(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0127774
(43) 공개일자 2012년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0045474
(22) 출원일자 2011년05월16일
심사청구일자 2011년05월16일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
류춘제
서울특별시 강남구 선릉로 221, 204동 203호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
최홍서
서울특별시 광진구 능동로27가길 20 (군자동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

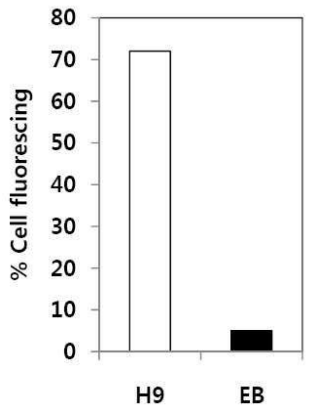
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **미분화 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체 2 9 7?D 4**

(57) 요 약

본 발명은 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마에 관한 것으로서, 구체적으로는 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하나 미분화 생쥐 배아줄기세포나 분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않거나 결합력이 현저히 약한 단일클론항체 297-D4와 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마297-D4, 상기 단일클론항체 297-D4를 포함하는 검정키트 및 인간 배아줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

김원태

서울특별시 광진구 군자동 358번지 202호

황효정

경기도 안양시 동안구 관평로327번길 37, 하나타운 다동 B02호 (관양동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20100488
부처명	교육인적자원부
연구사업명	2006년선정 미래기반기술개발사업 2단계 2차년도
연구과제명	줄기세포 niche에서 E1B-AP5-like 단백질의 기능연구
주관기관	세종대학교 산학협력단
연구기간	2006.11.01 ~ 2012.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 297-D4.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단일클론항체는 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하고 생쥐 배아줄기세포 또는 분화 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않거나 현저하게 결합력이 약한 특징을 나타내는 단일클론항체 297-D4.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 단일클론항체는 IgG1.κ 아이소타입이며, 미분화 인간 배아줄기세포 BAP31 유사단백질을 인식하는 것을 특징으로 하는 단일클론항체 297-D4.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 단일클론항체는 세포 표면의 BAP31 유사단백질을 인식하는 것을 특징으로 하는 단일클론항체 297-D4.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 단일클론항체 297-D4를 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기세포 제거용 조성물.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 단일클론항체 297-D4를 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기세포의 검정 키트.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 단일클론항체 297-D4를 세포군에 가하는 단계; 및

상기 단일클론항체 297-D4와 결합하는 세포를 상기 단일클론항체 297-D4와 결합하지 않는 세포로부터 분리하는 단계;를 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포를 분리하는 방법.

청구항 8

중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 비인간 동물로부터 얻은, 불멸화된 세포에 융합된 B세포를 포함하며, 청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 단일클론항체 297-D4 또는 그의 항원 결합 부위를 생

산하는 하이브리도마.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 단일클론항체 297-D4를 코딩하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 297-D4 cDNA.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 cDNA는 중쇄 가변 영역(V_H)을 코딩하는 서열번호 3의 염기서열 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 코딩하는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 297-D4 cDNA.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 297-D4 및 이를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 배아줄기세포(embryonic stem cell)는 생물을 구성하는 다양한 기능을 가진 모든 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포로서 생쥐, 원숭이, 사람 초기 배아의 배반포(blastocyst)나 상배엽(epiblast)에 미분화상태로 존재한다 (Evans et al., Nature, 292: 151-156, 1981; Thomson et al., PNAS 92:7844-7848, 1995; Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Brons, et al., Nature, 448: 191-196, 2007; Tesar, et al., Nature, 448:196-202, 2007). 이 세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 재생(self renewal)이라는 세포 분열에 의해 자신과 동일한 세포를 무한히 생산할 수 있으며, 다양한 환경 또는 분화 자극에 의해 우리 몸의 모든 기능성 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency)의 특징을 나타낸다. 배아줄기세포 연구의 역사적 배경을 보면 1981년 처음으로 생쥐 배아줄기세포(mESC, mouse embryonic stem cell) 배양법이 확립된 후(Evans et al., Nature, 292: 151-156, 1981), 1996년 영장류에서 전분화능 배아줄기세포 배양법(Thomson et al., Biol. Reprod., 55: 254-259, 1996)이 개발되었고, 1998년 미국의 톰슨(Thomson) 등에 의해 인간 배아줄기세포(hESC, human embryonic stem cell) 배양법이 확립되었다(Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998). 배아줄기세포는 모든 세포로 분화할 수 있는 전분화능을 갖고 있으므로, 질병이나 사고에 의한 특정 세포나 장기 손상시 줄기세포를 그 특정 세포로 분화를 유도하여 사용할 수 있을 것으로 기대됨에 따라, 여러 난치성 질환의 근원적 치료방법으로 부상하고 있다.

[0003] 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 전분화능을 가진 배아줄기세포의 운명은 내부와 외부 신호의 조합에 의해 조절된다. 전사인자인 Oct4, Nanog, Sox2는 재생이나 전분화능을 유지하기 위한 필수적인 내부 조절인자로 알려졌다 (Boyer et al., Current Opinion in Genetics and Development 16:455-462, 2006; Boiani et al., Nat. Rev. Mol.Cell.Biol. 6:872-884, 2005). 그러나 전분화능 및 미분화 상태를 조절하는 배아줄기세포는 반드시 외부환경에서 오는 신호를 상대해야 하는데, 그 이유는 생체 내(in vivo)에서 발생 동안 배아줄기세포는 실제로 수많은 다른 세포들에 둘러싸여 있기 때문이다. 발생을 유도하는 유전자 발현에서의 변화는 외부의 환경에서 오는 신호에 대한 반응에서 시작된다고 볼 수 있는데, 외부 환경의 변화에 관한 신호가 세포막이나 세포부착 분자들을 통해 내부로 전달되고, 이 신호의 궁극적인 타겟은 내부 인자인 Oct4, Nanog, Sox2로서 이들이 생체 내(in vivo)와 시험관 내(in vitro)에서 배아줄기세포의 재생과 전분화능을 조절하는 것이라고 볼 수 있다(Boiani et al., Nat. Rev. Mol.Cell.Biol. 6:872-884, 2005, Pera & Tam, Nature 465:713-720, 2010). 그러므로 어떤 특이적인 외부 분자가 존재하여 배아줄기세포 표면에 존재하고 이 분자를 통한 배아줄기세포 특이적인 외부 신호가 존재하는지 연구하는 것은 배아줄기세포 특성 연구, 효율적인 배양을 유도하는 배지 개발, 배아줄기세포 특이적인 마커 발굴, 세포 치료제에 잔류하여 암을 유발하는 미분화 배아줄기세포를 제거하는 것 등에 응용될 수 있다.

[0004] 배아줄기세포의 특징인 재생과 전분화능 특징은 종간에 잘 유지되어 왔을 것으로 추정되며, 실제로 예상대로 핵

심적인 세포 내부 전사인자인 Oct4, Nanog, Sox2는 생쥐와 인간에서 종간에도 잘 유지되어 있다 (Boyer et al., Current Opinion in Genetics and Development 16:455-462, 2006; Boiani et al., Nat. Rev. Mol.Cell.Biol. 6:872-884, 2005). 또 인간 배아줄기세포 (hESC, human embryonic stem cell)도 생쥐 배아줄기세포와 같이 전분화능을 가지고 있는 세포이므로, 시험관 내(in vitro) 조건에서 배아체(EB,embryoid body)를 형성시켜 분화를 유도하였을 때 다양한 모든 조직의 세포로 분화가 가능하다(Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Reubinoff, et al., Nat. Biotech., 18:399-404, 2000). 또 세포 배양시는 두 세포 모두 피더(Feeder)나 피더 세포 배양액이 있는 상태에서 배양이 가능하다는 유사점이 있고, 자가 증식이 가능한 세포에서 발현되고 있는 텔로머라제(telomerase)가 공통적으로 발현되고, 생쥐 배아줄기세포에서 발현하는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)는 인간 배아줄기세포에서도 발현되고 있다. 그러나 이런 유사점과 달리 인간과 생쥐 배아줄기세포를 배양할 때 많은 차이점도 존재한다. 두 세포는 형태학적으로 다르고, 배양시 자가 재생산이나 전분화능을 유지하기 위한 사이토카인 요구성도 다르다. 예를 들면, 생쥐 배아줄기세포는 재생을 위해 LIF (leukemia inhibitory factor)와 STAT3를 요구하나 사람은 이들이 필요하지 않다 (Smith et al., Nature 336:688-690, 1988; Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Daheron etal., Stem cells 22:770-778, 2004). 또 생쥐는 BMP (Bone morphogenic protein)가 재생에 필수적이나 인간에서는 BMP가 오히려 분화를 촉진하는데 사용된다 (Ying et al., Cell 115:281-292, 2003; Xu et al., Nat. Biotech. 20:1261-1264, 2002). 인간 배아줄기세포의 재생을 촉진하는 데 사용되는 성장인자는 bFGF (basic fibroblast growth factor)로서, 실제로 피더 없이도 마트리젤™(MaTrigel)(BD Biosciences, Seoul, Korea)과 bFGF 포함 배지만으로 인간 배아줄기세포를 시험관 내에서 배양할 수 있다 (Amit et al., Dev. Biol. 227:271-278, 2000; Xu et al., Nat. Biotech. 19:971-974, 2001). DNA 마이크로어레이(microarray)를 통한 전체 유전자 발현 분석결과에서도 인간의 배아줄기세포의 줄기성(Stemness)을 유지하기 위한 유전자 풀(pool)이 생쥐의 그것과 차이가 있다는 것을 알 수 있다 (Bhattacharya, et al., Blood, 103:2956-2964, 2004).

