(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0136875
(43) 공개일자 2023년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 5/26* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0034221
(22) 출원일자 2023년03월15일
심사청구일자 2023년03월15일
(30) 우선권주장
1020220034061 2022년03월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
류춘제
서울특별시 서초구 고무래로 35, 106동 3203호 (반포동, 반포리체아파트)
서효선
경기도 동두천시 강변로 160, 101동 1501호 (송내동, 송내아이파크)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리체

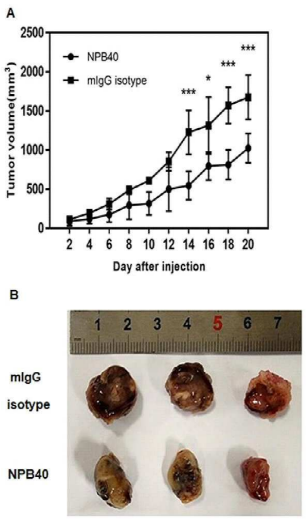
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **항 B7-H3 단일클론항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 순수인간만능줄기세포, 준인간만능줄기세포 및 인간 암세포 표면의 B7-H3에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 NPB40, 이를 생산하는 하이브리도마, 이를 이용하는 암 예방/치료용 약학 조성물, 이를 이용한 암 진단용 조성물 및 암 진단용 정보제공방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하여 B7-H3를 타겟으로 하는, 암의 예방, 치료 및 진단에 사용할 수 있는 조성물을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도24



(52) CPC특허분류
C12N 5/166 (2013.01)
G01N 33/57492 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
(72) 발명자
한산하
서울특별시 광진구 광나루로15길 7-16, 201호 (군자동)
최문주
서울특별시 중랑구 봉우재로43길 18 (상봉동)
최홍서
서울특별시 광진구 동일로54길 11-7, 204호 (군자동)
이현민
경기도 포천시 소흘읍 무림3길 16

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711127322
과제번호	2016M3A9C6918220
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	신규 전환인자 발굴을 통한 순수 인간만능줄기세포 유도 및 기전규명
기 여 율	7/10
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2016.07.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711136820
과제번호	2021R1F1A1050969
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	간암세포에서 단일클론항체를 통한 B7-H3의 치료 표적 검증
기 여 율	3/10
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1;HCDR1), 서열번호 2를 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄; 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 상보성 결정영역 1(light chain complementary determine region 1; LCDR1), 서열번호 5를 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 서열번호 7을 포함하는 중쇄(heavy chain) 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄(light chain)를 포함하는 항체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 순수인간만능줄기세포(human naïve pluripotent stem cells), 준인간만능줄기세포(human prime pluripotent stem cells) 및 인간 암세포 표면의 B7-H3에 결합하는 항체.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 항체에 접합된 항암 물질을 더 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 항암 물질은 상기 항체에 결합하는 2차 항체를 거쳐 접합된 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, NK-cell(natural killer cell), 대식세포(macrophage), 및 호중구(neutrophill)로 이루어진 군에서 적어도 하나를 더 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

청구항 4에 있어서, 상기 암은 B7-H3 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

청구항 4에 있어서, 상기 암은 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

청구항 1의 항체를 생산하는 하이브리도마.

청구항 11

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 암은 B7-H3 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암 진단용 조성물.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 암은 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암 진단용 조성물.

청구항 14

분리된 시료에 청구항 11의 조성물을 처리하여, 상기 항체가 결합된 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 시료는 혈청인 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 암은 B7-H3 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 17

청구항 14에 있어서, 상기 암은 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간 B7-H3에 특이적으로 결합하는 단일클론항체에 대한 것으로, 구체적으로는 인간 만능줄기세포와 간암을 포함하는 다양한 암세포 표면에 발현하는 B7-H3를 인식하는 단일클론항체와 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마, 상기 단일클론항체를 포함하는 진단키트 및 상기 단일클론항체를 포함하는 항암 치료용 조성

물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인간만능줄기세포(human pluripotent stem cells; hPSC)는 무제한 증식과 몸을 구성하는 모든 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 첫 번째 인간 만능줄기세포인 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cell; hESC)는 1998년 미국 James Thomson 박사팀에 의해 인간 냉동 배아에서 확립되었고, 2007년에는 일본 Shinya Yamanaka 박사팀에 의해서 유전자 도입에 의해 인간 배아줄기세포와 유사한 인간 유도만능줄기세포(human Induced Pluripotent Stem Cell; hiPSC)가 확립되었다. 2013년에는 미국 오레곤 대학 Shoukhrat Mitalipov 박사팀에 의해 난자의 핵 치환을 통한 인간 복제배아줄기세포가 만들어져서 현재 3종의 hPSC가 존재한다. 한편 Cambridge 대학의 Austin Smith 교수는 포유류의 만능줄기세포를 다시 두 세 가지 다른 상태로 분류하고 수정란이 자궁에 착상하기 전과 후로 나뉘어서 착상 전(pre-implantation epiblast) 또는 착상 후 상배엽(post-implantation epiblast)에서 각각 다른 만능줄기세포를 분리할 수 있으며, 착상 전 만능줄기세포를 순수(naive) 만능성, 그리고 착상 후를 준(primed) 만능성이라고 명명하였다. 순수 상태와 준 상태 만능줄기세포는 세포모양, 성장속도, 분화능력, 메틸화 정도, 생식선 전송(germline transmission)능력 등에서 차이가 많은데, 준 상태는 크게 편편한 상태로 자라며 성장속도가 느리나, 순수 상태는 작은 돔(dome) 모양으로 자라며 트립신으로 단일세포로 떼어도 잘 자라고, 성장속도가 빠르며, 발생단계에서 아직 편중되지 않은 상태로 더 많은 세포로 분화능력이 기대되고, 메틸화 정도가 더 낮고, 생식선 전송능력이 더 탁월한 발생 초기 만능줄기세포로 알려졌으며, 준 인간만능줄기세포에서 다양한 배양 조건에 따라 순수 인간만능줄기세포로 유도할 수 있다.

[0004] 암이 줄기세포에서 발생할 수 있다는 첫 번째 아이디어는 19세기 초이며 Durante와 Conheim에 의해 암의 "Embryonal Rest hypothesis"으로 공식적으로 제시되고, 배아 조직의 잔해가 성인 장기에 남아 있다가 암으로 발생한다고 제안하였다. 배아 발생 동안에 활발히 발현하다 성인 조직에는 최소로 존재하고 암 발생시 다시 발현되는 분자들을 oncofetal antigen이라고 부르며, Oncofetal antigen들은 현재 암의 진단이나 치료에 쓰이는 중요한 표적분자로, CA-125, CEA, AFP, cancer/testes antigen, POA등 실제 임상에서 진단 마커로 사용되고 있으며, 그 외에도 Cripto-1, Glypican-3, 5T4, M2A 등이 oncofetal antigen으로 알려졌으며, 이들을 표적하는 항체는 암 치료용 항체로 개발되고 있다. 그러나 인간 배아에 대한 윤리적 문제로 oncofetal antigen 연구가 쉽지 않았으며, 1998년에 이르러서 인간배아줄기세포가 확립되고 배양이 가능해지면서 5T4, Cripto, EpCAM등의 인간배아줄기세포 표면 oncofetal antigen이 발굴되고 있으며 이들 분자들은 암 치료용 항체의 표적 분자로 응용되고 있다. 실제로 최근 연구에서 인간배아줄기세포(hESC)나 인간유도만능줄기세포(hiPSC)등 hPSC를 면역주사한 생쥐에서 colon cancer, lung cancer, breast cancer, mesothelioma, melanoma에 대한 억제력을 확인하여 hPSC에 존재하는 oncofetal antigen을 인식하는 단일클론항체는 실제로 같은 항원을 발현하는 암세포 발생을 저지할 수 있다는 것이 증명되어 hPSC에 대한 oncofetal antigen 연구가 암줄기세포나 암세포 특이적인 분자를 발굴할 수 있음을 제시하고 있다.

[0005] B7-H3 (CD276, PD-L3)은 B7 및 CD28 패밀리의 면역 체크포인트 구성원이며 인간의 면역글로불린 가변 도메인과 면역글로불린 불변 도메인의 두 개의 동일한 쌍으로 구성된다. B7-H3은 인간 수지상 세포의 cDNA 라이브러리 데이터 베이스 검색에 의해 확인되었다. B7-H3가 T 세포 면역 자극 분자로 알려져 있지만, 축적된 증거에 따르면 B7-H3도 면역 억제 기능을 가지고 있어 T 세포에서 방출되는 인터페론과 자연 살해자의 세포 독성 활성을 감소시킨다. B7-H3의 전사체는 대부분의 정상 조직 및 고형 종양에서 같이 발현되지만, 단백질은 폐, 간, 백혈병, 결장, 직장, 위, 유방, 신장, 위, 신경교종, 난소, 췌장등 종양에서만 높게 발현된다. B7-H3 발현은 또한 종양 관련 혈관계 및 기질에서도 발견된다. B7-H3의 과발현은 유방암, 난소암, 폐암, 간암 및 위암을 포함한 많은 암에서 진행성 종양과 더 짧은 전체 생존과 밀접한 상관관계가 있다. 실제로 TCGA database에서 Kaplan-Meier 생존 분석 결과 간암, 유방암, 난소암, 폐암, 위암에서 B7-H3 과발현 시 생존율이 현저히 감소하며, 암 초기에는 발현하지 않더라도 말기 암에 이르면 과발현하는 특징으로 말기 암 치료 표적으로 가치가 높으며, 최근에는 squamous cell carcinoma과 pancreatic cancer stem cell 암줄기세포 마커로 제시되어 있다. 또한 많은 연구들은 B7-H3가 면역회피 역할을 넘어 항-세포사멸, 증식 촉진, 혈관 신생 및 종양 미세 환경의 매개를 통해 종양 형성을 촉진한다고 제안한다. 따라서 B7-H3는 다양한 암종에서 면역치료 요법의 매력적인 표적으로 간주된다. 실제로, TNBC, 난소암, 췌장암, NSCLC, 교모세포종, 흑색종 등을 포함한 많은 진행성 암에서 B7-H3를 표적으로 하는 항체 기반 치료제 및 CAR-T 세포치료제가 개발되고 있다. 그러나 B7-H3에 대한 수용체나 리간드가 아직 규명되지 않았기 때문에 암 면역 회피 기전에서 B7-H3에 의한 암 진행에 대한 명확한 기전적 그림을 그리는 것은

여전히 어려운 상태이다.

[0006] 우리는 순수 인간 만능줄기세포를 생쥐에 주사하여 제조한 단일클론항체군중에서 순수인간만능줄기세포와 준 인간 만능줄기세포에 동시에 결합하는 항체 NPB40를 제조하였다. NPB40항원은 정상세포인 말초혈액단핵구나 간세포에는 거의 발현하지 않지만 간암세포를 비롯하여 배아암, 췌장암, 대장암, 골육종, 흑색종, 폐암, 신경모세포종 세포에서 높게 발현하였다. NPB40항원을 분석한 결과 B7-H3였으며, B7-H3를 인식하는 NPB40항체는 인간만능줄기세포와 암세포에서 동시에 발현하는 Oncofetal epitope를 인식하는 새로운 항체로 암치료용 항체로 개발할 수 있을 것이라고 가정하였다. 실제로 인간 간암세포를 이식한 간암 생쥐모델에서 NPB40의 주사는 효과적인 항암효과를 보여 주였다. 따라서 NPB40은 간암을 포함하는 암치료용 항체로 개발될 수 있는 항체임을 확인하여 이 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2235935호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 인간 순수 만능줄기세포, 인간 준 만능줄기세포 및 암세포 표면에 발현하는 B7-H3 단백질을 인식하는 단일클론항체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 상기 단일클론항체의 기능을 활용한 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 암 진단용 조성물 및 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 1. 서열번호 1을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1;HCDR1), 서열번호 2를 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄; 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 상보성 결정영역 1(light chain complementary determine region 1; LCDR1), 서열번호 5를 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체.

[0014] 2. 위 1에 있어서, 서열번호 7을 포함하는 중쇄(heavy chain) 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄(light chain)를 포함하는 항체.

[0015] 3. 위 1에 있어서, 상기 항체는 순수인간만능줄기세포(human naïve pluripotent stem cells), 준인간만능줄기세포(human prime pluripotent stem cells) 및 인간 암세포 표면의 B7-H3에 결합하는 항체.

[0016] 4. 위 1 내지 3 중 어느 하나의 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0017] 5. 위 4에 있어서, 상기 항체에 접합된 항암 물질을 더 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0018] 6. 위 5에 있어서, 상기 항암 물질은 상기 항체에 결합하는 2차 항체를 거쳐 접합된 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0019] 7. 위 4에 있어서, NK-cell(natural killer cell), 대식세포(macrophage), 및 호중구(neutrophill)로 이루어진 군에서 적어도 하나를 더 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0020] 8. 위 4에 있어서, 상기 암은 B7-H3 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0021] 9. 위 4에 있어서, 상기 암은 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0022] 10. 상기 1의 항체를 생산하는 하이브리도마.

[0023] 11. 위 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 암 진단용 조성물.

[0024] 12. 위 11에 있어서, 상기 암은 B7-H3 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암 진단용 조성물.

[0025] 13. 위 11에 있어서, 상기 암은 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암 진단용 조성물.

[0026] 14. 분리된 시료에 위 11의 조성물을 처리하여, 상기 항체가 결합된 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

[0027] 15. 위 14에 있어서, 상기 시료는 혈청인 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

[0028] 16. 위 14에 있어서, 상기 암은 B7-H3 단백질을 세포막에 발현하는 암세포 유래 암인 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

[0029] 17. 위 14에 있어서, 상기 암은 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택되는 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 단일클론항체는 인간 순수 만능줄기세포, 인간 준 만능줄기세포 및 암세포 표면에 발현하는 B7-H3 단백질을 인식할 수 있다. 이는 바람직하게 암 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 암 진단용 조성물 등에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1A는 인간만능줄기세포(hPSC)인 H9세포를 준 인간만능줄기세포(primed H9) 배지와 순수 인간만능줄기세포(naive H9)로 유도하는 배지에서 배양한 것으로 순수 인간만능줄기세포 배지에서는 작은 돔(dome) 모양의 순수 H9 세포의 모양을 볼 수 있다. 도 1B와 1C는 FACS 분석을 통하여 준 인간만능줄기세포 마커인 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24, 및 CD90와 순수 인간만능줄기세포 마커인 CD7, CD77, 및 CD130 발현을 나타낸 그림으로, 전환된 순수 인간만능줄기세포(H9-2iL/X/F/P) 에서는 CD90을 제외한 모든 준 만능줄기세포 마커 발현이 감소하고 순수 인간만능줄기세포 마커로 알려진 CD7과 CD77은 발현이 증가함을 보여주는 그림이다. 실선은 각 단일클론항체이고, 회색바탕은 2차 항체만 포함한 것이다.

도 2는 naive hPSC와 primed hPSC에서 RNA-seq 방법으로 naive hPSC 연관 31개 유전자 발현 분석한 그림으로 naive hPSC에서 15개 naive hPSC 연관 유전자 발현이 증가한 것을 보여주는 것이다.

도 3는 FACS 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 NPB40가 준 인간만능줄기세포(primed H9)과 순수 인간만능줄기세포(naive H9)에 결합하고 인간 배아암종세포인 2102EP, NT-2에는 결합하지만 생쥐 배아섬유아세포(MEF)와 인간 말초혈액 단핵구 세포(PBMC) 에는 결합하지 않음을 보여준다. 이때, 실선은 단일클론항체 NPB40이고 빨간 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이다.

도 4A는 플로우 사이토미트리(flow cytometry) 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 NPB40이 각종 세포주 또는 일차 세포(primary cell)에 결합하는 정도를 보여주는 그림으로, 실선은 단일클론항체이고 빨간색 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이다. 단일클론항체 NPB40은 정상 인간 간세포 (hepatocyte)에는 약하게 결합하지만 4종의 인간 간암세포 Huh7, HepG2, SNU-387, SNU-449에 강하게 결합하는 것을 보여준다.

또한 NPB40은 3종의 인간 췌장암 세포 BxPC-3, PANC-1, SNU-213, 2종의 인간 대장암 세포 Colo-205, HCT-116, 2종의 인간 골육종 세포 U2-OS, Saos-2, 인간 피부암세포 A375, 인간 폐암세포 A549, 인간 신경모세포종 SH-SY5Y등 많은 암세포에 잘 결합하는 것을 보여준다. 도 4B는 세포면역화학염색법을 통해 단일클론항체 NPB40으로 2102Ep 인간 배아암세포, Huh7과 SNU-449 인간 간암세포의 세포 표면을 염색한 것으로, 단일클론항체 NPB40이

암세포의 세포 표면 단백질을 인식함을 보여준다.

도 5A는 세포 표면을 바이오틴(biotin)으로 표지 한 NT2/D1 인간 배아암줄기세포의 용출액에서 단일클론항체 NPB40을 사용하여 면역 침강시킨 단백질을 10% SDS-PAGE를 통해 분리하고 웨스턴 블라팅으로 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮긴 후, 스트렙타비딘-HRP(SA-HRP)로 분석한 그림으로 항체를 넣지 않고 동일 실험을 진행한 것을 음성 대조군(No Ab)으로 한 것이다. 화살표는 NPB40에 의해 면역침강된 단백질을 표시한다. 도 5B는 도 5A와 동일하게 면역 침강을 수행하고 10% SDS-PAGE를 통해 분리한 후, 폴리아크릴아마이드 젤을 PageBlue로 염색한 것이다. 빨간 상자 내부의 단백질을 오려내서 LC-MS/MS를 수행하였다. 도 5C는 도 5B에서 단일클론항체 NPB40로 면역 침강한 후 회수한 단백질을 LC-MS/MS로 분석한 결과로, NPB40 항원의 아미노산 서열이 B7-H3 단백질의 아미노산 서열과 일치하며 일치하는 부분을 빨간색으로 표시한 그림이다.

도 6A는 단일클론항체 NPB40이 인식하는 항원이 B7-H3인지 확인하기 위해 NT2/D1 인간 배아암세포 표면을 바이오틴-표지 한 후에 세포 용출액에서 단일클론항체 NPB40과 공지의 토끼 항-B7-H3 다클론항체(α-B7-H3)로 면역 침강한 단백질을 웨스턴 블랏팅 및 스트렙타비딘-HRP(SA-HRP) 반응을 통해 검출한 그림이다. 도 6B는 NT2/D1 인간 배아암세포의 세포 용출액에서 단일클론항체 NPB40과 공지의 토끼 항-B7-H3 다클론항체로 면역 침강한 단백질과 세포 용출액(whole lysate)를 웨스턴 블랏팅을 통해 분석하고 토끼 항-B7-H3 다클론항체를 반응시켜 검출한 것이다. 도 6C와 도 6D는 단일클론항체 NPB40의 항원이 B7-H3인지 재확인하기 위해 B7-H3를 과발현시킨 인간 배아 신장세포 HEK293T의 세포 용출액을 공지의 생쥐 항-His 단일클론항체, 토끼 항-B7-H3 다클론항체 및 단일클론항체 NPB40으로 면역 침강한 후, 웨스턴 블랏팅 하여 생쥐 항-His 단일클론항체 또는 토끼 항-B7-H3 다클론항체 반응을 통해 검출한 것이다.

도 7A는 간암세포주 Huh7, HepG2, SNU387, SNU449에서 B7-H3 Knockdown 실험을 수행한 것으로 음성 대조군 siRNA(siCon) 또는 B7-H3에 대한 siRNA(siB7-H3)를 간암세포에 트랜스펙션 한 후 회수한 세포 용출액에서 B7-H3 단백질의 발현을 분석하기 위해 웨스턴 블라팅을 수행한 것으로 GAPDH 단백질 발현을 대조군으로 사용하여 분석한 것이다. 도 7B와 7C는 도 7A처럼 B7-H3 녹다운(Knockdown)을 수행하고 회수한 간암세포를 플로우 사이토미트리 분석을 통해서 분석하여 공지의 토끼 항-B7-H3 다클론항체(α-B7-H3)가 결합하는 정도를 보여주는 것이다. 도 7B의 실선 및 점선은 단일클론항체이고 빨간색 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이며, 도 7C는 도 7B의 실험을 3회 이상 반복하여 평균 형광 세기를 통계적으로 나타낸 그래프이다. 도 7D와 7E는 도 7A처럼 B7-H3 녹다운(knockdown)을 수행하고 회수한 간암세포를 플로우 사이토미트리 분석을 통해서 분석하여 본 발명의 단일클론항체 NPB40가 결합 정도를 보여주는 그림이다. 도 7D의 실선 및 점선은 단일클론항체이고 빨간색 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이며, 도 7E는 도 7D의 실험을 3회 이상 반복하여 평균 형광 세기를 통계적으로 나타낸 그래프이다. 상기 도 7에서 ***는 p value<0.005를 나타낸다.

