(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0062506
(43) 공개일자 2015년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0147233
(22) 출원일자 2013년11월29일
심사청구일자 2014년10월22일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
국립암센터
경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)
(72) 발명자
류춘제
서울 강남구 선릉로 221, 204동 203호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
김지예
충남 천안시 서북구 봉서7길 13, 107동 702호 (쌍용동, 일성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

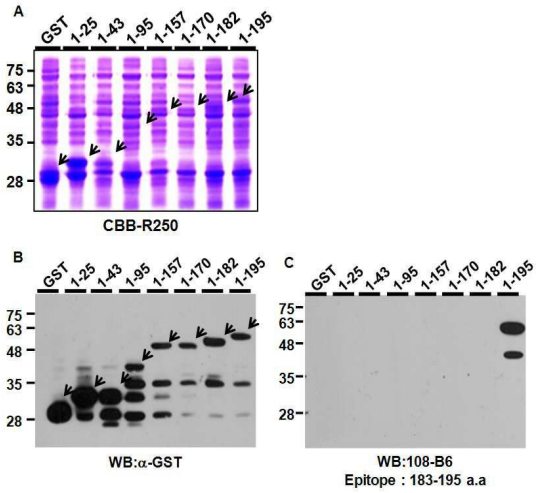
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **인간배아줄기세포와 암세포 표면의 PGRMC1을 인식하는 단일클론항체 108-B6**

(57) 요 약

본 발명은 인간배아줄기세포와 암세포 표면의 PGRMC1을 인식하는 단일클론항체 108-B6에 관한 것으로서, 구체적으로는 인간배아줄기세포와 암세포 표면에 발현하는 PGRMC1의 카복실 말단 (Carboxyl-terminal) 부위를 인식하는 단일클론항체 108-B6과 상기 단일클론항체 108-B6을 생산하는 하이브리도마, 상기 단일클론항체 108-B6을 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포 제거용 조성물 및 상기 단일클론항체 108-B6을 포함하는 검정키트를 제공한다. 또한, 시료 내에서 단일클론항체 108-B6을 이용하여 PGRMC1 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법 및 PGRMC1 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 108-B6을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다. 구체적으로 상기 암은 뇌암, 신경아세포종, 폐암, 간암 또는 배아암인 것을 특징으로 한다.

대 표 도 - 도13



(72) 발명자

최홍서

서울 광진구 능동로27가길 20, (군자동)

장희진

서울특별시 서초구 고무래로 35, 102동 2401호(반포동,반포리체아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2006-2004097
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업
연구과제명 줄기세포 niche에서 E1B-AP5-like 단백질의 기능연구
기 여 율 1/2
주관기관 세종대학교 산학협력단
연구기간 2012.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013K000272
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신기술융합형성장동력사업
연구과제명 단일클론항체를 이용한 혈중암세포 특이적 표면분자 발굴 및 분석
기 여 율 1/2
주관기관 세종대학교 산학협력단
연구기간 2011.07.01 ~ 2016.06.30

명 세 서

청구범위

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 108-B6.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단일클론항체는 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하고 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않는 것을 특징으로 하는 단일클론항체 108-B6.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단일클론항체는 IgG1.κ 아이소타입이며, 미분화 인간 배아줄기세포 프로게스테론 수용체 막 성분 1(Progesterone Receptor Membrane Component 1; PGRMC1) 단백질을 인식하는 것을 특징으로 하는 단일클론항체 108-B6.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 단일클론항체는 세포 표면의 PGRMC1 단백질의 카복실말단 아미노산 183-195 부위를 인식하는 것을 특징으로 하는 단일클론항체 108-B6.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일클론항체 108-B6을 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기세포 제거용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일클론항체 108-B6을 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기세포의 검정 키트.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일클론항체 108-B6을 세포군에 가하는 단계; 및

상기 단일클론항체 108-B6과 결합하는 세포를 상기 단일클론항체 108-B6과 결합하지 않는 세포로부터 분리하는 단계;를 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포를 분리하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일클론항체 108-B6 또는 그의 항원 결합 부위를 생산하는 하이브리도마.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단일클론항체 108-B6을 코딩하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 108-B6 cDNA.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 cDNA는 중쇄 가변 영역(VH)을 코딩하는 서열번호 3의 염기서열 및 경쇄 가변 영역(VL)을

코딩하는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 108-B6 cDNA.

청구항 11

시료 내에서 단일클론항체 108-B6을 이용하여 PGRMC1 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 시료는 혈청인 것을 특징으로 하는 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 암은 뇌암, 신경아세포종, 폐암, 간암 또는 배아암인 것을 특징으로 하는 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 14

PGRMC1 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 108-B6을 포함하는 암 진단용 키트.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암은 뇌암, 신경아세포종, 폐암, 간암 또는 배아암인 것을 특징으로 하는 암 진단용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간배아줄기세포 및 암세포에서 표면 항원으로 사용되는 프로게스테론 수용체 막 성분 1(Progesterone Receptor Membrane Component 1; PGRMC1) 카복실 말단에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 108-B6 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 존재한다. 이 세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 재생(self renewal)이라는 세포 분열에 의해 자신과 동일한 세포를 무한히 생산할 수 있으며, 다양한 환경 또는 분화 자극에 의해 우리 몸의 모든 기능성 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency) 특징을 나타낸다. 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. 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. 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, 세포치료제에 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 핵심적인 세포 내부 전사인자인 Oct4, Nanog, Sox2는 생쥐와 인간에서 종간에도 잘 유지되어 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. 또한 생쥐는 BMP (Bone morphogenic protein)가 재생에 필수적이나 인간에서는 BMP가 오히려 분화를 촉진하는데 사용된다. 인간 배아줄기세포의 재생을 촉진하는 데 사용되는 성장인자는 bFGF (basic fibroblast growth factor)로서, 실제로 피더(feeder) 없이도 마트리젤™(MaTrigel)(BD Biosciences, Seoul, Korea)과 bFGF 포함 배지만으로 인간 배아줄기세포를 시험관 내에서 배양할 수 있다. DNA 마이크로어레이(microarray)를 통한 전체 유전자 발현 분석결과에서도 인간의 배아줄기세포의 줄기세포성(Stemness)을 유지하기 위한 유전자 풀(pool)이 생쥐의 그것과 차이가 있다는 것을 알 수 있다.

[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 SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81등에 대한 항체들을 사용하고 있다. 그리고 이들 항원 중 인간에서는 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81가 모두 발현하고 SSEA-1은 발현하지 않으나, 생쥐에서는 반대로 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81가 모두 발현하지 않고 SSEA-1만 발현하는 현저한 차이가 있다. 그리고 이런 항체들에 의해서 정의되는 분자들은 대부분 탄수화물 항원성 부위(epitope)를 가지고 있어 그 기능이 여전히 알려지고 있지 않다. 그리고 최근 결과에 따르면 오랫동안 전분화능의 주요 마커로 사용되어온 SSEA-3, SSEA-4가 실제로 전분화능과 무관한 단순 외부 항원이라는 연구 결과가 나오기도 하여 여전히 그 기능이 확실하지 않다. 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. 최근에는 세포표면의 IGF1R, ERBB2, EpCAM이 미분화 인간 배아줄기세포의 생존과 재생에 중요한 새로운 후보 분자로 새롭게 보고되었지만, 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. 유도만능줄기세포 등장으로 세포치료에서 면역거부반응문제는 빠르게 해결될 것으로 전망되지만, 유도만능줄기세포도 배아줄기세포와 유사하며 실제로 배아줄기세포처럼 면역결핍 생쥐에서 기형종(teratoma)을 형성하는 것으로 알려졌다. 따라서 유도만능줄기세포를 이용한 줄기세포 치료제 개발에서도 최대 장애물도 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 꼭 필요하다.

[0007] 암세포 특이적 표면항원 발굴 연구는 암의 진단 및 고효율 저부작용의 항암제 개발에 필수적이지만 오랜 연구에도 실제 이용되는 암 특이 항원은 많지 않아 정확하고 효율적인 암의 진단 및 치료를 위해 암세포 특이적 표면항원 발굴을 위한 새로운 전략의 연구가 필요하다. 최근 암의 근본원인으로 암줄기세포가 뇌, 전립선, 대장, 췌장, 폐, 피부, 간암 등 많은 고형암에서 발견된 후, 암의 근본 치료법으로 암줄기세포를 타겟하는 암 줄기세포 특이적 마커를 이용하려 하지만 암 줄기세포 자체는 아주 희소하고 마커가 불확실해 분리하기 쉽지 않음으로 다른 대안이 필요하다.

[0008] 2009년 코네티컷대 Zihai Li 교수팀은 인간배아줄기세포를 면역 주사한 생쥐에서 대장암세포를 주사하면 주입한 대장암에 대한 T 세포 면역과 항체면역반응이 유도되며 자가 면역질환 없이 대장암 발생을 억제한다는 것을 밝혔으며, 루이스빌대의 John Eaton 교수팀은 2012년 생쥐배아줄기세포를 면역 주사한 생쥐에 폐암세포를 주사하거나, 발암물질로 폐암을 유도해도 폐암에 걸리지 않음을 보고하였는데, 이런 내용은 배아줄기세포 어떤 항원들이 암세포의 표면 항원처럼 암 발생 억제를 위한 항원으로 작용할 수 있다는 것을 증명하는 것으로, 인간배아줄기세포 표면항원을 발굴하면 암줄기세포 마커 발굴에 이용할 수 있다는 것을 제시한다. 실제로 암세포와 인간배

아줄기세포 같은 만능줄기세포는 높은 증식 능력, 자가 재생산, DNA 복구 체크포인트 유리(DNA repair checkpoint uncoupling), 다양한 세포 분화능력 등에서 유사하며 유전자 네트워크가 서로 아주 유사하게 보존되어있다. 따라서 인간배아줄기세포를 암세포 표면항원 발굴을 위한 면역 항원으로 사용하여 새로운 암 표면항원을 발굴할 수 있을 것이다. 구체적으로 인간배아줄기세포를 이용할 경우 장점으로는 인간배아줄기세포는 대량배양가능하고, 미분화마커가 확실해서 분화단계별 항체들을 분리하는 것이 가능하고, 암 줄기세포와 유전적으로 거의 동일하며, 진짜 암 줄기세포는 배아줄기세포 마커를 발현하는 것 등이 있다. 또한 배 발생 동안 발현하다 성체에서 더 이상 발현하지 않고 암 발생시 다시 발현하여 암의 진단이나 치료용 타겟으로 개발되고 있는 종양태아항원(Oncofetal antigen)인 Cripto, EpCAM, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81등은 이미 인간배아줄기세포의 미분화 마커로 쓰이고 있다.

