

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0021414
(43) 공개일자 2020년02월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
G01N 33/569 (2017.01) *G01N 35/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 5/069 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0100818
 (22) 출원일자 2019년08월19일
 심사청구일자 2019년08월19일
- (30) 우선권주장
 1020180096650 2018년08월20일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
 윤영섭
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원
- 이신정
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원
- 손동찬
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원
- (74) 대리인
 특허법인인벤싱크

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 명세서에서는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 PECAM1의 세포 외 기질 도메인 (extracellular matrix domain) 에 대하여 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체 및 이의 제조 방법이 제공된다

대표도 - 도1b

```

10      20      30      40      50
MQPRWAQGAT MWLGVLLTLL LCSSLEGQEN SFTINSVMK SLPDWTQNG
60      70      80      90      100
KNLTLCQFAD VSTTSHVKPQ HQMLFYKDDV LFYNISMKS TESYFIPEVR
110     120     130     140     150
IYDSGTYKCT VIVNNKEKTT AEYQLLEGV PSRVTLDKK EAIQGGIVRV
160     170     180     190     200
NCSVPPEKAP IHFTIEKLEL NEKMKVKKRE KNSRDQNFVI LEFPVEEQDR
210     220     230     240     250
VLSFRCQARI ISGIHMQTSE STKSELVTVT ESFSTPKFHI SPTGMIMEGA
260     270     280     290     300
QLHIKCTIQV THLAQEFPEI IIQDKAIVA HNRHGKAVY SVMAMVEHSG
310     320     330     340     350
NYTCKVESSR ISKVSSIVVN ITELFSKPEL ESSFTHLDQG ERLNLSCSIP
360     370     380     390     400
GAPPANFTIQ KEDTIVSQTQ DFTKIASKSD SGTICTAGI DKVVKKSNTV
410     420     430     440     450
QIVVCEMLSQ PRISYDAQFE VIKGQTIEVR CESISGTLPI SYQLLKTSKV
460     470     480     490     500
LENSTKNSND PAVFKDNPTD DVEYQCVADN CHSHAKMLSE VLRVKVIAPV
510     520     530     540     550
DEVQISILSS KVVESGEDIV LQCAVNEGSG PITKYFYREK EGKPFYQMTS
560     570     580     590     600
NATQAFWTKQ KASKEGEQGY YCTAFNRANH ASSVPRSKIL TVRVILAPWK
610     620     630     640     650
KGLIAVVIIIG VIITALLIIAA KCYFLRKA KA MPVMSRP AVPLLSNNE
660     670     680     690     700
KMSPDNMEAN SHYGHNDVNR NHAMKPINDN KEPLNSDVQY TEVQVSSAES
710     720     730
HKDLGKKDTE TVYSEVRKAV PDAVESRYSR TEGSLDGT

```

(52) CPC특허분류

G01N 33/56966 (2013.01)
 G01N 35/0098 (2013.01)
 C12N 2501/73 (2013.01)
 C12N 2506/02 (2013.01)
 C12N 2506/45 (2013.01)
 C12N 2509/00 (2013.01)
 G01N 2333/70503 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C2211
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 줄기세포, 재생의료 실용화/성과창출형 중개연구
 연구과제명 유도만능줄기세포에서 분화된 혈관내피세포를 이용한 말초동맥질환의 세포치료법 개발
 기 여 율 3/10
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2016.11.08 ~ 2021.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2019R1A2C100561
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
 연구과제명 유도만능줄기세포를 이용한 임상적용가능 림프관내피세포 치료제 개발
 기 여 율 1/10
 주관기관 연세대학교
 연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C2782
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 첨단의료기술개발/줄기세포, 재생의료분야 기반구축 국제협력
 연구과제명 나노입자를 이용한 혈관내피세포로의 직접세포전환법 개발
 기 여 율 3/10
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2015.12.01 ~ 2019.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3A9C6031514
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오의료기술개발사업
 연구과제명 유도만능줄기세포에서 심근세포 아형으로의 분화와 분리 및 이를 이용한 세포치료제 및 약물평가 기반기술 개발
 기 여 율 3/10
 주관기관 연세대학교
 연구기간 2015.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 PECAM1의 세포 외 기질 도메인 (extracellular matrix domain)에 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체는, 상기 PECAM1의 세포 외 기질 도메인에 특이적으로 결합하는 단일 클론 항체인, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 불변 도메인 및 자성 입자를 더 포함하고,

상기 자성 입자는 상기 항체의 중쇄 불변 도메인에 부착된, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체

청구항 4

PECAM1에 대한 항체가 생성되도록, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 상기 PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질을 항체 생산 개체에 주입하는 단계;

상기 항체 생산 개체로부터 상기 PECAM1의 항원과 반응하는 양성 클론을 결정하는 단계, 및

상기 양성 클론으로부터 상기 PECAM1에 대한 항체를 분리하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 생산 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 항체 생산 개체에 주입하는 단계 이전에,

상기 PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 발현하는 염기 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 벡터 (plasmid vector)를 제조하는 단계;

상기 재조합 플라스미드 벡터를 숙주 세포에 형질주입 (transfection) 하는 단계, 및

상기 PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질을 획득하는 단계를 더 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 생산 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 양성 클론을 결정하는 단계는,

상기 항체 생산 개체로부터 복수의 B 림프구를 분리하는 단계;

융합 세포를 생성하도록, 상기 복수의 B 림프구를 골수종 세포와 각각 융합하는 단계;

클론을 형성하도록, 복수의 상기 융합 세포를 각각 배양하는 단계, 및

형성된 상기 클론으로부터 상기 PECAM1의 항원과 반응하는 양성 클론을 결정하는 단계를 포함하고,

상기 항체를 분리하는 단계는,

상기 양성 클론으로부터 상기 PECAM1에 대한 단일 클론 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 생산 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

분리된 상기 PECAM1에 대한 항체는,

3.5 mg/ml 이상의 농도를 갖는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 생산 방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

분리된 상기 PECAM1에 대한 항체는,

0.004 mg/ml 이하의 농도에서 상기 PECAM1의 세포 외 기질 도메인에 대한 특이성 및 결합 친화성을 유지하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 생산 방법.

청구항 9

혈관 내피세포 및 상기 혈관 내피세포와 상이한 내피세포를 포함하는 세포 클러스터 (cluster) 를 획득하도록, 줄기세포로부터 내피세포를 분화시키는 단계;

상기 혈관 내피세포의 표면에 존재하는 PECAM1의 단백질과 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체가 면역반응하도록, 상기 세포 클러스터에 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 기재된 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 처리하는 단계,

면역형광염색법을 이용하여, 상기 면역반응에 의해 형광을 띄는 세포를 혈관 내피세포로 분류 (sorting) 하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포의 순수 분리 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 줄기세포는 인간 만능 줄기세포 또는 인간 유도 만능 줄기세포인, 혈관 내피세포의 순수 분리 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 분화시키는 단계는,

DLL4를 처리한 배지에서 상기 줄기세포를 배양함으로써, 상기 내피세포를 분화시키는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포의 순수 분리 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체는 자성 입자를 더 포함하고,

상기 분류하는 단계는,

금속성 입자가 내부에 위치해 있고, 외부에 자력이 인가되도록 구성된 컬럼에, 상기 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체가 처리된 상기 세포 클러스터를 투과시키는 단계;

상기 컬럼 내부에 위치한 상기 금속성 입자와 결합한 세포를 상기 혈관 내피세포로 분류하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포의 순수 분리 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 분류하는 단계는,

상기 컬럼 외부에서 자력이 인가되는 것을 차단함으로써 상기 혈관 내피세포를 분류하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포의 순수 분리 방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 기재된 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈관 내피세포의 순수 분리를 위한 항체 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 혈관 내피세포에 특이적으로 결합하도록 구성됨에 따라 분화된 혈관 내피세포의 순수 분리에 이용될 수 있는 항체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈관 신생 (neovascularization) 은 기존 혈관의 내피세포가 세포 외 기질 (ECM, extracellular matrix) 을 분해하고, 이동, 분열 및 분화하여 새로운 모세혈관을 형성하는 과정을 의미한다. 이러한 혈관 형성은 상처 수복, 배아 발생, 종양 형성, 만성염증, 비만 등 여러 가지 생리적 및 병리적 현상에 관여할 수 있다.