도 8A는 도 7A처럼 B7-H3 녹다운(Knockdown)을 수행하고 회수한 음성 대조군 siRNA(siCon) 또는 B7-H3에 대한 siRNA(siB7-H3)를 처리한 간암세포를 젤라틴이 코팅된 6-well 세포배양 플레이트에 반응시켜서 부착 정도를 분석한 그림으로 부착한 간암세포를 크리스탈 바이올릿으로 염색한 사진이다. 도 8B는 Huh7 간암세포주에서 도 8A과 동일한 실험을 수행한 후 0.1% SDS로 세포를 용출하여 OD_{570nm}에서 흡광도를 3회 반복측정하여 통계 처리한 것이다. 도 8C는 HepG2 간암세포주에서 도 8A과 동일한 실험을 수행한 후 0.1% SDS로 세포를 용출하여 OD_{570nm}에서 흡광도를 3회 반복 측정하여 통계 처리한 그림이다. 도 8D와 8E는 도 8A처럼 음성 대조군 siRNA(siCon) 또는 B7-H3에 대한 siRNA(siB7-H3)를 처리하여 B7-H3 녹다운(Knockdown)을 수행한 한 간암세포 Huh7에서 플로우 사이토미트리를 통해 세포부착 단백질들인 E-Cadherin, Integrin-α2, integrin-αV의 발현을 분석한 그림으로 도 8E는 도 8D실험을 3회 반복처리하여 통계 처리한 그림이다. 도 8F와 8G는 도 8A처럼 음성 대조군 siRNA(siCon) 또는 B7-H3에 대한 siRNA(siB7-H3)를 처리하여 B7-H3 녹다운(Knockdown)을 수행한 한 간암세포 HepG2를 플로우 사이토미트리를 통해 세포부착 단백질들인 E-Cadherin, Integrin-α2, integrin-αV의 발현을 분석한 그림으로 도 8G는 도8F 실험을 3회 반복 처리하여 통계 처리한 그림이다. 도 8에서 각각 ***는 p value<0.005를 나타내고, **는 p value<0.01, *는 p value <0.05를 의미한다.

도 9A는 도 8A처럼 음성 대조군 siRNA(siCon) 또는 B7-H3에 대한 siRNA(siB7-H3)를 처리하여 B7-H3 녹다운(Knockdown)을 수행한 한 간암세포 Huh7 세포를 단일세포화 하여 6-well 플레이트에 접종하여 2주간 배양하여 형성된 콜로니를 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색한 사진으로 그래프는 동일실험을 3회 반복하여 콜로니의 수를 분석하여 콜로니 형성 능력을 통계적으로 비교한 그래프이다. 도 9B는 도 8A처럼 음성 대조군 siRNA(siCon) 또는 B7-H3에 대한 siRNA(siB7-H3)를 처리하여 B7-H3 녹다운(Knockdown)을 수행한 한 간암세포 HepG2 세포를 단일세포화 하여 6-well 플레이트에 접종하여 2주간 배양하여 형성된 콜로니를 크리스탈 바이올렛 용액으로 염

색한 사진으로 그래프는 동일 실험을 3회 반복하여 콜로니의 수를 분석하여 콜로니 형성 능력을 통계적으로 비교한 그래프이다. 도 9에서 ***는 p value<0.005를 나타낸다.

도 10A와 10B는 바이오틴화 된 NPB40 항체를 이용하여 분리한 B7-H3-high와 B7-H3-low로 분리한 HepG2 세포를 PE 접합 SA와 FACSCalibur로 분석한 결과로 도 10B는 동일 실험을 3회 반복하여 통계적으로 비교한 그래프이다. 도 10C와 10D는 도 10A에서 NPB40 항체를 이용하여 분리한 HepG2 세포를 2주간 6웰 프레이트에서 배양하여 형성된 콜로니를 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색한 사진이고 도 10D는 콜로니의 수를 분석하여 콜로니 형성 능력을 통계적으로 비교한 그래프이다. 도 10에서 각각 ***는 p value<0.005를 나타내고, **는 p value<0.01를 나타낸다.

도 11A와 11B는 플로우 사이토미트리를 통해 단일클론항체 NPB40이 인간배아암세포 NT2/D1, 간암세포 Huh7, HepG2, SNU449와 인간 췌장암세포 BxPC-3, PANC-1, SNU-213에 내부화되는 것을 분석한 것이다. 도 11A에서 실선은 4℃에서 반응한 단일클론항체 NPB40, 점선은 4℃에서의 반응 후 37℃에서 반응한 단일클론항체 NPB40이며 빨간색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 도 11B는 도 11A 동일한 실험을 3회 반복하여 각 암세포의 세포표면에서 NPB40의 부착 정도를 상대적인 평균 형광세기로 통계적으로 처리하여 비교한 그림이다. **는 p value <0.01, ***는 p value <0.005를 나타낸다.

도 12A와 12B는 각각 단일클론항체 NPB40 중쇄와 경쇄 유전자 가변영역에 해당하는 DNA 절편을 중합효소연쇄반응을 통해 증폭한 DNA를 보여주는 그림이다. 도 12C와 12D는 각각 단일클론항체 NPB40 중쇄와 경쇄 유전자 가변영역을 pBluescript-KS(+) 벡터에 클로닝한 것이며, 도 12C에서는 중쇄 DNA를 각각 EcoRI과 SalI, 도 12D에서는 경쇄 DNA를 HindIII와 SalI을 처리해 pBluescript-KS(+) 벡터에 클로닝된 중쇄와 경쇄 유전자 가변영역을 확인한 것이다.

도 13은 단일클론항체 NPB40 중쇄 유전자 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)를 진한 글씨로 표시한 그림이다.

도 14는 단일클론항체 NPB40 경쇄 유전자 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)를 진한 글씨로 표시한 그림이다.

도 15는 NPB40항체를 인간 IgG1을 포함하는 키메라 항체로 제조하기 위해 유전자를 융합하는 과정으로 아가로오스 젤 전기영동 사진을 보여준다. 도 15A는 중쇄 신호펩타이드와 NPB40 중쇄 가변영역을 재조합PCR로 융합하는 그림이고 도 15B는 인간 IgG1 불변영역을 포함하고 있는 pdCMV-dhfr벡터에 EcoRI과 ApaI으로 절단하여 클로닝하는 과정을 보여주는 것이다. 도 15C는 경쇄 신호펩타이드와 NPB40 경쇄 가변영역을 재조합 PCR로 융합하는 그림이고 도 15D는 인간 카파 불변영역을 포함하고 있는 pdCMV-dhfr벡터에 HindIII와 BsiWI으로 절단하여 클로닝하는 과정을 보여주는 것이다.

도 16는 신호서열을 포함하는 생쥐-인간 키메라 NPB40 항체(Chi-NPB40)의 중쇄 가변영역의 아미노산 서열(파란색)과 불변영역(빨간색)을 표시한 것으로, 신호펩타이드 서열(검은색), 항원과 결합하는 CDR 아미노산의 잔기 위치는 밑줄로 표시한 것이다.

도 17은 신호서열을 포함하는 생쥐-인간 키메라 NPB40 항체(Chi-NPB40)의 경쇄 가변영역의 아미노산 서열(파란색)과 불변영역(빨간색)을 표시한 것으로, 신호펩타이드 서열(검은색), 항원과 결합하는 CDR 아미노산의 잔기 위치는 밑줄로 표시한 것이다.

도 18A는 본 발명의 생쥐 유래 NPB40 항체, 키메라 항체를 대상으로 SDS-PAGE 및 코마시 블루 염색을 수행한 결과를 나타낸 것이다. 도 18B는 상기 항체를 대상으로 웨스턴 블랏팅을 수행한 결과를 나타낸 것으로, 2차 항체는 인간 항체의 IgG 감마 사슬과 카파 사슬에 결합하는 것을 이용하였다.

도 19는 플로우 사이토미트리를 통해 Chi-NPB40 항체가 인간 간암세포인 Huh7과 SNU-449에 내부화되는 것을 분석한 그림이다. 빨간색 바탕은 4℃에서 반응한 키메라 항체 Chi-NPB40을, 흰색 바탕은 4℃에서의 반응 후 37℃에서 반응한 키메라 항체 Chi-NPB40를 나타내며 회색 바탕은 2차 항체만 포함한 것을 나타낸다.

도 20A와 20B는 NPB40 또는 Chi-NPB40 처리된 Huh7 세포의 세포 생존율을 측정한 것으로 Huh7 세포를 0nM 내지 100nM NPB40 또는 Chi-NPB40를 처리하고 12.7nM의 α-HFc-CL-DMDM로 48시간 동안 처리한 후 분석한 것이다. 도 20A는 세포 사진이고 도 20B는 세포 생존율은 CCK-8을 이용하여 측정한 것이다. 눈금 막대는 100㎛이다. 도 20C와 20D는 NPB40 또는 Chi-NPB40 처리된 Huh7 세포의 세포 생존율을 측정한 것으로 Huh7 세포를 0nM 내지 100nM NPB40 또는 Chi-NPB40를 처리하고 12.7nM의 α-HFc-CL-MMAF로 48시간 동안 처리한 후 분석한 것이다. 도

20C는 세포 사진이고 도 20D는 세포 생존율은 CCK-8을 이용하여 측정한 것이다. 눈금 막대는 100㎛이다. 도 20에서 *는 p value <0.05, **는 p value <0.01, ***는 p value <0.005를 나타낸다

도 21A와 21B는 NPB40 또는 Chi-NPB40 처리된 HepG2 세포의 세포 생존율을 측정한 것으로 HepG2 세포를 0nM 내지 250nM NPB40 또는 Chi-NPB40를 처리하고 12.7nM의 α-HFc-CL-DMDM로 48시간 동안 처리한 후 분석한 것이다. 도 21A는 세포 사진이고 도 21B는 세포 생존율은 CCK-8을 이용하여 측정한 것이다. 눈금 막대는 100㎛이다. 도 21C와 21D는 NPB40 또는 Chi-NPB40 처리된 HepG2 세포의 세포 생존율을 측정한 것으로 HepG2 세포를 0nM 내지 250nM NPB40 또는 Chi-NPB40를 처리하고 12.7nM의 α-HFc-CL-MMAF로 48시간 동안 처리한 후 분석한 것이다. 도 21C는 세포 사진이고 도 21D는 세포 생존율은 CCK-8을 이용하여 측정한 것이다. 눈금 막대는 100㎛이다. 도 21에서 *는 p value <0.05, **는 p value <0.01, ***는 p value <0.005를 나타낸다.

도 22A와 22B는 NPB40 또는 Chi-NPB40 처리된 SNU-449 세포의 세포 생존율을 측정한 것으로 SNU-449 세포를 0nM 내지 250nM NPB40 또는 Chi-NPB40를 처리하고 12.7nM의 α-HFc-CL-MMAF로 48시간 동안 처리한 후 분석한 것이다. 도 22A는 세포 사진이고 도 22B는 세포 생존율은 CCK-8을 이용하여 측정한 것이다. 눈금 막대는 100㎛이다. 도 22에서 *는 p value <0.05, ***는 p value <0.005를 나타낸다

도 23는 Chi-NPB40의 ADCC 기능을 확인한 것으로, 간암 세포인 Huh7 세포에서 Chi-NPB40과 대응하는 인간 IgG isotype 항체를 0.01㎍/ml에서 100㎍/ml농도까지 처리한 후 ADCC core kit(Promega)을 이용해 포함된 Jurkat effector세포에서 나타나는 ADCC반응을 luminescence를 관찰하는 것으로 측정한 것이다. 도 23에서 *는 p value <0.05, ***는 p value <0.005를 나타낸다.

도 24A는 간암 세포인 Huh7 세포를 이종 이식한 누드마우스에서 각각 생쥐 IgG isotype 항체와 NPB40을 투여하며 암의 성장을 관찰한 것으로, 각 항체는 2일에 한번 정맥을 통해 10mg/kg 용량으로 투여했으며 실험군 및 대조군 각각 3마리의 암 이종 이식 모델을 이용해 통계 처리했다. 도 24A에서 *는 p value <0.05를 나타내고 ***는 p value <0.005를 나타낸다. 도 24B는 도 24A의 최종 시점인 약물 투여 시작 20일 후 희생시킨 쥐에서 얻은 암 덩어리의 크기를 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하 본 발명을 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적인 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 의미를 따른다.

[0036] 본 발명은 서열번호 1을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1;HCDR1), 서열번호 2를 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄; 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 상보성 결정영역 1(light chain complementary determine region 1; LCDR1), 서열번호 5를 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체에 관한 것이다.

[0038] 본 발명의 단일클론항체는 순수인간만능줄기세포, 준인간만능줄기세포 및 암세포의 B7-H3 단백질에 결합할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 상기 순수 인간만능줄기세포(naive human pluripotent stem cell)는 착상 전의 인간만능줄기세포를 의미하는 것으로, naive 또는 ground 상태의 만능성을 가진다고 말한다. 착상 후의 인간만능줄기세포는 준(primed) 상태의 만능성을 가지는 준 인간만능줄기세포(primed human pluripotent stem cell)를 의미한다. 상기 순수 인간만능줄기세포는 도 1A에서 보듯, 작은 돔 모양으로 개별 세포들이 분리되어 성장한다는 측면에서 콜로니와 유사한 형태로 성장하는 준만능줄기세포와 구별된다. 순수 인간만능줄기세포를 좀 더 세분할 경우 상기 ground 상태의 줄기세포, 그리고 중간 단계인 intermediate, formative 또는 naive-like 상태의 순수 만능성을 가지는 줄기세포로 나눠질 수 있다.

[0040] 상기 암세포는 B7-H3를 세포 표면에 발현하는 암세포라면 제한 없이 본 발명의 암세포에 해당한다. 예를 들면, 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 인간배아암, 신경모세포종, 자궁암, 신장암, 전립선암, 유방암, 대장암, 위암, 담도암, 신장암, 방광암, 난소암, 뇌종양 등이 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 간암세포인 Huh7, HepG2, SNU-387, SNU-449, 인간 췌장암세포인 BxPC-3, PANC-1, SNU-213, 인간 대장암세포인 Colo-205, HCT-

116, 인간 골육종 세포인 U2OS, Saos2, 인간 피부암세포인 A375, 인간 폐암세포인 A549 및 인간 신경모세포종인 SH-SY5Y에 본 발명의 항체를 처리하고 플로우 사이토미트리(flow cytometry) 분석을 수행하였을 때, 본 발명의 항체가 상기 세포주에 강하게 결합하는 것을 확인하였다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명의 항체는 상기 서열번호 1 내지3의 HCDR 및 서열번호 4 내지 6의 LCDR 서열을 갖는 것이라면 그 중쇄 및 경쇄서열은 한정되지 않는다. 예를 들면 서열번호 7을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 상기 서열번호 7은 도 16에 나타낸 중쇄 가변부 서열을 의미하는 것이고, 상기 서열번호 8은 도 17에 나타낸 경쇄 가변부 서열을 나타낸다.

[0044] 서열번호 1 내지 8은 표 1에 나타낸 것과 같다.

표 1

[0046]

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

[0047] 본 발명에서 항체는 구체적으로 단일클론항체를 의미하는 것일 수 있고, 본 발명에서 단일클론항체란 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)에 대해서 지시되어 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 본 발명의 단일클론항체는 순수 인간만능줄기세포, 준인간만능줄기세포 및 암세포의 세포 표면 분자인 B7-H3에 특이적으로 결합하므로, 순수인간만능줄기세포, 준인간만능줄기세포 및 암세포의 세포 표면 분자를 인식하는 단백질 분자이다.

[0048] 항원의 특정 에피토프를 인식하여 항원-항체 복합체를 형성하는 항체의 주요 부위는 중쇄 및 경쇄의 가변 영역, 특히 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)이 이러한 복합체 형성에 기여하므로, 본 발명은 상기한 본 발명의 단일클론항체의 가변 영역, 특히 CDR을 포함하는 이의 키메릭 항체, 인간화 항체 등을 본 발명의 범위에 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 일 실시예에서 서열번호 9의 중쇄 서열, 서열번호 10의 경쇄 서열을 가지는 마우스-인간 키메라 항체(Chi-NPB40)을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 단일클론항체의 가변 영역, 특히 CDR이 동일한 이상, IgG_1 내지 IgG_4의 IgG 서브클래스(subclass) 등도 본 발명의 범위에 포함된다. 또한, 본 발명은 상기한 바와 같은 결합 특성을 갖는 한, 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편들을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')2 및 Fv 등이 있다.

[0050] 본 발명은 상기 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0051] 상기 암은 B7-H3를 세포 표면에 발현하는 암세포에 의하여 발생하는 암이라면 관계없이 상기 조성물을 예방 또

는 치료 용도로서 사용할 수 있다. 예를 들면, 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 인간배아암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암, 대장암, 위암, 담도암, 신장암, 방광암, 난소암, 뇌종양 등이 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간배아암세포 NT2/D1, 간암 세포인 Huh7, HepG2, SNU449 세포주 및 췌장암 세포인 BxPC-3, PANC-1, SNU-213 세포주에 대해서 본 발명의 조성물을 처리하였을 때 항암 효과가 있는 것을 확인하였다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 상기 암의 예방 및 치료 용도는 항체 의존적 세포 매개 세포 독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity; 이하 ADCC) 기전에 의하는 것일 수도 있다. ADCC는 종양이나 바이러스 항원에 항체가 부착되면 Fc 감마 수용체(F_c gamma receptor; $F_c\gamma R$)을 발현하는 면역세포들에 의하여 매개되는 것으로, 항체가 부착된 세포를 인식하여 면역반응을 일으켜 항원을 제거한다. 예를 들면, 대식세포(macrophage)와 호중구(neutrophil)의 경우, Fc 영역을 인식하여 식세포작용(phagocytosis)을 통해 항원을 발현하는 세포를 제거하고, NK cell(natural killer cell)은 Fc 영역을 인식하여 그랜자임(granzyme)을 분비하여 항원을 발현하는 세포를 제거한다. 본 발명의 상기 약학 조성물은 앞서 언급한대로, B7-H3을 발현하는 암세포와 특이적으로 결합할 수 있어, IgG1의 형태로 제조한 항체를 조성물에 포함하여 처리 시 상기 ADCC 기전에 의하여 항체와 결합한 B7-H3 양성 암세포를 사멸시켜 암의 예방 및 치료 효과를 보일 수도 있다.

[0053] 상기 암의 예방 및 치료 용도는 면역 체크포인트 억제제 치료(immune checkpoint inhibitor therapy; 이하 ICI therapy) 기전에 의하는 것일 수도 있다. 암세포는 면역기능을 억제하거나 T 세포 면역관용(immunotolerance) 또는 면역편집(immune-editing) 등의 기전을 통해 면역세포에 의한 암세포 제거 기전을 회피한다. ICI는 회피기전 중 하나로서, 암세포 파괴를 방해하는 단백질을 세포 표면에 발현하여, 억제 면역체크포인트를 활성화시켜 면역세포의 공격을 회피한다. ICI therapy는 이러한 억제 면역체크포인트를 활성화시키는 단백질과 결합하는 항체가 해당 단백질의 기능을 억제함으로써, 면역세포에 의한 암세포 사멸 기전을 활성화하는 원리의 치료방법에 해당한다. 본 발명의 상기 약학 조성물은 앞서 언급한대로, 억제 면역체크포인트의 기능을 수행하는 B7-H3에 대해 특이적으로 결합할 수 있으므로, 상기 항체의 CDR을 포함하는 IgG4를 처리시, 항체 NK cell, 대식세포 및 호중구에 의한 암세포 사멸을 유도할 수도 있다.

