



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월28일

(11) 등록번호 10-2344948

(24) 등록일자 2021년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/18* (2006.01) *C12N 5/16* (2006.01)  
*G01N 33/569* (2017.01)

(52) CPC특허분류  
*C07K 16/18* (2013.01)  
*C12N 5/163* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0104541

(22) 출원일자 2018년09월03일

심사청구일자 2020년02월25일

(65) 공개번호 10-2020-0027116

(43) 공개일자 2020년03월12일

(56) 선행기술조사문헌

Cell. Mol. Life Sci., 75:275-290(2018)

EP1623997 B1

CN1351713 A

(73) 특허권자

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

류춘제

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

최홍서

서울특별시 광진구 동일로54길 11-7, 204호(군자동)

서세리

서울특별시 송파구 장지동 375-2

(74) 대리인

특허법인리채

전체 청구항 수 : 총 13 항

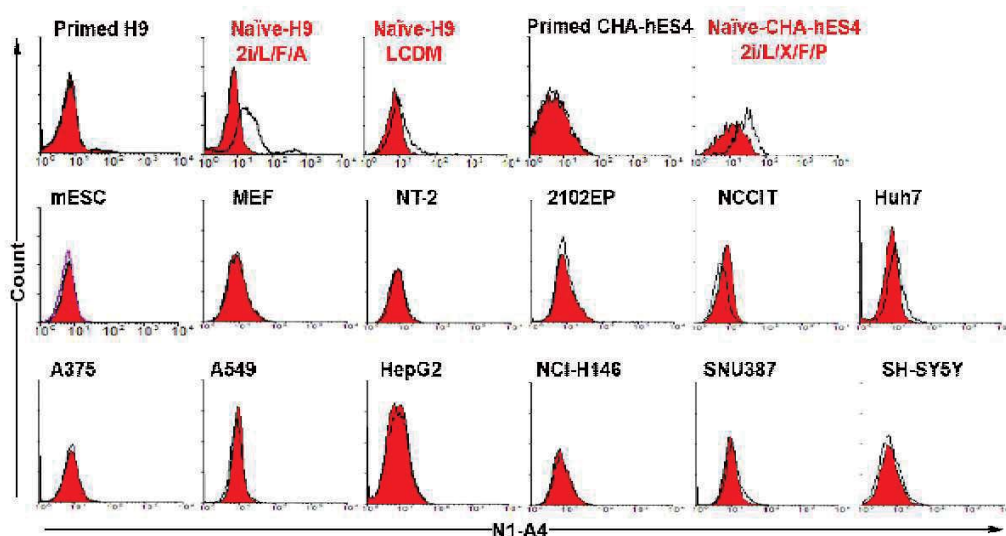
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 인간 순수만능줄기세포에 특이적인 단일클론항체 N1-A4

## (57) 요약

본 발명은 인간 순수 인간 만능줄기세포 (human 순수 pluripotent stem cell)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마에 관한 것으로서, 구체적으로는 인간 순수 만능줄기세포에는 결합하고 인간 준 만능줄기세포에는 결합하지 않거나 결합력이 현저히 약한 단일클론항체 N1-A4와 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 N1-A4, 상기 단일클론항체 N1-A4를 포함하는 검정키트 및 인간 만능줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.

## 대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

**G01N 33/56966** (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

G01N 2333/46 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711065554
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	신규 전환인자 발굴을 통한 순수 인간만능줄기세포 유도 및 기전규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교
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 LCDR1, 서열번호 5를 포함하는 LCDR5, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR6을 포함하는 경쇄를 포함하는, 순수만능줄기세포(naive pluripotent stem cell)에 특이적인 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 7을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항체.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 단일클론항체인, 항체.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 준 만능줄기세포(primed pluripotent stem cell)에는 결합하지 않는, 항체.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 순수 만능줄기세포의 HSP60 (heat shock protein 60)에 특이적으로 결합하는, 항체.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 7

제6항에 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

제6항에 있어서, 중쇄를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드 서열, 및 경쇄를 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 9

제6항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.

#### 청구항 10

제1항 또는 제2항의 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma).

#### 청구항 11

제1항 또는 제2항의 항체를 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하기 위한 조성물.

#### 청구항 12

제1항 또는 제2항의 항체를 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하기 위한 키트.

### 청구항 13

제1항 또는 제2항의 항체와 줄기세포를 혼합하여, 상기 항체가 결합된 상기 줄기세포를 순수 만능줄기세포로 결정하는 것을 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하는 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 순수만능줄기세포 (naive pluripotent stem cells) 에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 N1-A4 및 이를 생산하기 위한 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 인간배아줄기세포와 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 세포나 장기손상 시 특정세포로 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 황반변성증 환자를 인간 배아줄기세포 유래 망막색소상피세포를 사용하여 시력을 회복시킴으로써 이미 그 가능성을 성공적으로 증명하였다 (Cruz et al., 2018 Nature Biotechnology 36:328).

[0003] 2007년 배아줄기세포 및 유도 만능줄기세포와는 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 세포 및 분자적 특성에서 차이가 많았고, 인간 배아줄기세포와는 형태학으로 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 전송(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 장도가 더 낮고, 생식선 전승능력이 더 탁월한 발생 초기 만능줄기세포로 알려졌다 (Hackett and Surani 2014, Cell Stem Cell 15:416). 마우스 순수 배아줄기세포처럼 인간배아줄기세포는 비록 착상전의 배반포에서 유래했으나 마우스의 착상 후 상배엽에서 분리한 EpiSC와 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 단계에서도 더 초기단계로 착상 전 만능줄기세포인 순수 만능줄기세포

포를 밝히려는 연구는 높은 주목을 끌어들였다. 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), 순수 인간 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 (Takashima et al., 2014, Cell 158:1254) LIF, 2i, PKC 저해제, 및 아스코르브산(ascorbic acid)을 포함하는 배양 방법으로 인간 순수 만능줄기세포로 유도하였다. 그 후 유전자 도입 없이 준 상태 인간배아줄기세포에서 다양한 화학적 저해제만을 이용한 순수 상태 유도 배양 방법이 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, 14:2301; Zimmerlin et al., 2016, 143:4368; Guo et al., 2017, 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 순수 만능줄기세포 배양방법을 개발하려는 경쟁이 치열한데 그 이유는 순수 상태 인간 만능줄기세포가 가지는 많은 장점들 때문이다. 순수 상태 인간만능줄기세포는 인간의 착상 전 배아를 연구 할 수 있을 뿐만 아니라, 준 상태 인간 만능줄기세포와 비교할 때, 트립신 처리에 의한 단일세포배양이 가능하여 초보자도 배양하기 편하고, 세포성장이 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 순수 만능줄기세포 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 순수 인간 만능줄기세포에서는 음성인 것을 이용하는 방법이다 (Pastor et al., 2016, Cell Stem Cell 18:323). 세 번째 방법은 순수 상태 인간 만능줄기세포에는 결합하지 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).

[0006] 최근 영국 Cambridge대학의 Peter Rugg-Gunn 팀은 486종의 세포표면 마커를 인식하는 항체들을 사용하여 순수 상태와 준 상태 인간 만능줄기세포를 구별하여 순수 상태 인간 만능줄기세포에서만 양성인 CD7, CD75, CD77, 및 CD130 마커를 찾아냈다 (Collier et al., 2017 Cell Stem Cell 20:784). 하지만 이들은 순수상태 이외에도 인간배아에서 상배엽(epiblast)과 배외세포(extraembryonic cell)에도 결합하였다. 따라서 현재 사용되고 있는 인간 순수 만능줄기세포를 확인하는 항체만으로는 순수 상태 세포의 특성을 분석하고 세포를 분리하는데 충분하지 않으므로 순수 특이적인 새로운 표면 마커 발굴이 요구된다. 순수 만능줄기세포 새로운 표면 마커 발굴을 통해 순수 만능줄기세포의 효율적인 배양을 유도하는 배지 개발 및 효율적인 세포 치료제에 개발에 응용될 수 있다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

- [0007] (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

- [0008] 본 발명의 목적은 인간 순수 만능줄기세포에는 결합하고, 인간 준 만능줄기세포에는 결합하지 않는, 인간 순수 만능줄기세포 표면의 HSP60 (Heat Shock protein 60) 단백질을 인식하는 단일클론항체 N1-A4를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포 검정 키트를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포를 순수 분리하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 사용하여 인간 순수 만능줄기세포를 순수 분리하기 위한 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포를 제거하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 단일클론항체를 사용하여 인간 순수 만능줄기세포를 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0016] 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 LCDR5, 및 서열번호 6을 포함하는 LCDR6을 포함하는 경쇄를 포함하는, 순수만능줄기세포 (naive pluripotent stem cell)에 특이적인 항체.
- [0017] 2. 항목 1에 있어서, 서열번호 7을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항체.
- [0018] 3. 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 항체는 단일클론항체인, 항체.
- [0019] 4. 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 항체는 준 만능줄기세포(primed pluripotent stem cell)에는 결합하지 않는, 항체.
- [0020] 5. 항목 1 또는 2에 있어서, 상기 항체는 순수 만능줄기세포의 HSP60 (heat shock protein 60)에 특이적으로 결합하는, 항체.
- [0021] 6. 항목 1 또는 2의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [0022] 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 HCDR3를 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.
- [0023] 8. 항목 6에 있어서, 중쇄를 인코딩하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드 서열, 및 경쇄를 인코딩하는 서열번호 16의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.
- [0024] 9. 항목 6의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.
- [0025] 10. 항목 1 또는 2의 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma).



- [0026] 11. 항목 1 또는 2의 항체를 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하기 위한 조성물.
- [0027] 12. 항목 1 또는 2의 항체를 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하기 위한 키트.
- [0028] 13. 항목 1 또는 2의 항체와 줄기세포를 혼합하여, 상기 항체가 결합된 상기 줄기세포를 순수 만능줄기세포로 결정하는 것을 포함하는, 순수 만능줄기세포를 검출하는 방법.

