



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0123764  
(43) 공개일자 2009년12월02일

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01) C12N 5/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0134165

(22) 출원일자 2008년12월26일

심사청구일자 2008년12월26일

(30) 우선권주장

1020080048967 2008년05월27일 대한민국(KR)

1020080097589 2008년10월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울 광진구 군자동 98 세종대학교

(72) 발명자

류춘제

서울특별시 송파구 잠실동 44 레이크팰리스  
116-702

최홍서

서울특별시 광진구 군자동 76-14

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

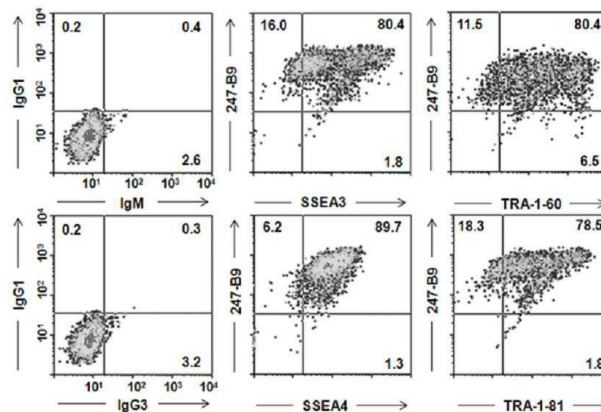
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체 247-B9

### (57) 요약

본 발명은 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마에 관한 것으로서, 구체적으로는 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하고 분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않거나 결합력이 현저히 약한 단일클론항체 247-B9와 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 247-B9, 상기 단일클론항체 247-B9을 포함하는 검정키트 및 인간 배아줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도13



(72) 발명자

**김하나**

제주도 제주시 화북주공 아파트 414동 105호

**김점지**

경기도 안양시 만안구 석수2동 럭키아파트 3동  
1205호

---

**김원태**

경기도 고양시 덕양구 관산동 동남빌라 가동 101호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 영역( $V_H$ ) 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역( $V_L$ )을 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 247-B9.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단일클론항체는 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하고 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않거나 현저하게 결합력이 약한 특징을 나타내는 단일클론항체 247-B9.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 단일클론항체는 미분화 인간 배아줄기세포의 약 37kDa 단백질을 인식하는 것을 특징으로 하는 단일클론항체 247-B9.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 단일클론항체는 IgG1.  $\kappa$  아이소타입이며, 미분화 인간 배아줄기세포 hnRNP A2/B1 유사단백질을 인식하는 것을 특징으로 하는 단일클론항체 247-B9.

### 청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 단일클론항체는 세포 표면의 hnRNP A2/B1 유사단백질을 인식하는 것을 특징으로 하는 단일클론항체 247-B9.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 단일클론항체 247-B9을 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기 세포 제거용 조성물.

### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 단일클론항체 247-B9을 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기 세포의 검정 키트.

### 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 단일클론항체 247-B9을 가하여 미분화 인간 배아줄기세포를 분리하는 방법.

### 청구항 9

중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 형질전환 비인간 동물로부터 얻은, 불멸화된 세포에 융합된 B세포를 포함하며, 청구항 1의 단일클론항체 247-B9 또는 그의 항원 결합 부위를 생산하는 하이브리도마.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

### 기술분야

<1> 본 발명은 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 247-B9 및 이를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다.

## 배경 기술

<2> 배아줄기세포(embryonic stem cell)는 생물을 구성하는 다양한 기능을 가진 모든 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포로서 생쥐, 원숭이, 사람 초기 배아의 배반포(blastocyst)나 상배엽(epiblast)에 미분화상태로 존재한다 (Evans et al., Nature, 292: 151-156, 1981; Thomson et al., PNAS 92:7844-7848, 1995; Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Brons, et al., Nature, 448: 191-196, 2007; Tesar, et al., Nature, 448:196-202, 2007). 이 세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 재생(self renewal)이라는 세포 분열에 의해 자신과 동일한 세포를 무한히 생산할 수 있으며, 다양한 환경 또는 분화 자극에 의해 우리 몸의 모든 기능성 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency)의 특징을 나타낸다. 배아줄기세포 연구의 역사적 배경을 보면 1981년 처음으로 생쥐 배아줄기세포(mESC, mouse embryonic stem cell) 배양법이 확립된 후(Evans et al., Nature, 292: 151-156, 1981), 1996년 영장류에서 전분화능 배아줄기세포 배양법(Thomson et al., Biol. Reprod., 55: 254-259, 1996)이 개발되었고, 1998년 미국의 톰슨(Thomson) 등에 의해 인간 배아줄기세포(hESC, human embryonic stem cell) 배양법이 확립되었다(Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998). 배아줄기세포는 모든 세포로 분화할 수 있는 전분화능을 갖고 있으므로, 질병이나 사고에 의한 특정 세포나 장기 손상시 줄기세포를 그 특정 세포로 분화를 유도하여 사용할 수 있을 것으로 기대됨에 따라, 여러 난치성 질환의 근원적 치료방법으로 부상하고 있다.

<3> 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 전분화능을 가진 배아줄기세포의 운명은 내부와 외부 신호의 조합에 의해 조절된다. 전사인자인 Oct4, Nanog, Sox2는 재생이나 전분화능을 유지하기 위한 필수적인 내부 조절인자로 알려졌다 (Boyer et al., Current Opinion in Genetics and Development 16:455-462, 2006; Boiani et al., Nat. Rev. Mol.Cell.Biol. 6:872-884, 2005). 그러나 전분화능 및 미분화 상태를 조절하는 배아줄기세포는 반드시 외부환경에서 오는 신호를 상대해야하는데, 그 이유는 생체 내(in vivo)에서 발생 동안 배아줄기세포는 실제로 수많은 다른 세포들에 둘러싸여 있기 때문이다. 발생을 유도하는 유전자 발현에서의 변화는 외부의 환경에서 오는 신호에 대한 반응에서 시작된다고 볼 수 있는데, 외부 환경의 변화에 관한 신호가 세포막이나 세포부착 분자들을 통해 내부로 전달되고, 이 신호의 궁극적인 타겟은 내부 인자인 Oct4, Nanog, Sox2로서 이들이 생체 내(in vivo)와 시험관 내(in vitro)에서 배아줄기세포의 재생과 전분화능을 조절하는 것이라고 볼 수 있다(Boiani et al., Nat. Rev. Mol.Cell.Biol. 6:872-884, 2005). 그러므로 어떤 특이적인 외부 분자가 존재하여 배아줄기세포 표면에 존재하고 이 분자를 통한 배아줄기세포 특이적인 외부 신호가 존재하는지 연구하는 것은 배아줄기세포의 효율적인 배양을 유도하는 배지 개발, 배아줄기세포 특이적인 마커 발굴, 세포 치료제에 잔류하여 암을 유발하는 미분화 배아줄기세포를 제거하는 것 등에 응용될 수 있다.

<4> 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 (Boyer et al., Current Opinion in Genetics and Development 16:455-462, 2006; Boiani et al., Nat. Rev. Mol.Cell.Biol. 6:872-884, 2005). 또 인간 배아줄기세포 (hESC, human embryonic stem cell)도 생쥐 배아줄기세포와 같이 전분화능을 가지고 있는 세포이므로, 시험관 내(in vitro) 조건에서 배아체(EB,embryoid body)를 형성시켜 분화를 유도하였을 때 다양한 모든 조직의 세포로 분화가 가능하다(Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Reubinoff, et al., Nat. Biotech., 18:399-404, 2000). 또 세포 배양시는 두 세포 모두 피더(Feeder)나 피더 세포 배양액이 있는 상태에서 배양이 가능하다는 유사점이 있고, 자가 증식이 가능한 세포에서 발현되고 있는 텔로머라제(telomerase)가 공통적으로 발현되고, 생쥐 배아줄기세포에서 발현하는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)는 인간 배아줄기세포에서도 발현되고 있다. 그러나 이런 유사점과 달리 인간과 생쥐 배아줄기세포를 배양할 때 많은 차이점도 존재한다. 두 세포는 형태학적으로 다르고, 배양시 자가 재생산이나 전분화능을 유지하기 위한 사이토카인 요구성도 다르다. 예를 들면, 생쥐 배아줄기세포는 재생을 위해 LIF (leukemia inhibitory factor)와 STAT3를 요구하나 사람은 이들이 필요하지 않다 (Smith et al., Nature 336:688-690, 1988; Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Daheron et al., Stem cells 22:770-778, 2004). 또 생쥐는 BMP (Bone morphogenic protein)가 재생에 필수적이거나 인간에서는 BMP가 오히려 분화를 촉진하는데 사용된다 (Ying et al., Cell 115:281-292, 2003; Xu et al., Nat. Biotech. 20:1261-1264, 2002). 인간 배아줄기세포의 재생을 촉진하는 데 사용되는 성장인자는 bFGF (basic fibroblast growth factor)로서, 실제로 피더 없이도 마트리젤™(Matrigel)(BD Biosciences, Seoul, Korea)과 bFGF 포함 배지만으로 인간 배아줄기세포를 시험관 내에서 배양할 수 있다 (Amit et al., Dev. Biol. 227:271-278, 2000; Xu et al.,

Nat. Biotech. 19:971-974, 2001). DNA 마이크로어레이(microarray)를 통한 전체 유전자 발현 분석결과에서도 인간의 배아줄기세포의 줄기성(Stemness)을 유지하기 위한 유전자 풀(pool)이 생쥐의 그것과 차이가 있다는 것을 알 수 있다 (Bhattacharya, et al., Blood, 103:2956-2964, 2004).

<5> 중간 배아줄기세포의 이와 같은 차이점에도 불구하고 현재 배양중인 미분화 상태의 인간 배아줄기세포의 재생 및 전분화능을 동정하고 정의하기 위하여, 인간 배아줄기세포가 아닌 생쥐 배아(embryo)나 사람 배아암세포(embryonal carcinoma)를 생쥐에 주사하여 만든 단일클론항체, 예를 들어 SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81등에 대한 항체들을 사용하고 있다. 그리고 이들 항원 중 인간에서는 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81가 모두 발현하고 SSEA1은 발현하지 않으나, 생쥐에서는 반대로 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81가 모두 발현하지 않고 SSEA1만 발현하는 현저한 차이가 있다 (Boiani et al., Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6:872-884, 2005). 그리고 이런 항체들에 의해서 정의되는 분자들은 대부분 탄수화물 항원성 부위(epitope)를 가지고 있어 그 기능이 여전히 알려지고 있지 않다 (Badcock, et al., Cancer Res. 59:4715-4719, 1999; Kannagi et al., EMBO. J. 2:2355-2361, 1983). 그리고 최근 결과에 따르면 오랫동안 전분화능의 주요 마커로 사용되어온 SSEA3, SSEA4가 실제로 전분화능과 무관한 단순 외부항원이라는 연구 결과가 나오기도 하여 여전히 그 기능이 확실하지 않다 (Brimble et al., Stem Cells, 25: 54-62, 2007). 단백질 마커로는 CD9, E-카테린(cadherin), 그리고 PODXL 같은 분자들이 산발적인 연구를 통해 미분화 인간 배아줄기세포 표면 단백질로 알려지고 있으나 그들의 재생과 전분화능에서의 역할에 대해서는 전혀 알려지지 않았다 (Cai et al., BMC Dev Biol, 5:26-33, 2005; Carpenter et al., Dev Dyn, 229:243-258, 2004; Choo, et al., Stem Cells. 26:1454-1463, 2008). 최근에는 IGF1R과 ERBB2가 미분화 인간 배아줄기세포의 생존과 재생에 중요한 새로운 후보 분자로 새롭게 보고되었지만 (Bendall et al., Nature, 448:1015-1021, 2007; Wang et al., Blood, 110:4111-4119, 2007), 여전히 미분화 배아줄기세포를 효율적으로 정의하고 동정하기 위한 단백질 표면 분자들에 대한 정보가 부족하기는 마찬가지이다.