[0054] 본 발명에서 상기 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 항체와 항암 물질을 접합한 것일 수 있고, 접합은 링커(linker) 서열 또는 항체에 결합하는 2차 항체(secondary antibody)에 의하여 이루어질 수도 있다.

[0055] 본 발명에서 상기 2차 항체는 항원에 결합하는 다른 항체(1차 항체)의 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하는 것으로, 표적 항원에 직접 결합하는 1차 항체와는 결합하는 대상에 차이가 있는 용어에 해당한다. 본 발명에서 링커 서열은 항암물질과 항체를 연결하기 위하여 사용되는 것으로, 예를 들면 링커 서열을 상기 항체의 Fc 서열에 부착하고, 링커 서열과 항암물질을 연결하여 항체-링커-항암물질(antibody-linker-drug) 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 상기 링커 또는 상기 2차 항체는 모두 본 발명의 상기 항체와 항암 물질을 결합시키기 위한 용도로 사용하는 것으로, 항체와 약물을 접합시키기 위한 용도라면 2차 항체 서열 또는 링커 서열과 무관하게 당업자가 사용하는 방식에 의하여 사용이 가능하다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 IgG Fc 부위에 특이적으로 결합하는 항체에 듀오카마이신(duocamycin)이 접합된 α-HFc-CL-DMDM(AH-102DD, Moradec, 미국)과, auristatin이 접합된 α-HFc-CL-MMAF(AH-102AF, Moradec) 항체를 이용하였다.

[0056] 본 발명에서 상기 항암 물질은 당 분야에 공지된 항암 물질이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면, 엘로티닙(TARCEVA(TM), Genentech/OSI Pharm.), 보르테조밉(VELCADE(TM), Millenium Pharm.), 풀베스트란트(FASLODEX(TM), Astrazeneca), 수텐트(SU1 1248, Pfizer), 레트로졸(FEMARA(TM), Novartis), 이마티닙 메실레이트(GLEEVEC(TM), Novartis), PTK787/ZK 222584(Novartis), 옥살리플라틴(Eloxatin(TM), Sanofi), 5-FU(5-플루오로우라실), 류코보린, 라파마이신(Sirolimus, RAPAMUNE(TM), Wyeth), 라파티닙(GSK572016, GlaxoSmithKline), 로나파르닙(SCH 66336), 소라페닙(BAY43-9006, Bayer Labs.), 및 게피티닙(IRESSA(TM), Astrazeneca), AG 1478, AG 1571(SU 5271; Sugen), 티오테파 및 CYTOXAN(TM) 시클로스포스파미드와 같은 알킬화제; 부술판, 임프로술판 및 피포술판과 같은 알킬 술포네이트; 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 캄토테신(합성 유기체 토포테칸을 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(그것의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유기체를 포함); 크립토피신(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1을 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스포기스타틴; 질소머스타드, 예컨대

클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비신, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 에네딘 항생제와 같은 항생제(예를 들어, 칼리키아미신, 특히 칼리키아미신 감마1I 및 칼리키아미신 오메가1I(Angew Chem Intl. Ed. Engl.(1994) 33:183-186); 다이네미신 A를 포함하는 다이네미신; 클로드로네이트와 같은 비스포스포네이트; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련된 색소단백질 에네딘 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 클로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN(TM) 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신을 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 C와 같은 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대, 칼우스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄과 같은 항-아드레날; 프롤린산과 같은 폴산 보충제; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노에불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티니움 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 나이트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도피필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(TM) 폴리사카라이드 복합체(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아조산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히 T-2 톡신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, TAXOL(TM) 파클리탁셀(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.), ABRAXANETM 무-크레모포르, 파클리탁셀의 알부민-유전자 조작된 나노입자 조제물(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, 111.), 및 TAXOTERE(TM) 도세탁셀(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로르안부실; GEMZAR(TM) 겜시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 시스플라틴 및 카르보플라틴과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE(TM) 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라아제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레니노산과 같은 레티노이드; 카페시타빈; 및 어떤 상기의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함할 수 있다.

[0057] 항암 물질을 접합하여 약학 조성물을 사용하는 경우, 항체-약물 콘쥬게이트(antibody-drug conjugate; 이하 ADC) 방식의 작용기전에 의하여 암의 예방 또는 치료를 유도할 수도 있다. 상기 ADC는 항체에 약물을 접합시켜서 주입하는 방법으로서 항체에 특이적으로 결합하는 항원을 발현하는 세포에서 항체의 내부화(internalization)를 유도함으로써 세포 내부로 약물을 전달하여 세포 특이적으로 약물을 전달하는 원리의 치료방법에 해당한다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 생쥐-인간 키메라 항체인 chi-NPB40 에 앞서 언급한 α-HFc-CL-DMDM(AH-102DD, Moradec, 미국)과, auristatin이 접합된 α-HFc-CL-MMAF(AH-102AF, Moradec) 항체를 접합시켜 세포주에 처리하였을 때, B7-H3를 발현하는 세포주 내부로 약물이 효과적으로 전달됨으로써, 세포 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 다만 이에 제한되지 않고, 앞서 언급한 ADCC 및 ICI 방식에 의하여도 암세포의 사멸이 유도될 수도 있다.

[0058] 본 발명의 의약 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제, 바람직하게는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당 업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 소화관내, 국소, 설 하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 이러한 목적에 적합한 제형으로는 정제, 환제, 당제(dragee), 산제, 캡슐제, 시럽제, 용액제, 겔제, 현탁제, 에멀젼, 마이크로에멀젼 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, 현

탁액, 용액 또는 에멀션 등의 형태를 취할 수 있고, 현탁화제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제화 제를 포함할 수 있다. 또한, 상기 항체 분자는 사용 전에 적절한 무균 액체로 재조정하여 사용할 수 있는 건조된 형태로 제제화 될 수도 있다.

[0060] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분으로서 상기 항체는 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.01 내지 50 ㎎/㎏ 체중, 바람직하게는 0.1 내지 20㎎/㎏ 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 예방 또는 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별, 약제 조합, 반응 민감성 및 치료에 대한 내성/반응 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해해야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0062] 또한, 본 발명은 상기 항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다.

[0063] 본 발명에서 하이브리도마는 하이브리도마 세포 또는 하이브리도마 세포주를 포함하는 의미로, 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. 본 발명의 일 실시예에서 본 발명은 단일클론항체 NPB40을 생산하는 하이브리도마를 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 하이브리도마는 2 × 10^6 개의 H9 준 인간만능줄기세포와 동 수의 H9 순수인간만능줄기세포를 마우스의 왼쪽과 오른쪽 발바닥에 각각 주입한 후, 상기 마우스의 왼쪽 오금에서 림파구를 분리하여 골수종 암세포와 융합하여 제조하였다. 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마는 이를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.

[0064] 상기 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액(ascites fluid)으로부터 분리될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 단일클론항체의 대량 생산을 위해 하이브리도마의 배양 배지를 단백질 G-세파로오스 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 다만 상기 하이브리도마의 배양 및 정제 방법은 당 분야에 공지된 방법이라면 모두 가능한 것이고, 이에 제한되지 않는다.

[0066] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다. 전술한 바와 같이, 상기 항체는 암 세포의 B7-H3 단백질에 특이적으로 결합할 수 있다. 일반적으로, B7-H3 단백질은 다양한 암 세포에서 과발현되는 양상을 보이는 것이므로, 대상 세포에서 B7-H3 항원이 확인되면 해당 세포는 암 세포일 확률이 높다고 할 수 있다. 따라서, 상기 항체를 포함하는 조성물을 B7-H3를 발현하는 암세포에 처리하면 상기 항체는 암세포의 B7-H3 항원과 결합하여 항원-항체 복합체를 형성하게 되므로, 항체에 결합하는 암세포와 결합하지 않는 정상 세포로 분류할 수 있다.

[0067] 상기 암 진단용 조성물에 의하여 진단할 수 있는 암은 바람직하게는 B7-H3가 과발현하는 것으로 알려진 암, 예를 들면, 간암, 췌장암, 골육종, 피부암, 폐암, 인간배아암, 신경모세포종, 자궁암, 전립선암, 대장암, 위암, 담도암, 신장암, 방광암, 난소암, 뇌종양 등을 들 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[0069] 또한, 본 발명은 분리된 시료에 상기 암 진단용 조성물을 처리하여, 상기 항체가 결합된 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 상기 항체가 단백질에 결합한 항원-항체 복합체가 검출되면, 암으로 진단받을 가능성이 높다고 판단할 수 있다. 예를 들어, 상기 시료는 체액, 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청 등일 수 있고, 바람직하게는 혈청일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 상기 항원-항체 복합체 형성여부는 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블랏팅(Western Blotting), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 사용 가능하다. 다만, 당 분야에 공지된 항원-항체 복합체 형성 여부를 판단할 수 있는 방법이라면 모두 사용 가능한 것이고, 이에 제한되지 않는다.

[0072] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0074] **실시예 1. 인간 만능줄기세포의 배양 및 순수 인간 만능줄기세포의 확립**

[0075] **1-1. 인간 준 만능줄기세포의 배양**

[0076] 인간 준 만능줄기세포 H9은 Wicell Research Institute에서 제공한 프로토콜에 따라 기존에 기술된 방법에 따라 배양하였다(한국등록특허 제 2235935호). 먼저 임신한 CF1 생쥐의 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)를 적출 및 배양하여 γ선 조사(γ-irradiation) 또는 mitomycin(10㎍/ml) 처리한 후에 지지 세포(feeder cell)로 사용하였다. 20%(v/v) KOSR(knockout serum replacement), 1%(v/v) NEAA, 0.1mM β-mercaptoethanol, 100U/㎖ penicillin-G, 100㎍/ml streptomycin, 8~12ng/ml bFGF를 첨가한 DMEM/F12(Invitrogen) 배지에서 배양하였고, 5~6일마다 계대 배양시에는 콜라게나아제 IV(1mg/ml)로 5분 간 처리 후에 황색 팁으로 적절한 크기로 자른 후 새로운 지지 세포 위에서 배양하였다. 그 결과 크고 편평하게 자라는 배양된 준 인간만능줄기세포 모양을 볼 수 있다(도 1A).

[0078] **1-2. 순수 인간만능줄기세포의 확립**

[0079] 이하 "순수 인간만능줄기세포(naive hPSC)"라는 용어는 준 인간만능줄기세포(primed hPSC) 와는 다르게 순수 인간만능줄기세포의 마커들을 발현하는 줄기세포를 의미하는 것으로서, ground 상태, 또는 intermediate, formative 같은 중간 상태의 줄기세포의 마커들을 발현하는 줄기세포를 의미한다. 준 인간만능줄기세포 H9(primed hPSC)를 이용하여 순수 인간만능줄기세포(naive hPSC)로 전환을 유도하여 배양하였으며 구체적인 프로토콜은 기존에 공지된 방법에 따랐다(한국등록특허 제 2235935호). 먼저 준 인간만능줄기세포 H9을 콜라게나아제 IV(1mg/ml)로 5분 간 처리하고, 황색 팁을 이용하여 적절한 크기로 자른 후에 미리 깔아둔 MEF 위에 옮겼다. 다음날 순수 hPSC 세포 유도 배지인 2iL/X/F/P 배지(1㎛M PD0325901, 3 ㎛M CHIR99021, hLIF(20ng/ml), 4 ㎛M XAV939, 10 ㎛M Forskolin, 2 ㎛M Purmorphamine, 20%(v/v) KOSR, DMEM/F12, 1%(v/v) L-glutamine, 1%(v/v) NEAA, 0.1mM β-mercaptoethanol, 1x penicillin-G, streptomycin)(Zimmerlin et al., 2016, *Development* 143:4368)에서 유도한 세포는 형성/중간 상태(formative/intermediate) 순수 인간만능줄기세포와 유사하며(Taei et al., 2020, *Exp Cell Res.* 389, 111924), 5%(v/v) 산소 배양기에서 계대 배양하며 준비하였다. 배양 후 3~5일이내에 돔 모양의 세포로 변하였고, 3~4일 간격으로 0.05%(v/v) 트립신-EDTA 또는 accutase(StemPro)를 이용하여 계대 배양하였다. 세포 생존을 높이기 위해 최초 계대 배양할 때만 10 ㎛M Y-27632(Tocris)을 처리하였다. 그 결과 편평하게 자라는 배양된 준 인간만능줄기세포 모양과 비교하여 작은 돔 모양으로 자라는 순수 인간 만능줄기세포들을 볼 수 있다(도 1A). 최소 4~5회 계대 배양한 순수 인간만능줄기세포를 면역 실험에 이용하였다.

[0081] **1-3. 다양한 암세포의 배양 및 혈액세포의 분리**

[0082] 인간 배아암세포 NT-2와 2102EP를 10% FBS, 1%(v/v) NEAA, 100U/ml penicillin-G, 100㎍/㎖ streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 인간 말초혈액 단핵구 세포(human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 Ficoll-Paque Plus method(GE Healthcare, Seoul, Korea)에서 제시한 방법을 이용하여 분리하였다.

[0084] **1-4. FACS분석에 의한 세포표면 항원염색**

[0085] 배양한 준(primed H9) 및 순수(naive H9) 인간만능줄기세포를 비교하기 위해 먼저 인간 준 만능줄기세포 마커로 알려진 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24, CD90의 발현 여부를 FACS로 먼저 분석하였다. FACS 분석을 위해서 콜라게나아제 IV로 분리한 세포를 TrypLE(Invitrogen)을 이용하여 단일 세포로 떼어낸 후 40㎛m 여과기(strainer)를 통과시킨 후 한 시료 당 약 2~3 x 10^5세포를 사용하였다. SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24-PE, CD90-PE 항체를 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBA(1%(w/v) bovine serum albumin, 0.02%(w/v) NaN_3 in PBS)로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-래트 IgM-FITC, 항-마우스 IgM-FITC 또는 항-마우스 IgG-

FITC(BD Biosciences)를 4℃에서 30분 간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest software(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 결합 여부를 분석하였다. 또한 같은 방법으로 바탕 상태 순수 인간만능줄기세포 마커로 알려진 CD7, CD77, CD130 발현도 관찰하였다. 그 결과 준 인간만능줄기세포 마커들 중 CD90을 제외한 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, 및 CD24 발현이 순수 인간만능줄기세포에서는 감소함을 관찰하였고 순수 인간만능줄기세포 마커로 알려진 CD7과 CD77발현만 H9-2iL/X/F/P에서 증가하고 CD130은 증가하지 않은 순수 인간만능줄기세포가 유도되었음을 확인하였다(도 1B 및 1C).

[0087] **1-5. RNA-Seq분석을 통한 순수 인간만능줄기세포 확인**

[0088] Primed H9와 naive H9 세포의 총 RNA를 RNAiso PLUS(TAKARA) 시약을 이용해서 추출한 후, RNA-seq 전사체 분석(3BIGS, 경기도)을 통한 naive hPSC 연관된 유전자 31개의 발현을 비교하였다. 그 결과 primed hPSC에 비해 2iL/X/F/P 방법(Zimmerlin et al., 2016, *Development* 143:4368)으로 유도한 naive hPSC 세포에서 15개의 naive hPSC 연관 유전자(DPPA3/5, KLF2/4/5/17, TBX3, DNMT3L, NANOG, STAT3, GDF3, PRDM14, ESSRRB, GBX2, TFCP2L1, ZFP42/57)가 더 많이 증가하는 것을 관찰하여 순수 인간만능줄기세포(naive hPSC)가 잘 유도되었음을 확인하였다(도 2).

[0090] **실시예 2. NPB40 하이브리도마 제조**

[0091] **2-1. 순수 인간만능줄기세포에 특이적 항체 제조를 위한 면역주사**

[0092] 순수 인간만능줄기세포에 대한 단일클론항체를 제조하기 위해 생쥐 발바닥에 만능줄기세포들을 면역주사하였으며 구체적인 프로토콜은 기존에 잘 기술된 방법에 따랐다(한국등록특허 제 2235935호). 먼저 6주 된 11 마리의 암컷 Balb/c 생쥐 오른쪽 발바닥에 2 × 10^6 개의 준 인간만능줄기세포 H9 세포를 -3, 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 주사하였고, 같은 수의 순수 인간만능줄기세포 H9 세포를 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 왼쪽 발바닥에 각각 주사하고 22일 되는 날 면역주사(immunization)된 마우스를 경추 탈골한 후 왼쪽 뒷발로부터 지방과 근육조직을 제거한 오금 림프절(popliteal lymph node)을 적출하여 표면이 울퉁불퉁한 비광택 슬라이드 글라스(frosted slide glass)를 이용하여 오금 림프절을 갈아서 단일세포화해서 준비하였다. 왼쪽 림프절 세포와 FO 미엘로마 세포를 1:5의 비율로 섞은 후, 혈청 없는 배지인 DMEM(Invitrogen)로 2번 세척한 후 1ml 50%(w/v) PEG1500(polyethylene glycol, BMS, seoul, Korea)를 1분당 25 방울이 섞이도록 넣어주었다. 1분 후 DMEM 배지를 1분간 3ml, 1분간 17ml, 1분간 20ml를 연속적으로 넣고, 5분 간 정치한 후 원심분리를 하여 세포를 모았다. 96웰 플레이트에 2 x 10^5 세포/웰을 20%(v/v) FBS, 1xHAT(Sigma-Aldrich), HCS(hybridoma cloning supplement)가 포함된 DMEM 배지에서 약 2주 간 배양하였고, 샌드위치 ELISA 방법을 이용하여 항체를 생산하는 하이브리도마 만을 선별하였다.

[0094] **2-2. NPB40 하이브리도마의 클로닝**

[0095] 항체가 발현되는 클론을 선발하기 위하여 샌드위치 ELISA(Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법을 사용하였다. 포획 항체(Capture antibody)인 항-마우스 IgG 또는 IgM 항체를 2 μg/ml로 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 100μl을 첨가해 37℃에서 1 시간 반응시키고, 다시 항-마우스 IgG-HRP 또는 항-마우스 IgM-HRP(horseradish peroxidase, Sigma-Aldrich)의 1/5,000 희석액과 1시간 더 반응시켰다. PBST(0.05%(v/v) Tween-20 in PBS)로 3회 세척하고, OPD(o-phenylenediamine, Sigma사)와 H_2O_2가 포함된 기질 용액을 첨가한 후 492nm에서 흡광도를 측정하여 항체를 생산하는 클론을 먼저 선발하였다. 다음으로 각 클론의 배양액을 상기 FACS 분석을 통해 먼저 순수 인간만능줄기세포에 결합하는 하이브리도마를 선발하였고 이들 중에서 준 인간만능줄기세포와 순수 인간만능줄기세포에 동시에 결합하는 하이브리도마를 33종을 추가로 선발하고 서브클로닝하여 안정적인 클론을 확보하였다. 이중 항체 NPB40은 순수와 준 인간만능줄기세포에 동시에 결합하는 IgG1과 κ사슬을 가진 단일클론항체로 분류하였으며(도 3), 이 특허에서 인식 항원과 특성을 분석하였다.

[0097] **실시예 3. NPB40의 각종 암세포와 정상세포에 대한 결합 특이성 분석**

[0098] 단일클론 항체 NPB40의 각종 세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토미트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 다양한 암세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40㎛ 스트레이너(SPL, Pocheon, Korea)에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 각 단일세포를 ml당 약 1 x 10^6개씩 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN_3 in PBS)에 섞은 후, 항체 NPB40을 4℃에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC(Invitrogen)를 4℃에서 20분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 단일클론항체 NPB40은 단일클론항체 NPB40은 정상 인간 말초혈액단핵구(PBMC)에는 결합하지 않지만 4종의 인간 간암세포 4종의 인간 간암세포 Huh7, HepG2, SNU-387, SNU-449에 강하게 결합하였다(도 4A, 표 2) 또한 3종의 인간 췌장암세포인 BxPC-3, PANC-1, SNU-213, 2종의 인간 대장암세포인 Colo-205, HCT-116, 2종의 인간 골육종세포 U2OS, Saos2, 인간 피부암세포 A375, 인간 폐암세포인 A549, 인간 신경모세포종인 SH-SY5Y에도 모두 잘 결합하였다(도 4A, 표 2). 이런 결과는 NPB40 항체가 인식하는 항원이 인간 정상세포인 PBMC, hepatocyte 에는 미약하게 발현하지만 인간만능줄기세포, 배아암세포 그리고 간암을 포함하는 다양한 암세포에서 강하게 표면에서 발현하는 것을 의미한다.