### 발명의 효과

- [0030] 본 발명의 단일클론항체 N1-A4는 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] 도 1은 준 H9과 2i/L/F/A 배지에서 배양한 순수 H9 세포의 모양이다.
- 도 2는 FACS 분석을 통하여 준 인간만능줄기세포 마커인 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24, 및 CD90와 순수 인간만능줄기세포 마커인 CD7, CD77, 및 CD130 발현을 준 H9 및 순수 H9-2i/LF/A 세포에서 보여준 그림으로, 실선은 각 단일클론항체이고, 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다.
- 도 3은 정량적 중합효소 연쇄반응을 통한 순수 특이적인 유전자 발현 양상으로 H9-2i/L/F/A 세포에서 대부분의 순수 유전자 (naive gene)의 발현이 준 H9 세포에 비해 상대적으로 증가했고, 특히 Esrrb, Klf4, Dnmt3L, 및 Dppa5 발현이 현저하게 증가함을 보여주는 그림이다.
- 도 4는 준 H9 및 H9-2i/L/F/A 세포의 마이코플라즈마(mycoplasma) 오염 여부를 확인하여 오염되지 않았음을 보여주는 결과이다.
- 도 5는 FACS 분석을 통해서 본 발명의 단일클론항체 N1-A4가 준 H9, 준 CHA-hES4 세포, 순수 H9, 순수 CHA-hES4 세포, 마우스 배아줄기세포 (R1), 마우스 배아섬유아세포(MEF), 및 다양한 암세포에 결합하는 정도를 보여주는 그림으로 순수 H9-2i/L/F/A, 순수 H9-LCDM, 순수 CHA-hES4-2i/L/X/F/P 세포에는 결합하지만, 준 H9, 준 CHA-hES4, 마우스 배아줄기세포 (R1), 마우스 배아섬유아세포(MEF), 및 다양한 암세포에는 결합하지 않는 것을 보여 준다. 또한 일부 암세포 Huh7, 및 SNU387에 대해서는 약한 결합력을 보여준다. 이때, 실선은 단일클론항체이고 붉은 바탕은 2차 항체만 포함한 음성 대조군 자료이다.
- 도 6은 항체 N1-A4를 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 간암세포 Huh7 세포 표면을 바이오티나화 (biotinylation)한 후에 단일클론항체 N1-A4를 사용하여 면역 침강시키고, 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 Ab으로 하였다)으로 하였으며, 61 kDa 아래에 침강된 단백질이 보인다.
- 도 8은 N1-A4 항체로 면역 침강시킨 단백질을 SDS-PAGE에서 분리하여 트립신으로 절단한 후 얻은 펩타이드를 MALDI-TOF분석을 통해 본 발명의 단일클론항체 N1-A4이 인식하는 항원이 HSP60 (Heat Shock Protein 60)임을 보여주는 결과로 각 펩타이드가 HSP60 전체 아미노산 서열 중에서 어디에 해당되는지 보여주는 결과이다.
- 도 9는 본 발명의 단일클론항체 N1-A4가 HSP60 단백질을 인식하여 면역 침강시키는지 재확인하기 위해 HSP60를 인식하는 토끼 폴리클로날 (rabbit polyclonal) 항-HSP60 (K19, Santa Cruz)를 사용하여 Huh7 세포에서 N1-A4와 토끼 항-HSP60 항체로 면역침강시킨 단백질을 토끼 항-HSP60로 웨스턴 블랏하여 확인한 결과이다.
- 도 10은 본 발명의 단일클론항체 N1-A4가 HSP60 단백질을 인식하는 것을 외래 유전자 도입 방법으로 확인하기 위해서 플래그가 표지된(Flag-tagging) HSP60을 발현하는 벡터를 제조하여 293FT 세포에 형질 감염 (transfection)한 후, 항-Flag, 항-HSP60, N1-A4 항체를 이용하여 면역침강(IP)하고, N1-A4에 의해 면역침강 (IP)된 항원이 마우스 항-Flag 항체에 검출이 되는지를 보여준다.
- 도 11은 본 발명의 단일클론항체 N1-A4가 HSP60 단백질을 인식하는 것을 외래 유전자 도입 방법으로 확인하기 위해서 Myc과 His-표지된 HSP60을 발현하는 벡터를 제조하여 293FT 세포에 형질 감염 한 후 Myc, His, HSP60,

N1-A4 항체를 이용하여 면역침강(IP)하고, N1-A4에 의해 면역침강된 항원이 토끼 항-Myc 항체에 검출이 되는지를 보여준다.

도 12는 항체 N1-A4 유전자를 클로닝하기 위해 하이브리도마 N1-A4에서 전체 RNA를 추출한 후, 역전사 효소-중합효소연쇄반응을 이용하여 중쇄유전자(HC)와 경쇄유전자(LC)의 가변영역을 증폭한 결과이다.

도 13은 N1-A4 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 14는 N1-A4 항체 경쇄 유전자의 가변영역의 염기서열과 아미노산 서열을 표시한 것으로 항원과 결합하는 CDR과 전체아미노산의 잔기 위치를 표시한 그림이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하 실시 예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [0034] 시중에 판매되고 있는 항체들의 제조방법(펩타이드 및 재조합단백질 이용)과는 다른 실제 배양된 인간 순수 만능줄기세포를 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 응용하였다(Yin et al., Blood, **90**: 5002-5012, 1997; Choi et al., Cell and Tissue Research, 333:197). 먼저 인간 준 만능줄기세포 H9(준 H9)을 2i/L/F/A (MEK/GSK inhibitor, LIF, Forskolin, Ascorbic acid, KOSR, KO-DMEM medium)를 포함한 배지(Duggal et al., 2015, Stem Cells 33:2686)에서 둠 모양 및 트립신 처리에 의한 단일세포로의 배양이 가능하고, 순수 특이적인 유전자를 높게 발현하는 순수 인간 만능줄기세포(H9-2i/L/F/A)를 확보하였다. 준 H9 세포를 마우스의 오른쪽 뒷발에 미리 주사하고 3일 후에 왼쪽 뒷발에 H9-2i/L/F/A 세포를 주사한 후, 3일 간격으로 총 7회 더 면역 주사하고, 왼쪽 뒷발의 오금 림프절을 분리하여 단일클론항체 제조에 사용하였다. 이들 인간 순수 만능줄기세포에 특이적인 단일클론항체군은 인간 순수 만능줄기세포에는 결합하고, 인간 준 만능줄기세포에는 결합하지 않거나 약하게 결합하였다. 우리는 이들 항체군중 N1-A4 항체가 인간 순수 만능줄기세포 표면의 HSP60(Heat Shock Protein 60)을 인식하고, 기존 알려진 항체와 다른 특성을 보이는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0036] 하나의 양태로서, 본 발명은 원래 미토콘드리아 기질(matrix)에 발현하는 것으로 알려진 HSP60을 인간 만능줄기세포의 새로운 표면 마커로 인식하는 단일클론항체 N1-A4에 관한 것이다.
- [0037] 하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 N1-A4는 인간 순수 만능줄기세포에는 결합하고 준 인간 만능줄기세포에는 결합하지 않거나 현저히 약하게 결합하는 단일클론항체이다.
- [0038] 또 다른 하나의 구체적 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 N1-A4는 마우스 배아줄기세포에는 결합하지 않고, 인간 순수 만능줄기세포만 특이적으로 인식하는 단일클론항체이다.
- [0039] 바람직한 양태에서, 본 발명의 단일클론항체 N1-A4는 도 13, 및 14에 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 순수 만능줄기세포의 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 발



명은 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.

[0043] 본 발명자는 인간 순수 만능줄기세포에 특이적인 단일클론항체를 생산하기 위해 미끼면역주사방법을 사용하였다. 구체적으로 준 H9 세포의 전형적인 세포 모양인 납작한 콜로니 및 준 마커의 발현을 확인하였다(도 1과 2A). 상기 준 H9 세포를 미끼면역원으로 마우스 뒷발 오른쪽에 먼저 주사하고, 2i/L/F/A 배지로 유도한 둥 모양의 인간 순수 만능줄기세포 H9-2i/L/F/A 세포를 알려진 준 마커 CD24, 및 CD90과 순수 마커인 CD7, CD77, CD130로 분석하여 순수 마커인 CD77과 CD130이 발현함을 확인하였다(도1과 2B). 그 후, 같은 마우스 왼쪽 발바닥에 3일 후부터 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 N1-A4항체를 이용하여 항원을 분석하였다.

[0044] 구체적으로, 준 H9 세포를 2i/L/F/A를 포함한 배지에서 배양한 후 4~6일 이내에 둥 모양의 콜로니 형성을 확인하였고, 인간 순수 만능줄기세포의 특성중 하나인 트립신 처리에 의한 3~4일 간격의 단일세포로의 배양이 가능함을 확인한 후, 정량분석 중합효소 연쇄반응 (qRT-PCR)을 이용하여 순수 특이적인 유전자 (DNMT3L, STELLA, REX1, ESRRB, PRDM14, KLF2/4/5)가 2i/L/F/A 배지에서 배양한 세포에서 높게 발현됨을 확인하였다 (도 3). 이렇게 준비한 미끼 면역원(준 H9 세포)과 진짜 면역원(순수 H9-2i/L/F/A 세포)을 이용하여 인간 순수 만능줄기세포에 특이적으로 결합하는 단일클론항체군의 제조에 이용하였다.

[0045] 이어서, 상기 배양된 준 H9 세포와 순수 H9-2i/L/F/A 세포를 콜라게나아제 IV(Collagenase IV)로 떼어낸 후 이를 마우스의 뒷다리 발바닥을 통해 면역주사하고, 이 왼쪽 다리의 오금 림프절을 분리하여 림프구를 얻어 FO 마 이엘로마 세포와 융합하여 제조한 하이브리도마로부터 본 발명의 구체적 양태인 단일클론항체군 262개를 분리하고, 그 중에서 14종의 항체가 순수 H9-2i/L/F/A 세포 표면에 결합하는 것을 확인하였다. 다시 그 중에서 N1-A4 항체는 IgG1과 카파 사슬을 가진 단일클론항체로 인간 순수 만능줄기세포에 결합하고, 인간 준 만능줄기세포, 마우스 배아줄기세포 (R1), 마우스 배아섬유아세포 (MEF), 다양한 암세포에도 결합하지 않는다는 것을 확인하였다 (도 5). 또한 N1-A4항체는 2i/L/F/A과 다른 방법인 LCDM 배지방법 (LIF, GSK inhibitor, Dimethundene maleate, Minocycline hydrochloride, IWR-1-endo, N2/B27, KOSR, DMEM/F12)(Yang et al., 2017, Cell 169:243)로 유도한 H9 순수 만능줄기세포와 2iL/X/F/P 배지방법(MEK/GSK inhibitor, LIF, XAV939, Purmorphamine, KOSR, DMEM/F12)(Zimmerlin et al., 2016, 143:4368)으로 유도한 또 다른 순수 CHA-hES4에도 결합하고 여러 가지 암세포 중에서 Huh7과 SNU387에 약하게 결합하는 것을 확인하였다 (도 5).

