



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0134292
(43) 공개일자 2022년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
G01N 33/56966 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0039776
(22) 출원일자 2021년03월26일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
류춘제
서울특별시 강남구 도곡로 320, 102동 1302호(도곡동, 래미안도곡카운티)
최홍서
서울특별시 광진구 동일로54길 11-7, 204호(군자동)
(74) 대리인
특허법인리체

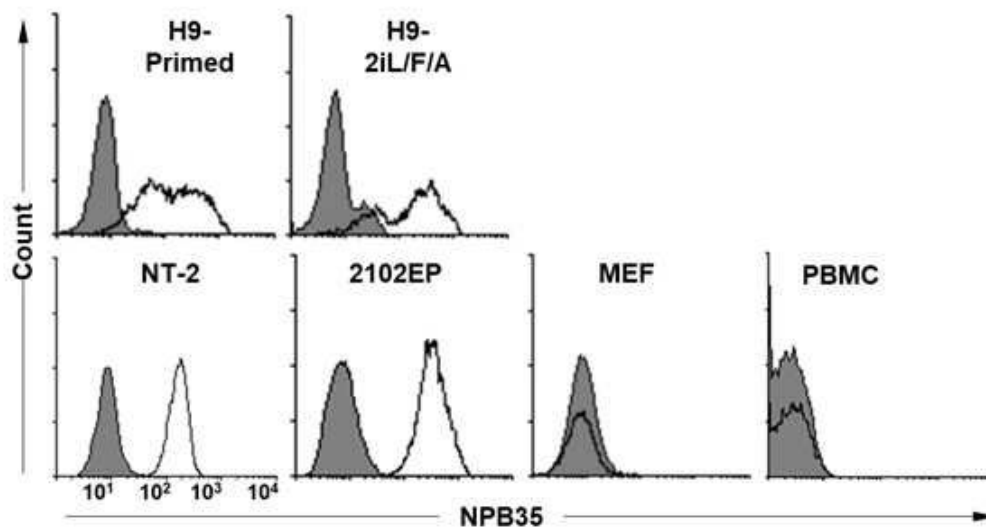
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포에 특이적인 단일클론항체 NPB35

(57) 요약

본 발명은 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 NPB35, 이를 생산하는 하이브리도마, 이를 이용한 암 진단 검출용 조성물, 키트, 암 치료용 조성물 등에 관한 것으로, 구체적으로 순수 인간만능줄기세포에는 결합하고, 준 인간만능줄기세포에는 결합하지 않거나 결합력이 현저히 약한 특성을 이용하는 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 33/574 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103554
과제번호	2016M3A9C6918220
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	신규 전환인자 발굴을 통한 순수 인간만능줄기세포 유도 및 기전규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1; HCDR1), 서열번호 2를 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄; 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 상보성 결정영역 1(light chain complementary determine region 1; LCDR1), 서열번호 5를 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는, 순수 인간만능줄기세포 (naive human pluripotent stem cell) 및 준 인간만능줄기세포(primed human pluripotent stem cell)에 특이적인 항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 서열번호 7을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 순수 인간만능줄기세포 또는 준 인간만능줄기세포의 BSG/CD147(Basigin/Cluster of Differentiation 147) 항원에 특이적으로 결합하는, 항체.

청구항 4

청구항 1의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 서열번호 9를 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1; HCDR1)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 10을 포함하는 HCDR2를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 11을 포함하는 HCDR3을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 12를 포함하는 LCDR1을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 13을 포함하는 LCDR2를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 서열번호 14를 포함하는 LCDR3을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 중쇄를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드 서열 및 경쇄를 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

청구항 4의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.

청구항 8

청구항 1의 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma).

청구항 9

청구항 1의 항체를 포함하는, 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검출용 조성물.

청구항 10

청구항 9의 조성물을 포함하는, 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검출 키트.

청구항 11

청구항 8의 하이브리도마를 배양하여 청구항 1의 항체를 생산하는 방법.

청구항 12

청구항 1의 항체를 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 13

분리된 시료에 청구항 12의 조성물을 처리하여, 상기 항체가 결합된 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 시료는 혈청인, 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 15

청구항 12의 조성물을 포함하는, 암 진단용 키트.

청구항 16

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

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 암은 배아암 또는 결장암인, 암 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 순수 인간만능줄기세포(naive human pluripotent stem cells) 및 준 인간만능줄기세포(primed human pluripotent stem cells)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 NPB35에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 인간만능줄기세포 (human pluripotent stem cells, hPSC) 는 무제한 증식과 몸을 구성하는 모든 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 첫 번째 인간 만능줄기세포인 인간 배아줄기세포 (human embryonic stem cell, hESC)는 1998년 미국 James Thomson박사팀에 의해 인간 냉동 배아에서 확립되었고, 2007년에는 일본 Shinya Yamanaka 박사팀에 의해서 유전자 도입에 의해 인간 배아줄기세포와 유사한 인간 유도만능줄기세포 (human Induced Pluripotent Stem Cell, hiPSC)가 확립되었으며, 2013년에는 미국 오레곤 대학 Shoukhrat Mitalipov 박사팀에 의해 난자의 핵 치환을 통한 인간 복제배아줄기세포가 만들어져서 현재 3종의 hPSC가 존재한다.
- [0004] hPSC는 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 무한히 생산할 수 있는 재생능력(self-renewal)과 신체의 모든 기능성 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency)의 특징을 보임으로써 손상된 세포나 조직을 대체할 수 있는 재생의학, 질환연구를 위한 다양한 인간세포에 대한 약물 탐색, 다양한 질병 및 인간 발생 연구를 위한 모델 등으로 활발히 사용되며 미래 재생의학의 핵심 줄기세포로 부상하고 있다. 하지만 hPSC는 편편한 모양에 느리게 자라며 단일세포 해리에 대한 민감성, 게놈 편집에 대한 열악한 적응성, 이질적인 집단, 분화 중 특정 계통에 대한 성향 증가 등으로 활발한 사용이 제한되는 문제점이 있다.
- [0005] 생쥐 배아줄기세포인 mESC는 착상전 배반포에서 분리하여 LIF (leukemia inhibitory factor, LIF) 를 포함하는 배지에서 작은 돔(dome) 모양으로 트립신으로 단일세포로 떼어도 잘 자라서 hPSC와 다른 상태의 만능줄기세포이다. 이후에 분리된 생쥐 상배엽 유래 줄기세포 (epiblast-derive stem cell, EpiSc)는 착상 후 배반포에서 분리되었으며, hPSC와 유사하게 자라며 bFGF/TGF- β 함유한 배지에서 증식하며 형태학적으로 분자적으로 hPSC와 유사한 특징을 보였다. 따라서 Cambridge 대학의 Austin Smith 교수는 포유류의 만능줄기세포는 두 가지 다른 상태로 존재하며 수정란이 자궁에 착상하기 전과 후로 나뉘어서 착상 전 (pre-implantation epiblast) 또는 착상 후 상배엽 (post-implantation epiblast)에서 각각 다른 만능줄기세포를 분리할 수 있으며, 착상 전 만능줄기세포를 순수 (naive) 만능성, 그리고 착상 후를 준 (primed) 만능성이라고 명명하였다.
- [0006] 순수와 준 만능줄기세포는 세포 모양, 성장 속도, 분화 능력, 메틸화 정도, 생식선 전송(germline transmission)능력 등에서 차이가 많은데, 준 상태 만능줄기세포는 크고 편편한 상태로 자라며 성장속도가 느리나, 순수 상태 만능줄기세포는 작은 돔(dome) 모양으로 자라며 트립신으로 단일세포로 떼어도 잘 자라고, 성장속도가 빠르며, 발생단계에서 특정 계열로 아직 편중되지 않은 상태로 더 많은 세포로 분화능력이 기대되고, 메틸화 정도가 더 낮고, 생식선 전송능력이 더 탁월한 발생 초기 만능줄기세포로 알려졌다.
- [0007] 순수 hPSC 특성이 각각의 방법에 따라 서로 달라 정확한 순수 상태와 특성에 대한 표준화가 되어있지 않아 각각의 배양방법에서 순수 상태, 중간 (intermediate) 상태, 준 상태 만능성이 혼재되어 있다. 이 중에서, 중간 상태 만능성은 형성 만능성(formative pluripotency) 으로 분화가 잘 일어나지 않는 순수 상태 만능성 보다 분화가 활발한 순수 hPSC로 규정되고 키메라 형성을 효율적으로 할 수 있는 순수 hPSC로 구분되지만 일시적으로 형성되는 세포로 여겨지며 안정적인 배양방법이 확립되지 않았다. 다양한 배양 조건으로 형성되는 순수 hPSC는 대부분은 유사한 세포 표현형을 생성하지만 유전자 프로파일링으로 좀 더 세분해서 보면 두 개의 그룹, 바탕 상태 만능성 그룹 (bona fide/ground)과 형성/중간 상태의 만능성 그룹(formative/intermediate) 으로 다시 나눌 수 있다. 대부분의 순수 hPSC 유도하는 방법은 형성/중간 상태의 형성 만능성 줄기세포를 유도한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제 10-2020-0027116호

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Gafni et al., 2013, Nature, 508, 282
 (비특허문헌 0002) Theunissen et al., 2014, Cell stem cell, 15, 471
 (비특허문헌 0003) Takashima et al., 2014, Cell 158:1254

- (비특허문헌 0004) Duggal, et al., 2015, Stem Cells 33, 2686
- (비특허문헌 0005) Guo et al., 2017, Development 16144, 2748
- (비특허문헌 0006) Zimmerlin et al., 2016 Development 143, 4368
- (비특허문헌 0007) Collier et al., 2017 Cell Stem Cell 20, 784
- (비특허문헌 0008) Yang, et al 2017, Cell 169, 243
- (비특허문헌 0009) Collier, et al., 2018 Bioassays 40, 1700239
- (비특허문헌 0010) Trusler et al., 2018 Stem Cell Research 26, 36
- (비특허문헌 0011) Wojdyla et al., 2020, Stem Cell Reports 14, 972
- (비특허문헌 0012) Taei et al., 2020, Exp Cell Res 389, 111924
- (비특허문헌 0013) Taei et al., 2020, EMBO Reports (2020) 21: e47533
- (비특허문헌 0014) Kinoshita et al 2021, Cell Stem Cell 28

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포에 결합하는 인간만능줄기세포 표면의 BSG/CD147 (Basigin/Cluster of differentiation 147) 항원을 인식하는 단일클론항체 NPB35를 제공함에 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공함에 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공함에 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검출용 조성물을 제공함에 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검정 키트를 제공함에 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 사용하는 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검출 방법을 제공함에 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공함에 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용한 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공함에 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공함에 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는 암 치료용 조성물을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0022] 1. 서열번호 1을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1; HCDR1), 서열번호 2를 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄; 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 상보성 결정영역 1 (light chain complementary determine region 1; LCDR1), 서열번호 5를 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는, 순수 인간만능줄기세포 (naive human pluripotent stem cell) 및 준 인간만능줄기세포(primed human pluripotent stem cell)에 특이적인 항체.
- [0023] 2. 위 1에 있어서, 서열번호 7을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항체.
- [0024] 3. 위 1에 있어서, 상기 항체는 순수 인간만능줄기세포 또는 준 인간만능줄기세포의 BSG/CD147(Basigin/Cluster

of differentiation 147) 항원에 특이적으로 결합하는, 항체.

- [0025] 4. 위 1의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [0026] 5. 위 4에 있어서, 서열번호 9를 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1; HCDR1)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 10을 포함하는 HCDR2를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 11을 포함하는 HCDR3을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 12를 포함하는 LCDR1을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 13을 포함하는 LCDR2를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 서열번호 14를 포함하는 LCDR3을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.
- [0027] 6. 위 4에 있어서, 중쇄를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드 서열 및 경쇄를 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.
- [0028] 7. 위 4의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.
- [0029] 8. 위 1의 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma).
- [0030] 9. 위 1의 항체를 포함하는, 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검출용 조성물.
- [0031] 10. 위 9의 조성물을 포함하는, 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검출 키트.
- [0032] 11. 위 8의 하이브리도마를 배양하여 청구항 1의 항체를 생산하는 방법.
- [0033] 12. 위 1의 항체를 포함하는, 암 진단용 조성물.
- [0034] 13. 분리된 시료에 위 12의 조성물을 처리하여, 상기 항체가 결합된 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [0035] 14. 위 13에 있어서, 상기 시료는 혈청인, 암 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [0036] 15. 위 12의 조성물을 포함하는, 암 진단용 키트.
- [0037] 16. 위 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, 암 치료용 조성물.
- [0038] 17. 위 16에 있어서, 상기 암은 배아암 또는 결장암인, 암 치료용 조성물.