[0099] 추가로 세포면역화학염색법(Immunocytochemistry)을 통해서도 일부 암세포에 대한 단일클론항체 NPB40의 표면 결합 여부를 확인하였다. 0.1% 젤라틴(Sigma, MA, U.S.A)로 37℃에서 30분간 코팅한 커버슬립(coverslip)에 세포를 깔고 5% CO_2, 95% air가 공급되는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 48-72시간 배양 후 세포를 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 세척하고 2% paraformaldehyde(PFA; Sigma-Aldrich) 용액으로 상온에서 15분간 세포를 고정하였다. 1mM CaCl2, 0.5mM MgCl2을 포함한 PBS로 세포를 2회 세척 후 5% normal horse serum(Sigma-Aldrich)과 0.1% BSA(Bovine serum albumin, MP Biomedicals)를 포함한 용액으로 상온에서 1시간 블로킹 하였다. 그리고 NPB40의 항원을 염색하기 위해 5㎍의 NPB40 항체를 넣고 4℃에서 빛을 차단한 채 12시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후, Dylight 488-conjugated anti-mouse IgG(Invitrogen)으로 실온에서 빛을 차단한 채 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후, DAPI(4,6-diamidino- 2-phenylindole)를 0.1% PBST(0.1%의 Triton-X-100을 포함하는 PBS)에 1:10,000 비율로 희석한 용액을 넣고 10분간 상온에서 반응시켜 세포핵을 염색했다. 단일클론항체 NPB40은 인간 배아암 세포주인 2102Ep 세포와 간암 암세포주인 Huh7, SNU-449 세포의 표면에 잘 결합하는 것을 볼 수 있다(도 4B).

표 2

Name	Cell	Reactivity by flow cytometry
primed H9	Human embryonic stem cell, primed state	++
naïve H9	Human embryonic stem cell, naïve state	++
NT-2/D1	Human embryonic carcinoma	+++
2102EP	Human embryonic carcinoma	+++
MEF	Mouse embryonic fibroblast	-
PBMC	Human peripheral blood mononuclear cells	-
Huh7	Human hepatocellular carcinoma, liver	+++
HepG2	Human hepatocellular carcinoma, liver	+++
SNU-387	Human hepatocellular carcinoma, liver	+++
SNU-449	Human hepatocellular carcinoma, liver	+++
BxPC-3	Human pancreatic carcinoma, pancreas	+++
PANC-1	Human pancreatic carcinoma, pancreas	+++
SNU-213	Human pancreatic carcinoma, pancreas	+++
Colo-205	Human adenocarcinoma, colon	+++
HCT116	Human adenocarcinoma, colon	+++
U2OS	Human osteosarcoma, bone	+++
Saos-2	Human osteosarcoma, bone	+++
A375	Human melanoma, skin	++
A549	Human adenocarcinoma, lung	+++
SH-SY5Y	Human neuroblastoma, brain	+++
+++, strong binding; ++, medium binding; +, weak binding; -, no binding.		

[0101]

[0103] **실시예 4. 단일클론항체 NPB40이 인식하는 항원 동정**

[0104] **4-1. 단일클론항체 NPB40이 인식하는 세포 표면 단백질 분자의 확인**

[0105] 인간 배아 암세포주 NT2/D1 표면의 바이오틴표지(biotinylation)는 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo Scientific)에서 제시한 프로토콜을 약간 수정하여 수행하였다. 100 밀리미터 세포배양 플레이트에 배양한 인간 배아 암세포 NT2/D1을 PBS(pH 7.4)로 2회 세척한 후 0.5mg의 바이오틴이 녹아있는 찬 PBS(pH 8.0) 5ml를 넣고, 4℃에서 30분간 반응시켰다. 찬 PBS(pH 8.0)로 3회 세척 한 후 바이오틴 표지된 세포는 용해 완충액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2㎍/ml Aprotinin, 100㎍/ml PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride), 5㎍/ml Leupeptin, 1mM NaF, 1mM Na_3VO_4)를 이용하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 12,000 rpm 속도로 40분간 원심 분리해서 핵을 제거한 후 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. Protein G 아가로스(Amicogen, Jinju, Korea)에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위해서, 약 $2.0X10^7$ 개 세포의 세포 용해물에 20㎕ Protein G 아가로스를 넣고 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후, 원심분리를 통해 그 Protein G 아가로스를 회수하여 용해 완충액에 5회 세척한 샘플을 음성 대조군으로 사용하였다. 단일클론항체 NPB40에 의해 인식되는 항원을 면역침강 하기 위해서 Protein G 아가로스에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거한 세포 용해물에 항체 4 ㎍을 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 20 ㎕ Protein G 아가로스를 넣고 4℃에서 4시간 동안 더 반응시켰다. 면역 침강된 면역 혼합체를 용해 완충액에 5회 세척하고, 항체에 결합된 항원을 용출하기 위해 5X 샘플 완충액를 넣고, 100℃에서 10분간 끓였다. 음성 대조군 단백질과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블랏팅 하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.1% TBST(Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween) 로 3번 세척한 후, 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP(SA-HRP, GE healthcare) 를 실온에서 1시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출

키트(Advansta)로 확인하였다. 그 결과, 단일클론 항체 NPB40은 인간 배아암세포 NT2/D1의 세포 용해물에서 약 120kDa 약한 단백질과 약 110 kDa 강한 단백질이 면역 침강되어 염색되는 것을 확인하였다(도 5A).

[0107] **4-2. 단일클론항체 NPB40에 의해 면역 침강된 항원의 동정**

[0108] 단일클론항체 NPB40에 의해 면역침강된 단백질을 포함하는 폴리아크릴아마이드 젤을 PageBlue Protein Staining Solution(Thermo Scientific)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다(도 5B). 젤에서 단일클론항체 NPB40에 의해 면역침강된 단백질로 추정되는 110kDa 위치에 염색된 단백질 밴드를 잘라 LC-MS/MS(Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry) 분석을 의뢰하였다(ProteomeTech, Seoul, Korea). 분석이 완료된 매스 스펙트럼으로부터 단백질 동정을 위하여 UniProt 데이터베이스를(https://www.uniprot.org/) 이용하였다. 그 결과, 단백질의 아미노산 서열이 B7-H3(CD276, PD-L3)와 일부 일치하는 것을 확인하였다(도 5C; 서열번호 11). 밑줄 친 아미노산은 실제로 질량분석기를 통해 확인한 아미노산 서열을 표시한 것으로 B7-H3와 26개의 아미노산이 일치하는 것을 알 수 있다.

[0110] **4-3. 동정된 NPB40 항원의 검증**

[0111] 단일클론항체 NPB40의 항원 단백질이 B7-H3인지 확인하기 위해 상업적으로 판매되고 있는 B7-H3에 대한 항체, 유전자 발현 벡터, siRNA를 이용하여 면역침강법, 웨스턴 블라팅법, RNA 간섭작용에 의한 유전자 녹다운법, 플로우 사이토미트리 분석을 수행하였다. 단일클론항체 NPB40이 면역침강 시킨 단백질이 B7-H3인지 확인하기 위해 토끼 항-B7-H3 다클론항체(Sino Biological)를 구입하여 면역침강법과 웨스턴 블랏팅을 수행하는 데 사용하였다. 상기 실시예 4-1에서 서술한 방법으로 바이오틴-표지된 세포 용출액을 준비하고, 이 용출액을 상기 서술한 바와 동일하게 단일클론항체 NPB40과 토끼 항-B7-H3 다클론항체로 면역침강 하였다. 이후, 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(No Ab)과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE를 통해 분리하고 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겨 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.1% TBST로 3번 세척 한 후, 스트렙타비딘-HRP(SA-HRP) 를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출 키트로 확인하였다. 그 결과, 단일클론항체 NPB40의 면역침강체(immunoprecipitant)가 공지의 토끼 항-B7-H3 다클론항체에 의해 면역 침강된 세포표면 B7-H3와 동일하게 110kDa에서 검출되었다(도 6A).

[0112] 또한, 단일클론항체 NPB40이 면역 침강시킨 110kDa의 세포 표면 단백질이 B7-H3인지 확인하기 위해 상기 서술한 바와 동일하게 세포 용출액을 단일클론항체 NPB40과 토끼 항-B7-H3 다클론항체(α-B7-H3)로 면역 침강하였다. 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(No Ab)과 용출된 단백질, 세포의 용출액(whole lysate)을 10% SDS-PAGE를 통해 분리하고 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겨 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 0.1% TBST로 3번 세척 한 후, 공지의 토끼 항-B7-H3 다클론항체(α-B7-H3)를 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척 한 후 항-토끼 IgG-HRP(1:15,000; Bethyl Laboratories)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과, 단일클론항체 NPB40과 토끼 항-B7-H3 다클론항체(α-B7-H3) 에 의해 면역침강된 110kDa의 단백질이 토끼 항-B7-H3 다클론항체에 의해 인식됨을 확인할 수 있어 두 항체가 B7-H3에 결합하여 면역침강시킨다는 것을 확인하였다(도 6B).

[0113] 단일클론항체 NPB40가 B7-H3를 직접 인식하여 면역침강시키는 것인지 간접 인식하여 침강시키는 것인지 구별하기 위해 B7-H3 유전자 발현 벡터 pCMV3-B7H3-His(Sino Biological)를 구입하여 인간 배아 신장 세포 HEK293T에서 His tag이 달린 재조합 B7-H3를 과발현시키고, 이 세포의 용해물을 마우스 항-His 단일클론항체(Invitrogen)와 토끼 항-B7-H3 다클론항체(α-B7-H3)를 사용해 면역 침강과 웨스턴 블랏을 수행하였다. 인간 배아 신장 세포 HEK293T에서 B7-H3를 과발현하기 위해 6-웰의 세포배양용 플레이트에 웰당 $3.5X10^5$개 HEK293T 세포를 24시간 배양하고, 공지의 pCMV3-B7-H3-His 벡터 DNA 1㎍을 PEI(Polyetherimide) 3㎍과 섞어 상온에서 20분간 반응한 혼합물을 세포 배양 배지에 첨가해 트랜스펙션 했다. 이후 48시간 추가 배양한 세포로부터 상기 실시예 4-1에서 서술한 용해 방법으로 세포 용해물을 준비하였다. 이 세포 용해물을 상기 서술한 바와 동일하게 단일클론항체 NPB40과 항-His 항체, 항-B7-H3 항체(α-B7-H3)로 면역 침강 후 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(No Ab)과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겼다. 이 막은 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹을 하였다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, 공지의 마우스 항-His 단일클

론항체 또는 토끼 항-B7-H3 다클론 항체(α-B7-H3) 를 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척 한 후, 항-마우스 IgG-HRP(1:10,000; Millipore) 또는 항-토끼 IgG-HRP(1:15,000)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 0.1% TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출 키트로 확인하였다. 그 결과 단일클론항체 NPB40과, 마우스 항-His 단일클론항체, 토끼 항-B7-H3 항체(α-B7-H3)에 의해 면역 침강된 각각의 단백질 모두 공지의 항-His 항체(도 6C)와 항-B7-H3 항체(α-B7-H3, 도 6D)에 의해 인식됨을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 본 발명의 단일클론항체 NPB40이 인간 배아암세포주 NT2/D1의 표면에 존재하는 B7-H3 단백질을 인식하는 항체임을 검증하는 것이다.

[0115] **실시예 5. 단일클론항체 NPB40의 기능 분석**

[0116] **5-1. 간암세포주에서 B7-H3 녹다운(Knockdown) 및 세포 부착능 측정**

[0117] 단일클론항체 NPB40의 항원인 B7-H3가 간암세포의 부착, 생존 및 성장에 어떻게 영향을 미치는지 분석하기 위해서 B7-H3 유전자를 표적하는 siRNA를 이용하여 간암세포주에서 유전자 녹다운을 진행하였다. B7-H3에 대한 siRNA(Bioneer, Daejeon, Korea)를 구매하여 간암세포주 Huh7, HepG2, SNU-387, SNU-449에 트랜스펙션 했다. 50nM의 음성 대조군(negative control) siRNA(siCon; Genolution, Seoul, Korea)와 B7-H3에 대한 siRNA(siB7-H3), Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)를 각각 TOM(Welgene, Gyeongsan, Korea)에 희석하고 5분간 상온에 두었다. 이후, 각각의 siRNA 희석액과 RNAiMAX 희석액을 섞어 20분간 상온에서 반응시켰다. 6웰 플레이트에 웰당 $1.5X10^5$ - $3.0X10^5$ 개의 간암세포주를 깔고 siRNA-RNAiMAX 희석액을 넣어 24시간 동안 배양했다. 24시간 후, 동일한 방법으로 두 번째 트랜스펙션을 반복하고 48시간을 추가적으로 배양했다. 첫 번째 트랜스펙션으로부터 72시간 후, 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 상기 실시예 4-1의 세포 용해 완충액으로 용해한 다음 5X 샘플 완충액를 넣고, 100℃에서 10분간 끓였다. siCon 단백질과 siB7-H3 단백질을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블랏팅하였다. 그 결과 siRNA로 녹다운한 간암세포 Huh7, HepG2, SNU387, SNU449에서 음성대조군으로 사용하는 GAPDH에 비해 B7-H3 단백질이 각각 77%, 100%, 98%, 93% 감소하는 것을 볼 수 있고 이것은 녹다운이 효과적으로 진행되었음을 말해준다(도 7A).

[0118] 이렇게 B7-H3를 녹다운한 간암세포에서 실시예 3에서 기술한 것처럼 플로우 사이토미트리를 수행하여 NPB40 및 토끼 항-B7-H3 다클론항체(α-B7-H3) 의 결합 정도를 확인하였다(도 7B). 도 7B 및 7C에서 보이는 것처럼 siB7-H3를 트랜스펙션 한 세포에서 상업적인 토끼 항-B7-H3 다클론항체(α-B7-H3) 의 결합이 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 이는 B7-H3 녹다운으로 세포표면 B7-H3 발현이 특이적으로 감소하였음을 보여주는 것이다. 또한 같은 세포에서 단일클론항체 NPB40로 수행한 플로우 사이토미트리에서도 NPB40의 표면 결합이 현저히 감소한 것을 확인하였다(도 7D-7E). 이는 siB7-H3에 의해 세포의 B7-H3 유전자가 녹다운 되어 B7-H3 표면 발현이 감소하여 NPB40 항체의 결합 정도가 감소한 것이며, NPB40이 B7-H3를 인식하는 항체임을 다시 확인해준다.

[0120] **5-2. B7-H3 녹다운(Knockdown) 간암 세포주에서 암세포 세포 부착능 측정**

[0121] 다음으로 B7-H3 녹다운된 간암세포 Huh7과 HepG2가 세포배양 플레이트에 잘 결합하는지 분석하기 위해서 세포부착(Cell adhesion) 실험을 수행하였다. 세포 부착 실험을 위해서는 B7-H3 녹다운 간암세포주 Huh7과 HepG2를 준비하여 $3.0X10^5$ - $1.2X10^6$ 개의 세포를 부유한 후 곧바로 세포 현탁액을 0.1%의 젤라틴 용액으로 37℃에서 30분 동안 코팅한 12-웰 플레이트에 넣고 5% CO_2, 95% air가 공급되는 37℃ 배양기에서 2-3시간 동안 배양하였다. PBS(pH 7.4)로 2회 세척 후 부착한 세포를 2% Paraformaldehyde로 상온에서 15분간 고정하고, 2% 에탄올에서 녹인 0.5% crystal violet(Sigma-aldrich)로 상온에서 30분간 염색하였다. 염색된 세포의 흡광도를 ELISA 판독기를 이용하여 부착된 세포를 0.1% SDS로 녹여낸 후 OD_{570nm}에서 측정하였다. B7-H3 녹다운 간암세포주에서 세포 배양 플레이트에 대한 결합이 뚜렷하게 감소하고(도 8A), 같은 실험을 3회 반복한 결과를 통계적으로 분석하면 Huh7에서는 세포부착능이 약 33% 감소하고 HepG2세포에서는 약 25%(도 8B, 8C) 감소하는 것을 관찰하였다. 이 결과는 B7-H3가 간암세포의 세포부착능 유지에 중요함을 말해준다. B7-H3가 세포-세포외기질(ECM, extracellular matrix) 부착을 조절하는 방법을 분석하기 위해 B7-H3 녹아운 Huh7 세포에서 플로우 사이토미트리 분석에 의해 cadherin 및 integrin 분자의 세포 표면 발현을 조사했다. E-카드헤린, 인테그린-α3 및 인테그

린-αV의 세포 표면 발현은 B7-H3 녹다운 Huh7 세포에서 각각 약 68%, 25% 및 17% 감소했다(도 8D, 8E). HepG2 세포에서도 유사한 결과가 얻어졌으며(도 8F, 8G), 이는 B7-H3가 E-카드헤린, 인테그린-α3 및 인테그린-αV의 발현 조절을 통해 세포-세포 부착 및 세포-ECM 접착을 촉진하는 분자임을 말해준다.

[0122]

[0123] **5-3. B7-H3 녹다운(Knockdown) 간암 세포주에서 암세포 생존 및 성장 분석**

[0124] 다음으로 간암세포의 생존 및 증식에서 B7-H3의 역할을 조사하기 위해, 상기의 B7-H3 녹다운 Huh7 세포를 사용하여 클론원성 생존 분석(clonogenic survival assay)을 수행하였다. 상기의 실험을 통해 제조한 B7-H3 녹다운 Huh7 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40㎛ 스트레이너(SPL, Pocheon, Korea)에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 6웰 플레이트에 웰당 $1.0X10^4$개씩 깔아서 세포들이 흩어져서 단일세포로 부착하도록 하고 7일 동안 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양 후 형성된 콜로니(colony)를 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하고 전체 콜로니의 수를 Image J 프로그램으로 분석하고 같은 실험을 3회 반복하여 세포의 콜로니 형성 능력을 통계적으로 나타냈다(도 9A). B7-H3 결핍은 Huh7 콜로니의 수와 크기를 약 3.6배 감소시켰다. 또 다른 간암세포주인 HepG2를 사용한 같은 실험에서도 B7-H3 결핍은 HepG2 콜로니의 수와 크기를 약 1.4배 감소시켰다(도 9B). 이런 결과는 B7-H3 가 저밀도 파종 스트레스 하에서 간암세포 생존을 향상시키고 증식을 촉진하는 중요한 세포 표면 분자라는 것을 증명한다.

[0125]

[0126] **실시예 6. 단일클론항체 NPB40을 이용한 B7-H3의 세포 성장 촉진 기능 확인**

[0127] B7-H3의 발현이 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 인간 간세포인 HepG2를 단일클론항체 NPB40로 B7-H3 높게 발현하는 세포(B7-H3-high)와 낮게 B7-H3를 발현하는 세포(B7-H3-low)로 sorting 하여 분리한 후 각각의 세포군의 클론원성 생존 분석(clonogenic survival assay)을 수행하여 비교하였다. 간암세포 sorting을 위해서는 먼저 DSB-X 바이오틴 라벨링 키트(Thermo Fischer Scientific)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 NPB40 항체를 바이오틴화 시켰다. HepG2 세포를 B7-H3 발현이 높은 군(B7-H3 high)과 B7-H3 발현이 낮은 군(B7-H3 low)으로 분리하기 위해 $1.0X10^7$개의 세포를 실온에서 30분 동안 100㎍의 바이오틴화된 NPB40 항체와 반응시켰다. 효율적인 세포 분리를 위해 세포를 PBS(pH 7.4)로 희석하고 1,500 rpm에서 3분간 원심분리하는 세척 과정을 2회 반복하여 세포에 결합하지 않은 항체를 제거하였다. 이후, Dynabeads FlowComp Flexi 키트(Thermo Fischer Scientific)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 세포 분류를 수행하였다. 바이오틴화 된 NPB40에 강하게 결합한 B7-H3 발현이 높은 군(B7-H3-high)은 마그네틱 비드를 사용해 분리 후, releasing buffer와 함께 상온에서 10분간 반응시켜 비드에서 세포를 떨어트렸다. B7-H3 발현이 낮은 군(B7-H3-low)은 마그네틱 비드에 결합하지 않아 세포군을 모아서 원심 분리하여 수집하였다. 각각의 세포군을 PE 접합된 SA(Phycoerythrin-conjugated streptavidin) 및 FACSCalibur로 분석하여 NPB40에 의해 분리된 B7-H3high 세포군은 low군에 비해 약 2배 정도 B7-H3 발현이 높은 것을 확인하였다(도 10A, 10B). 상기의 실험을 통해 분리한 세포를 6웰 플레이트에 웰당 $1.0X10^4$개씩 깔고 2주 동안 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양 후 형성된 콜로니(colony)를 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다(도 10C). 전체 콜로니의 수를 Image J 프로그램으로 분석하고 같은 실험을 3회 반복하여 세포의 콜로니 형성 능력을 통계적으로 나타냈다(도 10D). 도 10D에서 보이는 것처럼 B7-H3-low군에서 B7-H3-high 군에 비해 클론원성 생존능력이 34%로 약 3배 감소하는 것을 확인하였다. 이런 결과는 NBP40에 의해 인식되는 B7-H3발현이 간암세포의 암 줄기세포성(cancer stemness)을 촉진하는 분자임을 말해준다.