[0046] 이에 따라, N1-A4항체를 하이브리도마 배양액에서 순수 분리하였으며 (도 6), 이 항체를 사용하여 N1-A4 항체는 약 61 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  $\pm 2$  kDa, 바람직하게는  $\pm 1$  kDa의 범위를 가질 수 있다.

[0047] 단일클론항체 N1-A4가 인식하는 단백질을 면역침강 후 SDS-PAGE에서 분리한 후 트립신으로 절단하여 LC-MS/MS 분석으로 그 단백질이 HSP60라는 것을 확인하였다 (도8). N1-A4 항체가 인식하는 항원이 HSP60인지를 검증하기 위해서 N1-A4와 시중에 판매되고 있는 토끼 폴리클로날 HSP60 항체를 이용하여 면역침강 후, 토끼 폴리클로날 HSP60 항체로 웨스턴 블라팅을 통해 다시 확인하였다(도 9). Flag 및 Myc/His 태그(tag)를 연결한 HSP60 유전자를 발현하는 벡터 (도10A, 및 11A)를 293FT 세포에 형질 감염 한 후 마우스 Flag, 토끼 Myc, 마우스 His, N1-A4, HSP60 항체를 이용하여 면역침강 후 웨스턴 블라팅을 통해 재확인하였다 (도 10B, 11B, 및 11C). 이에 따라 상기 항체의 유전자를 중합효소연쇄반응방법으로 클로닝하였으며 (도12), 그 중쇄 및 경쇄 염기서열 및 아미노산 서열을 확인하여 HSP60를 인식하는 새로운 마우스 단일클론항체라는 것을 확인하였다 (도13, 및 14).

[0048] 본 발명의 단일클론항체인 N1-A4가 인식하는 HSP60는 다양한 외부환경에서 온 스트레스에 노출되었을 때 높게 발현되는 것으로 알려져 있으며, 세포내부에서 다양한 단백질의 접힘 (folding)과 세포소기관 사이 이동 (translocation)에 관여하는 샤페론 (chaperone) 단백질이다. 또한 햄스터 난소, 인간 신장, 및 인간 섬유아세포의 세포 표면에서 관찰되고, 인간 만능줄기세포에서도 발현됨이 보고되어 있다.

[0049] 가장 최근에 보고된 연구에 의하면, HSP60를 포함한 Heat shock protein 패밀리 단백질은 착상 전 마우스 배 발

생 (pre-implantation embryo development)에 있어서 필수적인 단백질임이 밝혀졌고, 인간의 포배기 세포 (blastocyst)와 포배강 (blastocoel fluid)의 단백질 분석(proteomic analysis) 결과에 의하면, HSP60이 다른 단백질보다도 매우 높게 발현됨이 보고되었다 (Jensen et al., 2013 Stem Cells and development 22, 1126). 또한 또 다른 연구결과에 의하면 HSP60은 순수 상태 만능줄기세포로 알려진 마우스 배아줄기세포 미토콘드리아에서 발현하며 제거 할 경우 마우스 배아줄기세포 증식과 재생을 억제하며 분화시에는 에이팍토시스 (apoptosis)를 유발함이 알려져서 HSP60의 발현이 마우스 배아줄기세포의 재생과 그로부터 분화된 세포의 생존에 필수적임이 밝혀졌다 (Seo et al., 2018, Experimental and Molecular Medicine 50, e459). 따라서, 인간 HSP60 단백질은 마우스에서처럼, 착상 전 인간 배 발생에 필수적인 단백질일 것으로 추정되고, 인간 순수 만능줄기세포에서 유래되었기 때문에 순수 만능성과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다. HSP60이 인간 순수 만능줄기세포의 표면에 발현한다는 것은 본 발명의 특정 단일클론항체 N1-A4의 사용으로 처음 밝힘으로써 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 N1-A4의 항체 서열분석을 통해 본 발명 이전에 개발된 HSP60에 대한 항체와는 상이한 항체서열로 새로운 항체임을 입증하였다.

- [0050] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 바와 같은 본 발명의 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다. 하나의 구체적 양태에서, 본 발명은 단일클론항체 N1-A4를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.
- [0051] 구체적 실시에서, 본 발명의 하이브리도마는 H9-2i/L/F/A 세포와 준 H9 세포를 마우스의 왼쪽과 오른쪽 발바닥에 각각 주입한 후 상기 마우스의 왼쪽 오금에서 림프구를 분리하여 골수종 암세포와 융합하여 제조하였다.
- [0052] 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마는 이를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양할 수 있다.
- [0053] 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.
- [0054] 본 발명의 구체적 실시에서는 본 발명의 단일클론항체의 대량 생산을 위해 하이브리도마의 배양 배지를 단백질 G-세파로오스 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.
- [0055] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 N1-A4를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포 분리용 조성물에 관한 것이다.
- [0056] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 N1-A4를 사용하여 인간 순수 만능줄기세포를 분리하는 방법에 관한 것이다.
- [0057] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 N1-A4를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포 제거용 조성물에 관한 것이다.
- [0058] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체 N1-A4를 사용하여 인간 순수 만능줄기세포를 제거하는 방법에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명의 단일클론항체군은 효율적인 세포치료제 개발을 위해 혼재된 세포군속에서 존재하는 고효율 인간 순수 만능줄기세포를 분리하기 사용될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 단일클론항체군은 세포 치료를 위해 이식될 세포 중에 존재하는 인간 순수 만능줄기세포를 제거하기 위해 사용될 수 있다.
- [0061] 인간 순수 만능줄기세포를 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.
- [0062] 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 포함

하는 조성물은 순수 인간 만능줄기세포를 제거하기에 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 전형적인 투여량 수준은 표준 임상적 기술을 사용하여 최적화할 수 있다.

[0063] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 단일클론항체를 포함하는 인간 순수 만능줄기세포의 검정 키트에 관한 것이다.

[0064] 본 발명의 단일클론항체는 항원-항체 복합체 반응을 통해 이식될 또는 이식된 세포 중의 인간 순수 만능줄기세포를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라 인간 순수 만능줄기세포를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.

[0065] 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.

[0066] 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0067] 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.

[0068] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정 가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는  $\beta$ -글루쿠로니다제,  $\beta$ -D-글루코시다제,  $\beta$ -D-갈락토시다제, 우레아제, 피옥시다아제, 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,  $K_4 W(CN)_8$ ,  $[Os(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[Mo(CN)_8]^{4-}$  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.

[0069] 본 발명에서 용어 "벡터"는 핵산을 시험관 내(in vitro), 생체 외(ex vivo) 또는 생체 내(in vivo) 세포로 도입하기 위한 바이러스성 운반체뿐만 아니라 비바이러스성 운반체 모두를 포함한다. 벡터는 부착된 절편을 증폭시키기 위하여 또 다른 DNA 절편이 부착된 레플리콘(replicon)일 수 있다. "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 벡터들이 핵산을 조작하고, 반응 요소(response element) 및 프로모터를 유전자로 혼입하는 등에 사용될 수 있다. 바람직한 벡터에는, 예를 들어, 플라스미드 또는, 예를 들어 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 또는 pBR322 또는 pUC 플라스미드 유도체 또는 블루스크립트(Bluescript) 벡터와 같은 플라스미드를 포함하는 변형된 바이러스를 포함한다. 예를 들어, 반응 요소 및 프로모터에 해당하는 DNA 단편의 적절한 벡터로의 삽입은, 상기 적절한 DNA 단편을 상보적인 접착말단(cohesive termini)을 갖는 선택된 벡터와 결합시킴으로써 달성될 수 있다. 그렇지 않으면, DNA 분자의 말단이 효소적으로 변형될 수 있거나, 또는 뉴클레오티드 서열(링커)을 DNA 말단과 결합시킴으로써 임의의 부위가 생성될 수 있다. 그러한 벡터들은 세포 계능으로 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.

[0070] 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  $\lambda$ 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  $\alpha$ -태아단백질, 아밀라제, 카텝신 E, M1 무스카린 수용체 또는  $\gamma$  글루타밀 트랜스퍼라제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0071] 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.

[0072] 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, 이소펜타닐 전달효소 유전자 등을 포함한다.

[0073] 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 예는 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 메토크세이트(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.

[0074] 본 발명의 항체는 이미징 마커(imaging marker)와 결합시켜 순수 만능줄기세포를 검출할 수 있다. 항체-이미징 마커 결합체(antibody-imaging marker conjugated)의 투여와 확인 및 항체를 이미징 마커에 연결시키는 방법은 (Goldenberg et al., 1978, New England J. Med. 298, 1384-1388; Goldenberg et al., 1983, J. Amer. Med. Assoc. 280, 630-635; Goldengerg et al., 1983, Gastroenterol. 84, 524-532; Siccardi et al., 1986, Cancer Res. 46, 4817-4822; Epenetos et al., 1985, Cancer 55, 984-987; Philben et al., 1986, Cancer 57, 571-576; Chiou et al., 1986, Cancer Inst. 76, 849-855; Colcher et al., 1983, Cancer Res., 43, 736-742; Colcher, E. et al., Laboratory Research Methods in Biology and Medicine Immunodiagnostics. New York, Alan R. Liss. pp. 215-258(1983); Keenan, A.M. et al., 1984, J. Nucl. Med. 25, 1197-1203; Colcher D. et al., 1987, Cancer Res. 47, 1185-1189; Estaban, J.M. et al., 1987, Intl. J. Cancer 39, 50-59; Martin, D.T., et al., 1984, Curr. Surg. 41, 193-194; Martin, E.W. Jr. et al., 1986, Hybridoma 5, S97-S108; Martin, D.T. et al., 1985, Am. J. Surg. 150, 672-675; Meares et al., Anal. Biochem. 1984, 142, 68-78; 및 Krejcarek et al., 1977, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 77, 581-585) 등의 문헌에 기술되어 있다. 투여량은 만능줄기세포의 양에 따라 변할 수 있다. 항체-이미징 마커 결합체 투여량은 준 만능줄기세포로부터 순수만능줄기세포를 가시화시키거나 확인할 수 있도록 효과적인 양이어야 한다.