[0005] 종간 배아줄기세포의 이와 같은 차이점에도 불구하고 현재 배양중인 미분화 상태의 인간 배아줄기세포의 재생 및 전분화능을 동정하고 정의하기 위하여, 인간 배아줄기세포가 아닌 생쥐 배아(embryo)나 사람 배아암세포(embryonal carcinoma)를 생쥐에 주사하여 만든 단일클론항체, 예를 들어 SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 등에 대한 항체들을 사용하고 있다. 그리고 이들 항원 중 인간에서는 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81가 모두 발현하고 SSEA1은 발현하지 않으나, 생쥐에서는 반대로 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81가 모두 발현하지 않고 SSEA1만 발현하는 현저한 차이가 있다 (Boiani et al., Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6:872-884, 2005). 그리고 이런 항체들에 의해서 정의되는 분자들은 대부분 탄수화물 항원성 부위(epitope)를 가지고 있어 그 기능이 여전히 알려지고 있지 않다 (Badcock, et al., Cancer Res. 59:4715-4719, 1999; Kannagi et al., EMBO. J. 2:2355-2361, 1983). 그리고 최근 결과에 따르면 오랫동안 전분화능의 주요 마커로 사용되어온 SSEA3, SSEA4가 실제로 전분화능과 무관한 단순 외부항원이라는 연구 결과가 나오기도 하여 여전히 그 기능이 확실하지 않다 (Brimble et al., Stem Cells, 25: 54-62, 2007). 단백질 마커로는 CD9, E-카데린(cadherin), 그리고 PODXL 같은 분자들이 산발적인 연구를 통해 미분화 인간 배아줄기세포 표면 단백질로 알려지고 있으나 그들의 재생과 전분화능에서의 역할에 대해서는 알려지지 않았다 (Cai et al., BMC Dev Biol, **5:**26-33, 2005; Carpenter et al., Dev Dyn, 229**:**243-258, 2004, Choo, et al., Stem Cells. 26:1454-1463, 2008). 최근에는 세포표면의 IGF1R, ERBB2, EpCAM이 미분화 인간 배아줄기세포의 생존과 재생에 중요한 새로운 후보 분자로 새롭게 보고되었지만 (Bendall et al., Nature, 448**:**1015-1021, 2007; Wang et al., Blood, 110:4111-4119, 2007, Ng et al., Stem Cells 28:29-35, 2010; Lu, et al., J Biol Chem. 285:8719-32, 2010), 여전히 미분화 배아줄기세포를 효율적으로 정의하고 동정하기 위한 단백질 표면 분자들에 대한 정보가 부족하기는 마찬가지이다.

[0006] 현재 줄기세포를 이용한 세포치료의 핵심은 인간과 동물에서 줄기세포 분리, 줄기세포 배양기술 확립, 시험관 내 조건에서 특정 기능세포로 분화유도 및 분리기술, 인체실험 전에 동물에서 효능과 안전성 확립, 그리고 인체 이식에서 면역거부반응 억제기술 등이 있다. 현재 기술에서 안전성 확립과 면역억제기술은 실제 줄기세포 이용의 실질적인 걸림돌로 작용한다고 할 수 있다. 하지만 최근 일본 교토대 그룹과 미국 위스콘신, 하버드 그룹에서 인간의 피부 세포에서 배아줄기세포와 거의 유사한 유도만능줄기세포 (iPS, induced pluripotent stem cell)를 제조하는데 성공하였는데 실제로 현재까지 인간배아줄기세포의 알려진 표면마커 그대로 유도만능줄기세포를 구별하고 확인하는데 사용하고 있다 (Takahashi et al., Cell, 131: 1-12, 2007; Yu et al. Science, 318:1917-1920, 2007; Park et al. Nature 451:141-146: 2008). 유도만능줄기세포 등장으로 세포치료에서 면역거부반응문제는 빠르게 해결될 것으로 전망 된다. 그러나 안전성 확립 문제는 여전히 요원한데 유도만능줄기세포도 배아줄기세포와 아주 유사하며 실제로 배아줄기세포처럼 면역결핍 생쥐에서 기형종(teratoma)을 형성하는 것으로 알려졌다 (Takahashi et al., Cell, 131: 1-12, 2007; Yu et al. Science, 318:1917-1920, 2007; Park

et al. Nature 451:141-146, 2008; Ben-David and Benvenisty, Nature reviews Cancer 11:268-277,2011). 따라서 유도만능줄기세포를 이용한 줄기세포 치료제 개발에서도 최대 장애물은 미분화 상태 줄기세포 잔류에 의한 암 발생 문제이다. 따라서 배아줄기세포를 이용하든 유도만능줄기세포를 이용하든 이들을 이용한 세포 치료법 개발에서 중요한 것은 우선 미분화 상태의 세포들을 분리 제거해서 실제 동물이나 인체 내에서 안전성을 확립하여야 하는 일이다. 그러나 현재 사용되고 있는 미분화 인간 배아줄기세포를 확인하는 항체만으로는 미분화 상태의 세포의 특성을 정확히 분석하고 미분화 상태의 세포를 분리해내고 미분화 상태의 세포만 죽이는 것이 충분하지 않다. 따라서 효율적으로 이들을 인식하고 제거할 수 있는 항체 개발은 세포 치료제 개발을 위해 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하나 미분화 생쥐 배아줄기세포나 분화 유도한 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않는, 미분화 인간 배아줄기세포 표면의 BAP31(B-cell receptor associated protein) 단백질를 인식하는 단일클론항체 297-D4를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포 검정 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론항체를 사용하여 미분화된 인간 배아줄기세포를 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론항체 297-D4를 코딩하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 297-D4 cDNA를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 297-D4를 제공한다.

[0014] 본 발명은 상기 단일클론항체가 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하고 생쥐 배아줄기세포 또는 분화 유도한 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않거나 현저하게 결합력이 감소하는 특징을 나타낸다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체가 미분화 인간 배아줄기세포의 약 31 kDa 단백질을 인식하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체가 IgG1.κ 아이소타입이며, 미분화 인간 배아줄기세포 BAP31 단백질을 인식하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체가 세포 표면의 BAP31을 인식하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 단일클론항체 297-D4를 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기세포 제거용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 단일클론항체 297-D4를 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기세포의 검정키트를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 단일클론항체 297-D4를 사용하여 미분화 인간 배아줄기세포를 분리하는 방법을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 비인간 동물로부터 얻은, 불멸화된 세포에 융합된 B세포를 포함하며, 상기 단일클론항체 297-D4 또는 그의 항원 결합 부위를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체 297-D4를 코딩하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 297-D4 cDNA를 제공하는 것이다.

[0023] 상기 cDNA는 중쇄 가변 영역(V_H)을 코딩하는 서열번호 3의 염기서열 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 코딩하는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 미분화 인간배아줄기세포를 인식, 분석하기 위해 사용하고 있는 항체들은 생쥐 배아세포들을 면역원으로 사용하여 제조한 항체들을 응용한 것들인데 제조할 때 실제 배양된 미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 직접 주사하여 그 미분화 상태의 표면분자들에 대한 단일클론항체를 제조하면 좀 더 많은 다양한 인간 배아줄기세포에 특이적인 세포 표면 분자들을 발굴할 수 있을 것으로 기대된다. 이렇게 만들어진 단일클론항체는 인간 배아줄기세포의 특성을 좀 더 정확히 분석하고 세포 치료시 인간 배아줄기세포를 제거하는데 유용하게 쓰일 수 있다. 그리고 이 항체를 이용하여 특이적 배아줄기세포 표면 항원을 발굴하고 이들의 재생, 전분화능에서의 역할을 규명하면 배아줄기세포 효율적인 배양을 위한 새로운 배지 개발에도 응용할 수 있다.

[0025] 이러한 배경 하에서 본 발명자들은 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체군을 제조하기 위해 혈액줄기세포의 표면항원 CD133을 발굴하는데 사용된 미끼면역주사방법을 응용하였다(Yin et al., *Blood*, **90**: 5002-5012, 1997; Choi et al., Cell and Tissue Research **333**:197-206, 2008). 먼저 배양된 인간 배아줄기세포가 미분화된 상태의 인간 배아줄기세포임을 확인한 후, 레티노산(retinoic acid, RA)을 이용하여 이 배아줄기세포의 분화를 유도하였다. 레티노산으로 분화 유도한 후 완전히 분화가 유도된 것을 확인한 다음 이 분화 유도된 세포를 생쥐의 오른쪽 뒷발에 미리 찌르고 3일 후에 왼쪽 뒷발에 미분화 인간 배아줄기세포를 주사하여 그 후 3일 간격으로 총 7회 더 면역주사한 후 왼쪽 뒷발의 오금 림프절을 분리하여 단일클론항체 제조에 사용하였다. 이들 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체군은 미분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하고, 레티노산으로 분화된 인간 배아줄기세포에는 붙지 않거나 약하게 결합하였다. 본 발명자들은 이들 항체군 중 297-D4 항체가 인간배아줄기세포 표면의 BAP31 단백질을 인식하고 기존 알려진 항체와 다른 특성을 보이는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0026] 하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 297-D4는 미분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하고 분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않거나 약하게 결합하는 단일클론항체이다.

[0027] 또 다른 하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 297-D4는 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않고 인간 배아줄기세포만 특이적으로 인식하는 단일클론항체이다.

[0028] 바람직한 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 297-D4는 도 13과 도 14에 도시된 염기서열과 아미노산 서열을 가지는 단일클론항체이다.

[0029] 본 발명에서 용어 "단일클론항체"란 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)를 인식하여 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 본 발명의 단일클론항체는 미분화 상태인 인간 배아줄기세포의 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하므로, 미분화된 인간 배아줄기세포의 세포표면 분자를 인식하는 단백질 분자이다.

[0030] 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 상기 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 형태 뿐만 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 등을 포함한다.

[0031] 본 발명자는 미분화된 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체를 생산하기 위해 미끼면역주사방법을 사용하였다. 구체적으로 인간 배아줄기세포(도 1A)를 레티노산으로 분화 유도한 후 완전분화가 유도된 것을 확인하고(도 1B), 이 분화된 인간 배아줄기세포를 미끼면역원으로 생쥐 뒷발 오른쪽에 먼저 주사하고 나중에 미분화 인간 배아줄기세포를 왼쪽에 주사하여 두 세포에 공통으로 존재하는 표면 항원들에 대한 항체들은 왼쪽 뒷발 림프절에서 제거되게끔 한 후 이 왼쪽 림프절의 림파구를 분리하여 단일클론항체군을 제조하고 그중 297-D4 항체를

이용하여 항원을 분석하였다.

[0032] 구체적으로, 인간 배아줄기세포를 배양한 후 플로우 사이토미트리(Flow Cytometry)를 통한 SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 분자들의 발현분석을 통하여, 인간 배아줄기세포에 음성마커인 SSEA1에 대한 항체는 상기 세포에 결합하지 아니하고, 양성마커인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81에 대한 항체는 결합한다는 것을 확인하였다(도 2A). 이 세포에 레티노산을 처리하면 이들 양성 마커들이 전부 음성으로 변하고 상대적으로 SSEA1은 발현이 증가함으로써 이 세포의 분화가 완전히 진행되었다는 것을 확인할 수 있었다(도 2B). 이렇게 준비한 미끼면역원과 진정한 면역원을 미분화 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체군의 제조에 이용하였다.