<6> 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 유사한 유도만능줄기세포 (iPS, induced pluripotent stem cell)를 제조하는데 성공함으로써 면역거부반응문제는 빠르게 해결될 것으로 전망 된다 (Takahashi et al., Cell, 131: 1-12, 2007; Yu et al. Science, 318:1917-1920, 2007; Park et al. Nature 451:141-146: 2008). 그러나 안전성 확립 문제는 여전히 요원한데 iPS 세포도 배아줄기세포와 아주 유사하며 실제로 배아줄기세포처럼 면역결핍 생쥐에서 기형종(teratoma)을 형성하는 것으로 알려졌다 (Takahashi et al., Cell, 131: 1-12, 2007; Yu et al. Science, 318:1917-1920, 2007; Park et al. Nature 451:141-146, 2008). 따라서 iPS를 이용한 줄기세포 치료제 개발에서도 최대 장애물도 미분화 상태 줄기세포 잔류에 의한 암 발생 문제이다. 따라서 배아줄기세포를 이용하는 iPS 세포를 이용하든 이들을 이용한 세포 치료법 개발에서 중요한 것은 우선 미분화 상태의 세포들을 분리 제거해서 실제 동물이나 인체 내에서 안전성을 확립하여야 하는 일이다. 그러나 현재 사용되고 있는 미분화 인간 배아줄기세포를 확인하는 항체만으로는 미분화 상태의 세포의 특성을 정확히 분석하고 미분화 상태의 세포를 분리해내고 미분화 상태의 세포만 죽이는 것이 충분하지 않다. 따라서 효율적으로 이들을 인식하고 제거할 수 있는 항체 개발은 세포 치료제 개발을 위해 필요하다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명의 목적은 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하고 분화 유도한 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않는, 미분화 인간 배아줄기세포 표면의 hnRNP A2/B1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1) 유사 단백질을 인식하는 단일클론항체 247-B9를 제공하는 것이다.

<8> 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 제공하는 것이다.

<9> 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포 검정 키트를 제공하는 것이다.

<10> 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하기 위한 조성

물을 제공하는 것이다.

- <11> 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 사용하여 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제 해결수단

- <12> 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 영역( $V_H$ ) 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역( $V_L$ )을 포함하는 미분화 인간 배아줄기세포 특이적인 단일클론항체 247-B9를 제공한다.
- <13> 본 발명은 상기 단일클론항체가 미분화 인간 배아줄기세포에는 결합하고 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않거나 현저하게 결합력이 감소하는 특징을 나타낸다.
- <14> 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체가 미분화 인간 배아줄기세포의 약 37kDa 단백질을 인식하는 것을 특징으로 한다.
- <15> 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체가 IgG1.  $\kappa$  아이소타입이며, 미분화 인간 배아줄기세포 hnRNP A2/B1 단백질을 인식하는 것을 특징으로 한다.
- <16> 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체가 세포 표면의 hnRNP A2/B1을 인식하는 것을 특징으로 한다.
- <17> 또한, 본 발명은 단일클론항체 247-B9을 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기세포 제거용 조성물을 제공한다.
- <18> 또한, 본 발명은 단일클론항체 247-B9을 포함하는 것을 특징으로 하는 미분화 인간 배아줄기세포의 검정 키트를 제공한다.
- <19> 또한, 본 발명은 단일클론항체 247-B9을 가하여 미분화 인간 배아줄기세포를 분리하는 방법을 제공한다.
- <20> 또한, 본 발명은 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 계능을 갖는 형질전환 비인간 동물로부터 얻은, 불멸화된 세포에 융합된 B세포를 포함하며, 청구항 1의 단일클론항체 247-B9 또는 그의 항원 결합 부위를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.
- <21> 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.
- <22> 이러한 배경 하에서 본 발명자들은 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체군을 제조하기 위해 혈액줄기세포의 표면항원 CD133을 발굴하는데 사용된 미가면역주사방법을 응용하였다(Yin et al., *Blood*, **90**: 5002-5012, 1997). 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. 우리는 이들 항체군중 247-B9 항체가 인간배아줄기세포 표면의 hnRNP A2/B1 유사단백질을 인식하고 기존 알려진 항체와 다른 특성을 보이는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- <23> 하나의 양태로서, 본 발명은 미분화 인간 배아줄기세포의 표면에 존재하는 hnRNP A2/B1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1) 유사단백질로서 핵내 hnRNP A2/B1과 다른 형태를 취하는 hnRNP A2/B1을 인식하는 단일클론항체 247-B9에 관한 것이다.
- <24> 하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 247-B9은 미분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하고 분화된 인간 배아줄기세포에는 결합하지 않거나 약하게 결합하는 단일클론항체이다.

- <25> 또 다른 하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 247-B9은 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않고 인간 배아줄기세포만 특이적으로 인식하는 단일클론항체이다.
- <26> 바람직한 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 247-B9은 도 15, 16에 보이는 염기서열과 아미노산 서열을 가지는 단일클론항체이다.
- <27> 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.
- <28> 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')<sub>2</sub> 및 Fv 등이 있다.
- <29> 본 발명자는 미분화된 인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체를 생산하기 위해 미끼면역주사방법을 사용하였다. 구체적으로 인간 배아줄기세포 (도 1A)를 레티노산으로 분화 유도한 후 완전분화가 유도된 것을 확인하고 (도 1B), 이 분화된 인간 배아줄기세포를 미끼면역원으로 생쥐 뒷발 오른쪽에 먼저 주사하고 나중에 미분화 인간 배아줄기세포를 왼쪽에 주사하여 두 세포에 공통으로 존재하는 표면 항원들에 대한 항체들은 왼쪽 뒷발 림프절에서 제거되게끔 한 후 이 왼쪽 림프절의 림프구를 분리하여 단일클론항체군을 제조하고 그중 247-B9 항체를 이용하여 항원을 분석하였다.
- <30> 구체적으로, 인간 배아줄기세포를 배양한 후 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)를 통한 SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 분자들의 발현분석을 통하여, 인간 배아줄기세포에 음성마커인 SSEA1에 대한 항체는 상기 세포에 결합하지 아니하고, 양성마커인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81에 대한 항체는 결합한다는 것을 확인하였다(도 2A). 이 세포에 레티노산을 처리하면 이들 양성 마커들이 전부 음성으로 변하고 상대적으로 SSEA1은 발현이 증가함으로써 이 세포의 분화가 완전히 진행되었다는 것을 확인할 수 있었다(도 2B). 이렇게 준비한 미끼면역원과 진정한 면역원을 미분화 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체군의 제조에 이용하였다.
- <31> 이어서, 상기 배양된 인간 배아줄기세포를 콜라게나제로 떼어낸 후 이를 마우스의 뒷다리 발바닥을 통해 면역주사하고 이 왼쪽 다리의 오금 림프절을 분리하여 림프구를 얻어 암세포와 융합하여 제조한 하이브리도마로부터 본 발명의 구체적 양태인 단일클론항체군 480개를 분리하고, 그 중에서 79종의 항체가 미분화 인간 배아줄기세포 H9 표면에 결합하는 것을 확인하였다. 다시 그 중에서 33종이 인간 배아줄기세포 H9과 또 다른 인간 배아줄기세포 H1에 대한 결합하는 것을 구체적으로 미분화 인간배아줄기세포에 결합함을 확인하였으며, 이들이 생쥐 배아줄기세포, 생쥐 배아섬유아세포(MEF, mouse embryonic fibroblast) 등에는 결합하지 않거나 약하게 결합하는 것도 확인하였다. H9 세포를 레티노산으로 처리하여 분화시킨 세포에서 이 33종의 항체 결합이 현저하게 감소하는 것을 확인하였으며, 또한 배아체(Embroid Body)로 분화시킨 H9 세포에도 현저하게 결합이 감소하는 것을 관찰하였다. 이들 항체 중에서 항체 247-B9는 IgG1과 카파사슬을 가진 단일클론항체로 미분화 배아줄기세포에 결합하고, 분화된 배아체세포, 레티노산 처리된 배아줄기세포에는 결합이 감소하고, 생쥐배아줄기세포, 생쥐배아섬유아세포, 말초혈액단핵세포에는 결합하지 않는다는 것을 플로우 사이토메트리로 확인하였고 (도 3). 다양한 암세포에서 이 항체가 표면에 잘 결합하는 것을 관찰할 수 있었다 (표 1). 그리고 247-B9항체는 다른 미분화 인간배아줄기세포 표면 마커들처럼 레티노산으로 분화 유도시 그 발현이 현저히 감소하였다(도4). 이 항체의 정확한 분석을 위해서 항체를 생산하는 하이브리도마를 생쥐 복수에 주사하여 복수액에서 항체를 정제하였다(도 5). 또한, 본 발명의 단일클론항체가 인식하는 항원을 검출하는 실험에서 미분화 인간 배아줄기세포 추출액에서 약 36, 37 kDa 단백질을 면역 침강시키는 것으로 확인되었다(도 6). 본 발명의 단일클론항체가 인식하는 인간 배아줄기세포의 단백질의 분자량은 10% SDS-PAGE를 이용하여 측정한 것으로서, 분자량의 측정 조건에 따라 일정 범위 내에서 약간의 오차가 있을 수 있다. 따라서, 단백질의 분자량을 제시함에 있어 용어 "약"의 사용을 피할 수 없으며, 일반적으로  $\pm 2$  kDa, 바람직하게는  $\pm 1$  kDa의 범위를 가질 수 있다. 단일클론항체 247-B9가 인식하는 단백질을 면역침강 후 SDS-PAGE에서 분리한 후 트립신으로 절단하여 PMF (Peptide Mass Fingerprinting)분석으로 그 단백질이 hnRNP A2/B1이라는 것을 확인하였다(도 7, 8). 이 항원이 정말 hnRNP A2/B1인지를 알려진

생쥐 단일클론항체 항-hnRNP A2/B1을 이용하여 웨스턴 블라팅을 통해 다시 확인하였으며(도 9 아래 패널), 이 항원이 공지의 항체와 달리 미분화 인간 배아줄기세포의 표면에서 hnRNP A2/B1을 특이적으로 인식함을 관찰하였다(도 9 위 패널). 실제로 플로우 사이토메트리 실험에서 hnRNP A2/B1에 대한 공지의 항체로는 세포 표면의 hnRNP A2/B1을 인식할 수 없지만 247-B9으로는 인간배아줄기세포 표면을 인식할 수 있었다(도 10). 면역세포화학적 방법으로 관찰해보면 이 항체가 미분화 인간배아줄기세포의 콜로니에서 기존 공지의 항체인 hnRNP A2/B1과는 달리 세포 표면에 결합하고 (도 11A), 세포에 구멍을 내어 내부를 염색했을 때는 hnRNP A2/B1과 동일하게 핵을 염색하는 것을 관찰할 수 있었다(도 11B). 이것은 247-B9항체는 핵과 세포표면에 존재하는 hnRNP A2/B1 유사 단백질을 인식하며 특히 세포표면에서의 결합은 공지의 hnRNP A2/B1 항체와는 다른 특성이다. 한편 이 hnRNP A2/B1 유사 항원은 배아체로 분화되어가는 동안 그 발현이 인간배아줄기세포 표면에서 7일 이후부터 급격히 감소하는 것이 확인되었다(도 12). 그리고 247-B9 항체가 기존 미분화 인간배아줄기세포 마커로 알려진 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 항체 양성인 세포들의 92% 이상에서 양성임을 보여줌으로써 이 항체가 미분화 마커로 사용될 수 있음을 보여 주었다(도 13). 이러한 특성을 가진 247-B9 항체의 유전자를 중합효소연쇄반응방법으로 클로닝하였으며(도 14), 그 중쇄 및 경쇄 염기서열과 아미노산 서열을 결정하여 이 항체가 기존에 알려지지 않은 유일한 아미노산 서열을 가진 항체임을 확인하였다(도 15, 16).

