

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0047812
(43) 공개일자 2020년05월08일(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) C12N 5/16 (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)(52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
C12N 5/163 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0127112

(22) 출원일자 2018년10월24일

심사청구일자 2019년10월30일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

류춘제

서울특별시 강남구 선릉로 221, 204동 203호(도곡동, 도곡테크아파트)

최홍서

서울특별시 광진구 동일로54길 11-7, 204호(군자동)

서세리

서울특별시 송파구 장지동 375-2

(74) 대리인

특허법인리체

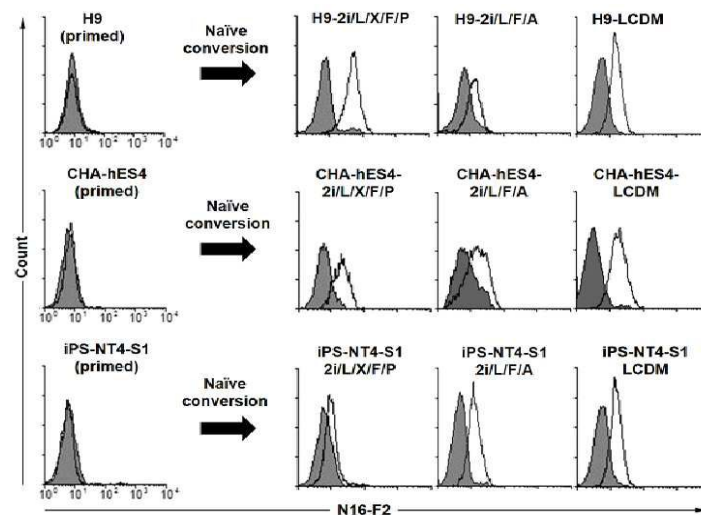
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 인간 순수 만능줄기세포에 특이적인 단일클론항체 N16-F2

(57) 요약

본 발명은 인간 순수 만능줄기세포 (human naive pluripotent stem cell)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마에 관한 것으로서, 구체적으로는 인간 순수만능줄기세포에는 결합하고 인간 준 만능줄기세포에는 결합하지 않거나 결합력이 현저히 약한 단일클론항체 N16-F2, 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 N16-F2, 상기 단일클론항체 N16-F2를 포함하는 검정키트 및 인간 만능줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Y 402/01001 (2013.01)

G01N 33/56966 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

G01N 2333/988 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711065554

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 신규 전환인자 발굴을 통한 순수 인간만능줄기세포 유도 및 기전규명

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2018.02.01 ~ 2018.12.31

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 만능줄기세포 (naive 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 1 또는 2에 있어서, 상기 항체는 단일클론항체인, 항체.

청구항 4

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 항체는 준 만능줄기세포(primed pluripotent stem cell)에는 결합하지 않는, 항체.

청구항 5

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 항체는 순수 만능줄기세포의 탄산 탈수 효소 14(Carbonic Anhydrase 14; CA14)에 특이적으로 결합하는, 항체.

청구항 6

청구항 1 또는 2의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

청구항 6에 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 LCDR5를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 서열번호 14를 포함하는 LCDR6을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

청구항 6 또는 7에 있어서, 중쇄를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드 서열, 및 경쇄를 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

청구항 6 또는 7의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.

청구항 10

청구항 1 또는 2의 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma).

청구항 11

청구항 1 또는 2의 항체를 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하기 위한 조성물.

청구항 12

청구항 1 또는 2의 항체를 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하기 위한 키트.

청구항 13

청구항 1 또는 2의 항체와 줄기세포를 혼합하여, 상기 항체가 결합된 상기 줄기세포를 순수 만능줄기세포로 결정하는 것을 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하는 방법.

청구항 14

청구항 10의 하이브리도마를 배양하여 순수 만능줄기세포에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 순수 만능줄기세포(naive pluripotent stem cells)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 N16-F2 및 이를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 만능줄기세포(pluripotent stem cell)는 몸을 구성하는 모든 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포로서 마우스, 원숭이, 인간의 초기 배아의 배반포(blastocyst)에서 처음 분리하였다(Evans et al., 1981, Nature, 292: 151; Thomson et al., 1995, PNAS 92:7844; Thomson et al., 1998, Science, 282: 1145). 첫 번째 인간 만능줄기세포인 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cell, hESC)는 1998년 미국 James Thomson박사팀에 의해 인간 냉동 배아에서 확립되었고(Thomson et al, 1998, Science, 282,1145), 2007년에는 일본 Shinya Yamanaka 박사팀에 의해서 유전자 도입에 의해 인간 배아줄기세포와 유사한 인간 유도만능줄기세포(human Induced Pluripotent Stem Cell, iPSC)가 확립되었으며(Takahashi et al., 2007, Cell 131:861), 2013년에는 미국 오레곤 대학 Shoukhrat Mitalipov 박사팀에 의해 난자의 핵 치환을 통한 인간 복제배아줄기세포가 만들어져서(Tachibana et al., 2013, Cell 153:1228) 현재 3종의 인간 만능줄기세포가 존재한다. 만능줄기세포는 세포 분열에 의해 자신과 동일한 세포를 무한히 생산할 수 있는 재생능력(self-renewal)과 다양한 환경과 분화 자극에 의해 신체의 모든 기능성 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency)의 특징을 보임으로써 질병이나 사고에 의한 특정 장기나 세포 손상 시 특정 세포로 분화를 유도하여 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 모든 인간세포로 분화 할 수 있는 인간 만능줄기세포는 미래 재생의학의 핵심 줄기세포로 부상하고 있다(Hackett and Surani 2014, Cell Stem Cell 15:416). 실제로 최근 연구에서 영국 University College London과 Moorfields 안과병원은 노인 실명원인 1위인 노인성 황반 변성증 환자를 인간 배아줄기세포에서 유래한 망막 색소상피세포를 사용하여 시력을 회복시킴으로써 이미 그 가능성을 성공적으로 증명하였다(Cruz et al., 2018 Nature Biotechnology 36:328).

[0003] 2007년 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포와는 다른 종류의 만능줄기세포가 영국과 미국 연구팀에 의해 동시에 마우스 상배엽(Epiblast)에서 분리되어 상배엽 줄기세포(epiblast-derived stem cell, EpiSC)라고 명명되었으며, 마우스 배아줄기세포와 마찬가지로 만능성을 가져서 삼배엽을 형성할 수 있지만, 마우스 배아줄기세포와 세포형태 및 분자적 특성에서 차이가 많고, 오히려 인간 배아줄기세포와는 형태학적으로 그리고 분자적 특징으로도 유사한 특징을 보였다(Tesar et al., 2007 Nature 448:196; Brons, et al 2007 Nature, 448,191). 따라서 Cambridge 대학의 Austin Smith 박사는 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 만능줄기세포를 분리할 수 있으며, 착상 전 만능줄기세포를 순수(naive 또는 ground) 상태 만능성, 그리고 착상 후를 준(primed) 상태 만능성이라고 명명하였다(Nichols & Smith, 2009. Cell Stem Cell 4:487). 순수 상태와 준 상태 만능줄기세포는 세포모양, 성장속도, 분화능력, 메틸화 정도, 생식선 전승(germline transmission)능력 등에서 차이가 많은데, 준 상태는 크게 편편한 상태로 자라며 성장속도가 느리나, 순수 상태는 작은 돔(dome) 모양으로 자라며 트립신으로 단일세포로 떼어도 잘 자라고, 성장속도가 빠르며, 발생단계에서 아직 편중되지 않은 상태로 더 많은 세포로 분화능력이 기대되고, 메틸화 정도가 더 낮고, 생식선 전승능력이 더 탁월한 발생 초기 만능줄기세포로 알려졌다(Hackett and Surani 2014, Cell Stem

Cell 15:416). 마우스 순수 배아줄기세포처럼 인간 배아줄기세포는 비록 착상전의 배반포에서 유래했으나 마우스의 착상 후 상배엽에서 분리한 상배엽 줄기세포(EpiSC)와 아주 유사하여 준 만능줄기세포로 분류할 수 있으며 배양과정에서 준 배아줄기세포 배양법을 적용함으로써 마우스 EpiSC처럼 준 상태로 돌아가서 확립된 준 만능성 상태로 배양되었다고 볼 수 있다 (Tesar et al., 2007 Nature 448:196; Davidson et al., 2015, Development 142:3090).

[0004] 한편 다른 인간 만능줄기세포인 유도만능줄기세포, 복제배아줄기세포 등도 모두 착상 후 상배엽 특성을 보이는 준 상태를 나타내고 있어서, 인간 배 발생 단계에서 착상 전 만능줄기세포인 순수 만능줄기세포를 확립하려는 연구는 높은 주목을 끌어왔다. 마우스 배아줄기세포를 배양할 때 분화 신호를 억제 할 수 있도록 2가지 화학적 저해제인 미토겐 활성화 단백질 키나아제 (Mitogen activated protein kinase; MEK) 저해제와 글리코젠 합성 키나아제 3 (Glycogen synthase kinase 3; GSK3) 저해제 (2i)를 배지에 첨가하면 높은 순수 상태를 유지함이 밝혀지면서 (Ying et al., 2008, Nature 453, 519-523), 인간 순수 만능성 배아줄기세포 유도를 위해 2010년 MIT의 Rudolf Jaenisch 그룹은 Klf4, Klf2, Oct4유전자를 도입 발현하고 LIF와 2i 배지에서 준 상태 줄기세포로부터 순수 인간 만능줄기세포를 유도하였으며, 또한 같은 배양조건에서 인간 체세포의 재프로그래밍 (reprogramming)을 통해 순수 상태 인간 iPSC도 확립하였다 (Hanna et al., 2010, PNAS 107, 9222). Cambridge 대학 Austin Smith 팀은 Nanog, Klf2 유전자 도입 후, LIF, 2i, PKC 저해제, 및 아스코르브산 (ascorbic acid)을 포함하는 배양 방법으로 인간 순수 만능줄기세포로 유도하였다 (Takashima et al., 2014, Cell 158:1254). 그 후 유전자 도입 없이 준 상태 인간배아줄기세포에서 다양한 화학적 저해제 만을 이용한 순수 상태 인간 만능줄기세포 유도 배양방법이 많은 연구 그룹에 의해 보고되었으며 (Chan, et al., 2013, Cell stem cell 13:663; Gafni et al., 2013, Nature 504:282; Ware, et al., 2014, PNAS, 111:4484; Wang et al., 2014, Nature 516:405; Theunissen et al., 2014, Cell Stem Cell 15:471; Duggal et al., 2015, Stem Cells 33:2686; Guo et al., 2016, Stem Cell Reports 6: 437; Qin et al., 2016, Cell Reports 14:2301; Zimmerlin et al., 2016, Development 143:4368; Guo et al., 2017, Development 144:2748; Yang et al., 2017, Cell 169:243), 유도된 인간 순수 만능줄기세포 특성이 각각의 방법에 따라 서로 서로 달라 정확한 순수 상태와 특성에 대해서는 여전히 논쟁 중이다.

