



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0071736

(43) 공개일자

2014년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0139664

(22) 출원일자

2012년12월04일

심사청구일자

2012년12월04일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

류춘제

서울 강남구 선릉로 221, 204동 203호 (도곡동, 도곡테크아파트)

최홍서

서울 광진구 능동로27가길 20, (군자동)

이현민

경기 포천시 소흘읍 무림3길 16,

(74) 대리인

특허법인태백

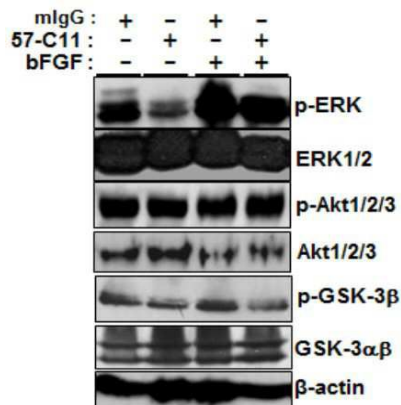
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 단일클론항체 57-C11을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 단일클론항체 57-C11을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 인간 배아줄기세포나 배아 암세포 성장을 억제하고, 다양한 암세포 중에서 57-C11 항원을 표면에 발현하는 피부암 세포, 소세포 폐암세포, 신경아세포종의 세포성장을 억제하는 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 57-C11을 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다. 상세하게는 단일클론항체 57-C11은 미분화 인간 배아줄기세포 세포표면의 E1B-AP5 단백질을 특이적으로 인식하는 것으로 E1B-AP5를 인식하여 인간배아줄기세포 및 배아암세포의 성장을 억제하고 또한 피부암, 소세포 폐암, 신경아세포종의 세포성장을 억제 하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345168293
부처명	교육과학기술부
연구사업명	바이오·의료기술개발사업
연구과제명	줄기세포 niche에서 E1B-AP5-like 단백질의 기능연구
기 여 율	3/5
주관기관	세종대학교 산학협력단
연구기간	2012.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2012K001480
부처명	미래창조과학부
연구사업명	신기술융합형 성장동력사업
연구과제명	단일클론항체를 이용한 혈중암세포 특이적 표면분자 발굴 및 분석
기 여 율	2/5
주관기관	세종대학교 산학협력단
연구기간	2012.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

단일클론항체 57-C11을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 단일클론항체 57-C11은 미분화 인간배아줄기세포 표면의 E1B-AP5 단백질을 인식하는 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 단일클론항체 57-C11은 미분화 인간배아줄기세포 또는 인간배아암세포의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 세포의 성장 억제는 MAPK/EPK 신호전달을 억제하는 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 암은 피부암, 소세포폐암 및 신경아세포종으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 단일클론항체 57-C11을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 인간 배아줄기세포나 배아 암세포 성장을 억제하고, 다양한 암세포 중에서 57-C11 항원을 표면에 발현하는 피부암세포, 소세포 폐암세포, 신경아세포종의 세포성장을 억제하는 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 57-C11을 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 배아줄기세포(embryonic stem cell)는 생물을 구성하는 다양한 기능을 가진 모든 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포로서, 생쥐, 원숭이, 사람 초기 배아의 배반포(blastocyst)나 상배엽(epiblast)에 존재 한다(Evans, et al., Nature, 292: 151-156, 1981; Thomson, et al., PNAS 92:7844-7848, 1995; Thomson, et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Brons, et al., Nature, 448: 191-196, 2007; Tesar, et al., Nature, 448:196-202, 2007). 이 세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 재생(self renewal)이라는 세포 분열에 의해 자신과 동일한 세포를 무한히 생산할 수 있으며, 다양한 환경 또는 분화 자극에 의해 우리 몸의 모든 기능성 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency) 특징을 지닌다. 배아줄기세포 연구의 역사적 배경을 보면 1981년 처음으로 생쥐 배아줄기세포(mESC, mouse embryonic stem cell) 배양법이 확립된 후(Evans, et al., Nature, 292: 151-156, 1981), 1996년 영장류에서 전분화능 배아줄기세포 배양법(Thomson, et al., Biol. Reprod., 55: 254-259, 1996)이 개발되었고, 1998년 미국의 톰슨(Thomson) 등에 의해 인간 배아줄기세포(hESC, human embryonic stem cell) 배양법이 확립되었다(Thomson, et al., Science, 282: 1145-1147, 1998). 배아줄기세포는 모든 세포로 분화할 수 있는 전분화능을 갖고 있으므로, 질병이나 사고에 의한 특정 세포나 장기 손상 시 줄기세포를 그 특정 세포로 분화를 유도하여 대체 사용할 수 있을 것으로 기대됨에 따라 여러 난치성 질환의 근원적 치료방법으로 여겨지고 있다. 그러나 전분화능 때문에 생쥐 등에서 암을 발생함이 증명되었고(Brickman and Burdon, Nat Genet. 32:557-558, 2002; Vogel, G. et al., Science. 308:1534-1538, 2005), 코넬 대학의 Goldman 그룹은 인간배아줄기세포에서 불멸화한 astrocyte와 함께 유도한 도파민 뉴런을 파킨슨 모델 쥐에 동시에 이식하여 효과적인 이식과 생존율을 관찰하였으니 이식부위에서 암 발생 가능성이 있는 미분화 상태의 세포를 관찰하여 실제 세포이식 실험에서 암 발생 위험성을 보여주었다(Roy, et al., Nat Med. 12:1259-1268,

