(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0007783
(43) 공개일자 2024년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57492 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0083514
(22) 출원일자 2022년07월07일
심사청구일자 2022년07월07일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
장수환
경기도 남양주시 경춘로1286번길 35, 1604동 704호(평내동, 상록데시앙아파트)
김용섭
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)
최은아
대구광역시 북구 칠곡중앙대로115길 24, 101동 1508호(읍내동, 칠곡우방타운)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

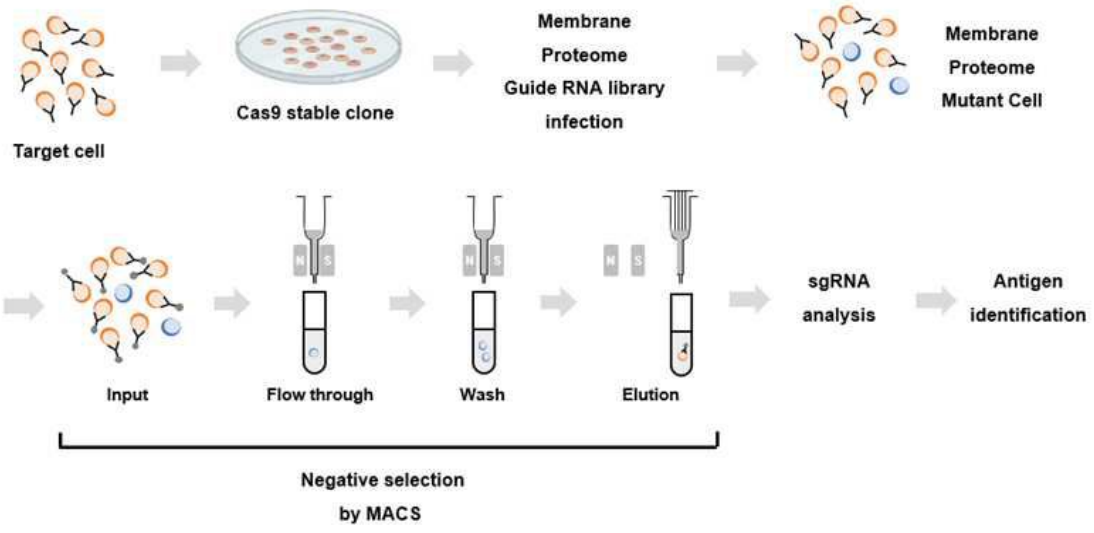
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **신규 항체에 대한 세포 표면 항원 발굴 방법**

(57) 요 약

신규 항체에 대한 세포 표면 항원 발굴 방법에 관한 것으로, 일 양상에 따른 스크리닝 방법에 따르면, 신규 항체와 결합하는 세포 표면 항원을 정확하게 스크리닝할 수 있으며, 신규 항체와 잘 결합하는 세포를 통해 상기 항체에 대한 세포 표면 항원을 효율적으로 스크리닝할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465034392
과제번호 HR21C0198
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원육성(R&D)
연구과제명 치료표적 발굴 특화 인공지능 기반의 개방형 신약개발 지원
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서울아산병원
연구기간 2021.07.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711169244
과제번호 2021R1A2C2005472
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 발암인자 microRNA-155와 Non-canonical Hippo 신호의 기능적 상호작용에 의한 암 면역회피 현상의 규명 및 제어
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

분리된 세포에 상기 세포의 세포-표면-단백질에 대한 가이드 RNA(guide RNA: gRNA) 라이브러리가 도입된 벡터를 처리하는 단계;

상기 벡터가 처리된 세포에 분리된 세포와 결합능을 갖는 단백질을 처리하는 단계; 및

상기 단백질이 처리된 세포에서 상기 처리된 단백질과의 결합능을 상실한 세포를 수득하는 단계를 포함하는 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 세포와 결합능을 갖는 단백질은 상기 세포-표면-단백질에 특이적으로 결합하는 단백질인 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 세포-표면-단백질에 특이적으로 결합하는 단백질은 항체, 애피바디(affibody), 및 다이아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 세포는 암세포인 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 세포는 Cas9 뉴클라아제를 포함하는 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 벡터는 바이러스성 벡터인 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 벡터가 처리된 세포는 하나의 세포 당 하나의 벡터가 도입된 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 가이드 RNA 라이브러리는 세포-표면-단백질의 유전자 한 개당 1 내지 10 개의 가이드 RNA를 포함하는 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 방법은 상기 처리된 단백질과의 결합능을 상실한 세포에 포함된 가이드 RNA를 분석하는 단계; 및

상기 분석된 가이드 RNA가 표적하는 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 처리된 단백질과의 결합능을 상실한 세포를 수득하는 단계는 상기 단백질이 처리된 세포를 상기 처리된 단백질과 결합하는 표면을 가진 비드에 처리하는 단계; 및

상기 비드와 결합하지 않은 세포를 수득하는 단계를 포함하는 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서,

상기 방법은 상기 분석된 가이드 RNA가 표적하는 유전자가 넉다운(knockdown) 또는 넉아웃(knockout)된 대조군 세포를 준비하는 단계; 및

상기 대조군 세포에 항체를 처리하여 항원-항체 반응 여부를 측정하는 단계를 포함하는 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 항원-항체 반응은 효소면역분석법, 방사능면역분석법, 샌드위치 측정법, 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법, 형광면역법, 효소기질발색법, 항원-항체 응집법으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 이용하여 측정하는 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

청구항 13

청구항 1에 있어서,

상기 세포-표면-단백질은 종양 관련 항원(Tumor-associated antigen, TAA)인 것인, 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 신규 항체에 대한 세포 표면 항원 발굴 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptor, CAR)를 통한 세포치료가 유망한 항암치료 방법으로 대두되고 있으며, 환자 내 면역 작용이 암세포 특이적 신생항원(neoantigen)에 집중될 수 있도록 유도하여 면역 항암 치료의 효과를 높일 수 있는 환자 맞춤형 항암 백신에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 이러한 항암 치료에 있어서, 유효한 항원을 스크리닝하는 기술이 핵심으로 작용한다.

[0003] 일반 적으로 신생항원 규명을 위해, cDNA 라이브러리 스크리닝을 이용한 방법이 활용되었다. 이 방법은 cDNA 라이브러리와 MHC 분자를 세포주 내에서 과발현시키고, T 세포 활성화를 유도하는 항원 식별을 위한 T 세포 공동배양 단계를 통해 이루어졌다. 그러나, 이는 노동 집약적이며, 비용이 많이 들고 모든 종양항원을 식별하기 어렵다는 단점이 존재하였다.

[0004] 또한, 항원 발굴을 위해 일반적으로 사용되는 방법인 Immunoprecipitation-LC-MS/MS 역시 효율이 저조하여, 현재 효과적으로 신규 항체에 대한 세포 표면 항원을 발굴하는 기술이 없는 실정이다.

[0005] 따라서, 항원을 기반으로한 항암 치료 등에 있어서, 현재의 비효율적인 항원 발굴 기술이 기술적 걸림돌으로 작

용하고 있으며, 효과적으로 항원을 발굴할 수 있는 기술이 요구되는 실정이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 이를 바탕으로 연구를 수행하던 중, 세포표면단백질에 대한 가이드 RNA 라이브러리를 구축하고, 이를 Cas9과 함께 암세포에 도입함으로써, 효과적으로 세포 표면 항원을 발굴할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 공개특허 10-2022-0063988

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 분리된 세포에 상기 세포의 세포-표면-단백질에 대한 가이드 RNA(guide RNA: gRNA) 라이브러리가 도입된 벡터를 처리하는 단계; 상기 벡터가 처리된 세포에 분리된 세포와 결합능을 갖는 단백질을 처리하는 단계; 및 상기 단백질이 처리된 세포에서 상기 처리된 단백질과의 결합능을 상실한 세포를 수득하는 단계를 포함하는 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 일 양상은 분리된 세포에 상기 세포의 세포-표면-단백질에 대한 가이드 RNA(guide RNA: gRNA) 라이브러리가 도입된 벡터를 처리하는 단계; 상기 벡터가 처리된 세포에 분리된 세포와 결합능을 갖는 단백질을 처리하는 단계; 및 상기 단백질이 처리된 세포에서 상기 처리된 단백질과의 결합능을 상실한 세포를 수득하는 단계를 포함하는 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0010] 상기 분리된 세포는 암세포일 수 있다.

[0011] 본 명세서에서 용어, "암"은 전형적으로 비정상적 또는 제어되지 않은 세포 성장의 특징을 가지는, 동물에서의 생리학적 상태를 의미한다. 암은 예를 들어, 전이, 정상적으로 기능하는 주변 세포에 대한 간섭, 비정상 레벨에서 사이토카인(cytokine) 또는 다른 분비 산물의 방출, 염증성 또는 면역학적 반응의 억제 또는 증대, 종양 형성(neoplasia), 전암(premalignant), 악성 종양(malignancy), 주위 또는 거리가 있는 조직 또는 기관, 예를 들어 림프절 침범(invasion) 등과 연관될 수 있다. 상기 암조직은 암으로부터 분리된 조직일 수 있다. 상기 암으로부터 암조직을 얻는 단계는 통상의 해부학적 방법, 예를 들어, 암에 존재하는 조직들을 멸균된 가위로 여러 부위로 잘라냄으로써 얻을 수 있다. 얻어진 암조직은 무혈청 배지, 또는 항생제, 예를 들면, 페니실린, 스트렙토마이신, 또는 겐타마이신이 포함된 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 세척함으로써, 조직에 존재하는 혈액 등의 오염물질들을 제거할 수 있다. 상기와 같이 분리된 암조직에 직접 효소 처리하거나, 멸균된 가위 등을 사용하여 더 잘게 세절한 후 효소 처리할 수 있다.

[0012] 일 구체예에서 상기 암은 혈액암 또는 고형암일 수 있으며, 상기 고형암은 폐암(lung cancer), 피부암(skin cancer), 위암(stomach cancer), 대장암(intestinal cancer), 결장암(colon cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 간암(liver cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 자궁암(uterine cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 난소암(ovarian cancer), 고환암(testicular cancer), 전립선암(prostate cancer), 유방암(breast cancer), 및 구강암(oral cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 일 구체예에 있어서 상기 세포는 Cas9 폴리펩티드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 CRISPR/Cas 시스템의 단백질 구성 요소 중 하나로서, 활성화된 엔도뉴클레아제 또는 닉(nick) 형성 효소일 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 crRNA(CRISPR RNA) 및 tracrRNA(trans-activating crRNA)와 복합체를 형성하여 그의 활성을 나타낼 수 있다. 상기 세포는 상기 Cas 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열인 Cas 폴리뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0014] 상기 Cas 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 스트렙토코커스 속(예, Streptococcus pyogens), 네이세리아 속(예, Neisseria meningitidis), 파스테우렐라 속(예, Pasteurella multocida), 프란시셀라 속(예, Francisella

novicida), 또는 캄필로박터 속(예, Campylobacter jejuni)의 세균으로부터 유래된 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0015] 상기 Cas 폴리펩티드는 야생형 Cas 폴리펩티드, 또는 돌연변이 Cas 폴리펩티드일 수 있다. 상기 돌연변이 Cas 폴리펩티드는 예를 들어 촉매적 아스파라긴산 잔기(catalytic aspartate residue)가 다른 아미노산(예, 알라닌)으로 변경된 폴리펩티드일 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 재조합 단백질일 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 용어, "가이드 RNA(guide RNA: gRNA)"는 RNA 편집(editing)을 통해 세포내에서 표적 DNA를 절단, 삽입, 또는 연결시키는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 상기 가이드 RNA는 단일-사슬 가이드 RNA(single-chain guide RNA: sgRNA)일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 표적 핵산 서열에 특이적인 crRNA(CRISPR RNA)일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 Cas9 뉴클레아제와 상호작용하는 tracrRNA(trans-activating crRNA)를 더 포함할 수 있다. 상기 tracrRNA는 루프(loop) 구조를 형성하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 길이가 10 뉴클레오티드 내지 30 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 길이가 예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 뉴클레오티드일 수 있다.

[0017] 상기 가이드 RNA는 RNA, DNA, PNA, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 화학적으로 변형된 것일 수 있다.

[0018] 상기 가이드 RNA는 유전자 가위(programmable nuclease)의 구성요소일 수 있다. 유전자 가위는 유전체 상의 특정 위치를 인식하여 절단할 수 있는 모든 형태의 뉴클레아제를 말한다. 상기 유전자 가위는 예를 들어, TALEN(transcription activator-like effector nuclease), 징크-핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease), 메가뉴클레아제(meganuclease), RGEN(RNA-guided engineered nuclease), Cpf1, 및 아고 상동체(Ago homolog, DNA-guided endonuclease)이다. 상기 RGEN은 표적 DNA에 특이적인 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 구성요소로 포함하는 뉴클레아제를 말한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 RGEN의 구성요소일 수 있다.

[0019] 상기 가이드 RNA는 세포의 유전체에서 비상동성 말단-접합(non-homologous end-joining: NHEJ)에 의해 KRAS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제거할 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 용어, "라이브러리"는 특성이 다른 동종의 물질이 2 종 이상 포함된 집단(pool or population)을 의미한다. 따라서, 올리고뉴클레오티드 라이브러리는 염기서열이 다른 2종 이상의 올리고뉴클레오티드, 예컨대 가이드 RNA, 및/또는 표적 서열이 다른 2종의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 집단일 수 있다.