[0005] 최근 미국, 영국, 이스라엘, 싱가포르, 일본, 독일, 호주, 및 벨기에를 중심으로 효율적인 인간 순수만능줄기세포 배양방법을 개발하려는 경쟁이 치열한데 그 이유는 인간 순수 만능줄기세포가 가지는 많은 장점들 때문이다. 인간 순수 만능줄기세포는 인간의 착상 전 배아를 연구 할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 준 만능줄기세포와 비교할 때, 트립신 처리에 의한 단일세포배양이 가능하여 초보자도 배양하기 편하고, 세포성장속도가 빠르며, 높은 분화능력을 가지며, 유전자 편집(gene edition)이 쉬운 장점이 있어 임상적인 가치가 더 높고 실제 실용화를 촉진할 수 있는 신개념의 만능줄기세포로 기대 된다 (Collier, et al., 2018, Bioassays 40:1700239). 하지만 아직 연구 초기단계로 인간 순수만능줄기세포 특성이 각각의 방법에 따라 서로 서로 달라 정확한 순수 상태와 특성에 대한 표준화가 전혀 되어있지 않다. 따라서 각각의 배양방법에서 순수 상태, 준 상태, 중간 (intermediate) 상태 등이 혼재되어있는 상태이고 순수 상태 인간 만능줄기세포를 순수하게 분리하여 이용할 수 있는 표면 마커(marker)는 알려져 있지 않다 (Collier, et al., 2018, Bioassays 40:1700239). 현재 순수상태와 준 상태 인간 만능줄기세포를 구별할 수 있는 세 가지 방법이 알려져 있는데 준 상태에서는 검출되고 순수 상태에서는 검출되지 않는 표면 마커를 이용하는 방법으로, 첫 번째는 CD24 마커로 순수 상태에서는 낮게 발현하고 준 상태에서는 높게 발현하는 것을 이용하는 것이다 (Shakiba et al., 2015, Nature Commun. 6: 7329). 두 번째 방법은 대표적인 준 상태 인간 만능줄기세포 마커인 SSEA-4가 인간 순수 만능줄기세포에서는 음성인 것을 이용하는 방법이다 (Pastor et al., 2016, Cell Stem Cell 18:323). 세 번째 방법은 순수 상태 인간 만능줄기세포에는 결함하지 않는 GPR64, CDH3, NLGN4X, PCDH1를 인식하는 네 가지 항체를 이용하여 준 상태 인간 만능줄기세포를 구별하는 방법이다 (O'Brien, et al., 2017, Stem Cells 35:626). 하지만 인간 순수 만능줄기세포에 대한 알려진 양성 표면 마커가 없는 상태에서 재프로그래밍 동안 다양한 세포군이 혼재되어 있는 데에서 인간 순수 만능줄기세포를 구별하기는 쉽지 않다 (Collier, et al., 2018, Bioassays 40:1700239; Trusler et al., 2018, Stem Cell Research 26:36). 최근 영국 Cambridge대학의 Peter Rugg-Gunn 팀은 486종의 세포표면 마커를 인식하는 항체들을 사용하여 순수 상태와 준 상태 인간 만능줄기세포를 구별하여 인간 순수 만능줄기세포에서만 양성인 CD7, CD75, CD77, 및 CD130 마커를 찾아냈다고 발표하였다 (Collier et al., 2017 Cell Stem Cell 20:784). 하지만 이들도 현재까지 알려진 배양 방법에 따라 인간 순수 만능줄기세포로 배양했을 때 음성이 되는 경우가 많고 순수상태 이외에도 인간배아에서 상배엽 (epiblast)과 배외세포(extraembryonic cell)에도 결함하였다. 따라서 현재 사용되고 있는 인간 순수 만능줄기세포를 확인하는 항체만으로는 순수 상태 세포의 특성을 분석하고 세포를 분리하는데 충분하지 않으므로 인간 순수 만능줄기세포 특이적인 새로운 표면 마커 발굴이 필요하다. 순수 만능

줄기세포 새로운 표면 마커 발굴을 통해 순수 만능줄기세포의 효율적인 배양을 유도하는 배지 개발 및 효율적인 세포 치료제에 개발에 응용될 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Shakiba et al., 2015, Nature Commun. 6: 7329
 (비특허문헌 0002) Pastor et al., 2016, Cell Stem Cell 18:323
 (비특허문헌 0003) O'Brien, et al., 2017, Stem Cells 35:626
 (비특허문헌 0004) Collier et al., 2017 Cell Stem Cell 20:784

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 인간 순수 만능줄기세포에는 결합하고, 인간 준 만능줄기세포에는 결합하지 않는, 인간 순수 만능줄기세포 표면의 탄산 탈수 효소 14 (Carbonic Anhydrase 14; CA14) 단백질을 인식하는 단일클론항체 N16-F2을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포 검정 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포를 순수 분리하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 사용하여 인간 순수 만능줄기세포를 순수 분리하기 위한 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포를 제거하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 사용하여 인간 순수 만능줄기세포를 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 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 LCDR1, 서열번호 5를 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는, 순수 만능줄기세포 (naive pluripotent stem cell)에 특이적인 항체.
- [0016] 2. 항목 1에 있어서, 서열번호 7을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항체.
- [0017] 3. 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 항체는 단일클론항체인, 항체.
- [0018] 4. 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 항체는 준 만능줄기세포(primed pluripotent stem cell)에는 결합하지 않는, 항체.
- [0019] 5. 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 항체는 인간 순수 만능줄기세포의 CA14에 특이적으로 결합하는, 항체.
- [0020] 6. 항목 1 또는 2의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [0021] 7. 항목 6에 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 LCDR5를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 서열번호 14를 포함하는 LCDR6을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

- [0022] 8. 항목 6에 있어서, 중쇄를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드 서열, 및 경쇄를 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.
- [0023] 9. 항목 6의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.
- [0024] 10. 항목 1 또는 2의 항체를 생산하는 하이브리도마 (hybridoma).
- [0025] 11. 항목 1 또는 2의 항체를 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하기 위한 조성물.
- [0026] 12. 항목 1 또는 2의 항체; 및 설명서를 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하기 위한 키트.
- [0027] 13. 항목 1 또는 2의 항체와 줄기세포를 혼합하여, 상기 항체가 결합된 상기 줄기세포를 순수만능줄기세포로 결정하는 것을 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하는 방법.
- [0028] 14. 항목 10의 하이브리도마를 배양하여 순수 만능줄기세포에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 방법.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 단일클론항체 N16-F2는 인간 순수 만능줄기세포의 세포표면 단백질을 특이적으로 인식하므로, 마우스와 고등동물인 인간의 초기 배 발달의 차이를 연구할 수 있는 도구를 제공하여 인간 만능줄기세포의 분석 연구에 이용할 수 있으며, 세포 치료제 개발 시 인간 순수 만능줄기세포를 분리하거나 제거하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 또 인간 배아줄기세포의 무혈청 배지 개발에 대한 정보를 제공해줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도1은 준 H9 (primed H9) 과 순수만능줄기세포 유도 배지인 2i/L/X/F/P에서 배양한 작은 돔(dome) 모양의 순수 H9 세포 (H9-2i/L/X/F/P) 의 모양이다.
- 도2는 FACS 분석을 통하여 준 인간 만능줄기세포 마커인 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24, 및 CD90와 인간 순수 만능줄기세포 마커인 CD7, CD75, CD77, 및 CD130 발현을 보여준 그림으로, 전환된 순수 만능줄기세포 (H9-2i/L/X/F/P) 에서는 CD90을 제외한 모든 준 만능줄기세포 마커 발현이 감소하고 순수 만능줄기세포 마커로 알려진 CD7과 CD77은 발현이 증가함을 보여주는 그림이다. 실선은 각 단일클론항체이고, 회색바탕은 2차 항체만 포함한 것이다.
- 도 3은 정량적 중합효소 연쇄반응을 통한 순수 만능줄기세포 특이적인 유전자 발현 양상으로 H9-2i/L/X/F/P 세포에서 순수 만능줄기세포 유전자 (naive gene)인 Stella, Esrrb, Prdm14, Rex1, Klf2, Klf4, Klf5 발현이 준 H9 세포에서 보다 현저히 증가하고 준 만능줄기세포 유전자 (primed gene)인 Otx2, Sox17, Dnmt3B 발현은 순수 H9 세포에서 감소함을 보여주는 그림이다.
- 도 4는 FACS 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 N16-F2가 준 H9, 준 CHA-hES4, 준 iPS-NT4-S1 세포에는 결합하지 않고, 또한 마우스 배아줄기세포 (R1), 마우스 배아섬유아세포 (MEF)에는 결합하지 않음을 보여준다. 또한 다양한 암세포 분석에서 N16-F2는 인간 배아암종세포인 NT-2, 2102Ep, NCCIT에는 결합하지만 7종의 일반 암세포들 (Huh7, A375, A549, HepG2, NCI-H146, SNU387, SH-SY5Y)과 인간 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC) 에는 전혀 결합하지 않음을 보여준다. 이때, 실선은 단일클론항체이고 회색 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이다.
- 도 5는 FACS 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 N16-F2가 준 H9, 준 CHA-hES4, 준 iPS-NT4-S1세포에는 결합하지 않고, 2i/L/X/F/P를 포함하는 세 가지 다른 방법으로 유도한 순수 H9세포들 (H9-2i/L/X/F/P, H9-2i/L/F/A, H9-LCDM)과 순수 CHA-hES4 (CHA-hES4-2i/L/X/F/P, CHA-hES4-2i/L/F/A, CHA-hES4-LCDM)에는 결합하는 것을 보여주는 그림이다. 또한 N16-F2는 또 다른 형태 만능줄기세포로 유도 만능줄기세포주인 iPS-NT4-S1에서도 준 iPS-NT4-S1에는 결합하지 않고 세 가지 다른 방법으로 유도한 순수 iPS-NT4-S1 세포들 (iPS-NT4-S1-

2i/L/X/F/P, iPS-NT4-S1-2i/L/F/A, iPS-NT4-S1-LCDM)에는 결합하는 것을 보여준다. 이때, 실선은 단일클론항체이고 회색 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이다.

도 6은 항체 N16-F2의 클론1 (c1)과 클론2 (c2)의 하이브리도마 배양액에서 단백질-G 세파로오스 컬럼 크로마토그래피 (protein-G sepharose column chromatography)로 정제하여 10% SDS-PAGE로 분석한 그림으로 HC는 중쇄이고, LC는 경쇄를 나타낸다.

도 7은 인간 배아암종세포 NT-2 세포 표면을 바이오티닐화 (biotinylation)한 후에 N16-F2 단일클론항체 클론 c1과 c2를 사용하여 면역 침강시키고, 침강된 단백질을 10% SDS-PAGE에서 분석하고 (왼쪽 A), 다시 웨스턴 블라팅으로 PVDF 막으로 옮기고 스트렙타비딘-HRP (SA-HRP)로 분석한 그림이다 (오른쪽 B). 항체를 빼고 똑같은 실험을 한 것을 음성 대조군 (No Ab으로 하였다)으로 하였으며, 약 45 kDa 근처에 침강된 단백질이 보인다.

도 8은 N16-F2의 c1 클론항체로 NT-2세포에서 면역 침강시킨 단백질을 SDS-PAGE에서 분리하여 트립신으로 절단한 후 얻은 펩타이드를 LC-MS/MS분석을 통해 본 발명의 단일클론항체 N16-F2가 인식하는 항원이 CA14 (Carbonic anhydrase 14)임을 보여주는 결과로 분석된 각각의 펩타이드 (빨간색)가 CA14 전체 아미노산 서열 중에서 일치하는 부분을 보여주는 결과이다.

도 9은 N16-F2 항체의 c2 클론항체로 NT-2세포에서 면역 침강시킨 단백질을 SDS-PAGE에서 분리하여 트립신으로 절단한 후 얻은 펩타이드를 LC-MS/MS분석을 통해 본 발명의 단일클론항체 N16-F2가 인식하는 항원이 CA14 (Carbonic anhydrase 14)임을 반복해서 보여주는 결과로 분석된 각각의 펩타이드 (빨간색)가 CA14 전체 아미노산 서열 중에서 어디에 일치하는지 보여주는 결과이다. 분석된 일부 펩타이드가 c1클론 결과와 다르지만 같은 CA14임을 보여준다.

도 10는 본 발명의 단일클론항체 N16-F2의 두 클론 c1과 c2가 CA14 단백질을 인식하여 면역 침강시키는지 재확인하기 위해 CA14를 인식하는 토끼 폴리클로날 (rabbit polyclonal) 항-CA14 (GTX81537, Gene Tex) 항체와 함께 NT-2 세포에서 CA14를 면역침강 (immunoprecipitation, IP) 시킨 후 토끼 항-CA14 항체로 웨스턴 블랏하여 확인한 결과이다. 이때 IP를 하지 않은 H9 세포추출물을 양성 대조군으로 동시에 분석하였으며 N16-F2의 c1항체 자체도 음성 대조군으로 함께 분석하였다. 토끼 항-CA14 항체는 CA14 이소형(isoform) (글리코실화됨)에 만 결합한다. N16-F2항체는 이소형보다 원래 형태인 45kDa의 형태에 더 잘 결합하지만 이소형과 45kDa형을 둘 다 결합하는 것을 보여준다.

도 11은 myc 태그(tag)를 가진 CA14 단백질을 293FT세포에서 발현하는 발현벡터이다.

도 12은 본 발명의 단일클론항체 N16-F2가 CA14 단백질을 인식하는 것을 외래 유전자 도입 방법으로 확인하기 위해서 Myc이 표지된 CA14을 발현하는 벡터를 제조하여 293FT 세포에 도입한 후 CA14-myc이 잘 발현하는지 검증하고 (A), Myc, N16-F2 c1과 c2 항체, CA14 항체를 이용하여 면역침강 (IP) 하고, 면역침강된 항원을 토끼 항-Myc 항체에 의해 검출하여 c1과 c2 항체가 Myc 항체나 CA14 항체처럼 CA14를 인식함을 보여준다. 이때 input은 IP전의 세포추출액이고 N16-F2 c1항체와 CA14항체는 대조군으로 IP없이 같이 분석하였다.