[0033] 이어서, 상기 배양된 인간 배아줄기세포를 콜라게나제로 떼어낸 후 이를 마우스의 뒷다리 발바닥을 통해 면역주사하고 이 왼쪽 다리의 오금 림프절을 분리하여 림파구을 얻어 암세포와 융합하여 제조한 하이브리도마로부터 본 발명의 구체적 양태인 단일클론항체군 480개를 분리하고, 그 중에서 79종의 항체가 미분화 인간 배아줄기세포 H9 표면에 결합하는 것을 확인하였다. 다시 그 중에서 33종이 인간 배아줄기세포 H9과 또 다른 인간 배아줄기세포 H1에 대한 결합하는 것을 구체적으로 미분화 인간배아줄기세포에 결합함을 확인하였으며, 이들이 생쥐 배아줄기세포, 생쥐 배아섬유아세포(MEF, mouse embryonic fibroblast) 등에는 결합하지 않거나 약하게 결합하는 것도 확인하였다. H9 세포를 레티노산으로 처리하여 분화시킨 세포에서 이 33종의 항체 결합이 현저하게 감소하는 것을 확인하였으며, 또한 배아체(Embroid Body)로 분화시킨 H9 세포에도 현저하게 결합이 감소하는 것을 관찰하였다. 이들 항체 79종 중에서 항체 297-D4는 IgG1과 카파사슬을 가진 단일클론항체로, 이 항체의 정확한 분석을 위해서 항체를 생산하는 하이브리도마를 생쥐 복수에 주사하여 복수액에서 항체를 정제하였다(도 3). 정제된 297-D4항체는 미분화 배아줄기세포에 결합하고, 분화된 배아체세포, 레티노산 처리된 배아줄기세포에는 결합이 감소하고, 생쥐배아줄기세포(J1, TC1, R1, E14Tg2a.4), 생쥐배아섬유아세포(MEF), 인간말초혈액단핵세포(PBMC), 인간피부섬유아세포(HDF)에는 결합하지 않는다는 것을 플로우 사이토미트리로 확인하였다(도 4). 또 인간배아줄기세포와 유사한 인간배아암세포(NT-2/D1, NCCIT)에는 이 항체가 표면에 잘 결합하는 것을 관찰할 수 있었다(도 4). 그리고 297-D4 항체는 미분화 인간배아줄기세포를 분화 유도된 배아체(embryoid body, EB)로 만들면 그 결합이 현저히 감소하였다(도 5). 그리고 297-D4 항체와 기존 미분화 인간배아줄기세포 표면마커로 알려진 SSEA4 항체와 이중 플로우사이토미트리를 수행하면 기존 미분화 인간배아줄기세포 마커로 알려진 SSEA4 항체 양성인 세포들의 99.7% 이상에서 같이 양성임을 보여줌으로써 이 항체가 미분화 마커로 사용될 수 있음을 보여 주었다(도 6). 또 다른 미분화 인간배아줄기세포 마커인 TRA-1-60, TRA-1-81 항체 양성인 세포들의 각각 77.4, 76.9% 이상에서 같이 양성임을 보여줌으로써 이 항체가 미분화 마커로 사용될 수 있음을 다시 한번 보여주었다(도 7).

[0034] 또한, 본 발명의 단일클론항체가 인식하는 항원을 검출하는 실험에서 미분화 인간 배아줄기세포 추출액에서 약 31kDa 단백질을 면역 침강시키는 것으로 확인되었다(도 8). 본 발명의 단일클론항체가 인식하는 인간 배아줄기세포의 단백질의 분자량은 12% SDS-PAGE를 이용하여 측정한 것으로서, 분자량의 측정 조건에 따라 일정 범위 내에서 약간의 오차가 있을 수 있다. 따라서, 단백질의 분자량을 제시함에 있어 용어 "약"의 사용을 피할 수 없으며, 일반적으로 ㅁ2 kDa, 바람직하게는 ㅁ1 kDa의 범위를 가질 수 있다. 단일클론항체 297-D4가 인식하는 단백질을 면역침강 후 SDS-PAGE에서 분리한 후 트립신으로 절단하여 PMF (Peptide Mass Fingerprinting)분석으로 그 단백질이 BAP31 이라는 것을 확인하였다(도 9, 10).

[0035] 이러한 항원이 정말 BAP31인지를 확인하기 위해 먼저 배아줄기세포의 표면단백질만 바이오틴으로 표지하고 공지의 토끼 폴리클론항체 항-BAP31와 297-D4를 가지고 면역침강을 수행하고, 침강물을 이용하여 항-BAP31 항체와 297-D4를 사용한 웨스턴 블라팅을 실시한 결과 297-D4가 인식하는 것이 BAP31이라는 것을 확인하였으며(도 11 아래 두 패널), 이 단백질이 세포표면에 발현하는 것을 확인하기 위해서는 웨스턴 블라팅에서 스트렙타비딘-호스 래디쉬 퍼옥시데이즈(Strpetavidin-HRP)로 사용하여 세포표면에 BAP31이 발현하는 것을 다시 확인하였다(도 11 위 패널). 또 인간배아줄기세포에 대한 기존 마커항체들인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 항체처럼 297-D4와 BAP31 항체가 동일하게 인간배아줄기세포에 잘 결합함을 플로우사이토미트리로 확인하였다(도 12). 이러한 특성을 가진 297-D4 항체의 유전자를 중합효소연쇄반응방법으로 클로닝하였으며, 그 중쇄 및 경쇄 염기서열과 아미노산 서열을 결정하여 이 항체가 기존에 알려지지 않은 유일한 아미노산 서열을 가진 항체임을 확인하였다(도 13, 도 14).

[0036] 본 발명의 297-D4가 인식하는 단백질은 BAP31로서 원래는 소포체 막에 존재하는 막단백질로서 세포질막 단백질들의 정상적인 이동이나 접힘을 도와주는 단백질로 알려졌다 (Kim et al., EMBO J. 13:3793-3800, 1994; Adachi et al., EMBO J. 15:1534-1541, 1996; Ng et al., J. Cell Biol. 139:327-338; Szczesna-Skorupa and

Kemper, J Biol Chem 281:4142-4148; Wang et al., Cell 133:1080-1092, 2008). 또 다른 기능으로는 세포의 아폽토시스(apoptosis)에 관여한다고 알려졌다(Ng et al., *J Cell Biol*. **139**: 327-338, 1997; Iwasawa et al., EMBO J, 30:556-568, 2011).

[0037] 본 발명에서는 BAP31 단백질이 미분화 인간 배아줄기세포 표면에서 발현된다는 것을 처음으로 밝히고 이 단백질을 특이적으로 인식할 수 있는 새로운 항체인 297-D4를 제조하였다. 또한, 이 단백질의 발현이 미분화 인간 배아줄기세포가 분화할 때 감소한다는 것도 밝힘으로써(도 5), 미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 정의해 주는 중요한 세포표면 마커로 작용할 수 있으며, 이를 이용하여 순수 미분화 인간 배아줄기세포를 분리하는데 사용할 수 있음을 입증하였다. 또한, BAP31이 배아줄기세포 표면에 발현한다는 것은 공지의 항-BAP31 항체가 297-D4 항체와 동일하게 배아줄기세포 표면에 결합하는 것을 웨스턴 블라팅, 플로우 사이토미트리 방법으로 거듭 확인하여 증명하였다(도 11, 도 12).

[0038] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 바와 같은 본 발명의 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다. 본 발명은 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 발현할 수 있는 형질전환되거나 형질전환되지 않은 비인간 동물, 예를 들어 마우스로부터 단리된 B 세포를 제공한다. 바람직하게는, 단리된 B 세포는 정제된 미분화 인간 배아줄기세포 또는 상기 세포가 풍부한 제제를 사용하여 면역화된 형질전환되거나 형질전환되지 않은 비인간 동물, 예컨대 마우스로부터 얻는다. 바람직하게는 비인간동물은 인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는다. 계속하여 단리된 B 세포를 불멸화함으로써 미분화 인간 배아줄기세포에 대한 단일클론항체의 공급원을 제공한다.

[0039] 하나의 구체적 양태에서, 본 발명은 단일클론항체 297-D4를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.

[0040] 구체적 실시에서, 본 발명의 하이브리도마는 미분화 인간 배아줄기세포와 분화 배아줄기세포를 생쥐의 뒷 왼쪽 및 오른쪽 발바닥에 각각 주입한 후 상기 생쥐의 왼쪽 오금에서 림파구를 분리하여 골수종 암세포와 융합하여 제조하였다.

[0041] 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마는 이를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.

[0042] 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 전기영동, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액(ascites fluid)으로부터 분리될 수 있다.

[0043] 본 발명의 구체적 실시에서는 본 발명의 단일클론항체의 대량 생산을 위해 하이브리도마를 생쥐의 복강에 주사하여 복수액에서 배양하고 단백질 G-세파로스(sepharose) 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[0044] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 297-D4를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.

[0045] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 297-D4를 사용하여 미분화된 인간 배아줄기세포를 분리하는 방법에 관한 것이다.

[0046] 본 발명의 단일클론항체는 세포치료를 위해 이식될 세포 중에 존재하는 배아줄기세포를 제거하거나, 이식된 세포 중에 존재하는 배아줄기세포를 제거하기 위해 사용될 수 있다.

[0047] 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, 림포카인, 독소, 이형가능성 항체 등이 있으나 이로 제한되지는 않는다.

[0048] 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 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 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 임상

적 기술을 사용하여 최적화할 수 있다.

[0049] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포의 검정 키트에 관한 것이다.

[0050] 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.

[0051] 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 표지물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0052] 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 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0053] 항원-항체 복합체 형성은 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) 등의 방법을 통해 분석되지만, 이로 제한되지 않는다.

[0054] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하는 표지물질(label)에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 표지로 이용 가능한 효소에는 β-글루쿠로니다제, β-D-글루코시다제, β-D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린 에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트 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, 루시퍼라아제 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, $K_4W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[RU(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선 동위원소에는 ^{3}H, ^{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.