2006). 또 다른 실험에서도 2백만 개 섬유아세포를 이식할 때 단지 두 개의 배아줄기세포만 섞여도 60% 생쥐에서 기형종(Teratoma)를 형성함을 관찰하여 (Lawrenz, et al., *Cytherapy* 6:212-222, 2004), 배아줄기세포에서 유도한 세포를 이식하여 임상적으로 적용하고자 할 때 잔존하는 미분화 배아줄기세포의 제거는 가장 중요한 문제중 하나이다. 따라서 안전한 세포이식치료를 위해 잔존하는 미분화 줄기세포를 제거하는 다양한 방법들이 제시되고 있다. 먼저 배아줄기세포에 넣어준 자살유전자(suicide gene)에 의한 미분화 세포의 자살 유도방법이 제시되었으나 transgenic으로 넣어준 유전자는 유전자 규제에 대한 또 다른 문제점을 유발할 수 있다 (Cao, et al., *Circulation*. 113: 1005-1014, 2006; Schuldiner, et al., *Stem Cells*. 21:257-265, 2003). 다른 방법으로 Fluorescent-Activated Cell Sorting (FACS) 과 Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)를 통한 원하는 줄기세포만을 분리하는 방법이 있고 (Handgretinger, et al., *Bone Marrow Transplant*. 29:731-736, 2002), 그 외에도 미분화 원숭이 배아줄기세포에 특이적인 표면 항원 SSEA-4 에 대한 항체를 이용하여 이 세포만을 분리 제거하는 방법 (Shibata, et al., *Stem Cells*. 24:1450-1457, 2006), 미분화 인간배아줄기세포에 특이적인 세포 살해성 항체를 이용하여 이 세포를 죽이는 방법 (Choo, AB., et al., *Stem Cells*. 26:1454-1463, 2008), 잘 증식하는 전분화능 세포의 특성을 이용하여 이런 세포만을 아예 약물로 죽이는 방법 등이 개발되고 있고 (Bieberich, et al., *J Cell Biol*. 167:723-734, 2004), 남아있는 미분화 세포의 분화를 유도하여 제거하는 방법도 제안되고 있다 (Brederlau, et al., *Stem Cells*. 24:1433-1440, 2006).

[0003] 19세기 중반에 병리학자들은 암조직을 현미경으로 관찰하면서 embryonic tissue와 암조직 사이의 유사성을 발견하였고 Beard등은 "Embryonal Rest hypothesis"를 내놓아, 암이란 성인 조직에 남아있는 일부 배아성 세포나 활성화된 germinal 세포로부터 발생한다고 제안하였으며 (Beard J. et al., *Lancet* 1902: i1758;1902; Sell S. et al., *Crit. Rev. Oncol. Hematol* 51:1-28, 2004; Brewer, et al., *Exp Mol Pathol*. 86(3):192-197, 2009), 실제로 암세포는 배아성세포와 형태학적으로 닮았을 뿐만 아니라, 운동성, 감소된 접촉방해, 조직 침입성, 증식 속도, 혐기성 대사, 분화부족, 혈관생성물질 분비, 배아성 단백질생성 등 많은 점이 배아성세포와 유사하다 (Cortes-Funes, et al., *Natural history of cancer and history of oncology*, 2-16.1993). 1906년 Schone 등은 실제로 fetal tissue를 주사한 생쥐는 이식된 암을 거부하는 것을 관찰하였고 (Schone, G., *Munch. Med. Wochenschr*. 51:2517-2519, 1906), 1970년대는 Embryonic/fetal 조직을 주사한 생쥐에서 암세포 (피부암, 간암, 위암 등) 이식이나 발암물질을 주입해도 암이 생기는 않는 것을 관찰하였으며, 이 현상은 두 조직에 동시에 존재하는 분자로 배아발생 동안에 발현하다 성인조직에는 최소로 존재하고 암 발생시 다시 발현되는 Oncofetal 항원 때문이라고 생각하였다 (Adinolfi, M And Lessof, MH. *Quarterly Journal of Medicine, New Series* 54 (215):193-204, 1985).