도 13는 항체 N16-F2 유전자를 클로닝하기 위해 하이브리도마 N16-F2 두 클론 c1과 c2에서 전체 RNA를 추출한 후, 역전사 효소-중합효소연쇄반응을 이용하여 중쇄유전자 (HC)와 경쇄유전자(LC)의 가변영역을 증폭한 결과이다.

도 14은 N16-F2 c1과 c2 항체 중쇄 유전자 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 상보성 결정 영역 (Complementarity Determining Region; CDR)과 전체 아미노산의 잔기 위치를 표시한 그림이다.

도 15는 N16-F2 c1과 c2 항체 경쇄 유전자의 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR과 전체아미노산의 잔기 위치를 표시한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이제 본 발명은 첨부된 도면을 참조로 하기에서 더욱 충분히 기술될 것이며, 그러나 본 발명의 전부가 아닌 단지 일부의 구체 예가 예시된다. 실제로, 이들 발명은 많은 다양한 형태로 구체화될 수 있으며, 본원에 제시된 구체 예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 단수 형태는 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수한 대상을 포함한다.

[0034] 시중에 판매되고 있는 항체들의 제조방법(펩타이드 및 재조합단백질 이용)과는 다른 실제 배양된 인간 순수 만

능줄기세포를 직접 주사하여 인간 순수 만능줄기세포의 표면분자들에 대한 단일클론항체를 제조하면 인간 순수 만능줄기세포에 특이적이고, 실제로 기능적인 상태의 세포 표면분자들을 발굴할 수 있을 것으로 기대된다. 이렇게 만들어진 단일클론항체는 인간 순수 만능줄기세포의 특성을 더 정확히 분석하고, 세포 치료제 개발 시에 인간 순수 만능줄기세포를 순수하게 분리하거나 제거하는데 유용하게 쓰일 수 있다. 그리고 이 항체를 이용하여 특이적 인간 순수 만능줄기세포 표면분자를 발굴하고 이들의 줄기세포 유지, 재생, 분화능력에서의 역할을 규명하면 인간 순수 만능줄기세포 효율적인 배양을 위한 새로운 배지 개발에도 응용할 수 있다.

[0035] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 인간 순수 만능줄기세포에 특이적인 단일클론항체 군을 제조하기 위해 혈액 줄기세포의 표면항원 CD133을 발굴하는데 사용된 미끼면역주사방법을 개량하여 응용하였다 (Choi et al., 2008, Cell and Tissue Research 333:197). 먼저 인간 준 만능줄기세포 H9 (primed H9)을 2i/L/X/F/P (MEK/GSK inhibitor, LIF, XAV939, Forskolin, Purmorphamine, KOSR, DMEM/F12 medium)를 포함한 배지 (Zimmerlin et al., 2016, Development 143:4368) 에서 배양하여 작은 둥 모양 및 트립신 처리에 의한 단일세포로의 배양이 가능하고, 순수 만능줄기세포 특이적인 유전자를 높게 발현하는 인간 순수 만능줄기세포 H9 (H9-2i/L/X/F/P)을 확보하였다. 준 H9 세포를 생쥐의 오른쪽 뒷발에 미리 찌르고 3일 후에 왼쪽 뒷발에 H9-2i/L/X/F/P 세포를 주사한 후 3일 간격으로 총 7회 더 면역 주사한 후 왼쪽 뒷발의 오금 림프절을 분리하여 단일클론항체 제조에 사용하였다. 이들 인간 순수 만능줄기세포에 특이적인 단일클론항체 군은 인간 순수 만능줄기세포에는 결합하고, 인간 준 만능줄기세포에는 결합하지 않거나 약하게 결합하였다. 우리는 이들 항체 군중 N16-F2 항체가 인간 순수 만능줄기세포 표면의 CA14 (Carbonic Anhydrase 14)를 인식하고, 기존 알려진 항체와 다른 특성을 보이는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0036] 하나의 양태로서, 본 발명은 아연 금속을 포함하는 효소(zinc metalloenzyme)이며 I형 세포막 단백질 (type I membrane protein)로 알려진 CA14를 인간 순수 만능줄기세포의 새로운 표면 마커로 인식하는 단일클론항체 N16-F2에 관한 것이다.

[0037] 하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 N16-F2은 인간 순수만능줄기세포에는 결합하고 인간 준 만능줄기세포에는 결합하지 않거나 약하게 결합하는 단일클론항체이다.

[0038] 또 다른 하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 N16-F2은 생쥐 배아줄기세포에는 결합하지 않고, 인간 순수 만능줄기세포만 특이적으로 인식하는 단일클론항체이다.

[0039] 바람직한 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 N16-F2은 도14 및 15에 보이는 염기서열과 아미노산 서열을 포함하는 단일클론항체이다.

[0041] 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 인간 순수만능줄기세포의 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하므로, 인간 순수 만능줄기세포의 세포 표면 분자를 인식하는 단백질 분자이다.

[0042] 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.

[0043] 본 발명자는 인간 순수 만능줄기세포에 특이적인 단일클론항체를 생산하기 위해 개량된 미끼면역주사방법을 사용하였다 (Choi et al., 2008, Cell and Tissue Research 333:197). 구체적으로 준 H9 세포의 전형적인 세포 모양인 납작한 콜로니 및 미분화 마커의 발현을 확인한 후(도 1과 2A), 이 준 H9 세포를 미끼면역원으로 생쥐 뒷발 오른쪽에 먼저 주사하고, 2i/L/X/F/P 배지로 유도한 둥 모양의 인간 순수 만능줄기세포 H9-2i/L/X/F/P 세포 (도 1과 2B)를 왼쪽에 주사하여 두 세포에 공통으로 존재하는 표면 항원들에 대한 항체들은 오른쪽 뒷발 림프절에 모이게 하여 제거하고, 인간 순수 만능줄기세포에 특이적인 항체들만을 포함하는 왼쪽 림프절의 림프구를 분리하여 단일클론항체군을 제조하고 그 중 N16-F2 항체를 이용하여 항원을 분석하였다.

[0044] 구체적으로, 준 H9 세포를 2i/L/X/F/P를 포함한 배지와 5% 산소 농도에서 배양한 후 3~5일 이내에 둥 모양의 콜로니 형성을 확인하였고, 인간 순수 만능줄기세포의 특성 중 하나인 트립신 처리에 의한 3~4일 간격의 단일세포

로의 배양이 가능함을 확인한 후, 정량분석 중합효소 연쇄반응 (qRT-PCR)을 이용하여 순수 특이적인 유전자 (STELLA, ESRRB, PRDM14, REX1, KLF2/4/5)가 2i/L/X/F/P 배지에서 배양한 세포에서 높게 발현됨을 확인하였다 (도 3). 이렇게 준비한 미끼면역원(준 H9 세포)과 진짜 면역원(H9-2i/L/X/F/P 세포)을 이용하여 인간 순수 만능 줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 군의 제조에 이용하였다.

[0045] 이어서, 상기 배양된 준 H9 세포와 H9-2i/L/X/F/P 세포를 콜라게나아제 IV (Collagenase IV)로 떼어낸 후 이를 마우스의 뒷다리 발바닥을 통해 면역주사하고, 이 왼쪽의 오금 림프절을 분리하여 림프구를 얻어 F0 마이엘로마 세포와 융합하여 제조한 하이브리도마로부터 본 발명의 구체적 양태인 단일클론항체군 360개를 분리하고, 그 중에서 85종의 항체가 H9-2i/L/X/F/P 세포 표면에 결합하는 것을 확인하였다. 다시 그 중에서 14종이 또 다른 인간 준 만능줄기세포 CHA-hES4 세포에서 유도한 순수 만능줄기세포 형태인 CHA-hES4-2i/L/X/F/P 세포에서도 결합하는 것을 확인하였으며, 이들이 생쥐 배아줄기세포(R1), 생쥐 배아섬유아세포(mouse embryonic fibroblast; MEF) 등에는 결합하지 않는다는 것도 확인하였다. 이들 항체 중에서 N16-F2 항체는 IgG1과 카파사슬을 가진 단일클론항체로 인간 순수 만능줄기세포와 인간 배아암종세포에는 결합하고, 인간 준 만능줄기세포, 생쥐 배아줄기세포, 생쥐 배아섬유아세포, 7종의 다양한 암세포, 그리고 인간 말초 혈액단핵구 (PBMC) 에는 결합하지 않는다는 것을 확인하였다 (도4, 5). 구체적으로 항체 N16-F2이 다양한 인간 순수 만능줄기세포에 특이적 결합을 보이는지 추가 검증하기 위해 인간 준 만능줄기세포 H9 세포에서 순수 만능줄기세포로 전환하는 방법 중 최근 방법인 2i/L/F/A 배지 (MEK/GSK inhibitor, LIF, Forskolin, Ascorbic acid, KOSR, KO-DMEM)(Duggal et al., 2015, Stem Cells 33:2686) 나, 또는 LCDM 배지 (LIF, GSK inhibitor, Dimethundene maleate, Minocycline hydrochloride, IWR-1-endo, N2/B27, KOSR, DMEM/F12)(Yang et al., 2017, Cell 169:243)에서 유도한 또 다른 인간 순수 만능줄기세포에 대한 결합 여부를 분석하여 결합하는 것을 다시 확인하였고 (도5), 또한 또 다른 인간 준 만능줄기세포 CHA-hES4 세포를 세가지 다른 방법으로 순수 만능줄기세포 전환한 세포들 (CHA-hES4-2i/L/X/F/P, CHA-hES4-2i/L/F/A, CHA-hES4-LCDM)에도 결합하는 것을 확인하였다 (도5). 또한 또 다른 형태 인간 만능줄기세포인 유도 만능줄기세포 iPS-NT4-S1에서도 준 만능줄기세포 상태에서는 결합하지 않고 다양한 순수 만능줄기세포 상태 (iPS-NT4-S1-2i/L/X/F/P, iPS-NT4-S1-2i/L/F/A, iPS-NT4-S1-LCDM) 에서는 잘 결합하는 것을 확인하여 N16-F2가 인간 순수 만능줄기세포의 범용적인 마커를 인식하는 실용성이 높은 항체라는 것을 확인하였다 (도5).

[0046] 따라서 재현성을 검증하기 위해 N16-F2 하이브리도마 중 두 클론 c1과 c2를 사용하여 N16-F2항체를 생산하는 하이브리도마 배양액으로부터 N16-F2 항체 c1과 c2를 각각 정제하고 (도6), 이 두 항체를 동시에 후속실험에 사용하였다. 이 항체들을 사용하여 N16-F2 c1과 c2 클론항체는 약 45 kDa 세포표면 단백질을 면역 침강시키는 것으로 확인하였다 (도7). 본 발명의 단일클론항체가 인식하는 인간 순수 만능줄기세포의 단백질 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 ± 2 kDa, 바람직하게는 ± 1 kDa의 범위를 가질 수 있다.

[0047] 단일클론항체 N16-F2의 c1과 c2가 인식하는 단백질을 면역침강 후 SDS-PAGE에서 분리한 후 트립신으로 절단하여 LC-MS/MS 분석으로 그 단백질이 CA14라는 것을 확인하였다 (도8, 도9). N16-F2의 c1과 c2 항체가 인식하는 항원이 CA14인지를 검증하기 위해서 N16-F2 c1과 c2 클론과 시중에 판매되고 있는 토끼 폴리클로날 CA14 항체를 이용하여 면역침강 후 토끼 폴리클로날 CA14 항체로 웨스턴 블라팅을 통해 다시 N16-F2인식하는 항원이 CA14라는 것을 확인하였으며 (도10), Myc 태그를 연결한 CA14 유전자를 발현하는 벡터 (도11)를 293FT 세포에 형질 감염한 후 myc 태그된 CA14가 예상되는 위치에서 발현하는 것을 확인하고 (도 12A), 토끼 Myc, N16-F2-c1, N16-F2-c2, 토끼 CA14 항체를 이용하여 면역침강 후 웨스턴 블라팅을 통해 재확인하였다 (도12B). 따라서 이 N16-F2 클론 c1과 c2 항체의 유전자를 중합효소연쇄반응 방법으로 클로닝 하였으며 (도13) 각각의 중쇄 및 경쇄 염기서열 및 아미노산 서열을 확인하여 두 클론이 동일한 중쇄 경쇄 아미노산 서열을 가진 CA14를 인식하는 새로운 생쥐 단일클론항체라는 것을 확인하였다 (도14,15).