발명의 효과

- [0040] 본 발명의 단일클론항체 NPB35는 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포에 특이적으로 결합하여 결합하지 않는 인간만능줄기세포가 순수 또는 준 인간만능줄기세포가 아님을 확인할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 단일클론항체 NPB35는 다양한 암세포에서 과발현되는 BSG/CD147을 특이적으로 인식할 수 있어, 이를 통해 암 진단용 조성물, 키트 등에 사용하거나 암 치료용 조성물로 이용해볼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 준 H9 (primed H9) 과 순수 인간만능줄기세포 유도하는 2 가지 배지인 2iL/X/F/P, 2iL/F/A에서 배양한 작은 돔(dome) 모양의 순수 H9 세포의 모양을 나타낸 것이다.
- 도 2는 FACS 분석을 통하여 준 인간만능줄기세포 마커인 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24, 및 CD90와 바탕상태 순수 인간만능줄기세포 마커인 CD7, CD77, 및 CD130 발현을 나타낸 그림으로, 전환된 순수 인간만능줄기세포 (H9-2iL/X/F/P) 에서는 CD90을 제외한 모든 준 만능줄기세포 마커 발현이 감소하고 순수 인간만능줄기세포 마커로 알려진 CD7과 CD77은 발현이 증가함을 보여주는 그림이다. 실선은 각 단일클론항체이고, 회색바탕은 2차 항체만 포함한 것이다.
- 도 3은 H9-2iL/X/F/P 방법 (Zimmerlin et al., 2016) 으로 유도한 naive hPSC와 primed hPSC에서 RNA-seq 방법으로 naive hPSC 연관 31개유전자 발현 분석한 그림으로 naive hPSC에서 15개 naive hPSC 연관 유전자 발현이 증가한 것을 확인할 수 있다.
- 도 4는 FACS 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 NPB35가 준 인간만능줄기세포 (H9-primed)과 순수 인간만능

줄기세포 (H9-2iL/F/A)에 결합하고 인간 배아암종세포인 2102EP, NT-2에는 결합하지만 생쥐 배아섬유아세포 (MEF)와 인간 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC)에는 결합하지 않음을 보여준다. 이때, 실선은 단일클론항체 NPB35 이고 회색 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이다.

도 5는 항체 NPB35를 하이브리도마 배양액에서 단백질-G 세파로오스 컬럼 크로마토그래피 (protein-G sepharose column chromatography)로 정제한 것으로 (A) 정제한 항체를 10 % SDS-PAGE로 분석한 후 웨스턴 블롯으로 확인한 그림이며, (B) FACS로 NT2 배아암세포에 대한 결합력을 확인한 것이다.

도 6은 NPB35 항원을 동정한 그림으로 (A) 2102EP 와 (B) NT-2 세포에서 세포 표면을 바이오틴화 한 후에 NPB35 단일클론항체를 사용하여 면역 침강시키고, 침강된 단백질을 10% SDS-PAGE에서 웨스턴 블로팅으로 PVDF 막으로 옮기고, 스트렙타비딘-HRP (SA-HRP)로 분석한 그림이다. NPB35 항체에 의해 면역침강된 43KDa 단백질을 확인할 수 있다. (C) 면역침강한 단백질을 Instant Blue staining solution으로 염색한 그림으로 (D) LC-MS/MS 분석을 통해 BSG/CD147 (Basigin, cluster of differentiation 147) 으로 동정되었고, BSG/CD147 아미노산과 매치되는 펩타이드의 아미노산 서열을 표시하였다.

도 7은 NPB35 항원을 검증한 그림이다. (A) pCMV3-BSG/CD147-Flag 벡터를 트랜스펙션한 293FT 세포를 NPB35와 anti-Flag 항체로 면역침강후 rabbit CD147 항체에 의해 검출된 low-glycosylated 36/38KDa의 BSG/CD147를 보여주며, (B) NT2 세포추출액에서 NPB35와 rabbit CD147 항체로 면역침강 후 rabbit CD147 항체에 의해 검출된 low-glycosylated 36/38 KDa와 high-glycosylated 65KDa 형태의 BSG/CD147를 보여주며, (C) 상업적인 rabbit polyclonal anti-CD147항체와는 달리 PNGase-F를 처리하면 NPB35 항원인 low-, high-glycosylated BSG/CD147가 unglycosylated core protein으로의 변화를 보여주는 그림이다.

도 8은 미분화 및 분화된 인간 만능줄기세포에서 BSG/CD147의 발현 양상을 보여주는 그림이다. real-time PCR을 이용한 미분화 및 14일동안 분화시킨 인간 만능줄기세포의 배아체 (embryoid body, EB) 에서 만능줄기세포 유전자와 BSG/CD147의 발현양을 비교하였고, GAPDH은 내부 대조군으로 사용하였다. 14일 간 분화하는 동안 전분화능 마커 (OCT4, SOX2, NANOG)는 감소하고, 분화마커인 Pax6, Gata6는 증가하고 본 발명의 단일클론항체 NPB35가 인식하는 BSG/CD147는 감소하다 10일 분화에서 다소 증가하다 다시 감소하는 것을 보여준다.

도 9은 H9 세포에서 siRNA로 BSG/CD147유전자를 녹다운한 후 전분화능 마커들을 real time PCR로 분석한 결과이다. real-time PCR을 이용하여 BSG/CD147을 녹다운한 H9 인간만능줄기세포에서 BSG/CD147과 전분화능 마커 (OCT4, SOX2, NANOG)들의 전사물을 분석한 결과 OCT4를 제외하고 BSG/CD147이 감소하면 전분화능 Sox2, NANOG 발현 감소가 심한 것을 확인할 수 있다.

도 10는 H9 세포에서 siRNA로 BSG/CD147유전자를 녹다운한 후 전분화능 마커들을 분석한 결과이다. (A) real-time PCR을 이용하여 BSG/CD147을 녹다운한 H9 인간만능줄기세포에서 BSG/CD147 전사물을 분석한 그림이고 (B) A에서 분석한 BSG/CD147유전자를 웨스턴 블롯으로 단백질 수준에서 분석한 그림이다. siRNA 녹다운 후 BSG/CD147이 감소하는 것을 볼수있다. (C) A, B 에서 BSG/CD147 녹다운 세포에서 전분화능 마커 단백질중 OCT4는 변화가 거의 없지만 Sox2는 강하게, NANOG는 약하게 발현이 감소한 것을 확인할 수 있다.

도 11은 NPB35를 사용하여 3 종류의 암세포에서 암세포 성장 억제에 관찰하여 나타낸 그림이다. 인간 배아암 세포주 NT-2, 2102EP, 인간 결장암 세포주 Colo205 세포에 mIgG와 NPB35 항체 (10 µg/ml)를 넣고, 48시간 후에 CCK-8 반응시키고 용해된 포마잔 (formazan) 산물의 흡광도는 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. NPB35 항체는 인간 배아암세포 NT-2와 2102EP 세포의 약 33%와 29%의 성장을 억제하는 것을 보여주고, 인간 결장암 세포주 Colo205 세포의 약 31%의 성장을 억제하는 것을 보여준다. % 는 NPB35 대신 mIgG를 처리한 것을 100%로 하였을 때의 상대적인 비율로 나타낸 것이다.

도 12는 항체 NPB35 유전자를 클로닝한 것으로 전체 RNA를 추출한 후, 역전사 효소-중합효소 연쇄 반응을 이용하여 중쇄 유전자 (HC)와 경쇄 유전자(LC)의 가변영역을 증폭하고 pBluesscript KS에 중쇄는 EcoRI/SalI, 경쇄는 HindIII/SalI자리에 클로닝한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 NPB35 중쇄 유전자의 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 상보성 결정 영역 (Complementarity Determining Region; CDR)과 전체 아미노산의 잔기 위치를 표시하여 나타낸 것이다.

도 14는 NPB35 항체 경쇄 유전자의 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR과 전체 아미노산의 잔기 위치를 표시하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044]

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0046]

본 발명은 서열번호 1을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1; HCDR1), 서열번호 2를 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄; 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 상보성 결정영역 1 (light chain complementary determine region 1; LCDR1), 서열번호 5를 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는, 순수 인간만능줄기세포 (naive human pluripotent stem cell) 및 준 인간만능줄기세포(primed human pluripotent stem cell)에 특이적인 항체에 관한 것이다.

[0047]

본 발명의 항체는 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포에 특이적으로 결합한다.

[0048]

순수 인간만능줄기세포는 착상 전의 인간만능줄기세포를 의미하는 것으로, 예를 들어 naive 또는 ground 상태의 만능성을 가진다고 말하고, 착상 후의 인간만능줄기세포는 준(primed) 상태의 만능성을 가지는 준 인간만능줄기세포를 의미한다. 순수 인간만능줄기세포를 좀 더 세분할 경우 상기 ground 상태의 줄기세포, 그리고 중간 단계인 intermediate, formative 또는 naive-like 상태의 순수 만능성을 가지는 줄기세포로 나뉘질 수 있다.

[0050]

본 발명의 항체는 상기 CDR 서열을 갖는 것이라면 그 중쇄 및 경쇄 서열은 한정되지 않으나, 예를 들면 서열번호 7을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄 서열을 가질 수 있다.

[0051]

상기 서열번호 7은 도 13에 나타난 중쇄의 전체 서열을 의미하는 것이고, 서열번호 8은 도 14에 나타난 경쇄의 전체 서열을 의미하는 것이다.

[0052]

서열번호 1 내지 8은 표 1에 나타난 것과 같다.

표 1

[0053]

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

[0054]

본 발명에서 항체는 구체적으로 단일클론항체를 의미하는 것일 수 있고, 본 발명에서 단일클론항체란 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)에 대해서 지시되어 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 본 발명의 단일클론항체는 순수 인간만능줄기세포 또는 준 인간만능줄기세포의 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하므로, 순수 인간만능줄기세포 또는 준 인간만능줄기세포의 세포 표면 분자를 인식하는 단백질 분자이다.

[0055]

항원의 특정 에피토프를 인식하여 항원-항체 복합체를 형성하는 항체의 주요 부위는 중쇄 및 경쇄의 가변 영역,

특히 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)이 이러한 복합체 형성에 기여하므로, 본 발명은 상기한 본 발명의 단일클론항체의 가변 영역, 특히 CDR을 포함하는 이의 키메릭 항체, 인간화 항체 등을 본 발명의 범위에 포함한다. 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.

[0056] 본 발명의 항체는 순수 인간만능줄기세포 또는/및 준 인간만능줄기세포에 특이적인 항체일 수 있고, 예를 들어 순수 인간만능줄기세포 또는/및 준 인간만능줄기세포의 BSG/CD147 (Basigin, cluster of differentiation 147)에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 또한, 본 발명은 상기 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0059] 본 발명에서 본 발명에서 용어 "핵산", "핵산 분자", "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용되고, 단일 가닥 형태나 이중 가닥 나선(helix)으로의 리보뉴클레오사이드 (아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘; "RNA 분자") 또는 데옥시리보뉴클레오사이드 (데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시시딘 또는 데옥시시티딘; "DNA 분자")의 인산 에스테르의 중합체 형태 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 및 티오에스테르와 같은 이의 임의의 인산 에스테르 유사체를 지칭한다. 이중 나선 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 나선이 가능하다. 용어 핵산 분자, 및 특히 DNA 또는 RNA 분자는 상기 분자의 일차 및 이차 구조만을 지칭하며 어느 특정 삼차 형태에 제한하지는 않는다. 따라서, 이 용어는 그 중에서도 선형 또는 환형 DNA 분자 (예컨대, 제한효소 단편), 플라스미드, 초나선형(supercoiled) DNA 및 염색체로 발견되는 이중 가닥 DNA를 포함한다. 특정 이중 가닥 DNA 분자의 구조를 논할 때, 서열을 전사되지 않은 DNA 가닥 (즉, mRNA에 일치하는 서열을 갖는 가닥)을 따라 5'에서 3' 방향으로만 제시하는 일반적인 규약에 따라 본 명세서에 서열이 기술될 수 있다. "재조합 DNA 분자"는 분자 생물학적 조작을 거친 DNA 분자이다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 합성 DNA 및 반합성 DNA를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 예를 들어 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 9를 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1; HCDR1)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 10을 포함하는 HCDR2를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 11을 포함하는 HCDR3을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 12를 포함하는 LCDR1을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 서열번호 13을 포함하는 LCDR2를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 서열번호 14를 포함하는 LCDR3을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 중쇄를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드 서열 및 경쇄를 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

표 2

[0062]