발명의 효과

[0055] 본 발명의 단일클론항체 297-D4는 미분화 생쥐 배아줄기세포나 분화 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않고 미분화 인간 배아줄기세포의 세포표면 단백질을 특이적으로 인식하므로, 생쥐와 고등동물인 인간의 초기 배 발달의 차이를 연구할 수 있는 도구를 제공하여 인간 배아줄기세포의 분석 연구에 이용할 수 있으며, 세포 치료시 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 또 인간 배아줄기세포의 무혈청 배지 개발에 대한 정보를 제공해 준다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1A는 배양중인 미분화 인간 배아줄기세포인 H9의 형태를 현미경으로 관찰한 것이고,

도 1B는 배양중인 미분화 인간 배아줄기세포 H9에 레티노산(Retinoic acid)을 처리하여 6일째 배양한 형태를 현미경으로 관찰한 것이고,

도 2A는 플로우 사이토미트리(Flow cytometry) 분석을 통하여 미분화 인간 배아줄기세포의 미분화 마커인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81은 양성이고 분화마커인 SSEA1은 음성인 것을 보여준 것이고(실선은 각 단일클론항체이고, 짙은 바탕은 2차 항체만 포함함),

도 2B는 플로우 사이토미트리 분석을 통하여 20일 이상 레티노산으로 분화시킨 인간 배아줄기세포에서 미분화 마커인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81은 음성이고 분화 마커인 SSEA1은 약하게 양성인 것을 보여준 것이고 (실선은 각 단일클론항체이고, 짙은 바탕은 2차 항체만 포함함),

도 3은 항체 297-D4를 생쥐 복수액에서 프로테인G 세퍼로스 칼럼 크로마토그래피(Protein G sepharose column chromatography)로 정제하여 12% SDS-PAGE로 분석한 것이고(HC는 중쇄, LC는 경쇄),

도 4는 플로우 사이토미트리 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 297-D4가 인간배아줄기세포 H9, H1, CHA-hES4, 그리고 인간배아 암세포 NT-2, NCCIT에 결합하는 정도를 보여준 것으로서, 인간배아줄기세포와 인간배아 암세포에 잘 결합하지만, 피더(feeder)인 MEF, 생쥐배아줄기세포들, 분화된 인간 세포들에는 결합하지 않는 것을 보여준 것이고(이때, 실선은 단일클론항체이고 검은 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군임),

도 5는 본 발명의 단일클론항체 297-D4가 H9에는 잘 결합하지만 미분화 인간배아줄기세포를 분화 유도된 배아체(embryoid body, EB)에는 그 결합이 현저히 감소하는 것을 보여준 것이고,

도 6 및 도 7은 본 발명의 단일클론항체 297-D4 항체와 기존 미분화 인간배아줄기세포 표면마커로 알려진 SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81항체와 이중 플로우사이토미트리를 수행한 결과로서, 기존 미분화 인간배아줄기세포 마커로 알려진 SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 항체 양성인 세포들의 99.7, 77.4, 76.9% 이상에서 같이 양성임을 보여준 것이고,

도 8은 미분화 인간 배아줄기세포 표면을 바이오틴화(biotinylation)한 후에 단일클론항체 297-D4를 사용하여 면역 침강시킨 후에 침강된 단백질을 12% SDS-PAGE에서 분석하여 (오른쪽) 다시 웨스턴 블라팅으로 PVDF 막으로 옮기고 거기서 스트렙타비딘-HRP (SA-HRP)로 분석한 것이고(No Ab는 항체를 빼고 똑같은 실험을 한 음성 대조군임),

도 9는 인간 배아줄기세포에서 본 발명의 단일클론항체 297-D4 항체로 면역 침강시킨 단백질을 SDS-PAGE에서 분리하여 트립신으로 절단한 후 얻은 펩타이드를 MALDI-TOF 분석을 통해 본 발명의 단일클론항체 297-D4가 인식하는 항원이 BAP31(B-cell receptor associated protein31)임을 보여준 매스 스펙트럼 그림이고,

도 10은 본 발명의 단일클론항체 297-D4가 인식하는 항원을 매스 스펙트럼에서 확인하였을 때의 펩타이드 매스 핑거프린팅(peptide mass fingerprinting; PMF) 으로 확인한 각 펩타이드가 BAP31의 아미노산 전체서열 중에서 실제 BAP31 단백질 아미노산 서열의 어디에 해당되는지 밑줄로 표시한 그림이고,

도 11 중 위 패널은 단일클론항체 297-D4가 BAP31 단백질을 인식하여 면역침강시키는지 재확인하기 위해 미분화 인간 배아줄기세포 표면을 바이오틴화(biotinylation)한 후에 단일클론항체 297-D4, 공지의 항-BAP31로 면역 침강시킨 후에 침강된 단백질을 12% SDS-PAGE에서 분석후 다시 웨스턴 블라팅으로 PVDF 막으로 옮기고 거기서 스트렙타비딘-HRP (SA-HRP)로 분석한 것과, 중앙 패널 및 아래 패널은 동일한 PVDF막을 그 후 제거완충용액으로 제거 후 공지의 항-BAP31 항체나 297-D4로 다시 각각 웨스턴 블라팅을 수행한 결과이고(No Ab는 항체를 빼고 똑같은 실험을 한 음성 대조군임),

도 12는 플로우 사이토미트리 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 297-D4와 공지의 항-BAP31 항체가 미분화 인간배아줄기세포 H9에 동일하게 결합하는지 분석한 것이고(이때, 실선은 항체들이고 검은 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군임),

도 13은 본 발명의 단일클론항체 297-D4 항체의 중쇄 유전자 가변영역(V_H)의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)과 중요 아미노산의 잔기 위치를 표시한 것이고,

도 14는 본 발명의 단일클론항체 297-D4 항체의 경쇄 유전자 가변영역(V_L)의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)과 중요 아미노산의 잔기 위치를 표시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0058] **<실시예 1> 인간 배아줄기세포의 배양 및 분화유도**

[0059] **<1-1> 배아줄기세포의 배양 및 레티노산 처리에 의해 분화된 배아줄기세포와 배아체 세포의 유도**

[0060] 인간 배아줄기세포 H1과 H9은 위스콘신대학 연구소(Wicell Research institute)에서 구입하여 제시한 프로토콜에 따라 배양하였다. CHA-hES4는 차병원 (Seoul, Korea)에서 얻어서 제공한 프로토콜대로 배양하였다. 먼저 0.1%의 젤라틴 용액으로 37℃에서 10분 동안 12-웰(well)의 조직배양용 플레이트(Nunclon)를 코팅한 후, 3000rad 감마 방사선을 조사한 MEF(CF1 mouse embryonic fibroblast, 세종대학교 실험동물실)를 웰당 6.5 × 10^4 세포수로 접종하였다. 상기 방사선이 조사된 MEF는 성장하지는 않지만, 인간 배아줄기세포의 성장을 지지하는 세포이다. MEF 배양 24시간 후에 미국에서 구입한 인간 배아줄기세포 H1과 H9을, 제공한 프로토콜에 따라 37℃ 물중탕에서 서서히 녹인 다음 아래처럼 준비한 인간 배아줄기세포 배지 5㎖에 부유시키고 원심 분리하여 상층액을 제거하고 새 배지에서 다시 부유시킨 다음 준비한 MEF에 접종하였다. 2차 배양을 위해서는 5일된 인간 배아줄기세포 배양 플레이트에 37℃에서 10분 동안 1㎎/㎖의 콜라겐 분해효소 Ⅳ(Invitrogen, Seoul, Korea)를 처리한 후, 상기 줄기세포를 적당한 크기로 자른 후 다시 상기처럼 준비한 MEF 조직배양용 플레이트에 옮기고, 48시간 후부터 매일 배양액을 교체하며 배양하였다. 미분화된 인간 배아줄기세포의 콜로니 바깥쪽이 명확히 생쥐 배아 섬유아세포와 구별되는 것을 관찰할 수 있다(도 1A). 인간 배아줄기세포 배양에 사용된 배지는 DMEM/F12(Invitrogen, Seoul, Korea), 20%의 넉아웃SR(Knockout SR)(Invitrogen), 0.1mM의 β-머캅토에탄올(Sigma-Aldrich, St. Luis, MO), 2mM의 글루타민(Invitrogen), 0.1mM의 비필수 아미노산(Invitrogen), 100U/㎖의 페니실린 G(Sigma-Aldrich), 100㎍/㎖의 스트렙토마이신(Sigma-Aldrich), 4ng/㎖의 bFGF(PeproTech, Rocky Hill, NJ)을 섞어 만든 배지를 사용하였다.

[0061] 분화된 H9 세포를 유도하기 위해서 레티노산(RA)(all-*trans*-retinoic acid, Sigma-Aldrich)을 10^{-5} M로 적어도 20일 이상 상기 배지에 넣고 배양하였다. 배양 2일째부터 배아줄기세포는 분화를 시작하여 6일째 경계선이 뚜렷하던 모습이 사라지고 세포가 전체적으로 넓게 퍼지는 것을 관찰할 수 있다(도 1B). H9 세포로부터 인간 배아체를 유도하는 과정은 분리된 인간 배아줄기세포 덩어리를 깨어지지 않게 조심하여 박테리아 플레이트(bacteria plate)에 잘 옮겨 EB 배양액{DMEM/F12, 20%의 FBS(Fetal bovine serum, Hyclone), 0.1mM의 β-머캅토에탄올, 2mM의 글루타민, 0.1mM의 비필수 아미노산, 100U/㎖의 페니실린 G, 100㎍/㎖의 스트렙토마이신}에서 배아체를 형성할 수 있도록 4일간 배양하였다. 이때, 매일 배양액과 플레이트를 교체하여 주었다 (Chadwick et al., Blood 102, 906-915, 2003). 마우스 배아줄기세포 J1은 방사선 처리된 마우스 배아섬유아세포인 CF1 세포상에서 15%의 FBS, 0.1mM의 β-머캅토에탄올, 1mM의 글루타민, 0.1mM의 비필수 아미노산, 100U/㎖의 페니실린 G, 100㎍/㎖의 스트렙토마이신, 그리고 500units/㎖ LIF(leukemia inhibitory factor, PeproTech)로 구성된 DMEM 배지(Invitrogen)를 이용하여 배양하였다. 인간 말초혈액 단핵구 세포 (human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 Ficoll-Paque Plus method (GE Healthcare, Seoul, Korea)에서 제시한 방법을 이용하여 분리하였고, 인간 피부 섬유아세포 (human dermal fibroblast, HDF)는 MCTT (Seoul, Korea)에서 구입하였고 인간배아암세포인 NT-2/D1, NCCIT는 ATCC (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하고 생쥐배아줄기세포도 ATCC에서 구입하여 제공된 프로토콜대로 배양하였다.

[0062] **<1-2> 플로우 사이트미트리에 의한 세포표면 항원염색**

[0063] 항체들의 각종세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토미트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 구체적으로, 미분화된 인간 배아줄기세포, 레티노산으로 처리된 인간 배아줄기세포를 콜라겐분해효소 Ⅳ(1㎍/㎖)를 이용하여 15-20분 동안 처리해서 세포를 떼어냈다. PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후, 세포분리 완충액(cell dissociation buffer,Invtrogen) 넣고 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 단일세포로 분리하기 위해 40㎛ 스트레이너(strainer, BD Biosciences, Seoul, Korea)를 이용하여 여과시켰다. 단일세포를 ㎖당 약 2 x 10^5cell을 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN_3 in PBS)에 섞은 후, 항-SSEA1, 항-SSEA3, 항-SSEA4, 항-TRA-1-60, 항- TRA-1-81 (Millipore, Billerica, MA) 항체를 4℃에서 30분간 반응시켰다. 0.1% PBST(Phosphate buffered saline Tween 20)로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-래트 IgM-FITC, 항-마우스 IgM-FITC와 항-마우스 IgG-FITC (BD Biosciences)를 4℃에서 30분간 더 반응시켰다. 0.1% PBST로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석

하였다. 미분화 인간 배아줄기세포 H9 세포가 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81에서 양성이고 SSEA1에서는 음성임을 보여주고 있고(도 2A), 레티노산으로 분화를 유도한 H9 세포는 반대로 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81에서 음성이고 SSEA1에서는 약하게 양성임을 보여주고 있다(도 2B).