[0048] 본 발명의 단일클론항체인 N16-F2가 인식하는 CA14는 이산화탄소의 가역적인 수화 (Reversible hydration)를 촉매하는 아연 금속을 포함하는 효소 (zinc metalloenzyme)로 알려져 있으며, 세포표면 막에 존재하는 막 단백질이다 (Mboge et al., 2018 Metabolites 8:19; Singh, S et al., 2018 Molecules 23:1045). 탄산 탈수 효소는 이온수송(ion transport), 산-염기 균형(acid-base balance), 가스교환 (gas exchange), 광합성 (photosynthesis), 이산화탄소 고정 (CO2 fixation) 에서 중요한 역할을 수행하며, 사람에게서 15개의 isoform 이 알려져 있다 (Supuran C.T. 2016, Biochem. J. 473:2023; Mboge et al., 2018 Metabolites 8:19).

[0049] 이중 8개(CA 1, 2, 3, 4, 8, 10, 11, 13)는 세포질에 존재하고 2개 (CA 5A, 5B)는 미토콘드리아, 1개 (CA 6)는

세포 밖으로 분비되고, 4개 (CA 4 (GPI결합), 9, 12, 14)는 막에 결합되어있다. 막 결합 CA중에서 CA9, CA12는 암 발생, 암세포 신호전달, 암 진행과 전이, 산화도(acidification)에서 중요한 역할을 수행함이 밝혀지면서 큰 주목을 받았고 이들에 대한 수많은 화학적 저해제나 항체가 개발되었다 (Supuran C.T. 2017, Metabolites 7:48; Singh, S et al., 2018 Molecules 23:1045). 막 결합 CA 중 CA14는 하나의 막 통과 영역을 가진 것으로 1999년 생쥐에서 밝혀진 이후 (Mori, Ogawa et al. 1999, JBC 274: 15701), 곧 인간 CA14도 밝혀졌지만 (Fujikawa-Adachi, Nishimori et al. 1999, Genomics 61: 74), 다른 막 결합 CA들에 비해 많이 알려지지 않았다.

- [0050] CA14는 인간 및 마우스의 뇌에 존재하는 신경세포(neuron)의 막과 축색돌기 (axon)에서 발현되고 (Seppo et al., 2001, PNAS 98, 1918), 인간 만능줄기세포에서도 발현됨이 보고되어 있지만 그 기능에 대해서는 전혀 알려진 것이 없다 (Sperger, et al., 2003 PNAS 100:13350). 최근에 보고된 연구에 의하면, 인간 CA14 유전자의 프로모터에 결합하는 대표적인 전사인자로 EGR1, EOMES, EWS-ERG, FOXA2, GATA1/2, MITF, NANOG, SOX2, TRIM28등을 보고하였다 (Rouillard AD et al., Database (oxford), 2016, 1, 2016). NANOG, SOX2, TRIM28은 인간 순수 및 준 만능줄기세포의 전분화능과 자가재생 (self-renew) 능력을 조절하는 대표적인 전사인자이고, 나머지 전사인자들은 배발생 단계에서 NANOG, SOX2, OCT4와 같은 전분화능 조절인자에 의해 직접적으로 조절을 받는 분화인자로 알려져 있다. 따라서, 인간 순수 만능줄기세포에서 CA14 발현은 NANOG, SOX2, TRIM28과 같은 전분화능 전사인자에 의해서 밀접하게 조절될 것으로 판단된다. CA14가 인간 순수 만능줄기세포의 표면에 발현한다는 것은 본 발명의 특정 단일클론항체 N16-F2 사용으로 처음 밝혀짐으로써 인간 순수 만능줄기세포를 정의해 주는 중요한 세포 표면 마커로 작용할 수 있으며, 또한 이를 이용하여 인간 순수 만능줄기세포를 분리 분석하는데 사용할 수 있다. 또한 본 발명의 단일클론항체 N16-F2의 항체 서열분석을 통해 본 발명 이전에 개발된 CA14에 대한 항체와는 상이한 항체서열로 새로운 항체임을 입증하였다.
- [0051] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 바와 같은 본 발명의 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다.
- [0052] 하나의 구체적 양태에서, 본 발명은 단일클론항체 N16-F2을 생산하는 하이브리도마를 제공한다.
- [0053] 구체적 실시에서, 본 발명의 하이브리도마는 H9-2i/L/X/F/P 세포와 준 H9 세포를 생쥐의 왼쪽과 오른쪽 발바닥에 각각 주입한 후 상기 생쥐의 왼쪽 오금에서 림파구를 분리하여 골수종 암세포와 융합하여 제조하였다.
- [0054] 단일클론항체를 분리하는 하이브리도마는 이를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.
- [0055] 상기한 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도 (예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액(ascites fluid)으로부터 분리될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 구체적 실시에서는 본 발명의 단일클론항체의 대량 생산을 위해 하이브리도마의 배양 배지를 단백질 G-세파로오스 컬럼 크로마토그래피 (protein G-sepharose column chromatography)를 이용하여 정제하였다.
- [0057] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 N16-F2을 포함하는 인간 순수 만능줄기세포 분리용 조성물에 관한 것이다.
- [0058] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 N16-F2을 사용하여 인간 순수 만능줄기세포를 분리하는 방법에 관한 것이다.
- [0059] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 N16-F2을 포함하는 인간 순수 만능줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.
- [0060] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 N16-F2을 사용하여 인간 순수 만능줄기세포를 제거하는 방법에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명의 단일클론항체군은 효율적인 세포치료제 개발을 위해 혼재된 세포군속에서 존재하는 고효율 인간 순수 만능줄기세포를 분리하기 사용될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 단일클론항체군은 세포 치료를 위해 이식될 세포 중에 존재하는 인간 순수 만능줄기세포를 제거하기 위해 사용될 수 있다.
- [0063] 인간 순수 만능줄기세포를 선택적으로 제거하기 위해, 본 발명의 단일클론항체를 공지의 치료제와 직접 또는 링

커 등을 통하여 간접적으로 커플링 (예를 들어, 공유결합)시킬 수 있다. 항체와 결합될 수 있는 치료제에는 방사성 핵종(radionuclide), 약제, 림포카인, 독소, 이형가능성 항체 등이 있으나 이로 제한되지는 않는다.

[0064] 이식된 세포 중에 존재하는 인간 순수 만능줄기세포를 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 인간 순수 만능줄기세포를 제거하기에 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 전형적인 투여량 수준은 표준 임상적 기술을 사용하여 최적화할 수 있다.

[0065] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포의 검정 키트에 관한 것이다.

[0066] 본 발명의 단일클론항체는 항원-항체 복합체 반응을 통해 이식될 또는 이식된 세포 중의 인간 순수만능줄기세포를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라 인간 순수 만능줄기세포를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.

[0067] 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.

[0068] 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 생리화적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0069] 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.

[0070] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는 β 글루쿠로니다제, β 글루코시다제, β 갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린 에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르트테이트 아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트 데카복실라제, β 라타마제 등이 있으며, 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, α -프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[Mo(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 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.

[0071] 본 발명에서 용어 "백터"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. 백터는 부착된 절편을 증폭시키기 위하여 또 다른 DNA 절편이 부착된 레플리콘(replicon)일 수 있다.

[0072] "레플리콘"은 생체 내(in vivo) 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 백터들이 핵산을 조작하고, 반응 요소(response element) 및 프로모터를 유전자로 혼입하

는 등에 사용될 수 있다. 바람직한 벡터에는, 예를 들어, 플라스미드 또는, 예를 들어 아테노바이러스, 레트로 바이러스, 아테노-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.

[0073] 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, 바이럴 LTR, 사이토메갈로바이러스, SV40, 또는 조직-특이적 또는 종양-특이적 프로모터, 예컨대 α -태아단백질, 아밀라제, 카텝신 E, M1 무스카린 수용체 또는 γ 글루타밀 트랜스퍼라제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0074] 부가적인 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.

[0075] 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, 히그로마이신, 비알라포스(bialaphos) 제초제, 술폰아마이드 등; 및 표현형 마커, 즉, 안토시아닌 조절 유전자, 이소헨타닐 전달효소 유전자 등을 포함한다.

[0076] 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 항생제의 존재 하에 세포를 배양하는 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 선별 마커 유전자의 다른 예에는 메토틱세이트(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.

[0077] 본 발명의 항체는 이미징 마커(imaging marker)와 결합시켜 순수만능줄기세포를 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 Immunodiagnosics. 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.

[0078] 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 확인될 수 있는 물질의 예로는 가돌리늄(Gadolinium: Gd)이 있다.

[0079] 본 발명에서 용어 "핵산", "핵산 분자", "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되고, 단일 가닥 형태나 이중 가닥 나선(helix)으로의 리보뉴클레오사이드 (아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘; "RNA 분자") 또는 데옥시리보뉴클레오사이드 (데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시티민 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.

[0080] 본 발명에서 용어 "설명서"는 구두 지시 (예를 들면, 의사, 수의사, 건강 전문가, 전문 판매자 또는 판매 조직으로부터의 구두 지시) 및/또는 라디오 또는 텔레비전 매체 (즉, 광고), 또는 서면 지시 (예를 들면, 의사, 수의사 또는 다른 건강 전문 가로부터의 서면 지시(예를 들면, 처방전), 전문 판매자 또는 판매 조직으로부터 서면 지시(예를 들면, 마케팅 책자, 팜플렛 또는 다른 지도 설비)), 서면 매체 (예를 들면, 인터넷, 전자 메일 또는 다른 컴퓨터 관련 매체)일 수 있는 지시를 포함할 수 있다. 설명서는 예를 들어, 종이, 컴퓨터, 개인 정보 단말기(PDA: personal digital assistant), 전화 (휴대 전화 및 다른 통신 장치 포함) 또는 음성 또는 텍스트를 통신하기 위해 사용되는 다른 장치, 인터넷 등을 포함한 다양한 형태로 제공되고/되거나 포함되고/되거나 저장되고/되거나 전달될 수 있다.

[0082] <실시예 1> 인간 만능줄기세포의 배양 및 인간 순수 만능줄기세포의 확립

[0083] <1-1> 인간 준 만능줄기세포와 생쥐 배아줄기세포의 배양

[0084] 인간 준 만능줄기세포 H9는 Wicell Research Institute에서 제공한 프로토콜에 따라 배양하였고, CHA-hES4와 인간 유도 만능줄기세포주인 iPS-NT4-S1는 차병원에서 분양 받아 배양하였다. 임신한 CF1 생쥐에서 배아 섬유아 세포(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)를 적출 및 배양하여 γ 조사(γ irradiation) 후에 지지 세포(feeder cell)로 사용하였다. 20%(v/v) KOSR (knockout serum replacement), 1%(v/v) NEAA, 0.1mM β 머캅토에탄올(β mercaptoethanol), 100U/ml 페니실린-G, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 8ng/ml bFGF를 첨가한 DMEM/F12 (Invitrogen) 배지에서 배양하였고, 5-6일마다 계대 배양시에는 콜라게나아제 IV (1mg/ml)로 5분간 처리 후에 황색 팁(yellow tip)으로 적절한 크기로 자른 후 새로운 feeder 세포 위에서 배양하였다. 생쥐 배아줄기세포 R1은 지지 세포 위에서 15% (v/v) FBS, 0.1mM β 머캅토에탄올, 1mM 글루타민, 0.1mM NEAA, 100U/ml 페니실린-G, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 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

[0086] <1-2> 인간 순수 만능줄기세포의 확립

[0087] 준 H9, 준 CHA-hES4, 준 iPS-NT4-S1 세포를 콜라게나아제 IV (1mg/ml)로 5분간 처리하고, 황색 틱을 이용하여 적절한 크기로 자른 후에 미리 깎아둔 MEFs 위에 옮겼다. 다음날 2i/L/X/F/P 배지 (1μM PD0325901, 3μM CHIR99021, hLIF(20ng/ml), 4μM XAV939, 10μM Forskolin, 2μM Purmorphamine, 20% (v/v) KOSR, DMEM/F12, 1% (v/v) L-글루타민, 1% (v/v) NEAA, 0.1mM β-머캅토에탄올, 1x 페니실린/스트렙토마이신) (Zimmerlin et al., 2016, Development 143:4368), 2i/L/F/A 배지 (1μM PD0325901, 3μM CHIR99021, hLIF(1000U/ml), 10μM Forskolin, 아스코르브산(50ng/ml), bFGF(16ng/ml), 20% (v/v) KOSR, KO-DMEM, 1% (v/v) L-글루타민, 1% (v/v) NEAA, 0.1mM β-머캅토에탄올, 1x 페니실린/스트렙토마이신) (Duggal et al., 2015, Stem Cells 33:2686), 또는 LCDM 배지 (hLIF(10ng/ml), 1μM CHIR99021, 2μM (S)-(+)-Dimethundene 말레이트, 2μM 미노사이클린 산염Minocycline hydrochloride), 0.5~1μM IWR-1-endo, 2μM Y-27632, N2/B27, 1% (v/v) GlutaMAX, 1% (v/v) NEAA, 0.1mM β-머캅토에탄올, 5% (v/v) KOSR, DMEM/F12) (Yang et al., 2017, Cell 169:243) 배양액으로 교체하였다. 2i/L/X/F/P 배지에서 5% (v/v) 산소 배양기에서 배양한 인간 순수 만능줄기세포는 3-5일 후 Dome 모양의 세포로 변하고, 확립된 순수 만능줄기세포 H9 세포는 3-4일 간격으로 0.05% (v/v) 트립신-EDTA를 이용하여 계대 배양하였다 (도1).