[0021] 상기 가이드 RNA 라이브러리는 세포-표면-단백질의 유전자를 표적하는 가이드 RNA의 집단일 수 있다. 상기 가이드 RNA 라이브러리는 2,000 내지 6,000 종의 세포-표면-단백질의 유전자를 표적하는 가이드 RNA의 집단일 수 있다. 상기 가이드 RNA는 세포-표면-단백질의 유전자 한 개당 1 내지 10 개의 가이드 RNA를 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 용어, "벡터"는 상기 가이드 RNA를 세포 내에 전달할 수 있도록 하는 매개체, 예컨대 유전적 작제물을 의미하는 것으로, 상기 벡터는 각각의 가이드 RNA 코딩 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 벡터는 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터일 수 있다.

[0023] 일 구체예에 있어서, 상기 벡터는 바이러스성 벡터일 수 있다. 상기 바이러스성 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 수두 바이러스 벡터, 랍도바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터, 플라바이러스 벡터 또는 아데노-연관 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 발현용 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 구성적(constitutive) 또는 유도성(inducible) 발현 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 패키징 신호, RRV(rev response element), WPRE(우드척(woodchuck) 간염 바이러스의 전사후 조절 요소(posttranscriptional regulatory element)), cPPT(central polypurine tract), 프로모터, 항생제 저항성 유전자, 오퍼레이터, 억제자, T2A 펩티드, 리포터 유전자, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 U6 폴리머라제 III 프로모터, 신장 인자 1α 프로모터, H1 프로모터, 사이토메갈로바이로스의 프로모터, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 항생제 저항성 유전자는 퓨로마이신 저항성 유전자, 블라스티시딘 저항성 유전자, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 억제자는 테트라사이클린 오퍼레이터일 수 있다. 상기 리포터 유전자는 증강된(Enhanced) 녹색 형광 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 벡터는 개체의 세포 내에 존재하는 경우 삽입물, 즉 올리고뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 삽입물에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0024] 상기 벡터를 라이브러리를 제조하기 위한 세포에 전달하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 예컨대, 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 트랜스펙션법, 폴리브렌-매개 형질

감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포좀 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당 분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 바이러스 벡터를 이용하는 경우, 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 입자를 사용하여 목적물, 즉 벡터를 세포 내로 전달시킬 수 있다. 아울러, 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 세포 내로 도입할 수 있다.

[0025] 일 구체예에 있어서, 상기 벡터가 처리된 세포는 하나의 세포 당 하나의 벡터가 도입된 것일 수 있다. MOI(multiplicity of infection)을 0.2 내지 0.4, 예를 들면 0.3으로 조절함으로써, 하나의 세포 당 하나의 벡터를 도입시킬 수 있다.

[0026] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 상기 벡터가 도입되지 않은 세포를 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

[0027] 본 명세서에서 용어, "세포와 결합능을 갖는 단백질"는 세포의 표면 단백질을 특이적으로 인식하는 또는 세포의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질을 의미할 수 있다. 따라서, 상기 세포와 결합능을 갖는 단백질은 상기 세포-표면-단백질에 특이적으로 결합하는 단백질일 수 있다.

[0028] 일 구체예에 있어서, 상기 세포-표면-단백질에 특이적으로 결합하는 단백질은 항체, 애피바디(affibody), 및 다이아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 용어, "항체"는 "항체"는 특정 항원에 특이적으로 결합하거나 또는 이와 상호작용하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 임의의 항원-결합 분자 또는 분자 복합체를 의미한다. 상기 항체는 이황화 결합에 의해 상호-연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)인 4개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 면역글로불린 분자뿐만 아니라 이의 다량체(예를 들어, IgM)를 포함한다. 또한, 상기 항체는 이황화 결합에 의해 상호-연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)인 4개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 면역글로불린 분자를 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 상기 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3인 3개의 도메인을 포함한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 상기 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인(CL1)을 포함한다. 상기 VH 및 VL 영역은, 프레임워크 영역(FR)이라고 하는, 더 보존된 영역이 개재된(interspersed), 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는, 초가변 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 이는 하기 순서 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 아미노-말단 내지 카르복시-말단에서 배열된다.

[0030] 상기 항체는 또한 완전 항체 분자의 항원-결합 단편을 포함한다. 용어 항체의 "항원-결합 부분", 항체의 "항원-결합 단편" 등은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 천연적으로 발생하는, 효소적으로 수득가능한, 합성인, 또는 유전적으로 조작된 폴리펩타이드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원-결합 단편은 예를 들어, 단백질 가수분해 소화와 같은 임의의 적합한 표준 기법, 또는 항체 가변 및 선택적 불변 도메인을 인코딩하는 DNA의 조작 및 발현을 수반하는 재조합 유전공학적 기법을 사용하여 완전 항체 분자에서 유래될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되고/되거나, 예를 들어, 상업적인 출처인 DNA 라이브러리(예를 들어, 파지-항체 라이브러리 포함)에서 용이하게 이용 가능하거나, 또는 합성될 수 있다. 상기 DNA는, 예를 들어, 하나 이상의 가변 도메인 및/또는 불변 도메인을 적합한 구성으로 배열시키기 위해, 또는 코돈을 도입하기 위해, 시스테인 잔기를 생성하기 위해, 아 미노산을 변형, 첨가 또는 결실시키는 등을 위해 화학적으로 또는 분자생물학 기법을 사용함으로써 시퀀싱 및 조작될 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 용어 "애피바디(affibody)"는 특정 타겟 단백질(수용체)에 결합할 수 있는, 항체 모사체를 의미할 수 있다. 일반적으로 애피바디 분자는 20 내지 150의 아미노산 잔기로 구성되며, 2 내지 10개의 알파 헬릭스로 구성된 것일 수 있다.

[0032] 일 구체예에 있어서, 상기 분리된 세포와 결합능을 갖는 단백질이 결합하는 부위를 제공하는 세포-표면-단백질은 항체 또는 항체 유사의 Fc 부위와 결합하는 것일 수 있다.

[0033] 일 구체예에 있어서, 상기 분리된 세포와 결합능을 갖는 단백질과 세포-표면-단백질은 비공유결합으로 연결되는 것일 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 용어, "세포-표면-단백질"은 세포의 표면에 존재하는 단백질을 의미할 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 세포-표면-단백질은 처리된 단백질과 결합하는 항원일 수 있다. 따라서, 상기 스크리닝 방법을 통해 신규 항체와 잘 결합하는 세포 표면 항원을 발굴할 수 있다.

[0035] 일 구체예에 있어서, 상기 처리된 단백질과의 결합능을 상실한 세포를 수득하는 단계는 상기 단백질이 처리된 세포를 상기 처리된 단백질과 결합하는 표면을 가진 비드에 처리하는 단계; 및 상기 비드와 결합하지 않은 세포

를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 비드는 상기 처리된 단백질과 결합할 수 있도록 표면이 개질된 것일 수 있다.

[0036] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 상기 처리된 단백질과의 결합능을 상실한 세포에 포함된 gRNA를 분석하는 단계; 및 상기 분석된 가이드 RNA가 표적하는 유전자를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0037] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 상기 분석된 가이드 RNA가 표적하는 유전자가 넉다운(knockdown) 또는 넉아웃(knockout)된 대조군 세포를 준비하는 단계; 및 상기 대조군 세포에 항체를 처리하여 항원-항체 반응 여부를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 분석된 가이드 RNA가 표적하는 유전자가 넉다운(knockdown)된 대조군 세포는 상기 표적하는 유전자의 siRNA를 도입함으로써, 제조할 수 있다.

[0038] 일 구체예에 있어서, 상기 항원-항체 반응은 효소면역분석법, 방사능면역분석법, 샌드위치 측정법, 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법, 형광면역법, 효소기질발색법, 항원-항체 응집법으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 이용하여 측정할 수 있다.

[0039] 일 구체예에 있어서, 상기 세포-표면-단백질은 종양 관련 항원(Tumor-associated antigen, TAA)일 수 있다.

[0040] 본 명세서에서 용어, "종양 관련 항원(Tumor-associated antigen, TAA)"은 암과 관련된 단백질을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 항원을 의미한다. 이러한 항원은 악성 세포 상에서 또는 종양 관련 혈관, 세포외 기질, 중간엽 간질, 또는 면역 침윤물과 같은 종양 미세환경에서 발현될 수 있다.

[0041] 상기 종양 관련 항원은 예를 들면, AFP, ALK, BAGE 단백질, BIRC5(서바이빈), BIRC7, β-카테닌, brc-abl, BRCA1, BORIS, CA9, 카르보닉 안하이드라제 IX, 카스파제-8, CALR, CCR5, CD19, CD20(MS4A1), CD22, CD40, CD70, CDK4, CEA, 사이클린-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE 단백질(예를 들어, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, 글리피칸-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IL-10, LMP2, MAGE 단백질(예를 들어, MAGE-1, -2, -3, -4, -6, 및 -12), MART-1, 메소텔린, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16(CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA(FOLH1), RAGE 단백질, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TGF-β, TMPRSS2, 톰슨-뉴벨(Thompson-nouvelle) 항원(Tn), TRP-1, TRP-2, 티로시나제 또는 유로플라킨-3일 수 있다.

발명의 효과

[0042] 일 양상에 따른 스크리닝 방법에 따르면, 신규 항체와 결합하는 세포 표면 항원을 정확하게 스크리닝할 수 있으며, 신규 항체와 잘 결합하는 세포를 통해 상기 항체에 대한 세포 표면 항원을 효율적으로 스크리닝할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 유방암 세포에서 Cas9 발현 여부를 확인한 이미지이다: MDA-MB-468은 Cas9이 형질 도입되지 않은 유방암 세포이고, MDA-MB-468-cas9은 Cas9을 형질 도입시킨 유방암 세포이다.

도 2는 Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포에 대해 세툭시맙(cetuximab)을 항체로 사용하여 MACS를 수행하고, 세툭시맙이 표지된 세포 대비 세툭시맙이 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 확인한 그래프이다.

도 3은 CD44항체를 사용하여 MACS를 수행하고, CD44항체가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 서로 다른 세포주에서 확인한 그래프이다:

도 3a는 CD44항체가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 HeLa 세포주에서 확인한 그래프이고, 도 3b는 CD44항체가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 A549 세포주에서 확인한 그래프이다.

도 4는 Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포에 대해 환자유래 항체 라이브러리에서 발굴된 항암항체 S4-2 및 S3-5을 항체로 사용하여 MACS를 수행하고, 상기 항암항체 S4-2 또는 S3-5가 표지된 세포 대비 항암항체 S4-2 또는 S3-5가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 확인한 그래프이다:

도 4 a는 환자유래 항체 라이브러리에서 발굴된 항암항체 S4-2가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 확인한 그래프이고, 도 4b는 환자유래 항체 라이브러리에서 발굴된 항암항체 S3-5가 표지되지 않은 세포

에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 확인한 그래프이다.

도 5는 MDA-MB-468 세포주에서 ICAM1의 특이적 siRNA를 처리하고, 유세포분석(Fluorescence-activated cell sorting, FACS)을 수행한 그래프이다.

도 6은 ICAM1을 발현하는 HS578T 유방암 세포주에의 면역침강법-웨스턴블랏(Immunoprecipitation-western blot)을 수행한 이미지이다.

도 7은 항암항체 S4-2 및 S3-5와 ICAM1이 직접 결합하는지 여부를 확인하기 위해 면역침강법-웨스턴블랏을 수행한 결과를 나타낸 이미지이다.

도 8은 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법에 대한 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] **실시예 1. Cas9을 안정적으로 발현하는 세포 구축**

[0047] Cas9을 안정적으로 발현하는 세포를 구축하기 위해, HEK293T 세포를 형질감염 1 일 전에 컨플루언시(confluency)가 70 %가 되도록 시딩하였다. 상기 HEK293T 세포를 패키징 Lipofectamine 3000을 사용하여 플라스미드(packaging plasmid) pMD2.G(1.5 μg), psPAX2(1.5 μg), 및 lentiCas9-Blast(4.5 μg)로 공동-형질도입(co-transfection)시켰다. 형질감염 시키고 6시간이 지난 후, 배지를 10 % FBS 및 1 % Penicillin/Streptomycin(P/S)가 포함된 DMEM 배지로 교체하였다. 그 후, 바이러스 입자를 포함하는 배양 상등액을 24 시간마다 수집하고, 1200 rpm에서 5 분간 원심분리하여 남아있는 HEK293T 세포를 제거하였다. 상기 수집된 바이러스 상층액을 0.45 μm 필터를 사용하여 여과하였다.

[0048] Cas9를 안정적으로 발현하는 유방암 세포(MDA-MB-468)를 생성하기 위해 바이러스를 포함하는 배양 배지에 폴리브렌(polybrene, 10 μg/ml)을 2 회 반복하여 보충하였다. 24 시간 동안 인큐베이션한 후, 6 내지 8 μg/ml의 블라스티시딘 S 염산염(Blasticidine S hydrochloride, Sigma)을 통해 안정적으로 Cas9을 발현하는 유방암 세포(MDA-MB-468-cas9)를 구축하였다. 상기 구축한 유방암 세포에서 Cas9이 잘 발현되는지 확인하기 위해, 웨스턴블랏을 수행하고, 이를 도 1에 나타내었다.

[0049] 도 1은 유방암 세포에서 Cas9 발현 여부를 확인한 이미지이다: MDA-MB-468은 Cas9이 형질 도입되지 않은 유방암 세포이고, MDA-MB-468-cas9은 Cas9을 형질 도입시킨 유방암 세포이다.

[0050] 도 1에 나타낸 바와 같이, Cas9이 형질도입된 MDA-MB-468-cas9는 Cas9을 안정적으로 발현함을 확인하였다.

[0052] **실시예 2. 세포-표면-단백질에 대한 가이드 RNA 라이브러리 구축**

[0053] 약 5,000 종의 세포-표면-단백질에 대하여 각 유전자를 표적하는 5 개의 가이드 RNA를 디자인하고 이를 합성한 후, 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector)에 클로닝함으로써 세포-표면-단백질의 가이드 RNA 라이브러리를 구축하였다.