[0075] 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 포

함한다. 감마 스캐너 등에 의하여 확인될 수 있는 물질의 적절한 예로서는  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ , 및  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 과 같은 방사성 동위원소를 포함한다.  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$  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.

[0076] 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, 데옥시티딘 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.

[0077] 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.

[0079] <실시예 1> 인간 만능줄기세포의 배양 및 인간 순수 만능줄기세포의 확립

[0080] <1-1> 준 인간 만능줄기세포와 마우스 배아줄기세포의 배양

[0081] 준 인간 만능줄기세포 H9는 Wicell Research Institute에서 제공한 프로토콜에 따라 배양하였고, CHA-hES4는 차병원에서 분양 받아 배양하였다. 임신한 CF1 마우스에서 배아 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs)를 적출 및 배양하여  $\gamma$ -조사(irradiation)후에 지지 세포(feeder cell)로 사용하였다. 20%(v/v) KOSR(knockout serum replacement), 1% (v/v) NEAA, 0.1mM  $\beta$ -머캅토에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol), 100U/ml 페니실린-G, 100 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신, 8ng/ml bFGF를 첨가한 DMEM/F12 (Invitrogen) 배지에서 배양하였고, 5-6일마다 계대 배양 시에는 콜라게나아제 IV (1mg/ml)로 5분간 처리 후에 황색 팁(yellow tip)으로 적절한 크기로 자른 후 새로운 지지 세포 위에서 배양하였다. 마우스 배아줄기세포 R1은 방사선 처리된 CF1 MEF 세포상에서 15% (v/v) FBS, 0.1mM  $\beta$ -머캅토에탄올, 1mM 글루타민(glutamine), 0.1mM NEAA, 100U/ml 페니실린-G, 100 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신, 500units/ml LIF (leukemia inhibitory factor, PeproTech)로 구성된 DMEM 배지(Invitrogen)를 이용하여 배양하였다.

[0083] <1-2> 인간 순수 만능줄기세포의 확립

[0084] 준 H9과 CHA-hES4 세포를 콜라게나아제 IV (1mg/ml)로 5분간 처리하고, 황색 팁을 이용하여 적절한 크기로 자른 후에 미리 깔아둔 MEFs 위에 옮겼다. 다음날 2i/L/F/A (1 $\mu$ M PD0325901, 3 $\mu$ M CHIR99021, hLIF(1000U/ml), 10 $\mu$ M Forskolin, 아스코르브산(50ng/ml), bFGF(16ng/ml), 20% (v/v) KOSR, KO-DMEM, 1% (v/v) L-글루타민, 1% (v/v) NEAA, 0.1mM  $\beta$ -머캅토에탄올, 1x 페니실린/스트렙토마이신) (Duggal et al., 2015), 2i/L/X/F/P (1 $\mu$ M PD0325901, 3 $\mu$ M CHIR99021, hLIF(20ng/ml), 4 $\mu$ M XAV939, 10 $\mu$ M Forskolin, 2 $\mu$ M Purmorphamine, 20% (v/v) KOSR, DMEM/F12, 1% (v/v) L-글루타민, 1% (v/v) NEAA 0.1mM  $\beta$ -머캅토에탄올, 1x 페니실린/스트렙토마이신)(Zimmerlin et al., 2016, 143:4368), 또는 LCDM (hLIF(10ng/ml), 1 $\mu$ M CHIR99021, 2 $\mu$ M (S)-(+)-Dimethundene 말레이트, 2 $\mu$ M 미노사이클린 산염Minocycline hydrochloride), 0.5-1 $\mu$ M IWR-1-endo, 2 $\mu$ M Y-27632, N2/B27, 1% (v/v) GlutaMAX, 1% (v/v) NEAA, 0.1mM  $\beta$ -머캅토에탄올, 5% (v/v) KOSR, DMEM/F12) 배양액으로 교체하였다.



- [0085] 둠 모양의 세포는 4~6일 이내에 볼 수 있었고, 처음 확립된 순수 세포는 10  $\mu$ M Y-27632을 40분간 처리한 후 콜라게나아제 IV (1mg/ml)를 5분간 처리 하여 떼어낸 후 젤라틴 코팅된 플레이트에서 30분 정도 두어 지지 세포를 제거하고 순수 세포만을 모았다. 0.05% (v/v) 트립신-EDTA를 처리하여 단일 세포로 분리한 후 1:1~1:3 비율로 새로운 지지 세포 위에서 배양하였고, 그 이후 3~4일 간격으로 0.05% (v/v) 트립신-EDTA를 이용하여 계대 배양 하였으며, 최소 5번이상 계대 배양한 후 실험에 이용하였다 (도1).
- [0087] **<1-3> 세포표면 항원염색**
- [0088] 2i/L/A/F배지방법으로 유도한 인간 순수 만능줄기세포와 유도하기 전인 인간 준 만능줄기세포를 비교하기 위해 먼저 인간 준 만능줄기세포 마커로 알려진 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24, 및 CD90의 발현 여부를 FACS로 먼저 분석하였다. FACS 분석을 위해서 콜라게나아제 IV로 분리한 세포를 TrypLE (Invitrogen)을 이용하여 단일 세포로 떼어낸 후 40  $\mu$ m 여과기(strainer)를 통과시킨 후 한 시료(sample)당 약  $2 \sim 3 \times 10^5$  세포를 사용 하였다. SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD24-PE, 및 CD90-PE 항체를 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBA (1% (w/v) 소 혈청 알부민, 0.02% (w/v)  $\text{NaN}_3$  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.
- [0089] 그 결과 인간 준 만능줄기세포 마커들인 TRA-1-60, TRA-1-81, CD24, 및 CD90 발현이 인간 순수 만능줄기세포에서는 급격히 감소함을 관찰 할 수 있었다 (도 2). 그리고 SSEA-3와 SSEA-4도 상대적인 발현이 순수에서 현저히 감소하는 것을 관찰하여 인간 순수 만능줄기세포가 잘 유도되었음을 확인하였다. 또한 2i/L/A/F로 유도한 순수 인간만능줄기세포는 순수 마커로 최근에 제안된 CD7, CD77, 및 CD130중에서 비록 CD7은 검출되지 않지만 CD77과 CD130 발현이 양성임을 보여 순수로 잘 유도되었음을 알 수 있다 (도2B).
- [0091] **<1-4> 순수 특이적인 유전자의 발현 확인**
- [0092] 인간 준 및 순수 만능줄기세포를 콜라게나아제 IV를 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 표1에 기재하였다.

표 1

Naïve genes	DNMT3L(F)	TGAACAAGGAAGACCTGGACG
	DNMT3L(R)	CAGTGCCTGCTCCTTATGGCT
	STELLA (DppA3)(F)	GTTACTCGGCGGAGTTCGTA
	STELLA (DppA3)(R)	TGAAGTGGCTTGGTGTCTTG
	REX1 (Zfp42) (F)	GGAATGTGGGAAAGCGTTCGT
	REX1 (Zfp42) (R)	CCGTGTGGATGCGCACGT
	ESRRB(F)	GCCATGATGGAAAATGCCCC
	ESRRB(R)	CCAGAGATGCTTTCCCTGGC
	TFCP2L1(F)	CTCAGGTGCTGACTTGCTGA
	TFCP2L1(R)	ATGGCGTGGTACACAGACAG
	PRDM14(F)	TGAGCCTTCAGGTCACAGAG
	PRDM14(R)	ATTTCCTATCGCCCTTGTCC
	KLF2(F)	CACACAGGTGAGAAGCCCTA
	KLF2(R)	GCACAGATGGCACTGGAATG
	KLF4(F)	TACCAAGAGCTCATGCCACC
	KLF4(R)	CGCGTAATCACAAGTGTGGG
	KLF5(F)	CCTGGTCCAGACAAGATGTGA
	KLF5(R)	GAACTGGTCTACGACTGAGGC
	TBX3(F)	CGGACATACTTGTCCCGA
	TBX3(R)	GCAGGGTGAGCTGTTTCTTTT
	E-cad (F)	CCCACCAAGTACAAGGGTC
	E-cad (R)	CTGGGGTATTGGGGGCATC
Primed genes	OTX2(F)	CAAAGTGAGACCTGCCAAAAGA
	OTX2(R)	TGGACAAGGGATCTGACAGTG
	DNMT3A(F)	AGTACGACGACGACGGCTA
	DNMT3A(R)	CACACTCCACGCAAAAGCAC
	DNMT3B(F)	AGGGAAGACTCGATCCTCGTC
	DNMT3B(R)	GTGTGTAGCTTAGCAGACTGG
	SOX17(F)	GGCGCAGCAGAATCCAGA
	SOX17(R)	CCACGACTTGCCAGCAT

[0093]

[0094]

그 결과 대부분의 순수 특이적인 유전자 발현이 2i/L/F/A배지로 유도한 샘플에서 현저히 증가함을 관찰하여 2i/L/F/A배지에서 인간 순수 만능줄기세포 특성을 보인다는 것을 확인하였다 (도 3).

[0096]

<1-5> 인간 만능줄기세포의 마이코플라즈마 오염 점검

[0097]

e-Myco<sup>TM</sup> VALiD Mycoplasma PCR Detection Kit (iNtRON)를 이용해서 인간 순수 및 준 만능줄기세포의 마이코플라즈마 오염 여부를 확인한 결과 오염되지 않음을 확인하였다 (도4).

[0099]

<실시예 2> 하이브리도마 제조

[0100]

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

[0101]

순수 H9 세포의 세포 표면 및 내부 분자에만 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 만들기 위해서, 6주된 11 마리의 암컷 Balb/c 마우스 오른쪽 발바닥에  $2 \times 10^6$  개의 준 H9 세포를 -3, 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 주사하였고, 같은 수의 순수 H9 세포를 0, 3, 6, 13, 17, 20, 21일에 왼쪽 발바닥에 각각 주사하였으며, 22일 되는 날 면역주사(immunization)된 마우스를 경추 탈골한 후 왼쪽 뒷발로부터 지방과 근육조직을 제거한 오금 림프절 (popliteal lymph node)을 적출하여 표면이 울퉁불퉁한 비광택 슬라이드 글라스(frosted slide glass)를 이용하여 오금 림프절을 갈아서 단일세포화해서 준비하였다. 왼쪽 림프절 세포와 F0 마이엘로마 세포를 1:5의 비율로 섞은 후, 혈청 없는 배지인 DMEM(Invitrogen)로 2번 세척한 후 1ml 50% (w/v) PEG1500 (폴리에틸렌 글리콜, 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. 96-웰 플레이트에  $2 \times 10^5$  세포/well를 20% FBS, HAT, HCF (hybridoma cloning factor)가 포함된 DMEM 배지에서 약 2주간 배양하였고, 샌드위치 ELISA 방법을 이용하여 항체를 생산하는 하이브리도마만을 선별하였다.

