VPGFADDPTELACR.V
139-161	723.7421	2168.2045	2168.2066	-0.97	20	K.VLADSLHVGPSARPPPSLSLR.E
139-161	543.0585	2168.2049	2168.2066	-0.77	10	K.VLADSLHVGPSARPPPSLSLR.E

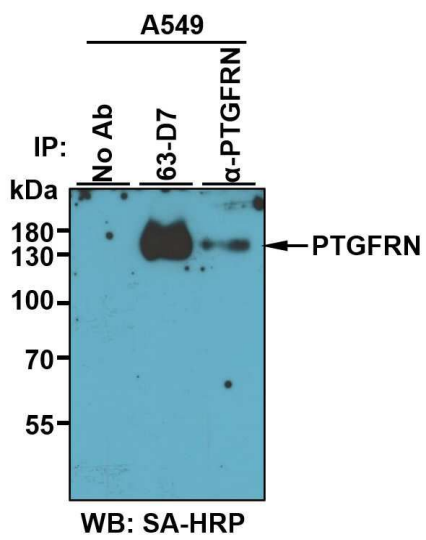
BAC11104.1 Prostaglandin F2 receptor negative regulator (PTGFRN)

1 MGRLASRPLL LALLSLALCR GRVVRVPTAT LVRVVGTELV IPCNVSDYDG PSEQNFDWSF
61 SSLGSSFVEL ASTWEVGFP QLYQERLQRG EILLRRTAND AVELHIKNVQ PSDQGHYKCS
121 TPSTDATVQG NYEDTVQVKV LADSLHVGPS ARPPPSLSLR EGEPFELRCT AASASPLHTH
181 LALLWEVHRG PARRSVLALT HEGRFHPGLG YEQRYHSGDV RLDTVGSDAY RLSVSRALSA
241 DQGSYRCIVS EWIAEQGNWQ EIQEKAVEVA TVVIQPSVLR AAVPKNVSA EGKELDLTCN
301 ITTDRADDVR PEVTWSFSRM PDSTLPGSRV LARLDRSLV HSSPHVALSH VDARSYHLLV
361 RDVSKENSGY YYCHVSLWAP GHNRSWHKVA EAVSSPAGVG VTWLEPDYQV YLNASKVPGF
421 ADDPTELACR VVDTKSGEAN VRFTVSWYYR MNRRSDNVVT SELLAVMDGD WTLKYGERSK
481 QRAQDGFIF SKEHTDTFNF RIQRTTEEDR GNYICVSAW TKQRNNSWVK SKDVFSKPVN
541 IFWALEDSVL VVKARQPKPF FAAGNTFEMT CKVSSKNIKS PRYSVLIMAE KPVGDLSSPN
601 ETKYIISLDQ DSVVKLENWT DASRVDGVVL EKVQEDEFY RMYQTQVSDA GLYRCMVTAW
661 SPVRGSLWRE AATSLSNPIE IDFQTSGLPIF NASVHSDTPS VIRGDLIKLF CIITVEGAAL
721 DPDDMAFDVS WFAVHSFGLD KAPVLLSSLD RKGIVTTSRR DWKSDLSLER VSVLEFLLQV
781 HGSEDQDFGN YYCSVTPWVK SPTGSWQKEA EIHSPVFIT VKMDVLNAFK YPLLIGVGLS
841 TVIGLLSCLI GYCSSHWCCK KEVQETRER RRLMSMEMD