[0054] 보다 구체적으로, 세포 표면에 존재하는 것으로 알려진 단백질 중 유전자 정보가 잘 검증된 유전자를 분석하여, 총 2,692 종의 세포-표면-단백질을 선정하고 이를 표 1에 나타내었다: Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Nov 13;115(46): E10988-E10997 및 HGNC 데이터베이스 참조.

표 1

[0055]

연번	단백질	연번	단백질	연번	단백질	연번	단백질	연번	단백질
1	ABCA1	540	DPEP3	1079	KCNJ12	1618	OR5J2	2157	SLC4A1
2	ABCA2	541	DPP4	1080	KCNK5	1619	OR5K1	2158	SLC4A4
3	ABCA3	542	DPP6	1081	KCNK18	1620	OR5K2	2159	SLC4A5
4	ABCA4	543	DPP10	1082	KCNMB1	1621	OR5K3	2160	SLC4A7
5	ABCA5	544	DRD1	1083	KCNMB2	1622	OR5K4	2161	SLC4A8

6	ABCA6	545	DRD2	1084	KCNMB3	1623	OR5L1	2162	SLC4A10
7	ABCA7	546	DRD3	1085	KCNMB4	1624	OR5L2	2163	SLC5A1
8	ABCA8	547	DRD4	1086	KCNS1	1625	OR5M1	2164	SLC5A2
9	ABCA9	548	DRD5	1087	KCNV2	1626	OR5M3	2165	SLC5A3
10	ABCA12	549	DSC1	1088	KDR	1627	OR5M8	2166	SLC5A4
11	ABCA13	550	DSC2	1089	KEL	1628	OR5M9	2167	SLC5A5
12	ABCB1	551	DSC3	1090	KIAA0319	1629	OR5M10	2168	SLC5A6
13	ABCB4	552	DSCAM	1091	KIAA1324	1630	OR5M11	2169	SLC5A7
14	ABCB5	553	DSCAML1	1092	KIAA1324L	1631	OR5P2	2170	SLC5A8
15	ABCB9	554	DSG1	1093	KIAA1549L	1632	OR5P3	2171	SLC5A9
16	ABCB11	555	DSG2	1094	KIR2DL1	1633	OR5R1	2172	SLC5A10
17	ABCC1	556	DSG3	1095	KIR2DL3	1634	OR5T1	2173	SLC5A11
18	ABCC2	557	DSG4	1096	KIR2DL4	1635	OR5T2	2174	SLC5A12
19	ABCC3	558	DUOX1	1097	KIR2DS4	1636	OR5T3	2175	SLC6A1
20	ABCC4	559	DUOX2	1098	KIR3DL1	1637	OR5V1	2176	SLC6A2
21	ABCC5	560	DUOXA1	1099	KIR3DL2	1638	OR5W2	2177	SLC6A3
22	ABCC9	561	DYNAP	1100	KIR3DL3	1639	OR6A2	2178	SLC6A4
23	ABCC10	562	EBP	1101	KIRREL1	1640	OR6B1	2179	SLC6A5
24	ABCC11	563	ECE1	1102	KIRREL2	1641	OR6B2	2180	SLC6A6
25	ABCC12	564	ECSCR	1103	KIRREL3	1642	OR6B3	2181	SLC6A7
26	ABCG2	565	EDA	1104	KISS1R	1643	OR6C1	2182	SLC6A8
27	ABCG4	566	EDA2R	1105	KIT	1644	OR6C2	2183	SLC6A9
28	ABCG5	567	EDAR	1106	KITLG	1645	OR6C3	2184	SLC6A11
29	ACE	568	EDNRA	1107	KL	1646	OR6C4	2185	SLC6A12
30	ACE2	569	EDNRB	1108	KLRB1	1647	OR6C6	2186	SLC6A13
31	ACHE	570	EFNA1	1109	KLRC1	1648	OR6C65	2187	SLC6A14
32	ACKR1	571	EFNA2	1110	KLRC2	1649	OR6C68	2188	SLC6A15
33	ACKR2	572	EFNA3	1111	KLRC3	1650	OR6C70	2189	SLC6A16
34	ACKR3	573	EFNA4	1112	KLRF1	1651	OR6C74	2190	SLC6A17
35	ACKR4	574	EFNA5	1113	KLRF2	1652	OR6C75	2191	SLC6A18
36	ACP2	575	EFNB1	1114	KLRG1	1653	OR6C76	2192	SLC6A19
37	ACP4	576	EFNB2	1115	KLRK1	1654	OR6F1	2193	SLC6A20
38	ACVR1	577	EFNB3	1116	KREMEN1	1655	OR6J1	2194	SLC7A1
39	ACVR1B	578	EGF	1117	KREMEN2	1656	OR6K2	2195	SLC7A2
40	ACVR1C	579	EGFR	1118	L1CAM	1657	OR6K3	2196	SLC7A3
41	ACVR2A	580	ELFN1	1119	LAG3	1658	OR6K6	2197	SLC7A4
42	ACVR2B	581	ELFN2	1120	LAIR1	1659	OR6M1	2198	SLC7A5
43	ACVRL1	582	EMB	1121	LAMP1	1660	OR6N1	2199	SLC7A6
44	ADAM2	583	EMCN	1122	LAMP2	1661	OR6N2	2200	SLC7A9
45	ADAM7	584	EMP1	1123	LAMP3	1662	OR6P1	2201	SLC7A10
46	ADAM8	585	EMP2	1124	LAMP5	1663	OR6Q1	2202	SLC7A14
47	ADAM9	586	EMP3	1125	LAYN	1664	OR6S1	2203	SLC8A1
48	ADAM10	587	ENG	1126	LCT	1665	OR6T1	2204	SLC8A2
49	ADAM11	588	ENPEP	1127	LDLR	1666	OR6V1	2205	SLC8A3
50	ADAM12	589	ENPP1	1128	LDLRAD3	1667	OR6X1	2206	SLC8B1
51	ADAM15	590	ENPP4	1129	LDLRAD4	1668	OR6Y1	2207	SLC9A1
52	ADAM17	591	ENPP5	1130	LEPR	1669	OR7A5	2208	SLC9A2
53	ADAM18	592	ENPP6	1131	LGR4	1670	OR7A10	2209	SLC9A3
54	ADAM19	593	ENTPD1	1132	LGR5	1671	OR7A17	2210	SLC9A6
55	ADAM20	594	ENTPD3	1133	LGR6	1672	OR7C1	2211	SLC9A7
56	ADAM21	595	EPCAM	1134	LHCGR	1673	OR7C2	2212	SLC10A1
57	ADAM22	596	EPGN	1135	LHFPL1	1674	OR7D2	2213	SLC10A2
58	ADAM23	597	EPHA1	1136	LHFPL4	1675	OR7D4	2214	SLC10A3
59	ADAM28	598	EPHA2	1137	LHFPL5	1676	OR7E24	2215	SLC10A4
60	ADAM29	599	EPHA3	1138	LIFR	1677	OR7G1	2216	SLC10A5
61	ADAM30	600	EPHA4	1139	LILRA1	1678	OR7G2	2217	SLC10A6
62	ADAM32	601	EPHA5	1140	LILRA2	1679	OR7G3	2218	SLC11A1
63	ADAM33	602	EPHA6	1141	LILRA4	1680	OR8A1	2219	SLC11A2

64	ADCY2	603	EPHA7	1142	LILRA5	1681	OR8B2	2220	SLC12A1
65	ADCY3	604	EPHA8	1143	LILRA6	1682	OR8B3	2221	SLC12A2
66	ADCY5	605	EPHA10	1144	LILRB1	1683	OR8B4	2222	SLC12A3
67	ADCY6	606	EPHB1	1145	LILRB2	1684	OR8B8	2223	SLC12A4
68	ADCY7	607	EPHB2	1146	LILRB3	1685	OR8B12	2224	SLC12A5
69	ADCY9	608	EPHB3	1147	LILRB5	1686	OR8D1	2225	SLC12A6
70	ADCYAP1R1	609	EPHB4	1148	LIM2	1687	OR8D2	2226	SLC12A7
71	ADGRA1	610	EPHB6	1149	LINGO1	1688	OR8D4	2227	SLC12A8
72	ADGRA2	611	EPOR	1150	LINGO2	1689	OR8G1	2228	SLC12A9
73	ADGRA3	612	EQTN	1151	LINGO3	1690	OR8G5	2229	SLC13A1
74	ADGRB1	613	ERBB2	1152	LINGO4	1691	OR8H1	2230	SLC13A2
75	ADGRB2	614	ERBB3	1153	LMAN2	1692	OR8H2	2231	SLC13A3
76	ADGRB3	615	ERBB4	1154	LMAN2L	1693	OR8H3	2232	SLC13A4
77	ADGRD1	616	EREG	1155	LMBR1	1694	OR8I2	2233	SLC14A1
78	ADGRD2	617	ERMAP	1156	LMBR1L	1695	OR8J1	2234	SLC14A2
79	ADGRE1	618	ERMP1	1157	LMBRD1	1696	OR8J2	2235	SLC15A1
80	ADGRE2	619	ERVFRD-1	1158	LMBRD2	1697	OR8J3	2236	SLC15A2
81	ADGRE3	620	ERVMER34-1	1159	LNPEP	1698	OR8K1	2237	SLC15A3
82	ADGRE5	621	ERVV-1	1160	LPAR1	1699	OR8K3	2238	SLC15A4
83	ADGRF1	622	ERVV-2	1161	LPAR2	1700	OR8K5	2239	SLC15A5
84	ADGRF2	623	ERVW-1	1162	LPAR3	1701	OR8S1	2240	SLC16A1
85	ADGRF3	624	ESAM	1163	LPAR4	1702	OR8U1	2241	SLC16A4
86	ADGRF4	625	ESYT3	1164	LPAR5	1703	OR9A2	2242	SLC16A5
87	ADGRF5	626	EVA1C	1165	LPAR6	1704	OR9A4	2243	SLC16A6
88	ADGRG1	627	EVC2	1166	LPL	1705	OR9G1	2244	SLC16A7
89	ADGRG2	628	EVI2A	1167	LRFN1	1706	OR9G4	2245	SLC16A8
90	ADGRG3	629	EVI2B	1168	LRFN2	1707	OR9I1	2246	SLC16A12
91	ADGRG4	630	F2R	1169	LRFN3	1708	OR9K2	2247	SLC17A1
92	ADGRG5	631	F2RL1	1170	LRFN4	1709	OR9Q1	2248	SLC17A5
93	ADGRG6	632	F2RL2	1171	LRFN5	1710	OR9Q2	2249	SLC17A6
94	ADGRG7	633	F2RL3	1172	LRIG1	1711	OR10A2	2250	SLC17A7
95	ADGRL1	634	F3	1173	LRIG2	1712	OR10A3	2251	SLC17A8
96	ADGRL2	635	F11R	1174	LRIG3	1713	OR10A4	2252	SLC17A9
97	ADGRL3	636	FAIM2	1175	LRIT1	1714	OR10A5	2253	SLC18A1
98	ADGRL4	637	FAM171A1	1176	LRIT2	1715	OR10A6	2254	SLC18A2
99	ADGRV1	638	FAM171A2	1177	LRIT3	1716	OR10A7	2255	SLC18A3
100	ADIPOR2	639	FAM171B	1178	LRP1	1717	OR10AC1	2256	SLC19A1
101	ADORA1	640	FAM174A	1179	LRP1B	1718	OR10AD1	2257	SLC19A2
102	ADORA2A	641	FAM174B	1180	LRP2	1719	OR10AG1	2258	SLC19A3
103	ADORA2B	642	FAM187B	1181	LRP3	1720	OR10C1	2259	SLC20A2
104	ADORA3	643	FAM189B	1182	LRP4	1721	OR10D3	2260	SLC22A1
105	ADRA1A	644	FAP	1183	LRP5	1722	OR10G2	2261	SLC22A2
106	ADRA1B	645	FAS	1184	LRP6	1723	OR10G3	2262	SLC22A3
107	ADRA1D	646	FASLG	1185	LRP8	1724	OR10G4	2263	SLC22A4
108	ADRA2A	647	FAT1	1186	LRP10	1725	OR10G6	2264	SLC22A5
109	ADRA2B	648	FAT2	1187	LRP11	1726	OR10G7	2265	SLC22A6
110	ADRA2C	649	FAT3	1188	LRP12	1727	OR10G8	2266	SLC22A7
111	ADRB1	650	FAT4	1189	LRRC3B	1728	OR10G9	2267	SLC22A8
112	ADRB2	651	FCAMR	1190	LRRC4	1729	OR10H1	2268	SLC22A9
113	ADRB3	652	FCAR	1191	LRRC4B	1730	OR10H2	2269	SLC22A11
114	AGER	653	FCER1A	1192	LRRC4C	1731	OR10H3	2270	SLC22A12
115	AGTR1	654	FCGR1A	1193	LRRC15	1732	OR10H4	2271	SLC22A13
116	AGTR2	655	FCGR1B	1194	LRRC19	1733	OR10H5	2272	SLC22A14
117	AJAP1	656	FCGR2A	1195	LRRC24	1734	OR10J1	2273	SLC22A15
118	ALCAM	657	FCGR2B	1196	LRRC25	1735	OR10J3	2274	SLC22A16
119	ALK	658	FCGR2C	1197	LRRC32	1736	OR10J4	2275	SLC22A17
120	ALPG	659	FCGR3A	1198	LRRC37A	1737	OR10J5	2276	SLC22A23
121	ALPI	660	FCGR3B	1199	LRRC37A2	1738	OR10K1	2277	SLC22A25

