



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년08월02일 10-0745895 2007년07월27일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2004-0105716 2004년12월14일 2004년12월14일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-2006-0067199 2006년06월19일
----------------------------------	---	------------------------	--------------------------------

(73) 특허권자 한국생명공학연구원
 대전 유성구 어은동 52번지

의료법인 성삼의료재단
서울 강서구 내발산동 701-4

(72) 발명자 홍효정
 대전시 서구 둔산동 크로바아파트 117동 201호

류춘제
대전시 유성구 어은동 99 한빛아파트 133-1104

손연성
서울특별시 서대문구 홍제3동 270-50 삼성그린빌 301호

박재현
경북 경산시 중방동 광명아파트 6동 507호

강영국
대전시 유성구 장대동 323-2 월드컵패밀리타운 102동 201호

박진성
대전시 유성구 신성동 146-14 벤처타운 403호

최홍서
대전시 유성구 송강동 한마을 A 109-101

윤현수
서울 강남구 도곡동 966 매봉APT 101동 505호

노성일
서울 강남구 압구정1동 458번지 현대APT 79동 1301호

이정은
서울시 노원구 하계1동 280. 미성 APT 6-1201

이정복
경기 부천시 원미구 원미동 114-1 원미풍림APT 106동 807호

(74) 대리인 손민

(56) 선행기술조사문헌
Hybridoma, vol. 14, pp. 347-354

심사관 : 김지윤

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체

(57) 요약

본 발명은 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마에 관한 것으로서, 구체적으로는 인간 배아줄기세포에는 결합하고 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않는 HSPA8(Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 1)에 대한 단일클론항체, 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마, 상기 단일클론항체를 포함하는 검정키트 및 인간 배아줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 9

특허청구의 범위

청구항 1.

수탁번호 KCTC 10733BP인 하이브리도마에 의해 생성되는 단일클론항체.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

수탁번호 KCTC 10733BP인 하이브리도마.

청구항 6.

제1항의 단일클론항체를 포함하는, 미분화된 인간 배아줄기세포 제거용 조성물.

청구항 7.

제1항의 단일클론항체를 포함하는, 미분화된 인간 배아줄기세포의 검정 키트.

청구항 8.

제1항에서, 상기 항체는 ATP 처리시 HSPA8로부터 분리되는 펩타이드가 HSPA8과 결합하고 있는 상태에서만 HSPA8에 결합하는 것인 단일클론항체.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다.

줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 생물을 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아, 나아가 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)하여 증식(proliferation; expansion)하는 특성이 있으며, 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

줄기세포는 크게 전분화능(pluripotency)을 갖는 배아줄기세포(embryonic stem cell)와 다분화능(multipotency)을 갖는 성체줄기세포(adult stem cell)로 구분된다. 배아발생 초기인 포배기(blastocyte)의 세포내괴(inner cell mass)는 장차 태아를 형성할 부분으로서 이 세포 내괴로부터 형성된 배아줄기세포는 이론적으로 한 개체를 구성하는 모든 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 줄기세포이다. 즉, 배아줄기세포는 무제한적으로 증식이 가능한 미분화 세포이고, 모든 세포로 분화할 수 있으며 성체줄기세포와 달리 배(germ) 세포도 만들 수 있어 다음세대로 유전될 수 있다. 이에 반하여, 그 후 태아 발생과정이 진행되어 태아의 각 장기가 형성되는 과정에 도입되면 각각의 장기에는 그 장기에 특이한 줄기세포(tissue specific stem cells; primary stem cells)가 존재하여 각 장기를 형성하는 분화 과정에 참여하게 된다. 이와 같이 조직 특이적 줄기세포는 일반적으로 분화할 수 있는 그 분화능력이 그 조직을 구성하는 세포로만 한정되게 되며(multipotent or unipotent), 성인이 된 후에도 대부분의 장기에는 각 장기에 특이한 줄기세포가 남아 있게 되어 정상적 또는 병리적으로 발생하는 세포의 손실을 보충하게 된다.

배아줄기세포 연구의 역사적 배경을 보면 1981년 처음으로 생쥐의 배아 줄기세포 배양법이 확립된 후(Evans et al., Nature, 292: 151-156, 1981), 1996년 영장류에서의 전분화능 배아줄기세포 배양법(Thomson et al., Biol. Reprod., 55: 254-259, 1996)이 개발되었고, 1998년 미국의 톰슨(Thomson) 등에 의해 인간 배아줄기세포 배양법이 확립되었다(Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998). 배아줄기세포는 모든 세포로 분화할 수 있는 전분화능을 갖고 있으므로, 질병이나 사고에 의한 특정 세포나 장기의 손상 시 줄기세포를 그 특정 세포로 분화를 유도하여 사용할 수 있을 것으로 기대됨에 따라, 여러 난치성 질환의 근원적 치료방법으로 부상하고 있다.

인간 배아줄기세포는 가장 잘 알려져 있는 생쥐 배아줄기세포와 유사한 특성을 가지기도 하지만, 확연한 차이를 보이는 부분 또한 많이 존재하고 있는 것으로 알려지고 있다. 먼저 대표적인 유사한 특징은 인간배아줄기세포는 생쥐 것처럼 전분화능을 가지고 있는 세포이므로, 시험관 내(in vitro) 조건에서 배아체(embryoid body, EB)를 형성시켜 분화를 유도하였을 때 다양한 모든 조직의 세포로 분화가 일어나게 된다(Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Reubinoff, et al., Nat. Biotech., 18:399-404; Park, et al., Biol. Reprod., 69:2007-2014, 2003). 세포 배양 시는 두 세포 모두 피더(Feeder)나 피더세포배양액이 있는 상태에서 배양이 가능하다는 유사점이 있고, 또한 배아의 발생에서 초기분화에 관계된다고 알려진 Oct-4 유전자가 발현되고 있으며, 자가 증식이 가능한 세포에서 발현되고 있는 텔로머라제(telomerase)의 존재 및 생쥐 배아줄기세포에서 높게 발현하고 있는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)가 인간 배아줄기세포에서도 공통으로 발현되고 있다는 점이다. 그러나 인간과 생쥐 배아줄기세포와의 특성상의 많은 차이점도 있는데 다음과 같다. 생쥐 배아줄기세포는 하나의 세포로 배양이 가능하지만 인간 배아줄기세포는 하나의 세포로 만들었을 때 대부분이 죽

어머리므로 하나의 세포로는 배양이 불가능하다는 사실이다. 형태학적으로 다를 뿐만 아니라, 배양 시 자가 재생산이나 전분화능을 유지하기 위한 사이토카인 요구성도 다르다. 실제 마이크로어레이 결과에서 인간의 배아줄기세포의 줄기성(Stemness)을 유지하기 위한 유전자 풀(pool)이 생쥐의 그것과 상당부분이 다르다는 것을 알 수 있다(Bhattacharya, et al., Blood, 103:2956-2964, 2004).

그럼에도 불구하고 현재 배양중인 미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 동정하고 정의하기 위하여, 인간 배아줄기세포가 아닌, 생쥐 배아(embryo)나 사람 배아암세포(embryonal carcinoma)를 생쥐에 주사하여 만든 단일클론항체, 예를 들어 TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA1, SSEA3, SSEA4 등에 대한 항체를 사용하고 있다. 그런데 이런 항체들에 의해서 인식되는 분자들은 대부분 탄수화물 에피토프를 가지고 있어 그 기능이 아직 알려져 있지 않다(Badcock, et al., Cancer Res. 59:4715-4719, 1999; Kannagi et al., EMBO. J. 2:2355-2361, 1983). 그 외 단백질 마커인 CD9도 인간배아줄기세포 표면에 발현하는 것으로 알려졌지만 이것은 생쥐 배아줄기세포에서도 발현된다(Oka, et al., Mol. Biol. Cell 13:1274-1281, 2002; Carpenter, et al., Dev. Dyn. 229:243-258, 2004). 따라서 미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 연구하기 위해 인간 배아줄기세포에만 특이적인 보다 많은 표식인자의 발굴이 절실히 요구되고 있으며 실제 배양된 미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 직접 주사하여 그 미분화상태의 표면분자들에 대한 단일클론항체의 제조는 보다 많은 다양한 인간 배아줄기세포에 특이적인 세포 표면 분자들을 발굴해 줄 것으로 기대된다.