<32> 본 발명의 247-B9가 인식하는 단백질은 hnRNP A2/B1으로서 RNA 결합 단백질이나, 최근 연구에서는 사람 암세포 원형질막에서 알부민에 결합하는 것으로 알려졌고(Fritzschke, et al., Biochem. Pharmacol. 67:655-665, 2004), 폐암에서 초기 바이오 마커로 알려졌다(Sueoka, et al., Cancer Res. 61:1896-1902, 2001). 본 발명에서는 hnRNP A2/B1 유사 단백질이 미분화 인간 배아줄기세포 표면에서 발현되고 이 단백질을 특이적으로 인식할 수 있는 새로운 항체인 247-B9를 제조하였다. 또한, 이 단백질의 발현이 미분화 인간 배아줄기세포가 분화할 때 감소한다는 것도 밝혀냄으로써(도 12), 미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 정의해 주는 중요한 세포표면 마커로 작용할 수 있으며, 이를 이용하여 순수 미분화 인간 배아줄기세포를 분리하는데 사용할 수 있음을 입증하였다. 또한, 본 발명의 247-B9 항체가 hnRNP A2/B1에 대한 공지의 항체와는 다른 결합 양상을 보인다는 것을 웨스턴 블라팅, 플로우 사이토메트리, 및 면역세포화학적 방법으로 확인하였다(도 9, 10, 11). 이러한 일련의 과정을 통해, 본 발명의 단일클론항체는 본 발명 이전에 개발된 공지의 hnRNP A2/B1에 대한 항체와는 상이한 항원성 부위(epitope)를 인식하는 새로운 항체임을 입증하였다.

<33> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 바와 같은 본 발명의 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다. 본 발명은 미분화 인간 배아줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 발현할 수 있는 형질전환 비인간 동물, 예를 들어 형질전환 마우스로부터 단리된 B세포를 제공한다. 바람직하게는, 단리된 B 세포는 정제된 미분화 인간 배아줄기세포 또는 상기 세포가 풍부한 제제를 사용하여 면역화된 형질전환 비인간 동물, 예컨대 형질전환 마우스로부터 얻는다. 바람직하게는 형질전환 마우스와 같은 형질전환 비인간동물은 인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는다. 계속하여 단리된 B세포를 불멸화함으로써 미분화 인간 배아줄기세포에 대한 단일클론항체의 공급원을 제공한다.

<34> 하나의 구체적 양태에서, 본 발명은 단일클론항체 247-B9을 생산하는 하이브리도마를 제공한다.

<35> 구체적 실시에서, 본 발명의 하이브리도마는 미분화 인간 배아줄기세포와 분화 배아줄기세포를 생쥐의 뒷 왼쪽 오른쪽 발바닥에 각각 주입한 후 상기 생쥐의 왼쪽 오금에서 림파구를 분리하여 골수종 암세포와 융합하여 제조하였다.

<36> 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마는 이를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.

<37> 상기한 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액(ascites fluid)으로부터 분리될 수 있다.

<38> 본 발명의 구체적 실시에서는 본 발명의 단일클론항체의 대량 생산을 위해 하이브리도마를 생쥐의 복강에 주사하여 복수액에서 배양하고 단백질 G-세파로스(sepharose) 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

<39> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 247-B9을 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.

<40> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 247-B9을 사용하여 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하는 방법에 관한 것이다.

- <41> 본 발명의 단일클론항체는 세포치료를 위해 이식될 세포 중에 존재하는 배아줄기세포를 제거하거나, 이식된 세포 중에 존재하는 배아줄기세포를 제거하기 위해 사용될 수 있다.
- <42> 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.
- <43> 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.
- <44> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체를 포함하는 미분화된 인간 배아줄기세포의 검정 키트에 관한 것이다.
- <45> 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.
- <46> 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.
- <47> 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 텍스투란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.
- <48> 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.
- <49> 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  $\beta$ -글루쿠로니다제,  $\beta$ -D-글루코시다제,  $\beta$ -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린 에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제,  $\beta$ -라타마제 등이 있으며, 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논,  $K_4 W(CN)_8$ ,  $[Os(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[MO(CN)_6]^{4-}$  등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선 동위원소에는  $^3H$ ,  $^{14}C$ ,  $^{32}P$ ,  $^{35}S$ ,  $^{36}Cl$ ,  $^{51}Cr$ ,  $^{57}Co$ ,  $^{58}Co$ ,  $^{59}Fe$ ,  $^{90}Y$ ,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{186}Re$  등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

## 효 과

- <50> 본 발명의 단일클론항체 247-B9은 미분화 인간 배아줄기세포의 세포표면 단백질을 특이적으로 인식하므로, 생

쥐와 고등동물인 인간의 초기 배 발달의 차이를 연구할 수 있는 도구를 제공하여 인간 배아줄기세포의 분석 연구에 이용할 수 있으며, 세포 치료시 미분화된 인간 배아줄기세포를 제거하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 또 인간 배아줄기세포의 무혈청 배지 개발에 대한 정보를 제공해 준다.

### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<51> 이하 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

#### <52> <실시예 1> 인간 배아줄기세포의 배양 및 분화유도

##### <53> <1-1> 배아줄기세포의 배양 및 레티노산 처리에 의해 분화된 배아줄기세포와 배아체 세포의 유도

<54> 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(Nunc)를 코팅한 후, 3000rad 감마 방사선을 조사한 MEF(CF1 mouse embryonic fibroblast, 세종대학교 실험동물실)를 웰당  $6.5 \times 10^4$  세포수로 접종하였다. 상기 방사선이 조사된 MEF는 성장하지는 않지만, 인간 배아줄기세포의 성장을 지지하는 세포이다. MEF 배양 24시간 후에 미국에서 구입한 인간 배아줄기세포 H1과 H9을, 제공한 프로토콜에 따라 37℃ 물중탕에서 서서히 녹인 다음 아래처럼 준비한 인간 배아줄기세포 배지 5ml에 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 1mg/ml의 콜라겐 분해효소 IV(Invitrogen, Seoul, Korea)를 처리한 후, 상기 줄기세포를 적당한 크기로 자른 후 다시 상기처럼 준비한 MEF 조직배양용 플레이트에 옮기고, 48시간 후부터 매일 배양액을 교체하며 배양하였다. 미분화된 인간 배아줄기세포의 콜로니 바깥쪽이 명확히 생쥐 배아 섬유아세포와 구별되는 것을 관찰할 수 있다(도 1A). 인간 배아줄기세포 배양에 사용된 배지는 DMEM/F12(Invitrogen, Seoul, Korea), 20%의 녹아웃SR(Knockout SR)(Invitrogen), 0.1mM의  $\beta$ -머캅토에탄올(Sigma-Aldrich, St. Luis, MO), 2mM의 글루타민(Invitrogen), 0.1mM의 비필수 아미노산(Invitrogen), 100U/ml의 페니실린 G(Sigma-Aldrich), 100 $\mu$ g/ml의 스트렙토마이신(Sigma-Aldrich), 4ng/ml의 bFGF(PeproTech, Rocky Hill, NJ)을 섞어 만든 배지를 사용하였다.

<55> 분화된 H9 세포를 유도하기 위해서 레티노산(RA)(all-trans-retinoic acid, Sigma-Aldrich)을  $10^{-5}$  M로 적어도 20일 이상 상기 배지에 넣고 배양하였다. 배양 2일째부터 배아줄기세포는 분화를 시작하여 6일째 경계선이 뚜렷하던 모습이 사라지고 세포가 전체적으로 넓게 퍼지는 것을 관찰할 수 있다(도 1B). H9 세포로부터 인간 배아체를 유도하는 과정은 분리된 인간 배아줄기세포 덩어리를 깨어지지 않게 조심하여 박테리아 플레이트(bacteria plate)에 잘 옮겨 EB 배양액{DMEM/F12, 20%의 FBS(Fetal bovine serum, Hyclone), 0.1mM의  $\beta$ -머캅토에탄올, 2mM의 글루타민, 0.1mM의 비필수 아미노산, 100U/ml의 페니실린 G, 100 $\mu$ g/ml의 스트렙토마이신}에서 배아체를 형성할 수 있도록 4일간 배양하였다. 이때, 매일 배양액과 플레이트를 교체하여 주었다 (Chadwick et al., Blood 102, 906-915, 2003). 마우스 배아줄기세포 J1은 방사선 처리된 마우스 배아섬유아세포인 CF1 세포상에서 15%의 FBS, 0.1mM의  $\beta$ -머캅토에탄올, 1mM의 글루타민, 0.1mM의 비필수 아미노산, 100U/ml의 페니실린 G, 100 $\mu$ g/ml의 스트렙토마이신, 그리고 500units/ml 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 분리하였다.

##### <56> <1-2> 플로우 사이토메트리에 의한 세포표면 항원염색

<57> 항체들의 각종세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 구체적으로, 미분화된 인간 배아줄기세포, 레티노산으로 처리된 인간 배아줄기세포를 콜라겐분해효소 IV(1 $\mu$ g/ml)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 $\mu$ m 스트레이너(strainer, BD Biosciences, Seoul, Korea)를 이용하여 여과시켰다. 단일세포를 ml당 약  $2 \times 10^5$  cell을 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in PBS)에 섞은 후, 항-SSEA1, 항-SSEA3, 항-SSEA4, 항-TRA-1-60, 항-TRA-1-81 (Millipore, Billerica, MA) 항체를 4℃에서 30분간 반응시켰다. 0.1% PBST(Phosphate buffered saline Tween 20)로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-라트 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 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81에서 양성이고 SSEA1에서는 음성임을 보여주고 있고(도 2A), 레티노산으로 분화를 유도한 H9 세포는 반대로 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81에서 음성이고 SSEA1에서는 약하게 양성임을 보여주고 있다(도 2B).

<58> <실시예 2> 하이브리도마 제조

<59> <2-1> 인간 배아줄기세포의 면역주사

<60> 인간 배아줄기세포 H9 세포를 20일 동안 레티노산처리하여 분화된 H9 세포를 준비하였다. 미분화 H9 세포와 분화된 H9 세포에 1mg/ml 콜라겐 분해효소 IV를 처리하여 세포를 떼어낸 후 파스퇴르 피펫으로 작은 크기로 잘게 부순 후 50μl PBS(pH 7.4)에 약  $2 \times 10^6$  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 찌러 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 단일 세포화해서 준비하였다. 미엘로마(myeloma) 세포인 FO 세포(ATCC, Manassas, VA)를 혈청 비첨가 배지로(serum-free media) 세척한 후, 40μm 세포 스트레이너를 이용하여 오금 림프절 세포와 FO 세포의 잔해물을 제거하였다. 미분화 H9 세포를 찌른 왼쪽 림프절 세포( $1.53 \times 10^8$ )와 FO 세포( $3.06 \times 10^7$ )를 1:5의 비율로 섞은 후, 혈청 없는 배지인 DMEM(Invitrogen)으로 2번 세척한 후 1ml 50% PEG1500 (polyethylene glycol, BMS, seoul, Korea)를 1분당 25방울이 섞이도록 넣어주었다. 1분 후 DMEM 배지를 1분간 3ml, 1분간 17ml, 1분간 20ml를 연속적으로 넣고, 5분간 정치한 후 원심분리하여 세포를 모았다. 20% FBS 포함된 DMEM과 HAT 구성요소(Sigma-Aldrich)와 50 ml 하이브리도마 클로닝 인자(hybridoma cloning factor, Bioveris, Gaithersburg, MD)에 융합된 세포를 96 웰 플레이트의 웰당  $2 \times 10^5$  세포 수 만큼 깔고, 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 세포 배양기에서 배양하였고, 3일 간격으로 200μl의 20% FBS와 HAT 구성요소를 포함한 DMEM으로 갈아 주었다.

<61> <2-2> 하이브리도마의 클로닝

<62> 하이브리도마 상층액에서 먼저 항체가 발현되는 클론을 선별하기 위하여 샌드위치(sandwich) ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법을 사용하였다. 항-마우스 IgG 또는 IgM 항체를 2 μg/ml로 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 100μl을 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 기질 용액을 첨가하고, 492nm에서 흡광도를 측정하여 항체를 생산하는 클론을 먼저 선별하였다. 다음으로 각 클론의 배양 상층액을 상기 실시예 <1-2>에 기술한 플로우 사이토메트리 분석을 통해 미분화 H9 세포에 결합하는 다양한 하이브리도마들을 선별하고 계대배양을 계속하며 서브클로닝하여, 확실하게 안정성을 유지하고 인간 배아줄기세포에 대한 결합력을 유지한 단일클론항체군을 분비하는 37종의 하이브리도마군을 선별하였다. 이 중 네 개의 항체는 다음의 다른 인간 배아줄기세포인 H1에 대한 결합력 실험에서 결합하지 않았다. 두 세포에 공통적으로 결합하는 항체 33종의 아이소타입은 마우스 이뮤노글로불린 아이소타이핑 키트(Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit, BD Biosciences)에서 제시한 방법을 이용하여 수행하여 결정하였다. 29개 항체는 IgG 형태이고 나머지 4개는 IgM 형태였다. 이들 중 항체 247-B9은 IgG1과 κ 사슬을 가진 항체로 본 발명에서 인식 항원과 특성을 분석하였다.