122	ALPL	661	FCGRT	1200	LRRC37A3	1739	OR10K2	2278	SLC23A1
123	ALPP	662	FCRL1	1201	LRRC37B	1740	OR10P1	2279	SLC23A2
124	AMHR2	663	FCRL2	1202	LRRC38	1741	OR10Q1	2280	SLC24A2
125	AMIGO1	664	FCRL3	1203	LRRC52	1742	OR10R2	2281	SLC24A3
126	AMIGO2	665	FCRL4	1204	LRRN1	1743	OR10S1	2282	SLC24A4
127	AMIGO3	666	FCRL5	1205	LRRN2	1744	OR10T2	2283	SLC24A5
128	AMN	667	FCRL6	1206	LRRN3	1745	OR10V1	2284	SLC26A1
129	ANKH	668	FFAR1	1207	LRRN4	1746	OR10W1	2285	SLC26A2
130	ANO1	669	FFAR2	1208	LRRN4CL	1747	OR10X1	2286	SLC26A3
131	ANO2	670	FFAR3	1209	LRRTM2	1748	OR10Z1	2287	SLC26A4
132	ANO3	671	FFAR4	1210	LRRTM3	1749	OR11A1	2288	SLC26A5
133	ANO5	672	FGFR1	1211	LRRTM4	1750	OR11G2	2289	SLC26A6
134	ANO6	673	FGFR2	1212	LRTM1	1751	OR11H1	2290	SLC26A8
135	ANO7	674	FGFR3	1213	LRTM2	1752	OR11H2	2291	SLC26A9
136	ANO9	675	FGFR4	1214	LSAMP	1753	OR11H4	2292	SLC28A1
137	ANPEP	676	FGFRL1	1215	LSMEM1	1754	OR11H6	2293	SLC28A2
138	ANTXR1	677	FKRP	1216	LTB4R	1755	OR11H7	2294	SLC28A3
139	ANTXR2	678	FLRT1	1217	LTB4R2	1756	OR11H12	2295	SLC29A1
140	ANTXRL	679	FLRT2	1218	LTBR	1757	OR11L1	2296	SLC29A2
141	AOC3	680	FLRT3	1219	LTK	1758	OR12D2	2297	SLC29A3
142	APCDD1	681	FLT1	1220	LY6D	1759	OR12D3	2298	SLC29A4
143	APLNR	682	FLT3	1221	LY6E	1760	OR13A1	2299	SLC30A1
144	APLP1	683	FLT3LG	1222	LY6G6C	1761	OR13C2	2300	SLC31A1
145	APLP2	684	FLT4	1223	LY6G6D	1762	OR13C3	2301	SLC32A1
146	APP	685	FLVCR1	1224	LY6G6F	1763	OR13C4	2302	SLC33A1
147	AQP1	686	FLVCR2	1225	LY6H	1764	OR13C5	2303	SLC34A1
148	AQP2	687	FNDC4	1226	LY6K	1765	OR13C8	2304	SLC34A2
149	AQP4	688	FNDC5	1227	LY9	1766	OR13C9	2305	SLC34A3
150	AQP5	689	FNDC9	1228	LY75	1767	OR13D1	2306	SLC35A5
151	AQP8	690	FNDC10	1229	LYNX1	1768	OR13F1	2307	SLC35F4
152	AQP9	691	FOLH1	1230	LYPD1	1769	OR13G1	2308	SLC36A1
153	AQP10	692	FOLR1	1231	LYPD2	1770	OR13H1	2309	SLC36A2
154	AREG	693	FOLR2	1232	LYPD3	1771	OR13J1	2310	SLC36A3
155	ARMH4	694	FPR1	1233	LYPD4	1772	OR14A2	2311	SLC36A4
156	ART1	695	FPR2	1234	LYPD5	1773	OR14A16	2312	SLC37A1
157	ART3	696	FPR3	1235	LYPD6B	1774	OR14C36	2313	SLC37A2
158	ART4	697	FRAS1	1236	LYPD8	1775	OR14I1	2314	SLC37A3
159	ASGR1	698	FREM2	1237	LYSMD3	1776	OR14J1	2315	SLC37A4
160	ASGR2	699	FRRS1	1238	LYVE1	1777	OR14K1	2316	SLC38A1
161	ASIC1	700	FSHR	1239	M6PR	1778	OR51A2	2317	SLC38A2
162	ASIC4	701	FURIN	1240	MAG	1779	OR51A4	2318	SLC38A4
163	ASIC5	702	FZD1	1241	MALRD1	1780	OR51A7	2319	SLC38A5
164	ASTN1	703	FZD2	1242	MAMDC4	1781	OR51B2	2320	SLC38A8
165	ASTN2	704	FZD3	1243	MANSC1	1782	OR51B4	2321	SLC38A9
166	ATG9A	705	FZD4	1244	MANSC4	1783	OR51B5	2322	SLC38A11
167	ATP1A1	706	FZD5	1245	MAS1	1784	OR51B6	2323	SLC39A2
168	ATP1A2	707	FZD6	1246	MAS1L	1785	OR51D1	2324	SLC39A4
169	ATP1A3	708	FZD7	1247	MC1R	1786	OR51E1	2325	SLC39A5
170	ATP1A4	709	FZD8	1248	MC2R	1787	OR51E2	2326	SLC39A6
171	ATP1B1	710	FZD9	1249	MC3R	1788	OR51F1	2327	SLC39A8
172	ATP1B2	711	FZD10	1250	MC4R	1789	OR51F2	2328	SLC39A9
173	ATP1B3	712	GABBR1	1251	MC5R	1790	OR51G1	2329	SLC39A10
174	ATP1B4	713	GABBR2	1252	MCAM	1791	OR51G2	2330	SLC39A12
175	ATP2B2	714	GABRA1	1253	MCHR1	1792	OR51H1	2331	SLC39A14
176	ATP2B3	715	GABRA2	1254	MCHR2	1793	OR51I1	2332	SLC40A1
177	ATP2B4	716	GABRA3	1255	MCOLN1	1794	OR51I2	2333	SLC41A1
178	ATP4B	717	GABRA4	1256	MDGA1	1795	OR51J1	2334	SLC41A2
179	ATP6V0A2	718	GABRA5	1257	MDGA2	1796	OR51L1	2335	SLC41A3

180	ATP13A1	719	GABRA6	1258	MEGF8	1797	OR51M1	2336	SLC43A1
181	ATP13A2	720	GABRB1	1259	MEGF9	1798	OR51Q1	2337	SLC43A2
182	ATP13A3	721	GABRB2	1260	MEGF10	1799	OR51S1	2338	SLC43A3
183	ATP13A5	722	GABRB3	1261	MEGF11	1800	OR51T1	2339	SLC44A1
184	ATRAID	723	GABRD	1262	MELTF	1801	OR51V1	2340	SLC44A2
185	ATRN	724	GABRE	1263	MEP1A	1802	OR52A1	2341	SLC44A3
186	ATRNL1	725	GABRG1	1264	MEP1B	1803	OR52A5	2342	SLC44A4
187	AVPR1A	726	GABRG2	1265	MERTK	1804	OR52B2	2343	SLC44A5
188	AVPR1B	727	GABRG3	1266	MET	1805	OR52B4	2344	SLC45A2
189	AVPR2	728	GABRP	1267	MFAP3	1806	OR52B6	2345	SLC45A4
190	AXL	729	GABRQ	1268	MFAP3L	1807	OR52D1	2346	SLC46A1
191	BACE1	730	GABRR1	1269	MFRP	1808	OR52E1	2347	SLC46A2
192	BACE2	731	GABRR2	1270	MFSD2A	1809	OR52E2	2348	SLC46A3
193	BAMBI	732	GABRR3	1271	MFSD2B	1810	OR52E4	2349	SLC47A1
194	BCAM	733	GALR1	1272	MFSD4A	1811	OR52E5	2350	SLC49A3
195	BCAN	734	GALR2	1273	MFSD4B	1812	OR52E6	2351	SLC51A
196	BDKRB1	735	GALR3	1274	MFSD5	1813	OR52E8	2352	SLC51B
197	BDKRB2	736	GAS1	1275	MFSD6	1814	OR52H1	2353	SLC52A1
198	BEST2	737	GCGR	1276	MFSD6L	1815	OR52I1	2354	SLC52A2
199	BEST4	738	GDPD2	1277	MFSD8	1816	OR52I2	2355	SLC52A3
200	BMPR1A	739	GDPD5	1278	MFSD11	1817	OR52J3	2356	SLCO1A2
201	BMPR2	740	GFRA1	1279	MFSD12	1818	OR52K1	2357	SLCO1B1
202	BOC	741	GFRA2	1280	MFSD14A	1819	OR52K2	2358	SLCO1B3
203	BRS3	742	GFRA3	1281	MICA	1820	OR52L1	2359	SLCO1B7
204	BSG	743	GFRA4	1282	MICB	1821	OR52M1	2360	SLCO1C1
205	BST1	744	GFRAL	1283	MILR1	1822	OR52N1	2361	SLCO2A1
206	BST2	745	GFY	1284	MIP	1823	OR52N2	2362	SLCO2B1
207	BTC	746	GGT1	1285	MLNR	1824	OR52N4	2363	SLCO3A1
208	BTLA	747	GGT7	1286	MME	1825	OR52N5	2364	SLCO4A1
209	BTN1A1	748	GHR	1287	MMEL1	1826	OR52R1	2365	SLCO4C1
210	BTN2A1	749	GHRHR	1288	MMP14	1827	OR52W1	2366	SLCO5A1
211	BTN2A2	750	GHSR	1289	MMP16	1828	OR52Z1	2367	SLCO6A1
212	BTN3A1	751	GINM1	1290	MMP17	1829	OR56A1	2368	SLITRK1
213	BTN3A2	752	GIPR	1291	MMP25	1830	OR56A3	2369	SLITRK2
214	BTN3A3	753	GJA1	1292	MOG	1831	OR56A4	2370	SLITRK3
215	BTNL3	754	GJA3	1293	MOSMO	1832	OR56A5	2371	SLITRK4
216	BTNL9	755	GJA4	1294	MPEG1	1833	OR56B1	2372	SLITRK5
217	BVES	756	GJB1	1295	MPIG6B	1834	OR56B4	2373	SLITRK6
218	C1orf159	757	GJB2	1296	MPL	1835	OSMR	2374	SLURP2
219	C3AR1	758	GJB3	1297	MPZ	1836	OSTM1	2375	SMO
220	C3orf80	759	GJB4	1298	MPZL1	1837	OTOA	2376	SORCS1
221	C5AR1	760	GJB5	1299	MPZL2	1838	OTOP1	2377	SORCS2
222	C5AR2	761	GJB6	1300	MPZL3	1839	OTOP2	2378	SORCS3
223	C5orf15	762	GJB7	1301	MR1	1840	OXER1	2379	SORL1
224	C11orf24	763	GJC2	1302	MRC1	1841	OXGR1	2380	SORT1
225	C11orf87	764	GJC3	1303	MRC2	1842	OXTR	2381	SPACA1
226	C14orf132	765	GJD2	1304	MRGPRD	1843	P2RX1	2382	SPACA4
227	C19orf18	766	GLDN	1305	MRGPRE	1844	P2RX2	2383	SPAM1
228	C19orf38	767	GLIPR1	1306	MRGPRF	1845	P2RX3	2384	SPINT2
229	CA4	768	GLMP	1307	MRGPRG	1846	P2RX4	2385	SPN
230	CA12	769	GLP1R	1308	MRGPRX1	1847	P2RX6	2386	SPNS2
231	CA14	770	GLP2R	1309	MRGPRX2	1848	P2RX7	2387	SPNS3
232	CACHD1	771	GLRA1	1310	MRGPRX3	1849	P2RY1	2388	SPPL2A
233	CACNA1C	772	GLRA2	1311	MRGPRX4	1850	P2RY2	2389	SPPL2B
234	CACNA1G	773	GLRA3	1312	MRVI1	1851	P2RY4	2390	SPPL2C
235	CACNA1I	774	GLRA4	1313	MS4A1	1852	P2RY6	2391	SPRN
236	CACNG1	775	GLRB	1314	MS4A6A	1853	P2RY8	2392	SSPN
237	CACNG2	776	GML	1315	MS4A15	1854	P2RY10	2393	SSR1