[0009] 세계 바이오 마커 시장은 2011년 131.6억 달러이며 2018년에는 297.8억 달러에 이를 것으로 추정되며 현재 암 바이오 마커가 최대 시장을 형성하고 있다 (http://www.transparencymarketresearch.com/cancer-biomarkers-market.html). 프로게스테론 수용체 막 성분 1(Progesterone Receptor Membrane Component 1; PGRMC1)은 프로게스테론 (progesterone, P4) 결합단백질로 처음 알려졌다. 1996년 이 단백질은 돼지 간 microsomal membrane에서 분리되었고 아미노산 서열이 밝혀지고 유전자가 클로닝 되었다. PGRMC1은 분자량 ~28 kDa로 짧은 N-terminal extracellular domain, single trans-membrane domain, 그리고 긴 cytoplasmic domain으로 구성되어 있으며 주로 소포체막에 존재하는 것으로 알려져 있다. 그 외에도 PGRMC1은 endoplasmic reticulum, golgi apparatus, inner acrosomal membrane, plasma membrane, 그리고 nucleus등 다양한 위치에 존재 한다. PGRMC1은 또한 cytochrome b_5 related protein으로 세포 증식을 조절하며 carcinogen에 의해 유도되는 것으로 알려졌다. 실제로 PGRMC1 발현은 ovarian, breast, lung cancer에서 높게 유지된다.

[0010] 한편 σ2 receptor는 원래 마약류인 N-allylnormetazocine의 수용체로 처음 존재가 제안된 다음, Hellewell와 Bowen에 의해 rat adrenal pheochromocytoma cell에서 유래된 PC12세포에서 처음 확인되었다. 그 후 σ2 receptor는 사람과 생쥐의 다양한 암세포에서 발현하는 것이 관찰되었다. PGRMC1과 σ2 receptor 두 단백질은 2011년에 처음으로 같은 단백질임이 밝혀졌다. PGRMC1 발현은 증식상태 암세포에서 정지 상태 때보다 10배 이상 높은 것으로 알려졌으며, 많은 암세포에서 과발현하며 활발히 분열하는 암세포의 바이오마커로 평가된다. 또한 최근 연구 결과는 PGRMC1이 폐암세포에서 분비되어 혈장과 혈장의 Exosome 분획에서 존재하여 폐암의 혈청 바이오 마커임을 알 수 있다. PGRMC1을 암의 진단이나 치료를 위해 지금까지 PGRMC1에 결합하는 저분자를 이용하여 형광으로 이미징하는 방법이 이용되고 있으나, 특이성이 낮은 문제점이 있어 세포표면의 PGRMC1을 높은 특이성으로 인식하는 항체가 있다면 암 진단을 위한 좋은 도구로 이용할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 10-1078217 (2009.12.02 공개)

(특허문헌 0002) 2. 한국등록특허 10-1302711 (2009.04.07 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하나 미분화 생쥐 배아줄기세포나 분화 유도한 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않는, 미분화 인간 배아줄기세포 표면의 프로게스테론 수용체 막 성분 1(Progesterone Receptor Membrane Component 1; PGRMC1) 단백질을 인식하는 단일클론항체 108-B6을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포 검정 키트를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 사용하여 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 시료 내에서 단일클론항체 108-B6을 이용하여 PGRMC1 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 뇌암, 신경아세포종, 폐암, 간암 또는 배아암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 PGRMC1 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 108-B6을 포함하는 뇌암, 신경아세포종, 폐암, 간암 또는 배아암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 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 미분화상태의 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.

[0020] 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 108-B6 항체가 인간배아줄기세포 표면의 PGRMC1 단백질을 인식하고 기존 알려진 항체와 다른 특성을 보이는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0021] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 108-B6을 제공한다.

[0022] 본 발명은 상기 단일클론항체가 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하고, 분화된 인간 배아줄기세포 또는 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않는 특징을 나타낸다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체가 미분화 인간 배아줄기세포의 약 28 kDa 단백질을 인식하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체가 IgG1.κ 아이소타입이며, 미분화 인간 배아줄기세포 PGRMC1 단백질을 인식하는 것을 특징으로 한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체가 세포 표면의 세포 표면의 프로게스테론 수용체 막 성분 1(Progesterone Receptor Membrane Component 1; PGRMC1)의 카복실 말단 183-195 아미노산을 인식하는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명에서 용어 "단일클론항체"란 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)에 대해서 지시되어 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 본 발명의 단일클론항체는 미분화 상태인 인간 배아줄기세포의 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하므로, 미분화된 인간 배아줄기세포의 세포표면 분자를 인식하는 단백질 분자이다.

[0027] 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 단편들을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), $F(ab')_2$ 및 Fv 등이 있다.

[0028] 본 발명의 108-B6이 인식하는 단백질은 PGRMC1로서 프로게스테론 결합 단백질 (progesterone binding protein)으로 알려졌다. PGRMC1은 최근에 opioid receptor인 sigma-2 receptor로써 동정되었고 증식하는 암세포에서 많이 발현되는 단백질로 알려졌다. 따라서 암 발달을 진단할 수 있는 바이오 마커로써 충분한 가능성이 있는 핵심 단백질이다.

[0029] 또한, 본 발명은 단일클론항체 108-B6을 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간배아줄기세포 제거용 조성물을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 단일클론항체 108-B6을 가하여 미분화 인간 배아줄기세포를 분리하는 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 단일클론항체는 세포치료를 위해 이식될 세포 중에 존재하는 배아줄기세포를 제거하거나, 이식된 세포 중에 존재하는 배아줄기세포를 제거하기 위해 사용될 수 있다.

[0032] 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.

[0033] 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 임상적 기술을 사용하여 최적화할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 단일클론항체 108-B6을 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기세포의 검정키트를 제공한다.

[0035] 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.

[0036] 본 발명의 단일클론항체는 또한 항원-항체 복합체 반응을 통해 분열하는 배아암, 뇌암, 폐암, 신경아세포종, 간암세포를 이미징하여 특이적으로 검출하기 위해서도 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 단일클론항체는 또한 항원-항체 복합체 반응을 통해 배아암, 뇌암, 폐암, 신경아세포종, 간암 환자 혈청에 유리되는 PGRMC1을 검출하여 암을 진단하는 검정 키트에도 사용될 수 있다.

[0038] 이러한 검정 키트에는 본 발명의 단일클론항체뿐만 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.

[0039] 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 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0040] 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) 등이 있으며 이로 제한되지 않

는다.

[0041] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로 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_4 W(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.

[0042] 또한, 본 발명은 단일클론항체 108-B6 또는 그의 항원 결합 부위를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.

[0043] 본 발명은 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 발현할 수 있는 마우스로부터 단리된 B세포를 제공한다. 바람직하게는, 단리된 B 세포는 정제된 미분화 인간 배아줄기세포 또는 상기 세포가 풍부한 제제를 사용하여 면역화된 마우스로부터 얻는다. 계속하여 단리된 B세포를 불멸화함으로써 미분화 인간 배아줄기세포에 대한 단일클론항체의 공급원을 제공한다.

[0044] 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마는 이를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.

[0045] 상기한 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액(ascites fluid)으로부터 분리될 수 있다.

[0046] 본 발명의 구체적 실시예서는 본 발명의 단일클론항체의 대량 생산을 위해 하이브리도마를 배양하고 하이브리도마 배양액을 단백질 G-세파로스(sepharose) 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체 108-B6을 코딩하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 108-B6 cDNA를 제공한다.

[0048] 상기 cDNA는 중쇄 가변 영역(VH)을 코딩하는 서열번호 3의 염기서열 및 경쇄 가변 영역(VL)을 코딩하는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0049] 또한, 본 발명은 시료 내에서 단일클론항체 108-B6을 이용하여 PGRMC1 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 시료는 혈청이 바람직하지만, 이제 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 암은 뇌암, 신경아세포종, 폐암, 간암 또는 배아암이 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 또한, 본 발명은 PGRMC1 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 108-B6을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다. 상기 암은 뇌암, 신경아세포종, 폐암, 간암 또는 배아암이 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0051] 본 발명의 단일클론항체 108-B6은 미분화 생쥐배아줄기세포에는 결합하지 않고 인간 배아줄기세포의 세포표면 단백질을 특이적으로 인식하므로, 생쥐와 고등동물인 인간의 초기 배 발달의 차이를 연구할 수 있는 도구를 제

공하여 인간 배아줄기세포의 분석 연구에 이용할 수 있으며, 세포 치료시 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 또한 분열하는 배아암, 뇌암, 폐암, 신경아세포종, 간암세포를 이미징하여 특이적으로 진단하기 위해서도 사용될 수 있고 상기 암환자 혈청에 유리되는 PGRMC1을 검출하여 암을 진단하는 검정 키트에도 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1A는 배양중인 미분화 인간 배아줄기세포인 H9의 형태를 현미경으로 관찰한 것이다.

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

도 2A는 플로우 사이토미트리(Flow cytometry) 분석을 통하여 미분화 인간 배아줄기세포의 미분화 마커인 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81은 양성이고 분화마커인 SSEA-1은 음성인 것을 보여준 그림이다.

도 2B는 플로우 사이토미트리 분석을 통하여 20일 이상 레티노산으로 분화시킨 인간 배아줄기세포에서 미분화 마커인 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81은 음성이고 분화 마커인 SSEA-1은 약하게 양성인 것을 보여준 그림이다 (실선은 각 단일클론항체이고, 짙은 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다).