서열번호	폴리뉴클레오티드 서열
9	GGA TTC ACT TTC AGT AAC TTC TGG ATG AAC
10	GAA ATT AAA TTG AAA TCT AGT AAT TAT GCA ACA CAT TAT GCG GAG TCT GTG AAG GGG
11	CTT ACT TCG GCT AAC TTC
12	AAG GCC AGT CAG AGT GTG AGT AAT GAT GTA GCT
13	TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT
14	CAG CAG GAT TAT AGT TCT CCG TAC ACG
15	CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA GGA GGC TTG GTG CAA CCT GGA GGA TCC ATG AAA CTC TCC TGT GTT GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AAC TTC TGG ATG AAC TGG GTC CGC CAG TCT CCA GAG AAG GGG CTT GAG TGG GTT GCT GAA ATT AAA TTG AAA TCT AGT AAT TAT GCA ACA CAT TAT GCG GAG TCT GTG AAG GGG AGG TTC ACG ATC TCA AGA GAT GAT TCC AAA AGT AGT GTC TAC CTG CAA ATG AAC AAC TTA AGA GCT GAA GAC ACT GGC ATT TAT TAC TGT ACT CCC CTT ACT TCG GCT AAC TTC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA

16	GAT ATT GTG ATG ACA CAA TCT CCC AAA TTC CTG CTT GTA TCA GCA GGA GAC AGG GTT ACC ATA ACC TGC AAG GCC AGT CAG AGT GTG AGT AAT GAT GTA GCT TGG TAC CAA CAG AGG CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATA TAC TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACT GGC AGT AGA TAT GGG ACG GAT TTC ACT TTC ACC ATC AGC ACT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAG GAT TAT AGT TCT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG
----	--

- [0063] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0064] 본 발명에서 용어 "벡터"는 핵산을 시험관 내(in vitro), 생체 외(ex vivo) 또는 생체 내(in vivo) 세포로 도입하기 위한 바이러스성 운반체뿐만 아니라 비바이러스성 운반체 모두를 포함한다. 벡터는 부착된 절편을 증폭시키기 위하여 또 다른 DNA 절편이 부착된 레플리콘(replicon)일 수 있다.
- [0065] "레플리콘"은 생체 내(in vitro) DNA 복제의 자율 단위로 작용할 수 있는, 즉 그 자신의 통제 하에 복제를 할 수 있는, 임의의 유전 요소(예컨대, 플라스미드, 파아지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 지칭한다. 본 기술분야에서 알려진 상당수의 벡터들이 핵산을 조작하고, 반응 요소(response element) 및 프로모터를 유전자로 혼입하는 등에 사용될 수 있다. 바람직한 벡터에는, 예를 들어, 플라스미드 또는, 예를 들어 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 또는 pBR322 또는 pUC 플라스미드 유도체 또는 블루스크립트(Bluescript) 벡터와 같은 플라스미드를 포함하는 변형된 바이러스를 포함한다. 예를 들어, 반응 요소 및 프로모터에 해당하는 DNA 단편의 적절한 벡터로의 삽입은, 상기 적절한 DNA 단편을 상보적인 접착말단(cohesive termini)을 갖는 선택된 벡터와 결합시킴으로써 달성될 수 있다. 그렇지 않으면, DNA 분자의 말단이 효소적으로 변형될 수 있거나, 또는 뉴클레오티드 서열(링커)을 DNA 말단과 결합시킴으로써 임의의 부위가 생성될 수 있다. 그러한 벡터들은 세포 계층으로 마커를 혼입한 세포를 선별하기 위한 선별 마커 유전자를 함유하도록 조작될 수 있다. 그러한 마커들은 마커에 의해 암호화된 단백질을 혼입하여 발현하는 숙주 세포를 확인 및/또는 선별할 수 있게 한다.
- [0066] 벡터는 필수 조절 서열(예를 들어, 전사 및 번역 요소)을 제공하여 적절한 숙주 세포 내에서의 융합 단백질의 발현을 조절한다. 조절 서열은 프로모터 영역, 인핸서 영역, 전사 종결 부위, 리보솜 결합 부위, 개시 코돈, 스플라이스 신호, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 샤인/달가노(Shine/Dalgarno) 번역 서열 및 코작 공통 서열(Kozak consensus sequence) 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 조절 서열은 융합 단백질이 생성될 숙주 세포를 고려하여 선택된다. 적절한 박테리아 프로모터는 박테리오파지 λ pL 또는 pR, T6, T7, T7/lacO, lac, recA, gal, trp, ara, hut 및 trp-lac을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 적절한 진핵 프로모터는 PRBI, GAPDH, 메탈로티오네인, 티미딘 키나제, 바이털 LTR, 사이토메갈로바이러스, SV40, 또는 조직-특이적 또는 종양-특이적 프로모터, 예컨대 α -태아단백질, 아밀라제, 카텝신 E, M1 무스카린 수용체 또는 γ 글루타미드 트랜스퍼라제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0067] 추가적인 벡터는 리포플렉스(lipoplex; 양이온성 리포솜-DNA 복합체), 폴리플렉스(polyplex; 양이온성 중합체-DNA 복합체) 및 단백질-DNA 복합체를 포함한다. 핵산에 덧붙여, 벡터는 한가지 이상의 조절 영역, 및/또는 핵산 전달 결과(어느 조직으로의 전달, 발현 지속기간 등)를 선택, 측정 및 감시하는 데 유용한 선택 가능한 마커를 또한 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 용어 "선별 마커"는 마커 유전자의 효과, 즉 항생제 저항성, 제초제 저항성, 비색(colorimetric) 마커, 효소, 형광 마커 등에 기초하여 선별될 수 있는 확인 인자, 일반적으로 항생제 또는 화학적 저항성 유전자이며, 여기서 상기 효과는 원하는 핵산의 유전을 추적 및/또는 원하는 핵산의 유전시킨 세포 또는 생물을 확인하는데 사용 된다. 본 기술분야에 알려져 사용되는 선별 마커 유전자의 예에는 암피실린, 스트렙토마이신, 젠타마이신, 카나마이신, 히드로마이신, 비알라포스(bialaphos) 제초제, 숄폰아마이드 등; 및 표현형 마커, 즉, 안토시아닌 조절 유전자, 이소헨타닐 전달효소 유전자 등을 포함한다.
- [0069] 본 발명의 일 구체 예에 있어서, 세포 내로 도입되는 벡터들은 발현될 때 상기 벡터가 숙주 세포 내로 도입되었음을 나타내는 "선별 마커 유전자"를 추가로 포함한다. 이 방식에서, 상기 선택 유전자(selector gene)가 벡터의 존재를 위한 양성 마커일 수 있다. 본 발명의 방법에 중요하진 않지만, 선별 마커 유전자의 존재가 실험자가 벡터 구조체가 세포 내로 도입된 살아있는 세포 집단을 선별할 수 있게 해준다. 따라서, 본 발명의 특정 구체 예에는 상기 벡터가 성공적으로 도입된 세포를 선별하는 것을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "선별" 또는 이의 변형은, 세포와 함께 사용될 때, 특정 유전적 기질이나 표현형을 갖는 세포를 선택하는 잘 알려진 표준 방법을 의미한다고 의도된다. 전형적인 방법에는 G418, 퓨로마이신(puromycin) 및 암피실린과 같은 항

생체의 존재 하에 세포를 배양하는 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 선별 마커 유전자의 다른 예에는 메토틱렉세이트(methotrexate), 히그로마이신(hygromycin), 또는 마이코페놀산(mycophenolic acid)에 대한 저항성을 부여하는 유전자들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 항생제 저항성 유전자 또는 유전자들을 포함하는 벡터 구조체를 포함하는 세포들은 배양 시 상기 항생제를 견뎌낼 수 있을 것이다. 마찬가지로, 항생제 저항성 유전자 또는 유전자들을 포함하는 벡터 구조체를 포함하지 않는 세포들은 배양 시 상기 항생제를 견뎌낼 수 없을 것이다.

[0070] 본 발명의 항체는 이미징 마커(imaging marker)와 결합시켜 순수 만능줄기세포를 검출할 수 있다. 항체-이미징 마커 결합체(antibody-imaging marker conjugated)의 투여와 확인 및 항체를 이미징 마커에 연결시키는 방법은 (Goldenberg et al., 1978, New England J. Med. 298, 1384-1388; Goldenberg et al., 1983, J. Amer. Med. Assoc. 280, 630-635; Goldengerg et al., 1983, Gastroenterol. 84, 524-532; Siccardi et al., 1986, Cancer Res. 46, 4817-4822; Epenetos et al., 1985, Cancer 55, 984-987; Philben et al., 1986, Cancer 57, 571-576; Chiou et al., 1986, Cancer Inst. 76, 849-855; Colcher et al., 1983, Cancer Res., 43, 736-742; Colcher, E. et al., Laboratory Research Methods in Biology and Medicine Immunodiagnostics. New York, Alan R. Liss. pp. 215-258(1983); Keenan, A.M. et al., 1984, J. Nucl. Med. 25, 1197-1203; Colcher D. et al., 1987, Cancer Res. 47, 1185-1189; Estaban, J.M. et al., 1987, Intl. J. Cancer 39, 50-59; Martin, D.T., et al., 1984, Curr. Surg. 41, 193-194; Martin, E.W. Jr. et al., 1986, Hybridoma 5, S97-S108; Martin, D.T. et al., 1985, Am. J. Surg. 150, 672-675; Meares et al., Anal. Biochem. 1984, 142, 68-78; 및 Krejcarek et al., 1977, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 77, 581-585) 등의 문헌에 기술되어 있다. 투여량은 만능줄기세포의 양에 따라 변할 수 있다. 항체-이미징 마커 결합체 투여량은 준 만능줄기세포로부터 순수 만능줄기세포를 가시화시키거나 확인할 수 있도록 효과적인 양이어야 한다.

[0071] 항체에 결합할 수 있는 이미징 마커의 예에는 당 분야의 기술자들에게 널리 알려져 있으며, 감마 스캐너(gamma scanner) 또는 수동 감마 프로브(hand held gamma probe) 또는 양성자 방출 단층 촬영기(positron Emission Tomography)등을 사용하여 진단상(diagnostic imaging)에 의하여 확인할 수 있는 물질과 또는 핵자기 공명 분광기(nuclear magnetic resonance spectrometer)등을 이용한 핵자기 공명상에 의하여 확인할 수 있는 물질을 포함한다. 감마 스캐너 등에 의하여 확인될 수 있는 물질의 적절한 예로서는 ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , 및 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 과 같은 방사성 동위원소를 포함한다. ^{125}I , ^{123}I , ^{153}Sm 및 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 는 적은 에너지와 광범위한 확인이 적절하기 때문에 바람직하다. 핵자기공명 분광기 등을 이용하여 확인할 수 있는 물질의 예로는 가돌리늄(Gadolinium: Gd)이 있다.

[0073] 또한, 본 발명은 상기 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma)에 관한 것이다.

[0074] 본 발명에서 용어 "하이브리도마"는 하이브리도마 세포 또는 하이브리도마 세포주를 포함하는 의미로, 2개의 다른 종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 세포로, 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol, PEG) 등 세포융합을 일으키게 하는 물질이나 어떤 종의 바이러스를 사용하여 둘 이상의 동종 세포나 이종세포가 융합되어, 각기 다른 세포가 갖는 다른 기능을 하나의 세포 속에 통합시킨 세포 또는 세포주를 의미한다.

[0075] 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마는 이를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.

[0076] 상기 하이브리도마의 배양은 당 분야에 공지된 방법이라면 모두 가능한 것이고, 배양되는 배지는 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077] 상기 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용할 수 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 복수액으로부터 분리될 수 있다.

[0078] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0079] 진술한 바와 같이, 상기 항체는 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포에 결합할 수 있다. 따라서, 이를 포함하는 조성물을 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포가 포함된 줄기세포에 처리하면, 상기 항체는 순수 인간만능줄기세포 또는 준 인간만능줄기세포에 결합하게 된다. 따라서, 줄기세포를 순수 인간만능줄

기세포 및 준 인간만능줄기세포, 그리고 이들에 포함되지 않는 줄기세포로 나눌 수 있다.

- [0080] 상기 조성물은 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포를 검출하기 위해 항체를 포함하는 형태인 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 피하 투여가 포함된다. 바람직한 투여 방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 본 발명의 항체를 포함하는 조성물은 순수 인간만능줄기세포를 제거하기에 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 전형적인 투여량 수준은 표준 임상적 기술을 사용하여 최적화할 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명은 상기 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검출용 조성물을 포함하는 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포 검출 키트에 관한 것이다.
- [0082] 본 발명의 항체 및/또는 항체를 포함하는 조성물은 항원-항체 복합체 반응을 통해 이식될 또는 이식된 세포 중의 순수 인간만능줄기세포 또는 준 인간만능줄기세포를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라, 순수 인간만능줄기세포 및 준 인간만능줄기세포를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.
- [0083] 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.
- [0084] 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 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0085] 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 않는다.
- [0086] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정 가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 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 제한되
- [0087] 지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데하이드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, K₄ W(CN)₈, [Os(bpy)₃]²⁺, [Ru(bpy)₃]²⁺, [Mo(CN)₈]⁴⁻ 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선 동위원소에는 ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.
- [0089] 또한, 본 발명은 상기 하이브리도마를 배양하여 상기 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0090] 상기 하이브리도마의 배양은 전술한 바와 같다.
- [0091] 상기 항체는 예를 들어, 서열번호 1을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역 1(heavy chain complementary determine region 1; HCDR1), 서열번호 2를 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄; 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 상보성 결정영역 1 (light chain complementary determine region 1; LCDR1), 서열번호 5를 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는 순수 인간만능줄기세포에 특

이적인 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0093] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0094] 전술한 바와 같이, 상기 항체는 BSG/CD147 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일반적으로, BSG/CD147 항원은 다양한 종양 세포에서 과발현되는 양상을 보이는 것으로, 대상 세포에서 BSG/CD147 항원이 확인되면 해당 세포는 종양 세포일 확률이 높다고 볼 수 있다. 따라서, 상기 항체를 이용하여 암 진단용 조성물로 활용할 수 있다.