<63> <2-3> 단일클론항체의 정제

<64> 쥐의 복부에 247-B9항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 찌러 넣기 일주일 전 프리스테인(Pristane, SIGMA-Aldrich, Seoul, Korea)을 쥐 체중의 1/10 중량만큼 취해 복강에 주사하였다. 일주일 뒤 항체를 생성하는 247-B9 하이브리도마  $1 \sim 5 \times 10^6$ 을 0.5ml의 PBS에 부유시키고 쥐의 복부에 찌러 넣고 1~2주 동안 쥐의 복부가 불러오는 것을 확인하고 복수(Ascites fluids)를 채취하였고, 채취한 복수를 사용하여 항체를 정제하였다. 추출한 복수액은 37℃에서 30분 반응시킨 다음 2,500rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 상기 복수액 1 ml에 PBS를 첨가하여 2ml로 희석시켰다. 또한, 1mM의 EDTA와 0.02%의 NaN<sub>3</sub>를 상기 복수액에 첨가하고, 0.22μm 여과기로 여과하였다. 이 항체의 순수 분리를 위해서 단백질 G-세파로스 컬럼 크로마토그래피 방법으로 분리하

였다. PBS로 미리 평형화시킨 단백질 G-세파로스 컬럼(Pharmacia, 스웨덴)에 항체 용액을 천천히 통과시키고 컬럼을 펄리스트라틱 펌프(peristaltic pump)에 연결하여 PBS로 충분히 세척하였다. 세척 완료 후, 0.2M의 글리신(Glycin)-HCl(pH 2.7)으로 항체를 용출하였다. 이때 미리 준비한 1M의 Tris (pH 9.0)를 포함한 튜브에 상기 용출액을 완충시켰다. 이 항체를 PBS에 투석한 후 사용하였다. BCA 단백질 분석 키트(BCA™ Protein Assay Kit, Pierce)를 이용하여 정제된 항체 양을 측정하고, SDS-PAGE를 이용하여 항체 247-B9의 정제양상을 확인하였으며 순수하게 분리되었음을 알 수 있었다(도 5). 복수 1mL당 약 1~2mg/mL 농도의 정제된 항체를 얻을 수 있었다.

### <실시예 3> 단일클론항체 247-B9의 결합 특이성 분석

#### <3-1> 인간 및 생쥐 배아줄기세포와 각종 세포에 대한 결합 특이성

단일클론항체 247-B9의 각종세포에 대한 결합정도를 관찰하기 위해 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)를 수행하였다. 구체적으로, 미분화된 인간배아줄기세포, 레티노산으로 처리된 인간배아줄기세포를 콜라겐분해효소 IV(1 mg/mL)를 이용하여 15~20분 동안 처리해서 세포를 떼어냈다. PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후, 세포분리완충액(cell dissociation buffer, Invitrogen)을 넣고 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 단일세포로 분리하기 위해 40μm 스트레이너(BD Biosciences, Seoul, Korea)를 이용하여 여과하여 잘 분리된 단일세포만 사용하였다. 또한, 세포분리완충액을 이용하여 인간 배아세포 및 여러 가지 암세포를 떼어냈고, PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후, 40μm 스트레이너를 이용하여 여과한 후 사용하였다. 각 단일세포를 mL당 약  $2 \times 10^5$  cell을 PBA(1% bovine serum albumin, 0.02% NaN<sub>3</sub> in PBS)에 섞은 후, 항-SSEA1, 항-SSEA3, 항-SSEA4, 항-TRA-1-60, 항-TRA-1-81 (Millipore, Billerica, MA)와 단일클론 항체 247-B9를 4℃에서 30분간 반응시켰다. 0.1% PBST로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-라트 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. 도 3 에서 실선은 단일클론항체이고 회색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 단일클론항체 247-B9가 인식하는 표면항원은 미분화 상태의 인간배아줄기세포인 H1, H9에서는 강하게 발현되었지만 분화된 EB, RA세포에서는 발현이 감소함을 볼 수 있었다(도 3). 또한, 인간배아줄기세포와 유사한 외부 표면항원을 가진 인간 배아암세포인 NT2/D1와 다른 일부 암세포(A375, NCI-H69, SH-SY5Y)에는 결합하였지만, 생쥐배아줄기세포(mESC J1), 생쥐배아섬유아세포(MEF)에는 결합하지 않고, 인간 PBMC 세포에는 극히 일부세포가 결합하는 것을 볼 수 있었다(도 3). 그 외 다양한 암세포에서 이 항체가 표면에 잘 결합하였으며 일부 결합하지 않은 것도 관찰할 수 있었다(표 1).

표 1

표1. 다양한 세포에 대한 단일클론항체 247-B9 결합능력

| 세포주이름       | 세포유래                            | 결합정도 |
|-------------|---------------------------------|------|
| H9          | Human embryonic stem cell       | +++  |
| H1          | Human embryonic stem cell       | +++  |
| NT-2(cl.D1) | Human embryonic carcinoma       | +++  |
| mES(J1)     | Mouse embryonic stem cell       | -    |
| MEF         | Mouse embryonic fibroblast      | -    |
| PBMC        | Peripheral blood monocytes      | -    |
| A172        | Glioblastoma, brain             | -    |
| U-87MG      | Glioblastoma, brain             | ++   |
| A375        | Malignant melanoma, skin        | ++   |
| MDA-MB435   | Ductal carcinoma, breast        | ++   |
| MCF7        | Adenocarcinoma, breast          | +++  |
| ACHN        | Renal cell carcinoma, kidney    | -    |
| Colo-205    | Adenocarcinoma, colon           | +++  |
| NCI-H69     | Carcinoma, lung(SCLC)           | +++  |
| NCI-H522    | Adenocarcinoma, lung(SCLC)      | ++   |
| A549        | Adenocarcinoma, lung(NSCLC)     | +++  |
| AGS         | Gastric adenocarcinoma, stomach | -    |
| SK-HEP-1    | Adenocarcinoma, liver           | +++  |
| Huh7        | Hepatocellular carcinoma, liver | +++  |

#### <3-2> 247-B9항체와 공지의 항체들의 인간배아줄기세포에 대한 상대적 결합 비교

<70> 본 발명의 247-B9항체와 미분화 인간 배아줄기세포 마커들에 대한 항-SSEA1, 항-SSEA3, 항-SSEA4, 항-TRA-1-60, 항-TRA-1-81 항체들의 미분화 인간배아줄기세포와 레티노산으로 분화 유도된 인간배아줄기세포에 대한 상대적인 결합능을 비교하기 위해서, 미분화 및 레티노산 분화 인간배아줄기세포에 대한 각 항체들의 결합 정도를 실시예 <1-2>처럼 플로우 사이토메트리로 측정하고 2차 항체로만 처리한 세포에 대해 상대적인 평균 형광값을 백분율로 나타내서 그래프화하였다. 도 4와 같이 공지의 미분화 마커들인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81들은 거의 90% 이상의 미분화 인간배아줄기세포에 결합하는 것을 볼 수 있다. 본 발명의 57-C11 항체도 이들과 95% 이상의 미분화 인간 배아줄기세포에 결합하는 것을 볼 수 있다 (도 4). 그리고 14일간 레티노산으로 분화시킨 인간배아줄기세포에는 현저하게 그 결합이 감소하여 다른 미분화마커들처럼 20% 이하로 결합능이 감소하는 것을 알 수 있다(도 4). 이런 결과는 247-B9 항체가 공지의 미분화 인간배아줄기세포 인식 항체와 매우 유사한 결합 특성을 보인다는 것을 말해준다.

<71>

<72> <실시예 4> 단일클론항체 247-B9이 인식하는 항원 동정

<73> <4-1> 단일클론항체 247-B9이 인식하는 세포표면 단백질 분자의 확인

<74> 인간 배아줄기세포 H9 세포 표면의 바이오틴표지(biotinylation)는 EZ-Link Sulfo-NHS- LC-Biotin (Pierce)에서 제시한 프로토콜을 약간 수정하여 수행하였다. 100 밀리미터 세포배양 플레이트에 배양한 인간 배아줄기 세포 H9를 37℃에서 미리 데워둔 PBS(pH 7.4)로 2회 세척한 후 바이오틴(1mg/ml)이 녹아있는 찬 PBS(pH 8.0)를 넣고, 실온에서 30분간 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, 2μg/ml 아프로티닌, 100μg/ml PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride), 5μg/ml 류페틴, 1mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)를 이용하여 4℃에서 20분간 반응시킨 후, 12,000rpm 속도로 40분간 원심분리해서 핵을 제거한 후 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. 단백질-G-플러스 아가로스(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위해서, 약  $1 \times 10^7$  세포의 세포 용해물에 20μl 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 247-B9에 의해 인식되는 항원을 면역침강하기 위해서 단백질-G-플러스 아가로스에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거한 세포 용해물에 각 항체 2μg을 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 20μl 단백질-G-플러스 아가로스를 넣고 4℃에서 2시간 동안 더 반응시켰다. 면역 침강된 면역 혼합체를 용해 용액을 이용해서 10회 세척하고, 각 항체에 결합된 항원을 용출하기 위해 5X 샘플 완충액을 넣고, 100℃에서 5분간 끓였다. 음성 대조군 단백질과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블랏팅하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 2시간동안 블로킹하였다. 0.1% PBST로 3번 세척 한 후, 스트렙타비딘-HRP(1:4,000; 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 247-B9은 약 37 kDa 단백질을 미분화 인간배아줄기세포 추출액에서 면역 침강시키는 것을 확인하였다(도 6 왼쪽).

<75> <4-2> 단일클론항체 247-B9에 의해 면역 침강된 항원의 동정

<76> 단일클론항체 247-B9에 의해 면역침강된 단백질을 포함하는 SDS 젤을 쿠마시 G250 (BIO-RAD)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다(도 6 오른쪽). 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% 아세트나이트릴로 세척하였다. 그 다음, 트립신 (8-10ng/μl)으로 8-10시간동안 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% 수용성 아세트나이트릴에 포함된 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](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe))을 이용하였다. 그 결과, 이 단백질이 hnRNP

A2/B1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1)임을 확인하였다(도 7, 8). 도 9의 밑줄 친 아미노산은 실제로 질량분석기를 통해 확인한 펩티드를 표시한 것으로 hnRNP A2/B1과 162개의 아미노산이 일치하는 것을 알 수 있다.