현재 줄기세포를 이용한 세포치료의 핵심은 인간과 동물에서의 줄기세포의 분리, 줄기세포의 배양기술 확립, 시험관내 조건에서의 특정 기능세포로의 분화유도 및 분리기술, 인체실험 전에 동물에서 효능과 안전성 확립, 그리고 인체 이식에서의 면역거부반응 억제기술 등이 있으며 그 중 가장 핵심기술은 다양한 기능성 세포로의 분화 유도이다. 현재까지 생쥐 배아줄기세포 연구에서는 조혈모세포(hematopoietic cells)(Wiles et al., Development, 111: 259-267, 1991), 심장근육세포(cardiomyocytes)(Klug et al., J. Clin. Invest., 98: 216-224, 1996), 인슐린-분비 세포(insulin-secreting cells)(Soria et al., Diabetes, 49: 157-162, 2000), 신경세포(neurons)와 신경아교세포(glia)(Bain et al., Dev. Biol., 168: 342-357, 1995; Okabe et al., Mech. Dev., 59: 89-102, 1996; Mujtaba et al., Dev. Biol., 214: 113-127, 1999; Brustle et al., Science, 285: 754-756, 1999; Brustle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 14809-14814, 1997)로의 분화방법이 확립되어 있으며 인간 배아줄기세포를 이용한 연구는 현재 이미 확립되어 있는 생쥐 배아줄기세포의 배양방법을 응용하여 특정한 기능성 세포로의 분화를 유도, 확립하는 과정에 있다. 현재 영양배(trophoblast)(Xu et al., Nat. Biotechnol., 20: 1261-1264, 2002), 심근세포(Kehat, et al., Circ. Res 91:659-661, 2002; Mummery. et al., Circulation 107:2733-2740, 2003), 신경전구체(Zhang et al., Nat. Biotechnol., 19: 1129 - 1133; Reubinoff et al., Nat. Biotechnol., 19: 1134 - 1140, 2001), 혈관 내벽세포(Levenberg, et al., PNAS. 99:4391-4396, 2002), 조혈세포(Chadwick et al., Blood, 102: 906-915, 2003)등등의 다양한 세포로의 분화 가능성이 보고되었으며 앞으로 보다 다양한 세포로의 분화유도법이 보고될 것으로 예상된다.

상기한 바와 같이 인간 배아줄기세포로부터 분화 유도한 다양한 기능성 세포들을 세포 치료법에 이용 시, 중요한 것은 우선 이들을 순수 분리해내고 실제 동물이나 인체 내에서 효능과 안전성 확립하여야 하는 일이다. 인간 배아줄기세포 자체를 다양한 퇴행성 질환에 세포치료요법으로 직접 쓸 수도 있지만, 이 경우는 생쥐 등에서 암을 형성하는 것으로 알려져 있다(Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Reubinoff, et al., Nat. Biotech., 18:399-404; Park, et al., Biol. Reprod. 69:2007-2014, 2003). 따라서 세포 치료를 위해 인간 배아줄기세포로부터 분화 유도된 기능성 세포는 반드시 인간 배아줄기세포를 완전히 제거한 후에 세포 치료에 사용되어야 한다. 그러나 현재 사용되고 있는 미분화 인간배아줄기세포를 동정하는 항체만으로는 그들의 특성을 보다 정확히 분석하고 또 이 미분화능 세포를 분리하는데 충분하지 않아 어려움이 많다. 따라서 인간 배아줄기세포를 특이적으로 인식하는 항체를 보다 많이 개발하면 인간 배아줄기세포의 특성을 정확히 분석하고 세포 치료시 인간 배아줄기세포를 제거하는데 유용하게 쓰일 수 있다.

이러한 배경 하에서, 본 발명자는 인간 배아줄기세포를 배양하여 배양된 인간 배아줄기세포가 미분화된 상태의 인간 배아줄기세포임을 확인한 후, 이를 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체의 제조에 이용하여 제조한 단일클론항체가 미분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하고, 생쥐 기원의 세포에는 결합하지 않으며, 항원으로서 HSPA8을 인식하고, HSP70에 대한 기존의 항체와 다른 에피토프를 인식하는 새로운 항체임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 인간 배아줄기세포에는 결합하고 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않는, HSPA8(Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 1)에 대한 단일클론항체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 배아줄기세포의 검정 키트를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 배아줄기세포를 제거하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 사용하여 인간 배아줄기세포를 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

하나의 양태로서, 본 발명은 인간 배아줄기세포에는 결합하고 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않는, HSPA8(Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 1)에 대한 단일클론항체에 관한 것이다.

하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체는 미분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하고 분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않는 단일클론항체이다.

또 다른 하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체는 HSPA8의 ATP에 민감한 에피토프를 특이적으로 인식하는 단일클론항체이다.

바람직한 양태에서, 본 발명의 단일클론항체는 수탁번호 KCTC 10733BP의 하이브리도마에 의해 생성되는 단일클론항체 20-202S이다.

본 발명에서 용어 “단일클론항체”란 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)에 대해서 지시되어 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 단일클론항체는 미분화 상태인 인간 배아줄기세포의 세포표면 단백질에 특이적으로 결합하므로, 미분화된 인간 배아줄기세포의 세포표면 단백질을 인식하는 단백질 분자이다.

항원의 특정 에피토프를 인식하여 항원-항체 복합체를 형성하는 항체의 주요 부위는 중쇄 및 경쇄의 가변 영역, 특히 CDR (complementarity determining region)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. 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 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

본 발명자는 미분화된 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체를 생산하기 위해, 인간 배아줄기세포를 콜라겐나제 효소를 사용하여 후속배양을 쉽게 하여 대량으로 배양하고 그 특성을 분석한 후 배양 세포가 인간 배아줄기세포임을 확인한 후 이를 생쥐에 면역주사하는데 이용하였다. 구체적으로, 인간 배아줄기세포를 배양한 후 헤마톡실린과 에오신 염색으로 인간 배아줄기세포의 형태 및 알칼라인 포스파타제 발현을 상대비 현미경으로 관찰(도 1a의 1 및 도 1a의 2 참조)하고, 텔로머라제 활성(도 1c 참조) 및 RT-PCR을 이용한 Oct4 발현을 측정(도 1b 참조)하여, 배양 세포가 인간 배아줄기세포임을 확인하였다. 또한, SSEA(stage specific embryonic antigen) 염색을 통하여, 인간 배아줄기세포에 음성마커인 SSEA1에 대한 항체는 상기 세포에 결합하지 아니하고, 양성마커인 SSEA3 및 SSEA4에 대한 항체는 결합한다는 것을 면역조직화학적 방법으로 확인하였다(도 1a의 3, 4 및 5 참조). 이에 비로써, 배아줄기세포 자체를 항원으로 사용하여 미분화된 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체의 제조가 가능하게 되었다.

이어서, 상기 배양된 인간 배아줄기세포를 불활성화시킨 후 이를 사용하여 마우스를 면역화시키고 이로부터 분리한 비장 세포를 암세포와 융합하여 제조한 하이브리도마로부터 본 발명의 일 구체적 양태인 단일클론항체 20-202S를 분리, 정제하고, 상기 항체의 인간 배아줄기세포에 대한 결합능을 확인하였으며(도 2 참조), 생쥐 배아줄기세포, 생쥐 배아섬유아세포, 생쥐 섬유아세포(STO) 등에는 결합하지 않음을 확인하였다(도 3 내지 도 5). 또한 이 항체는 레티노산을 처리하여 분화시킨 세포에서 결합능이 감소한다는 것을 확인하였다(도 6). 또한, 10% SDS-PAGE를 수행한 결과, 단일클론항체 20-202S는 분자량 약 72kDa의 인간 배아줄기세포의 단백질을 인식함을 확인하였다(도 7). 본 발명의 단일클론항체가 인식하는 인간 배아줄기세포의 단백질의 분자량은 10% SDS-PAGE를 이용하여 측정된 것으로서, 분자량의 측정 조건에 따라 일정 범위 내에서 달라질 수 있다. 따라서, 단백질의 분자량을 제시함에 있어 용어 “약”의 사용을 피할 수 없으며, 일반적인

로 ± 2 kDa, 바람직하게는 ± 1 kDa의 범위를 가질 수 있다. 또한, 단일클론항체 20-202S가 인식하는 단백질을 면역침강 후 SDS-PAGE에서 분리한 후 트립신으로 절단하여 Q-TOF분석으로 HSP70 단백질인 HSPA8라는 것을 확인하였다(도 8).