[0003] 혈관 신생은 특히 상처 치유나 조직 재생에 필수적인 현상일 수 있다. 예를 들어 체내에서 혈관 신생의 결핍이 있을 경우, 괴사, 궤양 및 허혈이 일어남에 따라, 조직 또는 기관의 기능 이상을 유발할 수 있다. 나아가, 혈액 공급이 원활하지 못함에 따라, 허혈성 심장 질환, 동맥경화증, 심근경색증 및 협심증과 같은 심혈관계 질환 또한 야기될 수 있다. 이에 따라, 혈관 신생의 결핍으로 인한 조직 손상을 감소시키고, 이로 유발되는 심혈관계 질환을 치료하기 위한, 새로운 치료법의 개발이 요구되어 왔다.

[0004] 한편, 혈관 신생 기능의 결핍 또는 이와 연관된 심혈관계 질환에 대한 새로운 전략으로, 줄기세포로부터 혈관을 새로 만드는 혈관 신생을 유도하여 혈관을 생성하는 재생치료가 대안 치료법으로 제안되었다. 이러한 세포 치료제를 이용한 혈관 재생치료에 대한 효과는 이용되는 세포 치료제의 순도, 즉 분화된 혈관 내피세포의 순도와 연관될 수 있다. 이에, 목적하는 치료 효과를 달성하기 위해 줄기세포로부터 분화된 다양한 세포주 (cell line) 로부터 혈관 형성능의 내피세포를 높은 순도로 분리하는 것이 중요할 수 있다.

[0005] 따라서, 이상의 한계를 극복하고, 혈관 신생의 결핍 또는, 이로 인한 조직 손상, 나아가 이들과 연관된 심혈관계 질환에 대한 치료에 이용될 수 있는, 혈관 내피세포의 세포 치료제에 대한 순수 분리 방법에 대한 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 발명자들은, 전술한 과제를 해결하기 위해 줄기세포로부터 분화된 다양한 세포주로부터, 세포 치료제로서 이용될 수 있는 혈관 형성능의 내피세포를 고순도로 분리하는 방법에 대하여 지속적으로 연구하였다.

[0008] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 분화된 혈관 내피세포에서 특이적으로 발현하는 마커 (marker) 들 중 PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) 의 mRNA 및 단백질 발현 수준이 현저하게 높은 것을 발견할 수 있었다. 나아가, 본 발명의 발명자들은 줄기세포로부터 분화된 다양한 세포 클러스터들 내에서 PECAM1 발현 양성 세포를 분류 (sorting) 함으로써, 순도 높은 혈관 내피세포를 획득할 수 있음을 인지할 수 있었다.

[0009] 특히, 본 발명의 발명자들은 PECAM1 단백질에 대하여 세포 표면에 위치하는, 세포 외 기질 도메인 (ECD, extracellular matrix domain) 에 주목하였다. 보다 구체적으로, 본 발명의 발명자들은, PECAM1 단백질의 세포 외 기질 도메인에 결합 가능한 항체를 개발함으로써, 줄기세포로부터 분화된 혈관 내피세포를 보다 용이하게

분류할 수 있음을 인지할 수 있었다.

- [0010] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 PECAM1의 세포 외 기질 도메인에 결합 가능한 항체를 개발하기에 이르렀다. 나아가, 본 발명의 발명자들은 이를 이용한 혈관 내피세포의 순수 분리 방법을 새롭게 개발할 수 있었다.
- [0011] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, PECAM1의 세포 외 기질 도메인에 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는, 자력의 인가 또는 차단에 의해 분화된 혈관 내피세포를 보다 용이하게 순수 분리할 수 있는 자성 입자가 결합된 항체를 더 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는, PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질을 항체 생산 개체에 주입하고, 항체 생산 개체로부터 PECAM1의 항원과 반응하는 양성 클론을 획득하고, 양성 클론으로부터 PECAM1에 대한 항체를 분리하도록 구성된, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는, 줄기세포로부터 혈관 내피세포를 분화시키고, 세포 클러스터에 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 처리하고, 면역형광염색법을 이용하여 면역반응에 의해 형광을 띄는 세포를 혈관 내피세포로 분류하도록 구성된, 혈관 내피세포의 순수 분리 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리용 키트를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해 본 발명은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 PECAM1의 세포 외 기질 도메인 (extracellular matrix domain) 에 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 제공한다.
- [0018] 본 명세서 사용되는 용어, "내피세포"는 혈관과 림프관의 내벽을 덮고 있는 층을 구성하는 편평 세포를 의미할 수 있다. 이에, 내피세포는 "혈관 내피세포 (vascular endothelial cell)"와 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [0019] 한편, 혈관 재생 치료에 있어서 줄기세포, 예를 들어 인간만능줄기세포로부터 분화된 내피세포는, 세포 치료제로서 생체 내에 이식되어 손상된 혈관을 재생하고 혈관의 형성 또는 혈관의 신생을 유도할 수 있다. 이때, 치료에 이용되는 내피세포의 순도는, 혈관 재생 치료에 대한 예후와도 연관될 수 있다. 보다 구체적으로, 미분화된 내피세포 또는 중배엽 계통의 다른 세포주를 포함하거나, 불순물이 혼합된 내피세포를 허혈성 조직에 이식할 경우, 내피세포의 생존률의 저하를 야기할 수 있다. 이에, 재생 치료에 있어서 이식된 내피세포는 오랜 기간 동안 혈관 형성에 기여할 수 없음에 따라, 순도가 낮은 내피세포의 이용은 치료 효과의 저하로 이어질 수 있다.
- [0020] 이에, 순도 높은 내피세포를 분류하는 것은, 내피세포 자체의 수득률을 높이는 것뿐만 아니라, 이를 이용한 세포 재생치료의 효과를 증진시키는 것과도 연관될 수 있다.
- [0021] 한편, 내피세포는, 특이적으로 높은 수준으로 발현하는 유전자 또는 단백질을 가질 수 있다. 예를 들어, 줄기세포로부터 분화된 내피세포에서의 *PECAM1* 유전자의 발현 수준, 및 *PECAM1* 단백질의 수준은, 줄기세포로부터 분화된 다른 세포주에서보다 높을 수 있다. 이에, *PECAM1*를 내피세포 마커로 이용하여 분화된 다양한 세포주들 사이에서 내피세포를 높은 순도로 분리할 수 있다.
- [0022] 본 명세서 사용되는 용어, "*PECAM1*"은, 혈소판 내피세포에 접합되어 있는 세포 부착 분자를 의미할 수 있으며, CD31, CD31/EndoCAM, PECA1 및 endoCAM과 상호 교환적으로 이용될 수 있다. 한편, *PECAM1*은 혈소판, 단구, 호중구 및 일부 유형의 T 세포의 표면에서 발견될 수 있으며, 특히 내피세포의 세포간 접합부의 많은 부분을 차지할 수 있다. 보다 구체적으로, *PECAM1*은 내피세포의 세포 표면에 존재하는, 세포 외 기질 도메인을 포함할 수 있다. 이때, *PECAM1*의 세포 외 기질 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열과 80 %이상의 상동성을 가질 수 있

고, 바람직하게 90 % 이상의 상동성을 가질 수 있고, 보다 바람직하게 95 % 이상의 상동성을 가질 수 있다.