도 3은 항체 108-B6을 하이브리도마 배양액에서 프로테인G 세퍼로스 칼럼 크로마토그래피(Protein G sepharose column chromatography)로 정제하여 12% SDS-PAGE로 분석한 그림 쿠마시 겔-염색 (도3 왼쪽)과 웨스턴블랏팅 (도3 오른쪽)으로 Heavy chain(중쇄), light chain(경쇄)를 화살표로 나타낸 것이다.

도 4는 플로우 사이토미트리 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 108-B6이 인간배아줄기세포 (H9, H1), 인간배아 암세포 (NT-2/D1, NCCIT), mESCs (R1, E14Tg2a.4), MEF, 완전히 분화된 인간 정상세포 (PBMC, HDF)에 결합하는 정도를 보여주는 그림으로 H9과 인간배아암세포에 잘 결합하지만, 피더(feeder)인 MEF와 생쥐배아줄기세포에는 결합하지 않는 것을 보여 준다(이때, 실선은 단일클론항체이고 검은 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이다).

도 5는 108-B6 항체와 기존 미분화 인간배아줄기세포 표면마커로 알려진 SSEA-3, TRA-1-81 항체와 이중 플로우 사이토미트리를 수행하면 SSEA-3, TRA-1-81 항체 양성인 세포들의 71.7, 72.5% 이상에서 같이 양성임을 보여주는 그림이다.

도 6은 108-B6 항체와 기존 미분화 인간배아줄기세포 전분화능 마커로 알려진 OCT4, SOX2 항체와 세포 내 이중 플로우사이토미트리를 수행하면 OCT4, SOX2 항체 양성인 세포들의 88.5, 80.8% 이상에서 같이 양성임을 보여주는 그림이다.

도 7은 108-B6이 미분화줄기세포에는 잘 결합하지만 레티노산을 처리하여 분화가 유도된 배아줄기세포에는 그 결합이 현저히 감소한다는 것을 보여주는 것이다. 분화가 유도된 배아줄기세포는 인간 미분화 줄기세포 마커인 TRA-1-81항체 결합의 감소로 보여주었다.

도 8은 미분화 인간 배아암세포(NT-2/D1) 표면을 바이오틴화(biotinylation)한 후에 단일클론항체 108-B6을 사용하여 면역 침강시킨 후에 침강된 단백질을 12% SDS-PAGE에서 분석하여 (오른쪽) 다시 웨스턴 블라팅으로 PVDF 막으로 옮기고 거기서 스트렙타비딘-HRP (SA-HRP)로 분석한 그림으로 항체를 빼고 똑같은 실험을 한 것을 음성 대조군 (No Ab)으로 한 것이다.

도 9는 본 발명의 단일클론항체 108-B6이 인식하는 항원을 매스 스펙트럼에서 확인하였을 때의 펩타이드 매스 핑거프린팅(peptide mass fingerprinting; PMF) 리스트로서 각 펩타이드가 실제 PGRMC1 단백질 아미노산 서열의 어디에 해당되는지 밑줄로 표시한 그림이다.

도 10은 단일클론항체 108-B6이 PGRMC1 단백질을 인식하여 면역 침강시키는 지 확인하기 위해 인간 배아 암세포 NT-2/D1 (위 패널) 또는 인간 미분화 배아줄기세포 H9 (아래 패널) 세포 추출물을 단일클론항체 108-B6과 공지의 항-PGRMC1로 면역 침강시킨 후에 침강된 단백질을 12% SDS-PAGE에서 분리 후 PVDF 막으로 옮기고 거기서 공지의 항-PGRMC1 항체나 108-B6으로 다시 웨스턴 블랏팅을 수행한 그림으로 항체를 빼고 똑같은 실험을 한 것을 음성 대조군 (No Ab)으로 하였다.

도 11은 단일클론항체 108-B6이 PGRMC1 단백질을 인식하는지 재확인 하기위해 HEK-293T세포에 pCMV-sport6-PGRMC1 발현벡터를 트랜스펙션 시킨 후 PGRMC1이 과 발현된 HEK-293T세포 추출액을 12% SDS-PAGE에서 분리 후 PVDF 막으로 옮기고 거기서 공지의 항-PGRMC1항체나 108-B6으로 웨스턴 블랏팅을 수행한 그림으로 빈 벡터인

pcDNA3.1+이나 HSPA8을 발현하는 pCMV-sport6-HSPA8 벡터를 트랜스펙션 시킨 세포로 똑같은 실험을 한 것을 음성 대조군으로 하였다.

도 12는 PGRMC1의 아미노산 말단을 인지하는 단일클론항체 항-PGMRC1 (C-3)항체와 또 다른 다클론 항체 항-PGMRC1 (G-21)와 108-B6이 미분화 인간줄기세포 표면에 결합정도를 보여주는 그림으로, 기존 문헌정보와 다르게 항-PGRMC1 (C-3)항체나 항-PGRMC1(G-21) 항체는 결합하지 않지만 108-B6은 인간 미분화줄기세포 표면에 잘 결합함을 보여준다.

도 13은 108-B6이 PGRMC1의 어느 부위를 인식하는지 에피토프를 결정한 실험으로 GST 유전자와 연결된 연속적으로 잘려진 7개의 PGRMC1 유전자를 형질 전환시킨 박테리아에 발현을 유도하여 단백질을 모았다. 모은 단백질은 12% SDS-PAGE에서 분리 후 CBB-R250으로 염색하거나 (A), PVDF막으로 옮기고 거기서 공지의 항-GST 항체로 웨스턴 블랏팅하여 단백질의 발현유도가 되었음을 확인하였고 (B), 108-B6으로 웨스턴 블랏팅한 결과 PGRMC1의 아미노산 서열 183번부터 195번까지 인식함을 (C) 보여준다.

도 14는 플로우 사이토미트리 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 108-B6이 다양한 인간암세포 (MDA-MB435, ACHN, U87-MG, SH-SY5Y, HEK-293T, Colo205, HepG2, NCI-H69, A549) 에 결합하는 정도를 보여주는 그림으로 U87-MG, SH-SY5Y, HEK-293T, HepG2, NCI-H69, A549 암세포 표면에 결합하는 것을 보여준다 (이때, 실선은 단일클론항체이고 검은 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이다).

도 15는 108-B6 항원이 인간 간 암세포인 HepG2 세포 표면에 발현함을 면역세포화합요법을 수행하여 보여주는 그림이다. 이는 단일클론항체 108-B6이 암 이미징 진단 마커로써의 가능성을 보여준다.

도 16은 108-B6 항체 중쇄 유전자 가변영역(V_H)의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)과 중요 아미노산의 잔기 위치를 표시한 그림이다.

도 17은 108-B6 항체 경쇄 유전자 가변영역(V_L)의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)과 중요 아미노산의 잔기 위치를 표시한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0054] **<실시예 1> 인간 배아줄기세포의 배양 및 분화유도**

[0055] **<1-1> 배아줄기세포의 배양 및 레티노산 처리에 의해 분화된 배아줄기세포 유도**

[0056] 인간 배아줄기세포 H1과 H9은 위스콘신대학 연구소(Wicell Research institute)에서 구입하여 제시한 프로토콜에 따라 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 H9를, 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), 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.

[0057] 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 뚜렷

하던 모습이 사라지고 세포가 전체적으로 넓게 퍼지는 것을 관찰할 수 있다(도 1B). 마우스 배아줄기세포 J1은 방사선 처리된 MEF 상에서 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)에서 구입하고 생쥐배아줄기세포도 ATCC에서 구입하여 제공된 프로토콜대로 배양하였다.

[0058] **<1-2> 플로우 사이트미트리에 의한 세포표면 항원염색**

[0059] 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,Invitrogen) 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-SSEA-1, 항-SSEA-3, 항-SSEA-4, 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 분석하였다. 미분화 인간 배아줄기세포 H9 세포가 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81에서 양성이고 SSEA-1에서는 음성임을 보여주고 있고(도 2A), 레티노산으로 분화를 유도한 H9 세포는 반대로 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81에서 음성이고 SSEA-1에서는 약하게 양성임을 보여주고 있다 (도 2B).

[0060] **<실시예 2> 하이브리도마 제조**

[0061] **<2-1> 인간 배아줄기세포의 면역주사**

[0062] 인간 배아줄기세포 H9 세포를 20일 동안 레티노산처리하여 분화된 H9 세포를 준비하였다. 미분화 H9 세포와 분화된 H9 세포에 1mg/㎖ 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 FO 세포(ATCC)를 혈청 비첨가 배지로(serum-free media) 세척한 후, 40㎛ 세포 스트레이너를 이용하여 오금 림프절 세포와 FO 세포의 잔해물을 제거하였다. 미분화 H9 세포를 찌른 왼쪽 림프절 세포(1.53 x 10^8)와 FO 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.

[0063] **<2-2> 하이브리도마의 클로닝**

[0064] 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 70종의 하이브리도마군을 선발하였다. 항체 70종의 아이소타입은 마우스 이뮤노글로불린 아이소타이핑 키트(Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit, BD Biosciences)에서 제시한 방법을 이용하여 수행하여 결정하였다. 대부분 IgG 형태이고 4개는 IgM 형태였다. 이들 중 항체 108-B6은 IgG1과 κ사슬를 가진 항체로 본 발명에서 인식 항원과 특성을 분석하였다.

[0065] **<2-3> 단일클론항체의 정제**

[0066] 108-B6 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 배양액{DMEM, 20%의 FBS(Fetal bovine serum, Hyclone), 100U/㎖의 안티바이오틱 안티마이코틱 솔루션} 에서 108-B6 항체를 형성할 수 있도록 2일 간격으로 계대배양하면서 배양액을 모았다. 4~5회 정도의 계대배양을 하면서 모은 약 500ml의 배양액을 사용하여 항체를 정제하였다. 이 항체의 순수 분리를 위해서 단백질 G-세파로스 컬럼 크로마토그래피 방법으로 분리하였다. PBS로 미리 평형화시킨 단백질 G-세파로스 컬럼(GE healthcare, Seoul, Korea)에 배양액을 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. 정제된 항체는 12% SDS-PAGE을 이용하여 분리한 후, 코마시 블루-겔 염색(Coomassie Blue gel staining)과 웨스턴 블랏팅을 이용하여 항체 108-B6의 정제양상을 확인하였으며 순수하게 분리되었음을 알 수 있었다(도 3). 배양액 500ml당 약 2~3㎎/㎖ 농도의 정제된 항체를 얻을 수 있었다.