238	CACNG3	777	GNRHR	1316	MSLN	1855	P2RY11	2394	SSTR1
239	CACNG4	778	GP1BA	1317	MSR1	1856	P2RY12	2395	SSTR2
240	CACNG5	779	GP1BB	1318	MST1R	1857	P2RY13	2396	SSTR3
241	CACNG6	780	GP2	1319	MTNR1A	1858	P2RY14	2397	SSTR4
242	CACNG7	781	GP5	1320	MTNR1B	1859	PAM	2398	SSTR5
243	CACNG8	782	GP6	1321	MUC1	1860	PANX1	2399	STAB1
244	CADM1	783	GPA33	1322	MUC3A	1861	PANX2	2400	STAB2
245	CADM2	784	GPBAR1	1323	MUC3B	1862	PARM1	2401	STEAP4
246	CADM3	785	GPC1	1324	MUC4	1863	PCDH1	2402	STIM1
247	CADM4	786	GPC2	1325	MUC12	1864	PCDH7	2403	STIMATE
248	CALCR	787	GPC3	1326	MUC13	1865	PCDH8	2404	STS
249	CALCRL	788	GPC4	1327	MUC15	1866	PCDH9	2405	STT3B
250	CALHM2	789	GPC5	1328	MUC16	1867	PCDH10	2406	SUCNR1
251	CALHM5	790	GPC6	1329	MUC17	1868	PCDH11X	2407	SUCO
252	CALY	791	GPER1	1330	MUC21	1869	PCDH11Y	2408	SUSD1
253	CASD1	792	GPIHBP1	1331	MUC22	1870	PCDH12	2409	SUSD2
254	CASR	793	GPM6A	1332	MUCL3	1871	PCDH15	2410	SUSD3
255	CATSPERD	794	GPM6B	1333	MUSK	1872	PCDH17	2411	SUSD4
256	CATSPERE	795	GPNMB	1334	MXRA8	1873	PCDH18	2412	SUSD5
257	CATSPERG	796	GPR1	1335	MYADM	1874	PCDH19	2413	SUSD6
258	CCKAR	797	GPR3	1336	MYADML2	1875	PCDH20	2414	SV2A
259	CCKBR	798	GPR4	1337	MYOF	1876	PCNX1	2415	SV2B
260	CCR1	799	GPR6	1338	NAALADL1	1877	PCNX2	2416	SV2C
261	CCR2	800	GPR12	1339	NAGPA	1878	PCSK5	2417	SVOPL
262	CCR3	801	GPR15	1340	NALCN	1879	PDCD1	2418	SYNPR
263	CCR4	802	GPR17	1341	NCAM1	1880	PDCD1LG2	2419	SYP
264	CCR5	803	GPR18	1342	NCAM2	1881	PDGFRA	2420	SYPL1
265	CCR6	804	GPR19	1343	NCMAP	1882	PDGFRB	2421	TAAR1
266	CCR7	805	GPR20	1344	NCR1	1883	PEAR1	2422	TAAR2
267	CCR8	806	GPR21	1345	NCR2	1884	PECAM1	2423	TAAR5
268	CCR9	807	GPR22	1346	NCR3	1885	PGAP1	2424	TAAR6
269	CCR10	808	GPR25	1347	NCR3LG1	1886	PHEX	2425	TAAR8
270	CCRL2	809	GPR26	1348	NCSTN	1887	PI16	2426	TAAR9
271	CD1A	810	GPR27	1349	NECTIN1	1888	PIEZO1	2427	TACR1
272	CD1B	811	GPR31	1350	NECTIN2	1889	PIEZO2	2428	TACR2
273	CD1C	812	GPR32	1351	NECTIN3	1890	PIGO	2429	TACR3
274	CD1D	813	GPR33	1352	NECTIN4	1891	PIGR	2430	TACSTD2
275	CD1E	814	GPR34	1353	NEGR1	1892	PIGT	2431	TARM1
276	CD2	815	GPR35	1354	NEMP1	1893	PIK3IP1	2432	TAS1R1
277	CD3D	816	GPR37	1355	NEO1	1894	PILRA	2433	TAS1R2
278	CD3G	817	GPR37L1	1356	NETO1	1895	PILRB	2434	TAS1R3
279	CD4	818	GPR39	1357	NETO2	1896	PKD1	2435	TAS2R1
280	CD5	819	GPR42	1358	NFAM1	1897	PKD1L1	2436	TAS2R3
281	CD6	820	GPR45	1359	NFASC	1898	PKD1L2	2437	TAS2R4
282	CD7	821	GPR50	1360	NGFR	1899	PKD1L3	2438	TAS2R7
283	CD8A	822	GPR52	1361	NIPAL1	1900	PKD2	2439	TAS2R8
284	CD8B	823	GPR55	1362	NIPAL2	1901	PKD2L1	2440	TAS2R9
285	CD9	824	GPR61	1363	NIPAL3	1902	PKDREJ	2441	TAS2R10
286	CD14	825	GPR62	1364	NIPAL4	1903	PKHD1	2442	TAS2R14
287	CD19	826	GPR63	1365	NKAIN1	1904	PKHD1L1	2443	TAS2R16
288	CD22	827	GPR65	1366	NKAIN2	1905	PLA2R1	2444	TAS2R19
289	CD24	828	GPR68	1367	NKAIN3	1906	PLAUR	2445	TAS2R20
290	CD27	829	GPR75	1368	NLGN1	1907	PLB1	2446	TAS2R30
291	CD28	830	GPR78	1369	NLGN2	1908	PLD5	2447	TAS2R38
292	CD33	831	GPR82	1370	NLGN3	1909	PLET1	2448	TAS2R39
293	CD34	832	GPR83	1371	NLGN4X	1910	PLP1	2449	TAS2R46
294	CD36	833	GPR84	1372	NLGN4Y	1911	PLPP1	2450	TBXA2R
295	CD37	834	GPR85	1373	NMBR	1912	PLPP2	2451	TCIRG1

296	CD38	835	GPR87	1374	NMUR1	1913	PLPP3	2452	TCTN2
297	CD40	836	GPR88	1375	NMUR2	1914	PLPPR1	2453	TCTN3
298	CD40LG	837	GPR101	1376	NOTCH1	1915	PLPPR4	2454	TDGF1
299	CD44	838	GPR107	1377	NOTCH2	1916	PLPPR5	2455	TECTA
300	CD46	839	GPR108	1378	NOTCH3	1917	PLVAP	2456	TECTB
301	CD47	840	GPR119	1379	NOTCH4	1918	PLXDC1	2457	TEK
302	CD48	841	GPR132	1380	NOX4	1919	PLXDC2	2458	TENM1
303	CD52	842	GPR137	1381	NPBWR1	1920	PLXNA1	2459	TENM2
304	CD53	843	GPR137B	1382	NPBWR2	1921	PLXNA2	2460	TENM3
305	CD55	844	GPR137C	1383	NPC1	1922	PLXNA3	2461	TENM4
306	CD58	845	GPR139	1384	NPC1L1	1923	PLXNA4	2462	TEX101
307	CD59	846	GPR141	1385	NPFFR1	1924	PLXNB1	2463	TFPI
308	CD63	847	GPR142	1386	NPFFR2	1925	PLXNB2	2464	TGFA
309	CD68	848	GPR143	1387	NPHS1	1926	PLXNB3	2465	TGFBR1
310	CD69	849	GPR146	1388	NPR1	1927	PLXNC1	2466	TGFBR2
311	CD70	850	GPR148	1389	NPR2	1928	PLXND1	2467	TGFBR3
312	CD74	851	GPR149	1390	NPR3	1929	PMEL	2468	TGOLN2
313	CD79A	852	GPR150	1391	NPSR1	1930	PMEPA1	2469	THBD
314	CD79B	853	GPR151	1392	NPTN	1931	PODXL	2470	THSD1
315	CD80	854	GPR152	1393	NPY1R	1932	PODXL2	2471	THSD7A
316	CD82	855	GPR153	1394	NPY2R	1933	PQLC2	2472	THSD7B
317	CD83	856	GPR155	1395	NPY4R	1934	PRIMA1	2473	THY1
318	CD84	857	GPR156	1396	NPY5R	1935	PRLHR	2474	TIE1
319	CD86	858	GPR157	1397	NRCAM	1936	PRLR	2475	TIGIT
320	CD93	859	GPR158	1398	NRG1	1937	PRND	2476	TIMD4
321	CD96	860	GPR160	1399	NRG2	1938	PRNP	2477	TLR1
322	CD101	861	GPR161	1400	NRG4	1939	PROCR	2478	TLR2
323	CD109	862	GPR162	1401	NRN1	1940	PROKR1	2479	TLR3
324	CD151	863	GPR171	1402	NRN1L	1941	PROKR2	2480	TLR4
325	CD160	864	GPR173	1403	NRP1	1942	PROM1	2481	TLR5
326	CD163	865	GPR174	1404	NRP2	1943	PROM2	2482	TLR6
327	CD163L1	866	GPR176	1405	NRROS	1944	PRPH2	2483	TLR7
328	CD164	867	GPR179	1406	NRXN1	1945	PRRT3	2484	TLR8
329	CD164L2	868	GPR180	1407	NRXN2	1946	PRSS8	2485	TLR9
330	CD177	869	GPR182	1408	NRXN3	1947	PRSS21	2486	TLR10
331	CD180	870	GPR183	1409	NT5E	1948	PRSS41	2487	TM4SF1
332	CD200	871	GPRC5A	1410	NTM	1949	PRTG	2488	TM4SF4
333	CD200R1	872	GPRC5B	1411	NTNG1	1950	PSCA	2489	TM4SF5
334	CD200R1L	873	GPRC5C	1412	NTNG2	1951	PSEN1	2490	TM4SF18
335	CD226	874	GPRC5D	1413	NTRK1	1952	PSEN2	2491	TM4SF20
336	CD244	875	GPRC6A	1414	NTRK2	1953	PTAFR	2492	TM7SF3
337	CD248	876	GRAMD1B	1415	NTRK3	1954	PTCH1	2493	TM9SF1
338	CD274	877	GRIA1	1416	NTSR1	1955	PTCHD1	2494	TM9SF2
339	CD276	878	GRIA2	1417	NTSR2	1956	PTCHD3	2495	TM9SF3
340	CD300A	879	GRIA3	1418	NUP210	1957	PTCHD4	2496	TM9SF4
341	CD300C	880	GRIA4	1419	NUP210L	1958	PTCRA	2497	TMC7
342	CD300E	881	GRID1	1420	OLR1	1959	PTGDR	2498	TMCO3
343	CD300LD	882	GRID2	1421	OMG	1960	PTGDR2	2499	TMED7
344	CD300LF	883	GRIK1	1422	OPALIN	1961	PTGER1	2500	TMEFF1
345	CD300LG	884	GRIK2	1423	OPCML	1962	PTGER2	2501	TMEFF2
346	CD302	885	GRIK3	1424	OPN1LW	1963	PTGER3	2502	TMEM8A
347	CD320	886	GRIK4	1425	OPN1MW	1964	PTGER4	2503	TMEM8B
348	CDCP1	887	GRIK5	1426	OPN1SW	1965	PTGFR	2504	TMEM9
349	CDH1	888	GRIN1	1427	OPN3	1966	PTGFRN	2505	TMEM9B
350	CDH2	889	GRIN2A	1428	OPN4	1967	PTGIR	2506	TMEM25
351	CDH3	890	GRIN2B	1429	OPN5	1968	PTH1R	2507	TMEM26
352	CDH4	891	GRIN2C	1430	OPRD1	1969	PTH2R	2508	TMEM30A
353	CDH5	892	GRIN2D	1431	OPRK1	1970	PTK7	2509	TMEM37

354	CDH6	893	GRIN3A	1432	OPRL1	1971	PTPRA	2510	TMEM62
355	CDH7	894	GRIN3B	1433	OPRM1	1972	PTPRB	2511	TMEM63A
356	CDH8	895	GRM1	1434	OR1A1	1973	PTPRC	2512	TMEM63B
357	CDH9	896	GRM2	1435	OR1A2	1974	PTPRD	2513	TMEM63C
358	CDH10	897	GRM3	1436	OR1B1	1975	PTPRF	2514	TMEM67
359	CDH11	898	GRM4	1437	OR1C1	1976	PTPRG	2515	TMEM87A
360	CDH12	899	GRM5	1438	OR1D2	1977	PTPRH	2516	TMEM87B
361	CDH13	900	GRM6	1439	OR1D4	1978	PTPRJ	2517	TMEM95
362	CDH15	901	GRM7	1440	OR1D5	1979	PTPRK	2518	TMEM104
363	CDH16	902	GRM8	1441	OR1E1	1980	PTPRM	2519	TMEM106A
364	CDH17	903	GRPR	1442	OR1E2	1981	PTPRN	2520	TMEM106B
365	CDH18	904	GSG1	1443	OR1E3	1982	PTPRN2	2521	TMEM108
366	CDH19	905	GSG1L	1444	OR1F1	1983	PTPRO	2522	TMEM114
367	CDH20	906	GSG1L2	1445	OR1G1	1984	PTPRQ	2523	TMEM116
368	CDH22	907	GUCY2C	1446	OR1I1	1985	PTPRR	2524	TMEM123
369	CDH23	908	GYPA	1447	OR1J1	1986	PTPRS	2525	TMEM131L
370	CDH24	909	GYPC	1448	OR1J2	1987	PTPRT	2526	TMEM132A
371	CDH26	910	HAVCR1	1449	OR1J4	1988	PTPRU	2527	TMEM132B
372	CDHR1	911	HAVCR2	1450	OR1K1	1989	PTPRZ1	2528	TMEM132C
373	CDHR2	912	HBEGF	1451	OR1L1	1990	PTTG1IP	2529	TMEM132D
374	CDHR3	913	HCAR1	1452	OR1L3	1991	PVR	2530	TMEM132E
375	CDHR4	914	HCAR2	1453	OR1L4	1992	QRFPR	2531	TMEM140
376	CDHR5	915	HCAR3	1454	OR1L6	1993	QSOX1	2532	TMEM145
377	CDON	916	HCRTR1	1455	OR1L8	1994	QSOX2	2533	TMEM150A
378	CEACAM1	917	HCRTR2	1456	OR1M1	1995	RAET1E	2534	TMEM150B
379	CEACAM3	918	HEG1	1457	OR1N1	1996	RAET1G	2535	TMEM154
380	CEACAM4	919	HEPACAM	1458	OR1N2	1997	RAET1L	2536	TMEM158
381	CEACAM5	920	HEPACAM2	1459	OR1P1	1998	RAMP2	2537	TMEM161A
382	CEACAM6	921	HEPH	1460	OR1Q1	1999	RAMP3	2538	TMEM171
383	CEACAM7	922	HEPHL1	1461	OR1S1	2000	RECK	2539	TMEM178A
384	CEACAM8	923	HFE	1462	OR1S2	2001	RELL1	2540	TMEM178B
385	CEACAM19	924	HHLA2	1463	OR2A1	2002	RELT	2541	TMEM179B
386	CEACAM20	925	HJV	1464	OR2A2	2003	RET	2542	TMEM182
387	CEACAM21	926	HLA-A	1465	OR2A4	2004	RGMA	2543	TMEM184A
388	CELSR1	927	HLA-B	1466	OR2A5	2005	RGMB	2544	TMEM204
389	CELSR2	928	HLA-C	1467	OR2A7	2006	RGR	2545	TMEM211
390	CELSR3	929	HLA-DMA	1468	OR2A12	2007	RHAG	2546	TMEM213
391	CFC1	930	HLA-DMB	1469	OR2A14	2008	RHBDF2	2547	TMEM217
392	CHL1	931	HLA-DOA	1470	OR2A25	2009	RHBDL2	2548	TMEM219
393	CHODL	932	HLA-DOB	1471	OR2A42	2010	RHCG	2549	TMEM225
394	CHPT1	933	HLA-DPA1	1472	OR2AE1	2011	RHO	2550	TMEM231
395	CHRM1	934	HLA-DPB1	1473	OR2AG1	2012	RNF13	2551	TMEM235
396	CHRM2	935	HLA-DQA1	1474	OR2AG2	2013	RNF43	2552	TMEM245
397	CHRM3	936	HLA-DQA2	1475	OR2AJ1	2014	RNF128	2553	TMEM255A
398	CHRM4	937	HLA-DQB1	1476	OR2AK2	2015	RNF130	2554	TMEM255B
399	CHRM5	938	HLA-DQB2	1477	OR2AP1	2016	RNF149	2555	TMIGD1
400	CHRNA1	939	HLA-DRA	1478	OR2AT4	2017	RNF150	2556	TMIGD2
401	CHRNA2	940	HLA-DRB1	1479	OR2B2	2018	RNF167	2557	TMIGD3
402	CHRNA3	941	HLA-DRB5	1480	OR2B3	2019	RNFT1	2558	TMPRSS5
403	CHRNA4	942	HLA-E	1481	OR2B6	2020	ROBO1	2559	TMPRSS6
404	CHRNA5	943	HLA-F	1482	OR2B11	2021	ROBO2	2560	TMPRSS11B
405	CHRNA6	944	HLA-G	1483	OR2C1	2022	ROBO3	2561	TMPRSS11D
406	CHRNA7	945	HM13	1484	OR2C3	2023	ROR1	2562	TMPRSS11E
407	CHRNA9	946	HRH1	1485	OR2D2	2024	ROR2	2563	TMPRSS13
408	CHRNA10	947	HRH2	1486	OR2D3	2025	ROS1	2564	TMPRSS15
409	CHRNB1	948	HRH3	1487	OR2F1	2026	RPN1	2565	TMX3
410	CHRNB2	949	HRH4	1488	OR2F2	2027	RPRM	2566	TMX4
411	CHRNB3	950	HTR1A	1489	OR2G2	2028	RPRML	2567	TNFRSF1A