- [0023] 이에, PECAM1의 세포 외 기질 도메인에 특이적으로 결합하는 항체는, 혈관 내피세포의 순수 분리에 이용될 수 있다.
- [0024] 본 명세서 사용되는 용어, "항체"는 항원에 대항하기 위해 생성된 당단백질을 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, 본원 명세서에 개시된 항체는, PECAM1의 세포 외 기질 도메인의 일부 서열을 에피토프 (epitope) 로 인식하여 이에 특이적으로 결합하도록 구성된 단일 클론 항체 (monoclonal antibody) 일 수 있다. 바람직하게 본 발명의 항체는, 치료를 위한 치료용 항체와는 상이할 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 나아가, 본 발명의 항체는 바람직하게 인간화 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 이때, 항체는 PECAM1의 세포 외 기질 도메인에 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 본 발명의 항체는 중쇄 불변 도메인 및 자성 입자를 더 포함할 수 있고, 자성 입자는 항체의 중쇄 불변 도메인에 부착될 수 있다. 그러나, 자성 입자의 위치는 이에 제한되지 않는다. 이에, 자성 입자를 포함하는 본원 발명의 항체에 의해 탐지된 혈관 내피세포는, 자력의 인가 또는 차단에 의해 보다 용이하게 순수 분리할 수 있는 효과가 있다.
- [0027] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해 본 발명은, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 생산 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 생산 방법은, PECAM1에 대한 항체가 생성되도록, PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질을 항체 생산 개체에 주입하는 단계, 항체 생산 개체로부터 PECAM1의 항원과 반응하는 양성 클론을 결정하는 단계, 및 양성 클론으로부터 PECAM1에 대한 항체를 분리하는 단계를 포함한다. 이때, PECAM1의 세포 외 기질 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0028] 본 명세서 사용되는 용어, "항체 생산 개체"는 항원 주입에 따라 이에 대응하는 항체를 B 림프구에서 생산할 수 있는 모든 개체를 의미할 수 있다. 바람직하게, 본원 발명의 항체 생산 개체는 마우스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 항체 생산 개체는 래트, 원숭이, 토끼, 염소, 기니피그 등의 포유 동물일 수도 있다.
- [0029] 본 명세서 사용되는 용어, "양성 클론"은 PECAM1의 항원, 보다 바람직하게 PECAM1의 세포 외 기질 도메인과 반응하는 항체를 생산하는 클론을 의미할 수 있다. 예를 들어, ELISA (enzyme-linked immunospecific assay) 를 통해 PECAM1의 항원과 미리 결정된 수준 이상의 반응성을 보이는 클론은, 양성 클론으로 결정될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 특징에 따르면, 항체 생산 개체에 주입하는 단계 이전에, PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 발현하는 염기 서열을 포함하는 제조합 플라스미드 벡터 (plasmid vector) 를 제조하는 단계, 제조합 플라스미드 벡터를 숙주 세포에 형질주입 (transfection) 하는 단계, 및 PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질을 획득하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0031] 이때, 생산된 PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질은, 항체 생산을 위해 항체 생산 개체에 주입되는 항원으로서 이용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 양성 클론을 결정하는 단계는 항체 생산 개체로부터 복수의 B 림프구를 분리하는 단계, 융합 세포를 생성하도록 복수의 B 림프구를 골수종 세포와 각각 융합하는 단계, 클론을 형성하도록 복수의 융합 세포를 각각 배양하는 단계, 및 형성된 클론으로부터 PECAM1의 항원과 반응하는 양성 클론을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 나아가, 항체를 분리하는 단계는 양성 클론으로부터 PECAM1에 대한 단일 클론 항체를 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 명세서 사용되는 용어, "B 림프구"는 림프구의 한 종류로, 체액성 면역 반응을 담당하면서 특정 병원체에 대해 항체를 생성할 수 있다. 이때, B 림프구"는 지라 세포로부터 분리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 명세서 사용되는 용어, "융합 세포"는 종양 세포 및 어떤 기능을 갖는 정상 세포를 융합하여 얻은 잡종 세포를 의미할 수 있다. 이때, 융합 세포는 하이브리도마 (hybridoma), 잡종세포와 상호교환적으로 이용될 수 있다. 한편, 융합 세포는 종양 세포가 갖는 증식성과 생체 세포의 기능을 함께 갖고 있음에 따라 단일 클론 항체 생산에 이용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 생산 방법에 따라 획득된 PECAM1에 대한 항체는, 3.5 mg/ml

이상의 농도를 가질 수 있다. 특히, 본 발명의 다양한 실시예에 의해 획득된 PECAM1에 대한 항체는 0.004 mg/ml 이하의 농도에서 상기 PECAM1의 세포 외 기질 도메인에 대한 특이성 및 높은 결합 친화성을 유지할 수 있다.

- [0036] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해 본 발명은, 혈관 내피세포의 순수 분리 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 방법은 혈관 내피세포 및 혈관 내피세포와 상이한 내피세포를 포함하는 세포 클러스터 (cluster) 를 획득하도록, 줄기세포로부터 내피세포를 분화시키는 단계, 혈관 내피세포의 표면에 존재하는 PECAM1의 단백질과 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체가 면역반응하도록, 세포 클러스터에 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 처리하는 단계, 면역형광염색법을 이용하여, 면역반응에 의해 형광을 띄는 세포를 혈관 내피세포로 분류 (sorting) 하는 단계를 포함한다.
- [0037] 본 명세서 사용되는 용어, "줄기세포"는 다양한 신체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 만능줄기세포 (Pluripotent stem cells) 를 의미할 수 있으나, 이제 제한되는 것은 아니다. 바람직하게, 혈관 재생 치료에 이용되는 줄기세포는 인간 배아줄기세포 또는 인간 유도만능줄기세포일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 줄기세포는 마우스 유래의 만능줄기세포 또는 유도 만능줄기세포일 수 있다.
- [0038] 본 명세서 사용되는 용어, "세포 클러스터"는 줄기세포로부터 분화된 내피세포와 함께, 배반포의 내세포 집단 (inner cell mass), 초기 단계 배아, 제대 세포, 제대혈, 인간 유도 만능 줄기세포, 뼈 골수, 나아가, 미분화된 줄기세포, 중배엽 계통의 줄기세포를 포함할 수 있다.
- [0039] 본 명세서 사용되는 용어, "면역형광염색법"은 항체나 항원에 플루오레세인이나 로다민과 같은 형광색소를 표지한 것을 사용하여 체액과 조직 등에 존재하는 항원 또는 항체를 검출하는 방법을 의미한다. 이때, 면역형광염색법은, 형광표지 항체를 이용하는 직접 면역형광염색법, 항원과 반응하는 무표지항체와 무표지항체에 특이적으로 반응하는 표지항체를 이용하는 간접 면역형광염색법을 모두 포함할 수 있다. 한편, 세포 클러스터 중 혈관 내피세포는 세포 표면에 존재하는 PECAM1 도메인과 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 면역반응에 의해 형광을 나타낼 수 있다. 이에, 형광 신호를 탐지함으로써, 혈관 내피세포를 순수 분리할 수 있다.
- [0040] 순수 분리된 혈관 내피세포는 세포 치료제로서 이용될 수 있다. 본 명세서 사용되는 용어, "세포 치료제"는 세포와 조직의 기능을 복원하기 위하여 살아 있는 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 이종 (xenogeneic) 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등 일련의 행위를 통하여 치료, 진단, 예방 목적으로 사용되는 모든 의약품을 의미할 수 있다. 본원 명세서에서 세포 치료제는 손상 조직의 회복을 위해 이식될 수 있는 세포 그 자체를 의미할 수 있다. 예를 들어, 세포 치료제는 허혈 부위에 이식되어 혈관 형성에 기여하는, 인간만능줄기세포로부터 분화된 혈관 내피세포일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 특징에 따르면, 분화시키는 단계는 DLL4를 처리한 배지에서 줄기세포를 배양함으로써, 내피세포를 분화시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 명세서 사용되는 용어, "DLL4 (delta-like 4)"는 노치 신호 전달 리간드일 수 있다. 이에, 배지에 DLL4를 첨가함으로써, 내피세포계통 세포로의 분화가 유도될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체는 자성 입자를 더 포함할 수 있다. 나아가, 분류하는 단계는, 금속성 입자가 내부에 위치해 있고 외부에 자력이 인가되도록 구성된 컬럼에 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체가 처리된 세포 클러스터를 투과시키는 단계, 컬럼 내부에 위치한 금속성 입자와 결합한 세포를 혈관 내피세포로 분류하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 분류하는 단계는 컬럼 외부에서 자력이 인가되는 것을 차단함으로써 혈관 내피세포를 분류하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0045] 전술한 특징에 따라, 자성에 의해 혈관 내피세포의 순수 분리는 보다 용이하게 수행될 수 있다.
- [0046] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해 본 발명은, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 키트를 제공한다.
- [0047] 키트는, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체와 혈관 내피세포의 표면에 존재하는 PECAM1의 세포 외 기질 도메인과 결합됨에 따라 형성된 면역 복합체의 수준을 측정하는 수단을 더 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 키트는 PECAM1의 에피토프 서열에 결합하는 항원 결합 단편 (antigen binding

fragment)"을 더 포함할 수 있다. 나아가, 키트는 항체 또는 항원 결합 단편에 특이적으로 결합하는 1종 이상의 링커와 고체 지지체의 복합체를 더 포함할 수 있다.