[0103]

<2-2> 하이브리도마의 클로닝

[0104]

하이브리도마 상층액에서 항체가 발현되는 클론을 선발하기 위하여 샌드위치 ELISA(Sandwich Enzyme Linked

Immunosorbent Assay) 방법을 사용하였다. 포획 항체(Capture antibody)인 항-마우스 IgG 또는 IgM 항체를 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 100 $\mu\text{l}$ 을 첨가해 37℃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% Tween-20 in PBS)로 3회 세척하고, OPD(o-phenylenediamine, Sigma사)와  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 포함된 기질 용액을 첨가한 후 492nm에서 흡광도를 측정하여 항체를 생산하는 클론을 먼저 선별하였다. 다음으로 각 클론의 배양 상층액을 상기 실시예 <1-3>에 기술한 FACS 분석을 통해 H9-2i/L/F/A 세포에 결합하는 하이브리도마를 선별하고 서브클로닝(subcloning)하여, H9-2i/L/F/A 세포에 대한 결합력을 유지한 단일클론항체군을 분비하는 14종의 하이브리도마 군을 선별하였다. 이중 6개의 항체는 CHA-hES4-2i/L/F/A 세포에도 결합하였다. 마우스 Immunoglobulin Isotyping Kit (BD Biosciences)를 이용해서 아이소타입(isotype)을 조사한 결과 6개 항체 모두 IgG 였다. 이중 항체 N1-A4는 IgG1과  $\kappa$  사슬을 가진 항체로 이 특허에서 인식 항원과 특성을 분석하였다.

[0106] <실시예 3> 단일클론항체 N1-A4의 결합 특이성 분석

[0107] <3-1> 인간 순수 와 준 만능줄기세포, 마우스 배아줄기세포 및 다양한 암세포에 대한 결합 특이성 분석

[0108] 단일클론 항체 N1-A4의 각종 세포에 대한 결합 정도를 관찰하기 위해 FACS 분석을 수행하였다. 구체적으로, 준 H9과 순수 H9 및 순수 CHA-hES4 세포를 콜라게나아제 IV(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 이용하여 5분 동안 처리해서 세포를 떼어내고, PBS (pH 7.4)로 2번 세척한 후, TrypLE 용액 (Invitrogen)을 넣고 실온에서 3분간 반응시켰고, 마우스 배아줄기세포 R1과 여러 가지 암세포는 0.05% (w/v) 트립신-EDTA를 처리하여 떼어내었다. 떼어낸 모든 세포는 단일세포로 분리하기 위해 40 $\mu\text{m}$  strainer (BD Biosciences, Seoul, Korea)를 이용하여 여과시키고 각 단일세포를  $\text{ml}$ 당 약  $2 \times 10^5$  개의 세포를 PBA에 섞은 후, 실시예 <1-3>과 동일한 방법으로 단일클론 항체 N1-A4를 4℃에서 30분간 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, 1차 항체와 상응하는 항-마우스 IgG-FITC (BD Biosciences)를 4℃에서 30분간 더 반응시켰다. PBA로 2번 세척한 후, FACSCalibur와 Cell Quest software(BD sciences)를 이용하여 프로피디움 요오드화물(propidium iodide; PI)-음성 세포에 대해서 항체 결합력을 분석하였다.

[0109] 도 5 에서 실선은 N1-A4 결합력을 의미하고, 적색 바탕은 2차 항체만 포함한 것이다. 단일클론항체 N1-A4는 준 H9과 CHA-hES4 세포에는 결합하지 않았고, 또한 준 인간 만능줄기세포와 유사한 외부 표면항원을 가진 인간 배아암세포인 NT-2 (cl.D1), 2102EP, 및 NCCIT와 암세포 (A375, A549, HepG2, NCI-H146, SH-SY5Y), 마우스 배아줄기세포 (mESC R1), 마우스배아섬유아세포(MEF)에도 결합하지 않았다. 반면 단일클론항체 N1-A4는 세 가지 형태 (H9-2i/L/F/A, H9-LCDM, CHA-hESC4-2i/L/XAV/P)의 인간 순수 만능줄기세포에 특이적인 결합력을 보였으며, 일부 간암세포 (Huh7, SNU387)에는 약한 결합을 보여주었다 (도5). 이런 결과는 N1-A4가 인간 순수 만능줄기세포에 특이적인 표면항원을 인식하는 항체라는 것을 확인하는 것이다.

[0111] <3-2> 단일클론항체 N1-A4의 정제

[0112] 단일클론항체 N1-A4를 정제하기 위해 하이브리도마 세포 배양액을 모아 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액만을 사용하였다. 단백질-G 세파로오스를 크로마토그래피 컬럼(protein-G sepharose chromatography column)에 넣고, 컬럼을 연동 펌프(peristaltic pump)에 연결하고, PBS(pH8)로 충분히 세척한 후 항체 상층액을 천천히 통과시켜 N1-A4 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(BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit, Pierce)를 이용하여 정제된 항체량을 측정하고, SDS-PAGE를 이용하여 정제 양상을 확인하여 순수하게 정제되었음을 확인하였다 (도6).

[0114] <실시예 4> 단일클론항체 N1-A4가 인식하는 항원 동정

[0115] <4-1> 단일클론항체 N1-A4가 인식하는 세포표면 단백질 분자의 확인

[0116] N1-A4 항체의 결합력을 보이는 Huh7 세포의 세포표면의 바이오틴 레이블링(biotinylation)은 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce)에서 제시한 프로토콜을 약간 수정하여 수행하였다. 100 mm 세포배양 플레이트에 배양한 Huh7 세포를 37℃에서 미리 데워둔 PBS(pH 7.4)로 2회 세척한 후 바이오틴 (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 바이오틴으로 레이블링된 세포는 용해 완충액 (25mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  PMSF, 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 1mM NaF, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )를 이용하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 12,000rpm 속도로 40분간 원심 분리하여 핵을 제거하고, 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다.

- [0117] 단백질-G 아가로오스 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위해서, 약  $1 \times 10^7$  세포의 세포 용해물에  $20\mu\text{l}$  단백질-G 아가로오스를 넣고  $4^\circ\text{C}$ 에서 2시간동안 반응시킨 후 원심분리를 통해 그 단백질-G 아가로오스를 회수하여 용해 완충액을 이용해 4~5회 세척한 샘플을 음성 대조군으로 사용하였다. 단일클론항체 N1-A4에 의해 인식되는 항원을 면역침강하기 위해서 단백질-G 아가로오스에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거한 세포 용해물에 각 항체  $2\mu\text{g}$ 을 넣고  $4^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 반응시킨 후  $20\mu\text{l}$  단백질-G 아가로오스를 넣고  $4^\circ\text{C}$ 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,  $100^\circ\text{C}$ 에서 5분간 가열하였다.
- [0118] 음성 대조군 단백질과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 웨스턴 블라팅을 하였다. 이 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹을 하였다. 0.1% PBST로 3번 세척한 후, 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP(1:7,000; GE healthcare)를 실온에서 1시간 더 반응시켰다. 0.1% PBST로 3번 세척하고, 바이오틴이 라벨링된 단백질을 ECL 검출 키트(GE healthcare)로 확인하였다. 그 결과 단일클론 항체 N1-A4는 약 61kDa 단백질을 면역 침강시키는 것을 확인하였다 (도7).
- [0120] <4-2> 단일클론항체 N1-A4에 의해 면역 침강된 항원의 동정
- [0121] 단일클론항체 N1-A4에 의해 면역 침강된 단백질을 포함하는 SDS 겔을 Commassie G250 (BIO-RAD)으로 공급자의 프로토콜에 따라 염색하였다. 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% 아세토니트릴(acetonitrile)로 세척하였다. 그 다음, 트립신( $8-10\text{ng}/\mu\text{l}$ )으로 8-10 시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 반응시켰다. 단백질 분해반응은  $5\mu\text{l}$  0.5% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)의 첨가에 의해 종결하였다. 트립신에 의해 잘려진 단백질 단편들은 수용액 상태로 회수되었고, C18ZipTips(Millipore)을 이용하여  $1-5\mu\text{l}$  부피로 탈염 및 농축하였다. 이 농축액은 동량의 50% 수성 아세토니트릴(aqueous acetonitrile)에 포화된  $\alpha$ -시아노-4-하이드록시나믹산( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)과 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 laser shots의 누적 피크에 의해 각각의 단백질 스팟에 대한 질량 스펙트럼(mass spectrum)을 구하였다. 질량 스펙트럼의 분석을 위해서 트립신의 자가분해에 의해 생성된 펩타이드의 이온 피크(ion peak)  $m/z(842.510, 2211.1046)$ 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](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe))을 이용하였다. 그 결과 이 단백질이 HSP60 (Heat Shock Protein 60)임을 확인하였다 (도8).
- [0123] <실시예 5> 단일클론항체 N1-A4의 특성분석
- [0124] <5-1> 단일클론항체 N1-A4 항원의 비교분석
- [0125] 단일클론항체 N1-A4가 면역침강시킨 HSP60 단백질을 상업적으로 판매되는 HSP60 항체에 의해 인식되는지를 확인하기 위해서, 인간 간암세포 (hepatocellular carcinoma) Huh7 세포 추출액을 N1-A4와 토끼 폴리클로날 HSP60 (K19, Santa Cruz Biotechnology) 항체로 면역침강한 후 음성 대조군 단백질과 용출된 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 나이트로 셀룰로오스 막으로 옮겼다. 이 막은 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹을 하였다. 0.1% (v/v) PBST로 3번 세척한 후, 토끼 폴리클로날 HSP60(K19) 항체를  $4^\circ\text{C}$ 에서 12시간 반응시켰다. 0.1% (v/v) PBST로 3번 세척한 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.
- [0126] 그 결과, 두 항체에 의해 면역침강된 분자는 토끼 HSP60 (K-19) 항체에 의해서 동시에 검출되었다 (도9). 이런 결과는 N1-A4 항체가 인식하여 면역 침강시킨 HSP60이 상업적인 HSP60 (K-19) 항체에 의해서 인식됨을 말해주는 것이다.
- [0128] <5-2> 외래 유전자 도입에 의한 단일클론항체 N1-A4 항원의 비교분석
- [0129] 단일클론항체 N1-A4의 항원이 HSP60 인지를 재확인하기 위해서, pOTB7-HSP60 (hMU007386, KHGB) 벡터를 구입하여 Not1-HSP60 (F); CCGCGGCCGCAATGCTTCGGTTA CCCACAGT와 HSP60-Sal I (R); GGGTCGACTTAGAACATGCCACCTCCCA 프라이머를 이용하여 PCR를 수행한 후, PCR 산물과 pFlag-CMV2 (Sigma) 벡터를 Not1과 Sal I 효소로 처리하고 라이