[0129] **실시예 7. 간암 및 췌장암 세포주에서 NPB40처리 후 B7-H3 세포막 내부화 분석**

[0130] 항체를 처리했을 때 암세포 내부로 항체의 내부화(internalization)를 유도할 수 있다면 antibody-drug conjugate를 이용하여 암세포 사멸을 유도할 수 있는 좋은 도구가 된다. 단일클론항체 NPB40의 각종 세포에 대한 세포막 내부화(internalization)를 관찰하기 위해 플로우 사이토미트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(FBS; VWR, PA, U.S.A)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40㎛ 스트레이너에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 각 단일세포를 ml당 약 1 x 10^5개씩 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN_3 in PBS)에 섞은 후, 항체 NPB40을 4

℃에서 30분간 반응시켰다. 내부화 여부를 관찰하기 위해서는 PBA로 세포를 2번 세척한 후, 세포막 내부화가 일어날 수 있도록 세포를 100 μl의 배양 배지에 현탁하여 30분간 37℃에서 반응시켰다. PBA로 1번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-Alexa flour 488(Invitrogen)를 4℃에서 20분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 4℃에서 세포 표면에 결합한 단일클론항체 NPB40와 37℃에서 반응했을 때 NPB40의 결합 정도를 플로우 사이토미트리로 비교했을 때, 인간배아암세포 NT2/D1, 인간 간암 세포 Huh7, HepG2, SNU449와 인간 췌장암 세포인 BxPC-3, PANC-1, SNU-213에서 단일클론항체 NPB40의 뚜렷이 감소한 것을 볼 수 있다(도 11). 이는 4℃에서 각종 암세포 표면에 결합한 단일클론항체 NPB40이 37℃에서 세포 활성에 의해 세포 내부화되어 표면에서의 결합이 감소하는 것을 의미한다.

[0132] **실시예 8. 단일클론항체 NPB40 항체 유전자 및 아미노산 분석**

[0133] **8-1. 단일클론항체 NPB40 유전자 클로닝**

[0134] 왕성하게 자라는 하이브리도마 NPB40 세포 $5X10^6$개를 원심 분리하여 수확한 후 찬 PBS로 세척하고 RNAiso plus reagent(TaKaRa, Otsu, Japan)으로 공급자의 프로토콜에 따라 전체 RNA을 추출하였다. 얻어진 전체 RNA의 A_{260}을 측정하여 RNA 양을 정량하였다. 전체 RNA 1 μg 당 1 unit의 DNase° 을 넣고 37℃에서 30분 동안 반응해 잔여의 DNA를 제거한 후 50mM EDTA 1 μl를 넣고 85℃에서 5분 동안 반응해 DNase° 를 불활성화 하고 전체 RNA를 변성시켰다. 전체 RNA와 Prime Script RT reagent Kit(TaKaRa)를 사용해 역전사중합효소 연쇄반응혼합액을 만들고 공급자의 프로토콜에 따라 cDNA을 합성하였다. (합성된 cDNA로 중쇄 클로닝을 위해서는 IgG1 불변영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 5'-gga gtc gac ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'(서열번호 12)인 올리고뉴클레오타이드 25 pmole과 중쇄항체 가변영역 N말단에 해당하는 프라이머인 염기서열 5'MH1 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC-3'(서열번호 13) 25pmole과 5'MH2 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3'(서열번호 14) 올리고뉴클레오타이드 25pmole을 넣어 연쇄 중합반응혼합액을 만들었다. 경쇄 클로닝을 위해서는 카파사슬 불변영역에 해당하는 프라이머인 5'-ggt gtc gac GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3'(서열번호 15) 올리고뉴클레오타이드와 카파사슬 가변영역 N 말단에 해당하는 프라이머인 5'MK 5'-cgg aag ctt GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3'(서열번호 16)과 각각을 사용하였다. 중합효소연쇄반응 생산물의 효율적인 클로닝을 위하여 중쇄의 경우는 5'-프라이머 말단에 EcoRI, 3'-프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 경쇄의 경우는 5'-프라이머 말단에 HindIII, 3'-프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄 또는 경쇄의 중합효소반응 프라이머와 1unit의 i-pfu DNA Polymerase(iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 각각 섞은 후 먼저 95℃에서 5분동안 1회 반응하고 95℃에서 1분, 35℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 30회 반응시켰다. 그 결과 중쇄 가변영역에 해당하는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 400bp, 경쇄 가변영역 해당되는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 390bp에 해당되는 위치에서 증폭된 DNA를 얻을 수 있었다(도 12A, 12B).

[0136] **8-2. NPB40 단일클론항체 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석**

[0137] 상기 실시 예에서 증폭해낸 NPB40 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 중합효소연쇄반응 산물을 중쇄는 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄는 HindIII와 SalI으로 처리한 후 1.0 %(w/v) 아가로스 젤에 전개시켜 FavorPrep GEL PCR Purification Kit(Favorgen, Pingtung, Taiwan)로 약 400bp와 390bp에 해당하는 DNA를 분리하였다. 중쇄유전자를 클로닝할 벡터로 사용할 pBluescript KS+를 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄유전자 클로닝 벡터로는 pBluescript KS+를 HindIII와 SalI으로 처리한 다음 FavorPrep GEL PCR Purification Kit로 분리하였다. 이 두 DNA를 T4 DNA 연결효소(New England Biolab, Massachusetts, U.S.A)로 연결하고 대장균 DH5α에 $CaCl_2$ 방법으로 형질 전환하였다.

[0138] 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 100㎍/㎖의 암피실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA-Spin plasmid mini prep kit(Intron, 한국)를 사용하여 공급자의 프로토콜에 따라 플라스미드 DNA를 분리하고 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 대장균 클론(도 12C), 경쇄의 경우 약 390bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 대장균 클론들을 선발하였다(도 12D). 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 Nucleotide sequencing(Bionics, Seoul, Korea)을 통해 확인하였다. 중쇄 및 경쇄 DNA의 염기서열을 아미노산으로 번역 후 항체 구조에 따른 항원인식결정 부위를 Kabat numbering을 통해 정리한 결과 중쇄는 subgroup Ⅱ에 해당하고 경쇄는 subgroup V에 해당하였다. 각 서열에 항원 결합 부위인 CDR1, 2, 3를 진한 색으로 표시하였

다(도 13, 도 14).

[0140] **실시예 9. 생쥐-인간 키메라 Chi-NPB40 항체의 발현 벡터 제조**

[0141] 생쥐 유래의 단일클론항체를 인간에 사용할 경우 면역 부작용을 일으킬 가능성이 있다. 이를 극복하기 위해 생쥐 유래의 단일클론항체를 면역부작용이 적은 생쥐-인간 키메라 항체(Chimeric antibody)로 제작하여 치료용 항체로써 사용할 수 있다. 생쥐 유래 단일클론항체 NPB40의 생쥐-인간 키메라 항체(Chi-NB40)를 개발하기 위해 NPB40 항체 유전자와 인간 항체의 불변부를 결합하였고, 이를 발현 벡터에 클로닝 하여 항체 생산을 위한 Chi-NPB40 항체의 발현 벡터를 제조했다. 먼저 생쥐에서 얻은 NPB40의 중쇄와 경쇄의 유전자를 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 약 400bp와 390bp에 해당하는 DNA를 Gel extraction kit(FAVORGEN, 대만)을 이용하여 DNA를 분리하였다. 중쇄 유전자 앞에 붙일 신호 펩타이드 서열(signal peptide)을 합성하기 위하여 pdCMV-dhfr 벡터(한국 등록특허 제 2120223호)를 주형으로 하여 h2B7-H.C-SLIC-5`(5`-GCC AGT GTG CTG GAA TTC ACT CTA ACC-3`, 서열번호 17) 프라이머와 NPB40-Chi-HC-SP-3`(5`-CTG CAC CTG GGA GTG GAC ACC TGT AGT TA-3`, 서열번호 18) 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그리고 NPB40의 중쇄 가변영역을 증폭하기 위해 중쇄 가변영역의 DNA를 주형으로 하여 NPB40-Chi-HC-SP-5`(5`-GTC CAC TCC CAG GTG CAG CTG CAG-3`, 서열번호 19) 프라이머와 NPB40-chi-HC-3`(5`-CCT TGG TGG AGG CTG AGG AGA CTG TGA G-3`, 서열번호 20) 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 다시, 중쇄 신호 펩타이드 서열과 NPB40 항체의 중쇄 가변 영역을 연결하기 위해, 상기 PCR로 제조한 DNA를 섞어 주형으로 하고 h2B7-H.C-SLIC-5` 프라이머와 H2B7-HC-SLIC-3`(AAG ACC GAT GGG CCC TTG GTG GAG-3`, 서열번호 21) 프라이머를 이용하여 recombinant PCR을 수행하였다. PCR 결과물을 1% 아가로스 젤에 전개시킨 결과 중쇄 가변영역과 중쇄 신호펩타이드 서열이 연결된 약 450bp에 해당하는 DNA를 확인할 수 있었다(도 15A). 이를 FavorPrep GEL쩨 PCR Purification Kit(Farvorgen, 대만)를 이용하여 분리하고 EcoRI 과 ApaI으로 처리한 후 다시 한 번 FavorPrep GEL쩨 PCR Purification Kit을 이용하여 분리하였다(도 15B). 이를 인간의 중쇄 불변영역(IgG1) 유전자를 포함하고 있는 pdCMV-dhfr 벡터의 EcoRI과 ApaI 자리에 T4 DNA 연결효소(NEB, 미국)을 사용하여 삽입하였다.

[0142] 경쇄 유전자 앞에 붙일 신호 펩타이드 서열(signal peptide)을 합성하기 위하여 pdCMV-dhfr 벡터를 주형으로 하여, h2B7-L.C-SLIC-5`(5`-ATA GGG AGA CCC AAG CTT CGG CAC GAG CAG A-3`, 서열번호 22) 프라이머와 NPB40-Chi-LC-SP-3`(5`-CAT CAC AAT ATC TCC TTC AAC ACC AGA CA-3`, 서열번호 23) 프라이머를 쌍으로 PCR을 수행하였다. 그리고 NPB40 항체의 경쇄 가변영역을 증폭하기 위해 경쇄 가변 영역의 DNA를 주형으로 NPB40-Chi-LC-SP-5`(5`-GTT GAA GGA GAT ATT GTG ATG ACA CAG TC-3`, 서열번호 24) 프라이머와 Chi63-B6-LC-SLIC-3`(5`-TGG TGC AGC CAC CGT ACG TTT GAT TTC CA-3`, 서열번호 25) 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 다시, 경쇄 신호 펩타이드 서열과 NPB40 항체의 경쇄 가변 영역을 연결하기 위해, 상기 PCR로 제조한 DNA를 섞어 주형으로 하고 h2B7-L.C-SLIC-5` 프라이머와 Chi63-B6-LC-SLIC-3` 프라이머를 이용하여 recombinant PCR을 수행하였다. PCR 결과물을 1% 아가로스 젤에 전개시킨 결과 경쇄 가변영역과 경쇄 신호펩타이드 서열이 연결된 약 430bp에 해당하는 DNA를 확인할 수 있었다(도 15C). 이를 FavorPrep GEL쩨 PCR Purification Kit를 이용하여 분리하고 HindIII와 BsiwI으로 처리한 후 다시 한 번 FavorPrep GEL쩨 PCR Purification Kit을 이용하여 분리하였다(도 15D). 이를 중쇄의 유전자가 삽입된 pdCMV-dhfr-chi-NPB40-HC 벡터의 HindIII와 BisWI 자리에 클로닝하여 인간 경쇄 불변영역(Ck) 유전자와 연결되도록 하고 `pdCMV-dhfr-chi-NPB40`이라 명명하였다. 최종 벡터 DNA는 대장균 DH5α에 RbCl2 방법으로 형질 전환한 다음 약 450bp 크기의 중쇄 유전자 삽입물을 가진 클론 및 약 430bp 크기의 경쇄 유전자 삽입물 가진 대장균 클론들을 선발하였다. 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 50㎍/ml의 암피실린이 함유된 5ml의 LB배지에서 밤새 배양한 후 DNA-spinTM Plasmid DNA purification kit(INTRON, 한국)을 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 확인하였다(Bionics, 한국). pdCMV-dhfr-chi-NPB40의 중쇄 및 경쇄 가변영역의 DNA 염기서열이 기존 NPB40 가변영역의 유전자 서열과 동일하였고, 신호펩타이드 서열 및 인간 중쇄와 경쇄 불변영역 유전자에 바르게 연결되어 있음을 확인하였다(도 16, 도 17).

[0144] **실시예 10. 생쥐-인간 키메라 항체 Chi-NPB40의 발현과 정제**

[0145] NPB40 생쥐 가변영역과 인간 불변영역으로 연결된 키메라 항체를 Chi-NPB40라고 명명하고 이 키메라 항체를 생산하고 정제하기 위하여, 먼저 인간 배아신장세포인 HEK293T 세포주를 150mm 배양 접시에 $1x10^7$ 세포를 20ml의 DMEM(Biowest, 프랑스) 배지에 배양했다. 50 ㎍의 pdCMV-dhfr-Chi-NPB40 발현 벡터와 75㎕의

Polyethyleneimine(1mg/ml)를 섞어준 뒤, 트랜스펙션 최적화 배지 500μl 와 섞어 배양한 세포의 세포 배양 배지 위에 뿌려주었다. 24시간 동안 배양한 후, 세포 배양 배지를 수집하여 항체를 정제했다. 수집한 세포 배양 배지를 Protein G agarose beads(Amicogen, 한국)로 채워진 column에 넣어주어 항체가 Protein G agarose beads와 결합 할 수 있게 한 뒤, PBS(pH8.0)으로 비드를 세척 후, 0.1M glycine(pH2.8) 10ml과 1M Tris-HCl(pH9.0)을 넣어 Protein G agarose beads에서 항체를 용출하였다. 이후 SDS-PAGE와 코마시 블루(Coomassie blue) 염색법을 통해 정제한 Chi-NPB40 키메라 항체의 순도를 확인하였다(도 18A). 또한, 염소의 항-인간 중쇄 항체(goat-α-hIgG-gamma chain-HRP, Invitrogen, 미국)와 염소의 항-인간 경쇄 항체(goat-α-hIgG-kappa chain-HRP, Bethyl, 미국)를 2차 항체로 이용하여 웨스턴 블랏팅을 통해 검출한 결과, 상기 키메라 항체는 인간 항체의 불변영역을 포함하는 항체인 것을 확인할 수 있었다(도 18B).

[0147] **실시예 11. 생쥐-인간 키메라 항체 Chi-NPB40의 기능 분석**

[0148] **11-1. Flow cytometry를 이용한 간암세포주에 대한 세포막 내부화 측정**

[0149] 키메라 항체 Chi-NPB40의 간암세포주 Huh7, SNU449에 대한 세포막 내부화(internalization)를 관찰하기 위해 플로우 사이토미트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(FBS; VWR, PA, U.S.A)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후, 세포를 40 μm 스트레이너에 통과시켜 단일세포로 준비하였다. 각각의 단일세포를 ml당 약 $1x10^5$개씩 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN_3 in PBS)에 섞은 후, 키메라 항체 Chi-NPB40와 4℃에서 30분간 반응시켰다. 내부화 여부를 관찰하기 위해서는 PBA로 세포를 세척하여 세포에 결합하지 않은 항체를 제거하고, 결합한 항체가 세포막 내부화 될 수 있도록 세포를 100μl의 배양 배지에 현탁하여 30분간 37℃에서 반응시켰다. 그리고 PBA로 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-인간 IgG-FITC(Invitrogen)를 4℃에서 20분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 4℃에서 반응했을 때와 비교할 때 37℃에서 추가반응 했을 때, 인간 간암 세포인 Huh7과 SNU-449에서 키메라 항체의 형광 세기가 감소한 것을 볼 수 있다(도 19). 이는 4℃에서 간암세포 표면의 B7-H3에 결합한 키메라항체 Chi-NPB40은 37℃에서 세포 활성이 활발할 경우 세포 내부로 B7-H3의 내부화를 유도할 수 있다는 것을 의미하며 이는 생쥐 단일클론항체 NPB40와 동일한 기능을 한다는 것을 보여준다.

[0151] **11-2. 약물 접합 키메라 Chi-NPB40 항체의 간암세포에서 세포 독성**

[0152] 앞선 연구 결과를 통해 생쥐 IgG1 불변영역을 가진 NPB40 항체 및 인간 IgG1 불변영역을 가진 키메라 Chi-NPB40 항체가 간암 세포 표면에 결합하면서 37℃ 온도 조건에서 세포에 내부화 되는 것을 확인하였다. 이러한 특성을 바탕으로 Chi-NPB40 항체에 항암 약물이 접합되어 있을 때, Chi-NPB40 항체가 암세포 내부에 약물을 전달하여 세포 독성을 나타낼 것으로 예상하였다. 이를 확인하기 위해 약물이 접합된 인간 IgG Fc 영역 특이적인 2차 항체[anti-human IgG(Fc Specific) antibody-drug conjugates(ADCs)]를 사용하였다. 구체적으로는 DNA Alkylation agent인 duocamycin이 접합된 α-HFc-CL-DMDM(AH-102DD, Moradec, 미국) 항체와 tubulin polymerization inhibitor인 monomethyl auristatin이 접합된 α-HFc-CL-MMAF(AH-102AF, Moradec) 항체를 이용하였다. 먼저 96 well plate(SPL, 한국)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 키메라 Chi-NPB40 항체 또는 이에 대한 대조군인 생쥐 유래 NPB40 항체를 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100nM 농도까지 각각 세포에 처리하였다. 37℃에서 10분간 항체가 세포 표면에 결합하게 한 후, 항체가 포함된 배지를 상기의 2차 항체가 12.7nM의 농도로 희석된 배지로 대체하였다. 세포를 48시간 동안 37℃ 5% CO_2 조건에서 배양한 후, 세포의 생존율을 알아보기 위해 Cell Counting Kit-8; CCK-8(K1018, APExBIO, 미국)을 사용하였다. 각 웰당 10μl의 CCK-8을 더해 3시간 동안 반응시키고 plate reader를 이용하여 OD_{450nm}에서의 흡광도를 측정하였다. 그 결과 α-HFc-CL-DMDM ADC와 함께 Chi-NPB40 항체를 처리한 경우 세포 생존율이 10 nM Chi-NPB40 항체 농도에서는 16%, 100nM농도에서는 39%까지 감소한 것을 확인하였다(도 20A, 20B). α-HFc-CL-MMAF를 사용하여 동일한 실험을 진행한 경우에서는 0.01 nM Chi-NPB40 항체 농도에서 10%, 1 nM Chi-NPB40 항체 농도에서 12%, 10nM농도에서는 46%, 100nM농도에서는 최대 60%까지 간암 세포의 생존율이 감소하였다(도 20C, 20D). 그러나 생쥐 유래 항체인 NPB40을 처리한 세포의 생존율은 큰 변화를 보이지 않았다. 이는 실험에서 사용한 약물이 접합된 2차 항체가 생쥐 항체가 아닌 인간 항체의 Fc 영역에 특이적으로

결합하며, 생쥐-인간 키메라 항체인 Chi-NPB40와 함께 세포 내부로 들어가 세포 독성을 유발하는 것을 증명한 것이다. 따라서 Chi-NPB40 항체가 간암세포에 내부화 되며, 이러한 특성을 바탕으로 B7-H3를 발현하는 간암세포 내부로 약물을 효과적으로 전달함으로써 항암 효과를 나타낸 것이다. 다른 간암 세포인 HepG2를 사용한 동일한 실험에서는 α-HFc-CL-DMDM을 사용할 경우, 100 nM의 Chi-NPB40 항체 농도에서 24%, 250nM 농도에서는 32%까지 간암세포 생존율이 감소하고(도 21A, 21B), α-HFc-CL-MMAF를 사용한 동일한 실험에서는 10 nM의 Chi-NPB40 항체 농도에서 12%, 100nM의 Chi-NPB40 항체 농도에서 23%, 250nM농도에서는 29%까지 간암세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다(도 21C, 21D). 또다른 간암 세포인 SNU-449를 사용한 동일한 실험에서는 α-HFc-CL-MMAF를 사용할 경우, 100nM의 Chi-NPB40 항체 농도에서 18%, 250 nM의 Chi-NPB40 항체 농도에서 38%까지 간암세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다(도 22A, 22B). 이런 결과는 Chi-NPB40 항체를 사용한 ADC 전략을 이용하여 다양한 간암세포들의 세포사멸을 유도할 수 있다는 것을 말해준다.