[0049] 이때, 본 명세서 사용되는 용어, "항원 결합 단편"은 전술한 본 발명의 다양한 실시예에서 이용되는 혈관 내피 세포의 순수 분리를 위한 항체의 전체 구조에 대한 단편으로, PECAM1의 세포 외 기질 도메인의 일부에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 의미할 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 단편은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 또는 scFv일 수 있다. 보다 구체적으로, Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인과 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 첫 번째 불변 (C_{H1}) 을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가질 수 있다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역 (hinge region) 을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있을 수 있다. 한편, F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 이황화 결합을 이루면서 생성될 수 있다. Fv는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인만을 가지고 있는 최소의 항체 조각일 수 있다.

[0050] 본 명세서 사용되는 용어, "링커 (linker)"는 자성 입자와 같은 비드와 항체 또는 항원 결합 단편을 연결시키는 물질을 의미할 수 있다. 링커는 예를 들면, 핵산, 단백질, 폴리펩타이드, 중합체 또는 이들의 조합일 수 있고, 항체 또는 항원 결합 단편에 결합 친화도를 갖는 것일 수 있다. 예를 들어, 링커는 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G, 단백질 L, 항-면역글로불린 항체, 자칼린 (Jacalin) 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0051] 본 명세서 사용되는 용어, "고체 지지체 (solid phase)"는 크로마토그래피에서 '동상'을 의미할 수 있다. 컬럼 크로마토그래피에 있어서 분리관에 충전한 흡착제 (고체) 또는 담체에 흡착시킨 액체가 고체 지지체일 수 있고, 평판 크로마토그래피에 있어서 여과지 등의 담체에 유지된 액체가 고체 지지체일 수 있다. 나아가, 친화 크로마토그래피에 있어서 흡착제를 분리를 목적으로 하는 물질에 특이적 친화력을 갖는 화합물을 고체 지지체에 결합시킨 것이 고체 지지체가 될 수 있다. 고체 지지체는 예를 들어 자성 입자, 폴리스티렌 (polystyrene) 플레이트 또는 폴리스티렌 비드일 수 있다.

[0052] 이때, 전술한 링커 및 고체 지지체는 물리적 또는 화학적으로 결합할 수 있다.

[0053] 한편, 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면 상기 키트는, 키트는 고체 지지체를 분리하기 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 완충액, 또는 자력 인가물질을 더 포함할 수 있다.

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

발명의 효과

[0055] 본 발명은 PECAM1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제공함으로써, 다양한 세포주들 또는 세포 클러스터 중 혈관 내피세포만을 순수 분리할 수 있어, 세포 치료제로서 이용될 수 있는 고순도의 혈관 내피세포를 제공할 수 있는 효과가 있다.

[0056] 특히, 본 발명은 자성 입자가 결합된 항체를 더 제공함에 따라, 자력의 인가 또는 차단에 의해 분화된 혈관 내피세포를 보다 용이하게 순수 분리할 수 있는 효과가 있다.

[0057] 이때, 본 발명은 저 농도에서도 항원 특이성 및 결합 친화도를 유지하는 혈관 내피세포 순수분리를 위한 항체를 제공함으로써, 효율적으로 높은 순도의 혈관 내피세포를 분리할 수 있는 효과가 있다.

[0058] 이에, 본 발명의 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 이용하여 분리한 혈관 내피세포는, 심혈관계 질환에 대한 예방 또는 치료에 효과적인 세포 치료제로서 안정적으로 임상에 적용될 수 있는 효과가 있다. 보다 구체적으로, 본 발명은 허혈성 조직에 직접 적용 가능한 고순도의 혈관 내피세포를 제공할 수 있어, 허혈성 심혈관 질환, 뇌혈관 질환, 당뇨 합병증, 창상 치료 등의 혈관 생성이 필요한 질환에 대한 세포 치료제 조성물을 제공할 수 있는 효과가 있다.

[0059] 나아가, 본 발명은 혈관 내피세포 순수 분리용 항체를 제공함으로써, 종래의 혈관 재생치료법에 이용되는 세포 치료제의 순도가 낮음에 따라 발생하는 문제점, 예를 들어, 생체 내 생존률 저하에 따른 미미한 치료 효과 등을 개선할 수 있는 효과가 있다.

[0060] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1a은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법의 절차를 도시한 것이다.
- 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 다른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서의 항원으로 이용되는 세포 외 기질 도메인을 도시한 것이다.
- 도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따른 다른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서의 항원으로 이용되는 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질에 대한 발현 수준을 나타내는 결과이다.
- 도 1d는 본 발명의 일 실시예에 따른 다른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서, 분리된 복수의 클론들 각각에 대하여 측정된 항원과의 결합 친화도 (binding affinity) 의 수준을 나타내는 결과이다.
- 도 1e는 본 발명의 일 실시예에 따른 다른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서, 분리된 복수의 클론들 각각에 대하여 측정된 면역형광염색 분석의 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 다른 실시예에 따른, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 이용한 혈관 내피세포의 순수 분리 방법의 절차를 도시한 것이다.
- 도 3a은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서, PECAM1과 반응하는 복수의 양성 클론으로 결정된 클론들 각각에 대하여 측정된 면역형광염색 분석의 결과이다.
- 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에 의해 획득된 항체에 대한 면역형광염색 방법을 이용한 평가 결과이다.
- 도 4a 및 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에 의해 획득된 항체에 대한 면역형광염색 방법을 이용한 세포 특이성에 대한 평가 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0062] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0063] 이하에서는 도 1a 및 1e를 참조하여, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조방법에 대해서 구체적으로 설명한다.
- [0064] 도 1a은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법의 절차를 도시한 것이다. 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 다른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서의 항원으로 이용되는 세포 외 기질 도메인을 도시한 것이다. 도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따른 다른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서의 항원으로 이용되는 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질에 대한 발현 수준을 나타내는 결과이다. 도 1d는 본 발명의 일 실시예에 따른 다른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서, 분리된 복수의 클론들 각각에 대하여 측정된 항원과의 결합 친화도의 수준을 나타내는 결과이다. 도 1e는 본 발명의 일 실시예에 따른 다른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서, 분리된 복수의 클론들 각각에 대하여 측정된 면역형광염색 분석의 결과이다.
- [0065] 도 1a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법은, PECAM1에 대한 항체가 생성되도록 PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질을 항체 생산 개체에 주입하는 단계 (S110), 항체 생산 개체로부터 PECAM1의 항원과 반응하는 양성 클론을 결정하는 단계 (S120) 및 양성 클론으로부터 PECAM1에 대한 항체를 분리하는 단계 (S130) 를 포함한다.
- [0066] 보다 구체적으로, 도 1b를 참조하면, PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질을 항체 생산 개체에 주입하는 단계 (S110) 에서는, PECAM1의 단백질 전체 도메인 중 28 내지 681 번째의 세포 외 기질 도메인을 갖는 단백질을 항원으로 이용하여 항체 생산 개체, 예를 들어 마우스에 주입할 수 있다.
- [0067] 이때, 항원으로 이용되는 단백질은, PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 발현하는 염기 서열을 포함하는 재조합 플

라스미드 백터를 제조한 다음, 재조합 플라스미드 백터를 숙주 세포에 형질주입하고, 숙주 세포로부터 발현된 PECAM1의 세포 외 기질 도메인을 포함하는 단백질을 정제함으로써 획득될 수 있다. 예를 들어, 도 1c를 참조하면, 쿠마시 블루 염색법 (coomassie blue staining) 에 의해 염색된, 획득된 PECAM1 (CD31) 의 세포 외 기질 도메인 (ECD, extracellurlar metrix domain) 의 단백질에 대한 발현 수준이 도시된다. 이와 같이, 정제된 PECAM1의 세포 외 기질 도메인의 단백질은 항체 생산 개체에 주입되는 항원으로서 이용될 수 있다.

[0068] 다음으로, 양성 클론을 결정하는 단계 (S120)에서는, 면역 반응에 따라 항체 생산 개체 내에서 항체가 형성된, 양성 클론을 획득할 수 있다. 예를 들어, 도 1d를 참조하면, ELISA 분석을 통해 마우스로부터 분리한 혈청에 인간 PECAM1의 항원 (hCD31-Fc) 및 인간 면역글로불린 G의 항원 (hIgG-Fc) 중, PECAM1의 항원에 대하여 특이도를 갖고 PECAM1의 항원과 높은 결합 친화도 (binding affinity) 로 반응함에 따라 양성 클론으로 결정된 51 개의 클론이 도시된다. 이때, 51 개의 양성 클론은 인간 PECAM1의 항원과 높은 특이도 및 반응성을 보임에 따라, PECAM1의 세포 외 기질 도메인 단백질 항원에 대항하는 항체가 형성된 클론일 수 있다.