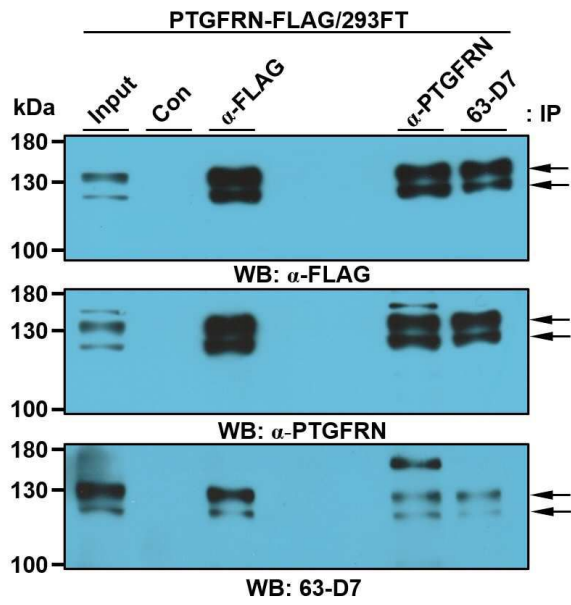
도면4a



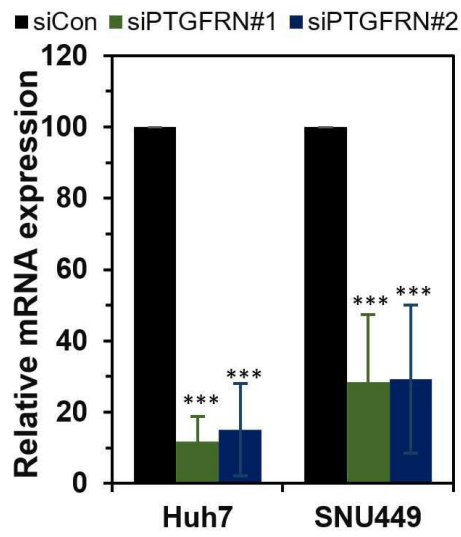
도면4b



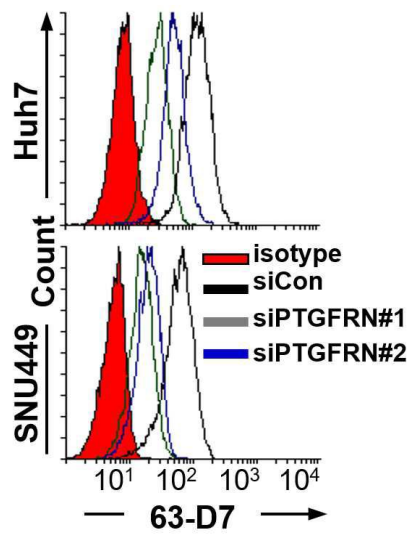
도면4c



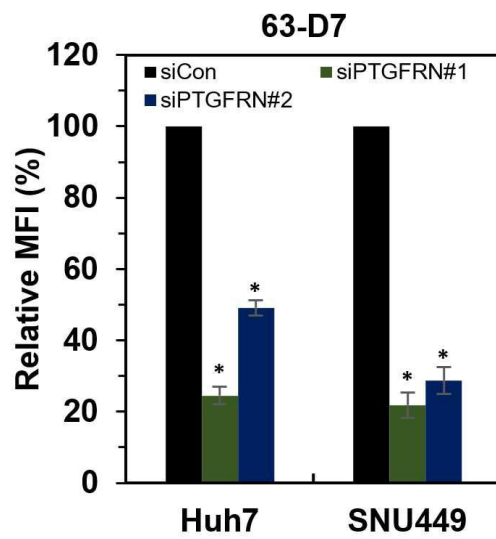
도면5a



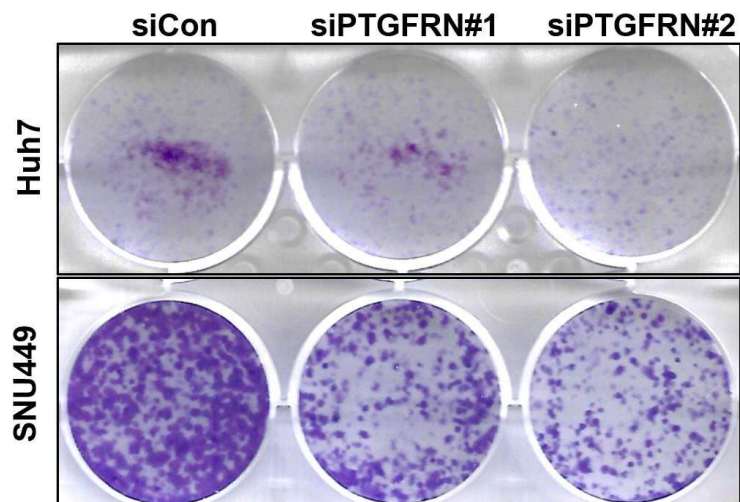
도면5b



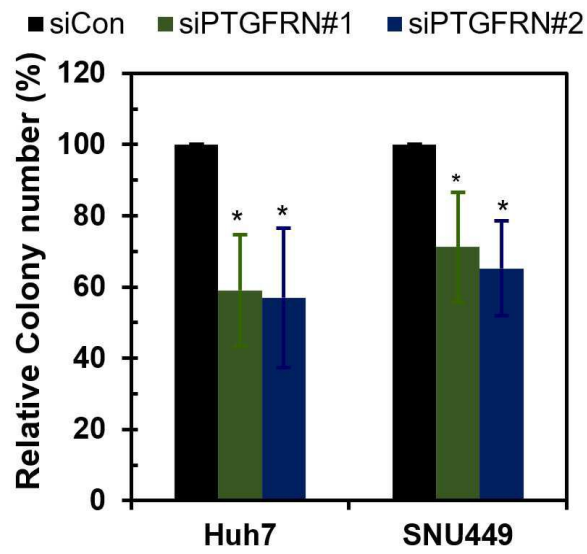
도면5c



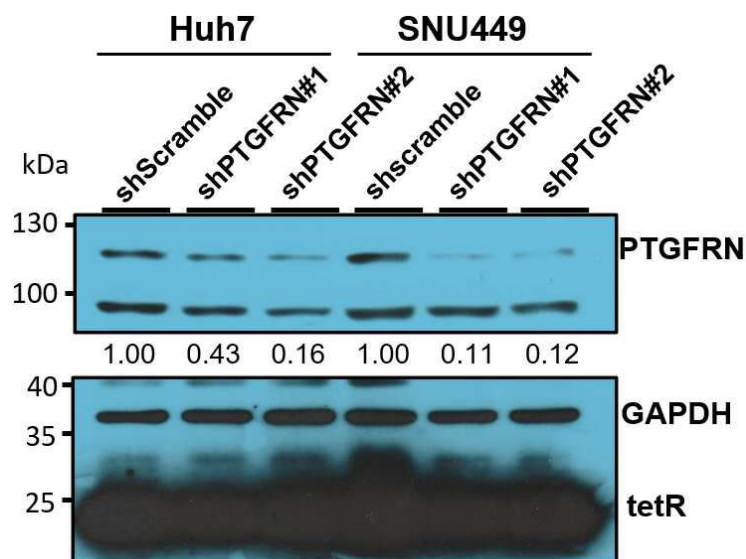
도면5d



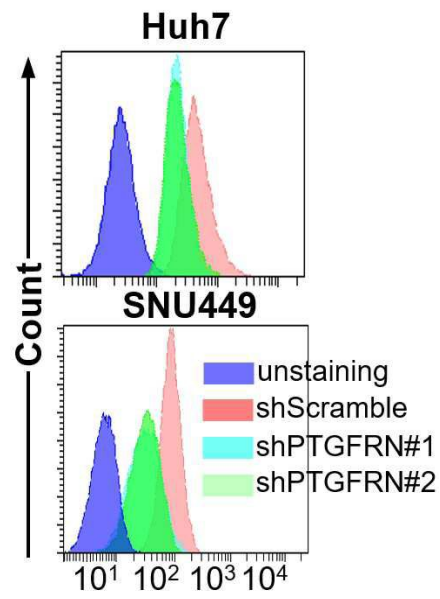
도면5e



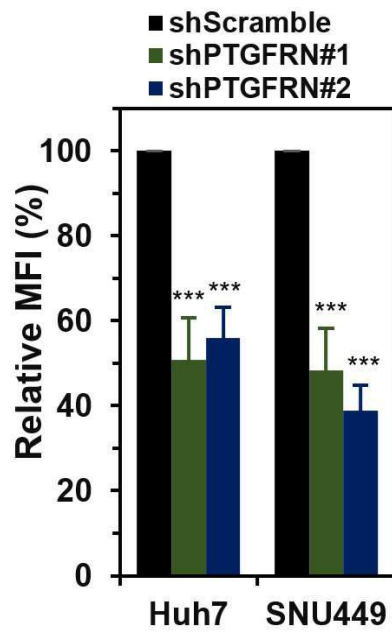
도면6a



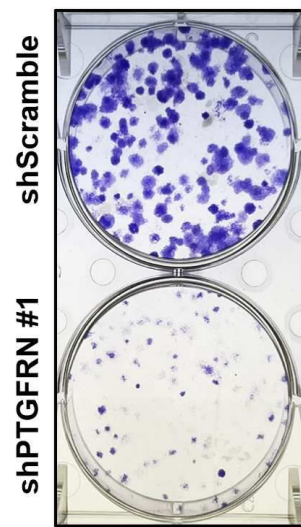
도면6b



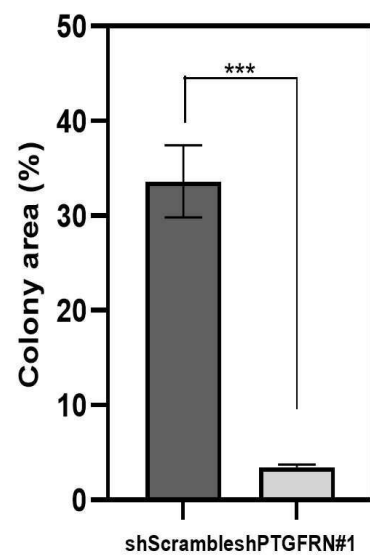
도면6c



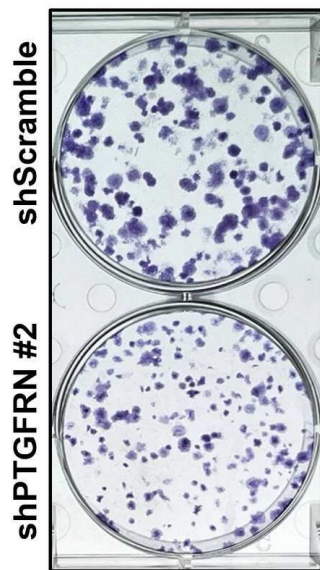
도면6d



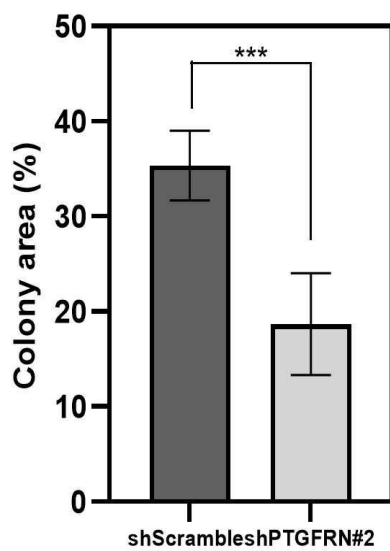
도면6e



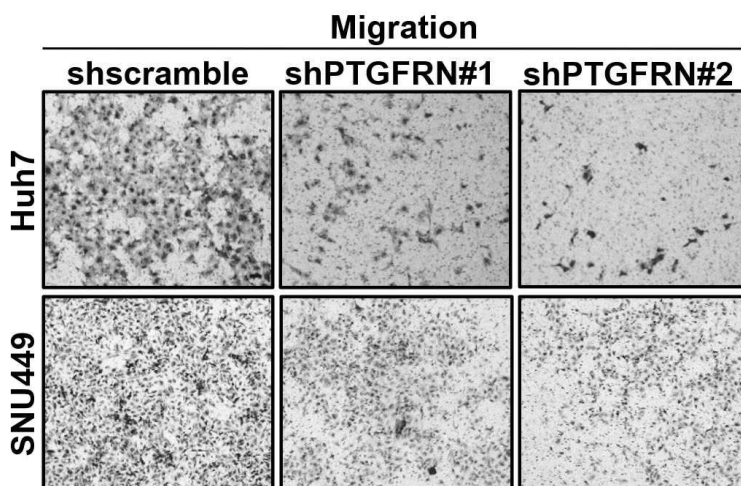
도면6f



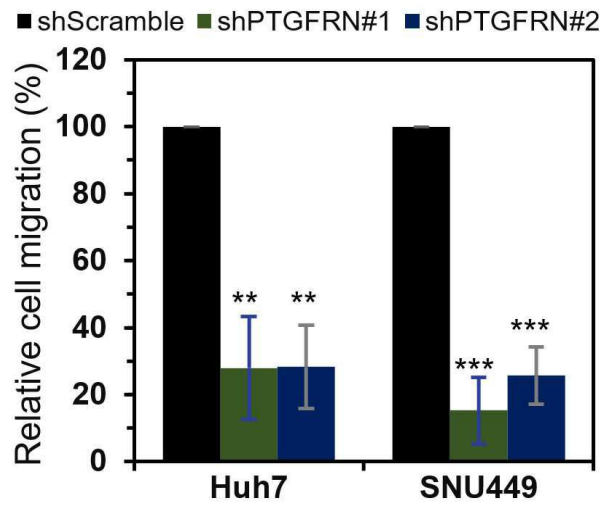
도면6g