[0064] **<실시예 2> 하이브리도마 제조**

[0065] **<2-1> 인간 배아줄기세포의 면역주사**

[0066] 인간 배아줄기세포 H9 세포를 20일 동안 레티노산처리하여 분화된 H9 세포를 준비하였다. 미분화 H9 세포와 분화된 H9 세포에 1㎎/㎖ 콜라겐 분해효소 IV를 처리하여 세포를 떼어낸 후 파스퇴르 피펫으로 작은 크기로 잘게 부순 후 50㎕ PBS(pH 7.4)에 약 2 x 10^6 세포를 각각 섞은 후 12마리의 6주령 암컷 Balb/c 마우스의 오른쪽 뒷발에는 -3, 0, 3, 6, 13, 17일마다 분화된 H9 세포를, 왼쪽 뒷발에는 0, 3, 6, 13, 17일마다 미분화된 H9 세포를 찔러 넣었다. 21일째에 면역주사(immunization)된 마우스를 경추 탈골하여 클린벤치로 옮긴 다음 멸균된 가위와 핀셋을 이용하여 왼쪽 뒷발로부터 지방과 근육조직을 제거한 오금 림프절(popliteal lymph node)을 적출하였다. 표면이 울퉁불퉁한 비광택 슬라이드 글라스(frosted slide glass)를 이용하여 오금 림프절을 갈아서 단일세포화해서 준비하였다. 미엘로마(myeloma) 세포인 F0 세포(ATCC, Manassas, VA)를 혈청 비첨가 배지로(serum-free media) 세척한 후, 40㎛ 세포 스트레이너를 이용하여 오금 림프절 세포와 F0 세포의 잔해물을 제거하였다. 미분화 H9 세포를 찌른 왼쪽 림프절 세포(1.53 x 10^8)와 F0 세포(3.06 x 10^7)를 1:5의 비율로 섞은 후, 혈청 없는 배지인 DMEM(Invitrogen)으로 2번 세척한 후 1㎖ 50% PEG1500 (polyethylene glycol, BMS, seoul, Korea)를 1분당 25방울이 섞이도록 넣어주었다. 1분 후 DMEM 배지를 1분간 3㎖, 1분간 17㎖, 1분간 20㎖을 연속적으로 넣고, 5분간 정치한 후 원심분리하여 세포를 모았다. 20% FBS 포함된 DMEM과 HAT 구성요소(Sigma-Aldrich)와 50㎖ 하이브리도마 클로닝 인자(hybridoma cloning factor, Bioveris, Gaithersburg, MD)에 융합된 세포를 96 웰 플레이트의 웰당 2 x 10^5 세포 수 만큼 깔고, 5% CO_2, 37℃세포 배양기에서 배양하였고, 3일 간격으로 200㎕의 20% FBS와 HAT 구성요소를 포함한 DMEM으로 갈아 주었다.

[0067] **<2-2> 하이브리도마의 클로닝**

[0068] 하이브리도마 상층액에서 먼저 항체가 발현되는 클론을 선발하기 위하여 샌드위치(sandwich) ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법을 사용하였다. 항-마우스 IgG 또는 IgM 항체를 2 ㎍/㎖로 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 100㎕을 첨가해 37℃에서 1시간 반응시키고, 다시 항-마우스 IgG 또는 IgM의 HRP(horseradish peroxidase, Sigma-Aldrich)의 1/5,000 희석액과 1시간 더 반응시켰다. 0.05%의 트윈 20을 첨가한 인산완충액으로 플레이트를 세척하고, OPD(o-phenylenediamine, Sigma-Aldrich)와 H_2O_2가 포함된 기질 용액을 첨가하고, 492㎚에서 흡광도를 측정하여 항체를 생산하는 클론을 먼저 선발하였다. 다음으로 각 클론의 배양 상층액을 상기 실시예 <1-2>에 기술한 플로우 사이토미트리 분석을 통해 미분화 H9 세포에 결합하는 다양한 하이브리도마들을 선발하고 계대배양을 계속하며 서브클로닝하여, 확실하게 안정성을 유지하고 인간 배아줄기세포에 대한 결합력을 유지한 단일클론항체군를 분비하는 37종의 하이브리도마군을 선발하였다. 이 중 네 개의 항체는 다음의 다른 인간 배아줄기세포인 H1에 대한 결합력 실험에서 결합하지 않았다. 두 세포에 공통적으로 결합하는 항체 33종의 아이소타입은 마우스 이뮤노글로불린 아이소타이핑 키트(Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit, BD Biosciences)에서 제시한 방법을 이용하여 수행하여 결정하였다. 29개 항체는 IgG 형태이고 나머지 4개는 IgM 형태였다. 이들 중 항체 297-D4는 IgG1과 κ사슬을 가진 항체로 본 발명에서 인식 항원과 특성을 분석하였다.

[0069] **<2-3> 단일클론항체의 정제**

[0070] 쥐의 복부에 297-D4 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 찔러 넣기 일주일 전 프리스테인(Pristane, SIGMA-Aldrich, Seoul, Korea)을 쥐 체중의 1/10 중량만큼 취해 복강에 주사하였다. 일주일 뒤 항체를 생성하는 297-D4 하이브리도마 1~5 X10^6을 0.5㎖의 PBS에 부유시키고 쥐의 복부에 찔러 넣고 1~2주 동안 쥐의 복부가 불러오는 것을 확인하고 복수(Ascites fluids)를 채취하였고, 채취한 복수를 사용하여 항체를 정제하였다. 추출한 복수액은 37℃에서 30분 반응시킨 다음 2,500rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 상기 복수액 1

㎖에 PBS을 첨가하여 2㎖로 희석시켰다. 또한, 1nM의 EDTA와 0.02%의 NaN_3를 상기 복수액에 첨가하고, 0.22㎛ 여과기로 여과하였다. 이 항체의 순수 분리를 위해서 단백질 G-세파로스 컬럼 크로마토그래피 방법으로 분리하였다. PBS로 미리 평형화시킨 단백질 G-세파로스 컬럼(Pharmacia, 스웨덴)에 항체 용액을 천천히 통과시키고 컬럼을 페리스타틱 펌프(peristatic pump)에 연결하여 PBS로 충분히 세척하였다. 세척 완료 후, 0.2M의 글리신(Glycin)-HCl(pH 2.7)으로 항체를 용출하였다. 이때 미리 준비한 1M의 Tris (pH 9.0)를 포함한 튜브에 상기 용출액을 완충시켰다. 이 항체를 PBS에 투석한 후 사용하였다. BCA 단백질 분석 키트(BCA™ Protein Assay Kit, Pierce)를 이용하여 정제된 항체 양을 측정하고, SDS-PAGE를 이용하여 항체 297-D4의 정제양상을 확인하였으며 순수하게 분리되었음을 알 수 있었다(도 3). 복수 1㎖당 약 1~2㎎/㎖ 농도의 정제된 항체를 얻을 수 있었다.

[0071] **<실시예 3> 단일클론항체 297-D4의 결합 특이성 분석**

[0072] **<3-1> 인간 및 생쥐 배아줄기세포와 각종 세포에 대한 결합 특이성**

[0073] 단일클론 항체 297-D4의 각종세포에 대한 결합정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토미트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 먼저, 미분화된 인간배아줄기세포 H9, H1, CHA-hES4를 콜라겐분해효소 IV(1㎎/㎖)를 이용하여 15~20분 동안 처리해서 세포를 떼어냈다. PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후, 세포 분리완충액(cell dissociation buffer, Invtrogen)을 넣고 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 단일세포로 분리하기 위해 40㎛ 스트레이너(BD Biosciences, Seoul, Korea)를 통과시켰다. 또한, 생쥐배아줄기세포(J1, TC1, R1, E14Tg2a.4), 생쥐배아섬유아세포(MEF), 인간 PBMC 세포, 인간 HDF 세포, 인간배아암세포(NT-2/D1, NCCIT)도 세포 분리완충액을 이용하여 떼어냈고, PBS(pH 7.4)로 2번 세척한 후, 40㎛ 스트레이너를 이용하여 단일세포로 준비하였다. 각 단일세포를 ㎖당 약 2 x 10^5 개씩 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN_3 in PBS)에 섞은 후, 항체 297-D4를 4℃에서 30분간 반응시켰다. 0.1% PBST로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC (BD Biosciences)를 4℃에서 30분간 더 반응시켰다. 0.1% PBST로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 도 4에서 실선은 단일클론항체 297-D4이고 회색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 단일클론항체 297-D4가 인식하는 표면항원은 미분화 상태의 인간배아줄기세포인 H1, H9, CHA-hES4에서는 잘 발현되고 또한, 인간배아줄기세포와 유사한 외부 표면항원을 가진 인간 배아암세포인 NT-2/D1, NCCIT에 잘결합하였다. 하지만 생쥐배아줄기세포(J1, TC1, R1, E14Tg2a.4), 생쥐배아섬유아세포(MEF), 인간 PBMC, HDF 세포에는 결합하지 않음을 볼 수 있었다(도 4).

[0074] **<3-2> 297-D4 항체와 분화된 배아체세포에 대한 상대적 결합 비교**

[0075] 인간배아줄기세포 H9을 상기 <실시예 1-1>에 기술된 것처럼 배아체(EB)를 분화를 유도한 다음에 H9과 EB 세포 사이의 결합정도를 플로우사이토미트리로 비교하였다. 플로우사이토미트리에서 결합정도를 평균형광강도 (mean fluorescence intensity)로 환산하여 결합정도를 백분율로 표현하였을 때, H9에 대한 결합정도는 72% 이상이지만 EB에 대한 결합정도는 5% 이하로, 분화된 EB 세포에는 현저히 그 결합력이 감소하는 것을 볼 수 있었다 (도 5).

[0076] **<3-3> 단일클론항체 297-D4 항원과 공지의 미분화 인간 배아줄기세포 표면항원과의 공동 발현분석**

[0077] 단일클론항체 297-D4와 기존에 알려진 전분화능 미분화 인간배아줄기세포 표면 마커들과의 관계를 조사하기 위하여 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce)을 가지고 제공한 방법대로 단일클론항체 297-D4의 바이오틴 표지화를 수행하였다. 구체적으로 1.63㎎의 NHS-LC-바이오틴을 1㎖ PBS (pH 8.0)에 녹이고, 50㎖(146.4nmol)의 이 용액을 1㎎의 정제된 항체의 바이오틴 표지에 사용하였다. 실온에서 1시간 반응시키고 나서 그 반응물은 4℃에서 투석액(0.1M $NaHCO_3$, pH 8.0)에 48시간 동안 투석되었다. 이렇게 준비한 바이오틴 표지 항체를 다음의 플로우 사이토미트리에 사용하였다. 세포를 먼저 상기 실시예 <1-2>와 같이 준비한 후 항-SSEA4, 항-TRA-1-60, 항-TRA-1-81 (Chemicon, Temecula, CA) 항체로 각각 4℃에서 30분 반응시킨 후 FITC-결합 항-마우스 IgG 또는 항-마우스 IgM (BD Biosciences) 항체로 1차 항체에 맞게 30분 더 반응시켰다. PBA로 세척한 후에 세포는 바이오틴 표지된 297-D4로 30분 더 반응시킨 후 스트렙타비딘-PE(phycoerythrin)로 30분 더 반응시켰다. 세척 후에 PI(propidium iodide)-음성 세포만을 FACSCalibur (BD Biosciences)와 Cell Quest 소프트웨어(BD Bioscience

s)로 분석하였다. SSEA4, TRA-1-60, 그리고 TRA-1-81 양성인 세포의 각각 99.7, 77.4, 76.9%가 단일클론항체 297-D4 양성반응을 보였다(도 6, 도 7). 이런 결과는 기존의 미분화 인간배아줄기세포의 표면 마커 양성인 대부분의 세포들이 297-D4 항원을 세포표면에서 발현하는 것으로서, 단일클론항체 297-D4 항원이 새로운 미분화 인간배아줄기세포 표면마커로 사용될 수 있다는 것을 말해준다.