[0096] 또한, 본 발명은 분리된 시료에 상기 조성물을 처리하여, 상기 항체가 결합된 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 상기 항체가 결합된 단백질이 검출되면, 암으로 진단받을 가능성이 높다고 판단할 수 있다. 예를 들어, 상기 시료는 체액, 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청 등일 수 있고, 바람직하게는 혈청일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0098] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트에 관한 것이다.

[0099] 상기 키트는 전술한 바와 같다.

[0101] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 암 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0102] 상기 암은 BSG/CD147을 과발현하는 암일 수 있고, 예를 들어, 배아암, 결장암, 간암, 고환암, 교모세포종, 구강암, 기저세포암, 뇌종양, 담낭암, 담도암, 대장암, 후두암, 망막세포종, 바터팡대부암, 방광암, 복막암, 부신암, 비소세포폐암, 설암, 소세포폐암, 소장암, 수막종, 식도암, 신우요관암, 신장암, 악성골종양, 악성연부조직종양, 악성피부종, 악성흑색종, 안종양, 요도암, 위암, 유방암, 육종, 인두암, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성뇌종양, 직장암, 질암, 척수종양, 침샘암, 편도암, 편평상피세포암, 폐암 및 항문암 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0103] 구체적으로, 상기 암 치료용 조성물은 종양 세포의 성장을 억제하거나 사멸시켜 암을 치료할 수 있으나, 치료 이전에 제한되는 것은 아니다.

[0105] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0107] 실시예 1. 인간 만능줄기세포의 배양 및 인간 순수 만능줄기세포의 확립

[0109] 1-1. 인간 준 만능줄기세포의 배양

[0110] 인간 준 만능줄기세포 H9은 Wicell Research Institute에서 제공한 프로토콜에 따라 배양하였다. 임신한 CF1 생쥐의 배아 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs)를 적출 및 배양하여 γ -조사 (γ -irradiation) 또는 mitomycin (10ug/ml) 처리한 후에 지지 세포(feeder cell)로 사용하였다. 20%(v/v) KOSR (knockout serum replacement), 1%(v/v) NEAA, 0.1mM β -mercaptoethanol, 100U/ml penicillin-G, 100 μ g/ml streptomycin, 8~12ng/ml bFGF를 첨가한 DMEM/F12 (Invitrogen) 배지에서 배양하였고, 5~6일마다 계대 배양시에는 콜라게나아제 IV (1mg/ml)로 5분 간 처리 후에 황색 덩어리로 적절한 크기로 자른 후 새로운 지지 세포 위에서 배양하였다. 그 결과 크고 편평하게 자라는 배양된 준 인간만능줄기세포 모양을 볼 수 있다(도 1).

[0111] 1-2. 순수 인간만능줄기세포의 확립

[0112] 이하 "순수 인간만능줄기세포(naive hPSC)"라는 용어는 준 인간만능줄기세포 (primed hPSC) 와는 다르게 순수 인간만능줄기세포의 마커들을 발현하는 줄기세포를 의미하는 것으로서, ground 상태, 또는 intermediate, formative 같은 중간 상태의 줄기세포의 마커들을 발현하는 줄기세포를 의미한다.

[0113] 준 인간만능줄기세포 H9 (primed hPSC)를 이용하여 3 가지 다른 방법으로 순수 인간만능줄기세포 (naive hPSC)

로 전환을 유도하였다. 먼저 준 인간만능줄기세포 H9을 콜라게나아제 IV (1mg/ml)로 5분 간 처리하고, 황색 틱을 이용하여 적절한 크기로 자른 후에 미리 깔아둔 MEF 위에 옮겼다.

[0114] 다음날 순수 hPSC 세포 유도 배지인 2iL/X/F/P 배지 (1 μ M PD0325901, 3 μ M CHIR99021, hLIF(20ng/ml), 4 μ M XAV939, 10 μ M Forskolin, 2 μ M Purmorphamine, 20% (v/v) KOSR, DMEM/F12, 1% (v/v) L-glutamine, 1% (v/v) NEAA, 0.1mM β -mercaptoethanol, 1x penicillin-G, streptomycin) (Zimmerlin et al., 2016, Development 143:4368), 2iL/F/A 배지 (1 μ M PD0325901, 3 μ M CHIR99021, hLIF(1000U/ml), 10 μ M Forskolin, 아스코르브산(50ng/ml), bFGF(16ng/ml), 20% (v/v) KOSR, KO-DMEM, 1% (v/v) L- glutamine, 1% (v/v) NEAA, 0.1mM β -mercaptoethanol, 1x penicillin-G, streptomycin) (Duggal et al., 2015, Stem Cells 33:2686). 2iL/X/F/P와 2iL/F/A방법으로 유도한 세포는 형성/중간 상태 (formative/intermediate) 순수 인간만능줄기세포와 유사하며 (Taei et al., 2020, Exp Cell Res 389, 111924), 5% (v/v) 산소 배양기에서 계대 배양하며 준비하였다. 배양 후 3~5일이내에 돔 모양의 세포로 변하였고, 3~4일 간격으로 0.05% (v/v) 트립신-EDTA 또는 accutase (StemPro)를 이용하여 계대 배양하였다. 세포 생존을 높이기 위해 최초 계대 배양할때만 10 μ M Y-27632 (Tocris)을 처리하였다.

[0115] 그 결과 편평하게 자라는 배양된 준 인간만능줄기세포 모양과 비교하여 작은 돔 모양으로 자라는 순수 인간 만능줄기세포들을 볼 수 있다(도 1). 최소 4~5회 계대 배양한 순수 인간만능줄기세포 중에서 2iL/X/F/P방법으로 준비한 세포를 추후 면역 실험에 이용하였다.

[0116] 1-3. 다양한 암세포의 배양 및 혈액세포의 분리

[0117] 인간 배아암세포 NT-2와 2102EP를 10% FBS, 1%(v/v) NEAA, 100U/ml penicillin-G, 100 μ g/ml streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 인간 말초혈액 단핵구 세포 (human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 Ficoll-Paque Plus method (GE Healthcare, Seoul, Korea)에서 제시한 방법을 이용하여 분리하였다.

[0118] 1-4. FACS분석에 의한 세포표면 항원염색

[0119] 배양한 준 (primed H9) 및 순수 (H9-2iL/X/F/P) 인간만능줄기세포를 비교하기 위해 먼저 인간 준 만능줄기세포 마커로 알려진 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24, CD90의 발현 여부를 FACS로 먼저 분석하였다. FACS 분석을 위해서 콜라게나아제 IV로 분리한 세포를 TrypLE (Invitrogen)을 이용하여 단일 세포로 떼어낸 후 40 μ m 여과기(strainer)를 통과시킨 후 한 시료 당 약 2~3 x 10⁵세포를 사용하였다. SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24-PE, CD90-PE 항체를 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBA (1%(w/v) bovine serum albumin, 0.02% (w/v) NaN₃ in PBS)로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-라트 IgM-FITC, 항-마우스 IgM-FITC 또는 항-마우스 IgG-FITC (BD Biosciences)를 4℃에서 30분 간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest software(BD sciences)를 이용하여 PI (propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 결합 여부를 분석하였다. 또한 같은 방법으로 바탕 상태 순수 인간만능줄기세포 마커로 알려진 CD7, CD77, CD130발현도 관찰하였다.

[0120] 그 결과 준 인간만능줄기세포 마커들 중 CD90을 제외한 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, 및 CD24 발현이 순수 인간만능줄기세포에서는 감소함을 관찰하였고 순수 인간만능줄기세포 마커로 알려진 CD7과 CD77발현만 H9-2iL/X/F/P에서 증가하고 CD130은 증가하지 않은 순수 인간만능줄기세포가 유도되었음을 확인하였다 (도 2A 및 2B).

[0121] 1-5. RNA-Seq분석을 통한 순수 인간만능줄기세포 확인

[0122] Primed H9와 H9-2iL/X/F/P 세포의 총 RNA를 RNAiso PLUS (TAKARA) 시약을 이용해서 추출한 후, RNA-seq전사체 분석 (3BIGS, 경기도)을 통한 naive hPSC 연관된 유전자 31개의 발현을 비교하였다. 그 결과 primed hPSC에 비해 2iL/X/F/P 방법 (Zimmerlin et al., 2016, Development 143:4368)으로 유도한 naive hPSC 세포에서 15개의 naive hPSC 연관 유전자 (DPPA3/5, KLF2/4/5/17, TBX3, DNMT3L, NANOG, STAT3, GDF3, PRDM14, ESSRRB, GBX2, TFCP2L1, ZFP42/57)가 더 많이 증가하는 것을 관찰하여 순수 인간만능줄기세포가 유도되었음을 확인하였고(도 3), 이 결과는 2iL/X/F/P방법으로 naive hPSC세포를 유도할 수 있음을 의미한다.

[0124] 실시예 2. 하이브리도마 제조

[0126] **2-1. 순수 인간만능줄기세포에 특이적 항체 제조를 위한 미끼 면역주사 (decoy immunization)**

[0127] 순수 H9 세포의 분자에만 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 만들기 위해서, 6주 된 11 마리의 암컷 Balb/c 생쥐 오른쪽 발바닥에 2×10^6 개의 준 만능성 H9 세포를 -3, 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 주사하였고, 같은 수의 H9-2iL/X/F/P 세포를 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 왼쪽 발바닥에 각각 주사하고 22일 되는 날 면역주사 (immunization)된 마우스를 경추 탈골한 후 왼쪽 뒷발로부터 지방과 근육조직을 제거한 오금 림프절 (popliteal lymph node)을 적출하여 표면이 울퉁불퉁한 비광택 슬라이드 글라스 (frosted slide glass)를 이용하여 오금 림프절을 갈아서 단일세포화해서 준비하였다. 왼쪽 림프절 세포와 FO 미엘로마 세포를 1:5의 비율로 섞은 후, 혈청 없는 배지인 DMEM (Invitrogen)로 2번 세척한 후 1ml 50% (w/v) PEG1500 (polyethylene glycol, BMS, seoul, Korea)를 1분당 25방울이 섞이도록 넣어주었다. 1분 후 DMEM 배지를 1분간 3ml, 1분간 17ml, 1분간 20ml를 연속적으로 넣고, 5분 간 정치한 후 원심분리를 하여 세포를 모았다. 96웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰을 20% (v/v) FBS, 1XHAT (Sigma-Aldrich), HCS (hybridoma cloning supplement)가 포함된 DMEM 배지에서 약 2주간 배양하였고, 샌드위치 ELISA 방법을 이용하여 항체를 생산하는 하이브리도마 만을 선별하였다.

[0128] **2-2. 하이브리도마의 클로닝**

[0129] 항체가 발현되는 클론을 선별하기 위하여 샌드위치 ELISA (Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법을 사용하였다. 포획 항체 (Capture antibody)인 항-마우스 IgG 또는 IgM 항체를 $2 \mu\text{g/ml}$ 로 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 $100 \mu\text{l}$ 을 첨가해 37°C 에서 1 시간 반응시키고, 다시 항-마우스 IgG-HRP 또는 항-마우스 IgM-HRP (horseradish peroxidase, Sigma-Aldrich)의 1/5,000 희석액과 1시간 더 반응시켰다. PBST (0.05% (v/v) Tween-20 in PBS)로 3회 세척하고, OPD (o-phenylenediamine, Sigma사)와 H_2O_2 가 포함된 기질 용액을 첨가한 후 492nm에서 흡광도를 측정하여 항체를 생산하는 클론을 먼저 선별하였다.

[0130] 다음으로 각 클론의 배양액을 상기 실시예 1-4에 기술한 FACS 분석을 통해 H9-2iL/X/F/P 세포에 결합하는 하이브리도마를 선별하고 서브클로닝하여, H9-2iL/X/F/P 세포에 대한 결합력을 유지한 단일클론항체 군을 분비하는 33종의 하이브리도마 군을 선별하였으며 이중 항체 NPB35는 IgG1과 κ 사슬을 가진 항체로 인식 항원과 특성을 분석하였다.