[0067] **<실시예 3> 단일클론항체 108-B6의 결합 특이성 분석**

[0068] **<3-1> 인간 및 생쥐 배아줄기세포와 각종 세포에 대한 결합 특이성**

[0069] 단일클론 항체 108-B6의 각종세포에 대한 결합정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토미트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 먼저, 미분화된 인간배아줄기세포 H9, H1을 콜라겐분해효소 IV(1㎎/㎖)를 이용하여 15~20분 동안 처리해서 세포를 떼어냈다. PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후, 세포 분리완충액(Invitrogen)을 넣고 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 단일세포로 분리하기 위해 40㎛ 스트레이너(BD Biosciences)를 통과시켰다. 그리고 생쥐배아줄기세포(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 108-B6을 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, FACS Calibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 도 4에서 실선은 단일클론항체 108-B6이고 채워진 회색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 단일클론항체 108-B6이 인식하는 표면항원은 미분화 상태의 인간배아줄기세포인 H1, H9에서는 잘 발현되고 또한, 인간배아줄기세포와 유사한 외부 표면항원을 가진 인간 배아암세포인 NT-2/D1, NCCIT에 잘 결합하였다. 하지만 생쥐배아줄기세포(R1, E14Tg2a.4), 생쥐배아섬유아세포(MEF), 인간 PBMC, HDF 세포에는 결합하지 않음을 볼 수 있었다(도 4).

[0070] **<3-2> 단일클론항체 108-B6 항원과 공지의 미분화 인간 배아줄기세포 표면항원과의 공동 발현 분석**

[0071] 단일클론항체 108-B6과 기존에 알려진 전분화능 미분화 인간배아줄기세포 표면 마커들과의 관계를 조사하기 위하여 다음의 플로우 사이토미트리에 사용하였다. 세포를 먼저 상기 실시예 <1-2>와 같이 준비한 후 108-B6을 4℃에서 30분 반응시킨 후 PE-결합 항-마우스 IgG 항체로 1차 항체에 맞게 30분 더 반응시켰다. PBA로 세척한 후

에 세포는 항-TRA-1-81, 항-SSEA-3, (Chemicon, Temecula, CA) 항체로 각각 4℃에서 30분 반응시킨 후 FITC-결합 항-마우스 IgM 또는 항-렛 IgM (BD Biosciences) 항체로 1차 항체에 맞게 30분 더 반응시켰다. 세척 후에 PI-음성 세포만을 FACSCalibur (BD Biosciences)와 Cell Quest 소프트웨어(BD Biosciences)로 분석하였다. SSEA-3와 TRA-1-81이 양성인 세포의 각각 71.7, 72.5%가 단일클론항체 108-B6 양성반응을 보였다(도 5). 또한 108-B6을 미분화 인간줄기세포 전분화능 마커들과의 관계를 조사하기 위해 세포 내부 플로우 사이토미트리에 사용하였다. 108-B6을 4℃에서 30분 반응시킨 후 PE-결합 항-마우스 IgG 항체로 1차 항체에 맞게 30분 더 반응시켰다. PBA로 세척한 후에 2% PFA에 4℃에서 15분 동안 세포 고정을 시킨 후 PBA로 세척한 후 0.5% 사포닌(saponin)을 넣고 4℃에서 15분 동안 세포 표면에 구멍을 내었다. PBA로 세척한 후에 세포는 항-OCT4, 항-SOX2, (Chemicon, Temecula, CA) 항체로 각각 4℃에서 30분 반응시킨 후 Alexa 488-항-레빗 IgG (BD Biosciences) 항체로 1차 항체에 맞게 30분 더 반응시켰다. 세척 후에 FACSCalibur (BD Biosciences)와 Cell Quest 소프트웨어(BD Biosciences)로 분석하였다. OCT4와 SOX2가 양성인 세포의 각각 88.5, 80.8%가 단일클론항체 108-B6 양성반응을 보였다(도 6). 이런 결과는 기존의 미분화 인간배아줄기세포의 표면 마커와 전분화능 마커 양성인 대부분의 세포들이 108-B6 항원을 표면에 발현한다는 것으로 단일클론항체 108-B6 항원이 새로운 미분화 인간배아줄기세포 표면마커로 사용될 수 있다는 것을 말해준다. 그리고 레티노산으로 미분화 인간배아줄기세포의 분화를 유도한 후 108-B6 항원의 발현을 플로우 사이토미트리로 측정한 후 평균 형광 강도(mean fluorecent intensity)를 미분화와 분화 인간배아줄기세포에서 비교하였을 때 108-B6 항원 발현이 분화 인간배아줄기세포에서 약 50% 감소함을 관찰하여 108-B6 항원 발현이 미분화 인간배아줄기세포 특이적임을 다시 한 번 증명하였다(도 7).

[0072] **<실시예 4> 단일클론항체 108-B6이 인식하는 항원 동정**

[0073] **<4-1> 단일클론항체 108-B6이 인식하는 세포표면 단백질 분자의 확인**

[0074] 인간 배아암세포 NT-2/D1 세포 표면의 바이오틴 표지(biotinylation)는 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce)에서 제시한 프로토콜을 약간 수정하여 수행하였다. 100 밀리미터 세포배양 플레이트에 H9 세포를 배양한 후 37℃에서 미리 데워둔 PBS(pH 7.4)로 3회 세척한 후 바이오틴(0.1mg/ml)이 녹아있는 찬 PBS(pH 8.0) 5 밀리리터를 넣고, 4℃에서 20분간 반응시킨다. 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)에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위해서, 약 1 x 10^7 세포의 세포 용해물에 20㎕ 단백질-G-플러스 아가로스를 넣고 4℃에서 2시간동안 반응시킨 후 원심분리를 통해 그 단백질-G-플러스 아가로스를 회수하여 용해 완충액을 이용해 10회 세척한 샘플을 음성 대조군으로 사용하였다. 단일클론항체 108-B6에 의해 인식되는 항원을 면역침강하기 위해서 단백질-G-플러스 아가로스에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거한 세포 용해물에 각 항체 10㎍을 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 20㎕ 단백질-G-플러스 아가로스를 넣고 4℃에서 3시간 동안 더 반응시켰다. 면역 침강된 면역 혼합체를 용해 용액를 이용해서 10회 세척하고, 각 항체에 결합된 항원을 용출하기 위해 5X 샘플 완충액를 넣고, 100℃에서 5분간 가열했다. 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(streptavidin-horse radish peroxidase 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 108-B6은 약 28 kDa 단백질을 인간 배아암세포 추출액에서 면역 침강시키는 것을 확인하였다(도 8).

[0075] **<4-2> 단일클론항체 108-B6에 의해 면역 침강된 항원의 동정**

[0076] 단일클론항체 108-B6에 의해 면역침강된 단백질을 포함하는 SDS 젤을 인스탄트블루(InstantBlue™ staining solution; Expendeon, Cambridgeshire, UK)로 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 N2 레이저 조사에 의해 기화된 다음, 20Kv 인젝션 펄스에 의해 가속하였다. 300 레이저샷의 누적 피크에 의해 각각의 단백질 스팟에 대한 매스 스펙트럼을 구하였다. 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 PGRMC1(Progesterone Receptor Membrane Component 1)임을 확인하였다 (도9). 도 9의 밑줄 친 아미노산은 실제로 질량분석기를 통해 확인한 펩티드를 표시한 것으로 PGRMC1과 46개의 아미노산이 일치하는 것을 알 수 있다.

[0077] **<4-3> 동정된 108-B6 항원의 검증**

[0078] PGRMC1에 대한 항체가 이미 상업적으로 팔리고 있다. 토끼 다클론항체 항-PGRMC1 항체(G-21;Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 구입하여 단일클론항체 108-B6이 면역침강시킨 단백질을 인식하는지 확인하기 위해 인간 배아암종 NT-2/D1 또는 인간 배아줄기세포 H9 세포 추출액을 사용하여 면역침강과 웨스턴 블랏을 수행하였다. 단일클론항체 108-B6이 면역 침강시키는 항원의 웨스턴 블랏팅을 수행하기 위해서, 상기 실시예 <4-1>에서 서술한 용해 방법으로 바이오틴-표지 단계를 생략하고 NT-2/D1 세포에서 세포 추출액을 준비하였다. 이 NT-2/D1 세포 추출액을 상기 서술한 바와 동일하게 단일클론항체 108-B6과 항-PGRMC1 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 2시간 동안 블로킹을 하였다. 공지의 항-PGRMC1 (G-21) 항체를 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척 한 후, 항-토끼IgG-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 108-B6으로 면역 침강시킨 PGRMC1 단백질과 항-PGRMC1 항체에 의해 면역침강된 PGRMC1 둘 다 공지의 항-PGRMC1 항체에 의해 인식됨을 관찰할 수 있었다 (도 10 위 패널). 그리고 다시 상기와 동일하게 H9 세포 추출액을 사용하여 면역침강 후 108-B6 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (도 10 아래 패널). 이와 같이 단일클론항체 108-B6은 공지의 항체 항-PGRMC1 항체는 동일하게 PGRMC1을 인식함을 알 수 있다.