[0078]

[0079] **<실시예 4> 단일클론항체 297-D4가 인식하는 항원 동정**

[0080] **<4-1> 단일클론항체 297-D4가 인식하는 세포표면 단백질 분자의 확인**

[0081] 인간 배아줄기세포 H9 세포 표면의 바이오틴표지(biotinylation)는 EZ-Link Sulfo-NHS- LC-Biotin (Pierce)에서 제시한 프로토콜을 약간 수정하여 수행하였다. 100 밀리미터 세포배양 플레이트에 배양한 인간 배아줄기 세포 H9을 37℃에서 미리 데워둔 PBS(pH 7.4)로 2회 세척한 후 바이오틴(0.1mg/ml)이 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 아프로티닌, 100㎍/ml PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride), 5㎍/ml 류펩틴, 1mM NaF, 1mM Na_3VO_4)를 이용하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 12,000rpm 속도로 40분간 원심분리해서 핵을 제거한 후 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. 단백질-G-플러스 아가로스(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위해서, 약 1 x 10^7 세포의 세포 용해물에 20㎕ 단백질-G-플러스 아가로스를 넣고 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 원심분리를 통해 그 단백질-G-플러스 아가로스를 회수하여 용해 완충액을 이용해 10회 세척한 샘플을 음성 대조군으로 사용하였다. 단일클론항체 297-D4에 의해 인식되는 항원을 면역침강하기 위해서 단백질-G-플러스 아가로스에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거한 세포 용해물에 각 항체 2 또는 5㎍을 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 20㎕ 단백질-G-플러스 아가로스를 넣고 4℃에서 3시간 동안 더 반응시켰다. 면역 침강된 면역 혼합체를 용해시킨 용액을 이용해서 7회 세척하고, 각 항체에 결합된 항원을 용출하기 위해 5X 샘플 완충액를 넣고, 100℃에서 5분간 끓였다. 음성 대조군 단백질과 용출된 단백질을 12% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블랏팅하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 2시간동안 블로킹하였다. 0.1% PBST로 3번 세척 한 후, 스트렙타비딘-HRP(1:3,000; GE healthcare)를 실온에서 1시간 더 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출 키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과, 단일클론 항체 297-D4는 약 31 kDa 단백질을 미분화 인간배아줄기세포 추출액에서 면역 침강시키는 것을 확인하였다(도 8).

[0082] **<4-2> 단일클론항체 297-D4에 의해 면역 침강된 항원의 동정**

[0083] 단일클론항체 297-D4에 의해 면역침강된 단백질을 포함하는 SDS 젤을 쿠마시 G250 (BIO-RAD)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다. 단백질은 Shevchenko(Shevchenko, et al., Anal. Chem. 68:850-858, 1996) 등의 방법에 따라 변형된 돼지 트립신을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해하였다. 젤 조각으로부터 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50% 아세토나이트릴로 세척하였다. 그 다음, 트립신(8-10ng/㎕)으로 8-10시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 단백질 분해반응은 5㎕ 0.5% 트리플루오로아세트산의 첨가에 의해 종결하였다. 트립신에 의해 잘려진 단백질 단편들은 수용액 상태로 회수되었고, C18ZipTips(Millipore)을 이용하여 1-5㎕ 부피로 탈염 및 농축하였다. 이 농축액은 동량의 50% 수용성 아세토나이트릴에 포화된 α-시아노-4-하이드록시시나믹산과 혼합되었고, 질량분석을 위하여 타겟 플레이트 위에 적하하였다. 질량분석기는 Ettan MALDI-TOF(Amersham Biosciences)를 사용하였다. 타겟 플레이트 상에 적하되어 있는 단백질 단편들은 337nm의 N_2 레이저 조사에 의해 기화된 다음, 20Kv 인젝션 펄스에 의해 가속하였다. 300 레이저샷의 누적 피크에 의해 각각의 단백질 스팟에 대한 매스 스펙트럼을 구하였다(도 9). 매스 스펙트럼 분석을 위해서 트립신의 자가분해에 의해 생성된 펩타이드의 이온 피크 m/z(842.510, 2211.1046)를 표준 피크로 이용하였다. 분석이 완료된 매스 스펙트럼으로부터 단백질 동정을 위하여 록펠러 대학에서 개발한 ProFound 검색엔진(http://129.85.19.192/profound_bin/ WebProFound.exe)을 이용하였다. 그 결과, 이 단백질이 BAP31(B-cell receptor associated protein31)임을 확인하였다(도 10). 도 10의 밑줄 친 아미노산은 실제로 질량분석기를 통해 확인한 펩티드를 표시한 것으로, BAP31과 52개의 아미노산이 일치하는 것을 알 수 있다.

[0084] **<4-3> 동정된 297-D4 항원의 검증**

[0085] BAP31에 대한 항체가 이미 상업적으로 팔리고 있다. 토끼 다클론항체 항-BAP31 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 구입하여 단일클론항체 297-D4가 면역침강시킨 단백질을 인식하는지 확인하기 위해 인간배아줄기세포 H9세포 추출액을 사용하여 면역침강과 웨스턴 블랏을 수행하였다. 단일클론항체 297-D4가 면역 침강시키는 항원의 웨스턴 블라팅을 수행하기 위해서, 상기 실시예 <4-1>에서 서술한 용해 방법으로 바이오틴-표지된 세포 추출액을 준비하였다. 이 세포 추출액을 상기 서술한 바와 동일하게 단일클론항체 297-D4와 항-BAP31 항체로 면역침강 후 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(No Ab)과 용출된 단백질을 12% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 PVDF 막으로 옮겼다. 이 막은 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 2시간동안 블로킹을 하였다. 0.1% PBST로 3번 세척한 후, 스트렙타비딘-HRP(1:4,000, GE healthcare, 미국)를 실온에서 1시간 더 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과, 단일클론항체 297-D4와 공지의 항체 항-BAP31항체는 동일하게 세포표면의 BAP31을 면역 침강시켜서 약 31 kDa에서 검출되었다(도 11 위 패널).

[0086] 한편, 이렇게 준비된 PVDF 막을 제거완충용액(62.5mM Tris-HCl(pH6.8), 2% SDS, 100mM β-mercaptoethanol)에 넣고, 50℃에서 45분간 반응시킨 후, 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 2시간동안 블로킹을 하였다. 0.1% PBST로 3번 세척한 후, 공지의 항-BAP31 항체를 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척 한 후, 항-토끼 IgG-HRP(1:3,000; Santa Cruz)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척한 후, ECL 검출키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과 단일클론항체 297-D4로 면역 침강시킨 BAP31 단백질과 항-BAP31 항체에 의해 면역침강된 BAP31 둘 다 공지의 항-BAP31 항체에 의해 인식됨을 관찰할 수 있었다(도 11 중앙 패널).

[0087] 그리고 다시 상기와 동일하게 제거완충용액으로 제거후 297-D4 항체를 이용한 웨스턴 블라팅에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다(도 11 아래 패널).

[0088] 따라서 본 발명의 단일클론항체 297-D4는 미분화 인간배아줄기세포의 표면에 존재하는 BAP31 단백질을 인식하는 항체임을 검증하는 것이다(도 11). 이와 같이 BAP31이 배아줄기세포 세포표면에서 발현한다는 것은 본 실시 예에서 처음으로 밝혔다.

[0089]

[0090] **<4-4> 단일클론항체 297-D4와 공지 BAP31 항체의 인간 배아줄기세포 표면에서의 발현 비교**

[0091] BAP31이 배아줄기세포 세포표면에서 발현한다는 것을 본 발명에서 제조한 항체 297-D4로 처음 밝혔음으로 공지의 항-BAP31 항체도 실제로 미분화 인간배아줄기세포 표면에 결합하는지를 분석하기 위해 인간배아줄기세포 H9를 상기 실시예 <1-2>처럼 준비하여 항-SSEA3, 항-SSEA4, 항-TRA-1-60, 항-TRA-1-81 (Chemicon, Temecula, CA), 단일클론항체 297-D4, 공지의 토끼 다클론항체 BAP31 항체(Santa Cruz)로 각각 4℃에서 30분 반응시킨 후 PBA로 세척한 후에 세포는 1차 항체와 상응하는 항-래트 IgM-FITC, 항-마우스 IgM-FITC와 항-마우스 IgG-FITC, 항-토끼 IgG-FITC (BD Biosciences)를 4℃에서 30분간 더 반응시켰다. 0.1% PBST로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다.

[0092] 그 결과를 도 12에 나타내었으며, 이때 실선은 단일클론항체이고 붉은색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 단일클론항체 297-D4가 미분화 상태의 인간배아줄기세포인 H9에 잘 결합하며, BAP31을 인식하는 공지의 항체 또한 결합하였다. 이러한 결과를 통해서 단일클론항체 297-D4는 공지의 토끼 항-BAP31 항체와 동일하게 미분화 인간배아줄기세포 표면에 결합하는 것을 다시 한번 더 플로우 사이토미트로도 검증하였다(도 12).

[0093] **<실시예 5> 단일클론항체 297-D4 항체유전자 및 아미노산 분석**

[0094] **<5-1> 단일클론항체 297-D4 유전자 클로닝**

[0095] 왕성하게 자라는 하이브리도마 297-D4 세포 $5X10^6$ 개를 원심분리하여 수확한 후 찬 PBS로 세척하고 1ml의 RNA-Bee(TEL-TEST사, 미국)를 넣고 격렬히 흔들어서 섞었다. 실온에서 5분 반응시키고 200㎕ 클로로포름를 넣고 다시 세차게 흔든 후 얼음에서 5분 보관하고 4℃ 12,000 x g, 15분 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 양과 동량의 페놀/클로로포름을 넣고 격렬히 섞은 후 원심분리하고 상층액을 다시 회수한 후 1회 더 페놀/클로로포름 추출을 반복하고 상층액을 회수한 후 클로로포름만 넣어서 최종 추출한 후 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 동

량의 이소프로판을 넣은 후 실온에서 10분 방치 후 실온에서 12,000 x g, 5분 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 75% 에탄올로 RNA를 세척한 후 물기를 완전히 없애고 공기 중에서 RNA 침전물을 건조시켰다. 디에틸피로카보네이트(Diethyl Pyrocarbonate, Sigma사, 미국) 처리된 증류수 50㎕에 녹인 다음 A260을 측정하여 RNA 양을 정량하였다. 항체 유전자를 클로닝하기 위해서는 알려진 중합효소연쇄반응 프라이머를 변형한 후 사용하였다(Wang, et al J. Immunol. Methods 233, 167-177, 2000).