[0154] **실시예 12. 단일클론항체 NPB40의 in vivo 기능 분석**

[0155] **12-1. 항체 NPB40의 in vitro ADCC 기능 분석**

[0156] 항체가 생체내에서 항암효과를 보이는 대표적인 방법은 암세포에 결합한 항체를 인식한 숙주의 면역세포들이 효과적으로 암세포를 살상하는 것이다. 이와 같은 항체 의존적 세포 매개 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity; 이하 ADCC)을 생쥐에서 생체 실험 전에 in vitro에서 먼저 확인하였다. 상업적으로 구입한 ADCC core kit(Promega, G7010)를 이용할 경우 키메라 항체를 사용하여 in vitro ADCC를 측정할 수 있음으로 NPB40의 키메라 항체 Chi-NPB40을 사용하여 간암세포주에 결합한후 ADCC 기능을 유도할 수 있는지 측정했다. ADCC를 측정하기 위해 실험 하루 전 먼저 96 well white plate(SPL)의 외곽의 36웰을 제외한 안쪽 60 웰에 37,500개의 Huh7 세포를 10%FBS가 포함된 RPMI-1640 (Biowest, 프랑스) 배지 100㎕를 이용하여 분주 후 24시간동안 배양했다. 다음날 아침 배양배지 95㎕를 제거하고 ADCC core kit(Promega, G7010)에 포함된 ADCC assay buffer(1.4㎖ low IgG serum+33.6㎖ RPMI) 25㎕를 안쪽 60웰에, 바깥쪽 36웰에는 75㎕를 처리한 후, hIgG isotype control 및 Chi-NPB40 각각 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1 0.03, 0.01, 0 ㎍/㎖ 농도로 ADCC assay buffer에 희석한 희석액을 25㎕씩 각 웰 에 처리한 후 3.6㎖ ADCC assay buffer에 해동한 630㎕ ADCC bioassay effector cell(Jurkat cell)을 현탁하여 만든 세포 현탁액을 25㎕씩 처리하여 E:T ratio 12:1에서 37℃ 5% CO_2 조건에서 6시간 배양했다. 6시간 후 plate를 상온에서 15분간 두어 온도를 낮추고 미리 준비한 Bio-Glo luciferase assay reagent를 안쪽 60웰에 각 75㎕씩, 바깥쪽 3웰에 75㎕씩(blank control) 처리한 후 5분간 반응 후 luminescence를 측정했다(도 23). 그 결과, 농도 10, 30 및 100㎍/㎖에서 Chi-NPB40의 ADCC를 관찰할 수 있었다(도 23). 따라서 이런 결과는 생쥐-인간 키메라 항체인 Chi-NPB40은 간암세포인 Huh-7 세포에 대해 ADCC를 통한 세포 독성을 유발하여 항암효과를 보일 수 있다는 것을 확인해주는 것이다. 또한 이런 결과는 NPB40을 생쥐에 주사하여 항암 효과를 관찰할 때 NPB40이 숙주의 면역세포를 이용하여 항암효과를 보일 것이라는 것을 제시해주는 것이다.

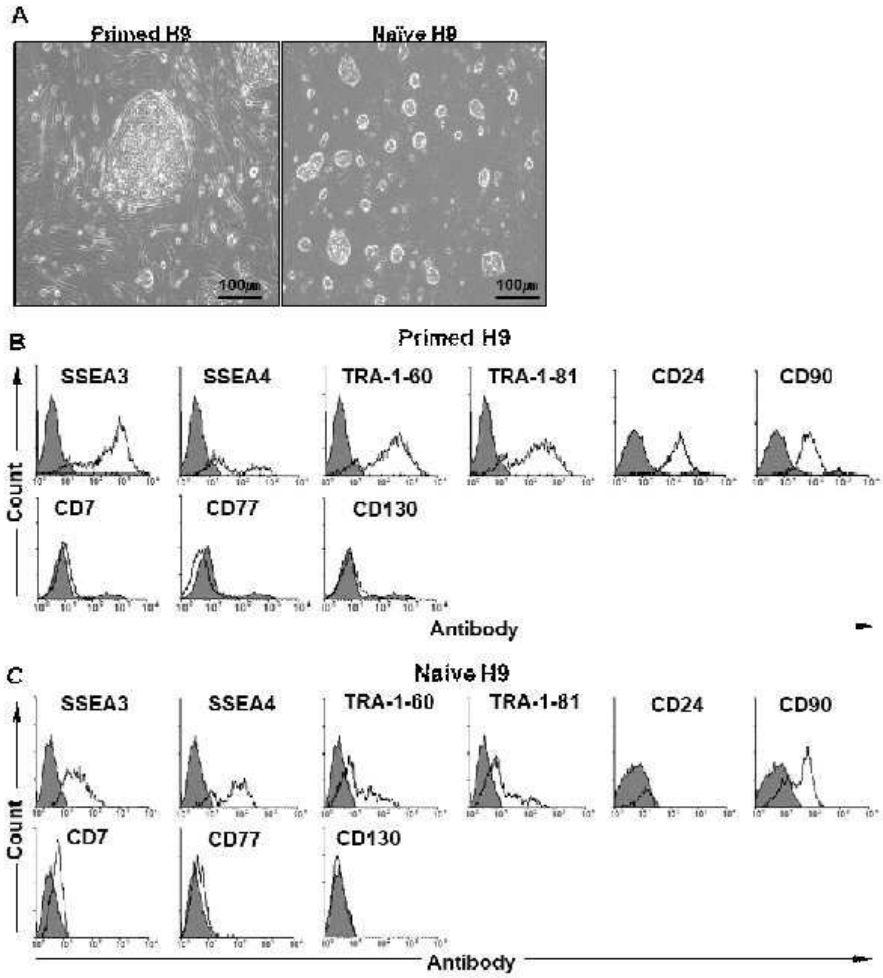
[0157]

[0158] **12-2. 간암세포주 이종이식 동물모델에서 NPB40의 항암 효과 확인**

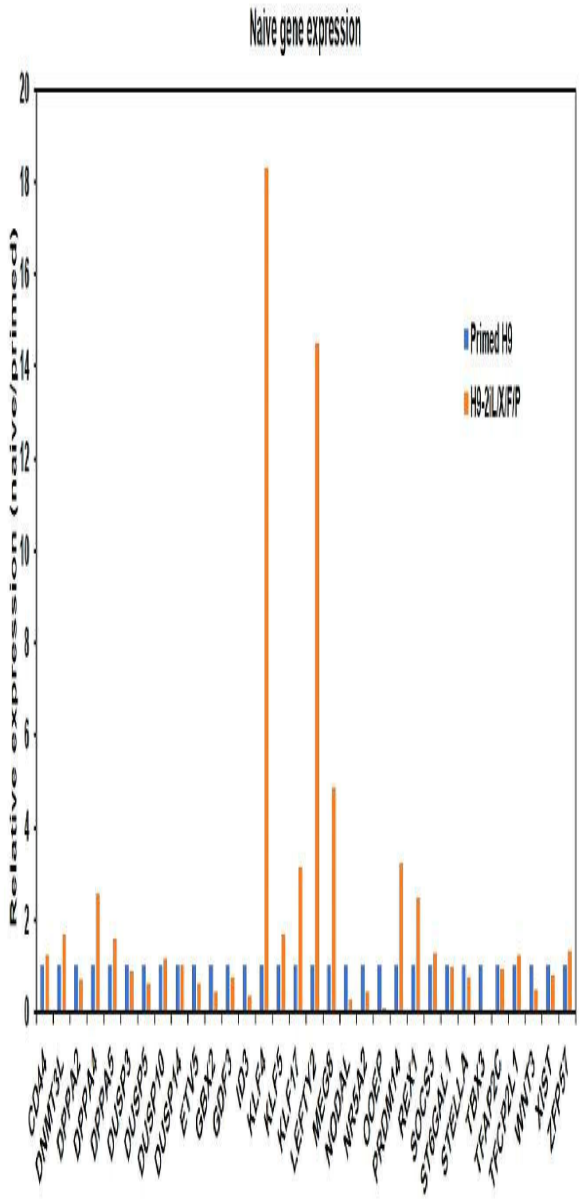
[0159] 상기에서 확인한 NPB40 항체의 기능에 기반하여 NPB40 항체가 B7-H3를 발현하는 암세포에 대하여 예방 또는 치료 용도로서 사용할 수 있음을 in vivo에서 확인하기 위해 간암세포주 이종이식 누드마우스 모델을 이용하여 암세포 성장을 확인했다. 간암세포인 Huh7 세포를 0.05% Trypsin-EDTA(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 떼어내고 10% fetal bovine serum(VWR)을 포함한 세포 배양 배지로 중화한 후 원심분리한 후 cell counting을 진행했다. 마리 당 $7.5X10^6$ 개의 세포를 PBS(pH7.4) 대 Matrigel(Corning)을 1:1로 섞어 만든 200㎕에 현탁시킨 다음 세포 현탁액을 1주일간 사육실에서 안정화시킨 5주령 암컷 Balb/C-nu 누드마우스(나라 바이오)의 dorsal flank에 피하주사로 이식했다. 50㎣ 이상의 암이 관찰된 생쥐에 각 NPB40 및 대응되는 mIgG1 isotype control항체를 10 mg/kg의 용량으로 꼬리 정맥 주사를 통해 주 3회(2일 간격으로) 투여했다. 각 날짜 별 암의 부피는 1/2*장축*단축^{2}으로 계산하여 측정하고 통계 처리를 진행하였다(도 24A). 암의 크기는 최종 시점인 약물 투여 시작 20일 후 희생시킨 쥐에서 얻은 암 덩어리의 크기를 비교한 것이다(도 24B). 그 결과 NPB40을 투여한 생쥐는 대조군에 비해 낮은 암 성장을 보였다. 20일차에 희생시킨 생쥐에서 수확한 암 덩어리의 크기를 비교했을 때 NPB40을 투여한 생쥐에서 얻은 암은 대조군에 비해 크기가 줄어드는 것을 확인했으며, 이 결과로 NPB40이 in vivo에서 암의 성장을 감소시키며 이에 따라 NPB40을 in vivo에서 암의 예방 및 치료 용도로 사용될 수 있음을 확인해 준다.

도면

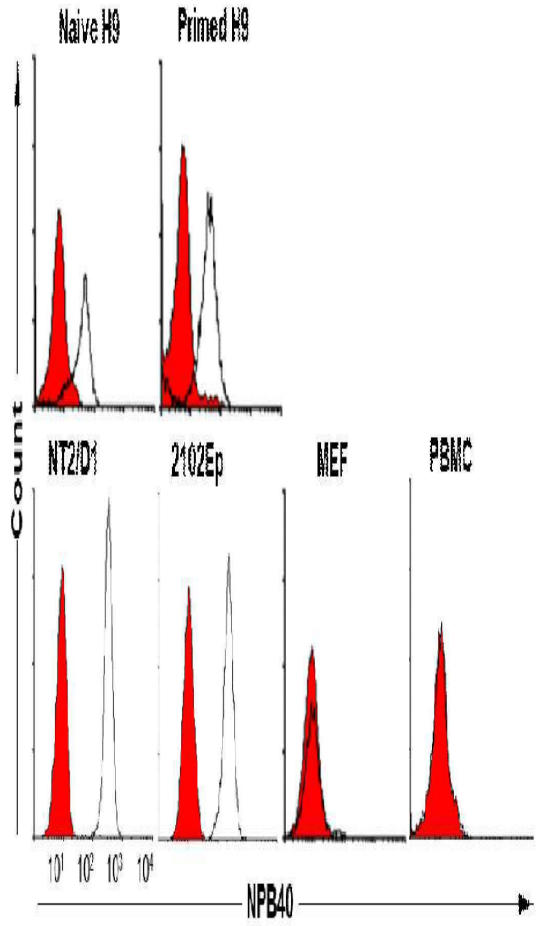
도면1


A
Primed H9
Naïve H9
100㎛
100㎛
B
Primed H9
SSEA3
SSEA4
TRA-1-60
TRA-1-81
CD24
CD90
CD7
CD77
CD130
Count
Antibody
C
Naive H9
SSEA3
SSEA4
TRA-1-60
TRA-1-81
CD24
CD90
CD7
CD77
CD130
Count
Antibody

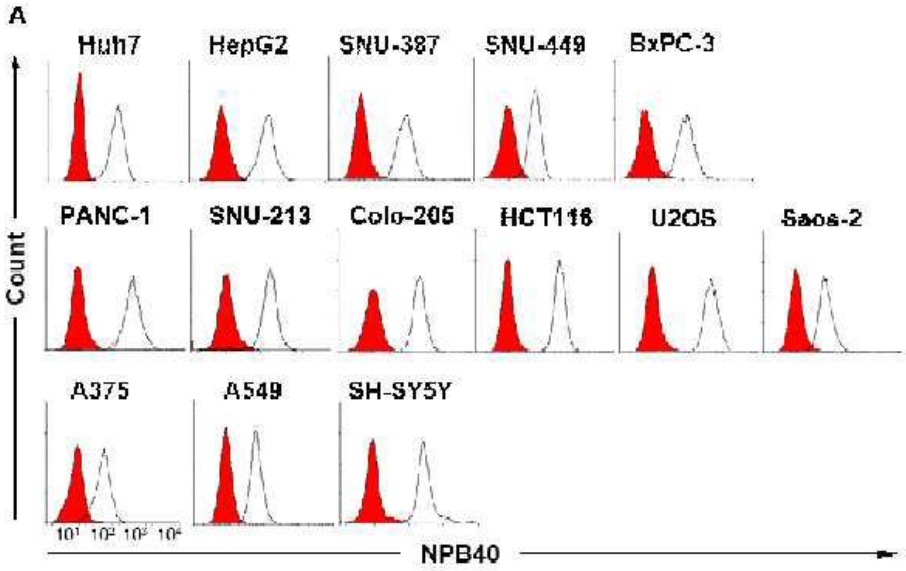
도면2

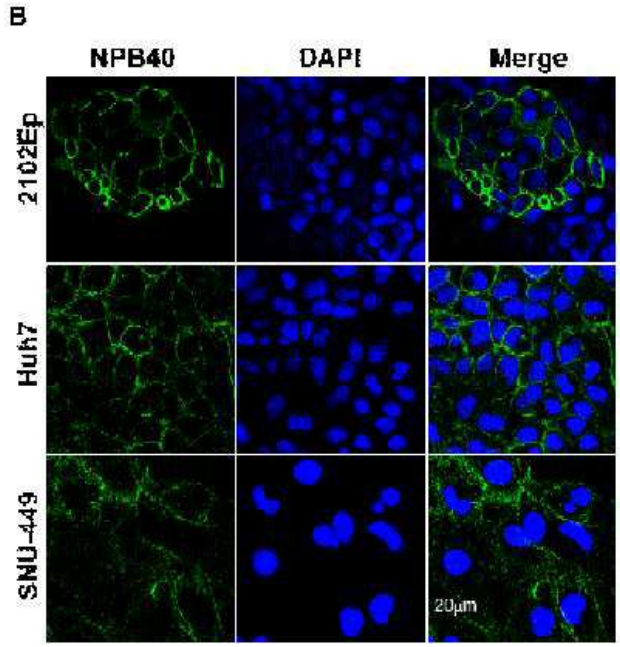

Naive gene expression
Relative expression (naive/primed)
Primed H9
H9-2LXIFIP

도면3

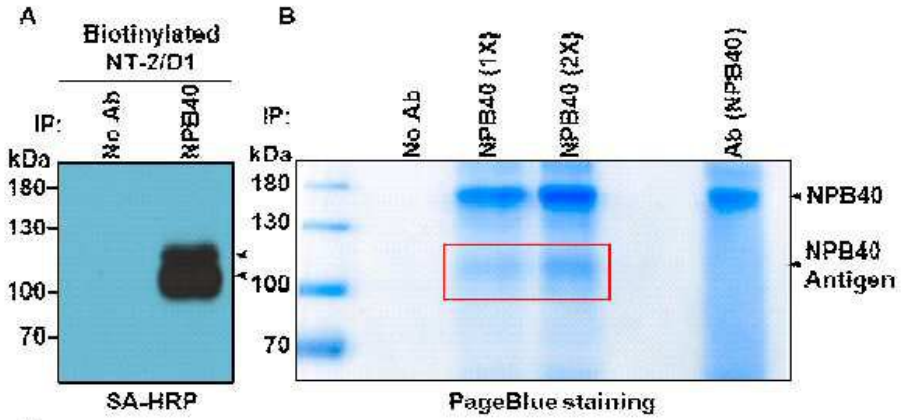


도면4


A
Huh7
HepG2
SNU-387
SNU-449
BxPC-3
PANC-1
SNU-213
Colo-205
HCT116
U2OS
Saos-2
A375
A549
SH-SY5Y
Count
NPB40


B
NPB40
DAPI
Merge
2102Ep
Huh7
SNU-449
20μm

도면5



C

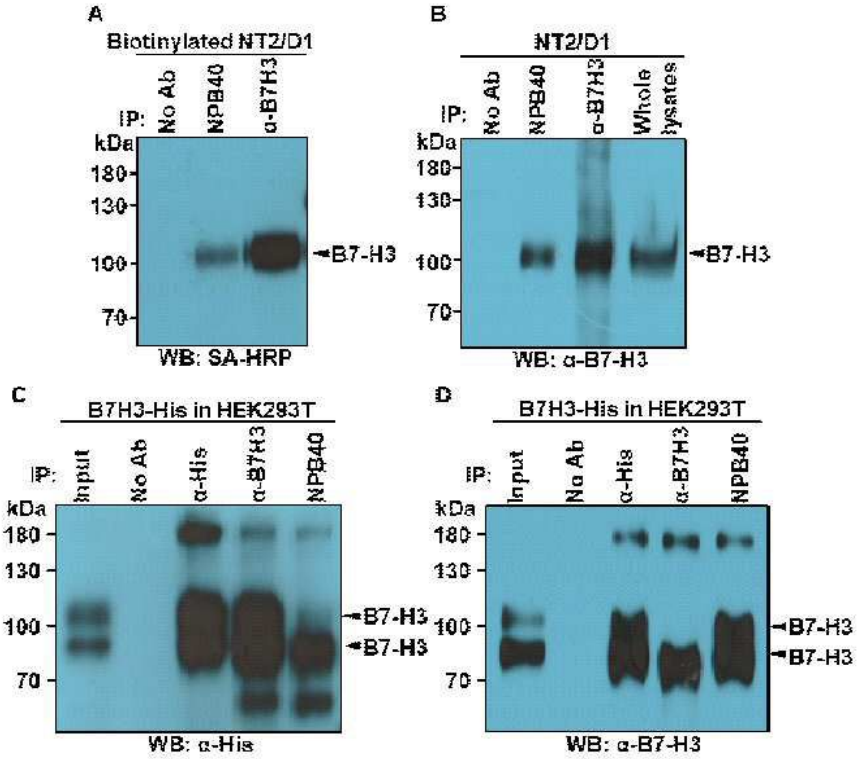
tr|A0A0C4DGH0|A0A0C4DGH0_HUMAN CD276 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD276 PE=1 SV=1