[0069] 한편, 항원-항체에 대하여 수치상으로 나타나는 높은 수준의 결합 친화도는, 실질적으로 세포 수준에서 혈관 내피세포의 표면에 존재하는 PECAM1의 세포 외 기질 도메인과의 결합 친화도가 높은 것을 의미하는 것이 아닐 수 있다. 이에, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 양성 클론을 결정하는 단계 (S120)에서는 면역형광염색법을 통해, 실제 세포 내에서 PECAM1의 세포 외 기질 도메인과의 결합 친화도가 높은 항체를 포함하는 양성 클론을 더 결정할 수 있다. 예를 들어, 도 1e를 참조하면, ELISA를 통해 양성 클론으로 결정된 51 개의 클론 중 실제 혈관 내피세포에서 PECAM1의 발현 위치를 정확하게 탐색할 수 있는 클론을 선정하기 위해, 인간 혈관 내피세포인 HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) 에서 면역형광염색법을 수행한 결과가 도시된다. 이때, 51 개의 양성 클론 중, 3F10, 4F1, 4H2, 6A3, 6A5, 6B2, 6C6, 8E5, 8E9 및 8H10은 다른 클론들보다 강하게 형광 빛을 발하는 것으로 나타난다. 즉, 3F10, 4F1, 4H2, 6A3, 6A5, 6B2, 6C6, 8E5, 8E9 및 8H10의 클론들은, 실제 인간 혈관 내피세포에서 내에서 PECAM1의 세포 외 기질 도메인과의 결합 친화도가 높은 것으로 나타남에 따라 최종적으로 반응성 높은 양성 클론으로 결정될 수 있다.

[0070] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 양성 클론을 결정하는 단계 (S120) 는, 항체 생산 개체로부터 복수의 B 세포를 분리하고, 융합 세포를 생성하도록 복수의 B 세포를 골수종 세포와 각각 융합하고, 클론을 형성하도록 복수의 융합 세포를 각각 배양하고, 형성된 클론으로부터 PECAM1의 항원과 반응하는 양성 클론을 결정하도록 구성될 수 있다.

[0071] 마지막으로 PECAM1에 대한 항체를 분리하는 단계 (S130)에서는, 양성 클론을 대량 배양하여 클론으로부터 PECAM1에 대한 항체, 보다 구체적으로 인간화 PECAM1 단일 클론 항체를 정제하여, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 획득할 수 있다.

[0072] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, PECAM1에 대한 항체를 분리하는 단계 (S130) 는, 양성 클론을 결정하는 단계 (S120) 에서 획득한 양성 클론을 평형화된 컬럼에 통과시켜 부수적인 단백질들을 제거하고, PECAM1 항원이 부착된 컬럼에 단백질 제거된 양성 클론을 통과시켜, 본 발명의 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체로 이용될 수 있는 PECAM1 항원 특이적인 항체를 정제하도록 구성될 수 있다.

[0073] 이상의 방법으로 획득된 PECAM1 항원 특이적인 항체는, 특히 허혈성 조직에 대하여 직접적으로 이용되거나, 이에 따른 질환의 치료에 이용될 수 있는 세포 치료제에 이용되는 혈관 내피세포의 순수 분리를 위해 이용될 수 있다.

[0074] 이하에서는 도 2를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 이용한, 혈관 내피세포의 순수 분리 방법에 대해서 구체적으로 설명한다. 도 2는 본 발명의 다른 실시예에 따른, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 이용한 혈관 내피세포의 순수 분리 방법의 절차를 도시한 것이다.

[0075] 도 2를 참조하면, 본 발명의 다른 실시예에 따른 혈관 내피세포의 순수 분리 방법은, 혈관 내피세포를 포함하는 세포 클러스터를 획득하도록, 줄기세포로부터 내피세포를 분화시키는 단계 (S210), 세포 클러스터에 혈관 내피세포의 순수 분리를 위한 항체를 처리하는 단계 (S220) 및 면역형광염색법에 따른 형광의 수준을 기초로 혈관 내피세포를 분류하는 단계 (S230) 를 포함한다.

[0076] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 내피세포를 분화시키는 단계 (S210)에서는, 줄기세포로 인간 만능 줄기세포 또는 인간 유도 만능 줄기세포가 이용될 수 있다. 나아가, 노치 신호 전달 리간드인 DLL4를 처리한 배지에서 줄기세포를 배양함으로써 내피세포의 분화가 개시될 수 있다.

[0077] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 내피세포를 분화시키는 단계 (S210) 에서 획득된 세포 클러스터는, 줄기세

포로부터 분화된 내피세포와 함께, 배반포의 내세포 집단 초기 단계 배아, 제대 세포, 제대혈, 인간 유도 만능 줄기세포, 뼈 골수, 나아가, 미분화된 줄기세포, 중배엽 계통의 줄기세포를 포함할 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0078] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 혈관 내피세포의 순수 분리를 위해 이용되는 본원 발명의 항체는, 자성 입자를 더 포함할 수 있다. 이에, 분류하는 단계 (S230) 는, 금속성 입자가 내부에 위치해 있고, 외부에 자력이 인가되도록 구성된 컬럼에, 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체가 처리된 세포 클러스터를 투과시키고, 컬럼 내부에 위치한 금속성 입자와 결합한 세포를 혈관 내피세포로 분류하도록 더 구성될 수 있다.

[0079] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 분류하는 단계 (S230) 는 컬럼 외부에서 자력이 인가되는 것을 차단함으로써 혈관 내피세포를 분류하도록 더 구성될 수 있다.

[0080] 이상의 방법으로 높은 순도로 분리된 혈관 내피세포는 허혈성 조직에 대하여 직접적으로 이용되거나, 2차적으로 유도되는 질환, 예를 들어 허혈성 심장 질환, 동맥경화증, 심근경색증 및 협심증과 같은 심혈관계 질환의 치료를 위한 세포 치료제로서 이용될 수 있다.

[0081] 실시예 1: 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 이용한 혈관 내피세포의 탐지

[0082] 이하에서는, 도 3a 및 3b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 평가 결과에 대하여 설명한다. 이때, 혈관 내피세포로 인간 혈관 내피세포인 HUVEC 세포가 이용되었으나, 본 발명의 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체에 대한 효과는 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 마우스 혈관 내피세포에 대해서도 동일한 효과를 가질 수 있다.

[0083] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에서, PECAM1과 반응하는 복수의 양성 클론으로 결정된 클론들 각각에 대하여 측정된 면역형광염색 분석의 결과이다. 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에 의해 획득된 항체에 대한 면역형광염색 방법을 이용한 평가 결과이다.

[0084] 도 3a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 생산 방법에 따라 양성 클론으로 최종 결정된 10 개의 클론인 3F10, 4F1, 4H2, 6A3, 6A5, 6B2, 6C6, 8E5, 8E9 및 8H10으로부터 정제된 항체들에 대한 혈관 내피세포 탐지 결과가 나타난다. 보다 구체적으로, 3F10, 4H2, 6A3, 6C6, 8E9 및 8H10의 항체가 혈관 내피세포의 표면에 존재하는 PECAM1의 세포 외 기질 도메인에 대하여 특이성을 가지고, 강한 신호로 탐지하는 것으로 나타난다. 특히, 8H10의 항체는 다른 항체들보다 강한 신호로 PECAM1를 탐지하는 것으로 나타난다.

[0085] 도 3b를 참조하면, 혈관 내피세포와의 반응성이 좋은 8H10 클론을 이용하여 마우스로부터 항체를 생산하고 정제 공정에서 의해 획득한 8H10의 항체에 대한, 혈관 내피세포 탐지 결과가 나타난다. 이때, 획득된 8H10의 항체의 농도는 3.86 mg/ml이고, 8H10의 항체를 1000:1로 희석하여 HUVEC 세포에 대한 면역형광염색법을 수행하였다. 보다 구체적으로, 8H10의 항체와 세포 표면에 존재하는 PECAM1 단백질의 반응에 의해 탐지된 내피세포는, DAPI (4',6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) 에 의해 염색된 혈관 내피세포와 전반적으로 일치하는 것으로 나타난다. 즉, 8H10의 항체는 혈관 내피세포를 효과적으로 탐지할 수 있어, 혈관 내피세포의 순수 분리를 위해 이용될 수 있다.