[0004] Oncofetal protein들은 실제로 암의 진단이나 치료에 쓰이는 주요한 타겟으로 CA-125 (난소암, Bafna S, et al., *Oncogene*. 29(20):2893-2904, 2009), CEA family (대장/직장암, Greiner JW. et al., *Cancer Res*. 62:6944-6951, 2002), AFP (간암, Evdokimova and Butterfield, *Expert Opin Biol Ther*. 8(3):325-336, 2008), cancer/testes antigen (Costa FF. et al., *Stem Cells* 25:707-711, 2007), POA (췌장암, Fritsche and Gelder. *Immunol Ser*. 53:289-296, 1990) 등 실제 임상에서 진단 마커로 응용되고 있으며, 또 이들을 타겟하는 항체는 암 치료용 항체로 개발되어 임상 실험 단계에 와 있다 (Carter, et al., *Endocrine-Related Cancer* 11:659-687, 2004). 그 외에도 Cripto-1 (Bianco et al., *Curr. Top Dev. Biol*. 67:, 85-133, 2005), Glypican-3 (Nakatsura and Nishimura, *BioDrugs*. 19(2):71-77, 2005), 5T4 (Myers, et al., *J. Biol Chem*. 269:9319-9324, 1994), M2A (Marks, et al., *Br J Cancer*. 80:569-578, 1999) 등이 최근 배 발생 동안과 암 발생 동안에 동시에 발현되는 Oncofetal protein으로 알려지고 있다.

[0005] Oncofetal protein들은 배 발생 이후에 성인에서 최소로 조절됨으로 이를 분리하기는 실제로 쉽지 않고, Embryonic/fetal tissue의 면역주사를 통한 암백신 개발은 분자 기전의 이해부족, 윤리적 문제등으로 동물모델에 그치고 1970년대 이후 진행되지 않다가 미분화 인간배아줄기세포가 배양 가능해지면서 (Thomson, et al., *Science*, 282: 1145-1147, 1998), 2009년 코네티컷대 Zihai Li 교수팀은 인간배아줄기세포를 면역 주사한 생쥐에서 대장암세포를 주사하면 주입한 대장암에 대한 T 세포 면역과 antibody 면역반응이 유도되며 자가 면역질환 없이 대장암 발생을 억제한다는 것을 밝혔으며 (Yi L. et al., *Stem Cells* 27: 3103-3111, 2009), 루이스빌대의 John Eaton 교수팀은 2012년 생쥐배아줄기세포를 면역 주사한 생쥐에 폐암세포를 주사하거나 발암물질로 폐암을 유도해도 폐암에 걸리지 않음을 보고하였는데 (Yaddanapudi K. et al., *PLoS One*. 7:e42289, 2012), 이런 내용은 인간 배아줄기세포 어떤 항원들이 암줄기세포의 표면 항원처럼 암 발생 억제를 위한 항원으로 작용함을 증명하는 것이다. SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, EpCAM, Cripto등의 Oncofetal 항원은 실제로 배아줄기세포의 미분화 마커로 쓰이고 있으며, 암을 유발하는 암줄기세포는 미분화성 세포로 각 조직에 일부 남아있는 배아성 줄기세포가 돌연변이를 통해 자가 재생산 과정이 고정되어 비가역적으로 영구적인 미분화 상태의 자가 재

생산 상태를 유지하여 일어나는 것으로 추정되고 있다 (Ben-Porath, et al., Nature Genetics 40:499-507, 2008; Widschwendter, et al., Nature Genetics. 39(2):157-158, 2007).

[0006] 본 발명자들은 선행연구를 통해서 미분화 인간배아줄기세포 특이적인 표면항원을 인식하는 항체 57-C11을 발굴하였고 (Choi HS. et al., Cell Tissue Res. 333:197-206, 2008), 이 항체가 미분화 인간배아줄기세포 표면에 발현하는 인산화 E1B-AP5라는 것을 밝히고 이 항원은 분화 유도시 표면에 발현이 현저히 감소하여 미분화 배아줄기세포 특이적인 표면마커라는 것을 밝혔다 (Choi HS. et al., Stem Cells and Dev. 20:609-620, 2011). 따라서 미분화 인간배아줄기세포 표면의 E1B-AP5를 인식하는 항체 57-C11를 미분화 인간배아줄기세포 인식 및 제거용 단일클론항체로 대한민국특허로 출원 등록하였다 (류춘제 외 대한민국 특허, 등록번호 제10-1078217, 등록날짜 2011.10.25).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 단일클론항체 57-C11을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다. 상기 단일클론항체 57-C11은 미분화 인간배아줄기세포 또는 인간배아암세포의 성장을 억제하고, 피부암, 소세포폐암 및 신경아세포종의 성장을 억제하는 것을 특징으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 항체 57-C11이 in vitro에서 인간배아줄기세포와 인간배아암세포의 증식을 억제하는 특성을 가지고 있으며, 이런 특성은 MAPK/ERK신호전달을 통해 세포성장을 억제해서 일어나는 것을 관찰하였고, 이 항체를 이용하면 세포 치료제 개발시 잔존하는 암 유발 우려가 있는 미분화인간배아줄기세포 성장 억제에 응용 가능하다는 사실을 밝혀냈다. 또한 표면에 E1B-AP5를 발현하는 세 가지 암세포인 피부암세포 A375, 소세포 폐암세포 NCI-H69, 신경아세포종 SH-SY5Y에 대한 in vitro 암세포 성장 실험을 통해서 항체 57-C11이 세 종류의 암세포 성장을 억제함을 관찰하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명은 단일클론항체 57-C11을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상세하게는, 상기 단일클론항체 57-C11은 미분화 인간배아줄기세포 표면의 E1B-AP5 단백질을 인식하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 또한, 상기 단일클론항체 57-C11은 미분화 인간배아줄기세포 또는 인간배아암세포의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하고, 보다 상세하게는, 상기 세포의 성장 억제는 MAPK/EPK 신호전달을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 한편, 상기 암은 피부암, 소세포폐암 및 신경아세포종으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명에서 용어 "단일클론항체"란 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)에 대해서 지시되어 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 본 발명의 단일클론항체는 미분화 상태인 인간 배아줄기세포의 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하므로, 미분화된 인간 배아줄기세포의 세포표면 분자를 인식하는 단백질 분자이다.