[0096] 4㎍의 전체 RNA를 70℃ 10분간 변성 시키고 이 RNA에 중쇄 클로닝을 위해서는 IgG1 불변영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 염기서열 5'-GGA GTC GAC ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'(서열번호 5)인 올리고뉴클레오타이드 25 pmole과 중쇄항체 가변영역 N말단에 해당하는 프라이머인 염기서열 5'MH1 5'-gcg gcg gcc gc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC-3'(서열번호 6)과 5'MH2 5'-gcg gcg gcc gc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3'(서열번호 7)인 올리고뉴클레오타이드를 25 pmole씩 섞어 전체 12㎕로 맞추고 8㎕ ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron사, 한국)를 넣어 역전사중합효소 연쇄반응혼합액을 만들었다. 경쇄클로닝을 위해서는 카파사슬 불변영역에 해당하는 프라이머인 5'-GGT GTC GAC GGA TAC TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3'(서열번호 8)인 올리고뉴클레오타이드 25 pmole과 카파사슬 가변영역 N 말단에 해당하는 프라이머인 5'MK 5'-cgg aag ctt GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3'(서열번호 9)과 프라이머 5'-cgg aag ctt GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT-3'(서열번호 10)과 프라이머 5'-cgg aag ctt GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA-3'(서열번호 11) 각각을 25 pmole씩 섞어 사용하였다. 중합효소연쇄반응 생산물의 효율적인 클로닝을 위하여 경쇄의 경우는 3'-프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였고, 5' -프라이머 경우 HindIII 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄인 경우에는 5' -프라이머에는 NotI, 3'-프라이머에는 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄 및 경쇄반응액을 각각 섞은 후 먼저 45℃에서 30분간 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성한 후 94℃에서 1분, 45℃에서 1분, 72℃에서 2분으로 30회 반응시켰다.

[0097] 그 결과, 중쇄 불변영역에 해당하는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 400bp,경쇄 불변영역 해당되는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 390bp에 해당되는 위치에서 증폭된 DNA를 얻을 수 있었다.

[0098] **<5-2> 단일클론항체 297-D4 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석**

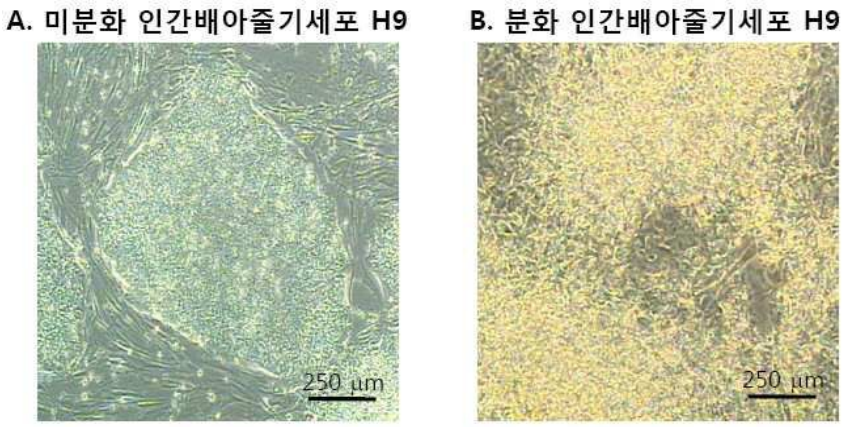
[0099] 상기 실시예에서 증폭해낸 297-D4 항체 유전자를 클로닝하기위하여 먼저 중합효소연쇄반응 산물을 중쇄는 NotI과 SalI으로 처리하고 경쇄는 HindIII와 SalI으로 처리한 후 1.4 % 아가로스 젤에 전개시켜서 GeneClean II(Bio101사, 미국)로 약 400과 390bp에 해당하는 DNA를 분리하였다. 중쇄유전자를 클로닝할 벡터로 사용할 pBluescript KS+를 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄유전자 클로닝 벡터로는 pBluescript SK+를 HindIII와 SalI으로 처리한 다음 GeneCleanII (Bio101사, 미국)로 분리하였다. 이 두 DNA를 T4 DNA 연결효소(New England Biolab사, 미국)로 연결하고 대장균 DH5α에 $CaCl_2$ 방법으로 형질전환한 다음, 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 대장균 클론, 경쇄의 경우 약 390bp 크기를 가진 대장균 클론들을 선발하였다.

[0100] 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 50㎍/ml의 앰피실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA 미니프렙 키트(Intron사 한국)를 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 결정하였다. 중쇄 및 경쇄 cDNA의 염기서열을 아미노산으로 바꾼 후 각 아미노산 배열을 Kabat 데이터베이스를 이용하여 분석하였다(Johnson G. and Wu,T.T. Nucleic Acids Res. 29: 205-206, 2001). 도 13 및 도 14의 염기 서열 위의 숫자는 Kabat 넘버링에 따라 정하였다. 이 아미노산 서열을 분석한 결과 이 면역유전자들은 항체구조에 특징적인 잔기와 배열을 완벽하게 갖추고 있으며 (도 13 및 도 14), 구체적으로 보면 면역글로블린 여러 그룹 가운데서 297-D4의 중쇄는 서브그룹 II(B)에 속하고 경쇄는 서브그룹 III에 속한다. 항원을 인식하는 CDR 잔기로는 중쇄의 경우 CDR1은 26-35, CDR2는 50-65, CDR3은 95-99이며, 경쇄의 경우 CDR1은 24-34, CDR2는 50-56, CDR3은 89-97에 해당하였다. 구조상 필수적인 디설피드 결합은 중쇄의 경우 22번과 92번 시스테인이, 경쇄의 경우 23번과 88번 시스테인이 관여하였다. 이 유전자의 분석 결과로부터 중쇄 및 경쇄유전자는 기능적임을 확인할 수 있었다.

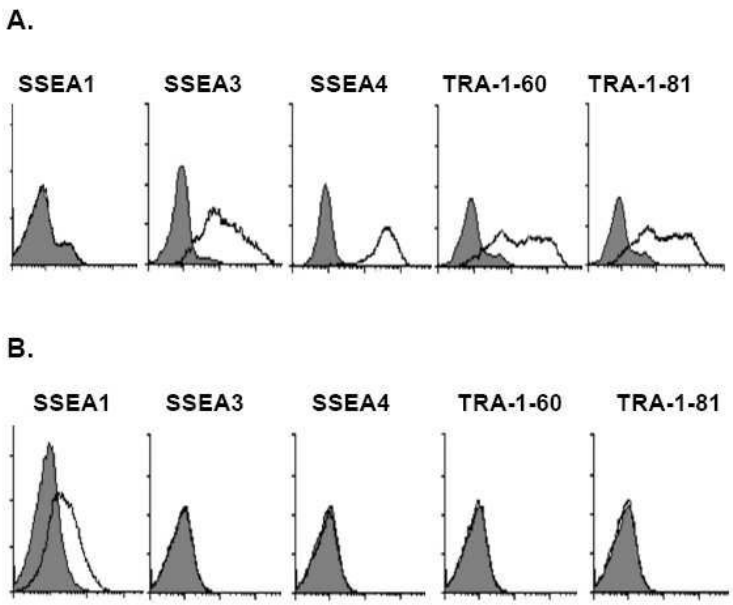
[0101] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