<77> <실시예 5> 단일클론항체 247-B9의 특성분석

<78> <5-1> 단일클론항체 247-B9 항원의 비교분석

<79> hnRNP A2/B1에 대한 항체가 이미 상업적으로 팔리고 있다. 생쥐 단일클론항체 anti-hnRNP A2/B1 항체인 DP3B3(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)가 단일클론항체 247-B9가 면역침강시킨 단백질을 인식하는 지 확인하기 위해 결합하는 인간 배아암세포인 NT2/D1와 인간배아줄기세포 H9세포 추출액을 사용하여 면역침강과 웨스턴 블랏을 수행하였다. 단일클론항체 247-B9이 면역 침강시키는 항원의 웨스턴 블랏팅을 수행하기 위해서, 상기 실시예 <4-1>에서 서술한 용해 방법으로 바이오틴-표지된 세포 추출액을 준비하였다. 이 세포 추출액을 상기 서술한 바와 동일하게 단일클론항체 247-B9과 hnRNP A2/B1 항체 DP3B3으로 면역침강 후 항체를 넣지 않은 음성 대조군 단백질(No Ab)과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 PVDF 막으로 옮겼다. 이 막은 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 2시간동안 블로킹을 하였다. 0.1% PBST로 3번 세척한 후, 스트렙타비딘-HRP(1:4,000, GE healthcare, 미국)를 실온에서 1시간 더 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척하고, 바이오틴이 표지된 단백질을 ECL 검출키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과, 단일클론항체 247-B9은 세포표면의 hnRNP A2/B1을 면역 침강시켜서 검출되었지만 단일클론항체 hnRNP A2/B1 항체로는 면역침강되어 검출되는 단백질이 없었다. 이 PVDF 막을 제거완충용액(62.5mM Tris-HCl(pH6.8), 2% SDS, 100mM  $\beta$ -mercaptoethanol)에 넣고, 50℃에서 45분간 반응시킨 후, 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 2시간동안 블로킹을 하였다. 0.1% PBST로 3번 세척한 후, hnRNP A2/B1 항체인 DP3B3(Santa Cruz Biotechnology) 항체를 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척 한 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 단일클론항체 247-B9으로 면역 침강시킨 hnRNP A2/B1 단백질과 DP3B3 항체에 의해 면역침강된 hnRNP A2/B1 둘 다 DP3B3 항체에 의해 인식됨을 관찰할 수 있었다 (도 9). 하지만, 세포표면에 존재하는 hnRNP A2/B1을 인식하는 단일클론항체 247-B9와는 다르게 DP3B3 항체는 세포표면의 hnRNP A2/B1을 인식하지 못하였다. 따라서 본 발명의 단일클론항체 247-B9은 미분화 인간배아줄기세포의 표면에 존재하는 hnRNP A2/B1나 이와 유사한 단백질을 인식하는 새로운 항체임을 알 수 있다(도 9). 이런 결과는 hnRNP A2/B1이 두 가지 형태로 세포표면과 세포내부에서 다르게 존재하며 정상적인 상태의 세포표면 hnRNP A2/B1은 단지 단일클론항체 247-B9에 의해서만 인식된다는 것을 말해준다.

<80>

<81> <5-2> 단일클론항체 247-B9과 공지 hnRNPA2/B1항체의 인간 배아줄기세포 표면에서의 발현 비교

<82> 단일클론항체 247-B9과 hnRNP A2/B1 항체의 미분화 인간배아줄기세포 표면에서의 발현을 비교하기 위해서 세포를 상기 실시예 <1-2>처럼 준비하여 항-SSEA3, 항-SSEA4, 항-TRA-1-60, 항-TRA-1-81 (Chemicon, Temecula, CA), 단일클론항체 247-B9, 생쥐 단일클론항체 hnRNP A2/B1 항체(Santa Cruz)로 각각 4℃에서 30분 반응시킨후 PBA로 세척한 후에 세포는 1차 항체와 상응하는 항-라트 IgM-FITC, 항-마우스 IgM-FITC와 항-마우스 IgG-FITC, 항-토끼 IgG-FITC (BD Biosciences)를 4℃에서 30분간 더 반응시켰다. 0.1% PBST로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest 소프트웨어(BD sciences)를 이용하여 PI(propidium iodide)-음성 세포에 대해서 항체 반응 여부를 분석하였다. 도 10에서 실선은 단일클론항체이고 적색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 단일클론항체 247-B9가 미분화 상태의 인간배아줄기세포인 H9에 잘 결합하지만 hnRNP A2/B1을 인식하는 생쥐 단일클론항체 DP3B3(Santa Cruze사, 미국)는 H9에 전혀 결합하지 않았다(Kzhyshkowska, et al., Biochemical. J 358, 305-314, 2001). 이 결과를 통해서 단일클론항체 247-B9은 생쥐 단일클론항체 DP3B3와는 다른 형태의 hnRNP A2/B1을 인식한다는 것을 알 수 있다(도 10).

<83> <5-3> 면역세포화학적 방법에 의한 세포내 247-B9 항원의 위치분석

<84> 247-B9 항원의 미분화 인간 배아줄기세포의 세포내 외 위치분석을 위해 면역세포화학적 방법(Immunocytochemistry)으로 조사하였다. 인간 배아줄기세포 H9 세포를 0.1% 젤라틴으로 코팅한 커버슬립에서 4일간 배양 한 후,  $Ca^{2+}$  과  $Mg^{2+}$  성분이 들어있는 PBS로 2회 세척 한 후 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde; PFA)로 4℃에서 15분간 처리하여 세포를 고정시켰다.  $Ca^{2+}$  과  $Mg^{2+}$  성분이 들어있는 PBS로 5회 세척한 후, 세포내부를 염색하기 위해서는 0.1% 트리톤 X-100을 포함하는 PBS로 10분 처리하였다. 세포표면 염색을 위해서는 트

리톤 X-100 처리없이 바로 블로킹 용액(10% 말 혈청, 0.1% BSA,  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$ -PBS)으로 1시간 세포를 블로킹하였다. 바이오틴 표지된 항체 247-B9(1:100)과 hnRNP A2/B1에 대한 공지의 항체 DP3B3를 넣고 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다.  $\text{Ca}^{2+}$  과  $\text{Mg}^{2+}$  성분이 들어있는 PBS로 3회 세척한 후, 스트렙타비딘-Cy3, 항-마우스 IgG-FITC(Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 실온에서 빛을 차단한 채로 1시간 더 반응시켰다.  $\text{Ca}^{2+}$  과  $\text{Mg}^{2+}$  성분이 들어있는 PBS로 3회 세척한 후 현미경으로 관찰하였다. 세포표면에서는 247-B9항체만 붉은색으로 염색되고 (도 11A), 세포내부에서는 247-B9과 공지의 항체 DP3B3가 둘다 결합하는 것을 보여 주었다(도 11B). 이런 결과는 247-B9 항체가 인식하는 hnRNP A2/B1 유사단백질은 핵 내와 세포 표면에 존재하며 특히 세포표면에 존재하는 것은 본 발명의 항체를 통해 처음으로 밝힌 것이다.

<85> <5-4> 분화된 인간 배아세포에 대한 특이성

<86> 단일클론항체 247-B9이 분화된 인간 배아세포에 결합하는지 관찰하기 위하여 완전히 분화하지 않은 초기 분화상태의 삼배엽성 세포들을 포함하는 배아세포로 상기 실시예 <1-1>처럼 분화시킨 다음 플로우 사이토메트리기를 통하여 단일클론 항체 247-B9의 배아세포에 대한 결합력을 14일에 걸쳐 관찰하였다. 그 결과 단일클론 항체 247-B9은 배아세포에서 배양 날짜별로 4일째부터 7일까지는 표면에서의 발현이 작게 감소하였지만, 7일 이후부터는 급격하게 감소하는 발현 양상을 보였다(도 12). 이 결과는 항체 247-B9은 미분화 인간배아줄기세포에는 잘 결합하지만 7일 정도 분화된 인간배아줄기세포에 대한 결합력이 현저하게 감소하는 것을 알 수 있다.

<87> <88> <5-5> 단일클론항체 247-B9 항원과 공지의 인간 배아줄기세포 마커 인식 항체와의 이중 플로우사이토메트리 분석

<89> 단일클론항체 247-B9과 공지의 전분화능 미분화 인간배아줄기세포 표면 마커들과의 관계를 조사하기 위하여 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Pierce)을 가지고 제공한 방법대로 단일클론항체 247-B9을 바이오틴 표지하였다. 구체적으로 1.63mg의 NHS-LC-바이오틴을 1ml PBS (pH 8.0)에 녹이고, 50ml (146.4nmol)의 이 용액을 1mg의 정제된 항체의 바이오틴 표지에 사용하였다. 실온에서 1시간 반응시키고 나서, 그 반응물은 4°C에서 투석액(0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.0)에 48시간동안 투석되었다. 이렇게 준비한 바이오틴 레이블링 항체를 다음의 플로우 사이토메트리에 사용하였다. 세포를 먼저 상기 실시예 <1-2>에서처럼 준비한 후 항-SSEA3, 항-SSEA4, 항-TRA-1-60, 항-TRA-1-81 (Chemicon, Temecula, CA) 항체로 각각 4°C에서 30분 반응시킨후 FITC-결합된 항-랫트 IgM, 항-마우스 IgG 또는 항-마우스 IgM(BD Biosciences) 항체로 1차 항체에 맞게 30분 더 반응시켰다. PBA로 세척한 후에 세포는 바이오틴 표지된 247-B9으로 30분 더 반응시킨후 스트렙타비딘-피코에리쓰린으로 30분더 반응시켰다. 세척 후에 PI(propidium iodide)-음성 세포만을 FACSCalibur (BD Biosciences)와 Cell Quest 소프트웨어(BD Biosciences)로 분석하였다. SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, 그리고 TRA-1-81 양성인 세포의 각각 97.8%, 98.6% 92.5%, 97.8%가 단일클론항체 247-B9 양성반응을 보였다(도 13). 이런 결과는 기존의 미분화 인간배아줄기세포의 표면 마커 양성인 대부분의 세포들이 hnRNP A2/B1을 발현한다는 것으로 단일클론항체 247-B9이 인식하는 표면 항원 hnRNP A2/B1가 새로운 미분화 인간배아줄기세포 표면마커로 사용될 수 있다는 것을 말해준다.

<90> <91> <실시예 6> 단일클론항체 247-B9 항체유전자 및 아미노산 분석

<92> <6-1> 단일클론항체 247-B9 유전자 클로닝

<93> 왕성하게 자라는 하이브리도마 247-B9 세포  $5 \times 10^6$  개를 원심분리하여 수확한 후 찬 PBS로 세척하고 1ml의 RNA-Bee(TEL-TEST사, 미국)를 넣고 격렬히 흔들어서 섞었다. 실온에서 5분 반응시키고  $200\mu\text{l}$  클로로포름을 넣고 다시 세차게 흔든 후 얼음에서 5분 보관하고 4°C 12,000 x g, 15분 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 양과 동량의 페놀/클로로포름을 넣고 격렬히 섞은 후 원심분리하고 상층액을 다시 회수한 후 1회 더 페놀/클로로포름 추출을 반복하고 상층액을 회수한 후 클로로포름만 넣어서 최종 추출한 후 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 동량의 이소프로판올을 넣은 후 실온에서 10분 방치 후 실온에서 12,000 xg, 5분 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 75% 에탄올로 RNA를 세척한 후 물기를 완전히 없애고 공기 중에서 RNA 침전물을 건조시켰다. 디에틸피로카보네이트(Diethyl Pyrocarbonate, Sigma사, 미국) 처리된 증류수  $50\mu\text{l}$ 에 녹인 다음 A260을 측정하여 RNA 양을 정량하였다. 항체 유전자를 클로닝하기 위해서는 알려진 중합효소연쇄반응 프라이머를 변형한 후 사용하였다 (Wang,

et al J. Immunol. Methods 233, 167-177, 2000).

<94> 4 $\mu$ g의 전체 RNA를 70℃ 10분간 변성 시키고 이 RNA에 중쇄 클로닝을 위해서는 IgG1 불변영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 염기서열 5'-GGA GTC GAC ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'인 올리고뉴클레오타이드 25 pmole과 중쇄항체 가변영역 N말단에 해당하는 프라이머인 염기서열 5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG TCW GG-3'인 올리고뉴클레오타이드를 25 pmole 섞어 전체 12 $\mu$ l로 맞추고 8 $\mu$ l ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron사, 한국)를 넣어 역전사중합효소 연쇄반응혼합액을 만들었다. 경쇄클로닝을 위해서는 카파사슬 불변영역에 해당하는 프라이머인 5'-GGT GTC GAC GGA TAC TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3' 올리고뉴클레오타이드 25 pmole과 카파사슬 가변영역 N 말단에 해당하는 프라이머인 5'-CGG AAG CTT GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3' 올리고뉴클레오타이드 25 pmole을 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 EcoRI, 3' 프라이머에는 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄 및 경쇄반응액을 각각 섞은 후 먼저 45℃에서 30분간 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성한 후 94℃에서 1분, 45℃에서 1분, 72℃에서 2분으로 30회 반응시켰다. 그 결과 중쇄 불변영역에 해당하는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 400bp, 경쇄 불변영역 해당하는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 390bp에 해당하는 위치에서 증폭된 DNA를 얻을 수 있었다(도 14).