[0132] **실시예 3. 단일클론항체 NPB35의 결합 특이성 분석 및 정제**

[0134] **3-1. 준 및 순수 인간만능줄기세포, 생쥐 배아섬유아세포, 인간 배아암세포에 대한 결합 특이성 분석**

[0135] 단일클론항체 NPB35의 각종 세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 FACS 분석을 수행하였다. 구체적으로, 준 인간만능줄기세포 H9과 상기의 H9-2iL/F/A 순수 만능줄기세포를 콜라게나아제 IV ($1 \mu\text{g/ml}$)를 5분 동안 처리해서 세포를 떼어내고, PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후, TrypLE 용액 (Invitrogen)을 넣고 37°C 에서 3분 간 반응시켰고, 생쥐 배아섬유아세포와 인간 배아암세포는 0.05% (w/v) trypsin-EDTA를 처리하여 떼어내었다.

[0136] 떼어낸 모든 세포는 단일세포로 분리하기 위해 $40 \mu\text{m}$ 여과기 (strainer) (BD Biosciences, Seoul, Korea)를 이용하여 여과시키고, 각 단일세포 (약 2×10^5 cell/ml)을 PBA (PBS pH 7.4, 1% BSA, 0.02% NaN_3)에 섞은 후, 단일클론항체 NPB35를 4°C 에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 anti-mouse IgG-FITC (BD Biosciences)를 4°C 에서 30분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest software (BD Biosciences)를 이용하여 propidium iodide (PI)-음성 세포에 대해서 항체 결합력을 분석하였다. 그 결과 NPB35는 생쥐 배아섬유아세포 (MEF)와 PBMC에는 결합하지 않았지만, 인간 준 만능줄기세포 H9과 순수 만능줄기세포 H9-2iL/F/A에 모두 결합하였고, 인간 배아암세포인 NT-2와 2102EP에도 결합하였다. 따라서 NPB35-A5는 인간 준 및 순수 만능줄기세포 모두에서 발현하는 표면항원을 인식하는 항체라는 것을 확인하였다 (도 4).

[0137] **3-2. 단일클론항체 NPB35의 정제**

[0138] 단일클론항체 NPB35-A5의 특성을 분석하기 위해 NPB35-A5 하이브리도마 배양액을 이용하여 항체를 정제하였다. 먼저 250ml 세포배양액을 회수하여 3,000rpm에서 5분 간 원심분리하여 상층액만을 사용하였다. 1ml Protein-G agarose (Amicogen)를 크로마토그래피 컬럼에 넣고, 컬럼을 연동 펌프 (peristaltic pump)에 연결하고, PBS (pH8)로 충분히 세척한 후 항체 배양액을 천천히 통과시켜 NPB35-A5 항체를 Protein-G 아가로스 컬럼에 결합

시켰다. PBS (pH8)로 충분히 세척한 후 0.2M glycine (pH 2.7)으로 항체를 용출하였고, 1M Tris-HCl (pH 9.0)를 첨가하여 용출액을 중화시켰다. 이 항체를 PBS (pH7.4)에 투석(dialysis)한 후 사용하였다. BCA 단백질 분석 키트(BCA™ Protein Assay Kit, Pierce)를 이용하여 정제된 항체량을 측정하고, SDS-PAGE를 이용하여 정제 양상을 확인하여 NPB35 항체가 순수하게 정제되었음을 확인하였고(도 5A), NT-2세포에 대한 농도 별 결합 활성을 측정하여 기능적인 항체임을 확인하였다(도 5B).

[0140] **실시예 4. 단일클론항체 NPB35가 인식하는 항원 동정**

[0142] **4-1. 단일클론항체 NPB35가 인식하는 세포표면 단백질 분자의 확인**

[0143] 세포 표면의 biotin 라벨링(biotinylation)은 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce)에서 제시한 프로토콜을 약간 수정하여 수행하였다. 100mm plate에 배양한 NT-2 및 2102EP ($1 \sim 2 \times 10^7$) 세포를 37℃에서 pre-warmed PBS (pH 7.4)로 2회 세척한 후 biotin (0.5mg/ml)이 녹아있는 cold PBS (pH 8.0)를 넣고, 4℃에서 30분 간 반응시킨다. cold PBS (pH 8.0)로 3회 세척 한 후 biotin labeling된 세포는 1% NP40 lysis buffer (25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 2μg/ml aprotinin, 100μg/ml PMSF, and 5μg/ml leupeptin, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄)를 이용하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 12,000rpm 속도로 30분 간 원심분리 해서 펠렛을 제거한 후, 상층액을 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. Protein-G agarose에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위해서, 상기 상층액 (cell lysate)에 20μl Protein-G agarose를 넣고 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 원심분리를 통해 그 Protein-G agarose를 회수하여 1% NP40 lysis buffer를 이용해 4~5회 세척한 샘플을 음성 대조군으로 사용하였다.

[0144] NPB35 항체에 의해 인식되는 항원을 면역침강하기 위해서 Protein-G agarose에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거한 세포 용해물에 NPB35 항체 2~4 μg을 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 20μl Protein-G agarose를 넣고 4℃에서 2시간 동안 더 반응시켰다. 면역 침강된 면역 혼합체를 1% NP40 lysis buffer를 이용해서 4~5회 세척하고, 각 항체에 결합된 항원을 용출하기 위해 5x 샘플 버퍼를 넣고, 100℃에서 7분 간 가열하였다. 용출된 단백질을 15% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 웨스턴 블로팅 하였다. 이 막을 5% (w/v) 스킵 밀크를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 0.1% (v/v) TBST로 3번 세척한 후, streptavidin-HRP (1:8,000; GE healthcare)를 실온에서 1시간 더 반응시켰다. 0.1% (v/v) TBST로 3번 세척하고, biotin 라벨링된 세포면단백질을 ECL 검출 키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과 단일클론항체 NPB35가 약 45 KDa 세포 표면단백질을 면역 침강시키는 것을 확인하였다(도 6A 및 6B).

[0145] **4-2. 단일클론항체 NPB35에 의해 면역침강된 항원의 동정**

[0146] 단일클론항체 NPB35에 의해 면역침강된 단백질을 Instant Blue staining solution (Expedeon)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다(도 6C). 단백질은 Shevchenko (Shevchenko, et al., Anal. Chem. 68:850-858, 1996)등의 방법에 따라 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해하였다. 젤 조각으로부터 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50% (v/v) 아세토니트릴로 세척하였다. 그 다음, 트립신 (8~10ng/μl)으로 8~10 시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 단백질 분해반응은 5μl 0.5% 트리플루오로아세트산의 첨가에 의해 종결하였다. 트립신에 의해 잘려진 단백질 단편들은 수용액 상태로 회수되었고, C18ZipTips(Millipore)을 이용하여 1~5μl 부피로 탈염 및 농축하였다. 이 농축액은 동량의 50% 수성 아세토니트릴에 포화된 α-시아노-4-하이드록시나믹산과 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 주입 펄스(injection pulse)에 의해 가속하였다. 300 레이저 샷의 누적 피크에 의해 각각의 단백질 스팟에 대한 질량 스펙트럼을 구하였다. 질량 스펙트럼의 분석을 위해서 트립신의 자가분해에 의해 생성된 펩타이드의 이온 피크 m/z(842.510, 2211.1046)를 표준 피크로 이용하였다. 분석이 완료된 질량 스펙트럼으로부터 단백질 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 ProFound 검색엔진(http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)을 이용하였다. 그 결과 단일클론항체 NPB35-A5의 항원이 BSG/CD147로 동정되었다 (도 6D).

[0148] **실시예 5. 단일클론항체 NPB35 항원 검증**

[0150] **5-1. Flag-tag된 BSG/CD147 유전자 발현에 의한 NPB35 항원의 검증**

[0151] 단일클론항체 NPB35의 항원이 BSG/CD147 인지를 확인하기 위해서, pCMV3-BSG-Flag (HG10186-CF, SinoBiological) 벡터를 구입하여 293FT 세포에 PEI 용액을 이용해서 transfection 시킨 후 1% NP40 lysis buffer를 이용하여 4℃에서 30분 간 반응시킨 후, 12,000rpm 속도로 30분 간 원심분리해서 펠렛을 제거한 상층액 (200~400ug)을 anti-Flag tag과 NPB35 항체로 면역침강한 후 면역침강된 항원이 rabbit BSG 항체에 의해 검출되는지를 확인하였다.

[0152] 그 결과, 약 36, 38KDa 단백질이 rabbit BSG 항체에 의해 검출되었다(도 7A). 이는 NPB35 항체가 BSG/CD147를 인식하는 것을 의미한다. 일반적으로 BSG/CD147는 176~385개의 아미노산으로 구성되어있고, 4개의 동종형이 존재하고, extracellular domain, transmembrane domain (TM), cytoplasmic domain으로 구성된 type I transmembrane glycoprotein이고, 이뮤노글로불린(Ig) 슈퍼 패밀리의 멤버임이 밝혀져 있다 (Kumar, et al., 2019, Life Sciences, 224:76). 또한, BSG/CD147은 다양한 암에서 과발현되어 종양 세포의 아포토시스를 억제하고, 종양 성장과 전이를 촉진하며, 악성 종양 형성에 관여함으로써 잠재적인 암 치료 타겟으로 부각되고 있다 (Landras, et al., 2019 Cancers, 11:1803).

[0153] 한편 2015년 일본의 Koichi Saito 그룹은 primed hESC lysate를 마우스의 발바닥에 면역 접종하여 BSG/CD147를 인식하는 단일클론항체를 만들었고, BSG/CD147이 미분화 상태에서 신경 세포로 분화 시 발현이 감소함을 보고하였다(Higashi et al., 2015 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 34:7). 본 발명에서는 NPB35에 의해 인식되는 BSG/CD147은 준 및 순수 인간 만능줄기세포에 모두 마커로 쓰일 수 있음을 확인하여, 범용적인 인간 만능줄기세포마커로 쓰일 수 있음을 제시하였다.

[0154] 한편 NPB35와 anti-Flag tag 항체에 의해 면역침강된 단백질의 크기가 서로 다르고(도 7A), 이 크기는 스트랩타 비딘 블롯의 단백질 크기 45 KDa와 다른데(도6A 및 6B), 이는 HEK293FT 에서 발현하는 재조합 BSG/CD147 단백질과 실제 세포에서 번역 후 변형이 일어나는 BSG/CD147 단백질이 다르다는 것을 의미한다.

[0155] **5-2. 단일클론항체 NPB35에 의해 면역침강된 BSG 항원 검증**

[0156] 단일클론항체 NPB35의 항원이 BSG/CD147 인지를 재확인하기 위해서, 1% NP40 lysis buffer를 이용한 NT-2 cell lysate를 NPB35 항체와 상업적인 rabbit polyclonal BSG (A1566, ABclonal) 항체로 각각 면역 침강한 후, 음성 대조군 단백질과 용출된 단백질을 15% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 nirtrocellulose membrane으로 옮겼다. 이 막은 5% (w/v) 스킵 밀크를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 0.1% (v/v) TBST로 3번 세척한 후, rabbit BSG 항체를 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% (v/v) TBST로 3번 세척 한 후, anti-rabbit IgG(H+L)-HRP (1:10,000)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 0.1% (v/v) TBST로 3번 세척한 후, ECL 검출 키트(GE healthcare)로 확인하였다.

[0157] 그 결과, NPB35와 rabbit BSG 항체에 의해 면역침강된 약 43KDa과 36KDa 단백질이 rabbit BSG 항체에 의해 검출되었다(도 7B). 이 결과는 NPB35와 rabbit BSG 항체가 인식하는 43kDa BSG/CD147은 번역 후 변형(PTM)된 것을 확인하는 것으로, 실제로 BSG/CD147는 27KDa의 non-glycosylated core protein, ~38KDa의 low-glycosylated (LG)-BSG와 40~60KDa의 high-glycosylated (HG)-BSG 형태로 검출된다고 알려져 있다(Kumar, et al., 2019, Life Sciences, 224:76; Landras, et al., 2019 Cancers, 11:1803).

[0158] **5-3. PNGase-F 처리를 통한 NPB35 항원의 검증**

[0159] NPB35 항원의 PTM 상태를 확인하기 위해, 1% NP40 lysis buffer를 이용한 NT-2 cell lysate에 NPB35와 상업적인 rabbit anti-BSG 항체 (A1566, ABclonal)를 이용하여 면역침강한 후 0.2M glycine (pH 2.5)을 이용하여 용출하였다. 이후, 1M Tris-HCl (pH 9.0)를 첨가하여 용출액을 중화시킨 후, PNGase-F (500U)를 37℃, 4시간 처리하고, rabbit BSG 항체로 검출한 결과, NPB35에 의해 면역침강된 low-glycosylated CD147 (LG-CD147)과 high-glycosylated CD147(HG-CD147)의 대부분이 non-glycosylated core CD147 단백질로 바뀐 것을 확인하였다(도 7C). 이 결과는 NPB35는 상업적인 anti-CD147항체와 달리 low- 및 high-glycosylated CD147를 모두 인식함을 보여준다.