412	CHRNB4	951	HTR1B	1490	OR2G3	2029	RRH	2568	TNFRSF1B
413	CHRND	952	HTR1D	1491	OR2G6	2030	RTN4R	2569	TNFRSF4
414	CHRNE	953	HTR1E	1492	OR2H1	2031	RTN4RL1	2570	TNFRSF8
415	CHRNG	954	HTR1F	1493	OR2H2	2032	RTN4RL2	2571	TNFRSF9
416	CLCA2	955	HTR2A	1494	OR2J1	2033	RXFP1	2572	TNFRSF10A
417	CLCA4	956	HTR2B	1495	OR2J2	2034	RXFP2	2573	TNFRSF10C
418	CLCNKB	957	HTR2C	1496	OR2J3	2035	RXFP3	2574	TNFRSF10D
419	CLDN1	958	HTR3A	1497	OR2K2	2036	RXFP4	2575	TNFRSF11A
420	CLDN2	959	HTR3B	1498	OR2L2	2037	RYK	2576	TNFRSF13B
421	CLDN3	960	HTR3C	1499	OR2L3	2038	S1PR1	2577	TNFRSF14
422	CLDN4	961	HTR3D	1500	OR2L5	2039	S1PR2	2578	TNFRSF17
423	CLDN6	962	HTR3E	1501	OR2L8	2040	S1PR3	2579	TNFRSF18
424	CLDN7	963	HTR4	1502	OR2L13	2041	S1PR4	2580	TNFRSF19
425	CLDN8	964	HTR5A	1503	OR2M2	2042	S1PR5	2581	TNFRSF21
426	CLDN9	965	HTR6	1504	OR2M3	2043	SCAP	2582	TNFRSF25
427	CLDN10	966	HTR7	1505	OR2M4	2044	SCARA5	2583	TNFSF4
428	CLDN11	967	HYAL2	1506	OR2M5	2045	SCARB1	2584	TNFSF8
429	CLDN12	968	ICAM1	1507	OR2M7	2046	SCARB2	2585	TNFSF11
430	CLDN15	969	ICAM2	1508	OR2S2	2047	SCARF1	2586	TNFSF13B
431	CLDN16	970	ICAM3	1509	OR2T1	2048	SCARF2	2587	TNFSF15
432	CLDN18	971	ICAM4	1510	OR2T2	2049	SCN1A	2588	TNFSF18
433	CLDN19	972	ICAM5	1511	OR2T3	2050	SCN1B	2589	TP53I13
434	CLDN20	973	ICOS	1512	OR2T4	2051	SCN2A	2590	TPBG
435	CLDN22	974	ICOSLG	1513	OR2T5	2052	SCN2B	2591	TPBGL
436	CLDN24	975	IFNAR1	1514	OR2T6	2053	SCN3A	2592	TPCN1
437	CLDND1	976	IFNAR2	1515	OR2T7	2054	SCN3B	2593	TPO
438	CLEC1A	977	IFNGR1	1516	OR2T8	2055	SCN4A	2594	TPRA1
439	CLEC1B	978	IFNGR2	1517	OR2T10	2056	SCN4B	2595	TPSG1
440	CLEC2D	979	IFNLR1	1518	OR2T11	2057	SCN5A	2596	TRABD2A
441	CLEC4G	980	IGDCC3	1519	OR2T12	2058	SCN7A	2597	TRABD2B
442	CLEC4M	981	IGDCC4	1520	OR2T27	2059	SCN8A	2598	TRAT1
443	CLEC5A	982	IGF1R	1521	OR2T29	2060	SCN9A	2599	TREH
444	CLEC7A	983	IGF2R	1522	OR2T33	2061	SCN10A	2600	TREM1
445	CLEC9A	984	IGFLR1	1523	OR2T34	2062	SCN11A	2601	TREM2
446	CLEC12A	985	IGSF1	1524	OR2T35	2063	SCNN1A	2602	TREML2
447	CLEC12B	986	IGSF3	1525	OR2V1	2064	SCNN1B	2603	TRHDE
448	CLEC14A	987	IGSF5	1526	OR2V2	2065	SCNN1D	2604	TRHR
449	CLEC17A	988	IGSF6	1527	OR2W1	2066	SCNN1G	2605	TRIL
450	CLMP	989	IGSF8	1528	OR2W3	2067	SCTR	2606	TRPV2
451	CLN3	990	IGSF9	1529	OR2Y1	2068	SDC1	2607	TRPV4
452	CLRN1	991	IGSF9B	1530	OR2Z1	2069	SDC2	2608	TRPV5
453	CLRN2	992	IGSF11	1531	OR3A1	2070	SDK1	2609	TRPV6
454	CLSTN1	993	IL1R1	1532	OR3A2	2071	SDK2	2610	TSHR
455	CLSTN2	994	IL1R2	1533	OR3A3	2072	SECTM1	2611	TSPAN1
456	CLSTN3	995	IL1RAP	1534	OR4A5	2073	SELE	2612	TSPAN2
457	CLTRN	996	IL1RAPL1	1535	OR4A8	2074	SELL	2613	TSPAN3
458	CMKLR1	997	IL1RAPL2	1536	OR4A15	2075	SELP	2614	TSPAN4
459	CNNM2	998	IL1RL1	1537	OR4A16	2076	SELPLG	2615	TSPAN5
460	CNNM3	999	IL1RL2	1538	OR4A47	2077	SEMA4A	2616	TSPAN6
461	CNNM4	1000	IL2RA	1539	OR4B1	2078	SEMA4B	2617	TSPAN7
462	CNR1	1001	IL2RB	1540	OR4C3	2079	SEMA4C	2618	TSPAN8
463	CNR2	1002	IL2RG	1541	OR4C5	2080	SEMA4D	2619	TSPAN9
464	CNTFR	1003	IL3RA	1542	OR4C6	2081	SEMA4F	2620	TSPAN11
465	CNTN1	1004	IL4R	1543	OR4C11	2082	SEMA4G	2621	TSPAN13
466	CNTN2	1005	IL5RA	1544	OR4C12	2083	SEMA5A	2622	TSPAN14
467	CNTN3	1006	IL6R	1545	OR4C13	2084	SEMA5B	2623	TSPAN15
468	CNTN4	1007	IL6ST	1546	OR4C15	2085	SEMA6A	2624	TSPAN17
469	CNTN5	1008	IL7R	1547	OR4C16	2086	SEMA6B	2625	TSPAN18

470	CNTN6	1009	IL9R	1548	OR4C45	2087	SEMA6C	2626	TSPAN31
471	CNTNAP1	1010	IL10RA	1549	OR4C46	2088	SEMA6D	2627	TSPAN33
472	CNTNAP2	1011	IL10RB	1550	OR4D1	2089	SEMA7A	2628	TTYH1
473	CNTNAP3	1012	IL11RA	1551	OR4D2	2090	SERINC1	2629	TTYH2
474	CNTNAP3B	1013	IL12RB1	1552	OR4D5	2091	SERINC2	2630	TTYH3
475	CNTNAP4	1014	IL12RB2	1553	OR4D6	2092	SERINC3	2631	TXNDC15
476	CNTNAP5	1015	IL13RA1	1554	OR4D9	2093	SERINC4	2632	TYR
477	CORIN	1016	IL13RA2	1555	OR4D10	2094	SERINC5	2633	TYRO3
478	CPD	1017	IL15RA	1556	OR4D11	2095	SEZ6	2634	TYRP1
479	CPM	1018	IL17RA	1557	OR4E1	2096	SEZ6L2	2635	UBAC2
480	CR1	1019	IL17RB	1558	OR4E2	2097	SGCA	2636	UGT8
481	CR2	1020	IL17RC	1559	OR4F3	2098	SGCB	2637	ULBP1
482	CRB1	1021	IL17RD	1560	OR4F4	2099	SGCD	2638	ULBP2
483	CRB2	1022	IL17RE	1561	OR4F5	2100	SGCE	2639	ULBP3
484	CRB3	1023	IL18R1	1562	OR4F6	2101	SGCZ	2640	UMOD
485	CRHR1	1024	IL18RAP	1563	OR4F15	2102	SHISA4	2641	UMODL1
486	CRHR2	1025	IL20RA	1564	OR4F16	2103	SHISA6	2642	UNC5A
487	CRIM1	1026	IL20RB	1565	OR4F17	2104	SHISA7	2643	UNC5B
488	CRLF2	1027	IL21R	1566	OR4F21	2105	SHISA8	2644	UNC5C
489	CRTAM	1028	IL22RA1	1567	OR4F29	2106	SHISA9	2645	UNC5D
490	CSF1	1029	IL23R	1568	OR4K1	2107	SHISAL1	2646	UNC93A
491	CSF1R	1030	IL27RA	1569	OR4K2	2108	SIDT1	2647	UNC93B1
492	CSF2RA	1031	IL31RA	1570	OR4K3	2109	SIDT2	2648	UPK1A
493	CSF2RB	1032	ILDR1	1571	OR4K5	2110	SIGIRR	2649	UPK1B
494	CSF3R	1033	IMPG2	1572	OR4K13	2111	SIGLEC1	2650	UPK2
495	CSMD1	1034	INSR	1573	OR4K14	2112	SIGLEC5	2651	UPK3A
496	CSMD2	1035	INSRR	1574	OR4K15	2113	SIGLEC6	2652	UPK3B
497	CSPG4	1036	ISLR2	1575	OR4K17	2114	SIGLEC7	2653	UPK3BL1
498	CSPG5	1037	ITFG1	1576	OR4L1	2115	SIGLEC8	2654	USH2A
499	CTLA4	1038	ITGA1	1577	OR4M1	2116	SIGLEC9	2655	UTS2R
500	CTNS	1039	ITGA2	1578	OR4M2	2117	SIGLEC10	2656	VASN
501	CUZD1	1040	ITGA2B	1579	OR4N2	2118	SIGLEC11	2657	VCAM1
502	CX3CL1	1041	ITGA3	1580	OR4N4	2119	SIGLEC12	2658	VIPR1
503	CX3CR1	1042	ITGA4	1581	OR4N5	2120	SIGLEC14	2659	VIPR2
504	CXADR	1043	ITGA5	1582	OR4P4	2121	SIGLEC15	2660	VLDLR
505	CXCL16	1044	ITGA6	1583	OR4Q2	2122	SIGLEC16	2661	VN1R1
506	CXCR1	1045	ITGA7	1584	OR4Q3	2123	SIGLECL1	2662	VN1R2
507	CXCR2	1046	ITGA8	1585	OR4S1	2124	SIRPA	2663	VN1R3
508	CXCR3	1047	ITGA9	1586	OR4S2	2125	SIRPB1	2664	VN1R4
509	CXCR4	1048	ITGA10	1587	OR4X1	2126	SIRPB2	2665	VNN1
510	CXCR5	1049	ITGA11	1588	OR4X2	2127	SIRPG	2666	VNN2
511	CXCR6	1050	ITGAD	1589	OR5A1	2128	SIT1	2667	VNN3
512	CYBB	1051	ITGAE	1590	OR5A2	2129	SLAMF1	2668	VSIG1
513	CYSLTR1	1052	ITGAL	1591	OR5AC1	2130	SLAMF6	2669	VSIG2
514	CYSLTR2	1053	ITGAM	1592	OR5AC2	2131	SLAMF7	2670	VSIG8
515	DAG1	1054	ITGAV	1593	OR5AK2	2132	SLAMF8	2671	VSIG10
516	DAGLA	1055	ITGAX	1594	OR5AL1	2133	SLAMF9	2672	VSIG10L
517	DAGLB	1056	ITGB1	1595	OR5AN1	2134	SLC1A1	2673	VSIR
518	DCBLD1	1057	ITGB2	1596	OR5AP2	2135	SLC1A2	2674	VSTM1
519	DCBLD2	1058	ITGB3	1597	OR5AR1	2136	SLC1A3	2675	VSTM4
520	DCC	1059	ITGB4	1598	OR5AS1	2137	SLC1A4	2676	VSTM5
521	DCHS1	1060	ITGB5	1599	OR5AU1	2138	SLC1A5	2677	VTCN1
522	DCHS2	1061	ITGB6	1600	OR5B2	2139	SLC1A6	2678	XCR1
523	DCSTAMP	1062	ITGB7	1601	OR5B3	2140	SLC1A7	2679	XKR3
524	DCT	1063	ITGB8	1602	OR5B12	2141	SLC2A1	2680	XPNPEP2
525	DDR1	1064	ITLN1	1603	OR5B17	2142	SLC2A2	2681	ZACN
526	DDR2	1065	ITM2B	1604	OR5B21	2143	SLC2A3	2682	ZAN
527	DGCR2	1066	ITM2C	1605	OR5C1	2144	SLC2A4	2683	ZDHHC5