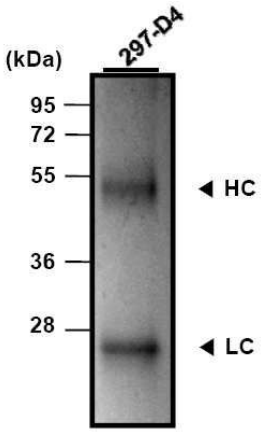
도면1



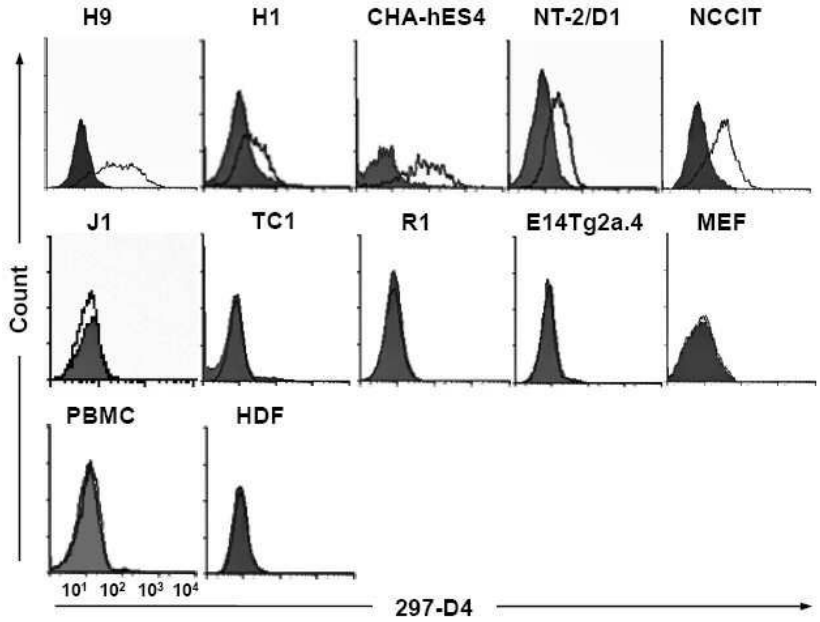
도면2



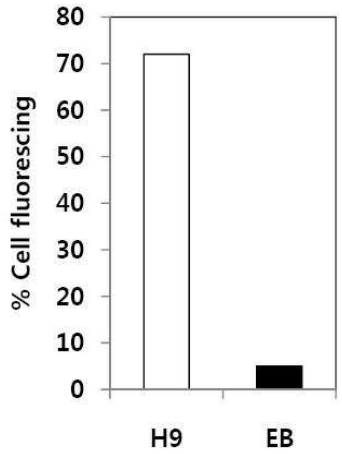
도면3



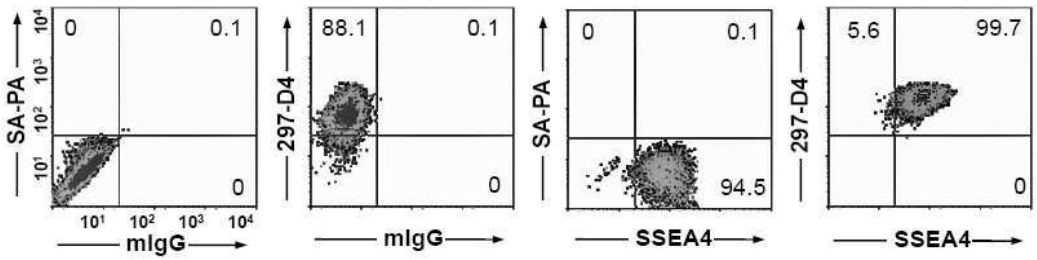
도면4


H9
H1
CHA-hES4
NT-2/D1
NCCIT
J1
TC1
R1
E14Tg2a.4
MEF
PBMC
HDF
Count
10^1 10^2 10^3 10^4
297-D4

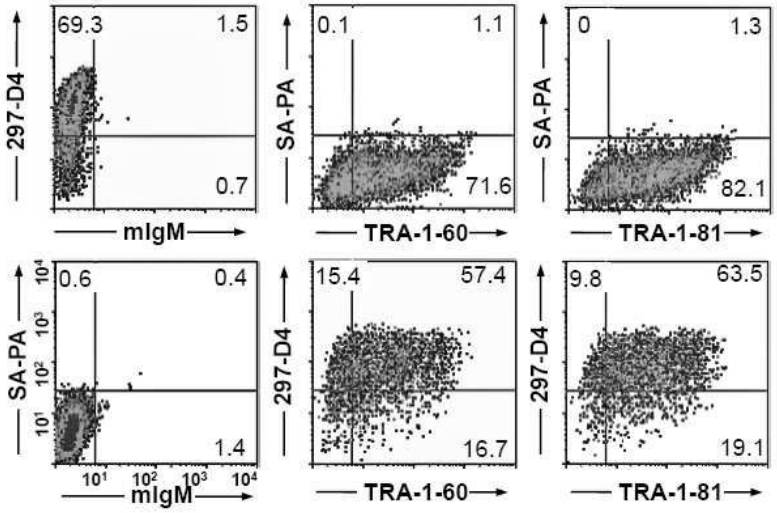
도면5


80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Cell fluorescing
H9
EB

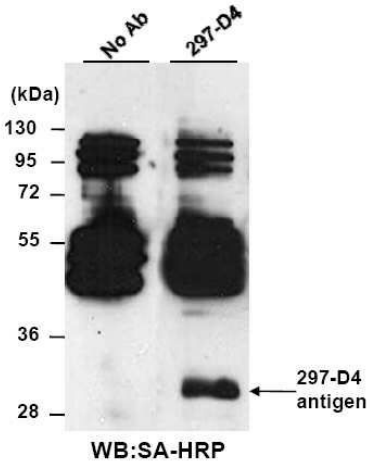
도면6


SA-PA
0
0.1
0
10^1 10^2 10^3 10^4
mIgG
297-D4
88.1
0.1
0
mIgG
SA-PA
0
0.1
94.5
SSEA4
297-D4
5.6
99.7
0
SSEA4

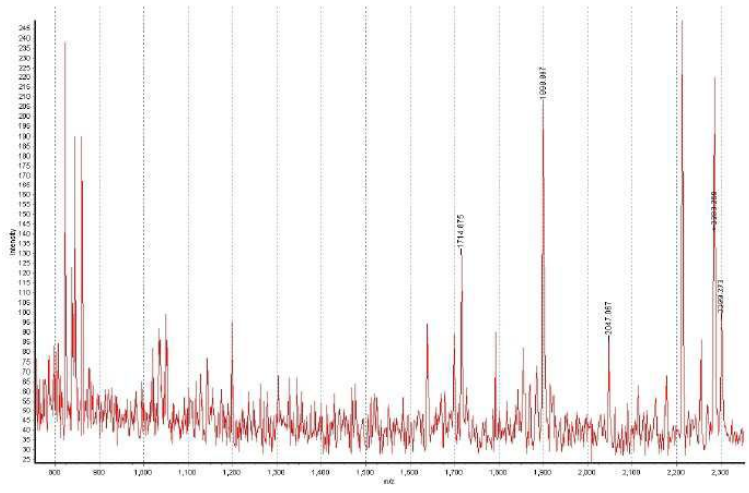
도면7


69.3
1.5
0.7
297-D4
mIgM
0.1
1.1
71.6
SA-PA
TRA-1-60
0
1.3
82.1
SA-PA
TRA-1-81
0.6
0.4
1.4
SA-PA
mIgM
15.4
57.4
16.7
297-D4
TRA-1-60
9.8
63.5
19.1
297-D4
TRA-1-81

도면8


No Ab
297-D4
(kDa)
130
95
72
55
36
28
297-D4
antigen
WB:SA-HRP

도면9



도면10

Match to: **gi|15680023** Score: **78** Expect: **0.0038**
B-cell receptor-associated protein 31 [Homo sapiens]

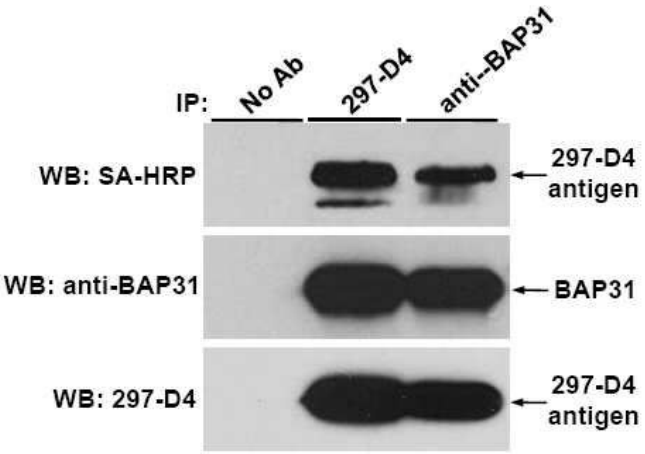
Matching peptide

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
80-95	1898.8970	1897.8897	1897.8563	0.0334	0	K.VNLQNNPGAMEHFHMK.L
80-98	2283.2590	2282.2517	2282.1201	0.1317	1	K.VNLQNNPGAMEHFHMKLFR.A
80-98	2299.2730	2298.2657	2298.1150	0.1507	1	K.VNLQNNPGAMEHFHMKLFR.A
119-137	2047.0670	2046.0597	2046.1361	-0.0764	0	R.LVTLISQQATLLASNEAFK.K
168-182	1714.8750	1713.8677	1713.8533	0.0144	1	K.LDVGNAEVKLEEENR.S

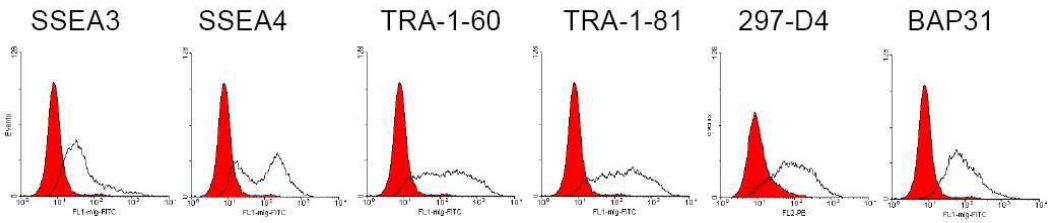
gi|15680023 (BAP31)

```
  1 MSLQWTAVAT FLYAEVFVVL LLCIPFISPK RWQKIFKSRL VELLVSYGNT
 51 FFVVLIVILV LLVIDAVREI REYDDVTEKV NLQNNPGAME HFHMKLFRAQ
101 RNLYIAGFSL LLSFLLRRLV TLISQQATLL ASNEAFKKQA ESASEAAKKY
151 MEENDQLKKG AAVDGGKLDV GNAEVKLEEE NRSLKADLQK LKDELASTKQ
201 KLEKAENQVL AMRKQSEGLT KEYDRLLEEH AKLQAAVDGP MDKKEE
```

도면11



도면12



도면13

```
HC 297-D4 subgroupⅡB
GAA GTC CAG CTG GAG GAG TCA GGA CCT GGC CTG GTG AAA CCT TCT CAG TCT CTG TCC
Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser
                          CDR1
CTC ACC TGC ACT GTC ACT GGC TAC TCA ATC ACC AGT GAT TAT GCC TGG AAC TGG ATC
Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile
                                                  CDR2
CGG CAG TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAG TGG ATG GGC TAC ATA AGC TAC AGT GGT AGC
Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser

ACT AGC TAC AAC CCA TCT CTC AAA AGT CGA ATC TCT ATC ACT CGA GAC ACA TCC AAG
Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys

AAC CAG TTC TTC CTG CAG TTG AAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCC ACA TAT TAC
Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
               CDR3
TGT GCA AGA TCG GAT TAT TAC GGT AGT ACC TAC TGG CAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA
Cys Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Trp His Phe Asp Val Trp Gly Ala

GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT - 393
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr - 131
```

도면14

```
LC 297-D4 subgroupⅢ
GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTA GCT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala
                    CDR1
ACC CTC TCA TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT TCA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC
Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
                                                                    CDR2
TGG AAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AGA CTC CTC ATC TAT CTT GTA TCC AAC
Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn

CTA GAA TCT GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC
Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                                                          CDR3
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAC ATT
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile

AGG GAG CTT CCG TGG ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT
Arg Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
GCT GCA CCA ACT GTA TCC - 360
Ala Ala Pro Thr Val Ser - 120
```

서 열 목 록

<110> Industry-Academia Cooperation Group Of Sejong University

<120> Monoclonal antibody 297-D4 specific to undifferentiated human embryonic stem cell

<130> DP-2011-0300

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 131

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45
Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Trp His Phe Asp Val Trp

100 105 110
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
115 120 125
Ser Val Tyr
130

<210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg

85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser

115 120

<210> 3

<211> 393

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

gaagtccagc tggaggagtc aggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60

acctgcactg tcactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag 120

tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagct acagtggtag cactagctac 180

aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240

ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagatcggat 300

tattacggta gtacctactg gcacttcgat gtctggggcg cagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctcagcca aaacgacacc cccatctgtc tat 393

<210> 4

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60

ctctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt tcatctggct atagttatat gcactggaac 120

caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 180

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttccgtgg 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 360

360

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

ggagtcgaca tagacagatg ggggtgtcgt tttggc 36

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

gcggcggccg csargtnmag ctgsagsagt c 31

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 7

gcggcggccg csargtnmag ctgsagsagt cwgg 34

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 8

ggtgtcgacg gatactacag ttggtgcagc atc 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 9

cggaagcttg ayattgtgmt sacmcarwct mca 33

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

cggaagcttg acattgtgct gacccaatct ccagcttct 39

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

cggaagcttg acattcagct gacccagtct cca 33