[0079] 이 사실을 좀 더 확인하기 위해, pCMV-sport6-PGRMC1 발현 벡터를 HEK-293T 세포에 트랜스펙션하여 PGRMC1을 과발현시켰다. HEK-293T 세포를 6-웰(well)의 조직배양용 플레이트(SPL, Seoul, Korea)에 웰당 7×10^5 세포수로 접종하여 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. pCMV-sport6-PGRMC1을 리포펙타민 2000 (Lipofectamine 2000, Invitrogen)을 이용하여 공급자의 프로토콜에 따라 트렌스펙션하였다. 이때, pcDNA3.1+과 HSPA8을 발현하는 pCMV-sport6-HSAP8 발현벡터는 음성대조군으로 사용하였다. 트렌스펙션 24시간 후, 찬 PBS(pH 8.0)로 3회 세척한 후 세포는 용해 완충액 (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% Doxycholic acid, 0.1% SDS, 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. PGRMC1이 과발현된 HEK-293T 세포 추출액은 12% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 PVDF 막으로 옮겼다. 단일클론항체 108-B6 또는 공지의 항-PGRMC1 (G-21) 항체를 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척 한 후, 항-마우스 또는 항-토끼IgG-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 pCMV-sport6-PGRMC1 발현 벡터에 의해 과발현된 PGRMC1이 음성 대조군의 PGRMC1보다 단일클론항체 108-B6 또는 항-PGRMC1 항체에 의해 더 많이 인식됨을 관찰할 수 있었다(도 11). 이때 항-β-actin 항체는 정량의 단백질 분석에 대한 대조군으로 사용되었다. 따라서 본 발명의 단일클론항체 108-B6은 미분화 인간배아줄기세포에 존재하는 PGRMC1단백질을 인식하는 항체임을 검증하는 것이다.

[0080] **<4-4> 단일클론항체 108-B6과 공지 PGRMC1 항체의 인간 배아줄기세포 표면에서의 발현 비교**

[0081] 단일클론항체 108-B6과 미분화 인간줄기세포 표면발현 PGRMC1 단백질을 인식하는지 확인하기 위해, PGRMC1의 아미노산 말단이 세포 밖에 노출되어있다는 기존 문헌정보를 참고하여 PGRMC1의 아미노산 말단을 인식하는 마우스 단일클론항체 항-PGRMC1(C-3, Santa Cruz, Santa Cruz, CA) 항체를 사용하여 플로우 사이토미트리 분석을 진행하였다(도 12). 미분화 인간배아줄기세포, H9 세포표면에 108-B6과 항-PGRMC1 (C-3)로 각각 4℃에서 30분 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 세포는 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC 4℃에서 30분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD Biosciences)를 이용하여 PI-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 도 12에서 실선은 단일클론항체이고 채워진 빨간색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 그 결과, 단일클론항체 108-B6이 미분화 상태의 인간배아줄기세포인 H9에 잘 결합하였지만, PGRMC1의 아미노산 말단 부위를 인식하는 공지의 마우스 단일클론항체는 결합하지 않았다. 그리고 토끼 다클론항체인 항-PGRMC1 (G-21)도 미분화 상태의 인간배아줄기세포인 H9에 결합하지 못함으로, 108-B6 항체만 미분화 인간배아줄기세포 표면발현 PGRMC1를 인식함을 알 수 있다(도 12).

[0082] **<실시예 5> 단일클론항체 108-B6의 미분화 인간배아줄기세포 표면발현 PGRMC1에 대한 항원부위결정 분석**

[0083] **<5-1> 연속적으로 잘려진 PGRMC1 유전자의 클로닝**

[0084] 단일클론항체 108-B6의 미분화 인간배아줄기세포 표면발현 PGRMC1에 대한 에피토프(Epitope)를 결정하기 위해, 195개의 아미노산으로 이루어진 PGRMC1의 유전자 정보를 참고하였다 (Genebank BC034238). 이를 토대로 pCMV-sprot6-PGRMC1 발현벡터로부터 서로 다른 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응에 의해 총 7개의 PGRMC1 돌연변이 유전자 (a.a 1-25, 1-43, 1-95, 1-157, 1-170, 1-182, 1-195)를 증폭시켰다. 중합효소연쇄반응 생산물의 효율적인 클로닝을 위하여 각 돌연변이 유전자의 경우는 3'-프라이머 말단에 XhoI 제한효소 자리를 부여하였고, 5'-프라이머 경우 EcoRI 제한효소자리를 부여하였다. 잘려진 유전자들은 GST (glutathione S-transferase) 유전자와 연결시키기 위해 pGEX4T-2 클로닝벡터에 삽입시켰고 완성된 GST-PGRMC1 플라스미드는 대장균 DH5α에 $CaCl_2$ 방법으로 형질전환한 다음, 각각 GST-PGRMC1 돌연변이 유전자들을 가진 대장균 클론들을 선발하였다. 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 50㎍/ml의 앰피실린(Ampicilin)이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA 미니프렙 키트(Intron사 한국)를 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 결정하였다.

[0085] **<5-2> 단일클론항체 108-B6 항원부위결정 분석**

[0086] 형질전환이 확인된 박테리아는 50 ㎍/ml 엠피실린이 들어간 5ml의 LB배지에 OD=600이 될 때까지 배양시키고 GST-PGRMC1 단백질 발현유도를 위해 0.1mM 이소프로필-1-티오-β-D-갈락토피라노시드(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside; IPTG)를 넣고 36℃에서 5시간 동안 배양했다. 다 자란 박테리아는 4℃, 3000 x g, 15분 원심분리하여 모아 PBS로 2회 세척하였다. 차가운 아세톤을 넣고 얼음에서 5분간 반응 시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 1% SDS을 실온에서 2분간 반응시킨 후 4℃ 12000 x g, 40분동안 원심분리히여 7개의 GST-PGRMC1 단백질을 각각 얻었다. 얻은 단백질은 12% SDS-PAGE를 이용하여 Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB-R250)으로 염색하여 분석 한 후 (도 13A), PVDF 막으로 옮겼다. 공지의 항-GST 또는 단일클론항체 108-B6을 넣고 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척한 후, 항-마우스-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 GST-PGRMC1 단백질 발현 유도가 잘 일어남 (도 13B)과 동시에 108-B6이 미분화 인간배아줄기세포 표면발현 PGRMC1의 아미노산 183번부터 195번까지를 인식함을 관찰할 수 있었다(도 13C). 이 결과는 108-B6이 미분화 인간배아줄기세포 표면발현 PGRMC1의 카복실 말단이 세포표면에 노출되었다는 사실과 표면 발현 PGRMC1을 108-B6이 인지함을 새롭게 증명한다.

[0087] **<실시예 6> 단일클론항체 108-B6을 이용한 다양한 암세포에서 PGRMC1 표면발현 분석**

[0088] **<6-1> 플로우 사이토미트리에 의한 다양한 암세포에서 PGRMC1 표면발현 분석>**

[0089] 단일클론 항체 108-B6의 각종 암세포에 대한 결합정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토미트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 유방암세포 (MDA-MB435), 뇌암세포(U87-MG), 신경아세포종 (SH-SY5Y), 신장암세포(ACHN), 배아 신장암 세포 (HEK-293T), 대장암세포(Colo205), 간암세포(HepG2), 소세포 폐암세포(NCI-H69), 비소세포 폐암세포

(A549)를 트립신을 이용하여 떼어냈고, PBS(pH 7.4)로 2번 세척한 후, 40㎛ 스트레이너를 이용하여 단일세포로 준비하였다. 각 단일세포를 ㎖당 약 2 x 10^5 개씩 PBA에 섞은 후, 항체 108-B6을 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, FACS Calibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD Biosciences)를 이용하여 PI-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 도 14에서 실선은 단일클론항체 108-B6이고 채워진 회색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 단일클론항체 108-B6은 뇌암 세포(U87-MG), 신경아세포종 (SH-SY5Y), 폐암세포(NCI-H69, A549), 간암세포(HepG2), 배아 신장암 세포 (HEK-293T)에 결합하여 이들 암세포에서는 PGRMC1이 세포표면에 발현함을 알 수 있다 (도 14).

[0090] **<6-2> 면역세포화학법에 의한 PGRMC1 발현 암세포의 이미지 분석**

[0091] 단일클론항체 108-B6의 항원이 인간 암세포 표면에 발현하고 암 이미지 진단 마커로써의 가능성을 확인하기 위하여 다음의 면역세포화학법을 수행하였다. 간암세포인 HepG2 세포를 커버슬립이 올려진 6-웰(well)의 조직배양용 플레이트(SPL)에 웰당 6 × 10^5 세포수로 접종하여 37℃에서 72시간 동안 배양하였다. 세포가 자라난 커버슬립을 12 well plate에 옮기고 새로운 배지에 단일클론항체 108-B6을 넣고 항체가 세포표면 단백질에 결합하도록 실온에서 1시간 반응시켰다. 3.7% PFA에 실온에서 10분 동안 세포 고정을 시키고 PBS로 세척한 후 0.1% Triton X100 을 넣고 실온에서 10분 동안 세포 표면에 구멍을 내었다. PBS로 세척한 후 5% 블로킹 솔루션(10% normal horse serum, 0.1% BSA, 1X PBS)을 이용하여 4℃에서 12시간 동안 블로킹을 하였다. PBS로 세척한 후에 FITC-항-생쥐-IgG를 넣고 빛을 차단시켜 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후 DAPI를 넣고 실온에서 10분간 반응시켜 세포의 핵을 염색하였다. PBS로 세척한 후 완료된 커버슬립을 슬라이드글라스에 마운트하고 형광현미경으로 세포를 관찰하였다(도 15). 그 결과 간암세포 표면에서 108-B6에 의한 PGRMC1의 발현이 관찰되었으며, 이 결과는 108-B6을 이용한 PGRMC1 발현 암세포의 이미지를 얻어 암진단에 이용할 수 있음을 제시한다.