본 발명의 단일클론항체가 인식하는 히트 속 단백질의 일종인 HSPA8 (Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 1) (Tavaria, et al., Genomics 29:266-268, 1995)은 세포내에서 단백질의 잘못된 접힘을 방지하는 기능을 갖는 것으로 밝혀져 있었으나, 최근 연구에서 암세포, 단핵구(monocyte), 태줄 정맥 혈관 내벽세포주

(umbilical vein endothelial cell) 표면에서 발현하는 것으로 알려졌다(Shin, et al., J. Biol. Chem., 278:7607-7616, 2003; Asea, et al., Nature Med., 6:435-

442, 2000; Triantafilou, et al., Nature Immunol. 2:338-345, 2001). 최근 마이크로레이(Microarray)를 이용한 분석에서 HSPA8의 유전자가 인간 배아줄기세포에서 과발현 된다는 보고가 있었으나(Abeyta, et al. Hum. Mol. Genet., 13:601-608, 2004; Zeng, et al., Stem Cells 22:292-312, 2004), 이는 단지 RNA 수준에서 과발현된다는 것을 보이는 것일 뿐이며, HSPA8이 인간 배아줄기세포의 표면에 발현한다는 것은 본 발명의 특정 단일클론항체의 사용에 의해 처음으로 밝혔다. 또한, 이 단백질의 발현이 미분화 인간배아줄기세포가 분화할 때 감소한다는 것도 밝힘으로써 미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 정의해 주는 중요한 세포표면 마커로 작용할 수 있으며 이를 이용하여 순수 미분화 인간 배아줄기세포를 분리하는데 사용할 수 있음을 입증하였다.

또한, 본 발명의 단일클론항체가 HSP70 에 대한 기존 항체(W27, SPA810, 5G10, SPA820)와는 다른 결합 양상을 보인다는 것을 웨스턴 블롯으로 확인하였다(도 9). 또한, ATP에 민감한 에피토프를 인식하는 항체임을 ATP을 처리하여 증명하였다(도 11). 이러한 일련의 과정을 통해, 본 발명의 단일클론항체는 본 발명 이전에 개발된 HSP70 에 대한 항체와는 상이한 에피토프를 인식하는 새로운 항체임을 입증하였다.

이와 같이, 인간 배아줄기세포에는 결합하지만 생쥐 기원의 세포, 생쥐 배아줄기세포, 배아섬유아세포, 섬유아세포에는 결합하지 않으면서, HSPA8을 특이적으로 인식하는 본 발명의 단일클론항체의 결합 특이성은 본 발명의 단일클론항체가 본 발명 이전에는 밝혀진 바 없는 새로운 단일클론항체임을 입증하는 것이다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 바와 같은 본 발명의 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다.

하나의 구체적 양태에서, 본 발명은 단일클론항체 20-202S를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.

구체적 실시에서, 본 발명의 하이브리도마는 인간 배아줄기세포에 방사선을 조사하여 세포를 불활성화시키고; 상기 불활성화된 배아줄기세포를 생쥐의 복강에 주입한 후; 상기 생쥐의 비장에서 림프구를 분리하여; 및 상기 림프구를 골수종 암 세포와 융합하여 제조하였다.

이중, 단일클론항체 20-202S를 분비하는 하이브리도마를 각각 하이브리도마 20-202S(수탁번호: KCTC 10733BP)라 명명하고, 이를 2004년 12월 1일자로 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, 대한민국 대전시 유성구 여은동 52번지 한국생명공학연구원)에 기탁하였다.

단일클론항체를 분비하는 하이브리도마는 이를 시험관내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.

상기한 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전지영동, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액(ascites fluid)으로부터 분리될 수 있다.

본 발명의 구체적 실시에서는 본 발명의 단일클론항체의 대량 생산을 위해, 하이브리도마를 생쥐의 복강에 주사하여 복수액에서 배양하고 이를 단백질 G-세파로스(sepharose) 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 분리하였다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체를 사용하여 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 단일클론항체는 세포치료를 위해 이식될 세포 중에 존재하는 배아줄기세포를 제거하거나, 이식된 세포 중에 존재하는 배아줄기세포를 제거하기 위해 사용될 수 있다.

배아줄기세포를 선택적으로 제거하기 위해, 본 발명의 단일클론항체를 공지의 치료제와 직접 또는 링커 등을 통하여 간접적으로 커플링(예를 들어, 공유결합)시킬 수 있다. 항체와 결합될 수 있는 치료제에는 방사성핵종(radionuclide), 약제, 톱포카인, 독소, 이형가능성 항체 등이 있으나 이로 제한되지는 않는다.

이식된 세포 중에 존재하는 배아줄기세포를 제거하기 위해, 항체는 그 자체 또는 항체를 포함하는 조성물로 투여될 수 있다. 항체를 포함하는 조성물의 경우 투여 방식에 따라 허용 가능한 담체를 포함하여 적절한 제제로 제조된다. 투여 방식에 적합한 제제는 당 분야에 공지되어 있다. 이들 제제는 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내, 및 국부적 면역억제치료를 위해 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의해 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하투여가 포함된다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 본 발명의 항체를 포함하는 조성물은 배아줄기세포를 제거하기에 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 전형적인 투여량 수준은 표준 임상적 기술을 사용하여 최적화할 수 있다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포의 검정 키트에 관한 것이다.

본 발명의 단일클론항체는 항원-항체 복합체 반응을 통해 이식될 또는 이식된 세포 중의 배아줄기세포를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라 미분화된 인간 배아줄기세포를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.

이러한 검정 키트에는 본 발명의 단일클론항체 뿐만 아니라 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함된다. 이러한 도구/시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함하나 이로 제한되지 않는다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

항원-항체 복합체 형성은 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법 (ELISA), 웨스턴 블롯(Western Blotting), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip)등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 핵소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]$

$^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[Mo(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl ,

^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 인간 배아줄기세포의 배양 및 배아줄기세포의 특성 분석

<1-1> 인간 배아줄기세포의 배양

본 발명자들은 인간 배아줄기세포를 특이적으로 인식할 수 있는 새로운 단일클론항체를 제조하기 위하여, 먼저 인간 배아 줄기세포 Miz-hES1(Park, et al., Biol. Reprod. 69:2007-2014, 2003), Miz-hES4(Kim, et al., Mole & Cells 2004 In press), HSF6(Abeyta, et al., Human Mol. Genet 13:601-608, 2004)를 성삼의료재단 미즈메디병원(대한민국 서울시 강서구 내발산동 701-4)으로부터 분양 받아서 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)/F12(Gibco, Rockville, MD, USA), 20%의 녀아웃(Knockout) SR(Gibco), 0.1 mM의 β -머캅토에탄올(mercaptoethanol)(Sigma, St Luis, MO, USA), 2 mM의 글루타민(glutamine)(Gibco), 0.1 mM의 비필수 아미노산(Gibco), 100 U/ml의 페니실린(penicillin) G (Sigma), 100 μ g/ml의 스트렙토마이신(streptomycin) (Sigma), 4 ng/ml의 bFGF(Gibco Invitrogen) 배지에서 인간 배아 줄기세포를 배양한 후, 6일 간격으로 2차 배양(subculture)을 수행하였다.