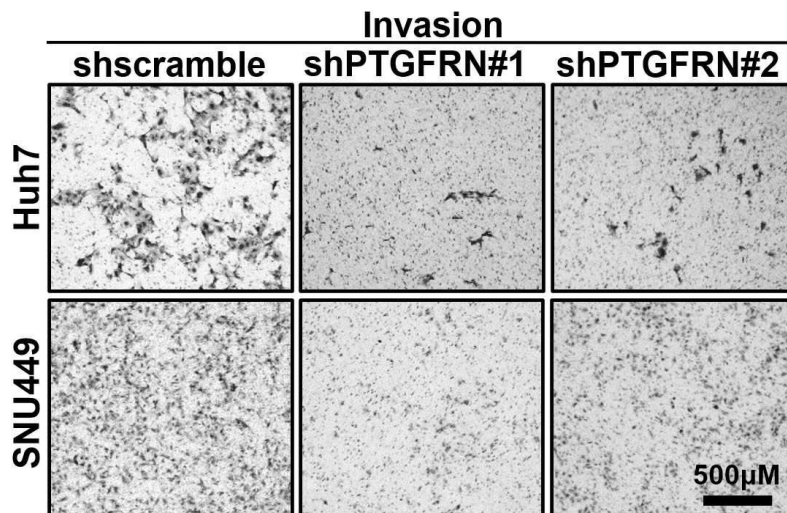
도면7a



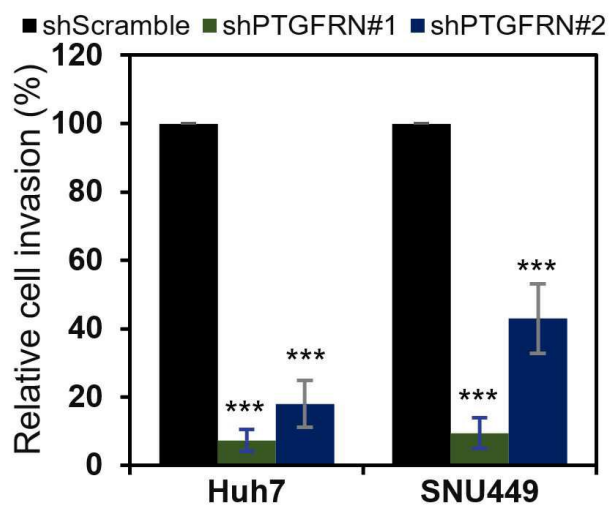
도면7b



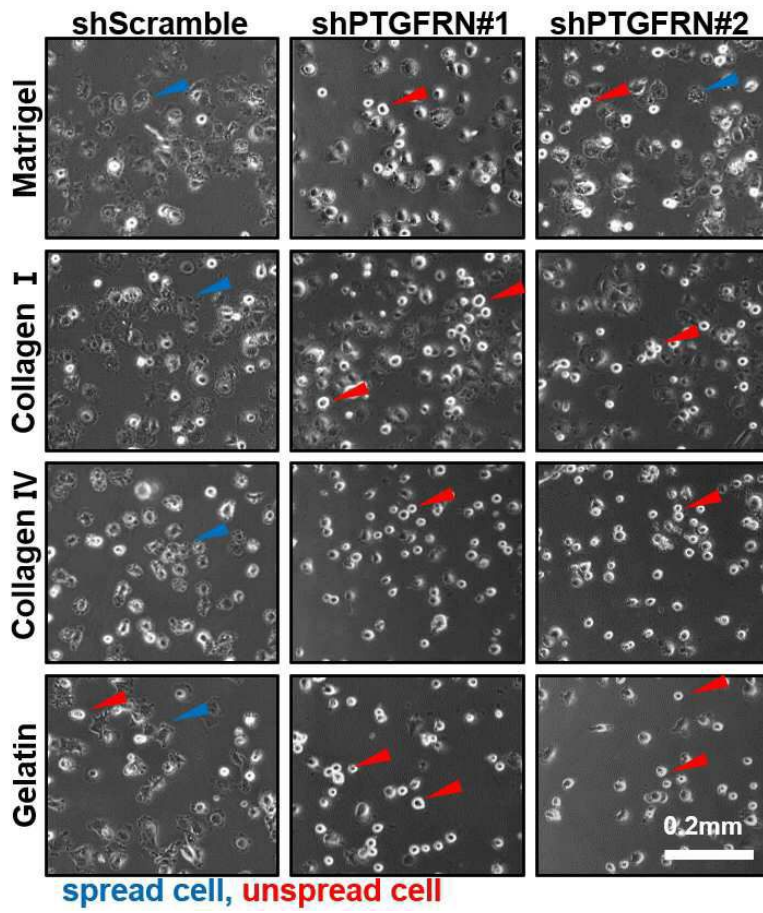
도면7c



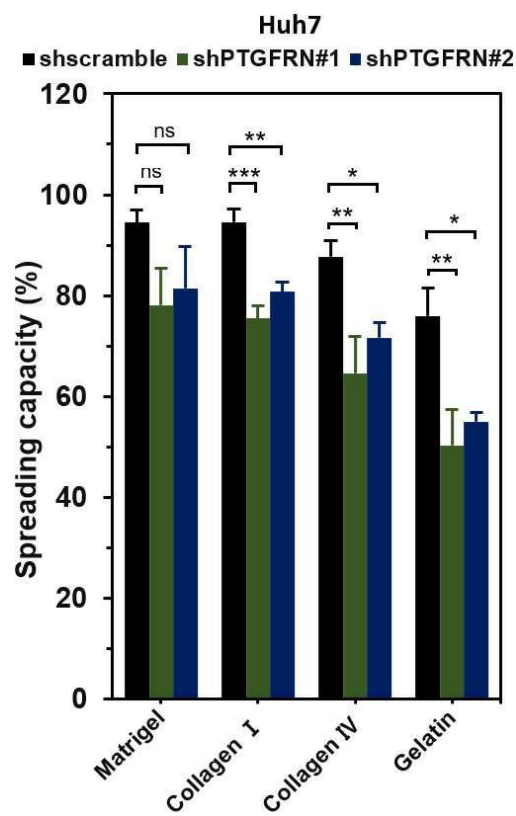
도면7d



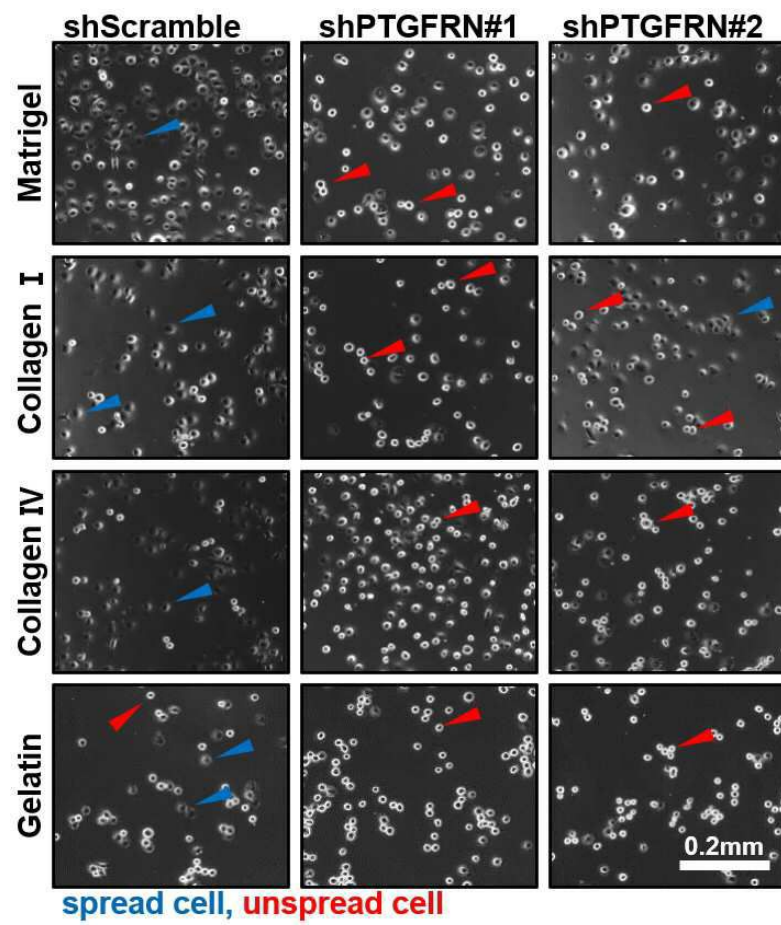
도면8a



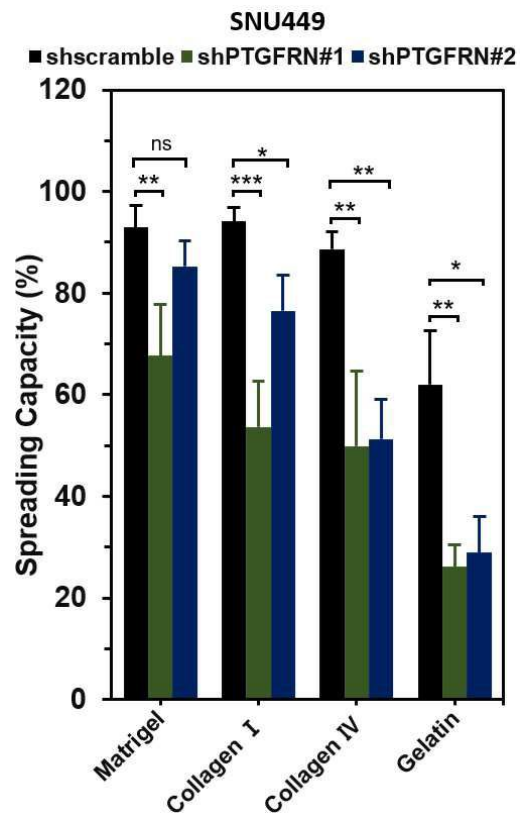
도면8b



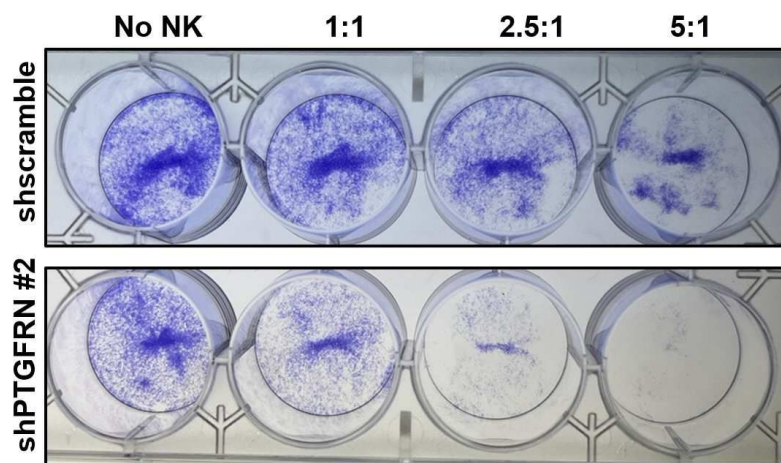
도면8c



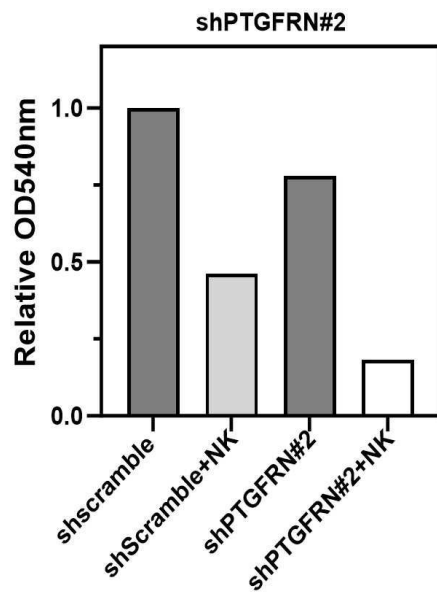
도면8d



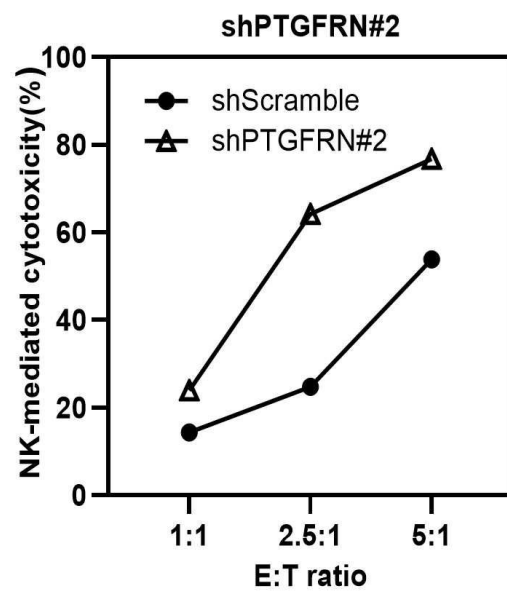
도면9a



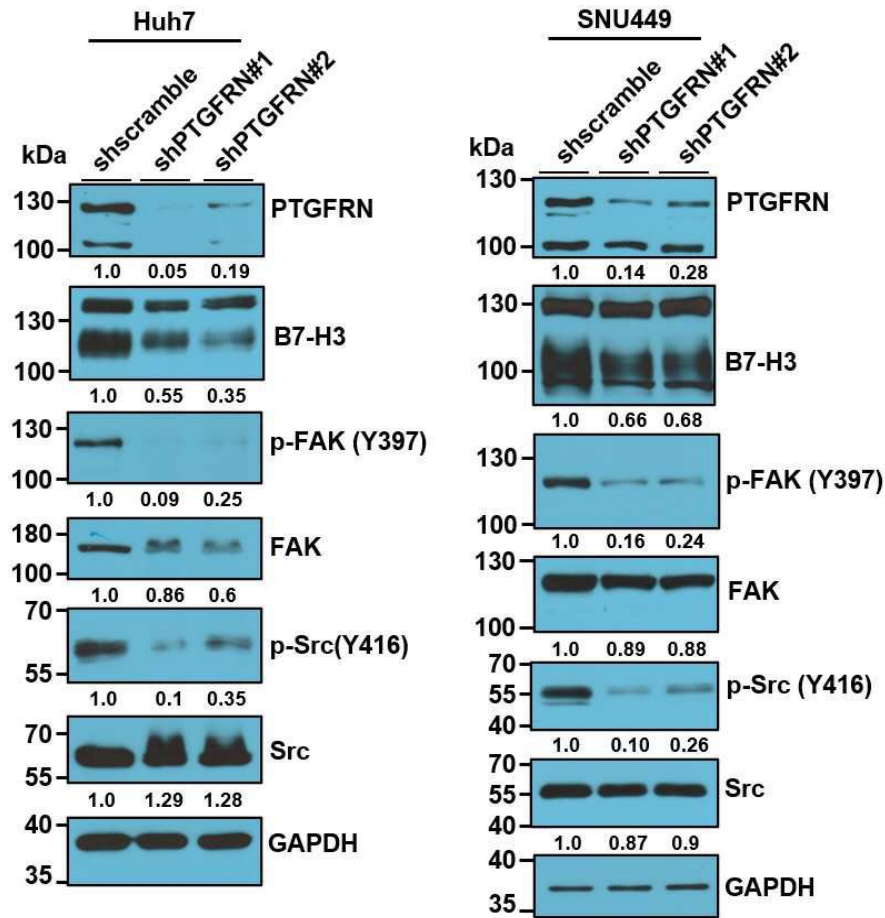
도면9b



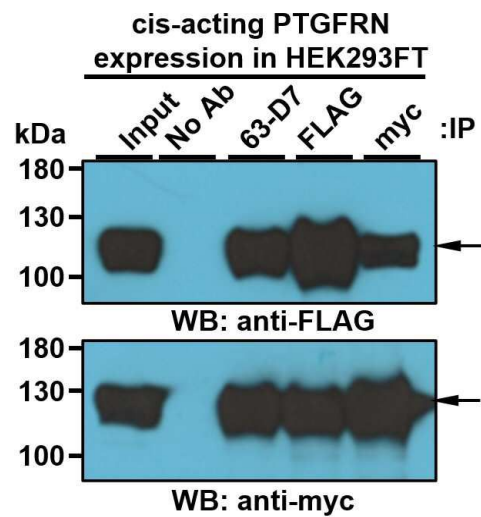
도면9c



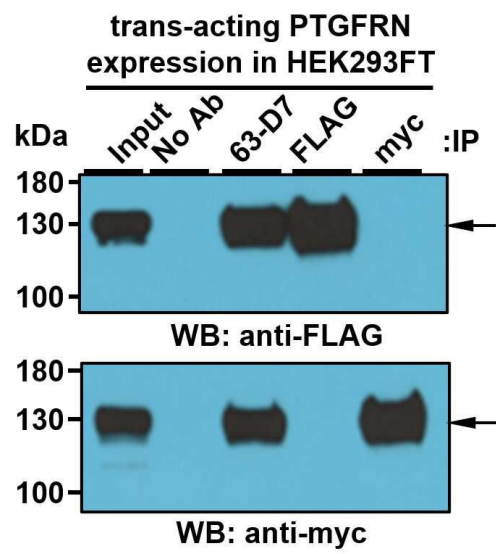
도면10



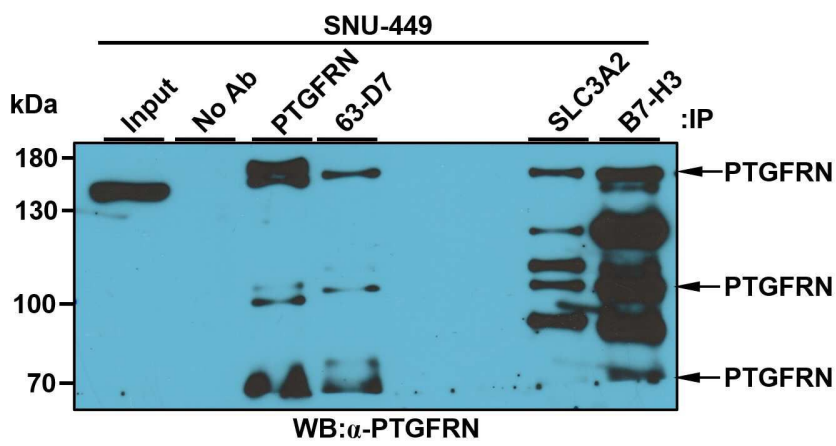
도면11a



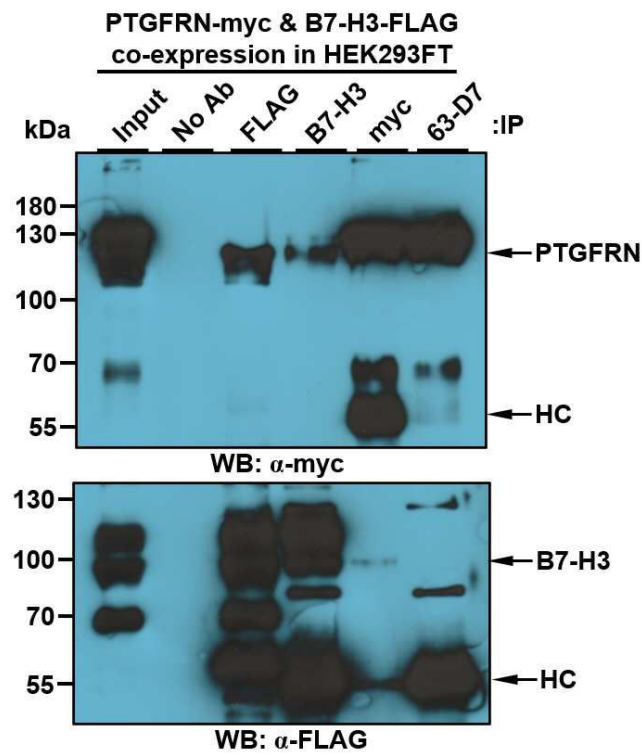
도면11b



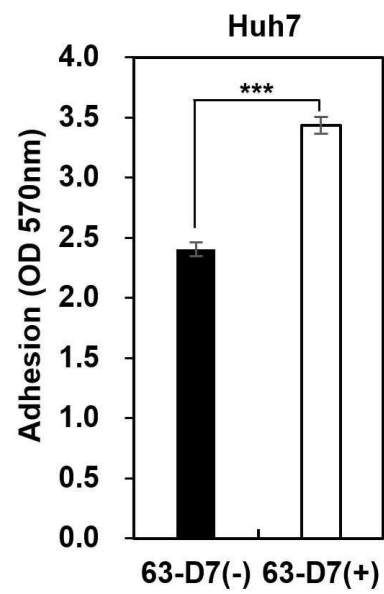
도면11c