[0161] 실시예 6. 인간 만능줄기세포에서 BSG/CD147의 기능 분석

[0163] 6-1. 미분화 및 분화된 인간 만능줄기세포에서 BSG/CD147 expression kinetics

[0164] 미분화 및 분화된 인간 만능줄기세포에서의 BSG/CD147의 발현 양상을 파악하기 위해서, 인간 준 만능줄기세포 H9을 콜라게나아제 IV($1\mu\text{g}/\text{ml}$)를 5분간 처리하여 콜로니를 떼어낸 후 0.1% gelatin을 코팅한 plate에서 45분간 incubation하여 MEF를 최대한 제거하였다. 인간 준 만능줄기세포 H9 colony만을 회수하여, DMEM/F12 배지로 2회 세척하여 bFGF를 최대한 제거한 후, 황색 팁을 이용하여 작은 절편으로 자른 후 10% FBS, 1%(v/v) NEAA, 0.1mM β -mercaptoethanol, 100U/ml penicillin-G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 1% Glutamax를 포함한 EB (embryoid body) 배지에 넣고, 4, 7, 10, 14일간 배양하였다. 각 날짜 별 세포를 회수하여 RNAiso Plus (TaKaRa)를 이용하여 세포의 총 RNA를 추출하였고, PrimeScripts RT Master mix (TaKaRa)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA (20-30ng)는 PowerUp SYBR Green Master Mix를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, 모든 전분화능 유전자 (Oct4, Sox2, Nanog) 발현은 EB 형성 후 급격히 감소하였고, 대표적인 분화 마커인 Pax6 (ectoderm)와 Gata6 (endoderm)는 EB 형성 4일 이후 크게 증가하였다. 한편, BSG/CD147는 EB 형성 후 급격히 감소하다가, EB 형성 10일에는 증가하는 양상을 보이지만, 미분화 인간 만능줄기세포보다는 전체적인 발현양은 낮았다(도 8). 이러한 결과로 BSG/CD147은 미분화 및 전분화능 관련된 인간 만능줄기세포의 기능에 관여함을 알 수 있다.

[0165] 6-2. BSG/CD147 녹다운된 인간 만능줄기세포에서 전분화능 유전자 분석

[0166] 인간 만능줄기세포에서 BSG/CD147의 기능을 분석하기 위해서, 준 인간만능줄기세포 H9을 콜라게나아제 IV($1\mu\text{g}/\text{ml}$)를 5분 간 처리하여 콜로니를 떼어낸 후 0.1% 젤라틴을 코팅한 플레이트에서 45분 간 인큐베이션하여 MEF를 최대한 제거하였다. 준 인간만능줄기세포 H9 콜로니 만을 회수하여 TrypLE solution을 37°C에서 3분 간 처리하고, 40 μm strainer를 이용하여 단일세포를 여과한 후, 각 단일세포 (3×10^5 cell/well)를 matrigel-coated 6 well plate에 깔았다. 다음날 accutarget 음성 대조군 siRNA (BIONEER)와 BSG siRNA (1) GUCACAGCCUCAAGUCACUtt (sense, 서열번호 17)와 AGUGACUUGAGGCGUGACTt (antisense, 서열번호 18)와 BSG siRNA (2) CUGUGAAGUCGUCAGAACAtt (sense, 서열번호 19)와 UGUUCUGACGACUUCACAGtt (antisense, 서열번호 20)는 BIONEER에서 제조하였다. BSG siRNA를 RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) solution을 이용하여 트랜스펙션한 후 BSG/CD147 녹다운 효율을 전사물에서 real-time PCR로 분석한 결과 BSG/CD147이 녹다운 될 때 Oct4, Sox2와 Nanog의 전사물 발현에서 Oct4 발현양은 크게 변화가 없었고, Sox2와 Nanog의 발현 양은 크게 감소하였다(도 9). 또한 BSG/CD147 녹다운 후에 발현을 전사물과 단백질 수준에서 확인한 후(도 10A,10B), 전분화능 마커 발현양을 웨스턴 블롯을 통해 조사해 본 결과, BSG/CD147발현이 감소함에 따라 SOX2 발현양은 크게 감소하였고, NANOG 발현양은 약간 감소하였고, OCT4 발현양은 변화가 없었다(도 10C). 이 결과는 BSG/CD147가 Sox2와 Nanog의 발현을 조절함으로써 만능줄기세포의 전분화능을 조절한다는 것을 보여준다.

[0168] 실시예 7. 단일클론항체 NPB35의 암세포 성장 억제

[0170] 인간 배아암 세포주 NT-2와 2102EP 세포와 인간 결장암 세포주 Colo205 세포 (5×10^4 cell/well)를 96웰 플레이트에 깔고, 24시간 배양하였다. mIgG와 NPB35 항체 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣고, 48시간 후에 CCK-8 (DOJINDO)을 10 μL 씩 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 용해된 포마잔 (formazan) 산물의 흡광도는 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 그 결과 NPB35 항체는 인간 배아암세포 NT-2와 2102EP 세포의 약 33%와 29%의 성장을 억제하였고, 인간 결장암 세포주 Colo205 세포의 약 31%의 성장을 억제하였다(도 11). NPB35 대신 mIgG를 처리한 것을 100% 하였을 때의 상대적인 비율로 나타내었다. 이는 NPB35가 암세포 성장을 억제하는 항체임을 보여준다.

[0172] 실시예 8. 단일클론항체 NPB35 유전자 및 아미노산 분석

[0174] 8-1. NPB35 항체 유전자의 증폭

[0175] 왕성하게 자라는 NPB35 하이브리도마 세포 (5×10^6)를 RNAiso Plus (TaKaRa)를 이용하여 세포의 총 RNA를 추출하였고, PrimeScripts RT Master mix (TaKaRa)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 항체 유전자를 클로닝하기 위해서 기존에 알려진 PCR 프라이머를 변형하여 사용하였다 (Wang, et al J. Immunol. Methods 233, 167, 2000). 중쇄 클로닝을 위해서 IgG1 불변영역에 반응하는 프라이머인 5'-GGAGTCGACATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTGGC-3'(서열번호 21)과 중쇄 가변영역의 N-말단에 반응하는 프라이머인 5'MH1 5'-CTCCGGAATTCARGTNMAGCTGSAGSAGTC-3'(서열번호 22)과 5'MH2- 5'-CTCCGGAATTCARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG-3'(서열번호 23)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 경쇄 (light chain) 클로닝을 위해서 카파사슬 불변영역에 반응하는 프라이머인 5'-GGTGTGACGCGATACAGTTGGTGCAGCATC-3'(서열번호 24)와 카파사슬 가변영역 N-말단에 반응하는 프라이머인 5'MK 5'-CGGAAGCTTGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA-3'(서열번호 25)과 primer 6 5'-GACATT GTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCT-3'(서열번호 26)과 primer 7 5'-GACATTGACGTGACCCAGTCTCCA-3'(서열번호 27)를 사용하였다. PCR 산물의 효율적인 클로닝을 위해서 경쇄의 경우는 3'-프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였고, 5'-프라이머의 경우 HindIII 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄인 경우에는 5'-프라이머에는 EcoRI, 3'-프라이머에는 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 각 중쇄 및 경쇄 반응액을 섞은 후 95℃(1분), 58℃(45초), 72℃(1분)으로 30회 반응시켰다. 그 결과, 중쇄 및 경쇄 불변영역에 해당되는 약 400, 390bp 의 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 증폭해낸 NPB35 항체 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 중쇄 PCR 산물은 EcoRI와 SalI으로 처리하고, 경쇄 PCR 산물은 HindIII와 SalI으로 처리한 후 1.0 % (w/v) 아가로스 겔에 전개시켜서 FavorPrep GEL제/ PCR Purification Kit (Favorgen)로 약 400bp와 390bp에 해당하는 DNA를 분리하였다.

[0176] 중쇄 유전자를 클로닝할 pBluescript KS+ 벡터를 EcoRI와 SalI으로 처리하고, 경쇄 유전자를 클로닝할 pBluescript KS+를 HindIII와 SalI으로 처리한 다음 FavorPrep GEL제/ PCR Purification Kit로 분리하였다. 각각의 두 DNA를 T4 DNA 리가아제(New England Biolab)로 연결하고, DH5α 세포에 형질전환한 다음, 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA 인서트를 가진 클론, 경쇄의 경우 약 390bp 크기의 DNA 인서트를 가진 클론을 선발하였다 (도 12A 및 12B).

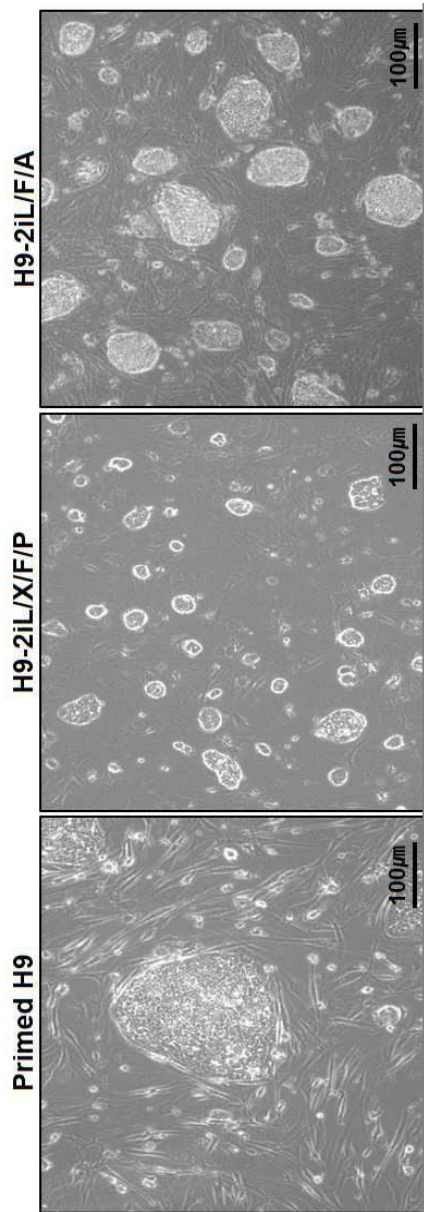
[0177] 8-2. NPB35 항체 유전자의 클로닝과 염기서열 분석

[0178] 항체 유전자들의 DNA 염기서열 분석을 위하여 상기의 여러 클론을 100μg/ml의 암피실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 배양한 후 플라스미드 DNA를 분리하고, 각각의 DNA 인서트의 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, 2001). 중쇄 서열(도 13)과 경쇄 서열(도 14)의 염기 서열 위의 숫자는 Kabat 넘버링에 따라 정하였다. 각각의 아미노산 서열을 분석한 결과 이 면역유전자들은 항체구조에 특징적인 잔기와 배열을 갖추고 있다.