구체적으로, 0.1%의 젤라틴(gelatin) 용액으로 37℃에서 10분 동안 12-웰(well)의 조직배양용 플레이트(Nunc)를 코팅한 후, 3000 rad 감마 방사선을 조사한 MEF(mouse embryonic fibroblast, 한국생명공학연구원 실험동물실)를 웰당 6.5×10^4 세포 수로 접종하였다. 상기 방사선이 조사된 MEF는 성장하지는 않지만, 인간 배아줄기세포의 성장을 지지하는 세포이다. MEF 배양 24시간 후에 5-7일 된 인간 배아줄기세포 조직에 37℃에서 1시간 동안 1 mg/ml의 콜라겐분해효소(collagenase) IV(Gibco)를 처리한 후, 상기 줄기세포를 적당한 크기로 자른 후 상기에서 준비한 MEF 조직배양용 플레이트에 옮기고, 48시간 후부터 매일 배양액을 교체하며 배양하였다.

<1-2> 헤마토실린(Hematoxylin)과 에오신(Eosine) 염색으로 인간 배아줄기세포의 관찰

상기 실시예 <1-1>의 방법으로 배양한 6-7일 배양된 인간 배아줄기세포를 PBS(Phosphate buffered saline, 인산완충 식염수)로 세척한 후, 4%의 파라포름알데히드(paraformaldehyde)(Roche, NY, USA)로 30분간 상기 줄기세포를 고정하고, 다시 PBS로 세척 과정을 3회 반복 실시한 후, 100%, 95%, 80%, 70%의 에탄올을 각각 1분씩 처리하였다. 그 후, 흐르는 물로 상기 세포를 세척한 뒤 헤마토실린(Sigma)을 5분 동안 처리하였다. 5분 경과 후, 암모니아수로 깨끗이 헤마토실린을 제거하고 0.5%의 에오신(Eosin, Sigma)에 5분 동안 처리하여 줄기세포의 세포질을 염색하였다. 최종적으로 다시 한번 암모니아수로 세척하고 70%, 80%, 95%, 100%의 에탄올을 각각 1분씩 처리한 후 상대비 현미경(phase contrast microscopy)으로 관찰하였다(도 1a의 1). 그 결과, 상기 세포는 MEF 세포와 뚜렷한 경계를 형성하고 모든 세포들이 밀접하게 연결되어 평평한 구형태의 한 덩어리를 형성하며 성장하였으며, 이는 인간 배아줄기세포의 특징적 형태를 나타냄을 확인하였다.

<1-3> 알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase)의 발현 조사

상기 실시예 <1-1>의 방법으로 배양한 인간 배아줄기세포를 4%의 파라포름알데히드로 30분간 고정시키고 다시 PBS 세척하였다. 그 후, 2%의 트윈(tween) 20을 30분간 처리하고 증류수로 세척한 후, 제조사의 매뉴얼에 따라 AP 염색 키트(AP staining kit; Sigma)를 사용하여 15분 동안 염색하였다. 최종적으로 증류수로 세척한 후, 대조염색(counterstaining)으로 헤마톡실린을 2분 정도 처리하여 상대비 현미경으로 관찰하였다(도 1a의 2). 그 결과, 파란 염색은 헤마톡실린에 의한 각각의 핵이 염색된 것으로 알칼라인 포스파타제 효소가 발현하여 붉게 세포괴가 염색됨을 확인하였다.

<1-4> SSEA 염색

상기 실시예 <1-1>의 방법으로 배양한 인간 배아줄기세포를 4%의 파라포름알데히드로 30분간 고정시키고 다시 PBS 세척한 뒤, 통상의 말혈청으로 1시간 동안 블러킹을 수행하였다. 이어서, SSEA(stage specific embryonic antigen)1, SSEA3, 및 SSEA4에 대한 항체(DSHB, the University of Iowa, USA)들을 1시간 동안 처리하고 PBS로 세척하였다. 최종적으로 SSEA에 대한 2차 항체를 1시간 동안 처리하고 Vectastain ABC 시약(DAP staining kit, Sigma) 20분간 처리한 후, PBS로 세척하고 기질 용액을 처리하여 염색을 하고 상대비 현미경으로 면역조직화학적 방법으로 관찰한 결과, 인간 배아줄기세포는 음성대조군 마커인 SSEA1에 대하여는 음성이고, 양성대조군 마커인 SSEA3 및 SSEA4에 대하여는 양성임을 확인하였다(도 1a의 3, 4 및 5).

<1-5> 텔로머라제(Telomerase) 활성 측정

MEF(mouse embryonic fibroblast)에서는 발현되지 않는 텔로머라제 유전자가 인간 배아줄기세포에서는 열에 민감한 텔로머라제 유전자가 발현되어 텔로미어(telomere)를 추가적으로 결합하여 증가된 길이의 텔로미어를 갖는다는 것을 서던 블롯(Southern blotting)으로 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>의 방법으로 배양한 인간 배아줄기세포에 콜라겐분해효소를 처리하여 각각의 세포로 분리한 후 텔로머라제 활성 분석 키트(telomerase activity assay kit)(Intergen, NY, USA)를 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따른 방법으로 세포파쇄(cell lysis) 후에 PCR을 수행하였다. 제조자의 매뉴얼에 따라, TS 프라이머에 텔로머라제액을 더해 텔로미어를 확장시키고, RP 프라이머와 Taq 폴리머라제(polymerase)를 사용하여 94℃에서 30초, 59℃에서 30초, 72℃에서 1분씩 36회 PCR을 수행하였다. 상기 PCR 수행후, 그 산물을 2%의 아가로스 겔에서 전기영동하고, 멤브레인으로 DNA를 옮긴 후, ^{32}P 방사능 동위원소로 표지된 서열번호 5로 기재되는 염기서열의 프로브를 사용하여 서던 블롯(Southern blotting)을 수행하여 텔로머라제 활성을 측정한 결과, 상기 인간 배아줄기세포는 열에 민감한 텔로머라제를 발현함을 확인하였다(도 1c). 이때, 상기 도 1c에서 P는 양성대조군 추출액과 그 희석액, P + heat는 양성대조군(시료)을 열 처리에 따른 텔로머라제 활성의 불활성화, MEF는 생쥐 배아섬유아세포, hES는 인간 배아줄기세포이고, hES + heat는 인간 배아줄기세포 추출액의 열처리를 나타낸다.

<1-6> Oct-4 발현조사

상기 실시예 <1-1>의 방법으로 배양한 인간 배아줄기세포로부터 RNA 분리 키트(RNA isolation kit)(Roche)를 사용하여 전체 RNA를 분리한 후, 생쥐 배아섬유아세포에서는 발현되지 않는 Oct4 유전자가 인간 배아줄기세포에서는 발현되는 것을 확인하기 위하여, Oct4 유전자에 특이적인 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재되는 프라이머를 이용한 RT-PCR 및 RNA 정량을 위한 서열번호 3 및 서열번호 4로 기재되는 β -액틴(actin) 프라이머를 이용한 RT-PCR을 수행하였다. 상기 PCR을 수행한 후, 그 산물을 1.5%의 아가로스 겔에서 전기영동함으로써 Oct4 유전자의 발현을 확인하였다(도 1b). 상기 도 1b에서 -RT는 역전사효소(Reverse Transcriptase)를 첨가하지 않은 음성대조군, MEF는 생쥐 배아섬유아세포이고, hES는 인간 배아줄기세포를 나타낸다.

<실시예 2> 하이브리도마 제조

<2-1> 인간 배아줄기세포의 면역주사

상기 실시예 <1-1>의 방법으로 배양한 인간 배아줄기세포 Miz-hES1을 콜라겐분해효소 IV로 처리하여 분리하고, 약 2×10^6 의 세포를 100 μl 의 PBS에 부유한 후 γ -방사선 조사하여 상기 줄기세포를 불활성화시킨 뒤, Balb/c 생쥐(한국생명공학연구원 실험동물실)의 복강에 주사하였다. 3주 간격으로 3회 반복투여하고 세포융합 3일 전에 다시 주사하였다.