[0092] **<실시예 7> 단일클론항체 108-B6 항체유전자 및 아미노산 분석**

[0093] **<7-1> 단일클론항체 108-B6 유전자 클로닝**

[0094] 왕성하게 자라는 하이브리도마 108-B6 세포 5X10^6 개를 원심분리하여 수확한 후 RNA iso plus reagent (TaKaRa, Otsu, Japan)으로 공급자의 프로토콜에 따라 전체 RNA을 추출하였다. 얻어진 전체 RNA는 A260을 측정하여 RNA 양을 정량하였다. 전체 RNA를 Prime Script RT Master Mix (TaKaRa)을 넣어 역전사중합효소 연쇄반응혼합액을 만들어 cDNA을 합성하였다. 항체 유전자를 클로닝하기 위해서는 알려진 중합효소연쇄반응 프라이머를 변형한 후 사용하였다 (Wang, et al J. Immunol. Methods 233, 167-177, 2000). 합성된 cDNA로 중쇄 클로닝을 위해서는 IgG1 불변영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 염기서열 5'-GGA GTC GAC ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'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'과 5'MH2- 5'-gcg gcg gcc gc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3' 인 올리고뉴클레오타이드를 넣고 연쇄 중합반응혼합액을 만들었다. 경쇄클로닝을 위해서는 카파사슬 불변영역에 해당하는 프라이머인 5'-GGT GTC GAC GGA TAC TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3' 올리고뉴클레오타이드와 카파사슬 가변영역 N 말단에 해당하는 프라이머인 5'MK 5'-cgg aag ctt GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3'과 primer6 5'-cgg aag ctt GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT-3'과 primer7 5'-cgg aag ctt GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA-3' 각각을 사용하였다. 중합효소연쇄반응 생산물의 효율적인 클로닝을 위하여 경쇄의 경우는 3'-프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였고, 5-프라이머 경우 HindIII 제한효소자리를 부여하였다. 중쇄인 경우에는 5-프라이머에는 NotI, 3' 프라이머에는 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄 및 경쇄반응액을 각각 섞은 후 먼저 94℃에서 1분, 45℃에서 40초, 72℃에서 1분으로 30회 반응시켰다. 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.

[0095] **<7-2> 단일클론항체 108-B6 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석**

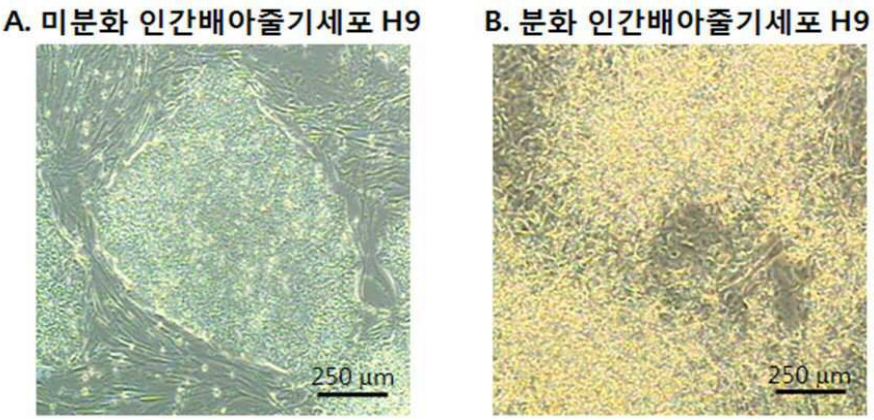
[0096] 상기 실시예에서 증폭해낸 108-B6 항체 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 중합효소연쇄반응 산물을 중쇄는 NotI과 SalI으로 처리하고 경쇄는 HindIII와 SalI으로 처리한 후 1.4 % 아가로스 젤에 전개시켜서 GeneClean

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 QIA quick PCR kit (Qiagen, 독일)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 클론, 경쇄의 경우 약 390bp 크기를 가진 대장균 클론들을 선발하였다.

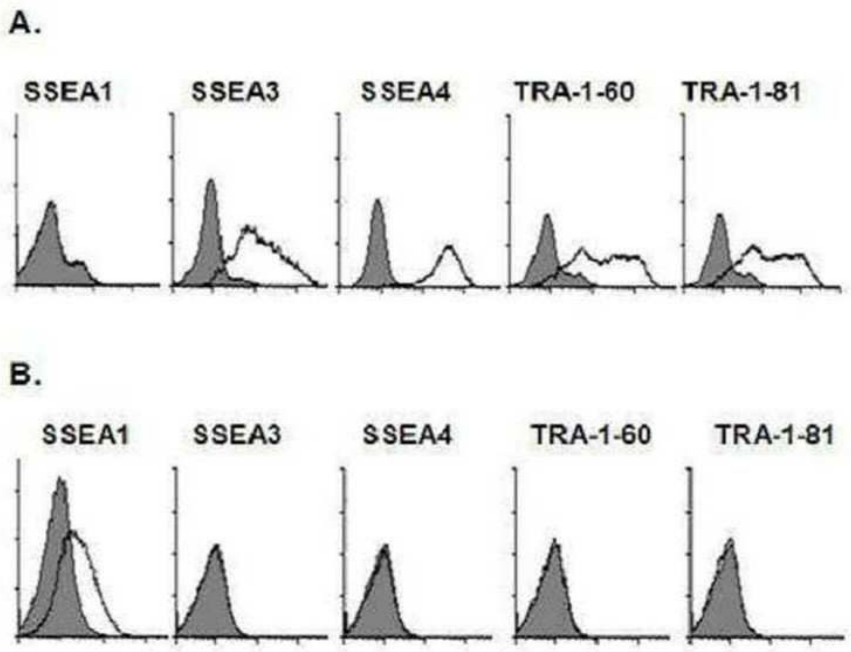
[0097] 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 50㎍/ml의 앰피실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA 미니프렙 키트(Intron사 한국)를 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 결정하였다. 중쇄 및 경쇄 cDNA의 염기서열을 아미노산으로 바꾼 후 각 아미노산 배열을 Kabat 데이터베이스를 이용하여 분석하였다(Johnson G. and Wu,T.T. Nucleic Acids Res. 29: 205-206, 2001). 도 16, 17의 염기 서열 위의 숫자는 Kabat 넘버링에 따라 정하였다. 이 아미노산 서열을 분석한 결과 이 면역유전자들은 항체구조에 특징적인 잔기와 배열을 완벽하게 갖추고 있으며 (도 16, 17), 구체적으로 보면 면역글로불린 여러 그룹 가운데서 108-B6의 중쇄는 서브그룹 IA 에 속하고 경쇄는 서브그룹 III에 속한다. 항원을 인식하는 CDR 잔기로는, 108-B6 중쇄 경우 CDR1은 26-35, CDR2는 50-68, CDR3는 100-105이며, 경쇄의 경우 CDR1은 24-39, CDR2는 55-61, CDR3는 94-102에 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.