[0013] 본 발명의 항체는 효소, 형광 물질, 방사선 물질 및 단백질 등과 접합된 것일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니며, 항체에 상기 물질을 접합하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0014] 본 발명의 암 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 희석제 등을 추가로 포함할 수 있

다. 본 발명에서 사용가능한 담체로는 단백질, 폴리펩타이드, 리포솜, 다당, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체 성 아미노산, 아미노산 공중합체 및 불활성 바이러스 입자와 같이 천천히 대사되는 거대분자를 들 수 있다. 예를 들면, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트 및 셀페이트와 같은 무기산의 염; 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트와 같은 유기산의 염과 같은 약제학적으로 허용 가능한 염; 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체; 및 수화제, 유화제 또는 pH 완충 물질과 같은 보조적 물질을 사용할 수 있다.

[0015] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제, 바람직하게는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당 업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 경구, 또는 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설 하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 이러한 목적에 적합한 제형으로는 정제, 환제, 당제 (dragee), 산제, 캡슐제, 시럽제, 용액제, 겔제, 현탁제, 에멀전, 마이크로에멀전 등의 다양한 경구투여용 제제 및 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입제, 및 하이포스프레이 (hypospray)와 같은 분무제 등과 같은 비경구투여용 제제가 바람직하다. 주사 또는 주입용 제제의 경우에는, 현탁액, 용액 또는 에멀전 등의 형태를 취할 수 있고, 현탁화제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제 화제를 포함할 수 있다. 또한, 상기 항체 분자는 사용 전에 적절한 무균 액체로 재조정하여 사용할 수 있는 건조된 형태로 제제화 될 수도 있다.

[0017] 본 발명의 조성물 또는 약학적 제제의 유효성분으로서 상기 항체는 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.01 내지 50 mg/kg 체중, 바람직하게는 0.1 내지 20 mg/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 예방 또는 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별, 약제 조합, 반응 민감성 및 치료에 대한 내성/반응 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 단일클론항체 57-C11은 미분화 인간 배아줄기세포 세포표면의 E1B-AP5 단백질을 특이적으로 인식하는 것으로 E1B-AP5를 인식하여 인간배아줄기세포 및 배아암세포의 성장을 억제하고 또한 피부암, 소세포 폐암, 신경아세포종의 세포성장을 억제하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 57-C11 항체에 의하여 인간배아줄기세포 H9의 성장이 억제되는 효과를 나타낸 것으로서, 항체의 음성대조군으로서는 비특정 생쥐 IgG (mIgG)을 사용하였고, 배양 중인 각각의 세포에 항체 10 µg/ml를 넣고 5 일 배양한 후, 세포의 성장 정도를 mIgG 대조군에 비해 백분율로 표현한 것이다. P value는 0.05이하이다.

도 2는 57-C11 항체에 의하여 인간배아줄기세포 H9의 성장이 억제되는 기전을 분석한 것으로, 인간배아줄기세포를 12시간 bFGF와 킥아웃 SR (Knockout serum replacement) 없이 배양한 후 마지막 1시간에 항체 57-C11과 생쥐 항체 IgG (mIgG)를 각각 10 µg/ml로 넣고 반응시키거나, 추가로 30분 20 ng/ml bFGF를 넣어 다시 신호전달경로를 자극한 다음, bFGF 있을 때와 없을 때, 그리고 항체 57-C11 처리한 것과 mIgG 처리한 것으로 나누어서 신호전달 경로 단백질인 AKT1/2/3, ERK1/2, GSK-3β를 분석한 것이다.

도 3은 57-C11 항체에 의하여 배아암세포 NT2/D1 세포의 성장이 억제되는 효과를 나타낸 것으로서, 항체의 음성대조군으로서는 비특정 생쥐 IgG (mIgG)을 사용하였고, 배양 중인 각각의 세포에 항체 10 µg/ml를 넣고 2일 배양한 후, 세포의 성장 정도를 mIgG 대조군에 비해 백분율로 표현한 것이다. P value는 0.05 이하이다.

도 4는 57-C11 항체에 의하여 피부암세포 A375의 성장이 억제되는 효과를 나타낸 것으로서, 항체의 음성대조군으로서는 비특정 생쥐 IgG (mIgG)을 사용하였고, 배양 중인 각각의 세포에 항체 10 µg/ml를 넣고 2 일 배양한 후, 세포의 성장 정도를 mIgG 대조군에 비해 백분율로 표현한 것이다. P value는 0.001 이하이다.