<2-2> 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 제조

피더(feeder) 세포를 채취하기 위하여, 세포융합 하루 전에 건강한 생쥐의 복막에 DMEM(GIBCO) 배지를 20 ml를 채웠다가 다시 빨아내는 방법으로 복강 내에 있는 세포를 채취한 다음 원심분리하고, 또 정상 비장을 갈아서 세포를 추출하여 이 둘을 섞은 다음 20% 우태아혈청을 넣고 웰당 10^5 개의 세포가 되도록 96웰 플레이트에 분주하여 37℃, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 2주 전부터 비장세포와 융합할 NS1 골수종(myeloma) 세포주(ATCC, USA)도 RPMI1640(GIBCO사)과 10%의 우태아혈청을 혼합한 배지에서 배양하였다.

상기 실시예 <2-1>에서와 같이 인간 배아줄기세포로 면역시킨 생쥐에서 비장을 꺼내 RPMI1640(GIBCO사)으로 잘 씻고 유리봉으로 페트리 디쉬에서 잘 분쇄하고 세포 부유물을 15 ml 튜브에서 방치하여 찌꺼기가 가라앉으면 상층액을 새 튜브로 옮겨두었다. NS1를 원심분리하여 수확하고 10 ml의 RPMI1640에 현탁하여 위의 비장세포와 함께 세포수를 계수하였다. 10^7 개의 NS1와 10^8 개의 비장세포를 50 ml 튜브에 옮겨 섞은 다음 200 × g로 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 37℃ 물이 채워진 비이커에 2분간 두었다. 튜브를 가볍게 쳐서 세포를 부드럽게 만들고 37℃ 물에 담근 상태로 천천히 흔들면서 1 ml의 PEG용액(GIBCO사)을 1분 동안 첨가하였다. 100 × g로 2분 동안 원심분리하고 5 ml의 RPMI1640 용액을 3분에 걸쳐 서서히 넣고, 다시 5 ml의 RPMI1640 용액을 2분에 걸쳐 서서히 넣은 다음 200 × g로 원심분리하여 세포들을 회수하고 30 ml의 정상 배지(RPMI1640 + 20% 우태아혈청)에 조심스럽게 현탁하였다. 37℃, CO₂ 배양기에서 30분간 방치한 후 미리 배양하여 둔 MEF 세포(피더(feeder) 세포)가 깔린 96웰 플레이트에 웰당 70 μl 씩 105개의 세포가 되도록 분주하여 37℃, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 다음 날 70 μl HAT를 더하고 3일 간격으로 HAT 배지에서 2주 이상 키우면서 자라는 콜로니를 관찰하였다.

항체가 발현되는 클론을 선발하기 위하여 샌드위치(sandwich) ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법을 사용하였다. 항-마우스 IgG 또는 IgM 항체를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 100 μl 을 첨가해 37℃에

서 1 시간 반응시키고, 다시 항-마우스 IgG 또는 IgM의 HRP(horseradish peroxidase, Sigma사)의 1/5,000 희석액과 1 시간 더 반응시켰다. 0.05%의 트윈 20을 첨가한 인산완충액으로 플레이트를 세척하고, OPD(Sigma사)와 H₂O₂가 포함된 기질용액을 첨가하고, 492 nm에서 흡광도를 측정하여 항체를 생산하는 클론을 먼저 선발하였다.

<실시예 3> 인간 배아줄기세포에 결합하는 단일클론항체의 제조

<3-1> 하이브리도마 클론의 선발

상기 실시예 2의 방법으로 제조한 클론 중에서, 비교적 안정하게 항체들을 분비하는 하이브리도마 상층액의 인간 배아줄기세포에 대한 결합능을 조사하였다. 구체적으로, 배양된 인간 배아줄기세포를 콜라겐분해효소 IV로 분리하고 다시 세포 분리 완충액(GIBCO)으로 20분 37℃에서 처리하여 단일세포로 분리한 뒤, 40 µm 스트레이너(strainer)를 통과시켜 2×10^5 세포를 플로우 사이토메트리(Flow cytometry)에 사용하였다. 먼저 단일세포화된 인간 배아줄기세포를 PBA(1%의 BSA를 PBS에 용해)에 부유시키고 항체 상층액을 4℃에서 30분간 반응시켰다. 4℃에서 1200 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상층액 100 µl을 제거하고 여기에 항-마우스 Ig-FITC(BD)를 200배 희석하여 4℃에서 30분 반응시킨 다음 2회 PBA로 세척하고 프로피디움 요오다이드(Propidium Iodide, PI) 음성인 세포들만 골라 FACS 칼리버(caliber)로 인간 배아줄기세포에 대한 결합능을 분석하였다.

그 결과, 인간 배아줄기세포에 결합하는 항체를 분비하는 다양한 하이브리도마들을 선발하고 계대배양을 계속하며 서브클로닝하여, 확실하게 안정성을 유지하고 인간 배아줄기세포에 대한 특이성을 유지한 항체 20-202S를 분비하는 하이브리도마를 선발하였다.

상기 단일클론항체 20-202S를 분비하는 하이브리도마를 하이브리도마 20-202S(수탁번호: KCTC10733BP)이라 명명하고, 이를 2004년 12월 01일자로 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, 대한민국 대전시 유성구 어은동 52번지 한국생명공학연구원)에 기탁하였다.

<3-2> 단일클론항체의 정제

상기 실시예 <3-1>에서 선별한 하이브리도마 20-202S로부터 단일클론항체 20-202S를 분리하였다.

구체적으로, 20-202S 항체를 정제하기 위하여, 일주일 전에 0.5 ml의 프리스탄(pristane) 접종한 Balb/c 생쥐의 복강에 상기 하이브리도마 세포 1×10^7 을 0.5 ml의 PBS에 용해시켜 주사하고, 주사 10-14일 후 주사기로 복수를 추출하고, 상기 복수를 원심분리하여 상층액만 모았다. 상기 복수액 1 ml에 PBS를 첨가하여 2 ml로 희석시켰다. 또한, 1 mM의 EDTA와 0.02%의 NaN₃을 상기 복수액에 첨가하고, 0.22 µm 여과기로 여과하였다. 단백질 G-세파로스 컬럼(Pharmacia, 스웨덴)을 사용하여 4℃에서 2시간 동안 회전하면서 항체를 결합시키고 컬럼을 똑바로 세워서 혈청 분리관을 이용하여 컬럼의 벽면을 세척액(0.5 M의 NaCl, 0.1 M의 Tris, pH 8.0)으로 세척하고, 컬럼을 펄리스타틱 펌프(peristaltic pump)에 연결하여 세척액으로 충분히 세척하였다. 세척 완료후, 0.2 M의 글리신(glycine)-HCl(pH 2.7)으로 항체를 용출하였다. 이때, 미리 준비한 1 M의 Tris(pH 9.0)를 포함한 튜브에 상기 용출액을 완충시켰다.

<실시예 4> 단일클론항체의 결합 특이성 분석

<4-1> 인간 및 생쥐 유래 세포에 대한 결합 특이성

상기 실시예<3-2>에서 정제한 20-202S 항체의 인간 배아줄기세포에 대한 결합능을 형광세포염색을 통하여 상기 실시예<3-1>과 동일한 방법으로 조사하였다(도 2). 상기 도 2에서 실선은 단일클론항체이고 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 것이며, SSEA1는 인간 배아줄기세포에 결합하지 않는 항체(음성대조군)이고, SSEA3 및 SSEA4는 인간 배아줄기세포에 결합하는 항체(양성 대조군)이다.

또한, 생쥐 배아줄기세포(mESC, J1)(Li. et al., Cell, 69:906-915, 1992), 생쥐 배아섬유아세포(MEF), 생쥐 섬유아세포 STO(ATCC 56-X)를 DMEM(GIBCO) 및 10%의 우태아혈청에서 배양한 후 콜라겐분해효소 IV로 분리하였다. 상기 20-202S 항체를 상기와 동일한 방법으로 생쥐 배아줄기세포, 생쥐 배아섬유아세포, 생쥐 섬유아세포 STO 세포에 대한 결합능을 확인하기 위하여, 형광 세포염색으로 플로우 사이토메트리를 수행하였으며(도 3, 도 4 및 도 5), 그 결과 20-202S 항체가 상기 세포주에는 결합하지 않음을 확인하였다.