도면

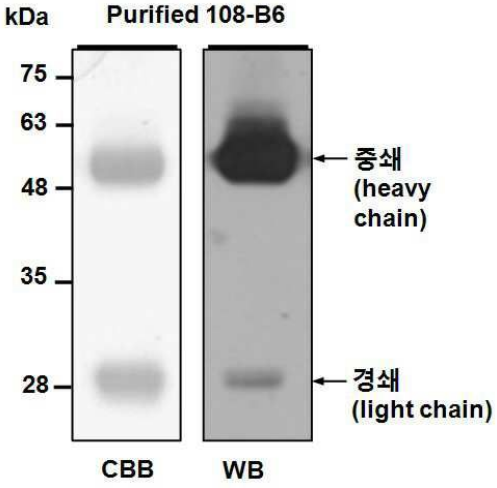
도면1



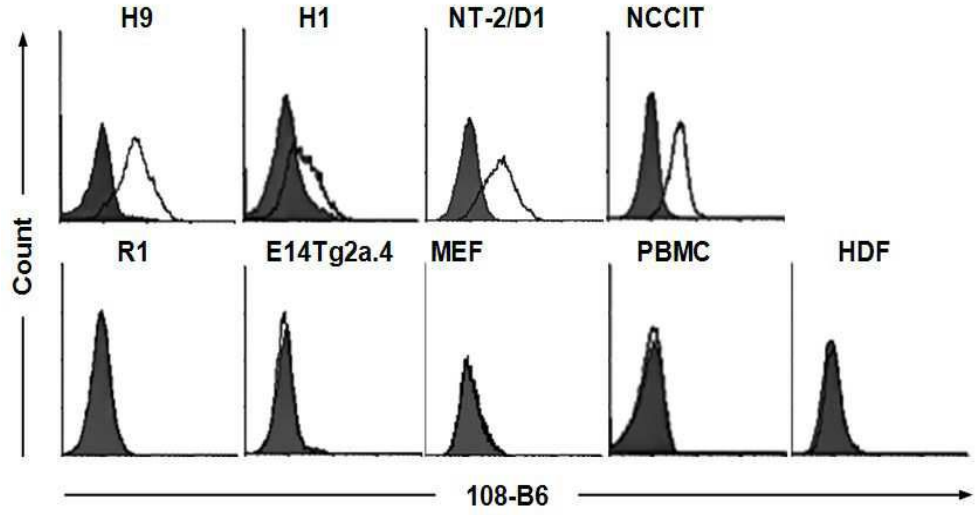
도면2


A.
SSEA1
SSEA3
SSEA4
TRA-1-60
TRA-1-81
B.
SSEA1
SSEA3
SSEA4
TRA-1-60
TRA-1-81

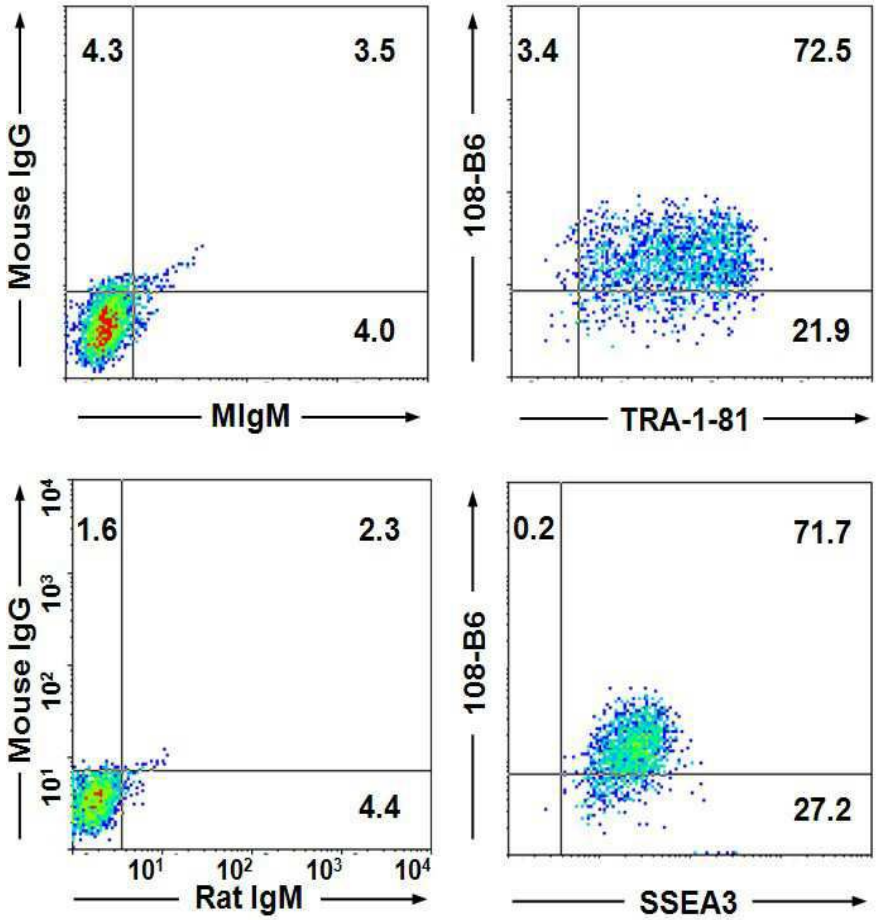
도면3


kDa
Purified 108-B6
75
63
48
35
28
중쇄
(heavy
chain)
경쇄
(light chain)
CBB
WB

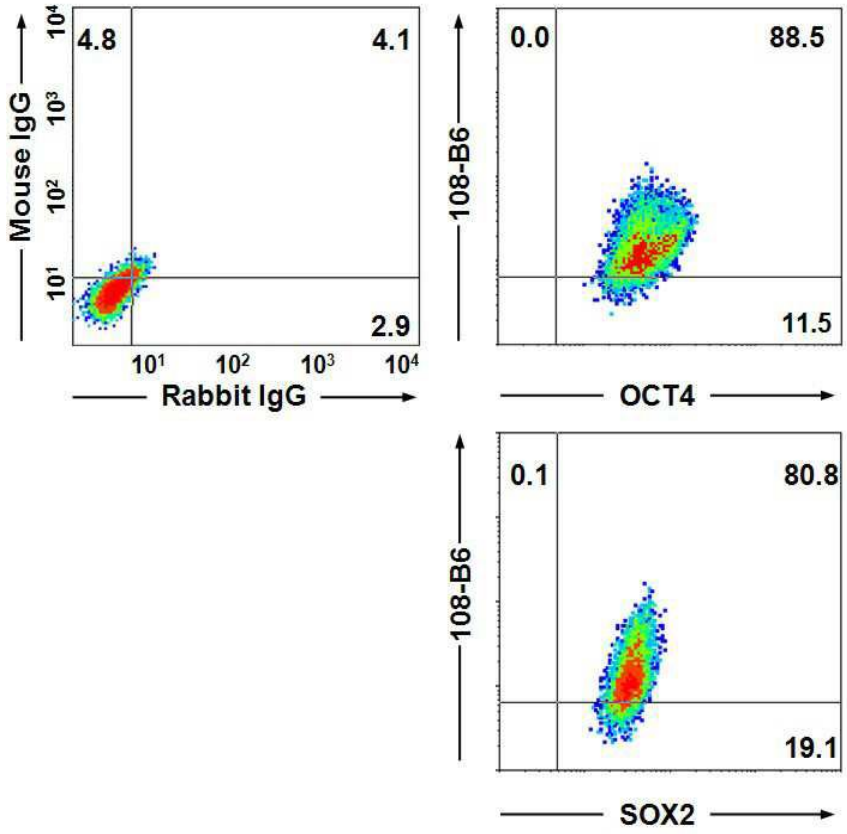
도면4


H9
H1
NT-2/D1
NCCIT
R1
E14Tg2a.4
MEF
PBMC
HDF
Count
108-B6

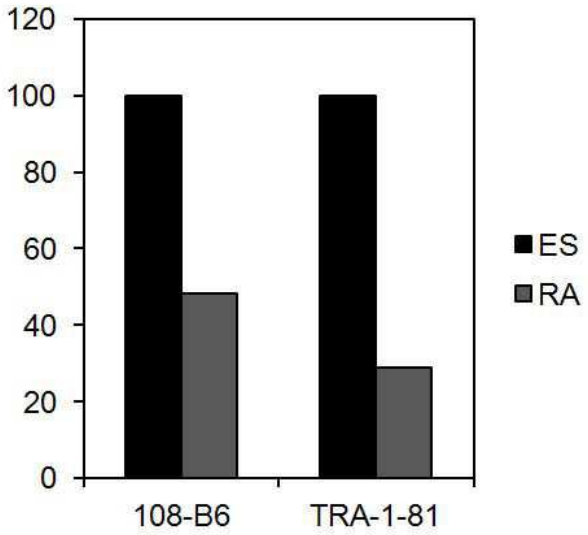
도면5


4.3
3.5
4.0
Mouse IgG
MIgM
3.4
72.5
21.9
108-B6
TRA-1-81
1.6
2.3
4.4
Mouse IgG
Rat IgM
0.2
71.7
27.2
108-B6
SSEA3

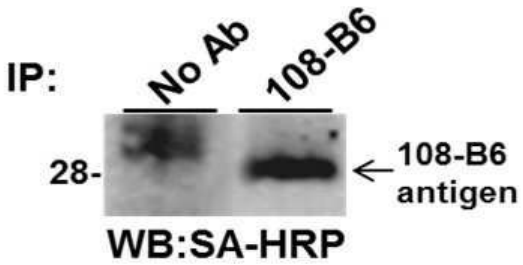
도면6


4.8
4.1
2.9
Mouse IgG
Rabbit IgG
0.0
88.5
11.5
108-B6
OCT4
0.1
80.8
19.1
108-B6
SOX2

도면7


120
100
80
60
40
20
0
ES
RA
108-B6
TRA-1-81

도면8



도면9

Match to: **gi|5729875** Score: **72** Expect: **0.017**
Membrane-associated progesterone receptor component 1 [Homo sapiens]

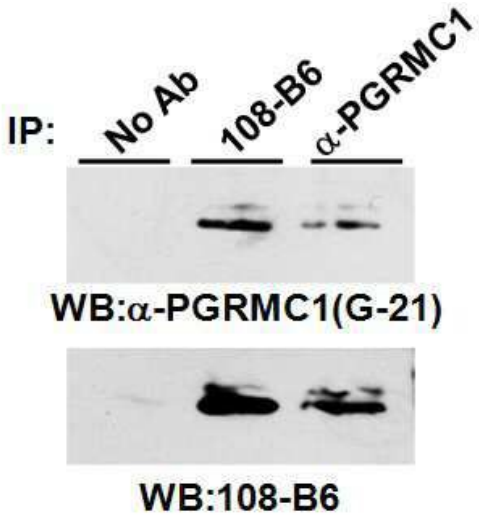
Matching peptide

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	M	Peptide
72-80	1104.6535	1103.6462	1103.5723	0.0739	1	R.DFTPAELRR.F
80-88	1089.6001	1088.5928	1088.5363	0.0565	1	R.RFDGVQDPR.I
89-102	1548.8593	1547.8520	1547.8745	-0.0225	1	R.ILMAINGKVFDVTK.G
105-119	1644.8389	1643.8316	1643.8096	0.0220	1	R.KFYGPEGPYGVFAGR.D
106-119	1516.7543	1515.7470	1515.7147	0.0323	0	K.FYGPEGPYGVFAGR.D

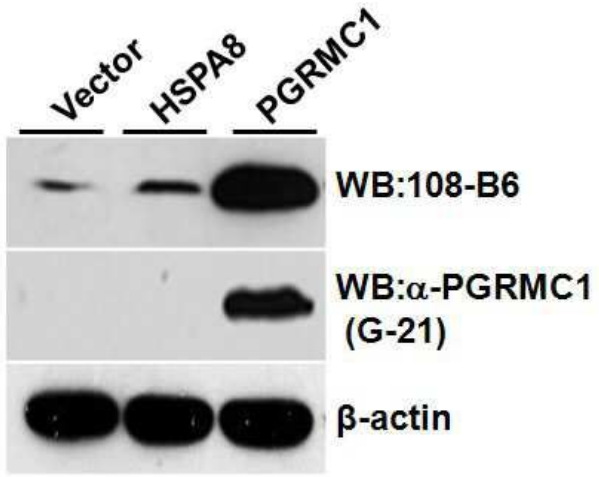
gi|5729875 (PGRMC1)

```
  1 MAAEDVVATG ADPSDLESGG LLHEIFTSPL NLLLLGLCIF LLYKIVRGDQ
 51 PAASGDSDDD EPPPLPRLKR RDFTPAELRR FDGVQDPRIL MAINGKVFDV
101 TKGRKFYGPE GPYGVFAGRD ASRGLATFCL DKEALKDEYD DLSDLTAAQQ
151 ETLSDWESQF TFKYHHVGKL LKEGEEPTVY SDEEEPKDES ARKND
```