[0089] <1-3> 세포표면 항원염색

[0090] 인간 준 및 순수 만능줄기세포를 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 40μm 여과기(strainer)를 통과시킨 후 한 시료 당 약 2~3 x 10⁵ 세포를 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 30분간 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 순수 만능줄기세포 마커로 알려진 CD7, CD75, CD77, CD130발현도 관찰하였다. 그 결과 인간 준 만능줄기세포 마커들 중 CD90을 제외한 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, 및 CD24 발현이 인간 순수 만능줄기세포에서는 현저히 감소함을 관찰하였고 순수 만능줄기세포 마커로 알려진 CD7과 CD77발현이 H9-2iL/X/F/P에서 증가하여 인간 순수 만능줄기세포가 잘 유도되었음을 확인하였다 (도2A, 2B).

[0092] <1-4> 순수 만능줄기세포 특이적인 유전자의 발현 확인

[0093] 인간 준 및 순수 만능줄기세포를 콜라게나아제 IV 처리하여 떼어내고, 0.1% (w/v) 젤라틴-코팅된 플레이트에서 30분간 반응시켜 지지 세포를 제거한 후, RNAiso Plus (TaKaRa)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem)를 이용한 qRT-PCR을 통해 순수 및 준 특이적인 유전자의 발현을 확인하였다. 이때 사용한 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 서열은 표 1에 기재하였다.

표 1

	Gene	Sequence (5'→3')
Naïve genes	STELLA (DppA3)(F)	GTTACTCGGCGGAGTTCGTA
	STELLA (DppA3)(R)	TGAAGTGGCTTGGTGTCTTG
	REX1 (Zfp42) (F)	GGAATGTGGGAAAGCGTTCGT
	REX1 (Zfp42) (R)	CCGTGTGGATGCGCACGT
	ESRRB(F)	GCCATGATGGAAAATGCCCC
	ESRRB(R)	CCAGAGATGCTTTCCTGGC
	PRDM14(F)	TGAGCCTTCAGGTCACAGAG
	PRDM14(R)	ATTTCCTATCGCCCTTGTC
	KLF2(F)	CACACAGGTGAGAAGCCCTA
	KLF2(R)	GCACAGATGGCACTGGAATG
	KLF4(F)	TACCAAGAGCTCATGCCACC
	KLF4(R)	CGCGTAATCACAAGTGTGGG
	KLF5(F)	CCTGGTCCAGACAAGATGTGA
	KLF5(R)	GAACTGGTCTACGACTGAGGC
Primed genes	OTX2(F)	CAAAGTGAGACCTGCCAAAAGA
	OTX2(R)	TGGACAAGGGATCTGACAGTG
	DNMT3B(F)	AGGGAAGACTCGATCCTCGTC
	DNMT3B(R)	GTGTGTAGCTTAGCAGACTGG
	SOX17(F)	GGCGCAGCAGAATCCAGA
	SOX17(R)	CCACGACTTGCCAGCAT

[0094]

[0095]

그 결과 2i/L/X/F/P배지에서 유도한 순수 H9 세포에서 순수 만능줄기세포 유전자 (naive gene)인 Stella, Esrrb, Prdm14, Rex1, Klf2, Klf4, Klf5 발현이 준 H9 세포에서보다 현저히 증가하고 준 만능줄기세포 유전자 (준 gene)인 Otx2, Sox17, Dnmt3B 발현은 순수 H9 세포에서 현저히 감소함을 관찰하여 2i/L/X/F/P 배지에서 인 간 순수 만능줄기세포가 잘 유도되었음을 확인하였다 (도 3).

[0097]

<실시예 2> 하이브리도마 제조

[0098]

<2-1> 인간 순수 만능줄기세포 특이적 항체 제조를 위한 미끼 면역주사 (decoy immunization)

[0099]

순수 H9 세포의 세포 표면 및 내부 분자에만 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 만들기 위해서, 6주된 11 마리의 암컷 Balb/c 생쥐 오른쪽 발바닥에 2×10^6 개의 준 H9 세포를 -3, 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 주사하였고, 같은 수의 순수 H9-2i/L/X/F/P 세포를 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 왼쪽 발바닥에 각각 주사하고 22일 되는 날 면역주사(immunization)된 마우스를 경주 탈골한 후 왼쪽 뒷발로 부터 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 F0 마이엘로마 세포를 1:5의 비율로 섞은 후, 혈청 없는 배지인 DMEM (Invitrogen)로 2번 세척 한 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 20ml을 연속적으로 넣고, 5분간 정지한 후 원심분리를 하여 세포를 모았다. 96웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰을 20% (v/v) FBS, HAT, HCF (hybridoma cloning factor)가 포함된 DMEM 배지에서 약 2주간 배양하였고, 샌드위치 ELISA 방법을 이용하여 항체를 생산하는 하이브리도마만을 선별하였다.

[0101]

<2-2> 하이브리도마의 클로닝

[0102]

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, Sigma사)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. 다음으로 각 클론의 배양액을 상기 실시예 <1-3>에 기술한 FACS 분석을 통해 H9-2i/L/X/F/P 세포에 결합하는 하이브리도마를 선별하고 서브클로닝(subcloning)하여, H9-2i/L/X/F/P 세포에 대한 결합력을 유지한 단일클론항체군을 분리하는 33종의 하이브리도

만균을 선발하였다. 이중 12개의 항체는 CHA-hES4-2i/L/X/F/P 세포에도 결합하여 추가로 선발하였고 이중 항체 N16-F2은 IgG1과 κ 사슬을 가진 항체로 이 특허에서 인식 항원과 특성을 분석하였다.

[0104] <실시예 3> 단일클론항체 N16-F2의 결합 특이성 분석

[0105] <3-1> 인간 준 과 순수 만능줄기세포, 생쥐 배아줄기세포, 다양한 암세포 및 분화된 정상 세포 에 대한 결합 특이성 분석

[0106] 단일클론항체 N16-F2의 각종 세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 FACS 분석을 수행하였다. 구체적으로, 준 H9, 준 CHA-hES4, 준 iPS-NT4-S1, 생쥐 배아줄기세포 (R1), 생쥐 배아섬유아세포(MEF), 다양한 암세포주, 인간 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC) 및 세가지 방법으로 유도한 인간 순수 만능줄기세포들을 준비하여 만능줄기세포는 먼저 콜라게나아제 IV($\mu\text{g}/\text{ml}$)를 이용하여 5분 동안 처리해서 세포를 떼어내고, PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후, TrypLE 용액 (Invitrogen)을 넣고 실온에서 3분간 반응시켰고, 생쥐 배아줄기세포 R1과 여러 가지 암세포는 0.05% (w/v) 트립신-EDTA을 처리하여 떼어내었다. 떼어낸 모든 세포는 단일세포로 분리하기 위해 40 μm 여과기 (strainer) (BD Biosciences, Seoul, Korea)를 이용하여 여과시키고 각 단일세포를 ml 당 약 2×10^5 cell을 PBA에 섞은 후, 실시예 <1-3>과 동일한 방법으로 단일클론 항체 N16-F2를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC (BD Biosciences)를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest software(BD sciences)를 이용하여 propidium iodide(PI)-염색 세포에 대해서 항체 결합력을 분석하였다. 도 4 에서 실선은 N16-F2 결합력을 의미하고, 회색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. N16-F2은 준 H9, 준 CHA-hES4, 준 유도만능줄기세포인 iPS-NT4-S1 세포에는 결합하지 않았고, 생쥐 배아줄기세포 (mESC R1), 생쥐배아섬유아세포(MEF) 및 7종의 다양한 암세포에서도 결합하지 않았지만, 배 발생 중에 발생하는 인간 배아암종 세포인 NT-2, 2102EP, NCCIT에는 결합하고, 분화된 인간 정상세포인 인간 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC)에도 결합하지 않았다 (도4).

[0107] 반면 N16-F2은 세 가지 형태 H9 순수 만능줄기세포 (H9-2i/L/X/F/P, H9-2i/L/F/A, H9-LCDM)에 특이적으로 결합하고, CHA-hES4 순수 만능줄기세포 (CHA-hESC4-2i/L/X/F/P, CHA-hESC4-2i/L/F/A, CHA-hES4-LCDM) 에 특이적인 결합력을 보였으며, 순수 유도 만능줄기세포로 유도한 iPS-NT4-S1 (iPS-NT4-S1-2i/L/X/F/P, iPS-NT4-S1-2i/L/F/A, iPS-NT4-S1-LCDM)에도 결합력을 보여주었다. 따라서 N16-F2은 다양한 형태의 인간 순수 만능줄기세포에 범용적으로 발현하는 표면항원을 인식하는 실용성이 높은 항체라는 것을 확인하였다 (도5).

[0109] <3-2> 단일클론항체 N16-F2의 정제

[0110] 단일클론항체 N16-F2의 특성을 분석하기 위해 N16-F2 하이브리도마에서 항체를 정제하였다. 특성 분석의 재현성과 정확성을 위해서 N16-F2 하이브리도마에서 유래한 두 개의 서브클론(subclone)인 클론 c1과 클론 c2 세포의 하이브리도마 세포 배양액을 독립적으로 모아 동일한 두 개의 항체를 각각 정제하여 실험하였고 동일한 실험결과를 얻을 수 있는지 관찰하였다. 먼저 세포배양액을 회수하여 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 사용하였다. 단백질-G 세파로오스를 크로마토그래피 컬럼에 넣고, 컬럼을 연동 펌프(peristaltic pump)에 연결하고, PBS(pH8)로 충분히 세척한 후 항체 상층액을 천천히 통과시켜 c1과 c2 항체를 단백질-G 세파로오스 컬럼에 결합시켰다. PBS(pH8)로 충분히 세척한 후 0.2M 글리신(pH 2.7)으로 항체를 용출하였고, 1M Tris-HCl(pH 9.0)를 첨가하여 용출액을 중화시켰다. 이 항체를 PBS에 투석(dialysis)한 후 사용하였다. BCA 단백질 분석 키트(BCATM Protein Assay Kit, Pierce)를 이용하여 정제된 항체량을 측정하고, SDS-PAGE를 이용하여 정제 양상을 확인하여 c1과 c2클론에서 N16-F2항체가 각각 순수하게 정제되었음을 확인하였다 (도6).

[0112] <실시예 4> 단일클론항체 N16-F2가 인식하는 항원 동정

[0113] <4-1> 단일클론항체 N16-F2의 c1과 c2가 인식하는 세포표면 단백질 분자의 확인

[0114] N16-F2 항체가 결합하는 청구항 10의 하이브리도마를 배양하여 순수 만능줄기세포에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 방법.

[0115] 세포 표면의 바이오틴 레이블링(biotinylation)은 EZ-Link Sulfo-NHS- LC-Biotin (Pierce)에서 제시한 프로토콜을 약간 수정하여 수행하였다. 100 밀리미터 세포배양 플레이트에 배양한 NT-2 세포를 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 미리 테워둔

PBS(pH 7.4)로 2회 세척한 후 Biotin (0.5mg/ml)이 녹아있는 차가운 PBS(pH 8.0)를 넣고, 4℃에서 30분간 반응시킨다. 차가운 PBS(pH 8.0)로 3회 세척한 후 Biotin 레이블링된 세포는 용해 완충액 (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 40분간 원심 분리해서 핵을 제거한 후 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다.