<4-2> 분화 및 미분화된 인간 배아줄기세포에 대한 특이성

인간배아줄기세포는 레티노산(Retinoic acid)을 처리하면 미분화능을 잃고 분화되는 성질이 있으므로(Henderson, et al., Stem Cells 20:329-337, 2002) 4일째 배양된 Miz-hES1 배지에 10^{-5} M 레티노산을 6일 동안 처리하거나 하지 않은 다음 세포를 떼서 항체로 위 실시예 <3-1>처럼 FACS분석을 하였다(도 6). 그 결과 분화된 세포에서는 그 결합능이 감소함을 확인하여 이 항체가 미분화 인간배아줄기세포에 특이적으로 결합함을 알 수 있었다.

<4-3> 다양한 인간 배아줄기세포에 대한 특이성

항체 20-202가 다양한 인간배아줄기세포인 Miz-hES1, Miz-hES4, Miz-hES6, HSF6의 표면에 결합하는지 확인하기 위하여 면역세포화학 분석을 수행하였다. 인간배아줄기세포를 Ca^{2+} - Mg^{2+} -PBS로 세척한 후 4% 파라포름알데하이드로 고정하였다. 플레이트를 1.5% 말혈청으로 블럭킹하고 플레이트를 각각의 항체로 1 시간 동안 실온에서 반응시키고 바이오 틴-표지된 이차 항체로 다시 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그 후 Vectastain Elite ABC 키트(Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 반응시키고 양성 콜로니를 DAB 기질 키트(Vector Laboratories)로 발색하였다. 면역형광 염색을 위해, 인간 배아줄기세포를 1 시간 동안 실온에서 블럭킹 용액(10% 정상 말혈청 및 0.1% 소 혈청 알부민, PBS중)로 처리하고, 항체 20-202S 또는 anti-TRA-1-60(Chemicon)로 4℃에서 밤새 반응시켰다. 6번 세척한 후, 세포를 FITC-결합된 anti-mouse IgG(Vector) 또는 FITC-결합된 anti-mouse IgM (Sigma)와 반응시키고 4,6 디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 카운터 염색하였다. 4차례 세척 후, Vectashield(Vector)로 마운팅하고 Zeiss 510LSM META 레이저-스캐닝 현미경으로 분석하였다. 그 결과 도 12에서 보이는 바와 같이, 양성대조군 항체인 SSEA3 및 SSEA4와 같이 항체 20-202S도 Miz-hES1, Miz-hES4, Miz-hES6, HSF6에 결합하였다(A). 보다 자세히 관찰하기 위하여 공초점(confocal) 현미경으로 Miz-hES1을 관찰한 결과, 항체 20-202S도 세포표면에 anti-Tra-1-60와 같이 염색되었다(도 12B).

<실시예 5> 단일클론항체가 인식하는 항원의 분리

단일클론항체 20-202S가 인식하는 인간 배아줄기세포의 세포표면 마커를 분리하기 위하여 먼저 배양한 인간 배아줄기세포를 PBS로 세척하고 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL)로 바이오틴화(biotinylation)시키고 세포를 용해용액(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin)으로 4℃에서 20분 동안 용해시키고 핵은 원심분리로 제거하였다. 단백질 농도는 BCA(bicinchoninic acid) 단백질 검정 키트(Pierce)를 사용하여 결정하였다. Protein G plus-Sepharose (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz)에 비특이적으로 결합하는 단백질은 세포용해액을 20 μl 의 Protein G plus-sepharose와 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 원심분리하여 상층액만 회수하여 제거하고, 회수한 상층액은 다시 약 1 μg 의 항체와 4℃에서 12시간 동안 반응시키고 여기에 다시 20 μl 의 Protein G plus-sepharose를 더해 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물을 세포용해액으로 10회 이상 세척하고 남아있는 단백질을 10% SDS-PAGE에서 분리하였다. 이 단백질을 니트로셀룰로즈 막에서 웨스턴 블롯을 수행하였다. 니트로셀룰로즈 막을 5% 탈지유(skim milk)을 넣은 PBST(PBS + 0.1% Tween 20)에서 1시간 반응시키고 다시 PBST로 두차례 이상 세척한 후 Streptavidin-HRP(horseradish peroxidase) 결합체(1:1,500 Amershambiosciences)로 1 시간 동안 반응시켰다. PBST로 5차례의 세척 후에 바이오틴 표지된 단백질을 ECL 검출 시약(Amersham biosciences)로 발색시켰다(A). 그 결과, 약 72 kDa크기의 단백질에 20-202S 항체가 각각 결합함을 확인하였다.

20-202S에 의해 면역침강되는 단백질을 모으기 위해 1X108 Miz-hES1 세포에서 얻은 세포용해액을 위와 같은 방법으로 면역침강법을 수행하였다. 20-20S에 잘 결합하는 또 다른 암세포인 Choi-CK 세포용해액도 비슷한 방법으로 사용하여 면역침강한 후 함께 SDS-PAGE를 걸어 분리하였다. 이 젤을 Coomassie G250 (Biorad)으로 염색하였다(B).

<실시예 6> 단일클론항체가 인식하는 항원의 분석

20-202S의 의해 면역침강된 단백질을 포함하는 SDS 젤을 Coomassie G250 (BIO-RAD)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다. 단백질이 포함된 부분을 잘라내고 30% 메탄올로 5분 동안 세척하고 잘게 부숴다. 젤 부스러기를 30% 메탄올로 염색이 완전히 탈색될 때까지 반응시키고 난 후, 잘 부스러기는 100% 아세토니트릴로 10 분 동안 수분을 제거하고 30 분 동안 진공 원심분리기에서 말렸다.젤 부스러기에 300ng의 트립신 (Promega), 50mM 중탄산암모늄 용액을 넣어 16 시간 동안 37℃에서 반응시켜 단백질을 절단시켰다. 잘린 펩타이드를 3차례에 걸쳐 100 μl 의 50 mM 중탄산암모늄으로 추출

해내고 진공 원심분리기에서 말렸다. 펩타이드 혼합물은 Q-TOF micro (MicroMass)에서 ESI Q-TOF MS/MS (electrospray quadrupole time of flight tandem mass spectrometry)로 분석하였다(도 8). 그 결과 이 단백질이 HSPA8 (Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 1)임을 확인하였다.

<실시예 7> 단일클론항체의 결합 특이성 비교

HSPA8은 Heat shock protein 70 패밀리로써 이들 패밀리는 서로 유사한 단백질 아미노산 서열을 가지고 있으며 이들 에 대한 여러 항체가 이미 상업적으로 팔리고 있다. 다양한 anti-HSP70 항체인 W27(Santa Cruz), SPA810 (Stressgen), 5G10(BD Pharmingen), SPA820 (Stressgen)과 20-202S 항체와의 차이점을 분석하기 위하여 다양한 암세포 (cholangiocarcinoma Choi-CK, sarcomatoid cholangiocarcinoma SCK, hepatocellular carcinoma HepG2, sarcomatoid hepatocellular carcinoma SH-J1, cervical carcinoma HeLa)와 생쥐 유래 세포(MEF, STO, mESC)와 인간 배아줄기세포 (Miz-hES1)와 인간 배아줄기세포에서 분화 된 신경전구체 세포(hNPST1, 대한민국특허출원10-2004-0011705)의 세포용해액을 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.도 9에서와 같이, 항체 20-202S는 HSPA8 단백질을 갖는 Miz-hES1을 인식하였다. 항체 W27 및 SPA820도 Miz-hES1을 인식하였으나 이들 항체는, 항체 20-202S와는 달리, 생쥐 기원의 세포(STO, MEF, mESC) 및 암세포(SCK 및 HepG2)에 대해서도 양성 반응을 보였다. 이러한 결과로부터, 항체 20-202S는 HSPA8에 대한 공지의 항체(W27, SPA810, 5G10, SPA820)와는 다른 항체임을 확인하였다.