도 5는 57-C11 항체에 의하여 소세포폐암 NCI-H69의 성장이 억제되는 효과를 나타낸 것으로서, 항체의 음성대조군으로서는 비특정 생쥐 IgG (mIgG)을 사용하였고, 배양 중인 각각의 세포에 항체 10 µg/ml를 넣고 2 일 배양한 후, 세포의 성장 정도를 mIgG 대조군에 비해 백분율로 표현한 것이다. P value는 0.01 이하이다.

도 6은 57-C11 항체에 의하여 신경아세포종 SH-SY5Y의 성장이 억제되는 효과를 나타낸 것으로서, 항체의 음성대조군으로서는 비특정 생쥐 IgG (mIgG)을 사용하였고, 배양 중인 각각의 세포에 항체 10 µg/ml를 넣고 2 일 배양한 후, 세포의 성장 정도를 mIgG 대조군에 비해 백분율로 표현한 것이다. P value는 0.001 이하이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 인간 배아줄기세포의 배양

인간 배아줄기세포 H9은 위스콘신대학 연구소(Wicell Research institute)에서 구입하여 제시한 프로토콜에 따라 배양하였다. 먼저 0.1%의 젤라틴(gelatin) 용액으로 37℃에서 10분 동안 12-웰(well)의 조직배양용 플레이트(Nunc)를 코팅한 후, 3000 rad 감마 방사선을 조사한 MEF(CF1 mouse embryonic fibroblast, 세종대학교 실험동물실)를 웰당 6.5×10^4 세포수로 10% 소 태아혈청을 포함하는 DMEM 배지(WelGene, Daegu, Korea)에 접종하였다. 상기 방사선이 조사된 MEF는 성장하지는 않지만, 인간 배아줄기세포의 성장을 지지하는 세포이다. MEF 배양 24시간 후에 미국에서 구입한 인간 배아줄기세포 H9을, 제공한 프로토콜대로 37℃ 물중탕에서 서서히 녹인 다음 아래처럼 준비한 인간 배아줄기세포 배지 5ml에 부유시키고 원심 분리하여 상층액을 제거하고 새 배지에서 다시 부유시킨 다음 준비한 MEF에 접종하였다. 2차 배양을 위해서는 5일된 인간 배아줄기세포 배양 플레이트에 37℃에서 10분 동안 1mg/ml의 콜라겐 분해효소(collagenase) IV(Invitrogen, Seoul, Korea)를 처리한 후, 상기 줄기세포를 적당한 크기로 자른 후 다시 상기처럼 준비한 MEF 조직배양용 플레이트에 옮기고, 48시간 후부터 매일 배양액을 교체하며 배양하였다. 인간 배아줄기세포 배양에 사용된 배지는 DMEM/F12(WelGene, Daegu, Korea), 20%의 녹아웃SR(Knockout SR)(Invitrogen), 0.1mM의 β-머캅토에탄올(mercaptoethanol)(Sigma-Aldrich, St. Luis, MO), 2mM의 글루타민(Glutamine)(WelGene), 0.1mM의 비필수 아미노산(Non essential amino acid)(Welgene), 100U/ml의 페니실린(penicillin) G(Welgene), 100µg/ml의 스트렙토마이신(streptomycin)(Welgene), 4ng/ml의 bFGF (R&D, LaJolla, CA, USA)를 섞어 만든 배지를 사용하였다.

실제 세포 성장억제시험을 위해서 상기 H9 세포를 MEF 없는 배지로 옮겨서 배양한 후 성장 억제 실험에 사용하였다. MEF없이 H9세포를 배양하기 위해서는 먼저 MEF를 배양한 후 상기 인간배아줄기세포 배양배지를 넣고 7-10일 MEF를 배양하면서 배양액을 매일 모아서 준비한 conditioned 배지를 준비하였다. Matrigel (BD Biosciences, Seoul, Korea)로 코팅된 플레이트에 상기 배양중인 H9 세포를 떼어 접종하고 8 ng/ml bFGF (R&D)를 포함하는 conditioned 배지를 사용하여 배양하였다. 인간배아줄기세포와 유사한 외부 표면항원을 가진 인간 배아암세포인 NT2/D1, 피부암세포 A375, 신경아세포종 (Neuroblastoma) SH-SY5Y는 DMEM 배지(WelGene)에 10% 소태아혈청 (WelGene)을 사용하여 배양하였고, 소세포폐암세포 (small cell lung carcinoma) NCI-H69는 RPMI1640 배지(WelGene)에 10% 소태아혈청 (WelGene)을 사용하여 배양하였다.

실시예 2. 단일클론항체 57-C11 정제

위의 복부에 57-C11항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 찢어 넣은 후 복수액에서 분리한 것으로 구체적인 실시예는 선행 특허에 기술하였다 (류준제 외 대한민국 특허, 등록번호 제10-1078217, 등록날짜 2011.10.25).