[0116] 단백질-G 아가로오스 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위해서, 약 1×10^7 세포의 세포 용해물에 20μl 단백질-G 아가로오스를 넣고 4℃에서 2시간동안 반응시킨 후 원심분리를 통해 그 단백질-G 아가로오스를 회수하여 용해 완충액을 이용해 4~5회 세척한 샘플을 음성 대조군으로 사용하였다. N16-F2의 c1과 c2에 의해 인식되는 항원을 면역침강하기 위해서 단백질-G 아가로오스에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거한 세포 용해물에 각 항체 2μg을 넣고 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 20μl 단백질-G 아가로오스를 넣고 4℃에서 2시간 동안 더 반응시켰다. 면역 침강된 면역 혼합체를 용해 완충액을 이용해서 4~5회 세척하고, 각 항체에 결합된 항원을 용출(elution)하기 위해 5x 샘플 완충액을 넣고, 100℃에서 5분간 가열하였다. 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후 Instant Blue (Expedeon)로 염색하여 c1과 c2 특이적인 단백질 (N16-F2 antigen)이 약 45 kDa에서 검출됨을 확인하였다 (도7A).

[0117] 음성 대조군 단백질과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블로팅을 하였다. 이 막을 5% (w/v) 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹을 하였다. 0.1% (v/v) PBST로 3번 세척한 후, 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP(1:7,000; GE healthcare)를 실온에서 1시간 더 반응시켰다. 0.1% (v/v) PBST로 3번 세척하고, 바이오틴이 라벨링된 세포표면 단백질을 ECL 검출 키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과 단일클론 항체 N16-F2의 c1과 c2는 각각 약 45 kDa 세포표면 단백질을 면역 침강시키는 것을 확인하였다 (도7B).

[0119] <4-2> 단일클론항체 N16-F2의 c1과 c2에 의해 면역 침강된 항원의 동정

[0120] 단일클론항체 N16-F2의 c1과 c2에 의해 면역 침강된 단백질을 포함하는 SDS 겔을 Instant Blue 염색 용액 (Expedeon)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다 (도7A). 단백질은 Shevchenko(Shevchenko, et al., Anal. Chem. 68:850-858, 1996)등의 방법에 따라 개질된 돼지 트립신(modified porcine trypsin)을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해하였다. 겔 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 포함된 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 c1과 c2가 동일한 CA14 (Carbonic Anhydrase 14)을 인식하는 것임을 확인하였다 (도8, 도9).

[0122] <실시예 5> 단일클론항체 N16-F2 항원 검증

[0123] <5-1> 단일클론항체 N16-F2에 의해 면역침강된 CA14 항원 검증

[0124] 단일클론항체 N16-F2에 의해 면역 침강시킨 CA14 단백질을 상업적으로 판매되는 CA14 항체에 의해 인식되는지를 확인하기 위해서, 인간 배아암세포 (embryonal carcinoma) NT-2 세포 추출액을 두 N16-F2 클론항체 c1과 c2, rabbit polyclonal CA14 (GTx81537, Gene Tex) 항체로 각각 면역 침강한 후 음성 대조군 단백질과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겼다. 이 막을 5% (w/v) 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹을 하였다. 0.1% (v/v) PBST로 3번 세척한 후, 토끼 폴리클로날 CA14 (N-

term) 항체를 4℃에서 12시간 반응시켰다. 0.1% (v/v) PBST로 3번 세척 한 후, 항-토끼 IgG-HRP(1:10,000)를 실온에서 1시간 동안 더 반응시켰다. 0.1% (v/v) PBST로 3번 세척한 후, ECL 검출키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 단일클론항체 N16-F2의 두 클론 c1과 c2가 CA14를 인식하는 토끼 폴리클로날(rabbit polyclonal) 항-CA14 항체처럼 CA14 단백질을 인식하여 면역 침강시키는 것을 관찰 할 수 있었다 (도 10). 이때 토끼 항-CA14 항체는 CA14 이소형(isoform) (글리코실화됨)에만 결합하는 것을 관찰하였고, N16-F2항체인 c1과 c2 는 글리코실화된 이소형보다 45 kDa의 원래 형태의 CA14에 더 잘 결합하지만 CA14의 두 가지 이소형에 모두 다 결합할 수 있다는 것을 보여 주었다 (도10).

[0126] <5-2> myc-tag된 CA14 유전자 발현에 의한 N16-F2 항원의 검증

[0127] 단일클론항체 N16-F2의 항원이 CA14 인지를 재확인하기 위해서, pCMV-CA14 (hMU004339, KHGB) 벡터를 구입하여 EcoR I (F); 5'-CCGAATTCATGTTGTTCTCCGCCCTCT-3'와 CA14-Xba I 5'-GGTCTAGATGCTCAGTCGTGGCTT-3' 프라이머를 이용하여 PCR를 수행한 후, PCR 산물과 pcDNA3.1(+)-Myc/His 벡터(Invitrogen)를 EcoR I 과 Xba I 효소로 처리하고 라이게이션(Ligation)한 후 pcDNA3.1(+)-CA14-Myc/His 벡터를 제조하였다 (도 11). CA14를 발현하는 이 벡터를 293FT 세포에 PEI 용액을 이용해서 형질감염 시킨 후 항-Myc 태그(Abcam) 항체로 Myc-태그된 CA14의 정상적인 발현을 확인하였다 (도12A). 다시 한번 pcDNA3.1(+)-CA14-Myc/His 벡터를 293FT 세포에 형질감염 시킨 후 실시예 <4-1>에 명시된 용해 완충액을 이용하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 12,000rpm 속도로 40분간 원심 분리해서 핵을 제거한 상층액(1 mg)을 사용하여 항-Myc tag, N16-F2 c1과 c2 클론항체, 토끼 항-CA14 항체로 Myc-태그된 CA14를 면역침강 (IP)한 후 면역침강된 항원이 항-Myc 항체에 의해 검출되는지를 확인한 결과, 항-Myc, N16-F2-c1, N16-F2-c2, 항-CA14 항체에 의해 면역침강된 항원이 항-Myc 항체에 검출되는 것을 확인하였다. (도12B). 이러한 결과는 N16-F2 항체가 Myc-태그된 CA14를 인식함을 보여주어 실제로 N16-F2 항체가 인식하는 항원이 CA14 라는 것을 반복해서 증명하는 것이다.

[0128]

[0129] <실시예 6> 단일클론항체 N16-F2 항체유전자 및 아미노산 분석

[0130] <6-1> N16-F2 c1과 c2 클론항체들의 유전자 클로닝

[0131] 왕성하게 자라는 하이브리도마 N16-F2 세포 c1과 c2클론을 각각 5×10^6 개를 원심 분리하여 수확한 후 RNA iso plus reagent (TaKaRa, Otsu, Japan)으로 공급자의 프로토콜에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 얻어진 전체 RNA 는 A260을 측정하여 RNA 양을 정량하였다. 전체 RNA를 Prime Script RT Master Mix (TaKaRa)을 넣어 역전사중합효소 연쇄반응혼합액을 만들어 cDNA를 합성하였다. 항체 유전자를 클로닝하기 위해서는 알려진 중합효소연쇄 반응 프라이머를 변형한 후 사용하였다 (Wang, et al J. Immunol. Methods 233, 167, 2000). 합성된 cDNA로 중쇄 클로닝을 위해서는 IgG1 불변영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 염기서열 5'-GGA GTC GAC ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'인 올리고뉴클레오타이드 25 pmole과 중쇄항체 가변영역 N말단에 해당하는 프라이머인 염기서열 5'MH1 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC-3'과 5'MH2- 5'-ctt ccg gaa ttc SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3' 인 올리고뉴클레오타이드를 넣고 연쇄 중합반응혼합액을 만들었다. 경쇄 클로닝을 위해서는 카파사슬 불변영역에 해당하는 프라이머인 5'- ggt gtc gac GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3' 올리고뉴클레오타이드 와 카파사슬 가변영역 N 말단에 해당하는 프라이머인 5'MK 5'-cgg aag ctt GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3'과 프라이머6 5'- GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT-3'과 프라이머7 5'-GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA-3' 각각을 사용하였다. 중합효소연쇄반응 생산물의 효율적인 클로닝을 위하여 경쇄의 경우는 3'-프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였고, 5'-프라이머 경우 HindIII 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄인 경우에는 5'-프라이머에는 EcoRI, 3'-프라이머에는 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄 및 경쇄반응액을 각각 섞은 후 먼저 95℃에서 1분, 58℃에서 45초, 72℃에서 1분으로 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 13).

[0133] <6-2> N16-F2 c1과 c2 클론항체들의 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

[0134] 상기 실시예에서 증폭해낸 N16-F2의 c1과 c2 항체 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 중합효소연쇄반응 산물을 중쇄는 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄는 HindIII와 SalI으로 처리한 후 1.0 % (w/v) 아가로스 겔에 전개시켜

서 FavorPrep GELTMPCR Purification Kit(Favorgen사, 대만)로 약 400bp와 390bp에 해당하는 DNA를 분리하였다. 중쇄유전자를 클로닝할 벡터로 사용할 pBluescript KS+를 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄유전자 클로닝 벡터로는 pBluescript KS+를 HindIII와 SalI으로 처리한 다음 FavorPrep GELTMPCR Purification Kit (Favorgen사, 대만)로 분리하였다. 이 두 DNA를 T4 DNA 연결효소(New England Biolab사, 미국)로 연결하고 대장균 DH5 α에 CaCl₂ 방법으로 형질 전환한 다음, 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA삽입물을 가진 클론, 경쇄의 경우 약 390bp 크기를 가진 대장균 클론들을 선발하였다.

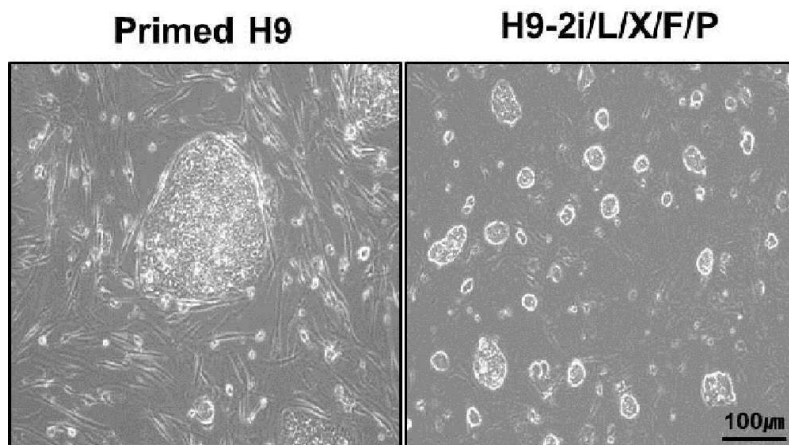
[0135] 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 100 μ g/ml의 앰피실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA 미니프랩 키트(Intron사 한국)를 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 결정하였다. 중쇄 및 경쇄 cDNA의 염기서열을 아미노산으로 바꾼 후 각 아미노산 배열을 Kabat 데이터베이스를 이용하여 분석하였다(Johnson G. and Wu, T.T. Nucleic Acids Res. 29: 205, 2001). c1과 c2클론에서 각각 얻은 유전자 서열은 정확히 일치하여 동일한 항체라는 것을 확인하였으며 중쇄 서열 (도14)과 경쇄 서열(도15)의 염기 서열 위의 숫자는 Kabat 넘버링에 따라 정하였다. 각각의 아미노산 서열을 분석한 결과 이 면역유전자들은 항체구조에 특징적인 잔기와 배열을 갖추고 있으며 (도14, 15), 구체적으로 보면 면역글로불린 여러 그룹 가운데서 중쇄는 서브그룹 IIA 에 속하고, 경쇄는 서브그룹 I에 속하였다 항원을 인식하는 CDR 잔기로는 중쇄의 경우, CDR1은 23-35, CDR2는 50-66, CDR3는 99-104이며, 경쇄의 경우 CDR1은 24-39, CDR2는 55-62, CDR3는 94-102에 해당하였다. 구조상 필수적인 디설피드 결합은 중쇄의 경우 22번과 96번 시스테인이, 경쇄의 경우 23번과 93번 시스테인이 관여하였다. 이 유전자의 분석 결과로부터 중쇄 및 경쇄 유전자는 기능적임을 확인할 수 있었다.