#### <95> <6-2> 단일클론항체 247-B9 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

<96> 상기 실시예에서 증폭해낸 247-B9 항체 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 중합효소연쇄반응 산물을 중쇄는 EcoRI와 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 EcoRI와 SalI으로 처리하고 경쇄유전자 클로닝 벡터로는 pBluescript SK+를 HindIII와 SalI으로 처리한 다음 GeneCleanII (Bio101사, 미국)로 분리하였다. 이 두 DNA를 T4 DNA 연결효소(New England Biolab사, 미국)로 연결하고 대장균 DH5  $\alpha$ 에 CaCl<sub>2</sub> 방법으로 형질전환한 다음, 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 클론, 경쇄의 경우 약 390bp 크기를 가진 대장균 클론들을 선발하였다.

<97> 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 50 $\mu$ g/ml의 엠프실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA 미니프랩 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 15, 16의 염기 서열 위의 숫자는 Kabat 넘버링에 따라 정하였다. 이 아미노산 서열을 분석한 결과 이 면역유전자들은 항체구조에 특징적인 잔기와 배열을 완벽하게 갖추고 있으며 (도 15, 16), 구체적으로 보면 면역글로불린 여러 그룹 가운데서 247-B9의 중쇄는 서브그룹 II(B)에 속하고 경쇄는 서브그룹 V에 속한다. 항원을 인식하는 CDR 잔기로는 중쇄의 경우, 247-B9 중쇄 경우 CDR1은 26-35, CDR2는 50-65, CDR3는 95-99이며, 경쇄의 경우 CDR1은 24-34, CDR2는 50-56, CDR3는 89-97에 해당하였다. 구조상 필수적인 디설피드 결합은 중쇄의 경우 22번과 92번 시스테인이, 경쇄의 경우 23번과 88번 시스테인이 관여하였다. 이 유전자의 분석 결과로부터 중쇄 및 경쇄유전자는 기능적임을 확인할 수 있었다.

#### 도면의 간단한 설명

<98> 도 1A는 배양중인 미분화 인간 배아줄기세포인 H9의 형태를 현미경으로 관찰한 것이고,

<99> 도 1B는 배양중인 미분화 인간 배아줄기세포 H9에 레티노산(Retinoic acid)을 처리하여 6일째 배양한 형태를 현미경으로 관찰한 것이고,

<100> 도 2A는 플로우 사이토메트리(Flow cytometry) 분석을 통하여 미분화 인간 배아줄기세포의 미분화 마커인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81은 양성이고 분화마커인 SSEA1은 음성인 것을 보여준 그림이고,

<101> 도 2B는 플로우 사이토메트리 분석을 통하여 20일 이상 레티노산으로 분화시킨 인간 배아줄기세포에서 미분화 마커인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81은 음성이고 분화 마커인 SSEA1은 약하게 양성인 것을 보여준 그림이다 (실선은 각 단일클론항체이고, 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다).

<102> 도 3은 플로우 사이토메트리 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 247-B9이 H9, H1 인간배아줄기세포, 14일된 레티노산 분화 H9 세포 (RA), 7일된 배아체(EB), 생쥐배아섬유아세포(MEF), 생쥐배아줄기세포(mESC 또는 J1), 그리고 인간 말초혈액단핵구(PBMC)에 결합하는 정도를 보여주는 그림으로 H9과 H1에 잘 결합하지만, 배아체

(EB), 레티노산 분화 인간배아줄기세포에는 약하게 결합하는 것을 보여 준다. 일부 암세포 A375, NCI-H69, SH-SY5Y에 대한 결합능도 보여주는 그림이다 (이때, 실선은 단일클론항체이고 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이다).

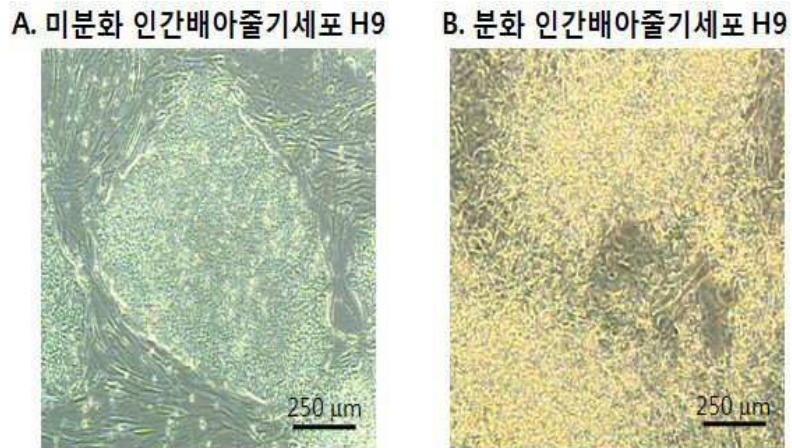
- <103> 도 4는 미분화 인간 배아줄기세포 (ES) 그리고 레티노산으로 분화시킨 인간 배아줄기세포(RA)에 대한 플로우 사이토메트리 분석에서 2차 항체만의 결합정도를 0%로 해서 247-B9 단일클론항체의 상대적 결합력을 백분율로 보여준 것이다. 양성 대조군인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81의 상대적 결합 퍼센트도 같이 보여주고 있다.
- <104> 도 5는 항체 247-B9를 생쥐 복수액에서 프로테인G 세퍼로스 칼럼 크로마토그래피(Protein G sepharose column chromatography)로 정제하여 10% SDS-PAGE로 분석한 그림으로 HC는 중쇄, LC는 경쇄를 나타낸 것이다.
- <105> 도 6은 미분화 인간 배아줄기세포 표면을 바이오틴화(biotinylation)한 후에 단일클론항체 247-B9를 사용하여 면역 침강시킨 후에 침강된 단백질을 10% SDS-PAGE에서 분석하여 (오른쪽) 다시 웨스턴 블라팅으로 PVDF 막으로 옮기고 거기서 스트렙타비딘-HRP (SA-HRP)로 분석한 그림이다 (왼쪽). (항체를 빼고 똑같은 실험을 한 것을 음성 대조군 (No Ab)으로 하였다). 37 kDa 위에 침강된 단백질이 보인다.
- <106> 도 7은 인간 배아줄기세포에서 247-B9 항체로 면역 침강시킨 단백질을 SDS-PAGE에서 분리하여 트립신으로 절단한 후 얻은 펩타이드를 MALDI-TOF분석을 통해 본 발명의 단일클론항체 247-B9이 인식하는 항원이 hnRNP A2/B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1)임을 보여주는 매스 스펙트럼 그림이다.
- <107> 도 8은 본 발명의 단일클론항체 247-B9이 인식하는 항원을 매스 스펙트럼에서 확인하였을 때의 펩타이드 매스 핑거프린팅(peptide mass fingerprinting; PMF) 리스트로서 각 펩타이드가 실제 hnRNP A2/B1 단백질 아미노산 서열의 어디에 해당되는지 밑줄로 표시한 그림이다.
- <108> 도 9는 본 발명의 단일클론항체 247-B9이 hnRNP A2/B1 단백질을 인식하여 면역침강시키는지 재확인하기 위해 공지의 hnRNP A2/B1를 인식하는 생쥐 단일클론항체(항-hnRNP A2/B1, Santa Cruz Biotechnology)를 사용하여 미분화 인간 배아줄기세포에서 247-B9과 항-hnRNP A2/B1으로 면역침강시킨 단백질을 스트렙타비딘-HRP와 공지의 항-hnRNP A2/B1로 웨스턴 블랏하여 확인한 그림이다. 표면단백질은 247-B9에 의해 면역침강되고 그 침강된 단백질은 항-hnRNP A2/B1에 의해 인식되는 것이 보이지만 항-hnRNP A2/B1는 표면의 hnRNP A2/B1을 면역침강시키지 못하는 것을 볼 수 있다.
- <109> 도 10은 본 발명의 단일클론항체 247-B9이 배아줄기세포표면에서 hnRNP A2/B1 단백질을 인식하므로 기존에 이를 인식하는 것으로 알려진 공지의 단일클론항체 항-hnRNP A2/B1를 사용하여 배아줄기세포에 대한 결합정도를 관찰한 그림으로 247-B9을 제외하고는 hnRNP A2/B1 항체 DP3B3 항체는 표면의 hnRNP A2/B1을 인식하지 못함을 볼 수 있다.
- <110> 도 11은 면역세포화학염색을 통하여 247-B9항체와 공지의 DP3B3 항체가 미분화 인간 배아줄기세포 표면에 결합하는지를 보여주는 그림으로써 247-B9항체는 바이오틴을 붙여서 사용하였으며, 형광이 연결된 2차 항체로 스트렙타비딘-Cy3를 사용하였으며 공지의 DP3B3 항체는 항-생쥐 IgG-FITC를 사용하여 247-B9만 염색되는 것을 보여준다(도 11A). 미분화 인간 배아줄기세포 내부에 결합하는지를 보여주기 위해서는 세포를 고정한 후 0.1% 트리톤 X-100으로 처리하고 염색하였다. 공지의 DP3B3 항체와 247-B9 항체에 항-마우스 IgG-FITC를 붙여서 둘 다 녹색으로 염색했으며 둘 다 핵을 잘 염색하는 것을 볼 수 있다 (도 11 B).
- <111> 도 12는 미분화 인간배아줄기세포 (ES)와 날짜별로 배아체(EB)로 분화시킨 인간배아줄기세포에 대한 플로우 사이토메트리 분석에서 2차 항체만의 결합정도를 0 퍼센트로해서 단일클론항체 247-B9의 상대적 결합력을 백분율로 보여준 것이다. 양성대조군인 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81의 상대적 결합 퍼센트도 보여주고 있다. 날짜가 지남에 따라 247-B9 항체의 배아체에 대한 결합력이 7일 이후부터 현저하게 감소하는 것을 보여주고 있다.
- <112> 도 13은 이중 형광 플로우 사이토메트리(two color flow cytometry)를 통해 미분화마커들에 대한 항체와 본 발명의 단일클론항체 247-B9을 동시에 이중으로 결합시킨 것으로 항체 247-B9은 바이오틴화한 후 사용되었다. 인간 배아줄기세포 미분화 마커로 알려진 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 항체가 결합하는 미분화 인간배아줄기세포에 247-B9 항체가 92% 이상 결합하고 있음을 보여주는 그림이다.
- <113> 도 14는 항체 247-B9 유전자를 클로닝하기위해 하이브리도마 57-C11에서 전체 RNA를 추출한 후를 역전사 효소-중합효소연쇄반응을 이용하여 중쇄유전자 (HC)와 경쇄유전자(LC)의 가변영역을 증폭한 그림이다.
- <114> 도 15는 247-B9 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.

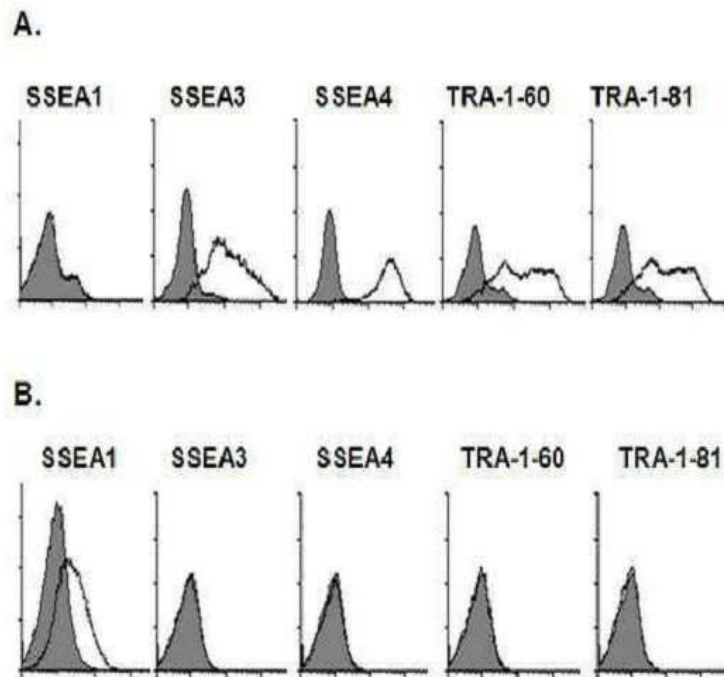
도 16은 247-B9 항체 경쇄 유전자 가변영역(V<sub>L</sub>)의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR(Complementarity Determining Region)과 중요 아미노산의 잔기 위치를 표시한 그림이다.