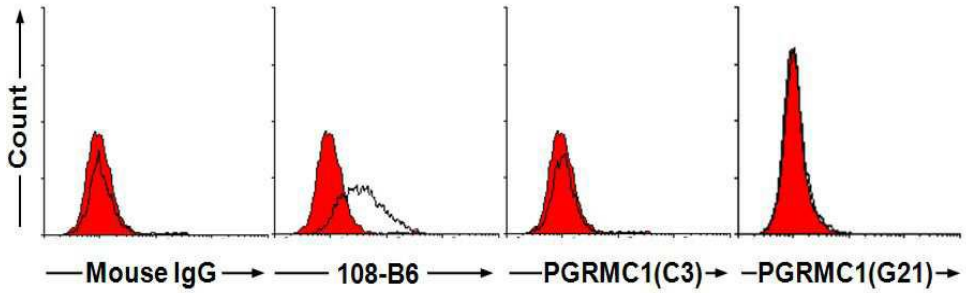
도면10



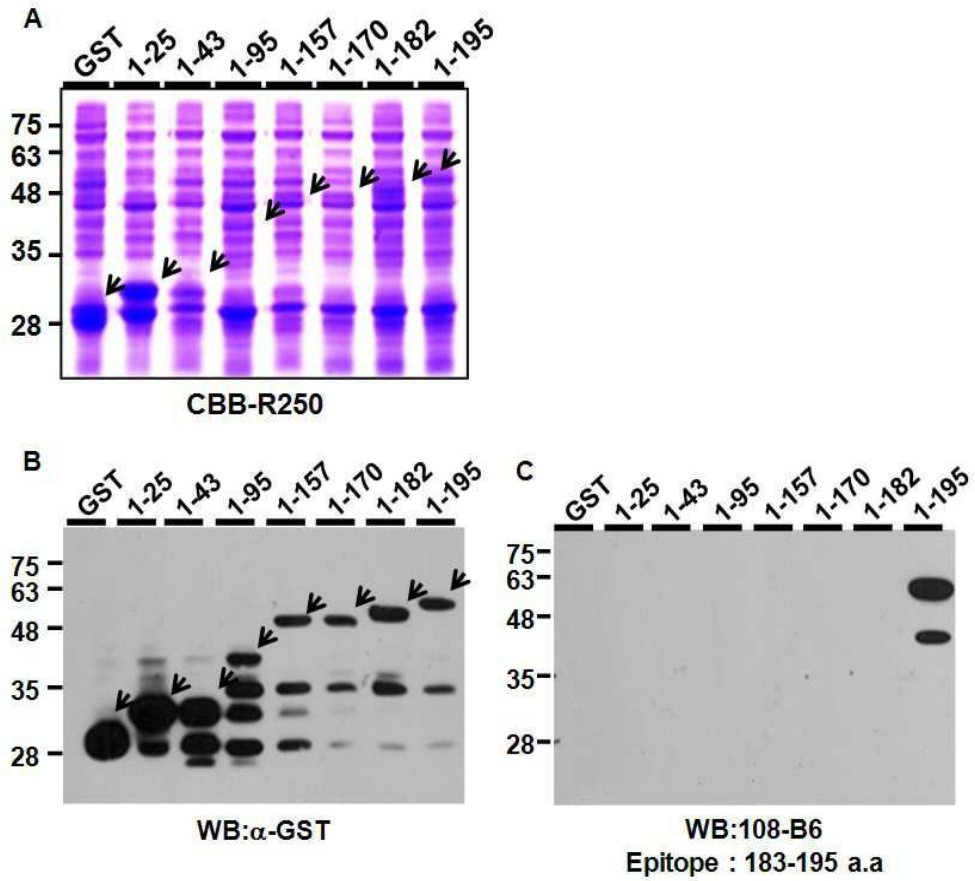
도면11


Vector
HSPA8
PGRMC1
WB:108-B6
WB:α-PGRMC1
(G-21)
β-actin

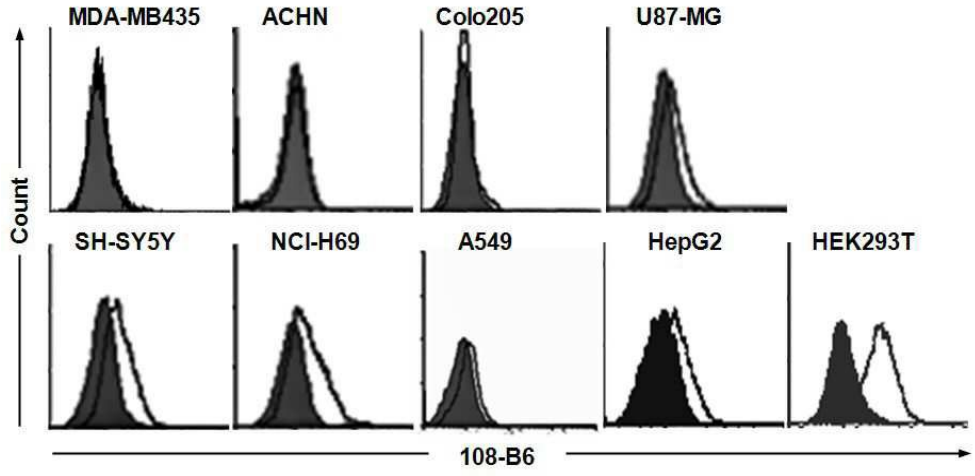
도면12


Count
Mouse IgG
108-B6
PGRMC1(C3)
PGRMC1(G21)

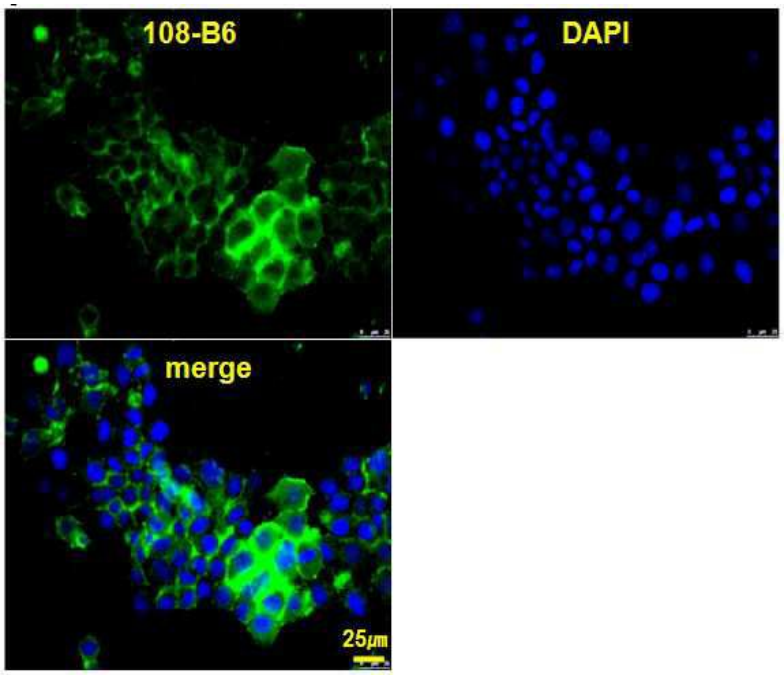
도면13


A
GST
1-25
1-43
1-95
1-157
1-170
1-182
1-195
75
63
48
35
28
CBB-R250
B
WB:α-GST
C
WB:108-B6
Epitope : 183-195 a.a

도면14


MDA-MB435
ACHN
Colo205
U87-MG
SH-SY5Y
NCI-H69
A549
HepG2
HEK293T
Count
108-B6

도면15



도면16

```
HC 108-B6 subgroup IA
GAA GTT CAG CTG CAG GAG TCT GGT GGA GGA TTG GTG CAG CCT AAA GGG TCA TTG AAA
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys
                          CDR1
CTC TCA TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AAT ACC TAC GCC ATG AAC TGG GTC CGC
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg
                                                CDR2
CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTG GAA TGG GTT GCT CGC ATA AGA AGT AAA AGT AAT AAT
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn

TAT GCA ACA TAT TAT GCC GAT TCA GTG AAA GAC AGG TTC ACC GTC TCC AGA GAT GAT
Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp

TCA CAA AGC ATG CTC TTT CTG CAA ATG AAC AAC TTG AAA ACT GAG GAC ACA GCC ATG
Ser Gln Ser Met Leu Phe Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met
                       CDR3
TAT TAC TGT ACG TAC GAC TGG TTT GGT TCC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC
Tyr Tyr Cys Thr Tyr Asp Trp Phe Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

TCT GCA GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT - 375
Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr - 125
```

도면17

```
LC 108-B6 subgroup III
GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT GTA CCT GTC ACT CCT GGA GAG TCA GTA
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val
                  CDR1
TCC ATC TCC TGC AGG TCT AGT AAG AGT CTC CTG CAT AGT GAT GGC ATC ACT TAC TTG
Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Ile Thr Tyr Leu
                                                          CDR2
TAT TGG TTC CTG CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCT CAG CTC CTG ATA TAT CGG ATG TCC
Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser

AAC CTT GCC TCA GGA GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCA GGA ACT GCT TTC
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
                                                                  CDR3
ACA CTG AGA ATC AGT AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTG GGT GTT TAT TAC TGT ATG CAA
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln

CAT CTA GAA TAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT
His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala

GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC - 363
Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser - 121
```

서 열 목 록

<110> Industry-Academia Cooperation Group Of Sejong University

<120> Monoclonal antibody 108-B6 specific to PGRMC1 expressed on the surface of human embryonic stem cells and various cancer cells

<130> ADP-2013-0494

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met

65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Tyr Asp Trp Phe Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr

115 120 125

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Val Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser

115 120

<210> 3

<211> 375

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

gaagttcagc tgcaggagtc tggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc 60

tcatgtgcag cctctggatt caccttcaat acctacgcca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccaggaaagg gtttggaatg ggttgctcgc ataagaagta aaagtaataa ttatgcaaca 180

tattatgccg attcagtgaa agacaggttc accgtctcca gagatgattc acaaagcatg 240

ctctttctgc aaatgaacaa cttgaaaact gaggacacag ccatgtatta ctgtacgtac 300

gactggtttg gttcctgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc caaaacgaca 360

cccccatctg tctat 375

<210> 4

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct gtacctgtca ctcctggaga gtcagtatcc 60

atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtgatg gcatcactta cttgtattgg 120

ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctcctgatat atcggatgtc caaccttgcc 180

tcaggagtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240

agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatct agaatatccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360

tcc 363