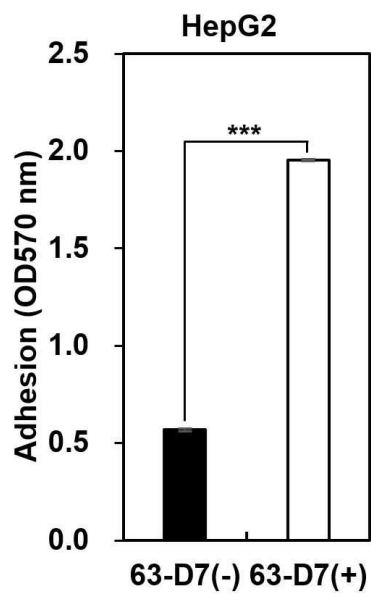
도면11d



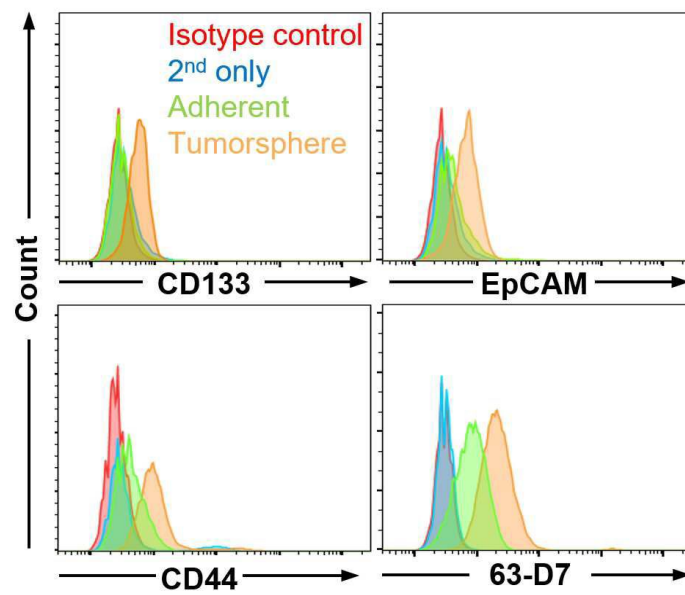
도면12a



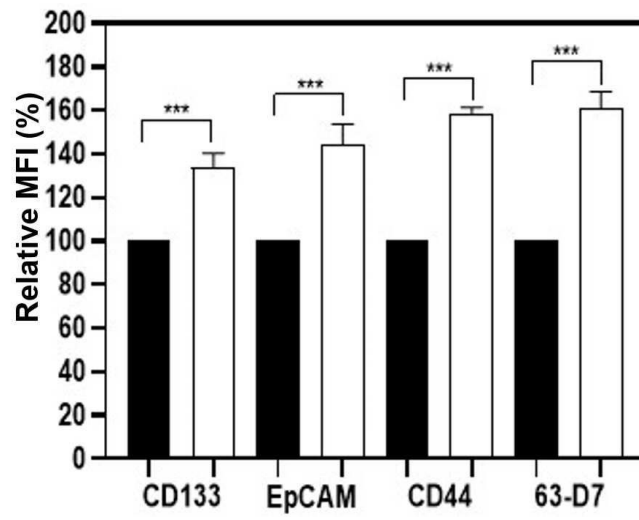
도면12b



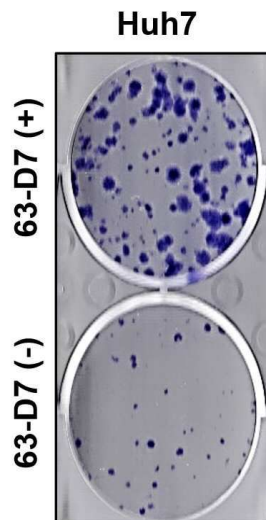
도면12c



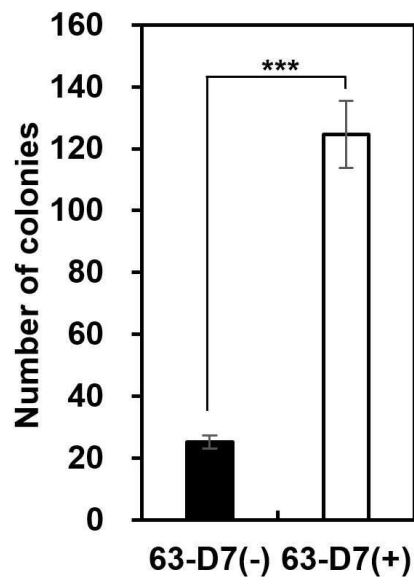
도면12d



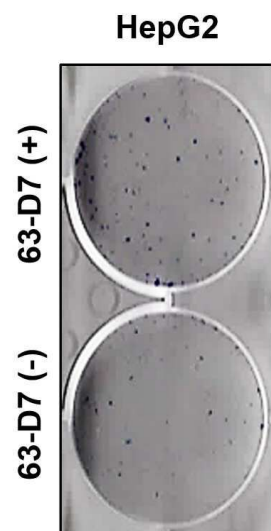
도면12e



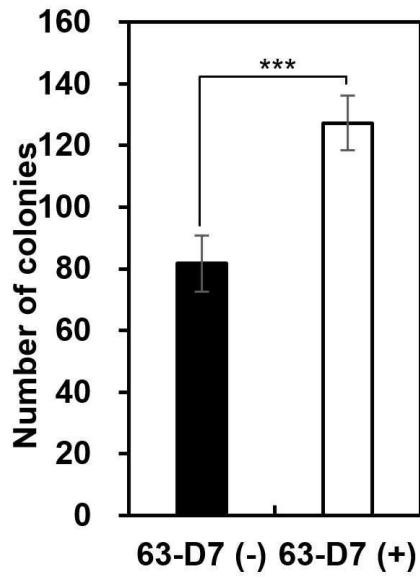
도면12f



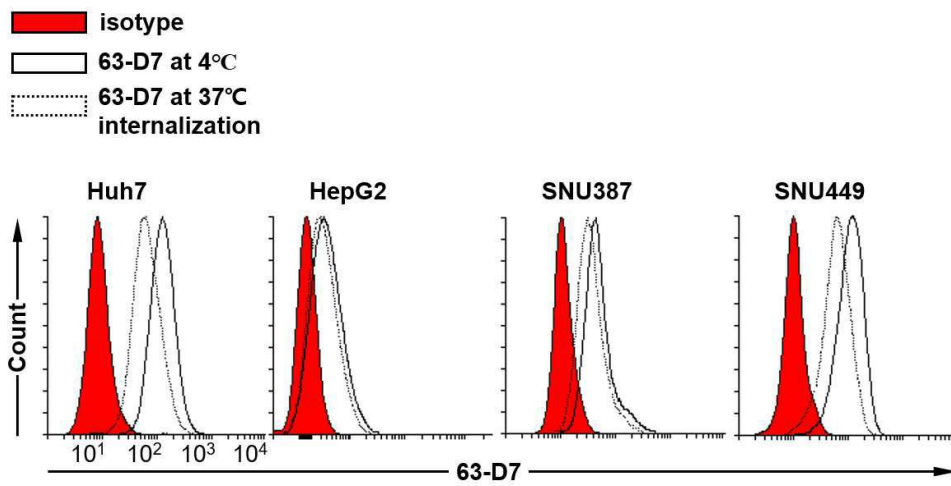
도면12g



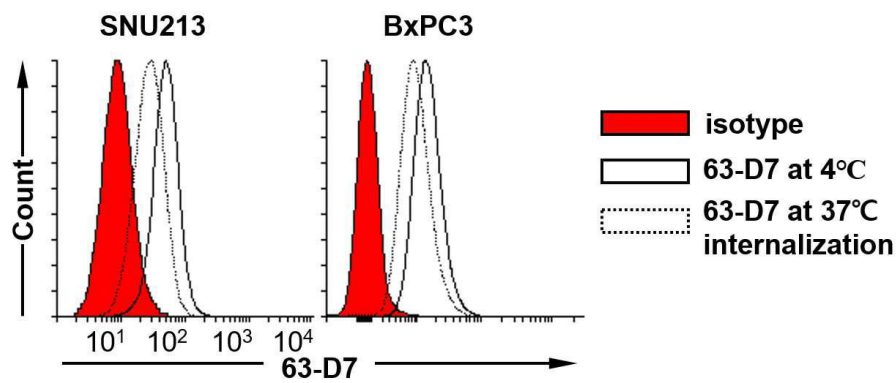
도면12h



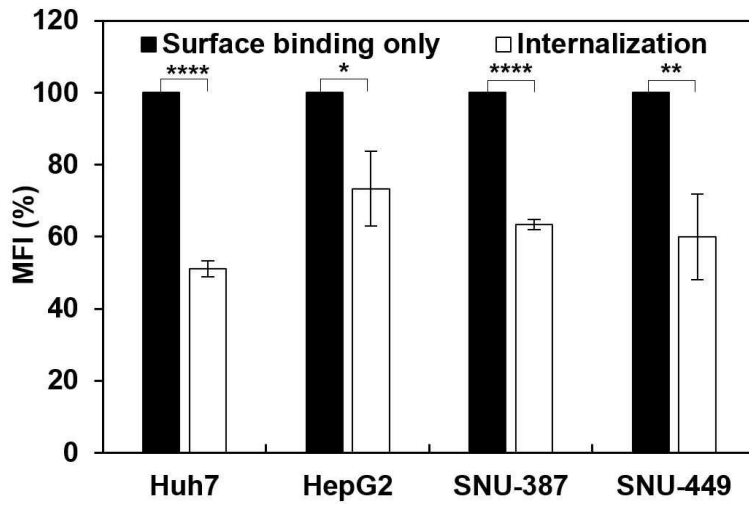
도면13a



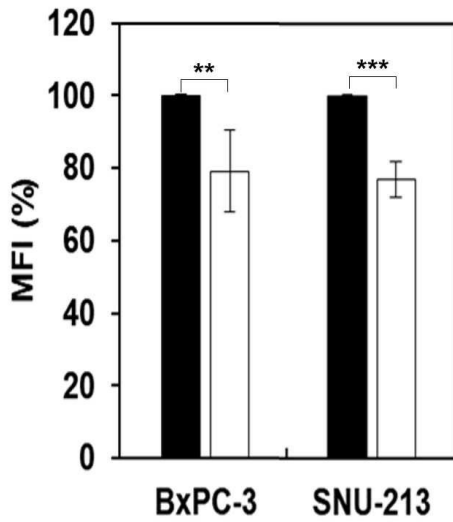
도면13b



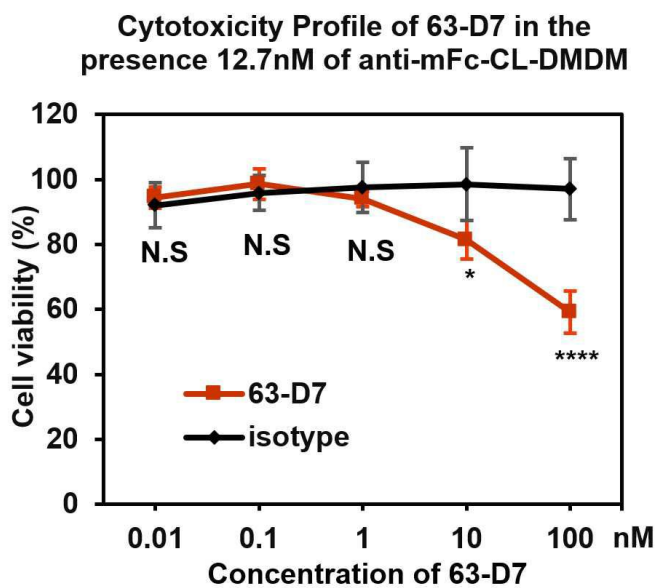
도면13c



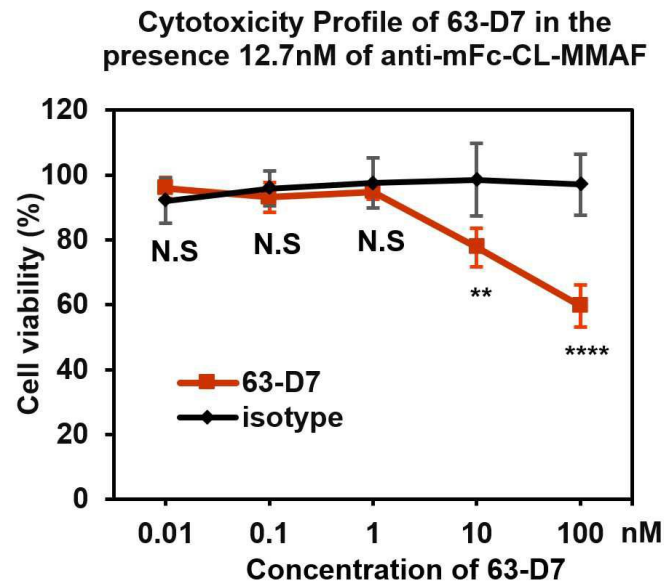
도면13d



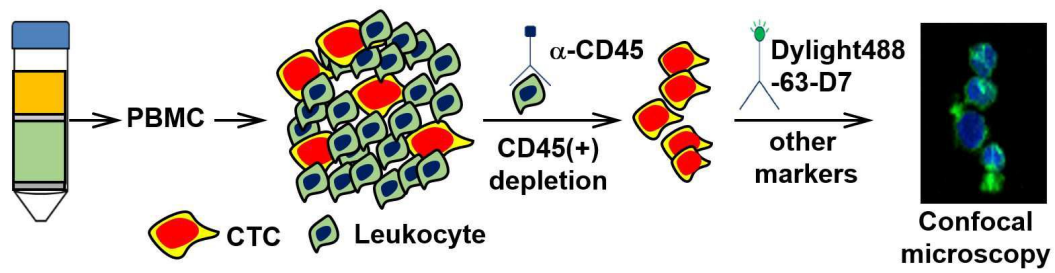
도면14a



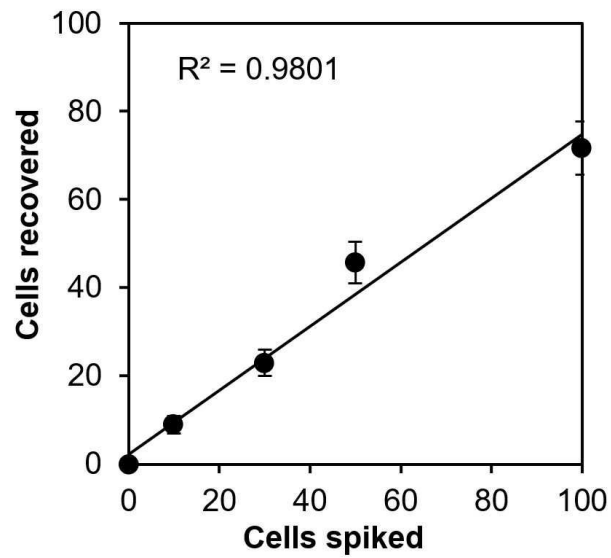