실시예 3. 항체의 인간배아줄기세포 성장억제 실험

[0028] 57-C11항체는 미분화 인간배아줄기세포에 특이적으로 결합하였다 (Choi HS. et al., Stem Cells and Dev. 20:609-620, 2011). 따라서 인간배아줄기세포의 성장을 억제할 수 있는지 관찰하기 위해 MEF없이 배양중인 인간 배아줄기세포에 항체 57-C11과 생쥐 항체 IgG (mIgG)를 각각 10 µg/ml로 넣고 5일 동안 반응시킨 후 0.25% 트립신으로 떼어서 세포를 0.2% trypan blue(Wgene)로 염색하여 염색되지 않는 세포수를 세어 세포 성장 억제여부를 측정하였다. 결과는 57-C11첨가한 웰의 세포수를 mIgG를 첨가한 웰의 세포수를 100%로 하였을 때의 상대적인 비율로 나타내었다. 실험은 3회 이상 측정하였으며 항체 57-C11는 인간배아줄기세포 H9의 성장을 약 43% 억제하는 것이 관찰되었다(도 1).

[0029]

[0030] **실시예 4. 항체의 인간배아줄기세포에서 신호전달 기전 억제 실험**

[0031] 인간배아줄기세포는 외부로부터 세포성장과 자가 재생산을 위한 신호를 받는다 (Pera and Tam, Nature, 465:713-720, 2010). 항체 57-C11이 인간배아줄기세포 성장에서 어떻게 외부로부터 내부로 보내는 세포성장 신호전달을 억제하는지 조사하기 위해 MEF 없이 키운 인간배아줄기세포를 12시간 bFGF와 넉아웃 SR (Knockout serum replacement)없이 배양한 후 마지막 1시간에 항체 57-C11과 생쥐 항체 IgG (mIgG)를 각각 10 µg/ml로 넣고 반응시키거나, 추가로 30분 20 ng/ml bFGF를 넣어 다시 신호전달경로를 자극한 다음, bFGF 있을 때와 없을 때, 그리고 항체 57-C11 처리한 것과 mIgG 처리한 것으로 나누어서 분석하였다. 각각의 세포를 찬 PBS (pH 7.4)로 3회 세척한 후 세포 용해 완충액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2 µg/ml 아프로티닌, 100 µg/ml PMSF, 및 5µg/ml 류펩틴, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄)를 이용하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후 12,000rpm 속도로 40분간 원심분리해서 핵을 제거한 후 상층액을 샘플로 준비하였다. 추출한 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블라팅하였다. 막을 실온에서 2시간 블라킹 완충용액 (5% bovine serum albumin, 1X TBS (10mM Tris-HCl, pH 7.4 150mM NaCl), 0.1% Tween 20)을 이용하여 블로킹하였다. 0.1% TBST (1X TBS, 0.1% Tween 20)로 3번 세척한 후, 각각의 항체들을 상기 블라킹 용액에 넣고 밤새 4°C에서 반응시켰다. 사용된 항체는 다음과 같다. GSK-3α β, ERK1, Akt1/2/3, β-actin (Santa Cruz Biotechnology), phospho-ERK1/2 (threonine 202/tyrosine204), phospho-Akt (serine 473), phospho-GSK3β (serine 9) (Cell Signaling Technology). 0.1% TBST (1X TBS, 0.1% Tween 20)로 3번 세척한 후, 스트렙타비딘-호스 래디쉬 퍼옥시다제(1:4,000; GE healthcare)를 실온에서 1시간 더 반응시키고 단백질을 ECL 검출 키트(GE healthcare)로 확인하였다. β-actin의 발현양은 같은 양의 단백질을 사용하여 분석하였다는 비교 대조군으로 사용하였다. 그 결과 57-C11을 처리하면 AKT1/2/3, GSK-3β, ERK1/2 중에서 ERK1/2의 인산화 정도가 bFGF 존재시는 관찰되지않지만 bFGF 부재시는 억제되는 것이 관찰된다(도 2). 이런 결과는 세포표면 E1B-AP5는 MAPK/ERK 신호전달경로를 통해 세포성장을 촉진하고 항체 57-C11는 표면 E1B-AP5에 결합하여 이런 신호전달 경로를 방해할 수 있는 항체라는 것을 말해준다.

[0032] **실시예 5. 항체의 인간배아암세포 성장억제 실험**

[0033] 80% 정도로 건강하게 자란 인간배아암세포주 NT2/D1세포를 트립신으로 처리하여 떼어주고, 세포수를 헤모사이토미터(Hemocytometer)를 이용하여 측정하였다. 세포수를 $0.3 - 1 \times 10^4$ 개/웰로 희석하여 96-웰 플레이트에 100 µl 씩 분주한 뒤 5% CO₂, 95% air가 공급되는 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다. 그 후 57-C11항체 (10 µg/ml)를 포함하는 배지를 세포가 자라고 있는 웰의 배지를 제거한 후에 넣어주었다. 그리고 대조군 또한 배지를 제거한 후 생쥐 항체 IgG (mIgG)를 포함하는 새로운 배양배지로 바꾸고, 48 시간 더 배양하고 CCK-8 (DOJINDO)을 웰당 10 µl씩 빠르게 첨가하여 37°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 처음 1분간 잘 흔들어서 용액이 잘 섞이도록 하고 용해된 포마잔(formazan) 산물의 흡광도는 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 결과는 57-C11 대신 mIgG를 첨가한 것을 100%로 하였을 때의 상대적인 비율로 나타내었다. 실험은 3회 이상 측정하였으며 항체 57-C11는 인간배아암세포 NT2/D1 성장억제기능이 관찰되었고 성장을 약 25% 정도 억제하였다(도 3).