이런 결과는 FACS 결과와도 일치하여, 도 3, 4, 5,10에서 확인되는 바와 같이, 항체 20-202S는 Miz-hES1, Choi-CK, SH-J1, HeLa 세포와만 결합하였으며, MEF, STO, mESC, hNPST1, SCK, HepG2, PBL에는 결합하지 않았다.

항체 20-202S가 HSPA8을 인식하는지 재확인하기위하여, 웨스턴 블롯 및 FACS에서 양성 반응을 보이지 않는 SCK 암세포에 HSPA8/pCMV-SPORT6 벡터를 트랜스펙션(transfection)하였다. 도 11에서 보여지는 바와 같이, HSPA8 발현 벡터로 트랜스펙션된 SCK 암세포는 웨스턴 블롯에 의해 항체 20-202S가 결합하는 것으로 나타났다(A).

또한, 항체 20-202S가 인식하는 HSPA8 항원의 에피토프가 ATP에 민감한지 조사하기 위하여, 2.5mM ATP, 10mM MgCl₂의 존재 및 부재 하에서 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, 항체 20-202S는 ATP에 민감한 에피토프를 인식하였다(B).

한편, Heat shock protein의 ATPase 기능이 알려져 있고, 또 세포내부의 특정 펩타이드 조각을 붙들고 있는 형태로 세포 밖으로 분비된다는 보고가 있으며(Nat. Reviews Immunology 2, 185-194), ATP 처리에 의해 그 펩타이드를 방출한다고 알려졌다. 항체 20-202S는 단지 HSPA8를 인식하는 것이 아니라 HSPA8과 펩타이드의 복합체를 인식한다는 사실은 본 실시예의 ATP sensitive binding 실험에 의해서도 확인된다(도 11B).

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 단일클론항체는 인간 배아줄기세포의 세포표면 단백질을 특이적으로 인식하므로, 생쥐와 고등동물인 인간의 초기배 발달의 차이를 연구할 수 있는 도구를 제공하여 인간 배아줄기세포의 분석 연구에 이용할 수 있으며, 세포 치료시 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1a는 인간 배아줄기세포의 형태(1), 알칼라인 포스파타제(2), 음성대조군 마커인 SSEA1(3), 양성대조군 마커인 SSEA3(4) 및 SSEA4(5) 발현을 면역조직화학적 방법으로 관찰한 인간 배아줄기세포의 배양과 특성을 나타낸 마커발현 사진이고,

도 1b는 생쥐 배아섬유아세포(mouse embryonic fibroblast, MEF)에서는 발현되지 않는 OCT4(octamer binding protein 4) 유전자가 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cell, hES)에서는 발현되는 것을 확인하기 위하여, RT-PCR(Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 수행한 후 그 산물을 전기영동으로 관찰한 사진이고,

-RT : 역전사 효소(Reverse Transcriptase)를 첨가하지 않은 음성 대조군,

MEF : 생쥐 배아섬유아세포,

hES : 인간 배아줄기세포,

도 1c는 MEF에서는 발현되지 않는 텔로머라제 유전자가 인간 배아줄기세포에서는 열에 민감한 텔로머라제 유전자가 발현되어 텔로미어(telomere)를 추가적으로 결합하여 증가된 길이의 텔로미어를 서던 블롯(Southern blotting)으로 확인한 전기 영동사진이다.

P : 양성대조군 추출액과 단계적 희석액,

P + heat : 양성대조군(시료)을 열 처리에 따른 텔로머라제 활성여부,

MEF : 생쥐 배아섬유아세포 추출액,

hES : 인간 배아줄기세포 추출액,

hES + heat : 인간 배아줄기세포 추출액의 열처리,

도 2는 형광 세포염색을 통하여 본 발명의 단일클론항체 20-202S가 인간 배아줄기세포인 Miz-hES1과 HSF6에 결합하는 것을 나타내는 그래프이다(이때, 실선은 단일클론항체이고 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다).

SSEA1 : 인간 배아줄기세포에 결합하지 않는 항체(음성대조군),

SSEA3,4 : 인간 배아줄기세포에 결합하는 항체(양성대조군),

도 3은 형광 세포염색을 통하여 본 발명의 단일클론항체 20-202S가 생쥐 배아줄기세포(mESC)에 결합하지 않는 것을 나타내는 그래프이다(이때, 실선은 단일클론항체이고 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다).

SSEA4 : 생쥐 배아줄기세포에 결합하지 않는 항체(음성대조군),

SSEA1 : 생쥐 배아줄기세포에 결합하는 항체(양성 대조군),

도 4는 형광 세포염색을 통하여 본 발명의 단일클론항체 20-202S가 생쥐 배아섬유아세포에 결합하지 않는 것을 나타내는 그래프이다(이때, 실선은 단일클론항체이고 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다).

도 5는 형광 세포염색을 통하여 본 발명의 단일클론항체 20-202S가 인간 배아줄기세포 배양시 사용되는 지지세포인 생쥐 섬유아세포 STO에 결합하지 않는 것을 나타내는 그래프이다(이때, 실선은 단일클론항체이고 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다).

도 6는 형광 세포염색을 통하여 본 발명의 단일클론항체 20-202S가 인간배아줄기세포의 분화를 유도하는 레티노산(Retinoic acid) 존재 시 배아줄기세포에 대한 결합능이 감소하는 것을 보여주는 그래프이다(이때, 음성대조군인 SSEA1, 양성대조군인 SSEA3, SSEA4도 함께 포함하여 조사하였다).

도 7은 인간 배아줄기세포를 바이오틴화(biotinylation)한 후에 본 발명의 단일클론항체 20-202S로 면역 침강시킨 후에 침강된 단백질을 보여주는 그림이다(항체를 빼고 똑같은 실험을 한 것을 음성대조군으로 하였다).

도 8는 인간배아줄기세포에서 면역침강시킨 단백질을 SDS-PAGE에서 분리하여 트립신으로 절단한 후 얻은 펩타이드를 Q-TOF분석을 통해 본 발명의 단일클론항체 20-202S가 인식하는 항원이 HSPA8 (Heat shock 70kD protein 8 isoform 1)임을 확인한 그림이다.

도 9은 본 발명의 단일클론항체 20-202S가 HSP70에 대한 공지의 항체와 상이한 결합양상을 갖는다는 것을 보여주는 웨스턴 블롯 사진이다.

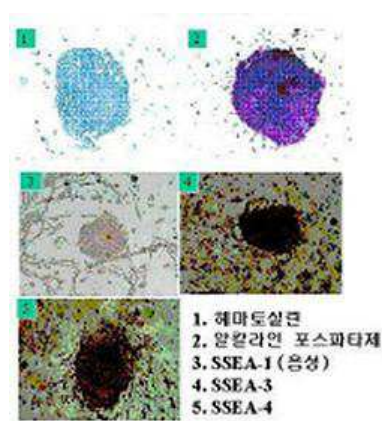
도 10은 플로우 사이토메트리를 통해 본 발명의 단일클론항체 20-202S가 인간배아줄기세포를 포함하는 다양한 세포주들에서 결합하는 것을 보여주는 그래프이다.

도 11는 본 발명의 단일클론항체 20-202S가 HSPA8 단백질을 인식하는지 확인하기 위해 HSPA8 유전자를 발현시킨 후의 웨스턴 블롯 사진(A) 및 ATP 존재 하에서는 인간 배아줄기세포의 HSPA8에 결합하지 않는다는 것을 보여주는 사진(B)이다.

도 12는 다양한 인간 배아 줄기세포의 표면에 HSPA8이 발현한다는 것을 보여주는 면역세포화학 사진이다.