528	DIRC2	1067	IZUMO1	1606	OR5D13	2145	SLC2A5	2684	ZDHHC11
529	DISP1	1068	IZUMO1R	1607	OR5D14	2146	SLC2A6	2685	ZDHHC11B
530	DISP2	1069	IZUMO3	1608	OR5D16	2147	SLC2A7	2686	ZFYVE27
531	DISP3	1070	JAG1	1609	OR5D18	2148	SLC2A8	2687	ZNRF4
532	DLK1	1071	JAG2	1610	OR5F1	2149	SLC2A9	2688	ZP1
533	DLK2	1072	JAM2	1611	OR5G3	2150	SLC2A10	2689	ZP2
534	DLL1	1073	JAM3	1612	OR5H1	2151	SLC2A11	2690	ZP3
535	DLL3	1074	JAML	1613	OR5H2	2152	SLC2A12	2691	ZP4
536	DLL4	1075	KCNA3	1614	OR5H6	2153	SLC2A13	2692	ZPLD1
537	DNER	1076	KCNG4	1615	OR5H14	2154	SLC2A14	-	-
538	DPEP1	1077	KCNJ3	1616	OR5H15	2155	SLC3A1	-	-
539	DPEP2	1078	KCNJ4	1617	OR5I1	2156	SLC3A2	-	-

[0057] 상기 표 1에 개시된 유전자 중 가이드 RNA의 디자인이 용이한 유전자 2,653 종을 선정하고, 상기 유전자 하나당 최대 6 개의 가이드 RNA와 대조군 가이드 RNA를 디자인하여 총 15,678 개의 가이드 RNA를 포함하는 가이드 RNA 라이브러리를 디자인하였다. 그리고 합성된 가이드 RNA 라이브러리를 렌티바이러스 벡터로 클로닝하여 가이드 RNA를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 구축하였다. 상기 렌티바이러스 벡터를 차세대염기서열분석법(Next-generation sequencing, NGS)를 수행하여, 가이드 RNA가 잘 발현됨을 확인하였다.

[0059] **실시예 3. Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포(Cas9/gRNA library cell)의 구축**

[0060] 상기 실시예 2의 가이드 RNA 라이브러리가 도입된 렌티바이러스 벡터를 실시예 1의 유방암 세포(MDA-MB-468-cas9)에 도입하였다. MOI(Multiplicity of Infection)를 0.3 수준으로 조절하여 각 유방암 세포 당 하나의 렌티바이러스 벡터를 도입하였다. 그리고 퓨로마이신 셀렉션(Puromycin selection)을 통해 가이드 RNA가 삽입되지 않은 유방암 세포를 제거하고, Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포를 구축하였다. 상기 구축된 Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포의 전체 DMA(genomic DNA)를 분리하고 NGS를 수행하여 가이드 RNA 라이브러리가 삽입되었음을 확인하였다.

[0062] **실험예 1. 자기 활성화 세포 분류(magnetic activated cell sorting: MACS)를 이용한 항체와 결합능을 상실한 세포 분류**

[0063] 상기 실시예 3의 Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포를 트립신으로 처리하고 150 μl의 MACS 완충액에서 2×10^6 세포의 최종 농도로 재현탁하였다. 이후, 5 ㎍의 항체와 함께 상기 Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포를 2 시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 상기 Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포와 MACS 단백질 G 마이크로비드(130-071-101)를 4 ℃의 조건에서 30 분 동안 결합시킨 후, MACS 완충액(100 μl)을 상기 Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포에 첨가하고 LD 컬럼(130-042-901)을 사용하여 세포를 분류하였다. 항체가 표지되지 않은 세포 및 항체가 표지된 세포를 수집하고, 세포 계수를 수행하였다.

[0065] **실험예 2. 유전자 결손에 따른 항체 결합능 상실 확인**

[0066] 각 분리된 세포군에서 삽입된 gRNA를 확인하기위해 세포의 전체 DNA에서 가이드 RNA 영역을 PCR하고 이를 NGS를 통해 염기서열을 분석함으로써 15,678개의 가이드 RNA의 분포를 확인하였다. 총 15,678 개의 가이드 RNA 각각에 대해 대조군 및 실험군에서의 비율을 계산하여 대조군보다 실험군에서 증가한 가이드 RNA를 선별하였다. 상기 선별된 가이드 RNA가 표적하는 유전자를 확인하고, 어떤 유전자가 결손되었을 때 항체 결합이 없어지는지 추적하였다.

[0068] **2.1 EGFR표면단백질의 결합항체인 Cetuximab을 사용하여 MACS를 수행한 결과 EGFR이 결손된 세포가 스크리닝 됨을 확인**

[0069] 세포 표면 단백질인 표피 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)의 결합항체로 잘 알려진 세툭시맙(Cetuximab)을 이용하여 스크리닝한 결과 EGFR을 표적하는 가이드 시퀀스(guide sequence)(서열번호 1: TGTCACCACATAATTACCTG, 서열번호 2: GTGGAGCCTCTTACACCCAG, 서열번호 3: GTCTGCGTACTTCCAGACCA, 서열번호 4: TCTTGCCGGAATGTCAGCCG, 서열번호 5: CCTCATTGCCCTCAACACAG, 서열번호 6: CTCTTCTTAGACCATCCAGG)에 대한 가이드 RNA가 세툭시맙이 표지되지 않은 세포에서 22,000배 이상 증폭되는 것을 확인하고 이를 도 2에 나타내었다.

[0070] 도 2는 Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포에 대해 세툭시맙(cetuximab)을 항체로 사용하여 MACS를 수행하고, 세툭시맙이 표지된 세포 대비 세툭시맙이 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 확인한 그래프이다.

[0071] 도 2에 나타낸 바와 같이, 세툭시맙이 표지되지 않은 세포에서 세툭시맙에 대한 항원인 EGFR을 표적하는 가이드 RNA가 많이 발현되는 것을 확인하였다.

[0072] 이는, 항체가 표지되지 않은 세포에서 증폭된 가이드 RNA를 확인하고, 상기 증폭된 가이드 RNA가 표적하는 유전자를 확인함으로써, 항체가 결합하는 항원을 규명할 수 있음을 의미한다.

[0074] **2.2 CD44에 대한 결합항체인 CD44항체를 사용하여 MACS를 수행한 결과 CD44가 결손된 세포가 스크리닝 됨을 확인**

[0075] CD44 표면단백질에 대한 결합항체인 CD44항체를 사용하여 스크리닝한 결과, 두 개의 서로 다른 세포주(HeLa 및 A549) 모두에서 CD44를 표적하는 가이드 시퀀스(서열번호 7: CATCACGGTTAACAATAGCT, 서열번호 8: AAGACTCCCATTCGACAACA, 서열번호 9: TGCTACTTCAGACAACCACA, 서열번호 10: TCGCTACAGCATCTCTCGGA, 서열번호 11: CGTGGAATACACCTGCAAAG, 서열번호 12: CTACAGCATCTCTCGGACGG)에 대한 가이드 RNA가 CD44항체가 표지되지 않은 세포에서 증폭되는 것을 확인하고, 이를 도 3에 나타내었다.

[0076] 도 3은 CD44항체를 사용하여 MACS를 수행하고, CD44항체가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 서로 다른 세포주에서 확인한 그래프이다:

[0077] 도 3a는 CD44항체가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 HeLa 세포주에서 확인한 그래프이고, 도 3b는 CD44항체가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 A549 세포주에서 확인한 그래프이다.

[0079] 도 3에 나타낸 바와 같이, CD44항체가 표지되지 않은 세포에서 CD44를 표적하는 가이드 RNA가 많이 발현되는 것을 확인하였다.

[0080] 이는, 항체가 표지되지 않은 세포에서 증폭된 가이드 RNA를 확인하고, 상기 증폭된 가이드 RNA가 표적하는 유전자를 확인함으로써, 항체가 결합하는 항원을 규명할 수 있음을 의미한다.

[0082] **실험예 3. 항암항체에 대한 항원 동정**

[0083] **3.1 항암항체에 대한 항원 동정**

[0084] 환자유래 항체 라이브러리에서 발굴된 항암항체 S4-2 및 S3-5에 대하여 상기 실험예 2와 동일한 실험을 수행하고, 그 결과 신규 항암항체에 대한 항원으로 ICAM-1 1(Intercellular Adhesion Molecule 1)을 동정하였다. 이를 도 4에 나타내었다.

[0085] 도 4는 Cas9/가이드 RNA 라이브러리 세포에 대해 환자유래 항체 라이브러리에서 발굴된 항암항체 S4-2 및 S3-5을 항체로 사용하여 MACS를 수행하고, 상기 항암항체 S4-2 또는 S3-5가 표지된 세포 대비 항암항체 S4-2 또는 S3-5가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 확인한 그래프이다:

[0086] 도 4 a는 환자유래 항체 라이브러리에서 발굴된 항암항체 S4-2가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 확인한 그래프이고, 도 4b는 환자유래 항체 라이브러리에서 발굴된 항암항체 S3-5가 표지되지 않은 세포에서 많이 발현되는 가이드 RNA를 확인한 그래프이다.

[0087] 도 4에 나타낸 바와 같이, 환자유래 항체 라이브러리에서 발굴된 항암항체 S4-2 및 S3-5가 표지되지 않은 세포에서 ICAM-1를 표적하는 가이드 시퀀스(서열번호 13: TGACGTGTGCAGTAATACTG, 서열번호 14:

GCCCGCTGAGGTCACGACCA, 서열번호 15: CGGGCTGTTCCCAGTCTCGG, 서열번호 16: TGCAGGGACTCCAGAACGGG, 서열번호 17: ACCAGCACGGAGCCTCCCCG, 서열번호 18: GCTCAGTTACTCACAGTACA)에 대한 가이드 RNA가 많이 발현되는 것을 확인하였다.

[0088] 이는, 상기 ICAM-1이 항암항체 S4-2 및 S3-5에 대한 항원임을 의미한다.

[0090] **3.2 항암항체 S4-2 및 S3-5와 ICAM1을 발현하는 세포주의 결합 확인**

[0091] 상기 ICAM1이 항암항체 S4-2 및 S3-5와 직접 결합하는지 확인하기 위하여, 상기 ICAM1의 특이적 siRNA를 처리하여 유세포분석(Fluorescence-activated cell sorting, FACS)을 통해 항체에 대한 결합능력 상실을 확인하였다. 또한, 면역침강법-웨스턴블랏(Immunoprecipitation-western blot)을 통해, ICAM1이 항암항체 S4-2 및 S3-5와 직접 결합하는지 여부를 검증하였다. 그리고 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

표 2

[0092]

ICAM1 특이적 siRNA		염기서열	서열번호
ICAM1	Sense	CCGGUAUGAGAUUGUCAUCAUUU	서열번호 19
	antisense	AUGAUGACAAUCUCAUACCGGUU	서열번호 20

[0094] 도 5는 MDA-MB-468 세포주에서 ICAM1의 특이적 siRNA를 처리하고, 유세포분석(Fluorescence-activated cell sorting, FACS)을 수행한 그래프이다.

[0095] 도 6은 ICAM1을 발현하는 HS578T 유방암 세포주에의 면역침강법-웨스턴블랏(Immunoprecipitation-western blot)을 수행한 이미지이다.

[0096] 도 5 및 6에 나타낸 바와 같이, ICAM1를 발현하지 않는 세포주는 항암항체 S4-2 및 S3-5와의 결합능을 상실함을 확인하였고, ICAM1를 발현하는 세포주는 항암항체 S4-2 및 S3-5와 결합함을 확인하였다.

[0098] **3.3 항암항체 4-2 및 3-5와 ICAM1의 직접적 결합여부 확인**

[0099] 항암항체 S4-2 및 S3-5와 ICAM1이 직접 결합하는지 여부를 확인하기 위해, 정제된 ICAM1을 항체(IgG, 3-5, 및 4-2)와 *in vitro*에서 섞고 면역침강법-웨스턴블랏을 수행하였다. 그리고 그 결과를 도 7에 나타내었다.