[0034] 실시예 6. 피부암세포 A375 성장 억제 실험

[0035] 80% 정도로 건강하게 자란 암세포 주 A375 세포를 트립신으로 처리하여 떼어주고, 세포수를 헤모사이토미터 (Hemocytometer)를 이용하여 측정하였다. 세포수를 $0.3 - 1 \times 10^4$ 개/웰로 희석하여 96-웰 플레이트에 100 μ l씩 분주한 뒤 5% CO₂, 95% air가 공급되는 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다. 그 후 57-C11항체 (10 μ g/ml)를 포함하는 배지를 세포가 자라고 있는 웰의 배지를 제거한 후에 넣어주었다. 그리고 대조군 또한 배지를 제거한 후 생쥐 항체 IgG (mIgG)를 포함하는 새로운 배양배지로 바꾸고, 48 시간 더 배양하고 CCK-8 (DOJINDO)을 웰당 10 μ l씩 빠르게 첨가하여 37℃에서 2 시간 동안 반응시켰다. 처음 1분간 잘 흔들어서 용액이 잘 섞이도록 하고 용해된 포마잔(formazan) 산물의 흡광도는 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 결과는 57-C11 대신 mIgG를 첨가한 것을 100%로 하였을 때의 상대적인 비율로 나타내었다. 실험은 3회 이상 측정하였으며 항체 57-C11는 피부암세포 A375에서 성장억제기능이 관찰되었고 피부암세포 A375의 성장을 약 30% 정도 억제하였다(도 4).

[0036] 실시예 7. 소세포폐암 NCI-H69 성장억제 실험

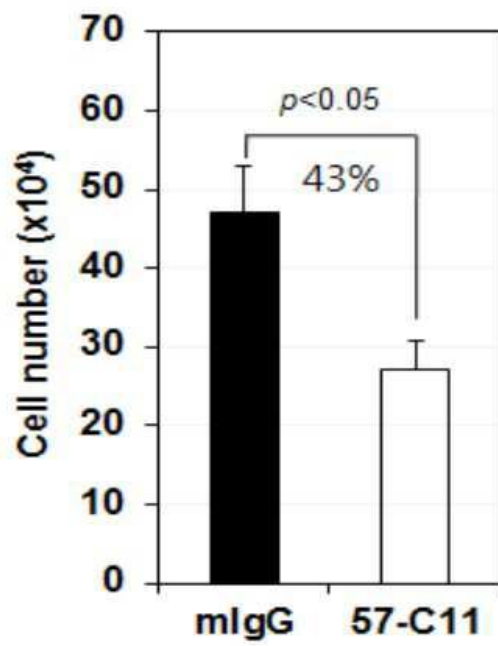
[0037] 80% 정도로 건강하게 자란 암세포주 NCI-H69 세포를 파이펫팅으로 떼어주고, 세포수를 헤모사이토미터 (Hemocytometer)를 이용하여 측정하였다. 세포수를 $1 - 3 \times 10^4$ 개/웰로 희석하여 96-웰 플레이트에 100 μ l씩 분주하였고, 5% CO₂, 95% air가 공급되는 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다. 그 후 57-C11항체 (10 μ g/ml)를 포함하는 배지를 세포가 자라고 있는 웰의 배지를 제거한 후에 넣어주었다. 그리고 대조군 또한 배지를 제거한 후 생쥐 항체 IgG (mIgG)를 포함하는 새로운 배양배지로 바꾸고, 48 시간 더 배양하고 CCK-8 (DOJINDO)을 웰당 10 μ l씩 빠르게 첨가하여 37℃에서 2 시간 동안 반응시켰다. 처음 1분간 잘 흔들어서 용액이 잘 섞이도록 하고 용해된 포마잔(formazan) 산물의 흡광도는 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 결과는 57-C11 대신 mIgG를 첨가한 것을 100%로 하였을 때의 상대적인 비율로 나타내었다. 실험은 3회 이상 측정하였으며 항체 57-C11는 소세포 폐암 (NCI-H69)의 성장억제기능이 관찰되었고 성장을 약 20% 정도 억제하였다(도 5).