## 도면

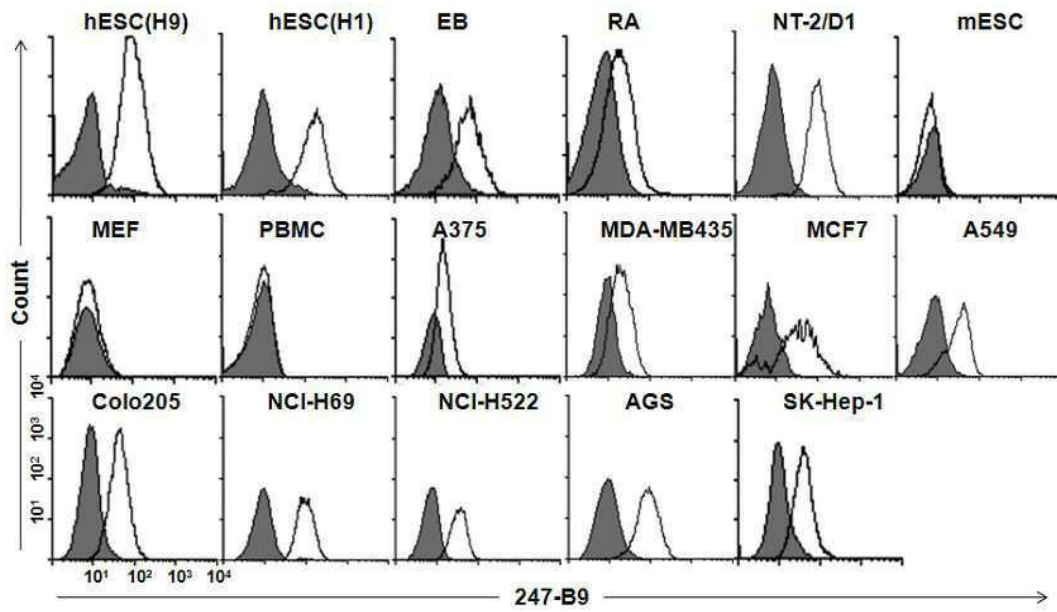
도면1



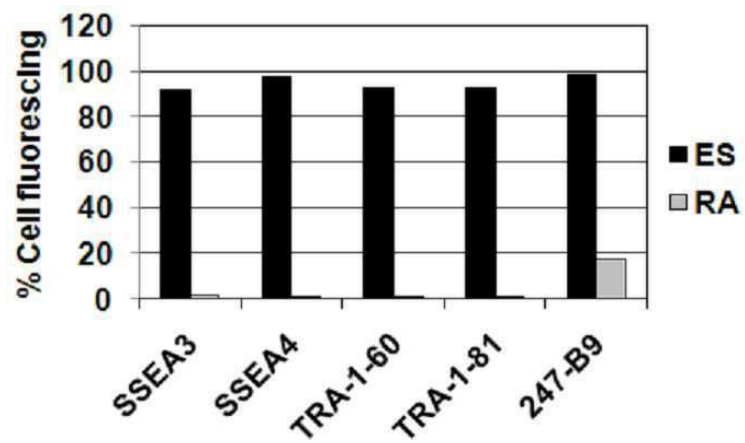
도면2



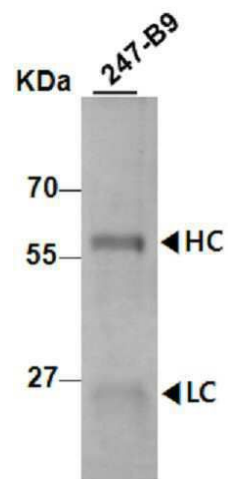
도면3



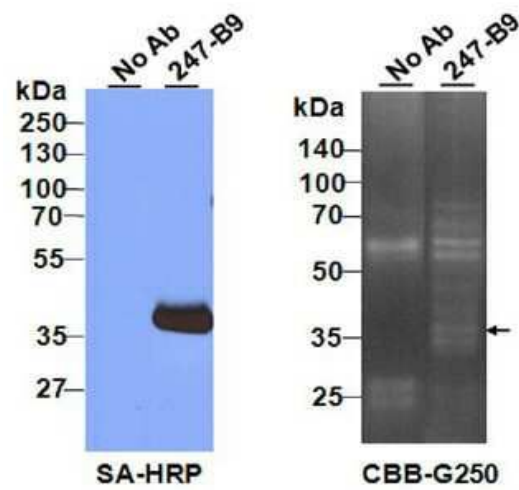
도면4



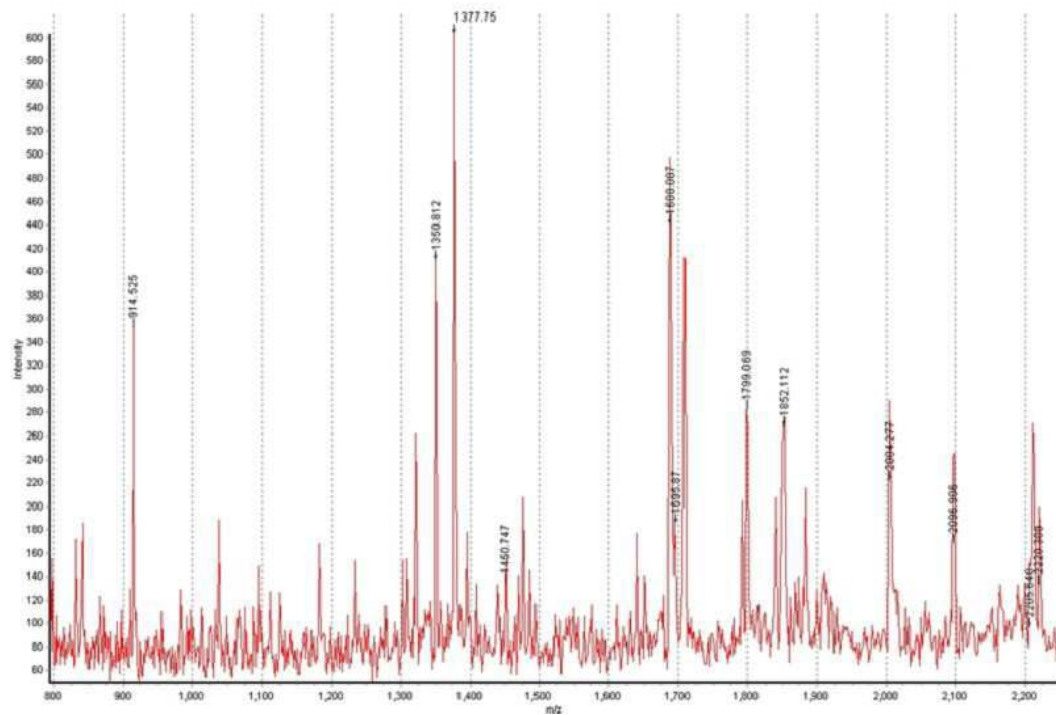
도면5



도면6



도면7



도면8

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform A2 (gi|4504447|ref|NP\_002128.1)

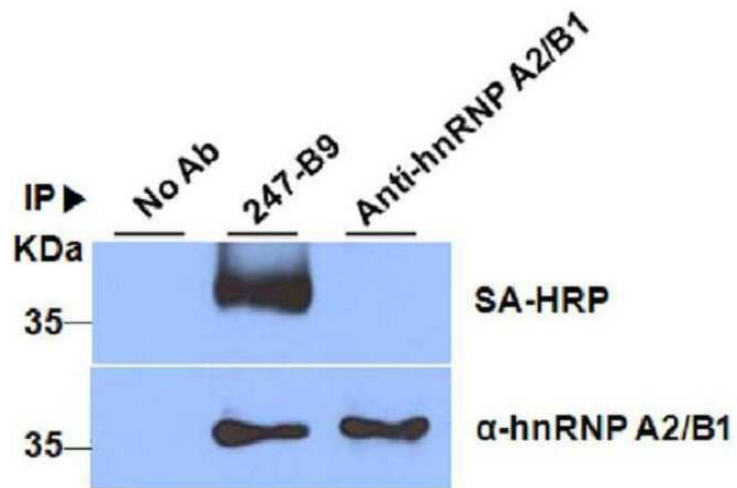
Matching peptide

| Measured Mass (M) | Avg/ Mono | Computed Mass | Error (Da) | Residues Start | Residues To | Residues Missed Cut | Peptide Sequence             |
|-------------------|-----------|---------------|------------|----------------|-------------|---------------------|------------------------------|
| 731.857           | M         | 732.453       | -0.596     | 102            | 108         | 0                   | LFVGGIK                      |
| 859.916           | M         | 860.548       | -0.632     | 101            | 108         | 1                   | KLFVGGIK                     |
| 1011.856          | M         | 1012.436      | -0.580     | 192            | 201         | 0                   | GGNFGFGDSR                   |
| 1085.888          | M         | 1086.477      | -0.589     | 27             | 34          | 0                   | NYEQWGK                      |
| 1187.028          | M         | 1187.639      | -0.611     | 126            | 135         | 0                   | IDTIEIITDR                   |
| 1376.033          | M         | 1376.621      | -0.588     | 202            | 216         | 0                   | GGGGNFGPGPGSNFR              |
| 1410.033          | M         | 1409.679      | 0.354      | 162            | 173         | 0                   | YHTINGHNAEVR                 |
| 1694.205          | M         | 1694.757      | -0.552     | 142            | 156         | 0                   | GFGFVTDDHDPVDK               |
| 1797.362          | M         | 1797.914      | -0.552     | 11             | 26          | 0                   | LFIGGLSFETTEESLR             |
| 1850.117          | M         | 1850.858      | -0.741     | 141            | 156         | 1                   | RGFGFVTDDHDPVDK              |
| 1878.450          | M         | 1878.958      | -0.508     | 102            | 117         | 1                   | LFVGGIKEDTEHHLR              |
| 1925.621          | M         | 1926.009      | -0.388     | 10             | 26          | 1                   | KLFIGGLSFETTEESLR            |
| 2188.472          | M         | 2188.897      | -0.425     | 314            | 338         | 0                   | NMGGPYGGNYGPGSGSGGYGGR       |
| 2204.207          | M         | 2204.892      | -0.685     | 314            | 338         | 0                   | NMGGPYGGNYGPGSGSGGYGGR       |
| 2218.498          | M         | 2219.062      | -0.564     | 118            | 135         | 1                   | DYFEEYGKIDTIEIITDR           |
| 2494.681          | M         | 2494.031      | 0.650      | 227            | 254         | 0                   | GFGDGYNGYGGGPGGGNFGGSPGYGGGR |

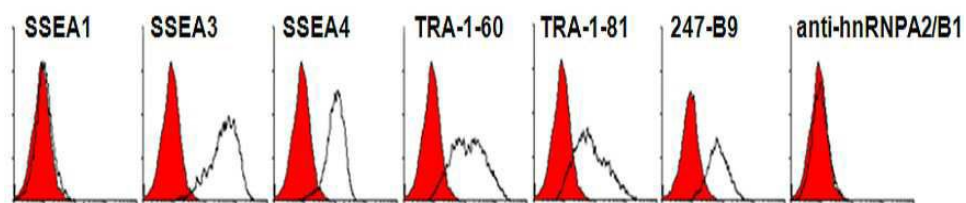
NP\_002128.1 (hnRNP A2/B1)

1 MEREKEQFRK LFIGGLSFET TEESLRNYE QWGKLTDCVV MRDPASKRSR GFGFVTFFSSM  
61 AEVDAAMAAR PHSIDGRVVE PKRAVAREES GKPGAHVTVK KLFVGGIKED TEEHHLRDYF  
121 EEEYGKIDTIE IITDRQSGKK RGFGFVTFFD HDPVDKIVLQ KYHTINGHNA EVRKALSRQE  
181 MQEVQSSRSR RGGNFGFGDS RGGGNFGPG PGSNFRGSD GYGSGRGFGD GYNGYGGGPG  
241 GGNFGGSPGY GGGRGYGGG GPYGNQGGG YGGGYDNYGG GNYGSGNYND FGNYNQPSN  
301 YGPMKSGNFG GSRNMGPPYG GGNYPGGSG GSGGYGGRSR Y