도면14b



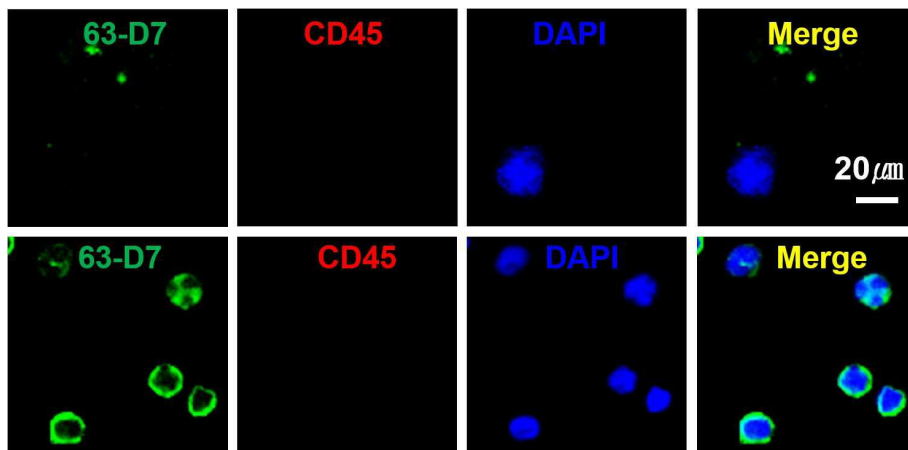
도면15a



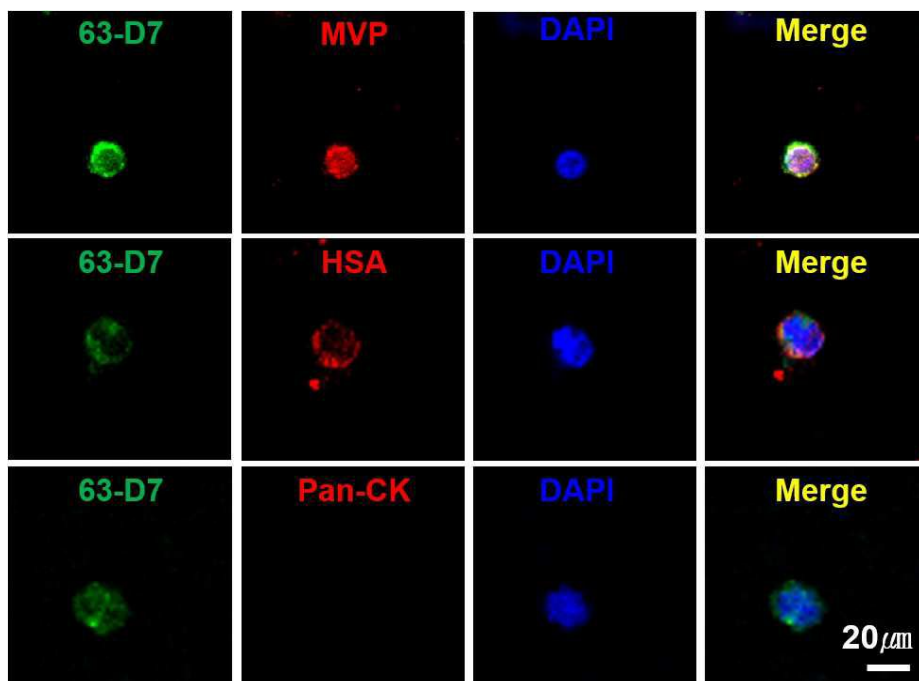
도면15b



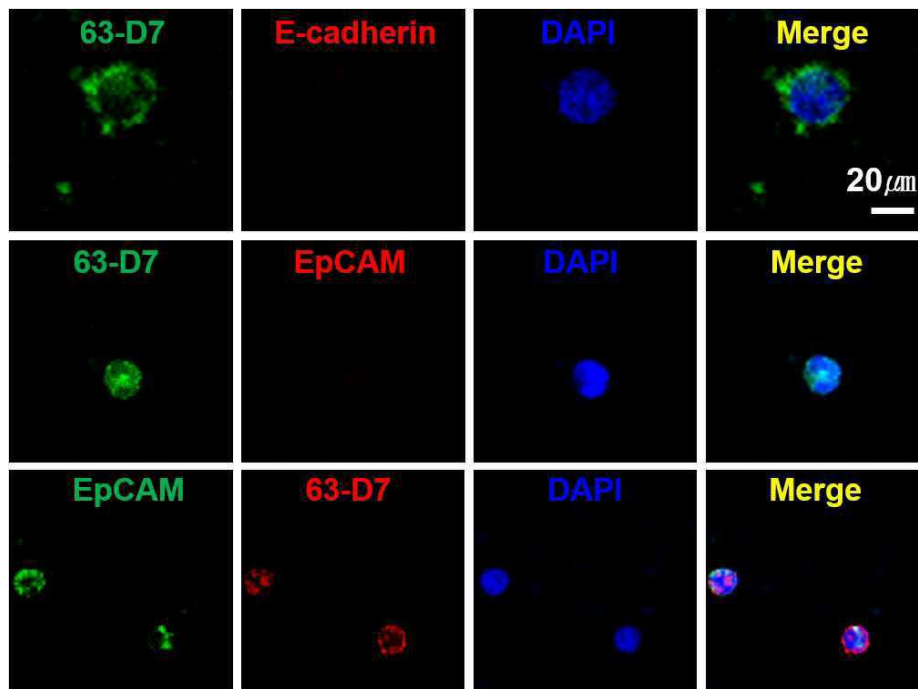
도면15c



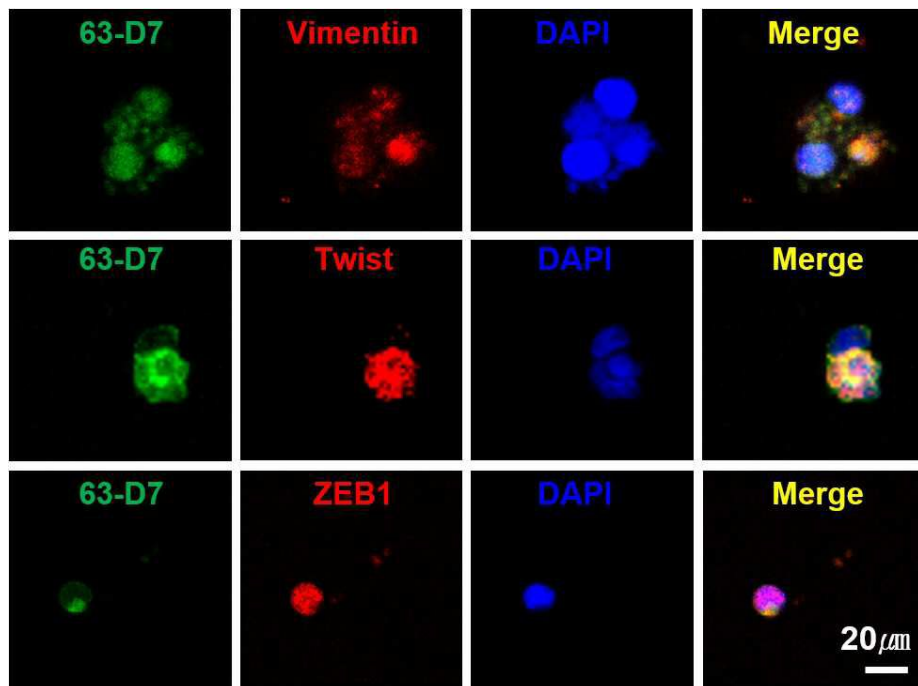
도면16a



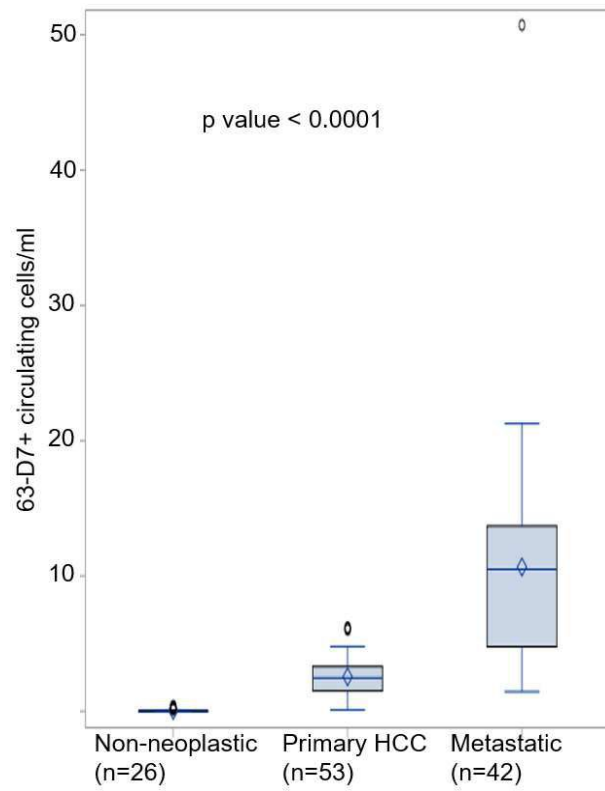
도면16b



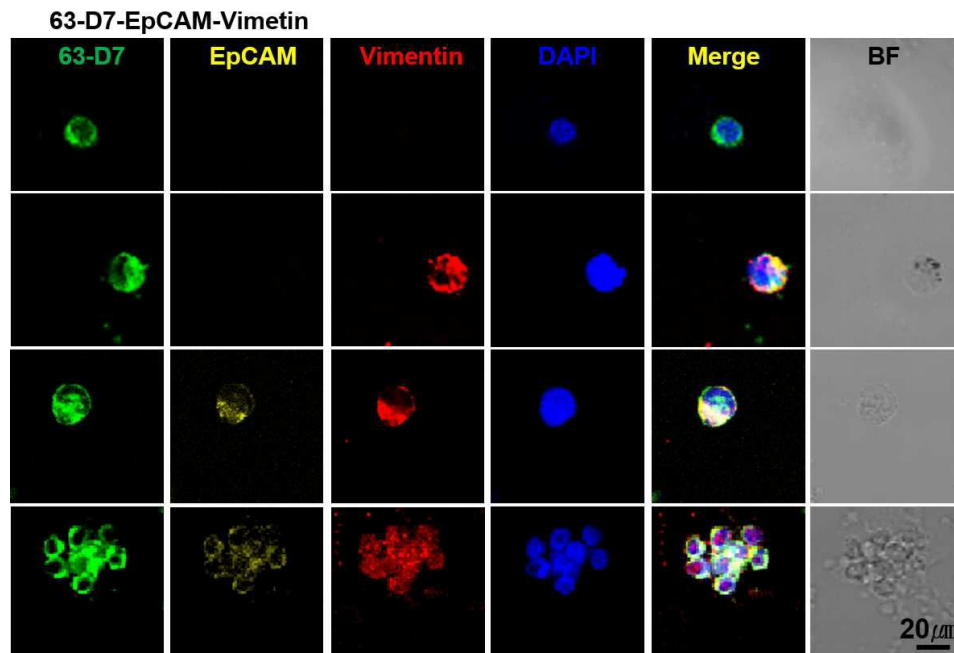
도면16c



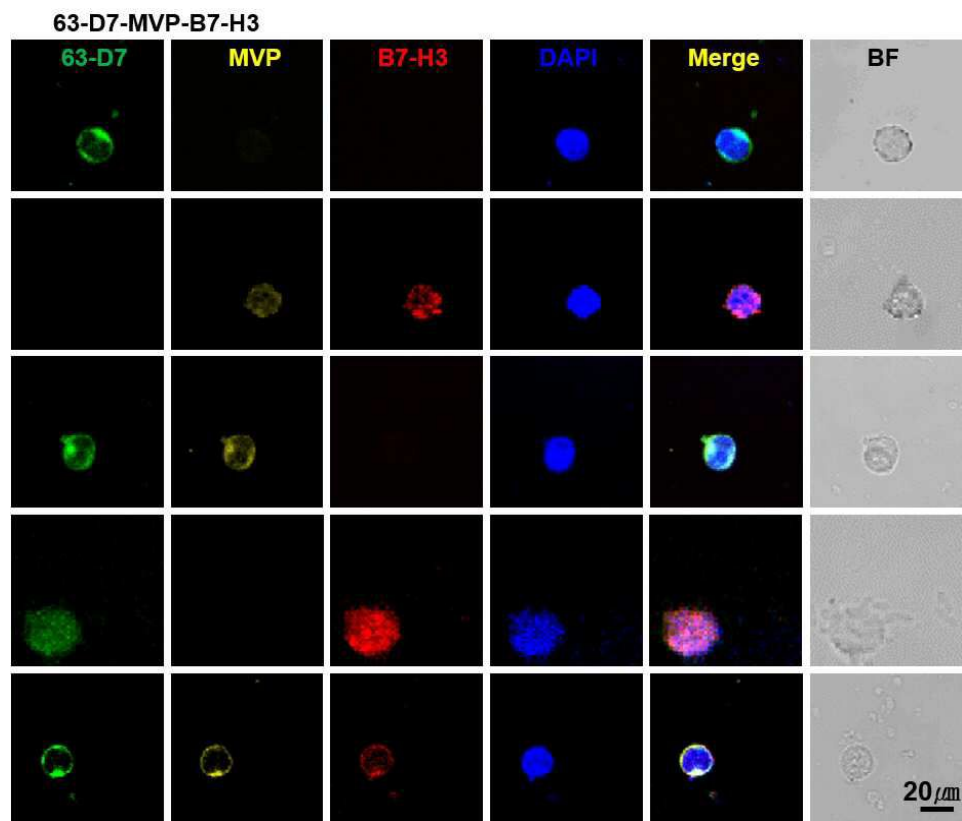
도면17



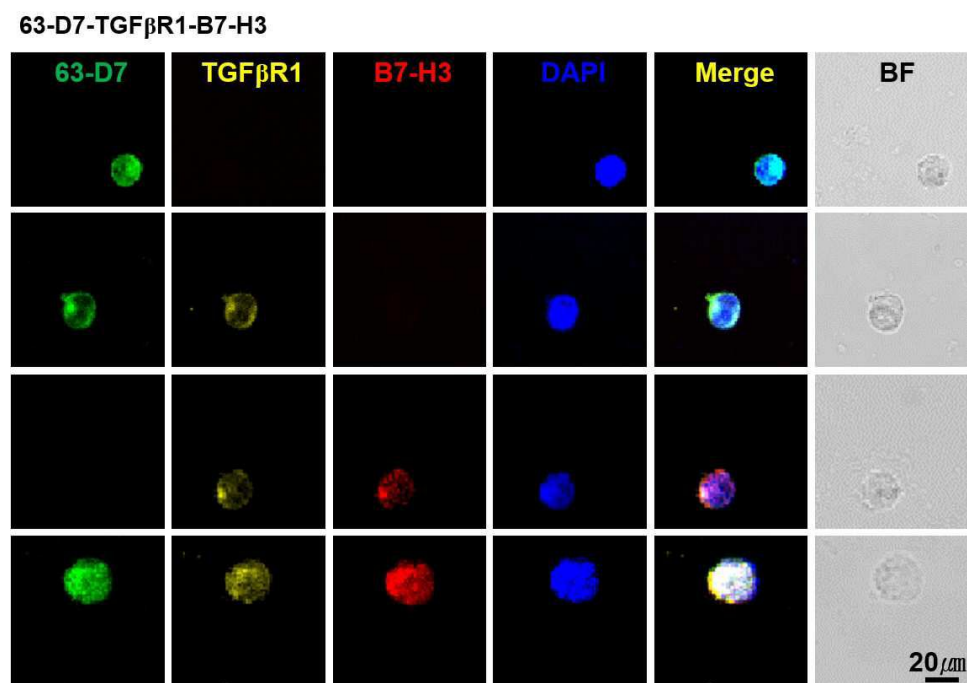
도면18a



도면18b

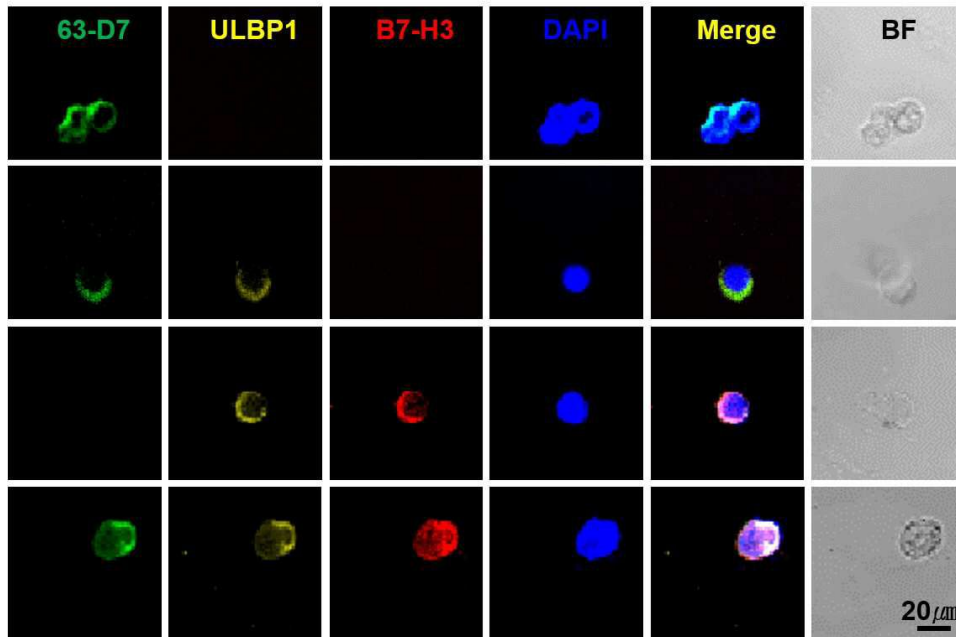


도면19



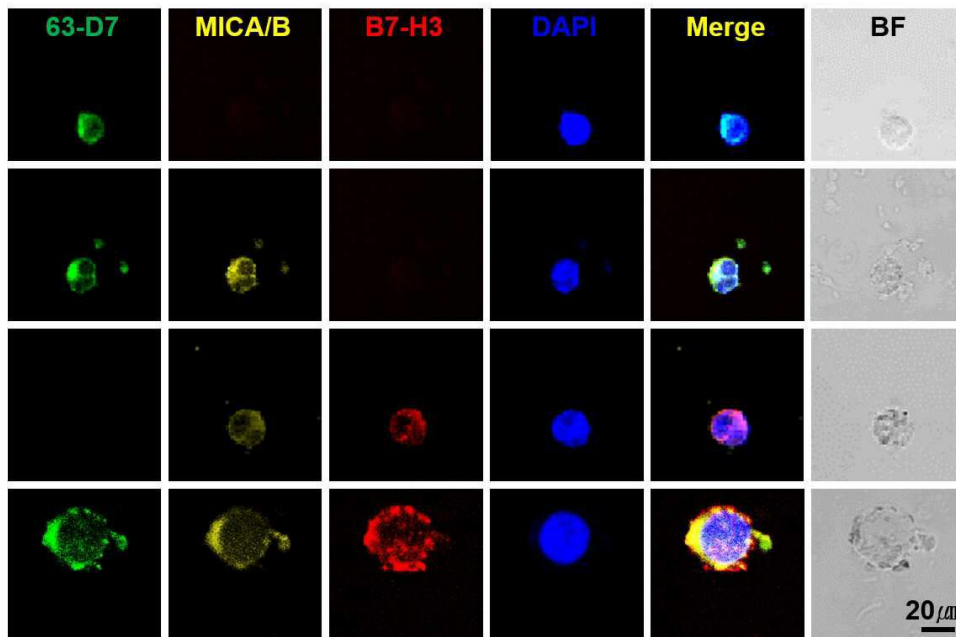
도면20a

63-D7-ULBP1-B7-H3



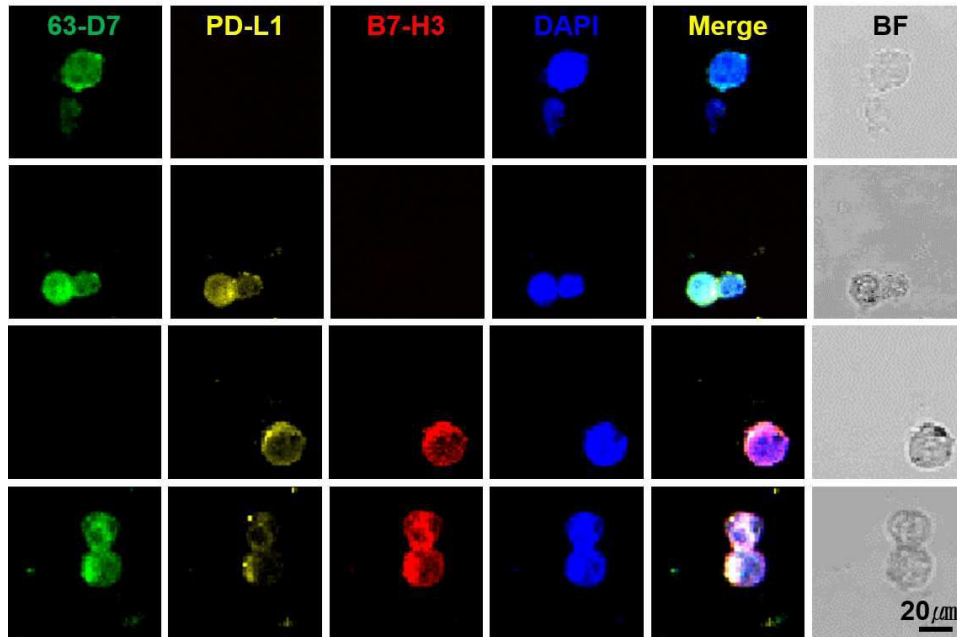
도면20b

63-D7-MICA/B-B7-H3



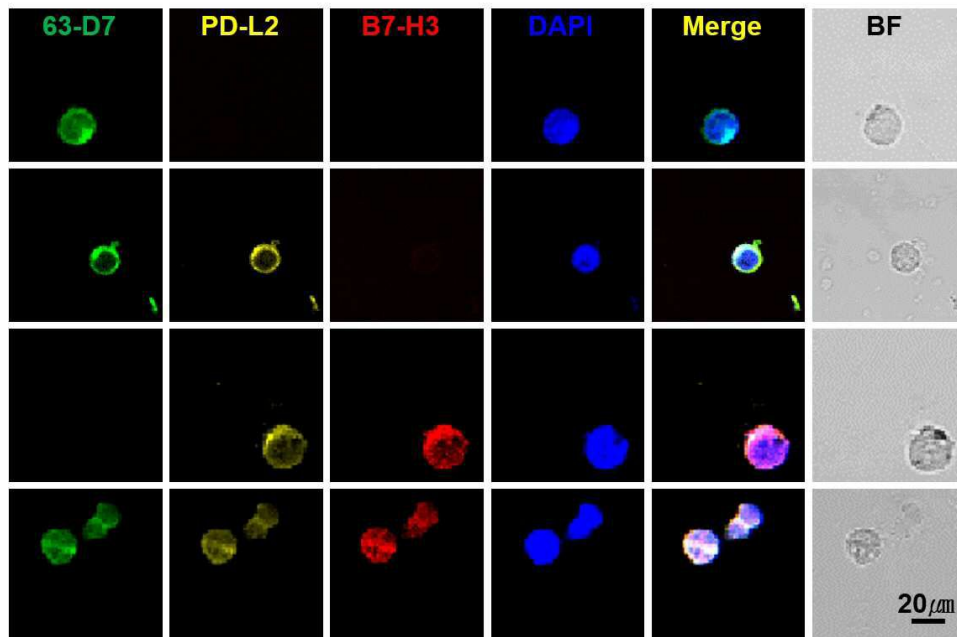
도면21a

63-D7-PD-L1-B7-H3



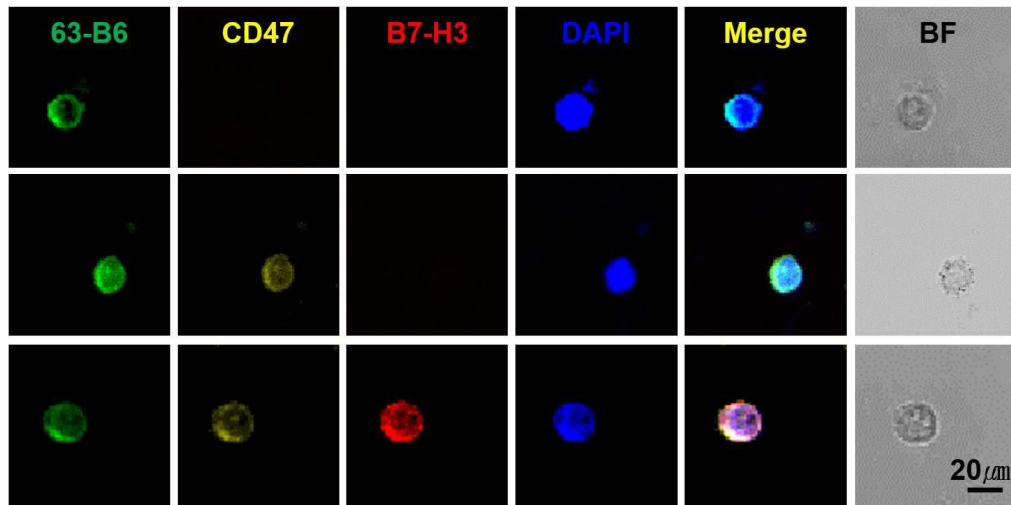
도면21b