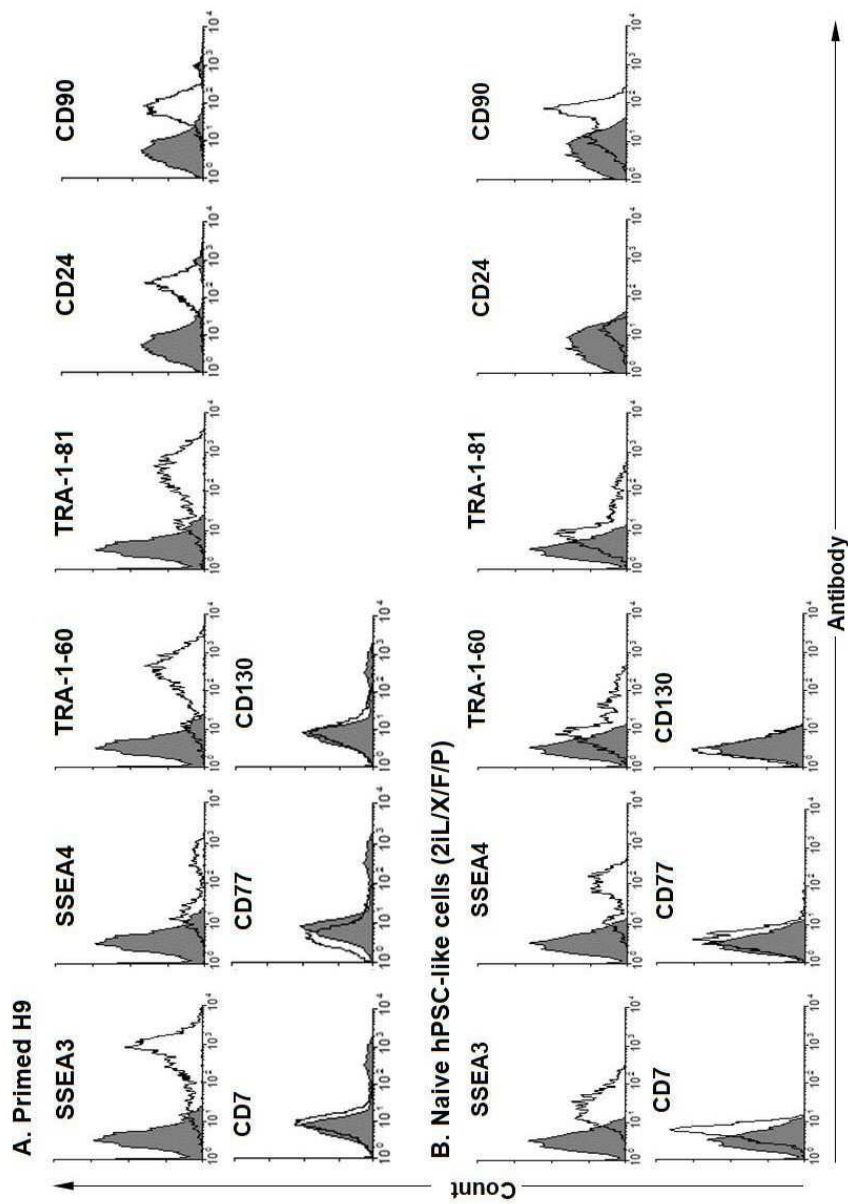
[0179] 구체적으로 살펴보면 면역글로불린의 여러 그룹 가운데서 중쇄는 서브그룹 VA에 속하고, 경쇄는 서브그룹 V에 속하였다. 항원을 인식하는 CDR 잔기로는 중쇄의 경우, CDR1은 26-35, CDR2는 50-68, CDR3는 101-106이며, 경쇄의 경우 CDR1은 24-34, CDR2는 50-56, CDR3는 89-97에 해당하였다. 구조상 필수적인 디설피드 결합은 중쇄의 경우 22번과 98번 시스테인이, 경쇄의 경우 23번과 88번 시스테인이 관여하였다. 이 유전자의 분석 결과로부터 중쇄 및 경쇄 유전자는 기능적임을 확인할 수 있었다.