도면

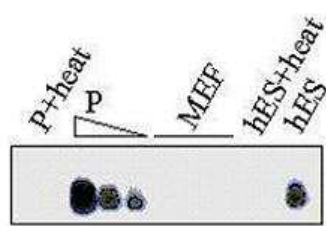
도면1a



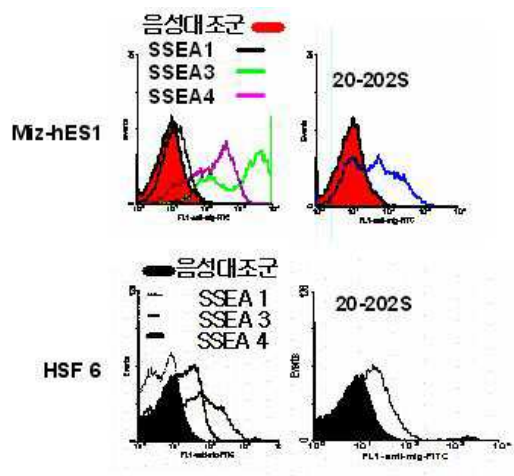
도면1b



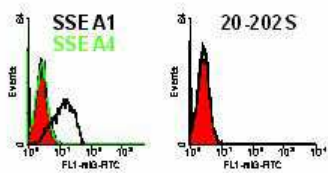
도면1c



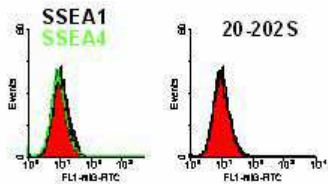
도면2



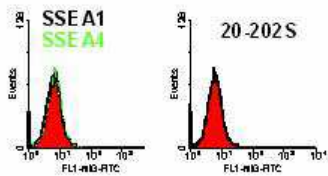
도면3



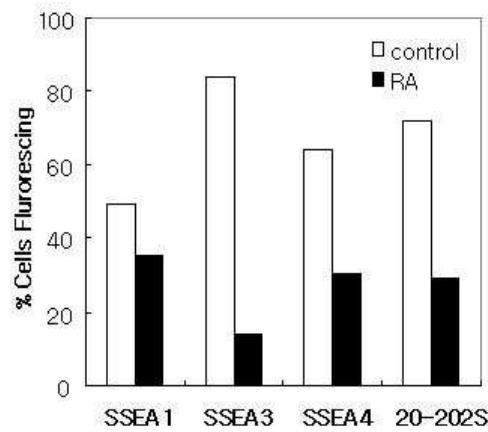
도면4



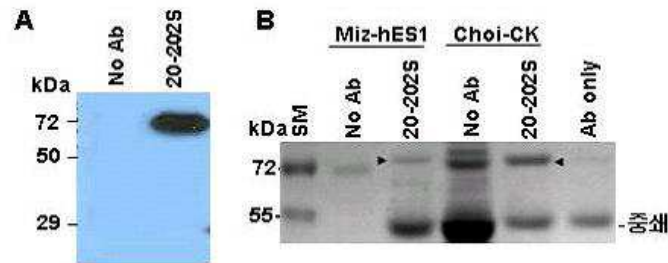
도면5



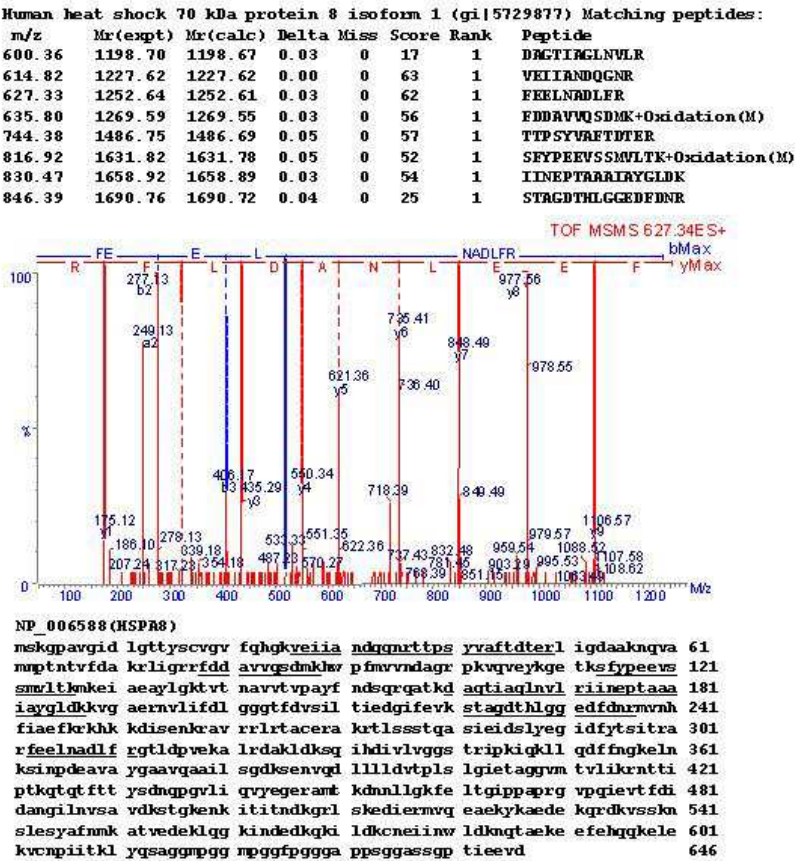
도면6



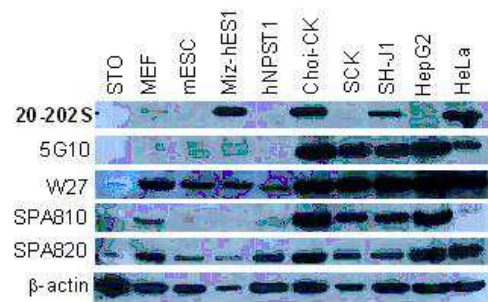
도면7



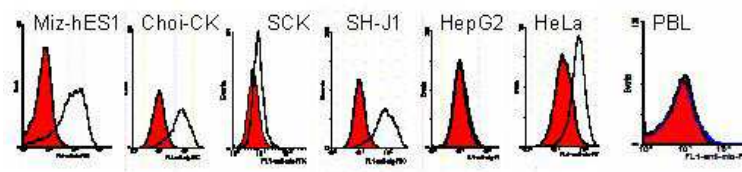
도면8



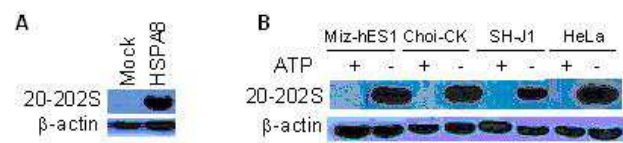
도면9



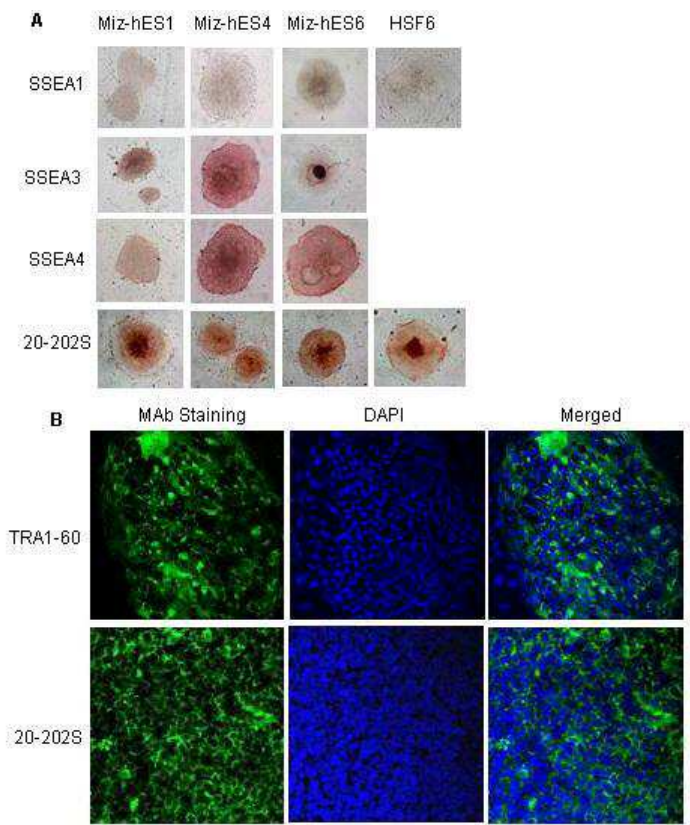
도면10



도면11



도면12



서열목록

서열목록 전자파일 첨부