Database:	uniprot-Homosapiens
Score:	46
Monoisotopic mass (M$_r$):	42255
Calculated pI:	4.64
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications:	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications:	Deamidated (NQ), Oxidation (M)

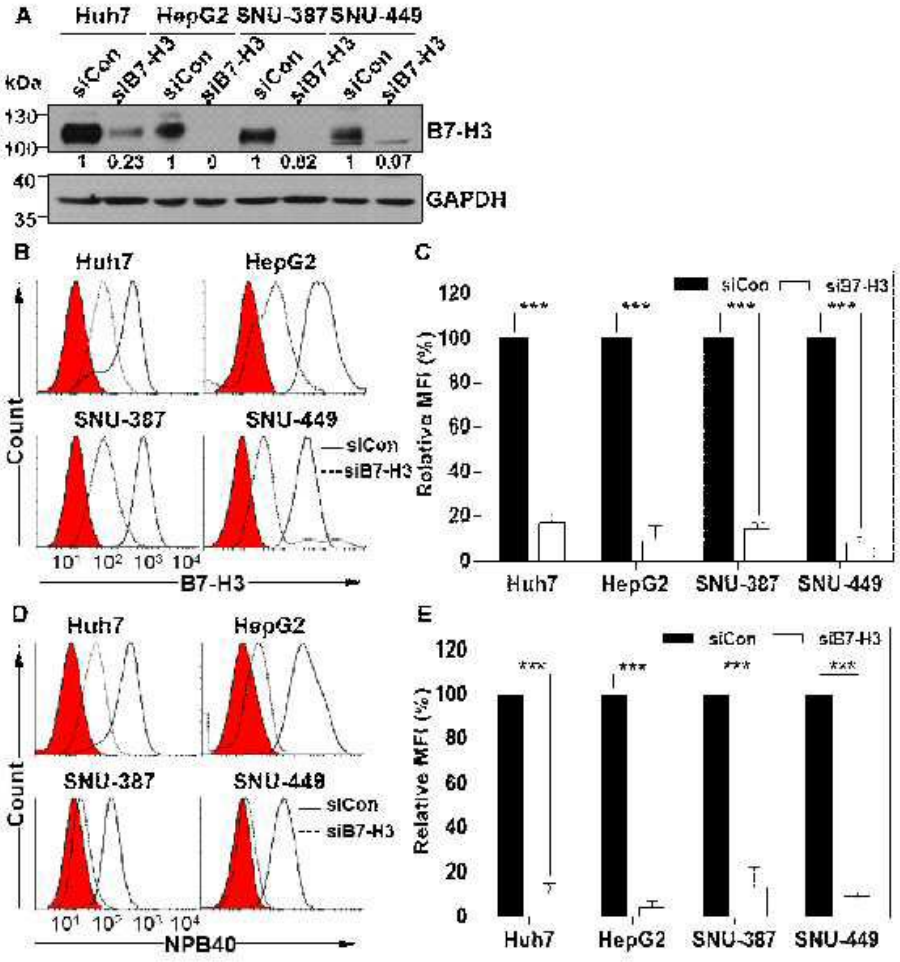
Matched peptides shown in ***bold red***.

```
  1 MTLEPNKDLR PGDTVTITCS SYQGYPEAEV FWQDGQGVPL TGNVTTSQMA
 51 NEQGLFDVHS ILRVVLGANG TYSCLVRNPV LQQDAHSSVT ITPQRSPTGA
101 VEVQVPEDPV VALVGTDATL RCSFSPEPGF SLAQLNLIWQ LTDTKQLVHS
151 FTEGRDQGSA YANRTALFPD LLAQGNASLR LQRVRVADEG SFTCFVSIRD
201 FGSAAVSLQV AAPYSKPSMT LEPNKDLRPG DTVTITCSSY RGYPEAEVFW
251 QDGQGVPLTG NVTTSQMANE QGLFDVHSVL RVVLGANGTY SCLVRNPVLQ
301 QDAHGSVTIT GQPMTFPPEA LWVTVGLSVC LIALLVALAF VCWRKIKQSC
351 EEENAGAEDQ DGEGEGSKTA LQPLKHSDSK EDDGQEIA
```

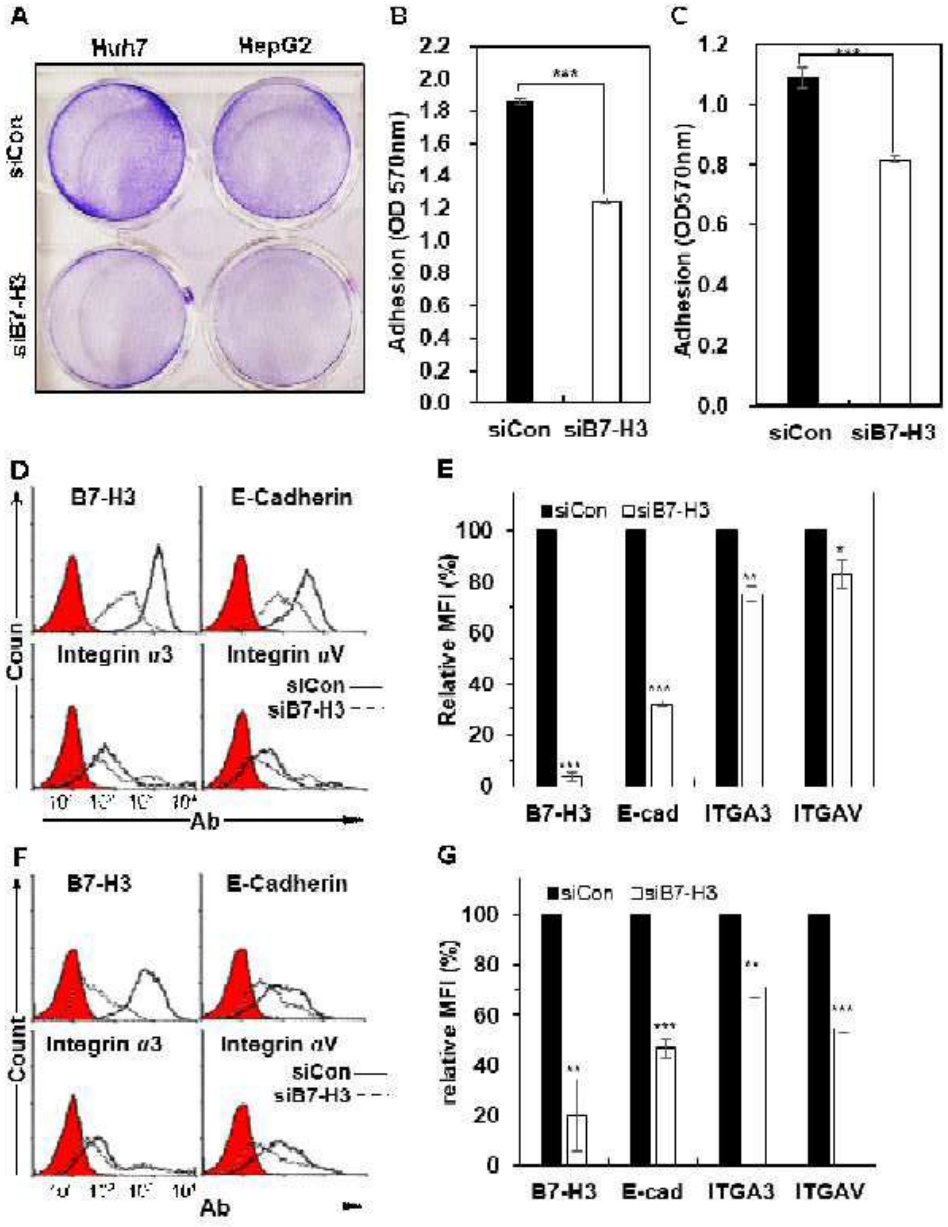
도면6


A
Biotinylated NT2/D1
IP:
No Ab
NPB40
α-B7H3
kDa
180
130
100
70
B7-H3
WB: SA-HRP
B
NT2/D1
IP:
No Ab
NPB40
α-B7H3
Whole Lysates
kDa
180
130
100
70
B7-H3
WB: α-B7-H3
C
B7H3-His in HEK293T
IP:
Input
No Ab
α-His
α-B7H3
NPB40
kDa
180
130
100
70
B7-H3
B7-H3
WB: α-His
D
B7H3-His in HEK293T
IP:
Input
No Ab
α-His
α-B7H3
NPB40
kDa
180
130
100
70
B7-H3
B7-H3
WB: α-B7-H3

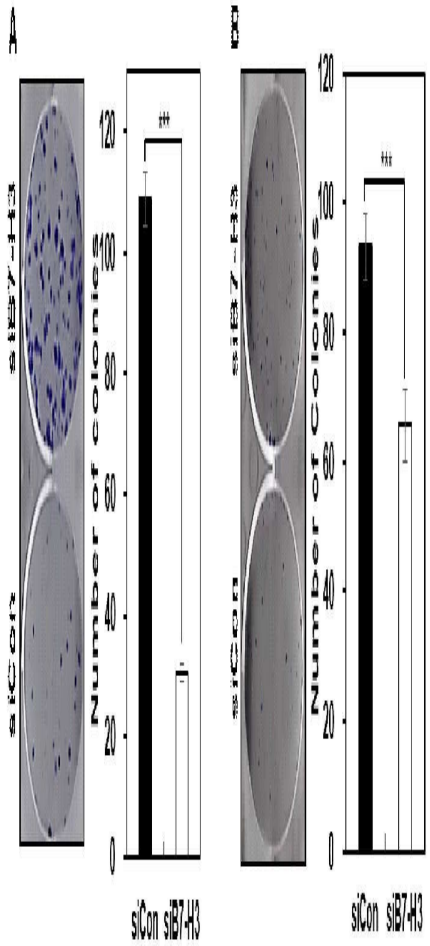
도면7


A
Huh7
HepG2
SNU-387
SNU-449
siCon
siB7-H3
kDa
130
100
40
35
B7-H3
GAPDH
1 0.23 1 0 1 0.02 1 0.07
B
Huh7
HepG2
SNU-387
SNU-449
siCon
siB7-H3
Count
B7-H3
C
siCon
siB7-H3
Relative MFI (%)
Huh7
HepG2
SNU-387
SNU-449
D
NPB40
E

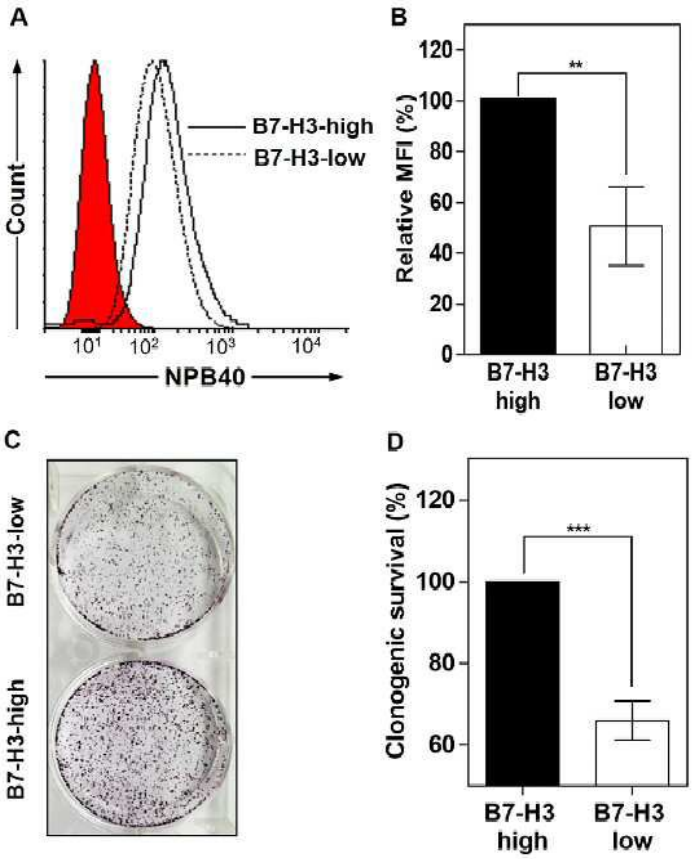
도면8


A
Huh7
HepG2
siCon
siB7-H3
B
Adhesion (OD 570nm)
siCon
siB7-H3
C
Adhesion (OD570nm)
siCon
siB7-H3
D
B7-H3
E-Cadherin
Integrin α3
Integrin αV
siCon
siB7-H3
Ab
E
siCon
siB7-H3
Relative MFI (%)
B7-H3
E-cad
ITGA3
ITGAV
F
B7-H3
E-Cadherin
Integrin α3
Integrin αV
siCon
siB7-H3
Count
Ab
G
siCon
siB7-H3
relative MFI (%)
B7-H3
E-cad
ITGA3
ITGAV

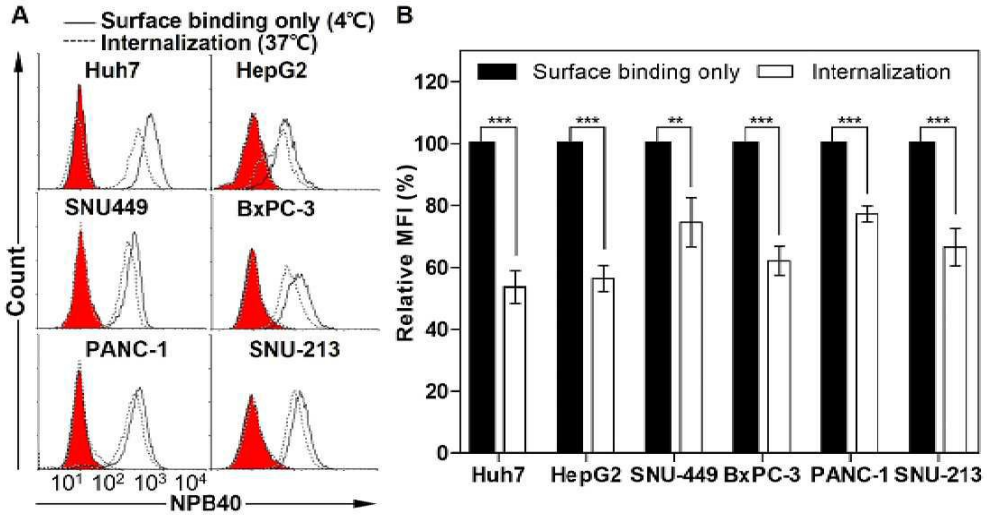
도면9



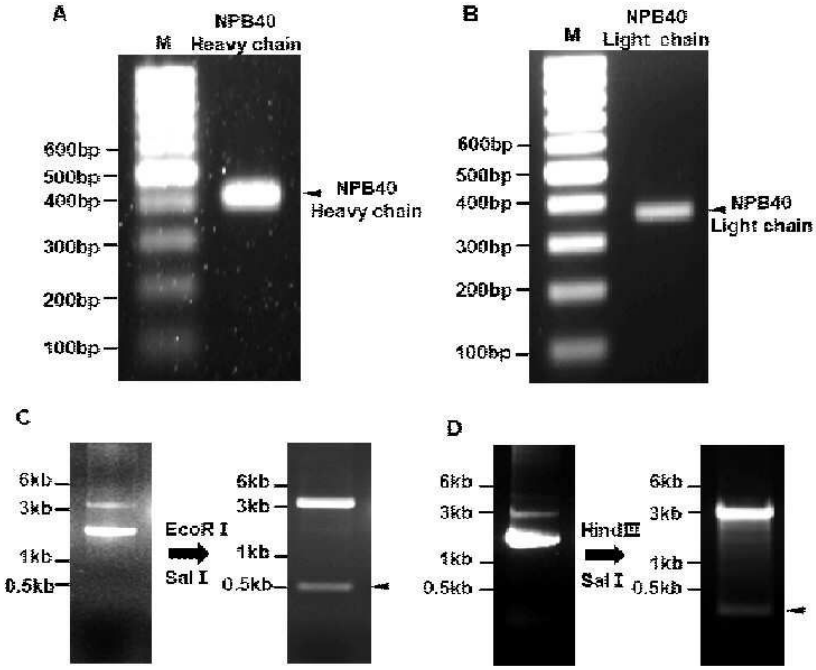
도면10


A
B7-H3-high
B7-H3-low
Count
NPB40
B
Relative MFI (%)
B7-H3 high
B7-H3 low
C
B7-H3-low
B7-H3-high
D
Clonogenic survival (%)
B7-H3 high
B7-H3 low

도면11


A
Surface binding only (4℃)
Internalization (37℃)
Huh7
HepG2
SNU449
BxPC-3
PANC-1
SNU-213
Count
NPB40
B
Surface binding only
Internalization
Relative MFI (%)
Huh7
HepG2
SNU-449
BxPC-3
PANC-1
SNU-213

도면12



도면13

Reavy chain of NPB40 variable region : subgroup II

CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCA GGG GGA GGC TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC 60
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu 20

CDR-H1

TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT 120
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr 40

CDR-H2

CCA GAC AAG AGG CTG GAG TTG GTC GCA ACC ATT AAT GGT AAT GGT GGT AAC ACC TAC TAC 180
Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Gly Asn Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr 60

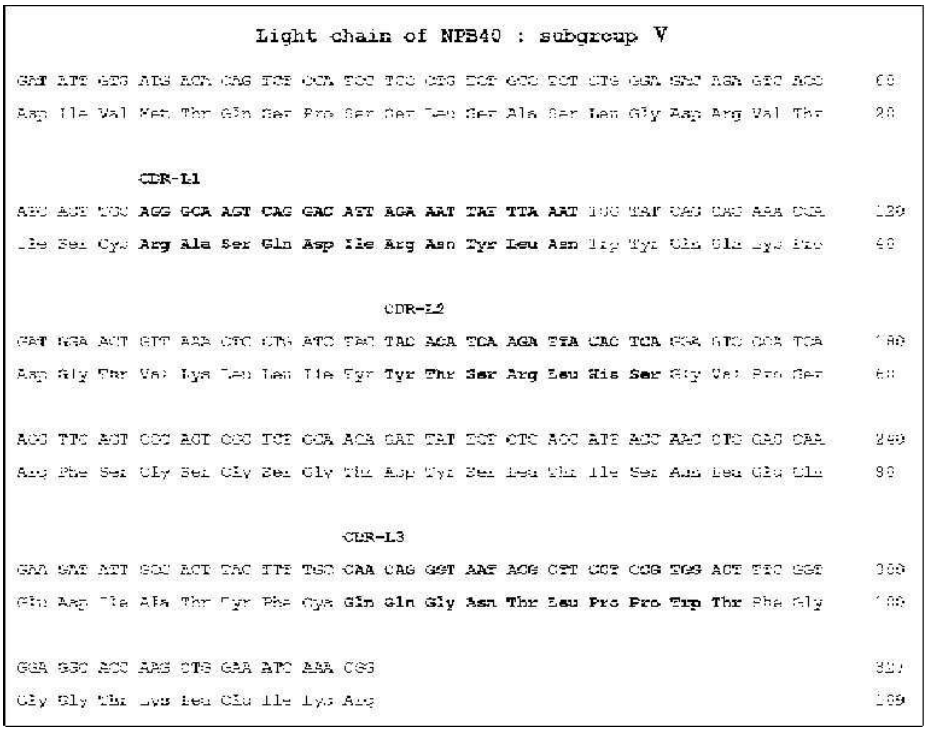
TCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC 240
Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 80