[0038] 실시예 8. 신경아세포종 SH-SY5Y 성장억제 실험

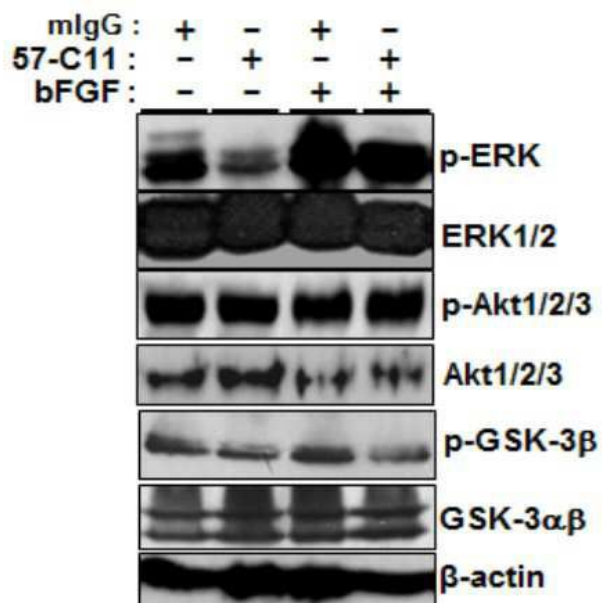
[0039] 80% 정도로 건강하게 자란 암세포 주 SH-SY5Y세포를 트립신을 처리하여 떼어주고, 세포수를 헤모사이토미터 (Hemocytometer)를 이용하여 측정하였다. 세포수를 0.5×10^4 개/웰로 희석하여 96-웰 플레이트에 100 μ l씩 분주하였고 5% CO₂, 95% air가 공급되는 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다. 그 후 57-C11항체 (10 μ g/ml)를 포함하는 배지를 세포가 자라고 있는 웰의 배지를 제거한 후에 넣어주었다. 그리고 대조군 또한 배지를 제거한 후 생쥐 항체 IgG (mIgG)를 포함하는 새로운 배양 배지로 바꾸고, 48 시간 더 배양하고 CCK-8 (DOJINDO)을 웰당 10 μ l씩 빠르게 첨가하여 37℃에서 2 시간 동안 반응시켰다. 처음 1분간 잘 흔들어서 용액이 잘 섞이도록 하고 용해된 포마잔(formazan) 산물의 흡광도는 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 결과는 57-C11 대신 mIgG를 첨가한 것을 100%로 하였을 때의 상대적인 비율로 나타내었다. 실험은 3회 이상 측정하였으며 항체 57-C11는 신경아세포종 (SH-SY5Y)의 성장억제기능이 관찰되었고 성장을 약 31% 정도 억제하였다(도 6).

도면

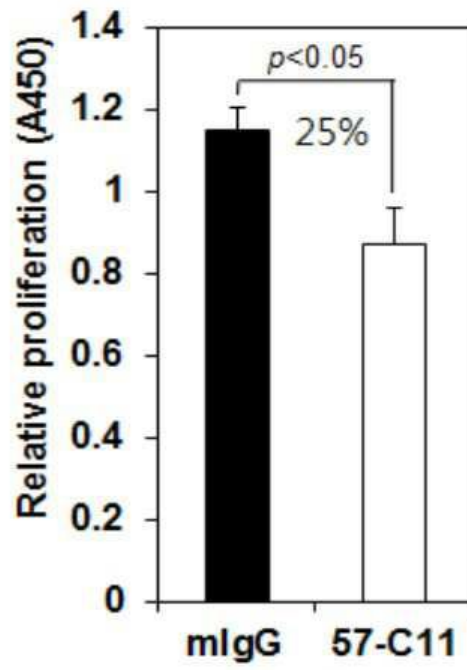
도면1



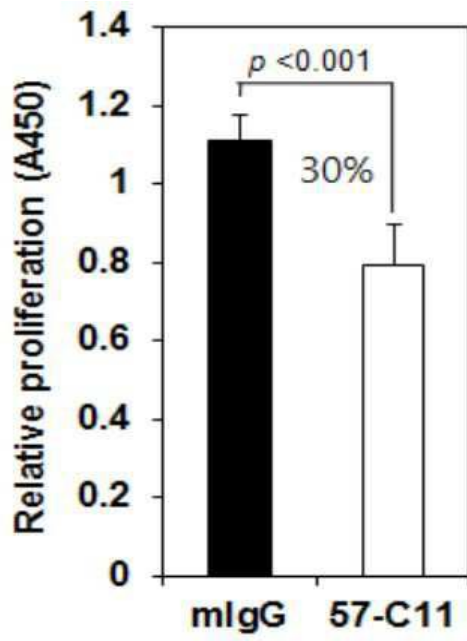
도면2



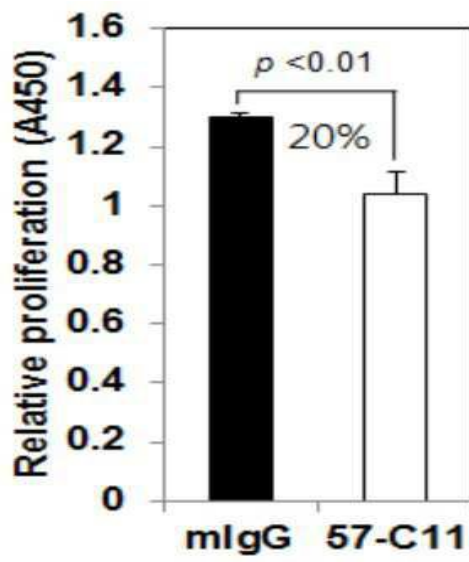
도면3



도면4



도면5



도면6