게이션한 후 pFlag-CMV2-HSP60 벡터를 제조하였다. 또한 pOTB7-HSP60 벡터를 HindIII-HSP60 (F); CCAAGCTTCCATGCTTCGGTTACCCACAGT와 HSP60-Xba I (R); GGTCTAGAGAACATGCCACCTCCCATAC 프라이머를 이용하여 PCR를 수행한 후, PCR 산물과 pcDNA3.1(+)-Myc/His 벡터 (Invitrogen)를 HindIII와 Xba I 효소로 처리하고 라이게이션한 후 pcDNA3.1(+)-HSP60-Myc/His 벡터를 제조하였다. 두 벡터를 293FT 세포에 PEI 용액을 이용해서 형질 감염시킨 후, 항-Flag tag (MBL), 항-Myc 태그 (Abcam) 항체로 Flag- 또는 Myc-태그된 HSP60의 정상적인 발현을 확인하였다 (도10A, 및 11A). 다시 한번 두 벡터를 293FT 세포에 형질 감염시킨 후, 실시예 <4-1>에 명시된 용해 완충액을 이용하여 4℃에서 30분간 반응시키고, 12,000rpm 속도로 40분간 원심분리해서 핵을 제거한 상층액(1 mg)을 항-Flag 태그, 항-Myc 태그, 항-His 태그(Genescript), N1-A4, 항-HSP60 항체를 이용하여 면역침강한 후 N1-A4 항체에 의해 면역침강(IP)된 항원이 항-Flag 태그, 항-Myc 태그 또는 항-His 태그 항체에 의해 검출되는지를 확인하였다.

[0130] 그 결과, 항-Flag 태그, N1-A4, 및 항-HSP60 항체에 의해 면역침강된 항원이 항-Flag 태그 항체에 검출되었고 (도10B), 항-Myc 태그, 항-His 태그(Genescript), N1-A4, 항-HSP60에 의해 면역침강된 항원이 항-Myc 태그 항체에 의해 서도 검출되었다 (도 11B, 및 11C). 이러한 결과는 N1-A4 항체가 Flag-, Myc- 또는 His-태그된HSP60을 인식함 보여주며, 실제로 N1-A4항체가 인식하는 항원이 HSP60이라는것을 반복해서 증명하는 것이다.

[0132] <실시예 6> 단일클론항체 N1-A4 항체유전자 및 아미노산 분석

[0133] <6-1> 단일클론항체 N1-A4 유전자 클로닝

[0134] 왕성하게 자라는 하이브리도마 N1-A4 세포 5X10<sup>6</sup> 개를 원심분리하여 수확한 후 RNA iso plus reagent (TaKaRa, Otsu, Japan)으로 공급자의 프로토콜에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 얻어진 전체 RNA는 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 중합효소연쇄반응 프라이머를 변형한 후 사용하였다 (Wang, et al J. Immunol. Methods 233, 167-177, 2000). 합성된 cDNA로 중쇄 클로닝을 위해서는 IgG1 불변영역에 해당하는 중합효소연쇄반응 프라이머인 염기서열 5'-GGA GTC GAC ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3'인 올리고뉴클레오타이드 25 pmole과 중쇄항체 가변영역 N말단에 해당하는 프라이머인 염기서열 5'MH1 5 '-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 프라이머 6 5' - GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT-3 '과 프라이머 7 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 제한효소자리를 부여하였다. 중쇄인 경우에는 5'-프라이머에는 EcoRI, 3'-프라이머에는 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 중쇄 및 경쇄반응액을 각각 섞은 후 먼저 95℃에서 1분, 55℃에서 45초, 72℃에서 1분으로 30회 반응시켰다. 그 결과 중쇄 불변영역에 해당하는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 400bp, 경쇄 불변영역 해당되는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 390bp에 해당되는 위치에서 증폭된 DNA를 얻을 수 있었다 (도 12).

[0136] <6-2> 단일클론항체 N1-A4 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

[0137] 상기 실시예에서 증폭해낸 N1-A4 항체 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 중합효소연쇄반응 산물을 중쇄는 EcoRI 과 SalI으로 처리하고 경쇄는 HindIII와 SalI으로 처리한 후 1.0 % 아가로스 젤에 전개시켜서 FavorPrep GEL™ / PCR Purification Kit(Favorgen사, 대만)로 약 400과 390bp에 해당하는 DNA를 분리하였다. 중쇄 유전자를 클로닝할 벡터로 사용할 pBluescript KS+를 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄 유전자 클로닝 벡터로는 pBluescript KS+를 HindIII와 SalI으로 처리한 다음 FavorPrep GEL™/ PCR Purification Kit(Favorgen사, 대만)로 분리하였다. 이 두 DNA를 T4 DNA 연결효소(New England Biolab, 미국)로 연결하고 대장균 DH5α에 CaCl<sub>2</sub> 방법으로 형질 전환한 다음, 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA삽입물을 가진 클론, 경쇄의 경우 약 390bp 크기를 가진 대장균 클론들을 선발하였다.

[0138] 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 여러 클론들을 100μg/ml의 앰피실린이 함유된 3ml의 LB 배지에서 밤새 배양한 후 DNA 미니프렙 키트(Intron사 한국)를 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 결정하였다. 중쇄 및 경쇄 cDNA의 염기서열을 아미노산으로 바꾼 후 각 아미노산 배열을 케이뱃(Kabat) 데이터베이스를 이용하여 분석하였다(Johnson G. and Wu,T.T. Nucleic Acids Res. 29: 205-206,



2001). 도13, 및 14의 염기 서열 위의 숫자는 케이벳 넘버링에 따라 정하였다.

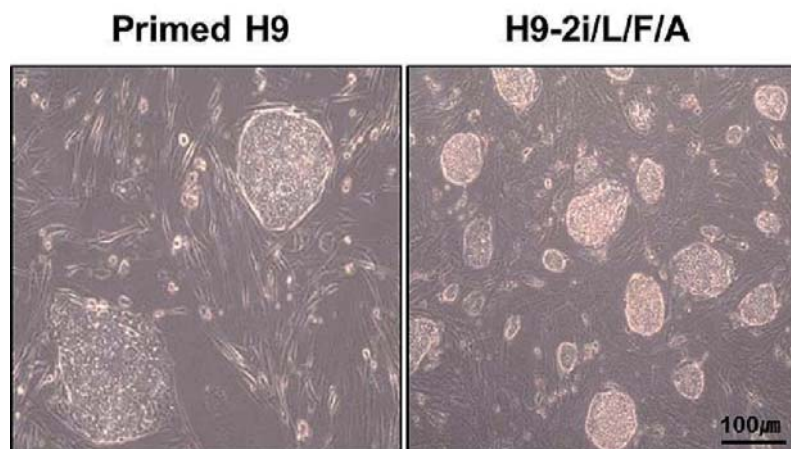
[0139] 이 아미노산 서열을 분석한 결과 이 면역유전자들은 항체구조에 특징적인 잔기와 배열을 완벽하게 갖추고 있으며 (도13, 및 14), 구체적으로 보면 면역글로불린 여러 그룹 가운데서 N1-A4의 중쇄는 서브그룹 IIC 에 속하고 경쇄는 서브그룹 V에 속한다. 항원을 인식하는 CDR 잔기로는 중쇄의 경우, N1-A4 중쇄 경우 CDR1은 23-35, CDR2는 50-65, CDR3는 95-102이며 (도 13), 경쇄의 경우 CDR1은 24-34, CDR2는 50-56, CDR3는 89-97에 해당하였다 (도 14). 구조상 필수적인 디설피드 결합은 중쇄의 경우 22번과 92번 시스테인이, 경쇄의 경우 23번과 88번 시스테인이 관여하였다. 이 유전자의 분석 결과로부터 중쇄 및 경쇄 유전자는 기능적임을 확인할 수 있었다.

[0140] 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 검정시, 일부 길항 활성을 지닐 수 있다.

[0141] 예를 들어, 청구항 구성 목적을 위해, 이하 기재되는 청구항은 어떤 식으로든 이의 문자 그대로의 언어보다 좁게 해석되어선 안 되고, 따라서 명세서로부터의 예시적 구현예가 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.