CDR-H3

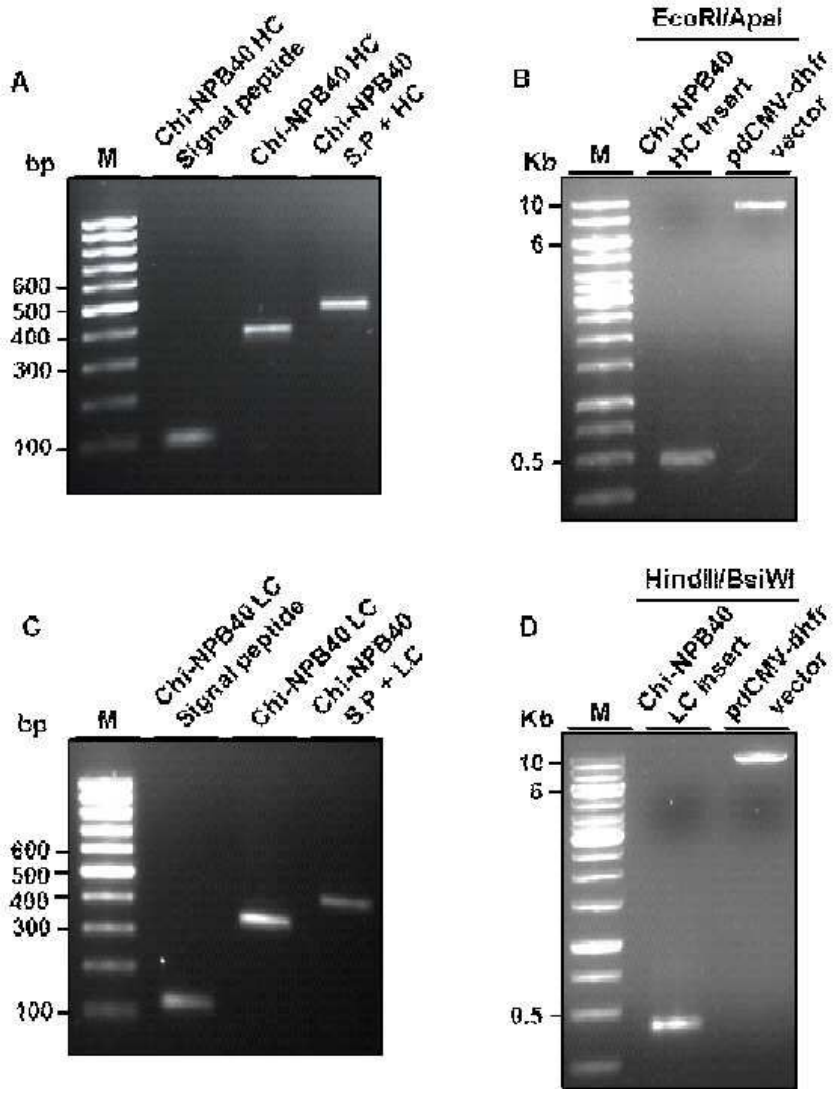
CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA TCC TAT 300
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr 100

GGT AAC TAC CAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA 357
Gly Asn Tyr His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser 119

도면14



도면15


A
Chi-NPB40 HC Signal peptide
Chi-NPB40 HC
Chi-NPB40 S.P + HC
bp
M
600
500
400
300
100
B
EcoRI/ApaI
Chi-NPB40 HC insert
pdCMV-dhfr vector
Kb
M
10
6
0.5
C
Chi-NPB40 LC Signal peptide
Chi-NPB40 LC
Chi-NPB40 S.P + LC
bp
M
600
500
400
300
100
D
HindIII/BsiWI
Chi-NPB40 LC insert
pdCMV-dhfr vector
Kb
M
10
6
0.5

도면16

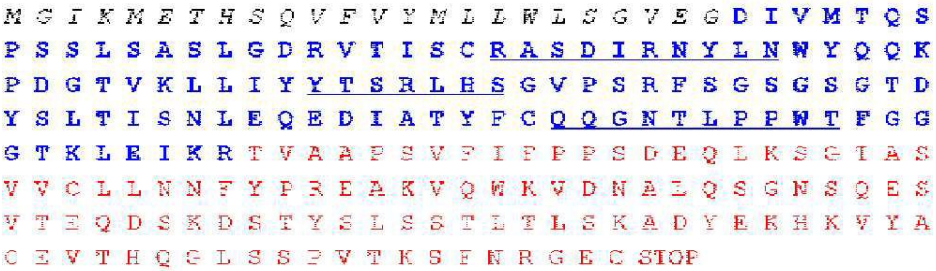
Chimeric antibody Chi NPB40 중쇄 (IgG1) 아미노산 서열



굵은석: 신호 펩타이드 아미노산 서열
가는석: NPB40 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (mouse), 밑줄은 CDR
빨간석: heavy chain constant region 아미노산 서열 (human IgG1)

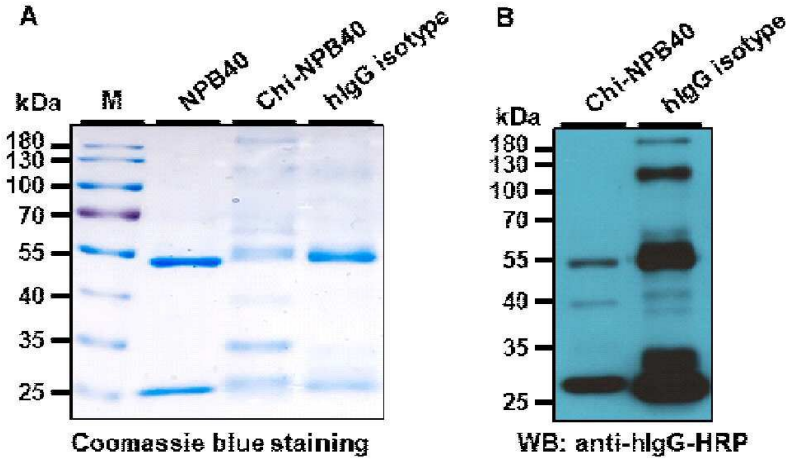
도면17

Chimeric antibody Chi NPB40 경쇄 아미노산 서열

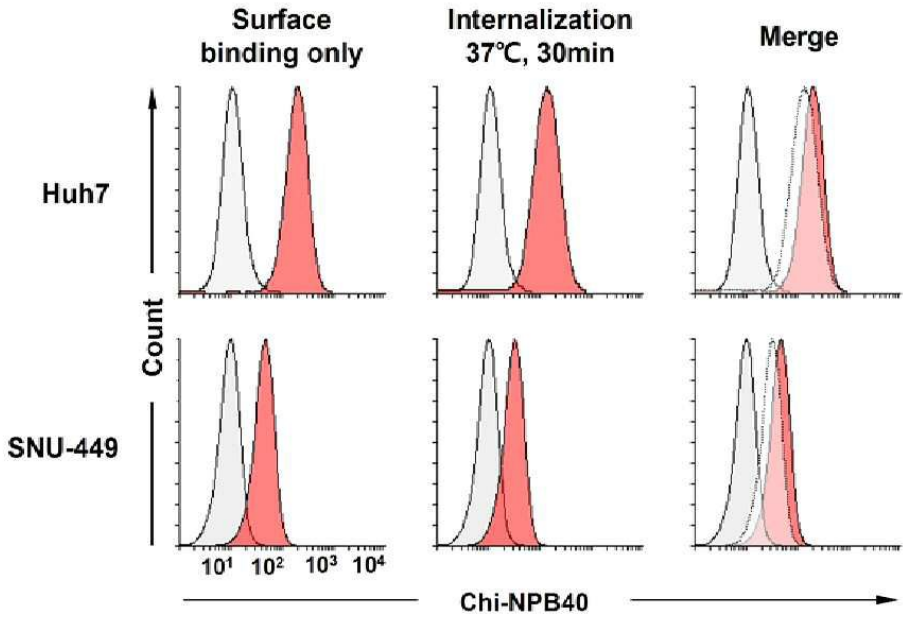


굵은석: 신호 펩타이드 아미노산 서열
가는석: Chi NPB40 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (mouse), 밑줄은 CDR
빨간석: kappa chain constant region 아미노산 서열 (human Ck)

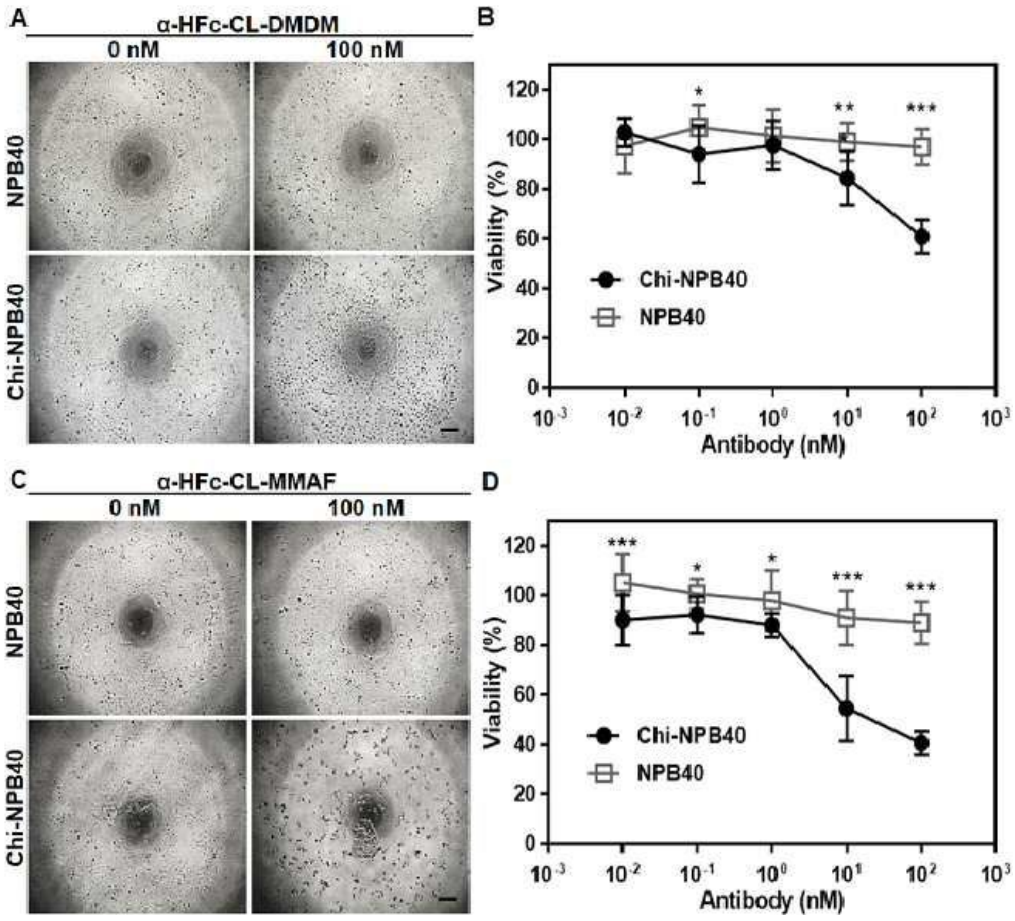
도면18


A
kDa
M
NPB40
Chi-NPB40
hIgG isotype
180
130
100
70
55
40
35
25
Coomassie blue staining
B
kDa
Chi-NPB40
hIgG isotype
180
130
100
70
55
40
35
25
WB: anti-hIgG-HRP

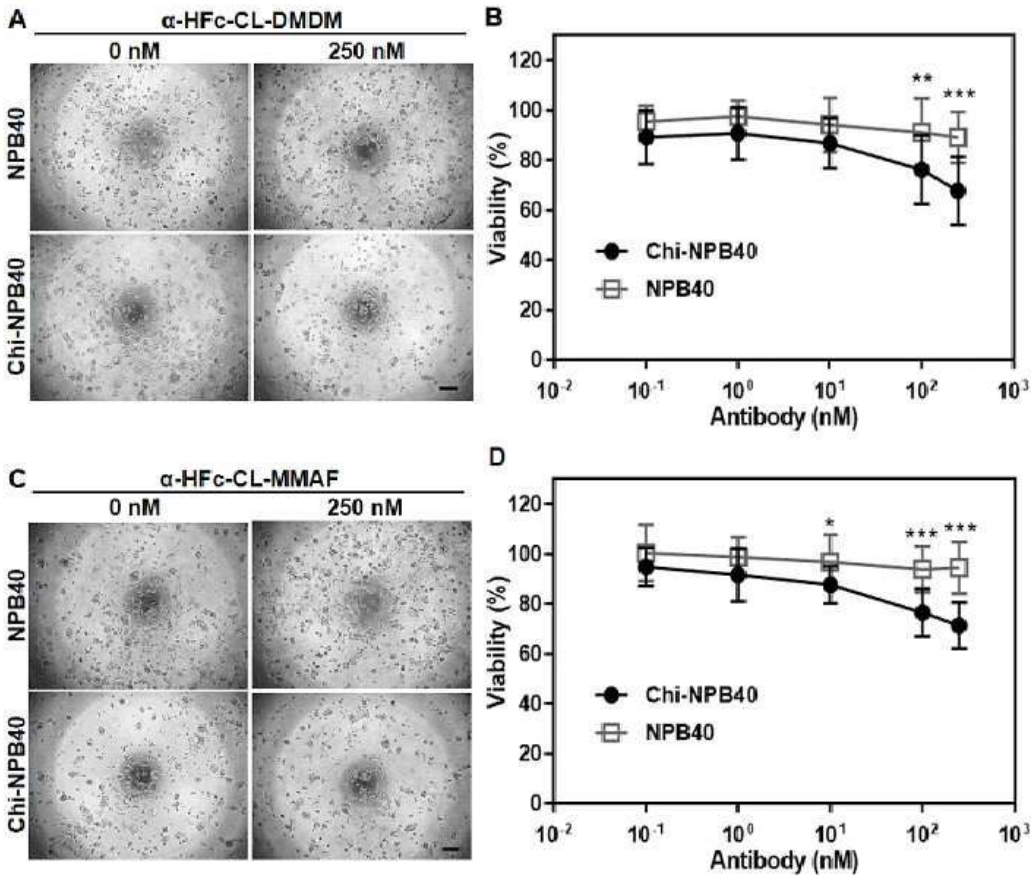
도면19


Surface binding only
Internalization 37℃, 30min
Merge
Huh7
SNU-449
Count
10¹ 10² 10³ 10⁴
Chi-NPB40

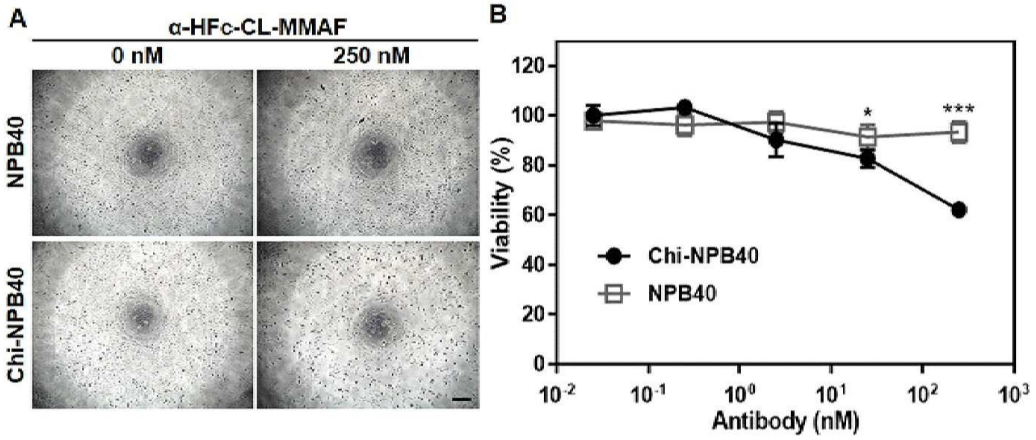
도면20


A
α-HFc-CL-DMDM
0 nM
100 nM
NPB40
Chi-NPB40
B
Viability (%)
Antibody (nM)
Chi-NPB40
NPB40
C
α-HFc-CL-MMAF
0 nM
100 nM
NPB40
Chi-NPB40
D
Viability (%)
Antibody (nM)
Chi-NPB40
NPB40

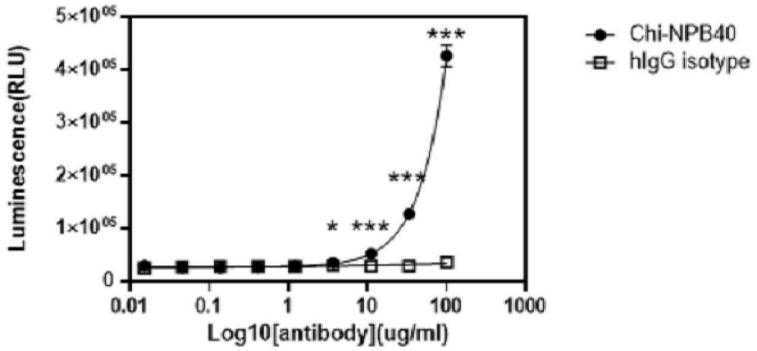
도면21


A
α-HFc-CL-DMDM
0 nM
250 nM
NPB40
Chi-NPB40
B
Viability (%)
Antibody (nM)
Chi-NPB40
NPB40
C
α-HFc-CL-MMAF
D

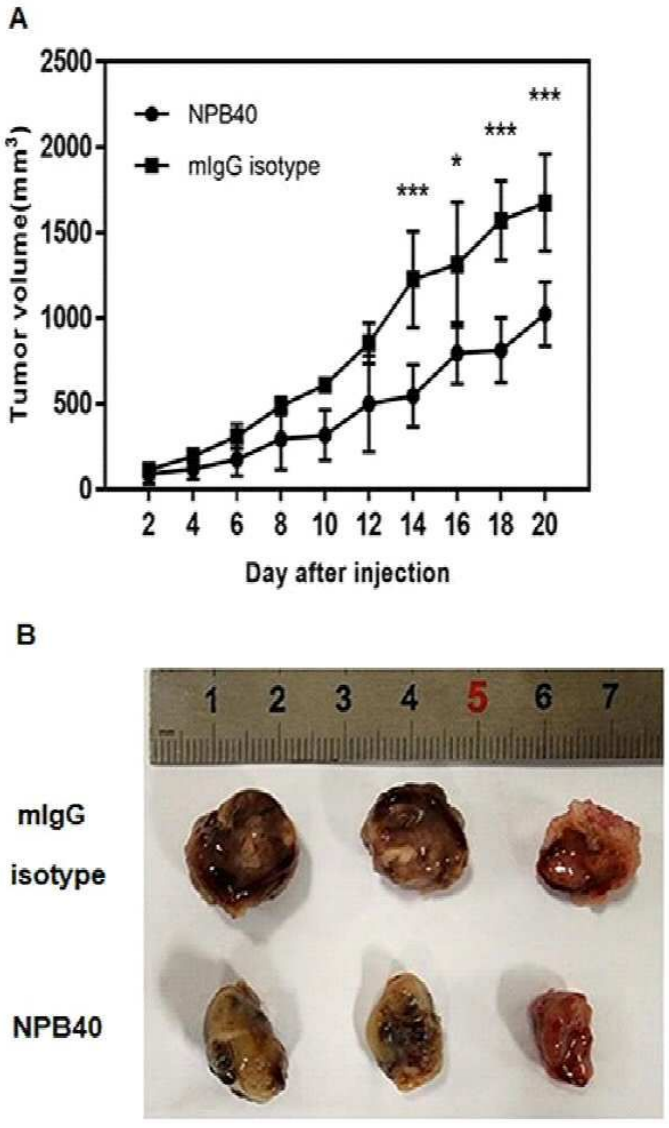
도면22


A
α-HFc-CL-MMAF
0 nM
250 nM
NPB40
Chi-NPB40
B
Viability (%)
Antibody (nM)
Chi-NPB40
NPB40

도면23


Luminescence(RLU)
5×10^05
4×10^05
3×10^05
2×10^05
1×10^05
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Log10[antibody](ug/ml)
Chi-NPB40
hIgG isotype
***
***
* ***

도면24


A
Tumor volume(mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Day after injection
NPB40
mIgG isotype
***
*
***
***
B
mIgG
isotype
NPB40
1 2 3 4 5 6 7

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.