도면9

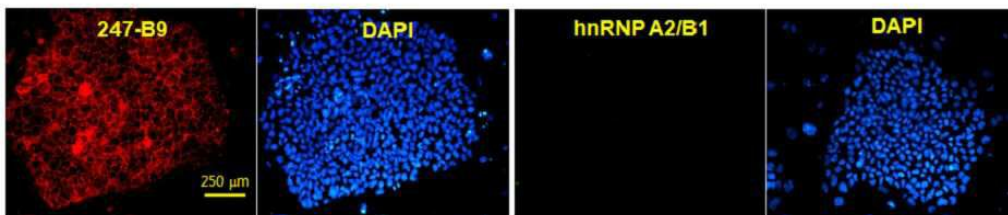


도면10

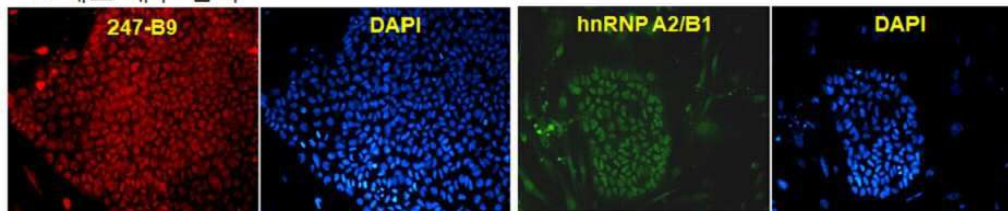


도면11

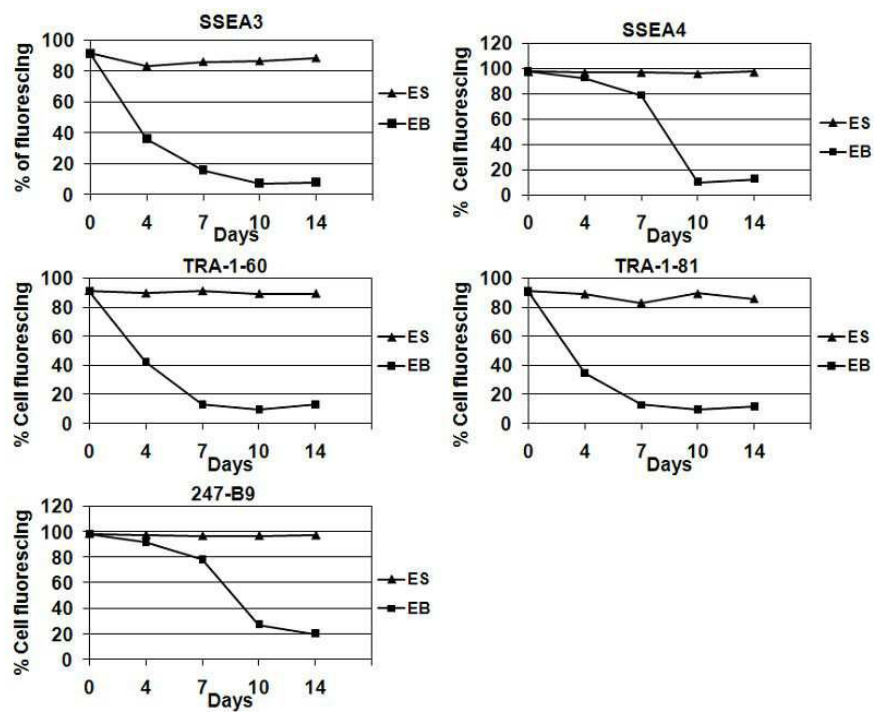
A. 세포 표면 염색



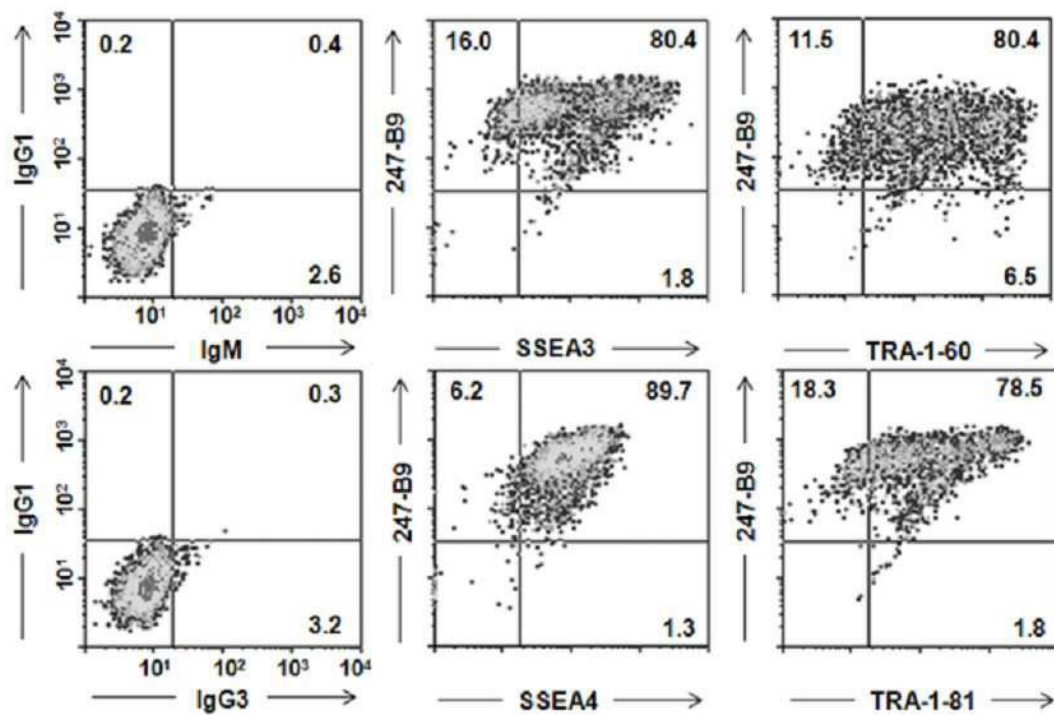
B. 세포 내부 염색



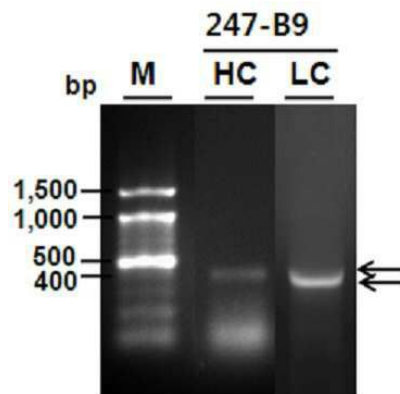
도면12



도면13



도면14



도면15

```

1
CAA GTT AAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT 42
Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro 14

22
GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAT ACC 84
Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr 28

CDR1
TTC ACA GAC TAT TCA ATG CAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA 126
Phe Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly 42

52 52A
AAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACT GAG ACT GGT 168
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly 56

CDR2
65
GAG GCA ACA TAT GCA GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC 210
Glu Ala Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe 70

82 82A
TCT TTG GAA ACC TCT GCC ACC ACT GCC TAT TTG CAG ATC AAC 252
Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn 84

82B 82C 83
AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT TCT AGA 294
Asn Leu Lys Arg Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Arg 98

CDR3
CAT GGT AAC TAC AAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC 336
His Gly Asn Tyr Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val 112

Cγ1 ->
TCC TCA GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT 369
Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr 123

```

## 도면16

```

1
GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA AAA TTC ATG TCC ACG TCA 42
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser 14

23 CDR1
GTA GGA GAC AGG GTC AGC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT 84
Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn 28

34
GTG GGT ACT AAT GTA GCG TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA 126
Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln 42

50 CDR2
TCT CCT AAA GCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT 168
Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 56

GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT 210
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp 70

TTC ACT CTC ACC ATC AGC AAT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA 252
Phe Thr Lys Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Lys Ala 84

88 CDR3
GAG TAT TTT TGT CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CTC ACG TTC 294
Glu Tyr Glu Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Lys Thr Phe 98

100 Ck ->
GGA GGG GGG ACC ACG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA 336
Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala 112

CCA ACT GTA TCC 348
Pro Thr Val Ser 176

```

## 서열목록

- <110> Industry-Academia Cooperation Group of Sejong University
- <120> Monoclonal antibody 247-B9 specific to undifferentiated human embryonic stem cell
- <130> RyuCJ-08004
- <150> KR10-2008-48967
- <151> 2008-05-27
- <150> KR10-2008-97589
- <151> 2008-10-06
- <160> 8
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1

<211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 1  
 ggagtcgaca tagacagatg ggggtgtcgt ttggc 36

<210> 2  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 2  
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagtcw gg 32

<210> 3  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 3  
 ggtgtcgacg gatactacag ttggtgcagc atc 33

<210> 4  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

|                                                                 |              |                |
|-----------------------------------------------------------------|--------------|----------------|
| <400>                                                           | 4            |                |
| cggaagcttg                                                      | ayattgtgmt   | sacmcarwct mca |
|                                                                 |              | 33             |
| <210>                                                           | 5            |                |
| <211>                                                           | 369          |                |
| <212>                                                           | DNA          |                |
| <213>                                                           | Mus musculus |                |
| <220>                                                           |              |                |
| <221>                                                           | CDS          |                |
| <222>                                                           | (1)..(369)   |                |
| <400>                                                           | 5            |                |
| caa gtt aag ctg cag cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag |              | 48             |
| Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu |              |                |
| 1 5 10 15                                                       |              |                |
| aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggt tat acc ttc aca gac tat |              | 96             |
| Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr |              |                |
| 20 25 30                                                        |              |                |
| tca atg cac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg |              | 144            |
| Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met |              |                |
| 35 40 45                                                        |              |                |
| ggc tgg ata aac act gag act ggt gag gca aca tat gca gat gac ttc |              | 192            |
| Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Ala Asp Asp Phe |              |                |
| 50 55 60                                                        |              |                |
| aag gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc acc act gcc tat |              | 240            |
| Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr |              |                |
| 65 70 75 80                                                     |              |                |
| ttg cag atc aac aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt |              | 288            |
| Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys |              |                |
| 85 90 95                                                        |              |                |
| tct aga cat ggt aac tac aac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc |              | 336            |
| Ser Arg His Gly Asn Tyr Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val |              |                |
| 100 105 110                                                     |              |                |
| tcc tca gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc tat                     |              | 369            |
| Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr                     |              |                |

115

120

<210> 6  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 6  
 Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ser Arg His Gly Asn Tyr Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr  
 115 120

<210> 7  
 <211> 399  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(399)

<400> 7  
 gaa gtt cag ctg cag cag tct ggg cct gag ctg gtg agg cct ggg gtc

48

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

tca gtg aag att tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat 96  
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

gct atg cac tgg gtg aag cag tgt cat gca aag agt cta gag tgg att 144  
Ala Met His Trp Val Lys Gln Cys His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

gga gtt att agt act tat tat gat aat aca aac tac aac cag aag ttt 192  
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

aag ggc aag gcc aca atg act gtg gac aaa tcc tcc agc aca gcc tat 240  
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

atg gaa ctt gcc aga gtg aca tct gag gat tcc gcc atc tat tac tgt 288  
Met Glu Leu Ala Arg Val Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

gca aaa tcg ggg gac cat tac ggt agg agt ttc ggg gcc tgg ttt gct 336  
Ala Lys Ser Gly Asp His Tyr Gly Arg Ser Phe Gly Ala Trp Phe Ala  
100 105 110

tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca gcc aaa acg aca 384  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr  
 115 120 125

ccc cca tct gtc tat 399  
Pro Pro Ser Val Tyr  
130

|       |              |
|-------|--------------|
| <210> | 8            |
| <211> | 133          |
| <212> | PRT          |
| <213> | Mus musculus |

<400> 8  
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Cys His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ala Arg Val Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Ser Gly Asp His Tyr Gly Arg Ser Phe Gly Ala Trp Phe Ala  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr  
115 120 125

Pro Pro Ser Val Tyr  
130