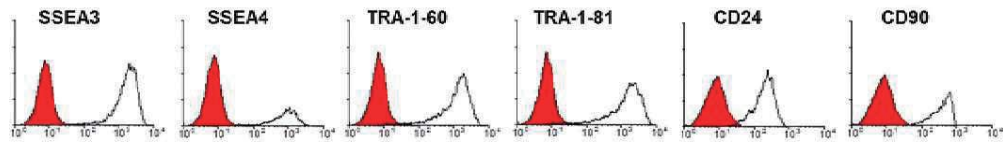
## 도면

### 도면1

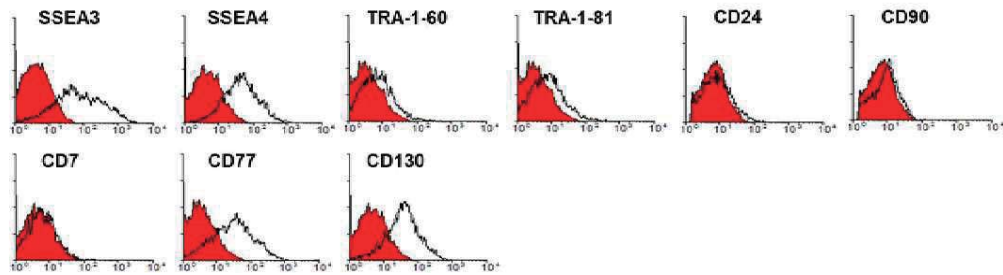


도면2

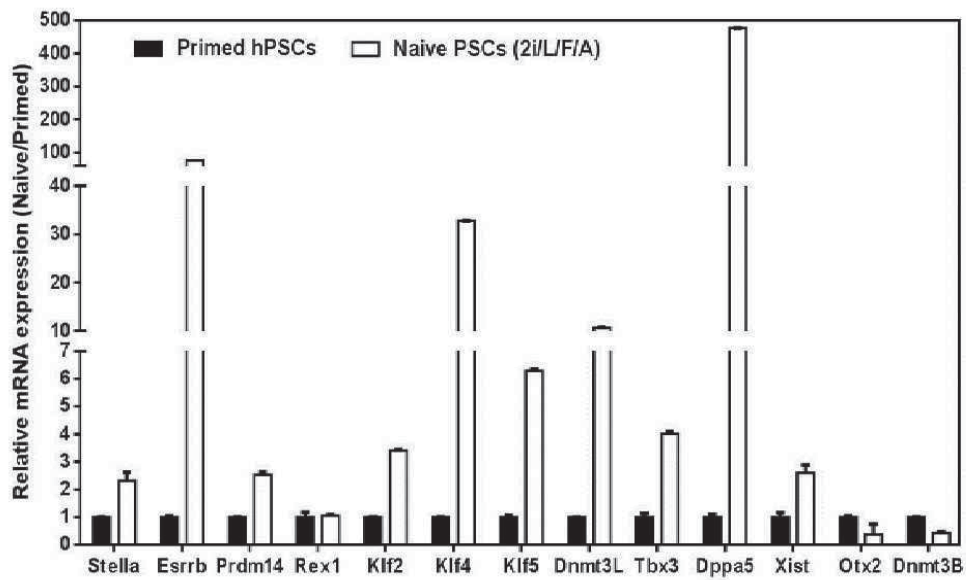
A. Primed H9



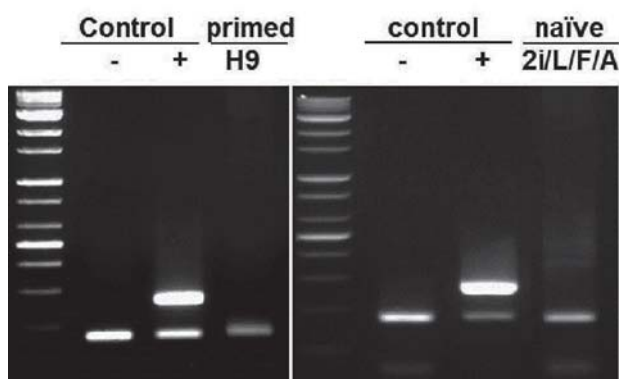
B. naïve-H9-2i/L/F/A



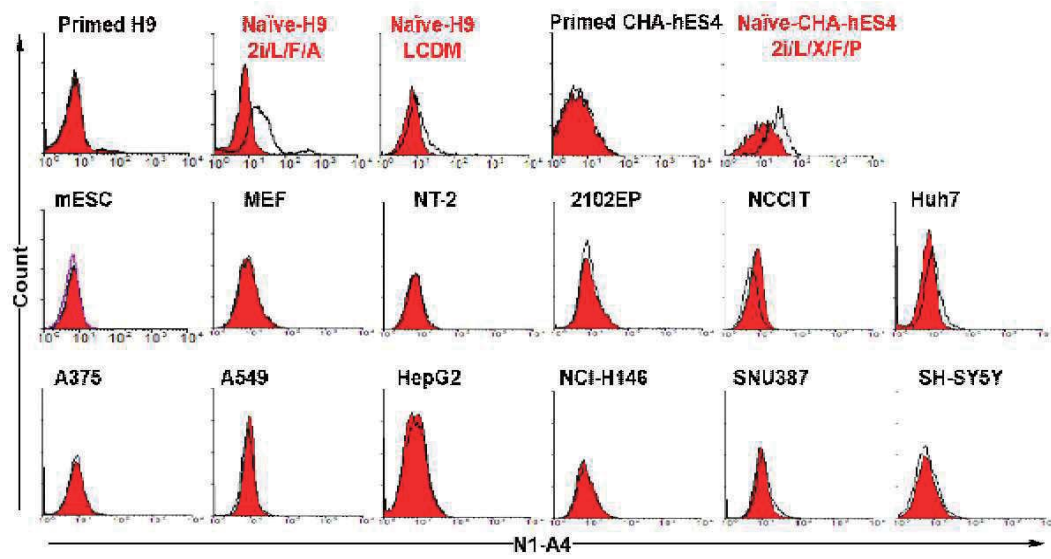
도면3



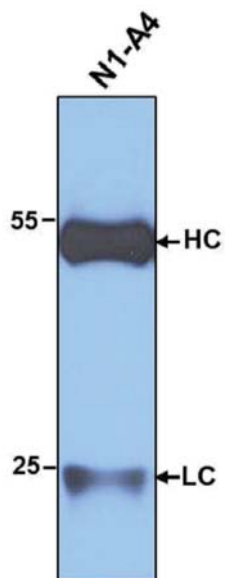
도면4



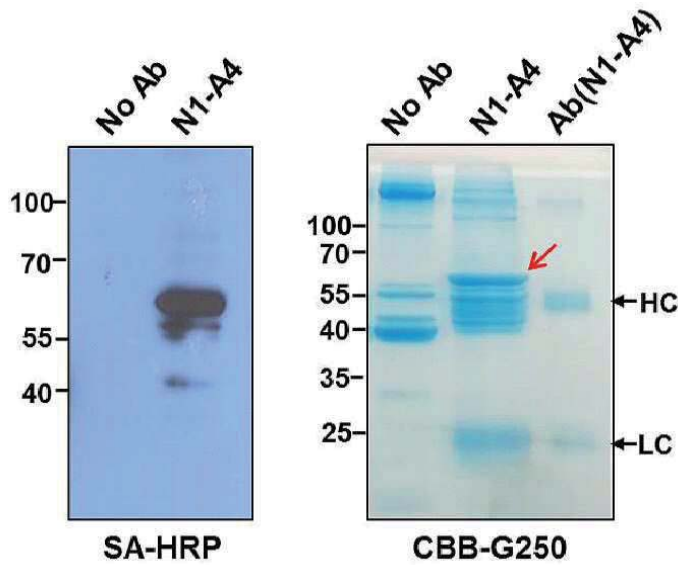
도면5



도면6



도면7



도면8

Accession: ABB01008.1 Score:2507 Mass:61382  
heat shock protein 60 [Homo sapiens]

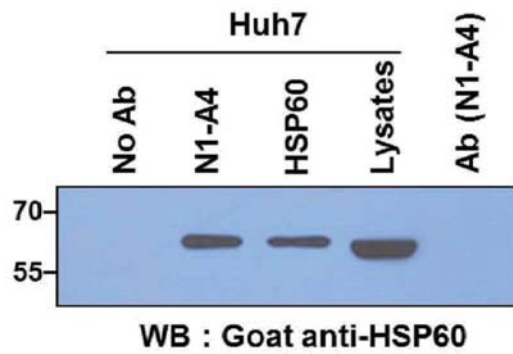
Matching peptide shown in bold red

Start-End	Observed	Mr(theory)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
38-58	1037.5702	2113.3253	2113.1163	-4.52	0	<b>R</b> <u>ALNNQSVLLADAVVTMSFK</u> .G
142-156	528.9739	1533.8998	1533.9049	-4.46	1	<b>R</b> <u>SGVMLAVDAVIAELK</u> .K
143-156	476.9493	1427.799	1427.8058	-4.73	0	<b>R</b> <u>GVNGLAVDAVIAELK</u> .K
143-157	778.9542	1555.8938	1555.9007	-4.47	1	<b>R</b> <u>GVNGLAVDAVIAELK</u> .Q
206-223	647.3159	1938.9258	1938.9244	0.58	1	<b>K</b> <u>FLNDELLEIRGNR</u> FOR.G+oxidation(M)
317-346	1039.168	3114.4821	3114.4703	3.77	0	<b>K</b> <u>DMALATGSAWFGREGLTINLEDVQPHDLK</u> .V+oxidation(N)
347-354	422.7571	843.4396	843.5056	-8.26	0	<b>K</b> <u>GVGVIVTK</u> .D
347-361	544.3034	1625.8864	1629.9012	-7.81	1	<b>K</b> <u>VAENVIVKDDAMLLK</u> .G
399-407	451.2679	960.5213	960.528	-7.44	0	<b>K</b> <u>LSGSAVLR</u> .V
423-431	461.2412	960.4798	960.4876	-8.12	0	<b>R</b> <u>VTDALRTR</u> .A
432-448	842.9479	1683.8313	1683.8978	-9.77	0	<b>R</b> <u>AAVERGIVLGGCALLR</u> .C
465-472	471.3068	940.539	940.5069	8.45	1	<b>K</b> <u>IGIEIRK</u> .T
473-483	396.2632	1185.7977	1185.7155	8.53	1	<b>R</b> <u>TSKIPANTIAK</u> .K
476-483	422.7488	843.4831	843.4888	-8.71	0	<b>K</b> <u>IPANTIAK</u> .N
484-495	608.8256	1215.8366	1215.6347	1.56	0	<b>K</b> <u>NAGVSSGLIVK</u> .I
519-528	549.3336	1096.8527	1096.6604	7.97	1	<b>K</b> <u>GEILPRKVR</u> .T
529-553	828.131	2481.3713	2481.3942	-5.22	0	<b>K</b> <u>TALLDAAGVASLITAEVNVTSIRK</u> .K
529-556	956.8569	2867.9488	2867.5743	8.9	1	<b>R</b> <u>TALLDAAGVASLITAEVNVTSIRSEK</u> .D

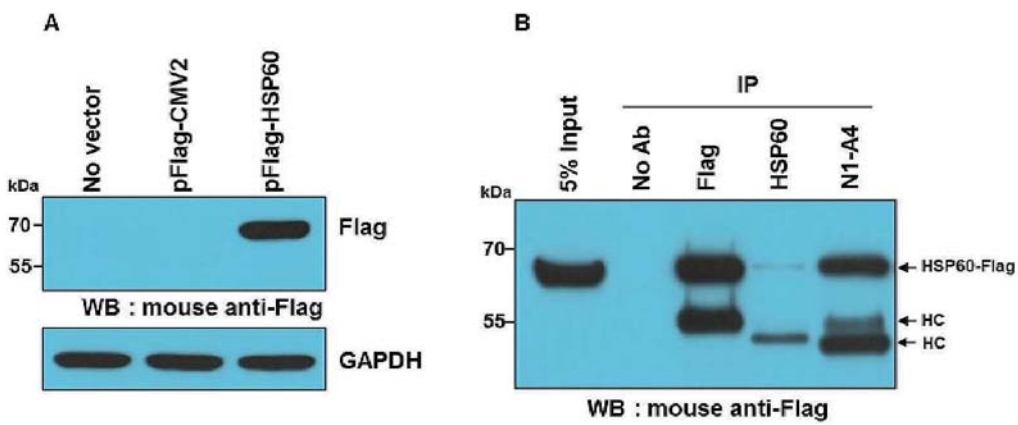
Matched peptides are underlined in red.