[0086] 특히, 8H10의 항체는, 1000:1의 희석에 따른 약 0.00386 mg/ml 농도에서도 혈관 내피세포에 대한 특이성을 갖고, 혈관 내피세포에 대하여 높은 결합도를 갖는 것으로 나타난다.

[0087] 이상에 실시예 1의 결과로, 본 발명의 다양한 실시예에서 이용되는, 혈관 내피세포의 순수 분리를 위한 항체는, 3F10, 4F1, 4H2, 6A3, 6A5, 6B2, 6C6, 8E5, 8E9 및 8H10의 항체, 바람직하게 3F10, 4H2, 6A3, 6C6, 8E9 및 8H10의 항체, 보다 바람직하게 8H10의 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

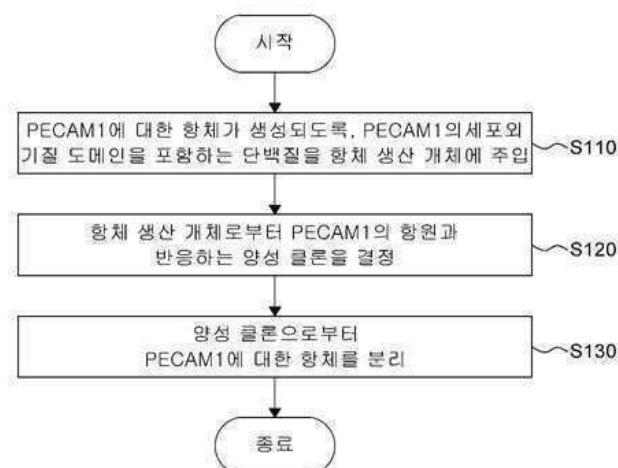
[0088] 실시예 2: 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 세포 특이성 평가

[0089] 이하에서는, 도 4a 및 4b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체에 대한 세포 특이성의 평가 결과를 설명한다. 이때, 실험군으로 혈관 내피세포로서 인간 혈관 내피세포인 HUVEC 세포가 이용되었고, 음성 대조군으로 섬유아세포 (fibroblast) 가 이용되었다. 이때, 본 발명의 항체는 실시예 1에서 전술한 항체 중, 3.86 mg/ml 농도의 8H10에 대하여 100:1, 200:1, 500:1 및 1000:1의 비율로 희석된 후, 섬유아세포 및 인간 혈관 내피세포 각각에 처리되었다.

- [0090] 도 4a 및 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체의 제조 방법에 의해 획득된 항체에 대한 면역형광염색 방법을 이용한 세포 특이성에 대한 평가 결과이다.
- [0091] 먼저, 도 4a의 (a), (b), (c) 및 (d)를 참조하면, 음성 대조군의 섬유아세포에 대하여, 100:1, 200:1, 500:1 및 1000:1의 비율로 희석된 본 발명의 항체가 처리된 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 파란 빛을 발하는 섬유아세포는 관찰되지만, 본 발명의 항체와의 특이적 결합이 일어나지 않았음에 따라 녹색 빛의 항체는 관찰되지 않는다.
- [0092] 한편, 도 4b의 (a), (b), (c) 및 (d)를 참조하면, 파란 빛을 발하는 인간 혈관 내피세포와 함께, 내피세포의 표면에서 녹색 빛을 발하는 항체가 함께 나타난다. 이때, 본 발명의 항체는 인간 혈관 내피세포 표면의 PECAM1과 특이적으로 결합하여, 인간 혈관 내피세포를 탐지할 수 있다. 특히, 도 4d의 (d)를 참조하면, 1000:1의 희석에도 본 발명의 항체는, 혈관 내피세포의 탐지 수준이 높은 것으로 나타난다. 이에, 본 발명의 항체는, 저 농도의 이용에도 혈관 내피세포에 대한 특이성이 높음에 따라, 저농도에서도 혈관 내피세포를 효율적으로 탐지할 수 있다. 나아가, 본 발명의 항체는, 순도 높은 내피세포를 획득하기에 용이할 수 있다.
- [0093] 특히, 8H10의 항체는, 1000:1의 희석에 따른 약 0.00386 mg/ml 농도에서도 혈관 내피세포에 대한 특이성을 갖고, 혈관 내피세포에 대하여 높은 결합도를 갖는 것으로 나타난다.
- [0094] 이상에 실시예 2의 결과로, 본 발명의 다양한 실시예에서 이용되는, 혈관 내피세포의 순수 분리를 위한 항체는, 혈관 내피세포 특이적으로 결합함에 따라, 높은 순도의 내피세포를 분리하는 것에 이용될 수 있다.
- [0095] 이에, 본 발명의 혈관 내피세포 순수 분리를 위한 항체를 이용하여 분리한 혈관 내피세포는 순도가 높음에 따라 심혈관계 질환에 대한 예방 또는 치료에 효과적인 세포 치료제로서 안정적으로 임상에 적용될 수 있다.
- [0096] 보다 구체적으로, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 항체는, 허혈성 조직에 직접 적용 가능한 혈관 내피세포를 고순도로 분리할 수 있어, 허혈성 심혈관 질환, 뇌혈관 질환, 당뇨 합병증, 창상 치료 등의 혈관 생성이 필요한 질환에 대한 세포 치료제 조성물을 제공할 수 있다.
- [0097] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예를 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시 예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

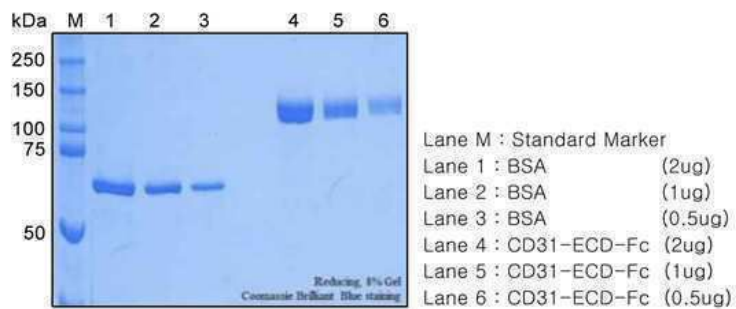
도면1a



도면1b

10	20	30	40	50
MQPRWAQGAT	MWLGVLTL	LCSSLEGQEN	SFTINSVMK	SLPDWTVQNG
60	70	80	90	100
KNLTLQCFAD	VSTTSHVKPQ	HQMLFYKDDV	LFYNISSMKS	TESYFIPEVR
110	120	130	140	150
IYDSGTYKCT	VIVNNKEKTT	AEYQLLVEGV	PSPRVTLDDK	EAIQGGIVRV
160	170	180	190	200
NCSVPEEKAP	IHFTIEKLEL	NEKMKVKKRE	KNSRDQNFVI	LEFPVEEQDR
210	220	230	240	250
VLSFRCQARI	ISGIHMQTSE	STKSELVTVT	ESFSTPKFHI	SPTGMIMEGA
260	270	280	290	300
QLHIKCTIQV	THLAQEFPEI	IIQKDKAIVA	HNRHGNKAVY	SVMAMVEHSG
310	320	330	340	350
NYTCKVESSR	ISKVSSIVVN	ITELFSKPEL	ESSFTHLDQG	ERLNLSCSIP
360	370	380	390	400
GAPPANFTIQ	KEDTIVSQTQ	DFTKIASKSD	SGTYICTAGI	DKVVKKSNTV
410	420	430	440	450
QIVVCEMLSQ	PRISYDAQFE	VIKGTIEVR	CESISGTLPI	SYQLLKTSKV
460	470	480	490	500
LENSTKNSND	PAVFKDNPTE	DVEYQCVADN	CHSHAKMLSE	VLRVKVIAPV
510	520	530	540	550
DEVQISILSS	KVVESGEDIV	LQCAVNEGSG	PITYKFYREK	EGKPFYQMTS
560	570	580	590	600
NATQAFWTKQ	KASKEQEGEY	YCTAFNRANH	ASSVPRSKIL	TVRVILAPWK
610	620	630	640	650
KGLIAVVIIG	VIIALLIIAA	KCYFLRKAKA	KQMPVEMSRP	AVPLLNSNNE
660	670	680	690	700
KMSDPNMEAN	SHYGHNDVDR	NHAMKPINDN	KEPLNSDVQY	TEVQVSSAES
710	720	730		
HKDLGKKDTE	TVYSEVRKAV	PDAVESRYSR	TEGSLDGT	