[0136] 본 발명은 일부 구현 예를 참조로 하여 상기 제시되고 기재되었으나, 당업자는 상술된 특정 실험이 단지 본 발명의 예시임을 용이하게 인지할 것이다. 본 발명의 사상을 벗어남이 없이 다양한 변형이 이루어질 수 있음이 이해되어야 한다. 예를 들어, 상기 검정에서 항체의 활성에 따른 실시예들을 기술하였으나, 하나 이상의 변이체, 예를 들어, 동일한 CDR 서열을 갖고 85% 이상의 서열 동일성을 갖는 항체가 기술된 활성을 가진다는 것이 이해될 것이다. 다른 변이체는 유사하거나, 더 적은 활성을 가지거나, 활성을 지니지 아니할 수 있거나, 기능 검정 시, 일부 길항 활성을 지닐 수 있다.

[0137] 예를 들어, 청구항 구성 목적을 위해, 이하 기재되는 청구항은 어떤 식으로든 이의 문자 그대로의 언어보다 좁게 해석되어선 안 되고, 따라서 명세서로부터의 예시적 구현 예가 청구항으로 읽혀서는 안 된다. 따라서, 본 발명은 예시로서 기재되었고, 청구항의 범위에 대한 제한이 아님이 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 하기 청구항에 의해서만 제한된다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 발행된 특허, 특허 출원, 서적 및 저널 논문은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 각각 포함된다.

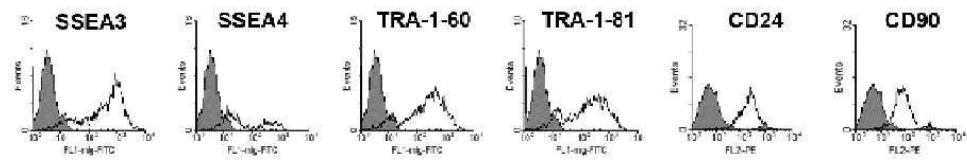
도면

도면1

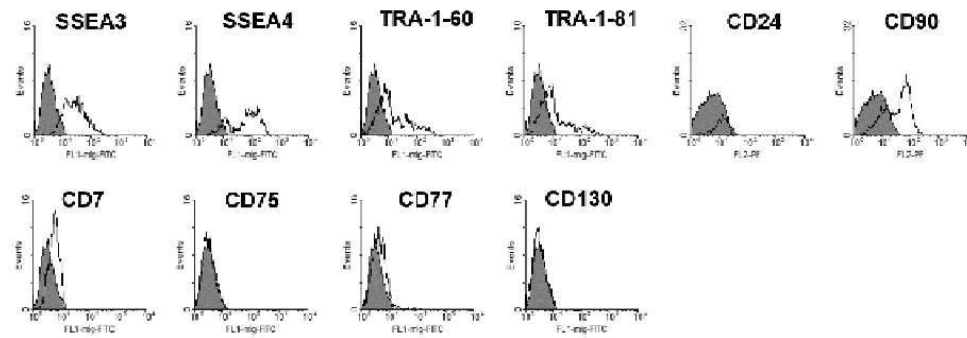


도면2

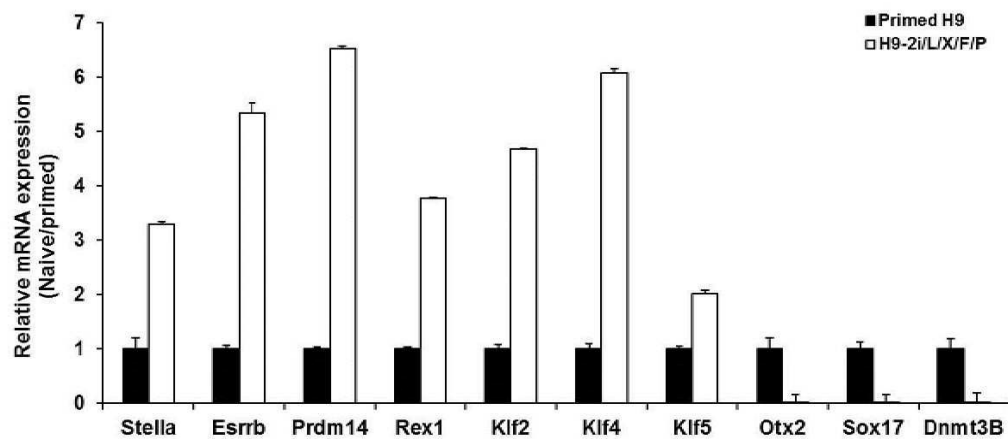
A. Primed H9



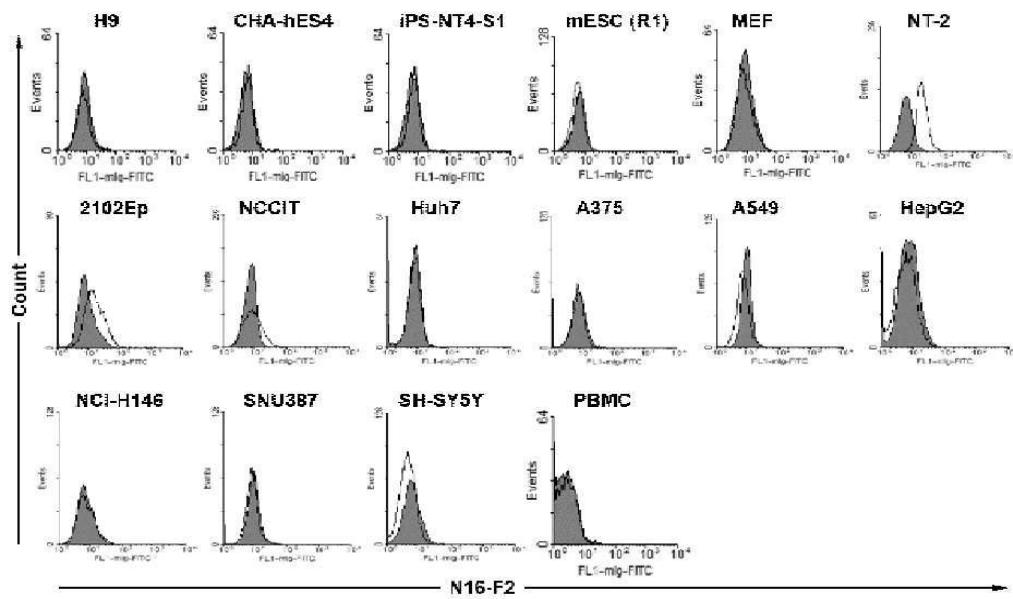
B. H9-2i/L/X/F/P



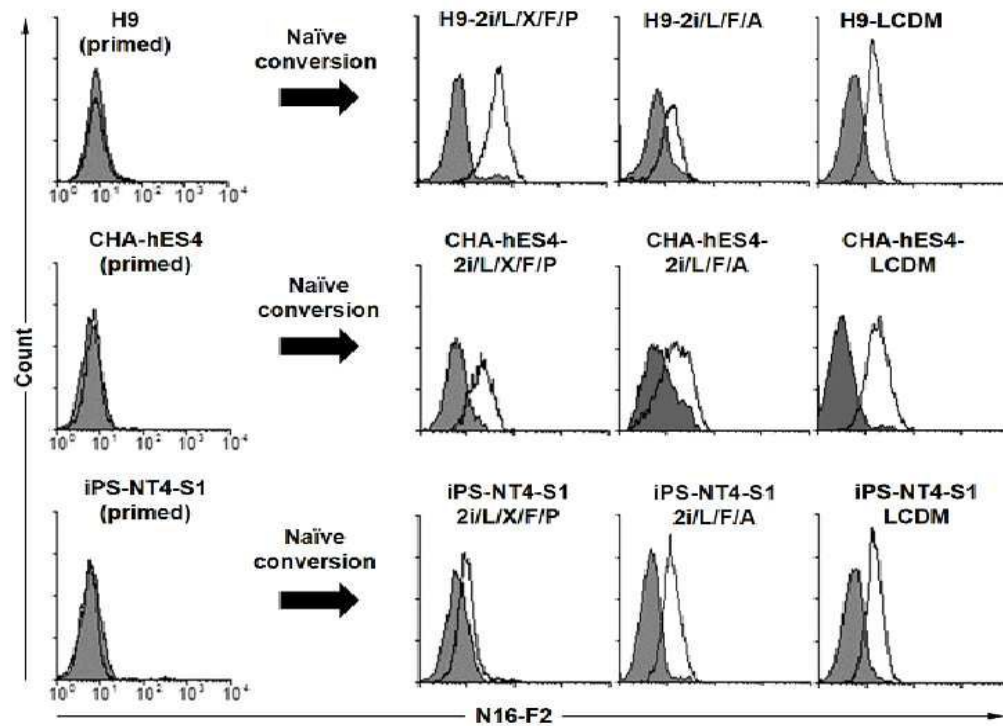
도면3



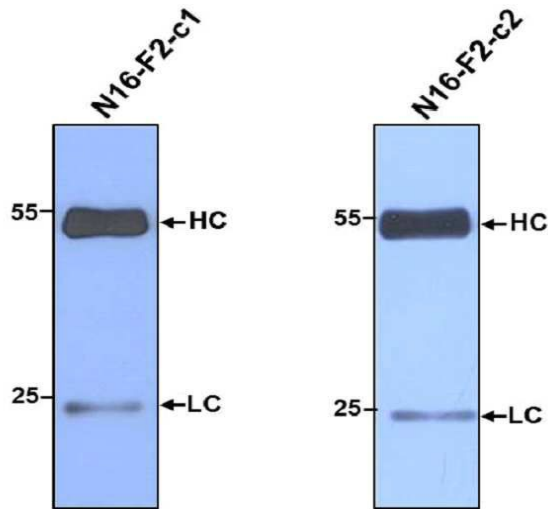
도면4



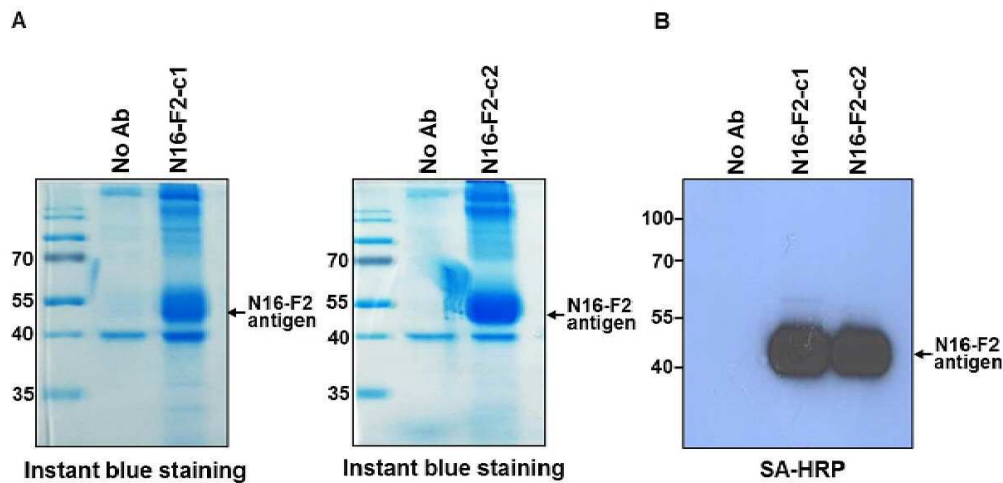
도면5



도면6



도면7



도면8

Match to: **BAC1119.1** Score 58 Mass 37878
Carbonic anhydrase 14 [Homo sapiens]

Matching peptide shown in bold red

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
191-199	515.7165	1029.4185	1030.5448	-1.12	0	K.TSVPPFNLR.E
191-199	515.7877	1029.5608	1030.5448	-0.98	0	K.TSVPPFNLR.E
191-199	515.7882	1029.5619	1030.5448	-0.98	0	K.TSVPPFNLR.E
205-211	456.2390	910.4635	912.4341	-1.97	0	K.QLGQTFR.Y
234-243	604.7947	1207.5748	1209.5434	-1.96	0	R.SQISMEQLEK.L + Oxidation(M)
244-257	783.3895	1564.7645	1565.7461	-0.98	0	K.LQGTLFSTEEPSK.L
258-264	453.2638	904.5130	906.4811	-1.96	0	K.LLVQNYR.A
265-272	314.7998	941.3776	941.4818	-0.10	0	R.ALQPINQR.M

Matched peptides are underlined in red.