1. MLKLPVVERQ MRP/SRVLEP HLTRAYARDV RTGADKRLH LSGYCELADA VAVTMEPRGR  
61. TVILRQSWGS PENTRGGVTV AKSLDGRKY KRIGAKLVQD VANNUNEKAG DGTPTATVLA  
121. RTAKRGEKEX ISKAGNEVEI **RSGVGLAVDA** **VIAELIKQSR** FVTTFEELAQ VATISASGDF  
181. EIGIILSDAM KVGRKGVIT VKASLQSTLA **DELEITSGMK** EDRGYISPYF INTSKGQCE  
241. PDQAVVLESE KRISSIQSIV PALEIANAHK KPLVILARDV DGALSTPLV NREKVGIAVY  
301. AVKLPQFSDN KRMILKMAI **ATSGRWTERE** **GLTINLEDVQ** SEDLGVSEV IVPKEDAMLL  
361. KGEKQAGIT KRIQELIEQL IVTTSFYRKE KLSSESLAKLS SGVALNVGG TSQVENVKPK  
421. DKVDAKANT RAAVDEGIVL GGGQALNCI PAIDSLTPAN EDQKIGIIEII KRTKTPFAPK  
481. **LASDAQDESE** **LIVKIDQGES** SEGVYDMAG DGVNIVKRI IQPTQVRLA LIDAGVAGG  
541. LTTAEVAVTE **IKRREKDESM** GAMGCGGGM GSQMP

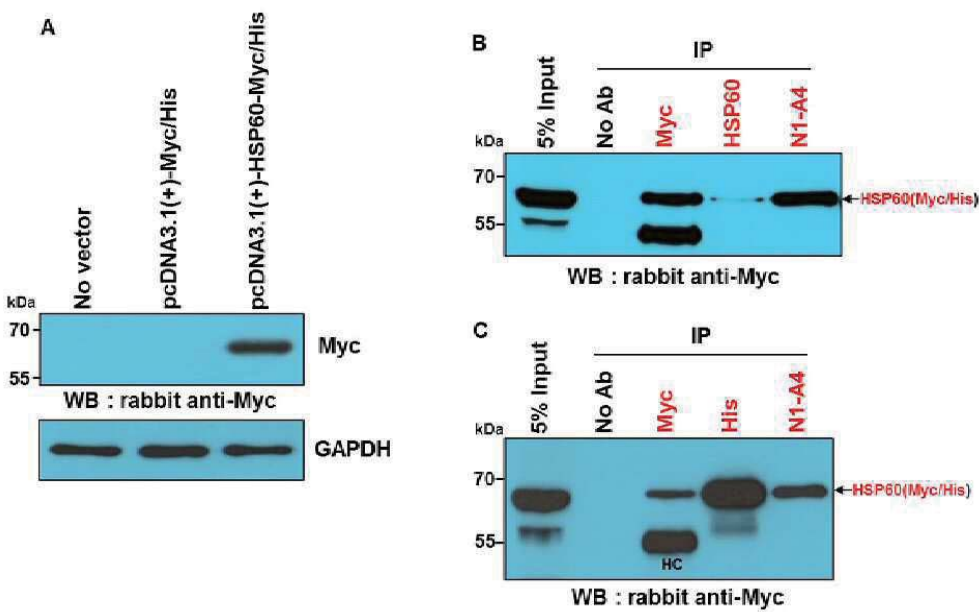
도면9



도면10

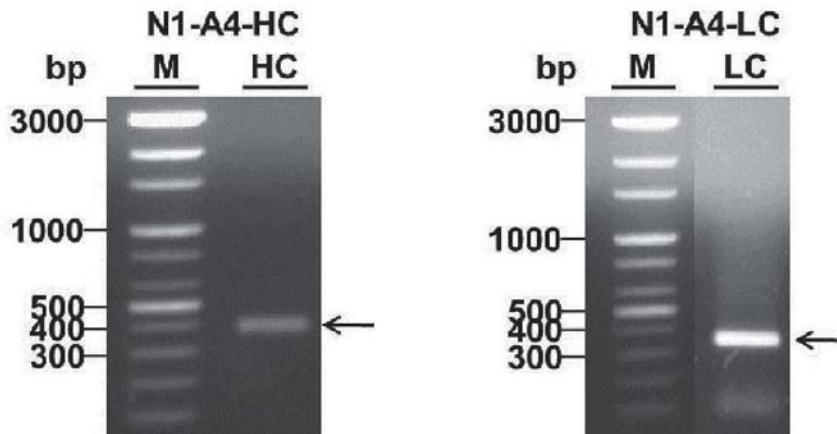


도면11





도면12



도면13

HC N1-A4 subgroup IIc

CAA GTA AAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AGG  
Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Arg  
CDR1  
ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA ACT GCT GGA ATG CAG TGG GTG CAA  
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln  
CDR2  
AAG ATG CCA GGA AAG GGT TTG AAG TGG ATT GGC TGG ATA AAC ACC CAC TCT GGA GTG  
Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val  
CDR2  
CCA AAA TAT GCA GAA GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC  
Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala  
AGC ACT GCA TAT TTA CAG ATA AGC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACG TAT TTC  
Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe  
CDR3  
TGT GCG AGA GGC TAC GGT AGT CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC  
Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
TCC TCA GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT - 375  
Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr - 125

도면14

LC N1-A4 subgroup V

GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GTG ACT CCA GGA GAT AGC GTC  
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Ser Val  
CDR1  
AGT CTT TCC TGC AGG GCC AGC CAA AGT ATT AGC AAC AAC CTA CAC TGG TAT CAA CAA  
Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln  
CDR2  
AAA TCA CAT GAG TCT CCA AGG CTT CTC ATC AAG TAT GCT TCC CAG TCC ATC TCT GGG  
Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly  
ATC CCC TCC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACT CTC AGT ATC AAC  
Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn  
CDR3  
AGT GTG GAG ACT GAA GAT TTT GGA ATG TAT TTC TGT CAA CAG AGT AAC AGC TGG CCG  
Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro  
TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT  
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr  
GTA TCC - 348  
Val Ser - 116

# 서열 목록

<110> Sejong University Industry-Academy Cooperation Group

<120> Monoclonal antibody N1-A4 specific to naive human pluripotent stem cells

<130> 18P07102

<160> 16

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<400> 1

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(17)

<223> HCDR2

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(7)

<223> HCDR3

<400> 3

Gly Tyr Gly Ser Leu Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<223> LCDR1

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(7)

<223> LCDR2

<400> 5

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(9)

<223> LCDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(125)

<223> Heavy chain full length

<400> 7

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala

20 25 30

Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100 105 110

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

115 120 125

<210> 8

<211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells  
 <220><221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(116)  
 <223> Light chain full length  
 <400> 8

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

1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

Pro Thr Val Ser

115

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> CDS

<222> (1)..(39)

<223> HCDR1

<400> 9



aag gct tct ggg tat acc ttc aca act gct gga atg cag 39

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln

1 5 10

<210> 11

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> CDS

<222> (1)..(51)

<223> HCDR2

<400> 11

tgg ata aac acc cac tct gga gtg cca aaa tat gca gaa gac ttc aag 48

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

1 5 10 15

gga 51

Gly

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<223> HCDR3

<400> 13

ggc tac ggt agt ctt gac tac 21

Gly Tyr Gly Ser Leu Asp Tyr

1 5

<210>

> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> CDS

<222> (1)..(33)

<223> LCDR1

<400> 15

agg gcc agc caa agt att agc aac aac cta cac 33

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His

1 5 10

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<223> LCDR2

<400> 17

tat gct tcc cag tcc atc tct 21

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells

<220><221> CDS

<222> (1)..(27)

<223> LCDR3

<400> 19

caa cag agt aac agc tgg ccg tac acg 27

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 21  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells  
 <220><221> CDS  
 <222> (1)..(375)  
 <223> Heavy chain full length

<400> 21

caa gta 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 agg atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc aca act gct	96
Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala	
20 25 30	
gga atg cag tgg gtg caa aag atg cca gga aag ggt ttg aag tgg att	144
Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile	
35 40 45	
ggc tgg ata aac acc cac tct gga gtg cca aaa tat gca gaa gac ttc	192
Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe	
50 55 60	
aag gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc act gca tat	240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
tta cag ata agc aac ctc aaa aat gag gac acg gct acg tat ttc tgt	288
Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys	
85 90 95	
gcg aga ggc tac ggt agt ctt gac tac tgg ggc caa ggc acc act etc	336
Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu	
100 105 110	
aca gtc tcc tca gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc tat	375

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr  
115 120 125  
<210> 23  
<211> 348  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> N1-A4 antibody specific to naive human pluripotent stem cells  
<220><221> CDS  
<222> (1)..(348)  
<223> Light chain full length  
<400> 23  
gac att cag ctg acc cag tct cca gcc acc ctg tct gtg act cca gga 48  
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
gat agc gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agc caa agt att agc aac aac 96  
Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn  
20 25 30  
cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca agg ctt ctc atc 144  
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45  
aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc agg ttc agt ggc 192  
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac agt gtg gag act 240  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr  
65 70 75 80  
gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac agc tgg ccg tac 288  
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr  
85 90 95  
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg gct gat gct gca 336  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
100 105 110

cca act gta tcc

348

Pro Thr Val Ser

115