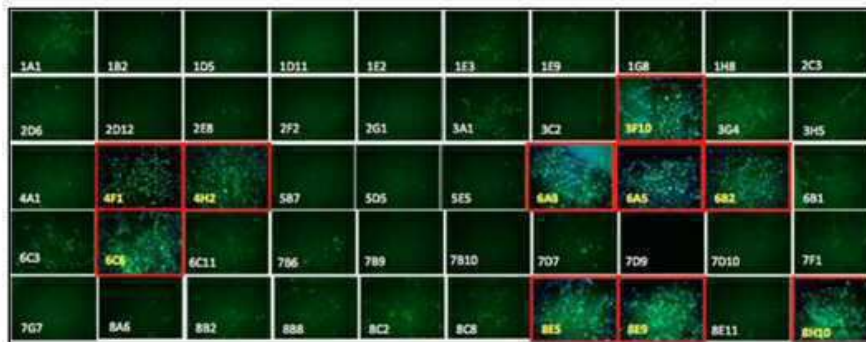
도면1c



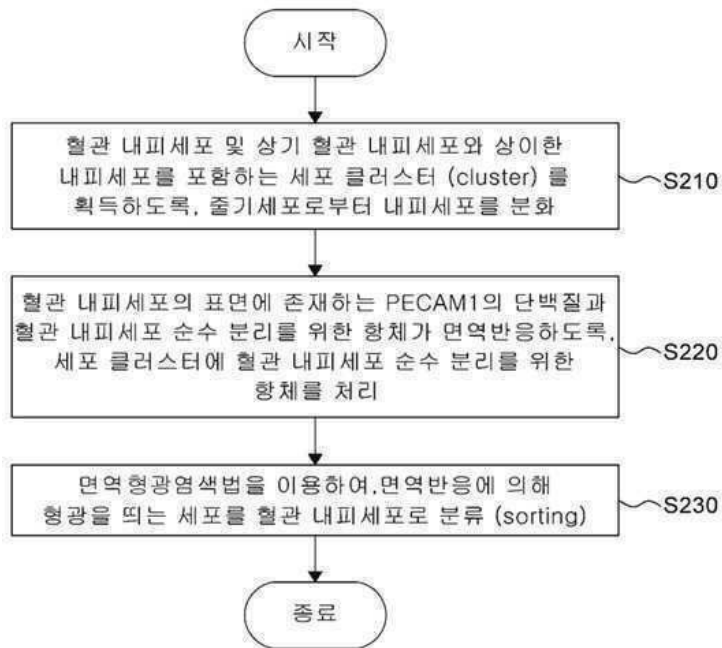
도면1d

Clone No.	OD		Clone No.	OD		Clone No.	OD		Clone No.	OD	
	hCD31-Fc	hlgG-Fc		hCD31-Fc	hlgG-Fc		hCD31-Fc	hlgG-Fc		hCD31-Fc	hlgG-Fc
1A1	2.503	0.144	3B3	0.924	0.773	5A10	1.188	1.712	7D7	2.475	0.141
1A6	1.492	0.814	3B7	1.284	1.243	5A11	1.988	0.938	7D8	2.011	0.088
1A7	2.042	2.154	3C2	2.821	0.355	5B7	2.962	0.257	7D10	2.559	0.096
1A8	2.156	1.141	3C3	0.773	0.844	5D1	1.144	0.880	7E3	2.348	2.095
1B2	2.437	0.214	3C7	0.261	0.563	5D5	2.303	0.127	7E12	2.484	2.337
1C6	2.360	2.145	3C9	1.258	0.754	5E5	2.667	0.134	7F1	2.356	0.073
1C8	2.074	0.894	3C5	0.468	0.673	5E11	2.759	2.778	7F5	2.067	2.422
1D3	2.613	2.470	3D7	2.755	0.768	5F12	2.907	2.865	7F7	2.686	2.137
1D5	2.575	0.202	3D8	2.395	1.158	5H2	2.281	2.279	7F11	2.343	2.242
1D11	2.226	0.288	3E4	2.753	2.157	5H4	2.357	2.121	7G2	2.319	2.456
1E2	2.402	0.208	3E8	0.183	0.193	6A3	2.715	0.134	7G7	2.559	0.117
1E3	2.748	0.286	3F5	2.362	2.844	6A5	2.536	0.091	7G11	2.160	2.129
1E7	1.910	1.184	3F7	2.907	2.855	6B2	2.622	0.094	7H3	2.198	2.194
1E9	2.642	0.180	3F10	2.572	0.310	6B10	2.518	0.184	7H6	2.087	2.422
1G8	2.671	0.269	3G2	2.684	2.127	6B11	2.205	2.311	8A3	2.031	1.122
1H8	2.518	0.161	3G4	2.914	0.234	6C3	2.570	0.168	8A6	2.574	0.110
2A1	2.118	2.557	3G8	1.052	2.720	6C6	5.679	0.172	8B2	2.758	0.153
2A3	2.079	2.235	3H5	2.601	0.119	6C9	2.797	2.199	8B3	2.237	2.456
2A9	2.115	2.235	3H10	2.820	2.684	6C10	2.024	2.183	8B8	2.683	0.095
2A11	2.121	2.305	3H11	1.756	2.788	6C11	2.625	0.227	8C2	2.534	0.270
2B11	0.880	0.905	4A9	0.768	0.794	6D3	0.049	0.052	8C8	2.539	0.125
2C3	2.991	0.135	4A11	0.924	0.773	6E5	2.340	2.321	8D10	2.847	2.739
2C5	1.001	1.622	4A12	2.764	0.173	6E8	2.236	2.487	8D12	2.313	2.205
2C8	2.228	2.233	4C3	2.696	2.722	6F5	2.237	2.453	8E3	2.276	2.383
2C11	2.554	1.164	4C7	1.622	2.579	6F9	2.121	2.381	8E5	2.875	0.133
2D6	2.723	0.213	4C9	2.820	2.684	6G5	2.444	2.011	8E9	2.677	0.210
2D8	1.645	1.956	4C11	2.417	2.711	6G7	2.014	2.292	8E11	2.511	0.128
2D12	2.848	0.208	4D3	1.988	0.938	6G8	2.327	2.285	8E12	2.541	0.117
2E5	0.833	0.711	4D6	1.284	1.243	6G10	2.379	2.135	8F1	2.605	2.132
2E8	2.814	0.070	4E7	0.924	0.773	6H2	2.215	2.268	8G4	2.060	2.221
2E9	1.258	0.754	4E1	2.803	0.115	7B2	2.279	2.178	8G5	2.237	2.453
2E2	0.860	0.104	4F9	2.695	2.752	7B5	2.421	0.120	8G6	2.479	2.074
2F9	0.948	2.215	4G3	2.710	1.259	7B9	2.592	0.148	8H1	2.205	2.311
2G1	2.557	0.093	4G11	2.609	2.590	7B10	2.733	0.206	8H8	2.373	2.273
2G4	0.953	1.284	4H2	3.059	0.228	7B11	2.744	1.888	8H10	2.605	0.132
2H3	0.754	0.939	4H9	2.820	2.684	7C3	2.080	2.106	PBS	0.005	0.061
2A4	1.958	2.758	4H10	2.362	2.544	7C4	2.237	2.453	Serum	1.745	1.876
3A1	2.350	0.109	5A3	2.379	2.097	7C5	2.340	2.321			
3A12	0.878	0.813	5A9	2.907	2.865	7D2	2.215	2.268			