63-D7-PD-L2-B7-H3



도면22

63-D7-CD47-B7-H3



도면23

63-D7 Heavy chain: Subgroup IIB

GAA GTT CAG CTG GAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC 60
Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile 20

CDR-L1

TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAT ACC TTC ACA GAC TCT TCA ATG CAC TGG GTG AAG CAG GCT 120
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala 40

CDR-L2

CCA GGA AAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACT GAG ACT GGT GAG TCA ACA TAT 180
Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Ser Thr Tyr 60

GCA GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC GTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCC TAT 240
Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Val Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr 80

CDR-L3

TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT GCT AGA GGG GGA 300
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly 100

CCC AAT TAC TAT GTT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA 357
Pro Asn Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser 119

도면24

63-07 Light chain: Subgroup V

GAT ATT GTG ATC ACC CAA TCT ACA CCC TCC TTT TCT GTG TCT CCA GGA GAC AGA GTC ACC 60
Asp Ile Val Ile Thr Gln Ser Thr Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Asp Arg Val Thr 20

CDR-H1

ATT ATT TGC AAG GCA AGT GAG GAC ATA TAT AAT CGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA 120
Ile Ile Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 40

CDR-H2

GGA AAT GCT CCT AGG CTC TTA ATA TCT GGT GCA ACC AGT TTG GAA ACT GGG GTT CCT TCA 180
Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser 60

AGA TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGA AAG GAT TAC GCT CTC AGC ATT ACC AGT CTT CAG ACT 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Ala Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr 80

CDR-H3

GAA GAT GTT GCT ACT TAT TAC TGT CAC CAG TAT TGG AGT ACT CCG TGG ACG TTC GGT GGA 300
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly 100

GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA 328
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 107

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.