1 MLFSALLLEV IWILAADGGQ HWTYEGPHGQ DHWPASYPEC GNNAQSPIDI
51 QTDSVTFFPD LPALQPHGYD QPGTEPLDLH NNGHTVQLSL PSTLYLGGLP
101 RKYVAAQLHL HWQKGSPGG SEHQINSEAT FAELHIVHYD SDYDSLSEA
151 AERPQGLAVL GILIEVGEEK NIAYEHILSH LHEVRHKDQK **TSVPPFNLR**
201 **LLPKQLGQYF** **RYNGSLTTPP** **CYQSVLWTVF** **YRRSQISMEQ** **LEKLGQTLFS**
251 **TEEPEPSKLLV** **QNYRALQPLN** **QRMVFASFIQ** **AGSSYTTGEM** **LSLGWGILVG**
301 CLCLLLAVYF IARKIRKKRL ENRKSVMFTS AQATTEA

도면9

Match to: **BAC1119.1** Score 102 Mass 37878
Carbonic anhydrase 14 [Homo sapiens]

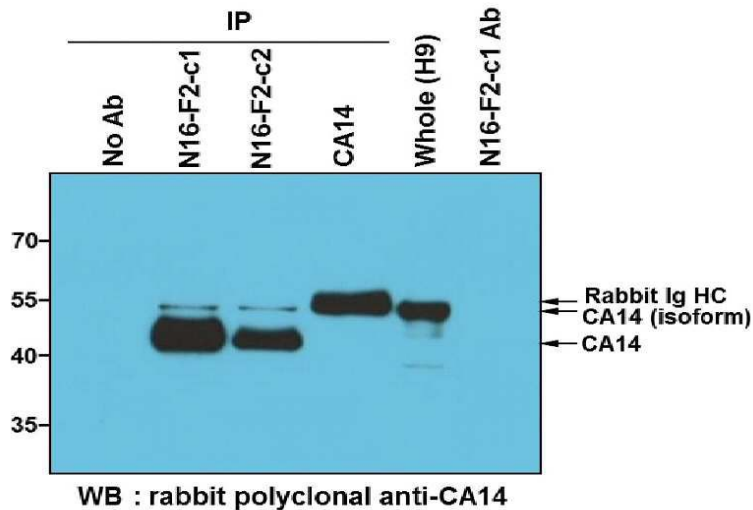
Matching peptide shown in bold red

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
191-199	515.7864	1029.5583	1030.5448	-0.98	0	K.TSVPPENLR.E
191-199	515.7869	1029.5592	1030.5448	-0.98	0	K.TSVPPENLR.E
191-199	515.7875	1029.5605	1030.5448	-0.98	0	K.TSVPPENLR.E
205-211	456.2394	910.4642	912.4341	-1.96	0	K.QLGQYFR.Y
234-243	596.7965	1191.5785	1193.5485	-1.97	0	R.SQISMEQLEK.L
234-243	604.7944	1207.5742	1209.5434	-1.96	0	R.SQISMEQLEK.L + Oxidation(M)
234-243	604.7946	1207.5746	1209.5434	-1.96	0	R.SQISMEQLEK.L + Oxidation(M)
244-257	783.3871	1564.7596	1565.7461	-0.98	0	K.LQGTLEFSTEEPSK.L
244-257	783.3872	1564.7599	1565.7461	-0.98	0	K.LQGTLEFSTEEPSK.L
244-264	818.4285	2452.2638	2454.2166	-1.95	0	K.LQGTLEFSTEEPSKLLVQNYR.A
258-264	453.2638	904.5130	906.4811	-1.96	0	K.LLVQNYR.A
324-337	720.3715	1438.7285	1439.7144	-0.98	0	R.KSVVFTSAQATTEA.-
325-337	656.3235	1310.6324	1311.6194	-0.98	0	K.SVVFTSAQATTEA.-
325-337	656.3253	1310.6361	1311.6194	-0.98	0	K.SVVFTSAQATTEA.-

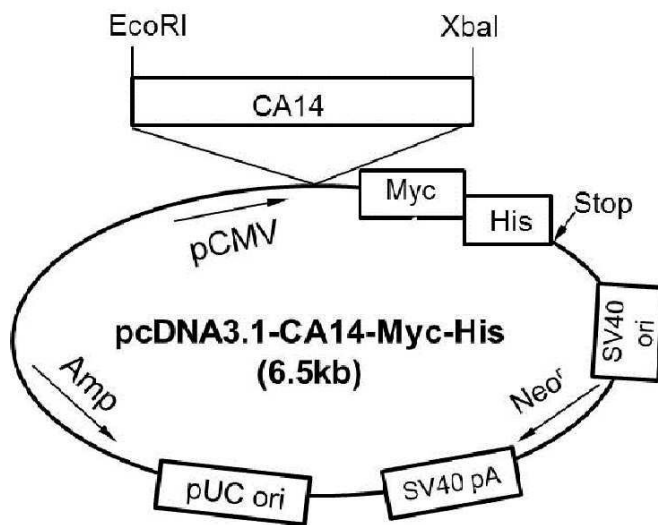
Matched peptides are underlined in red.

1 MLFSALLLEV IWILAADGGQ HWTYEGPHGQ DHWPASYPEC GNNAQSPIDI
51 QTDSVTFEDP LPAIQPHGYD QPGTEPLDLH NNGHTVQLSL PSTLYLGGLP
101 RKYVAAQLHL HWQKGSPGG SEHQINSEAT FAELHIVHYD SDSYDSLSEA
151 AERPQGLAVL GILIEVGETK NIAYEHILSH LHEVRHKDQK **TSVPPFNLR**
201 **LLPKQLGQYF** RYNGSLTTPP CYQSVLWTVF YRR**SQISMEQ** **LEKLGQTLFS**
251 **TEEPKSKLLV** QNYRALQPLN QRMVFASFIQ AGSSYTTGEM LSLGVGILVG
301 CLCLLLAVYF IARKIRKKRL ENR**KSVVFTS** **AQATTEA**

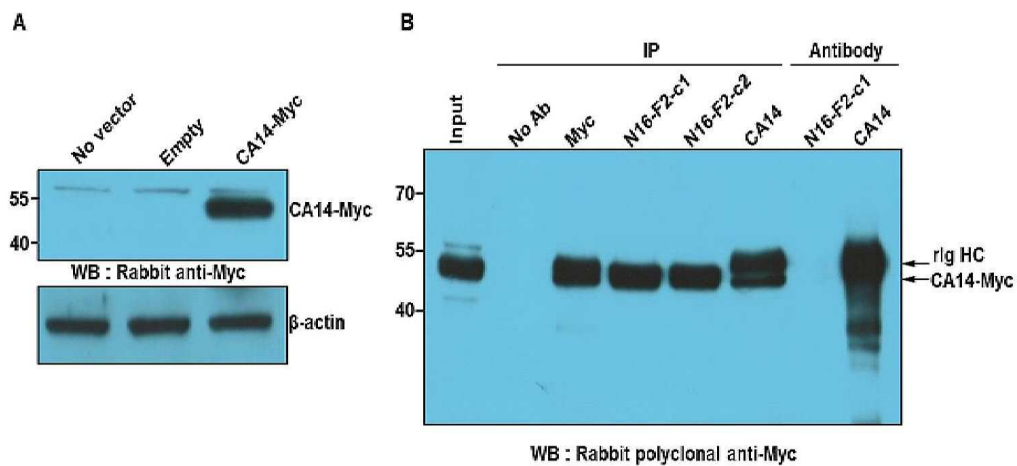
도면10



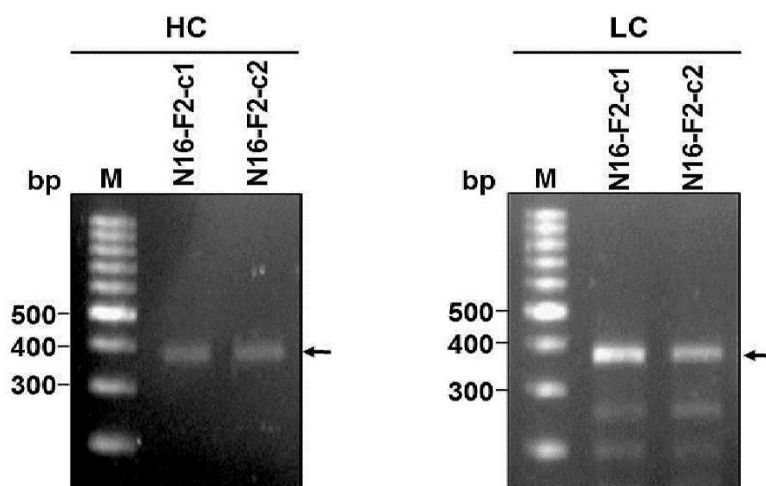
도면11



도면12



도면13



도면14

HC N16-F2-c1 and N16-F2-c2 subgroup IIA

```

1
CAA GTT AAG CTG GAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG 19
Gln Val Lys Leu Glu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
20
ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAT ACC CTC ACA GAC TAT TCA ATG CAC TGG GTG AAG 38
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Lys
39
CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACT GAG ACT GGT GAG 57
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu
58
CCA ACA TAT GCA GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTT TCT TTG GAA ACC TCT GCC 76
Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala
77
AGC ATT GCC TAT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC 95
Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
96
TGT ACT AGA GGA CGC GAA AGG GGA TTC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACG GTC TCC 114
Cys Thr Arg Gly Arg Glu Arg Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
115
TCA GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT - 372
Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr - 124

```

도면15

LC N16-F2-c1 and N16-F2-c2 subgroup I

```

1
GAT ATT GTG ATG ACA CAA TCT ACA TTC TCC AAT CCA GTC ACT CTT GGA ACA TCA GCT 19
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Thr Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala
20
TCC ATC TCC TGC AGG TCT AGT AAG AGT CTC CTA CAT AGT AAT GGC ATC ACT TAT TTG 38
Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu
39
TAT TGG TAT CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCT CAG CTC CTG ATT TAT CAG ATG TCC 57
Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser
58
AAC CTT GCC TCA GGA GTC CCA GAC AGG TTC AGT AGC AGT GGG TCA GGA ACT GAT TTC 76
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
77
ACA CTG AGA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTG GGT GTT TAT TAC TGT GCT CAA 95
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln
96
AAT CTA GAA CTT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT 114
Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
115
GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC - 363
Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser - 121

```

서 열 목 록

- <110> Sejong University Industry-Academy Cooperation Group
- <120> Monoclonal antibody N16-F2 specific to human naive pluripotent stem cells
- <130> 18P09051
- <160> 16
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 1

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr Ser Met His

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> HCDR2

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 3

Gly Arg Glu Arg Gly Phe

1 5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 4

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR2
 <400> 5

Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3
 <400> 6

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HC full sequence
 <400> 7

Gln Val Lys Leu Glu 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 Leu 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 Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Ile 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

Thr Arg Gly Arg Glu Arg Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

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

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC full sequence

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Thr Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
115 120

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 9

aaggcttctg gttataccct cacagactat tcaatgcac

39

<210> 10

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 10

tggataaaca ctgagactgg tgagccaaca tatgcagatg acttcaaggg a

51

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 11

ggacgcgaaa ggggattc

18

<210> 12

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 12

aggtctagta agagtctcct acatagtaat ggcatcactt atttgtat

48

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 13

cagatgtcca accttgctc a

21

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3

<400> 14

gctcaaaatc tagaacttcc gtacacg 27

<210> 15

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC full sequence

<400> 15

caagttaagc tggagcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcttgcaagg cttctggtta taccctcaca gactattcaa tgcactgggt gaagcaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacactg agactggtga gccaacatat 180

gcagatgact tcaagggacg gtttgctttt tctttggaaa cctctgccag cattgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtac tagaggacgc 300

gaaaggggat tctggggcca aggcaccact ctcacggtct cctcagccaa aacgacaccc 360

ccatctgtct at 372

<210> 16

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC full sequence

<400> 16

gatattgtga tgacacaatc tacattctcc aatccagtc cttttggaac atcagcttcc 60

atctctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta ttgtattgg 120

tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctctgatatt atcagatgtc caaccttgcc 180

tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360

tcc 363