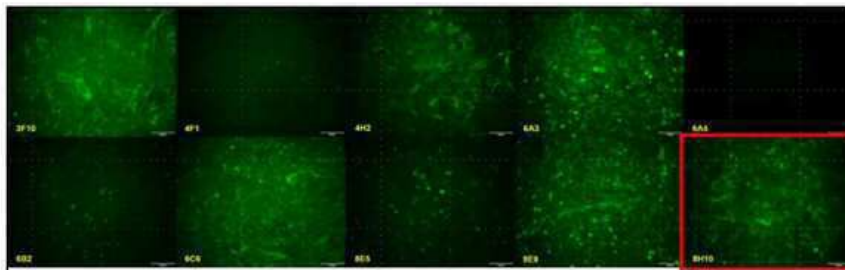
도면1e



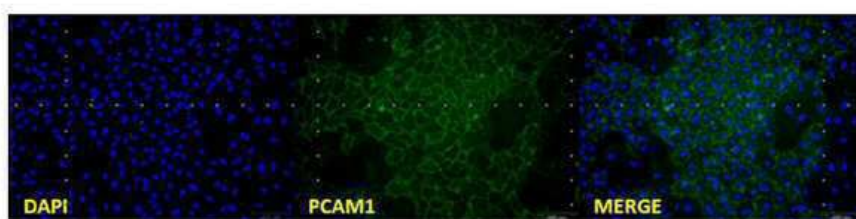
도면2



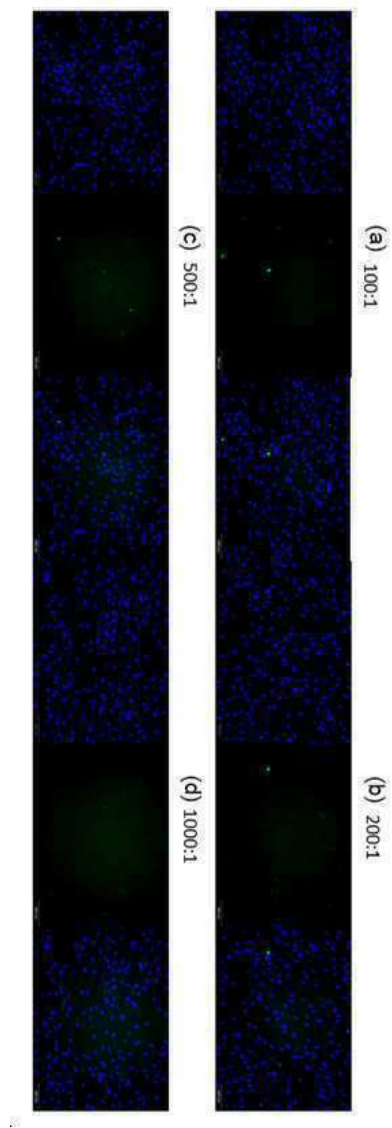
도면3a



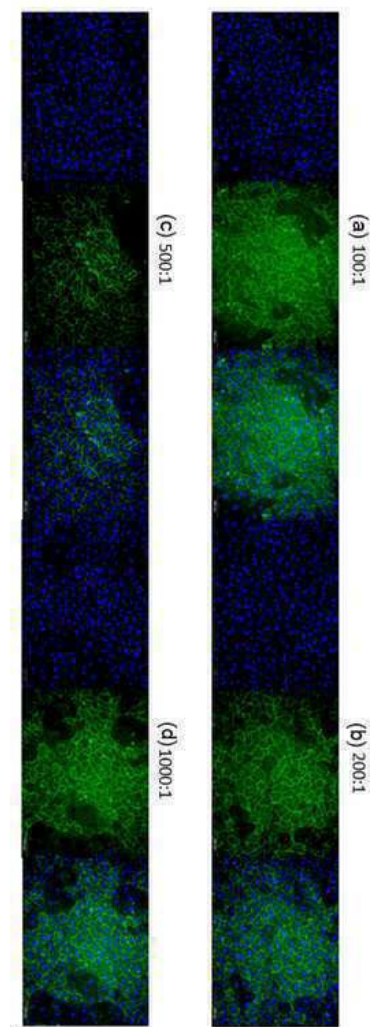
도면3b



도면4a



도면4b



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> ANTIBODY FOR PURIFYING VASCULAR ENDOTHELIAL CELL AND METHOD FOR MAKING THEREOF
- <130> 19PD5340KR
- <150> KR 10-2018-0096650
- <151> 2018-08-20
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 574
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Artificial

<400> 1

Gln Glu Asn Ser Phe Thr Ile Asn Ser Val Asp Met Lys Ser Leu Pro

1 5 10 15

Asp Trp Thr Val Gln Asn Gly Lys Asn Leu Thr Leu Gln Cys Phe Ala

20 25 30

Asp Val Ser Thr Thr Ser His Val Lys Pro Gln His Gln Met Leu Phe

35 40 45

Tyr Lys Asp Asp Val Leu Phe Tyr Asn Ile Ser Ser Met Lys Ser Thr

50 55 60

Glu Ser Tyr Phe Ile Pro Glu Val Arg Ile Tyr Asp Ser Gly Thr Tyr

65 70 75 80

Lys Cys Thr Val Ile Val Asn Asn Lys Glu Lys Thr Thr Ala Glu Tyr

85 90 95

Gln Leu Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Pro Arg Val Thr Leu Asp Lys

100 105 110

Lys Glu Ala Ile Gln Gly Gly Ile Val Arg Val Asn Cys Ser Val Pro

115 120 125

Glu Glu Lys Ala Pro Ile His Phe Thr Ile Glu Lys Leu Glu Leu Asn

130 135 140

Glu Lys Met Val Lys Leu Lys Arg Glu Lys Asn Ser Arg Asp Gln Asn

145 150 155 160

Phe Val Ile Leu Glu Phe Pro Val Glu Glu Gln Asp Arg Val Leu Ser

165 170 175

Phe Arg Cys Gln Ala Arg Ile Ile Ser Gly Ile His Met Gln Thr Ser

180 185 190

Glu Ser Thr Lys Ser Glu Leu Val Thr Val Thr Glu Ser Phe Ser Thr

195 200 205

Pro Lys Phe His Ile Ser Pro Thr Gly Met Ile Met Glu Gly Ala Gln

210 215 220

Leu His Ile Lys Cys Thr Ile Gln Val Thr His Leu Ala Gln Glu Phe

225 230 235 240

Pro Glu Ile Ile Ile Gln Lys Asp Lys Ala Ile Val Ala His Asn Arg
245 250 255

His Gly Asn Lys Ala Val Tyr Ser Val Met Ala Met Val Glu His Ser
260 265 270

Gly Asn Tyr Thr Cys Lys Val Glu Ser Ser Arg Ile Ser Lys Val Ser
275 280 285

Ser Ile Val Val Asn Ile Thr Glu Leu Phe Ser Lys Pro Glu Leu Glu
290 295 300

Ser Ser Phe Thr His Leu Asp Gln Gly Glu Arg Leu Asn Leu Ser Cys
305 310 315 320

Ser Ile Pro Gly Ala Pro Pro Ala Asn Phe Thr Ile Gln Lys Glu Asp
325 330 335

Thr Ile Val Ser Gln Thr Gln Asp Phe Thr Lys Ile Ala Ser Lys Ser
340 345 350

Asp Ser Gly Thr Tyr Ile Cys Thr Ala Gly Ile Asp Lys Val Val Lys
355 360 365

Lys Ser Asn Thr Val Gln Ile Val Val Cys Glu Met Leu Ser Gln Pro
370 375 380

Arg Ile Ser Tyr Asp Ala Gln Phe Glu Val Ile Lys Gly Gln Thr Ile
385 390 395 400

Glu Val Arg Cys Glu Ser Ile Ser Gly Thr Leu Pro Ile Ser Tyr Gln
405 410 415

Leu Leu Lys Thr Ser Lys Val Leu Glu Asn Ser Thr Lys Asn Ser Asn
420 425 430

Asp Pro Ala Val Phe Lys Asp Asn Pro Thr Glu Asp Val Glu Tyr Gln
435 440 445

Cys Val Ala Asp Asn Cys His Ser His Ala Lys Met Leu Ser Glu Val
450 455 460

Leu Arg Val Lys Val Ile Ala Pro Val Asp Glu Val Gln Ile Ser Ile
465 470 475 480

Leu Ser Ser Lys Val Val Glu Ser Gly Glu Asp Ile Val Leu Gln Cys
485 490 495

Ala Val Asn Glu Gly Ser Gly Pro Ile Thr Tyr Lys Phe Tyr Arg Glu
500 505 510
Lys Glu Gly Lys Pro Glu Tyr Gln Met Thr Ser Asn Ala Thr Gln Ala
515 520 525
Phe Trp Thr Lys Gln Lys Ala Ser Lys Glu Gln Glu Gly Glu Tyr Tyr
530 535 540
Cys Thr Ala Phe Asn Arg Ala Asn His Ala Ser Ser Val Pro Arg Ser
545 550 555 560
Lys Ile Leu Thr Val Arg Val Ile Leu Ala Pro Trp Lys Lys
565 570