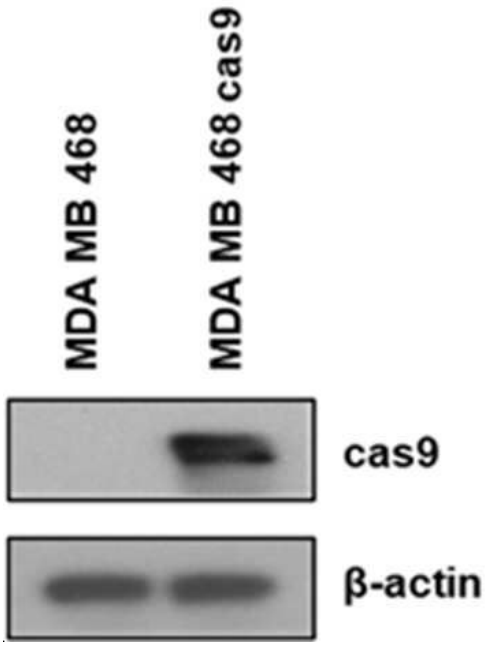
[0100] 도 7은 항암항체 S4-2 및 S3-5와 ICAM1이 직접 결합하는지 여부를 확인하기 위해 면역침강법-웨스턴블랏을 수행한 결과를 나타낸 이미지이다.

[0101] 도 8은 세포 표면 항원을 스크리닝하는 방법에 대한 모식도이다.

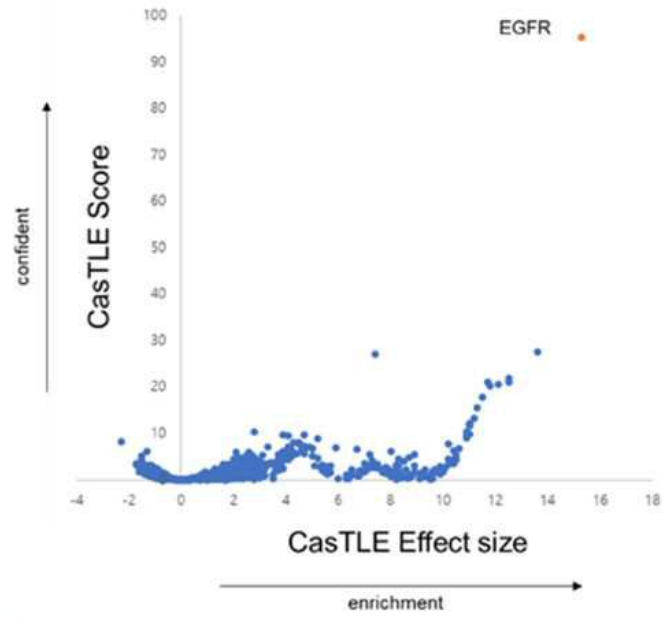
[0103] 도 7에 나타낸 바와 같이, 항암항체 S4-2 및 S3-5는 모두 ICAM1과 직접 결합함을 확인하였다.

도면

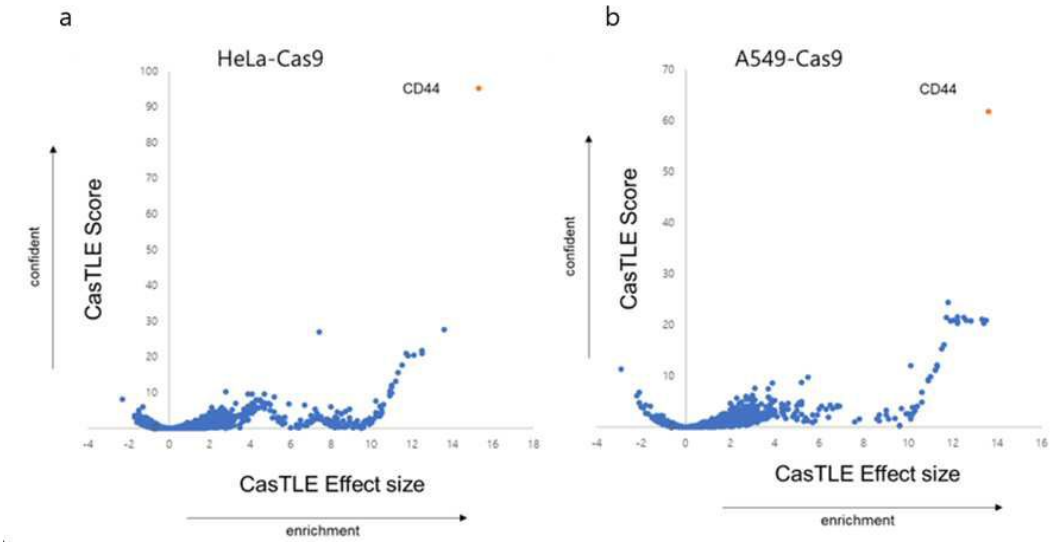
도면1


MDA MB 468
MDA MB 468 cas9
cas9
β-actin

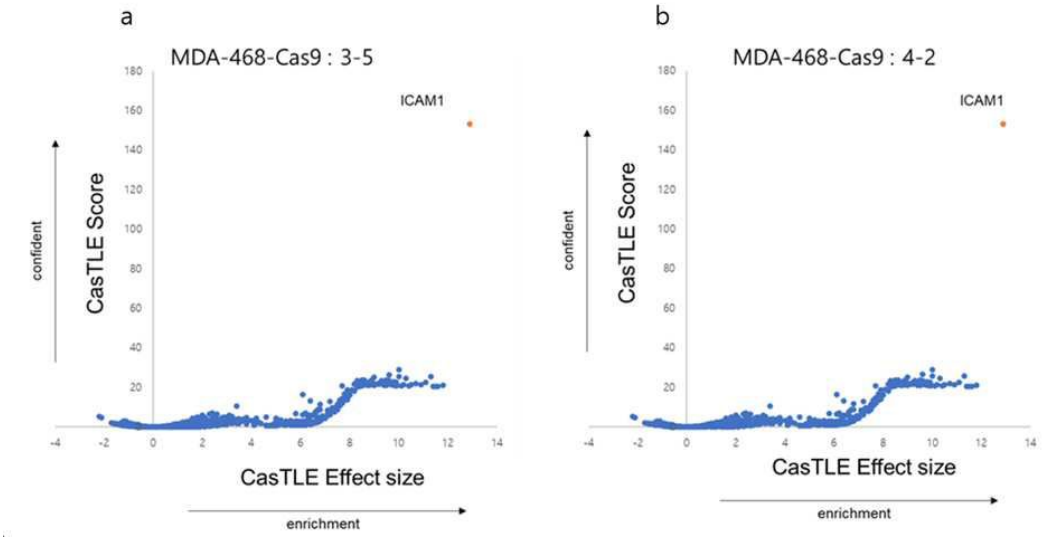
도면2


EGFR
CasTLE Score
confident
CasTLE Effect size
enrichment

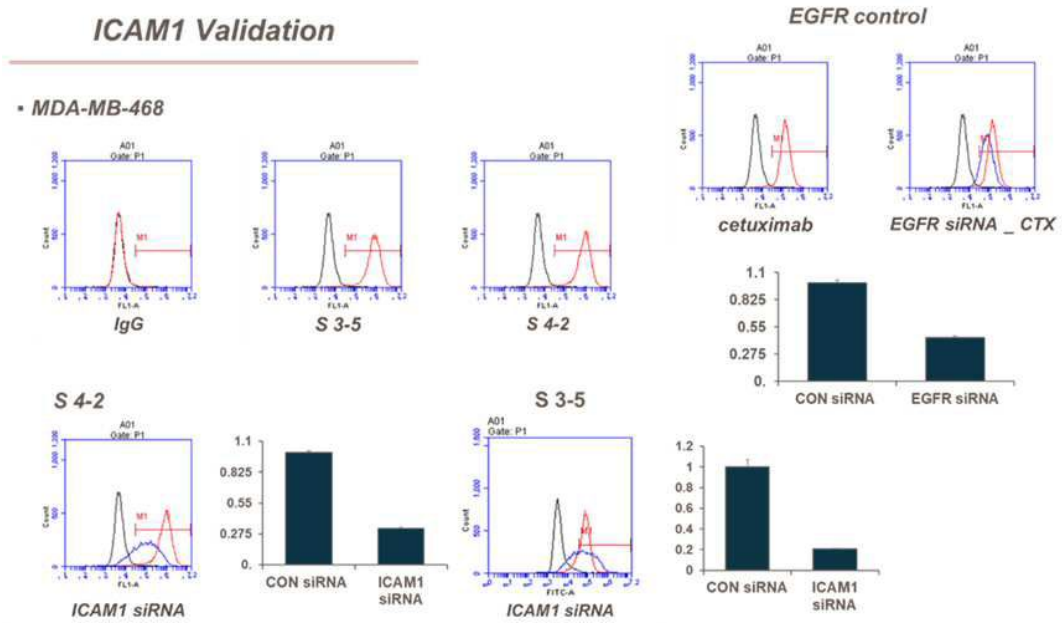
도면3


a
HeLa-Cas9
CD44
CasTLE Score
confident
CasTLE Effect size
enrichment
b
A549-Cas9
CD44
CasTLE Score
confident
CasTLE Effect size
enrichment

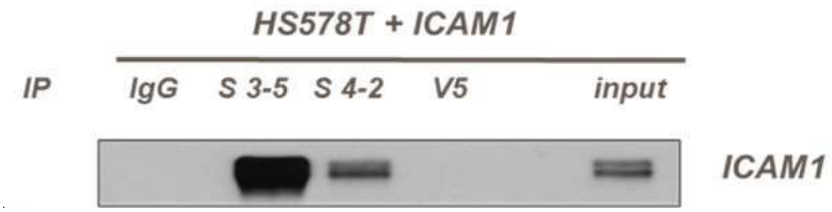
도면4


a
MDA-468-Cas9 : 3-5
ICAM1
CasTLE Score
confident
CasTLE Effect size
enrichment
b
MDA-468-Cas9 : 4-2
ICAM1
CasTLE Score
confident
CasTLE Effect size
enrichment

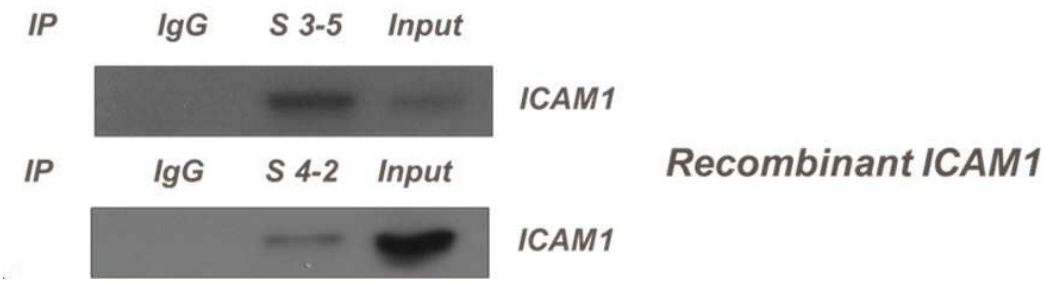
도면5


ICAM1 Validation
• MDA-MB-468
IgG
S 3-5
S 4-2
S 4-2
ICAM1 siRNA
CON siRNA
ICAM1 siRNA
S 3-5
ICAM1 siRNA
CON siRNA
ICAM1 siRNA
EGFR control
cetuximab
EGFR siRNA _ CTX
CON siRNA
EGFR siRNA

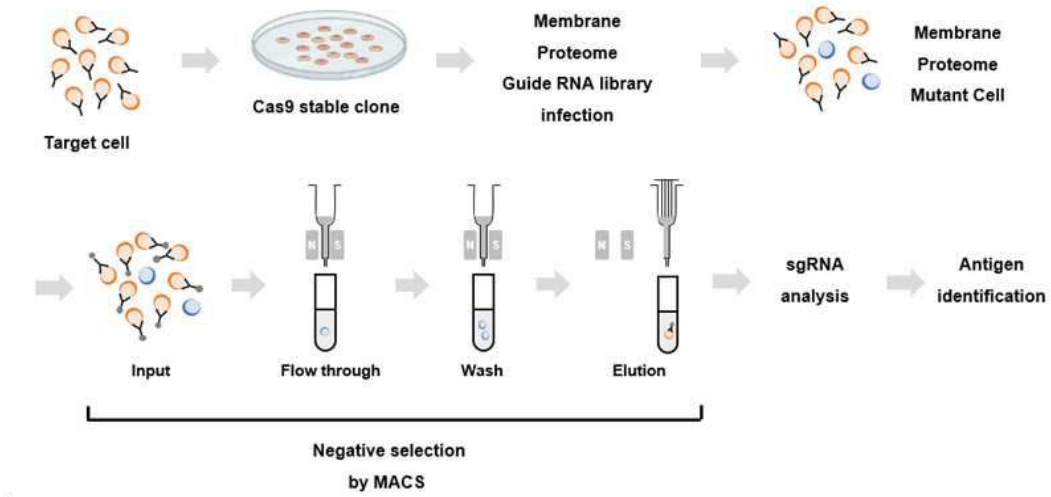
도면6


HS578T + ICAM1
IP
IgG
S 3-5
S 4-2
V5
input
ICAM1

도면7


IP
IgG
S 3-5
Input
ICAM1
IP
IgG
S 4-2
Input
ICAM1
Recombinant ICAM1

도면8


Target cell
Cas9 stable clone
Membrane
Proteome
Guide RNA library
infection
Membrane
Proteome
Mutant Cell
Input
Flow through
Wash
Elution
sgRNA
analysis
Antigen
identification
Negative selection
by MACS

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.