도면

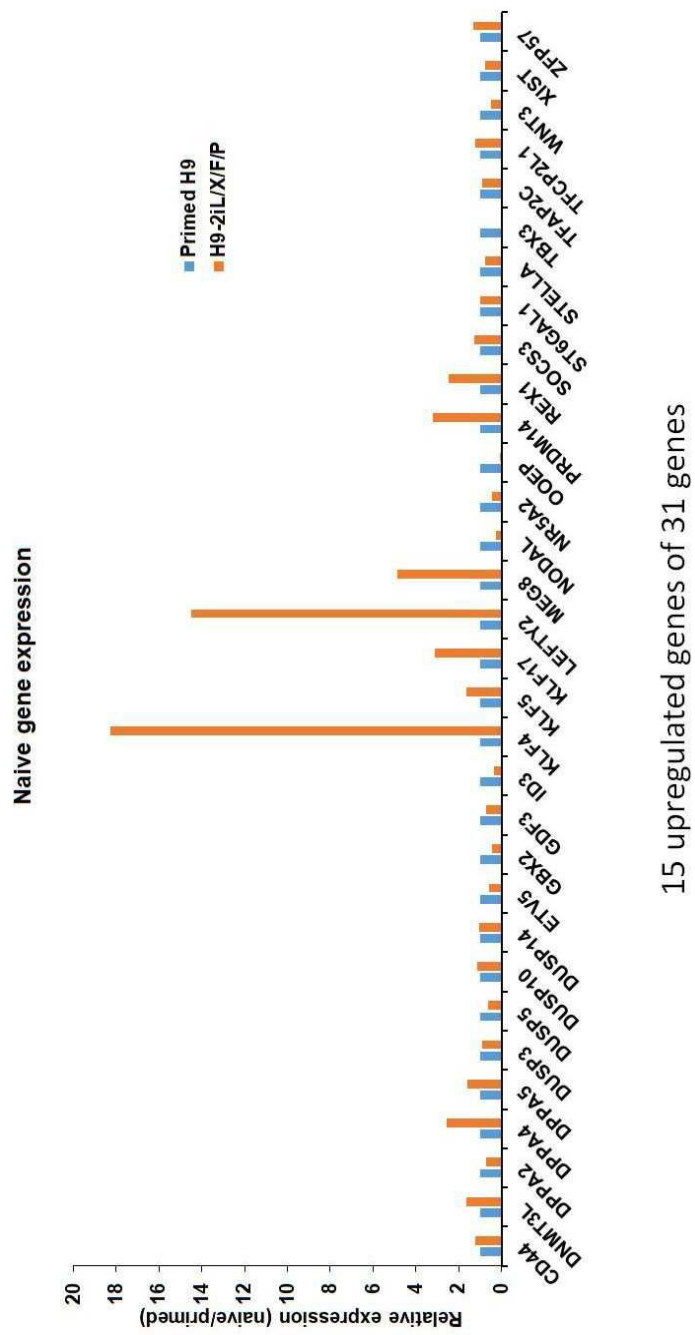
도면1



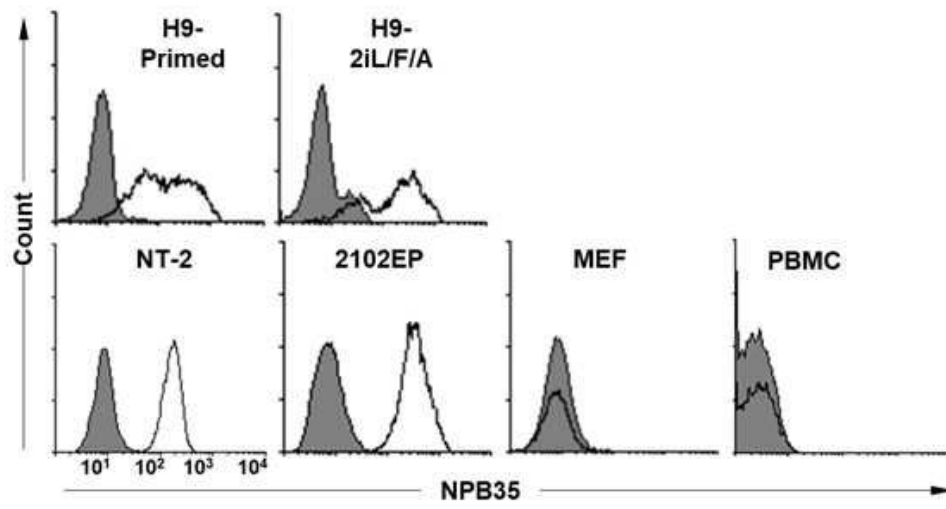
도면2



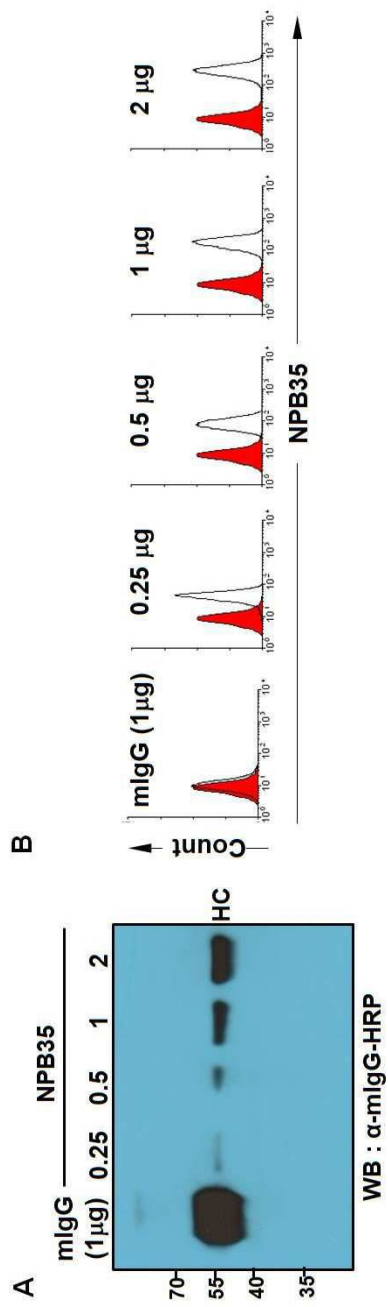
도면3



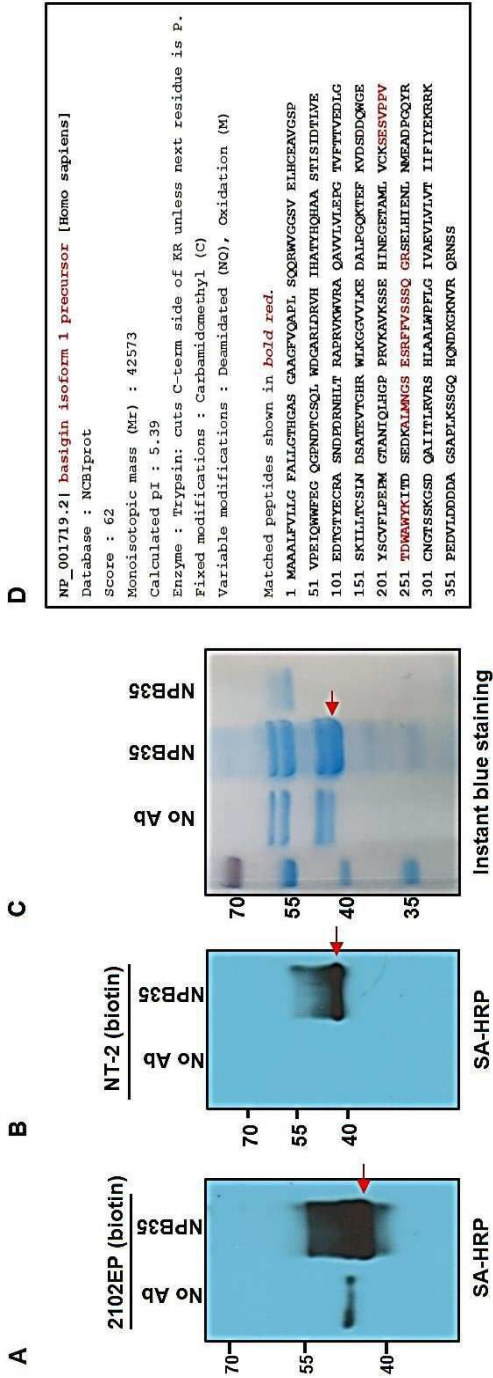
도면4



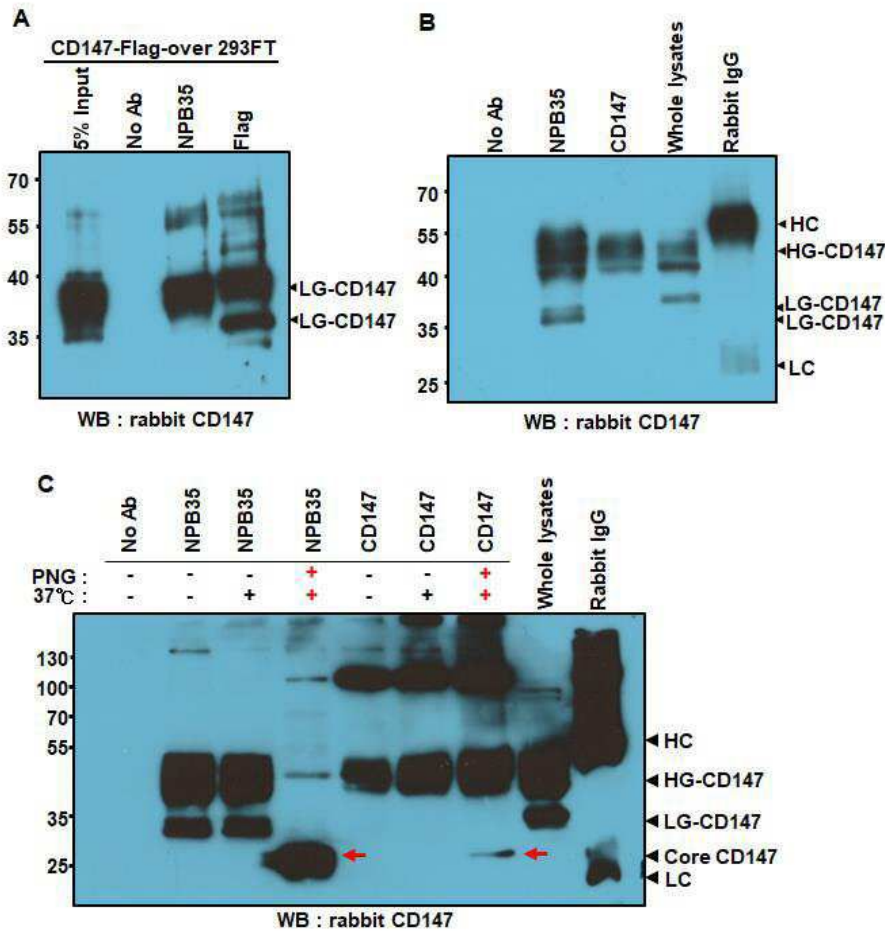
도면5



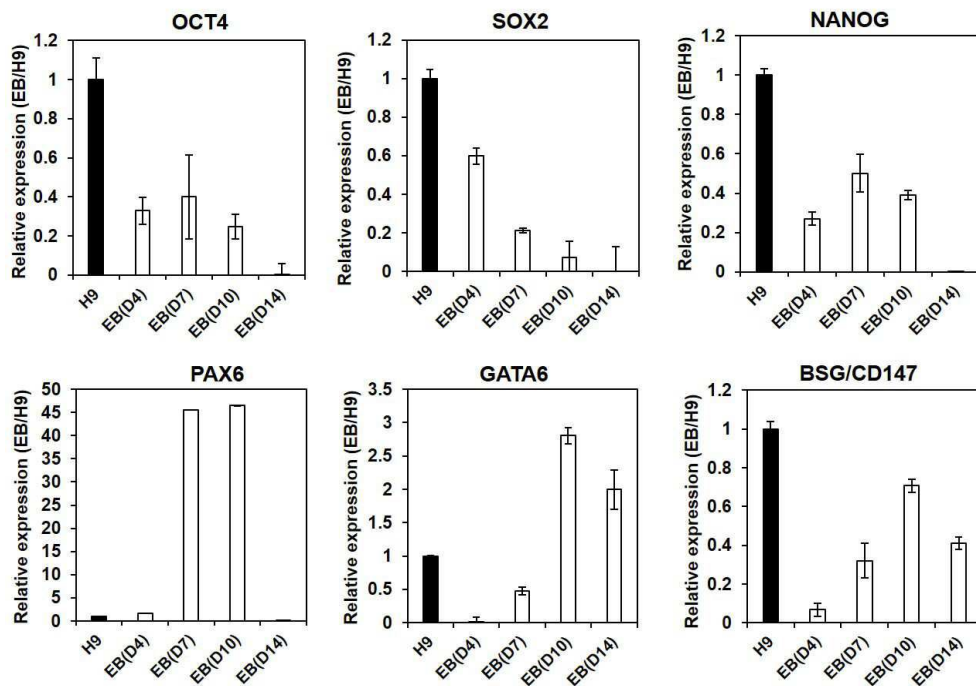
도면6



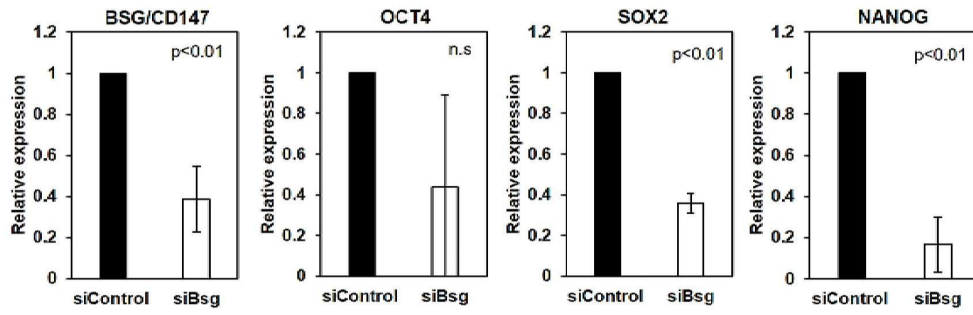
도면7



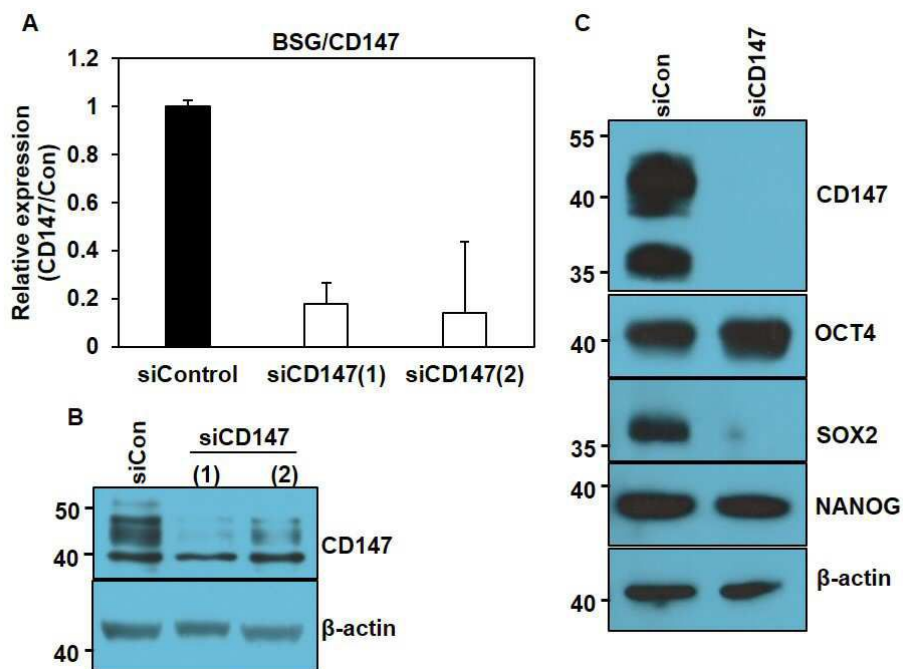
도면8



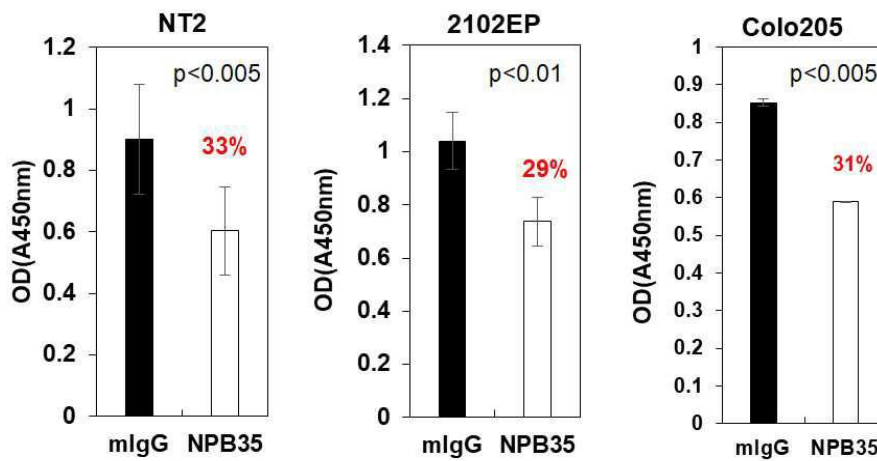
도면9



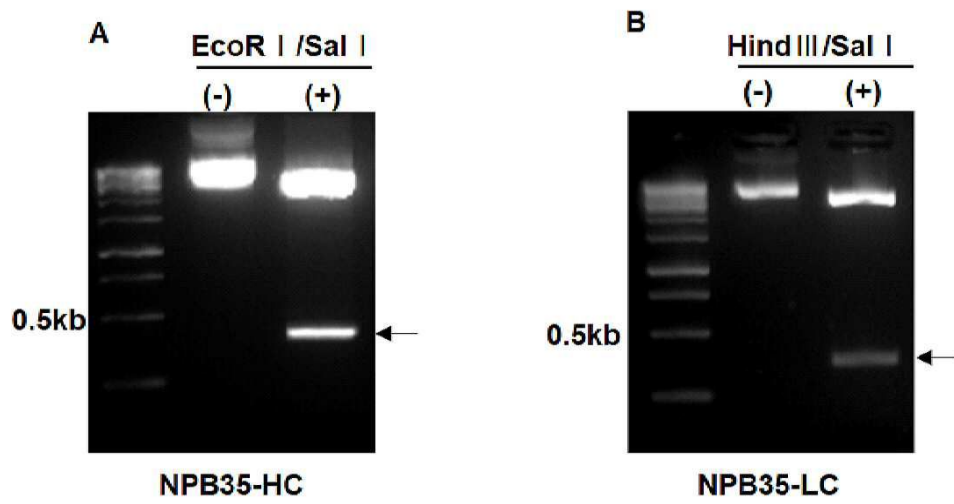
도면10



도면11



도면12



도면13

Heavy chain of NPB35-A5 : subgroup VA	
CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA GGA GGC TTG GTG CAA CCT GGA TCC ATG AAA CTC TCC TGT GTT GCC TCT	
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser	
CDR1 : 서열번호 1	
GGA TTC ACT TTC AGT AAC TTC TGG ATG AAC TGG GTC CGC CAG TCT CCA GAG AAG GGG CTT GAG TGG GTT GCT GAA	
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu	
CDR2 : 서열번호 2	
ATT AAA TTG AAA TCT AGT AAT TAT GCA ACA CAT TAT GCG GAG TCT GTG AAG GGG AGG TTC ACG ATC TCA AGA GAT	
Ile Lys Leu Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp	
GAT TCC AAA AGT AGT GTC TAC CTG CAA ATG AAC AAC TTA AGA GCT GAA GAC ACT GGC ATT TAT TAC TGT ACT CCC	
Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Pro	
CDR3 : 서열번호 3	
CTT ACT TCG GCT AAC TTC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA-351	
Leu Thr Ser Ala Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser-117	

도면14

Light chain of NPB35: subgroup V									
GAT	ATT	GTG	ATG	ACA	CAA	TCT	CCC	AAA	TTC
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys
CDR1 : 서열번호 4									
AGT	CAG	AGT	GTG	ACT	AAT	GAT	GTA	GCT	TGG
Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp	Val	Ala	Tyr
CDR2 : 서열번호 5									
GCA	TCC	AAT	CGC	TAC	ACT	GGA	GTC	CCT	GAT
Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp
CDR3 : 서열번호 6									
AGC	ACT	GTG	CAG	GCT	GAA	GAC	CTG	GCA	GTT
Ser	Thr	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val
GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG - 324									
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg - 108									

서열목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> Monoclonal antibody N15-F8 specific to naive human pluripotent stem cells
- <130> 21P02039
- <160> 27
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp Met Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<

400> 2

Glu Ile Lys Leu Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 3

Leu Thr Ser Ala Asn Phe

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 5

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3

<400> 6

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain sequence

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Glu Ile Lys Leu Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95
Tyr Cys Thr Pro Leu Thr Ser Ala Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain sequence

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 9

ggattcactt tcagtaactt ctggatgaac

30

<210> 10

<211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR2
 <400> 10
 gaaattaaat tgaatctag taattatgca acacattatg cggagtctgt gaagggg 57

<210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR3
 <400> 11
 cttacttcgg ctaacttc 18

<210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR1
 <400> 12
 aaggccagtc agagtgtgag taatgatgta gct 33

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR2
 <400> 13
 tatgcatcca atcgctacac t 21

<210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3
 <400> 14

cagcaggatt atagttctcc gtacacg	27
<210> 15	
<211> 351	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> heavy chain sequence	
<400> 15	
caggttcagc tgcagcagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc	60
tcctgtgttg cctctggatt cactttcagt aacttctgga tgaactgggt ccgccagtct	120
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attaaattga aatctagtaa ttatgcaaca	180
cattatgagg agtctgtgaa ggggagggtc acgatctcaa gagatgattc caaaagtagt	240
gtctacctgc aaatgaacaa cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtactccc	300
cttacttcgg ctaacttctg gggccaaggc accactctca cagtctctc a	351
<210> 16	
<211> 324	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> light chain sequence	
<400> 16	
gatatgtga tgacacaatc tcccaaattc ctgcttgtat cagcaggaga cagggttacc	60
ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaggcca	120
gggcagtctc ctaaactgct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtcctgat	180
cgcttcactg gcagtagata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct	240
gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagtt ctccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tggaaataaa acgg	324
<210> 17	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> BSG siRNA	
<400> 17	
gucacagccu caagucacut t	21
<210>	

> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BSG siRNA

<400> 18

agugacuuga ggcugugact t 21

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BSG siRNA

<400> 19

cugugaaguc gucagaacat t 21

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BSG siRNA

<400> 20

uguucugacg acuucacagt t 21

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

ggagtcgaca tagacagatg ggggtgtcgt ttggc 36

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc	32
<210> 23	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 23	
cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg	35
<210> 24	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 24	
ggtgtcgacg gatacagttg gtgcagcatc	30
<210> 25	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 25	
cggaagcttg ayatttgtmt sacmcarwct mca	33
<210> 26	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 26	
gacattgtgc tgaccaatc tccagttct	30
<210> 27	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer

<400> 27

gacattcagc tgaccagtc tcca

24