



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년12월12일
(11) 등록번호 10-1092916
(24) 등록일자 2011년12월06일

(51) Int. Cl.
C12N 5/07 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0094759
(22) 출원일자 2007년09월18일
심사청구일자 2007년09월18일
(65) 공개번호 10-2009-0025120
(43) 공개일자 2009년03월10일
(30) 우선권주장
60969959 2007년09월05일 미국(US)
60969960 2007년09월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Stem Cells, Vol.25, pp.994-1002.*
US5965436 A
US5837539 A
US20050214873 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주) 에이프로젠
대전광역시 유성구 구성동 373-1 KAIST E-18
(72) 발명자
배소현
대전 유성구 신성동 하나아파트 105동 106호
김호연
대전 유성구 도룡동 타워코리아나 602호
(74) 대리인
윤여강

전체 청구항 수 : 총 7 항

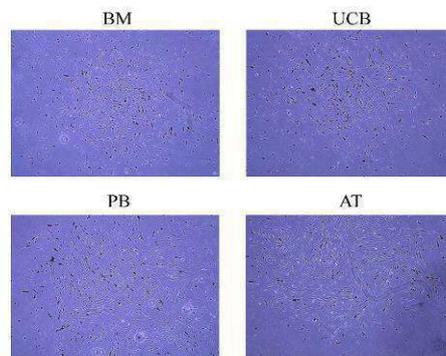
심사관 : 이효진

(54) 중간엽줄기세포 분리 동정 바이오 마커 발굴 및 이를이용한 중간엽줄기세포 분리 방법

(57) 요약

본 발명은 중간엽줄기세포(일명 중간엽기질세포) 분리 동정 바이오 마커 발굴 및 이를 이용한 중간엽줄기세포 분리 방법에 관한 것으로서 항-섬유아세포 활성화 단백질 α (fibroblast activation protein α; **FAP α**) 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 분리 또는 동정용 조성물을 제공하고, 항-FAP α 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 분리 장치 및 동정 키트를 제공한다. 또한 본 발명은 중간엽줄기세포를 동정하는 방법 및 분리 정제하는 방법을 제공한다. 상세하게는 항-FAP α 항체를 시료 세포와 접촉시키는 단계; 상기 시료 세포의 FAP α와 상기 항-FAP α 항체의 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포를 동정 방법을 제공하고, 중간엽줄기세포가 들어 있는 액체 생물학적 배지를 항-FAP α 항체와 접촉시켜 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 항원-항체 복합체를 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포를 분리 정제하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1.SC3200 2.M10641000037

부처명 1. 과학기술부 2. 과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 1. 세포응용연구사업 2. 줄기세포연구사업

연구과제명 1. 중간엽줄기세포의 자가증식 기전 규명 2. 중간엽줄기세포 특이 막단백질대응단일클론항체를 이용한 줄기세포의 신속한분리 및동정법 개발

기여율

주관기관 1. 세포응용연구사업단 2. 한국과학재단

연구기간 1. 2005년 04월 01일 ~ 2008년 03월 31일 2. 2006년 10월 01일 ~ 2009년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

분리용 비드가 연결된 항-섬유아세포 활성화 단백질 α (fibroblast activation protein α ; FAP α) 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 지방세포로부터 중간엽줄기세포 분리 또는 동정용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

분리용 리간드가 연결된 항-섬유아세포 활성화 단백질 α 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 지방세포로부터 중간엽줄기세포 분리 또는 동정용 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

루시페라아제, 퍼옥시다아제 및 베타-갈락토시다아제로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나의 효소가 연결된 항-섬유아세포 활성화 단백질 α 항체인 것을 특징으로 하는 지방세포로부터 중간엽줄기세포 분리 또는 동정용 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

항-섬유아세포 활성화 단백질 α 항체를 시료 세포와 접촉시키는 단계;

상기 시료 세포의 섬유아세포 활성화 단백질 α 와 상기 항-섬유아세포 활성화 단백질 α 항체의 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 지방세포로부터 중간엽줄기세포 분리방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 항원-항체 복합체 형성의 확인 방법은 라디오면역측정법(RIA), 효소 면역측정법(ELISA), 면역형광법, 색체입자결합법 또는 화학발광물질결합법인 것을 특징으로 하는 지방세포로부터 중간엽줄기세포 분리방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

항-섬유아세포 활성화 단백질 α 항체를 시료 세포와 접촉시키는 단계;

상기 시료 세포의 섬유아세포 활성화 단백질 α 와 상기 항-섬유아세포 활성화 단백질 α 항체의 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 지방세포로부터 중간엽줄기세포 동정방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 항원-항체 복합체 형성의 확인 방법은 라디오면역측정법(RIA), 효소 면역측정법(ELISA), 면역형광법, 색체입자결합법 또는 화학발광물질결합법인 것을 특징으로 하는 지방세포로부터 중간엽줄기세포 동정방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 골수, 말초혈액, 탯줄혈액 및 지방조직으로부터 중간엽줄기세포를 동정 및 분리하기 위한 표면 단백질 마커인 섬유아세포 활성화 단백질 α (fibroblast activation protein α ; **FAP α**) 및 이를 이용한 중간엽 줄기세포 분리 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells; **MSCs**)는 흔히 중간엽기질세포(mesenchymal stromal cells)라고 불리기도 하는데[1], 골수(bone marrow; **BM**)에 존재하지만 결합 조직의 항상성을 유지하기 위하여 이동 신호에 반응하여 순환계로 방출된다. 최근에 중간엽줄기세포는 조직 재생, 혈액 생성 보조(hematopoietic support) 및 면역 조절(immunomodulation)을 포함하는 다방면의 기능성 때문에 세포 및 면역 치료 분야에서 폭넓은 관심을 받고 있다[2-4]. 그러나 임상적으로 유용한 산물로의 신속한 개발이 결정적인 마커의 부족으로 인하여 지연되고 있다. 비록 SSEA-4[5] 및 GD2[6] 같은 당지질(glycolipid) 마커가 골수 유래 중간엽줄기세포에서 알려지긴 했지만, 중간엽줄기세포를 다른 세포 형태들로부터 특이하게 구별되는 단일 단백질 마커는 개발되지 않았다. 그러므로 인간 중간엽줄기세포를 명백하게 밝혀내기 위해서, 종래에는 다수의 표면 단백질 마커들의 분석이 필요하였다. 세포 치료를 위한 국제 협회(International Society for Cellular Therapy)는 CD14⁻ (또는 CD11b⁻) CD19⁻ (또는 CD79 a⁻) CD34⁻ CD45⁻ CD73⁺ CD90⁺ CD105⁺ HLA-DR⁺의 조합 적절한 것으로 제안하였다[7].

[0003] 본 발명자들에 의해 인간 중간엽줄기세포의 특이적 분자 신호를 밝히기 위해서 DNA 마이크로어레이 기반의 차등적 유전자 발현 프로파일링을 수행하였다[8, 9]. 상기 문헌에서는 말초혈액 유래 단핵세포와 다르게 중간엽줄기세포에서 발현이 선호되는 다수의 유전자를 보고 하였다. 그러나, 섬유아세포 활성 단백질 α가 중간엽줄기세포에서만 특이적으로 발현되어 중간엽줄기세포를 분리 동정할 수 있다는 점에 대한 보고는 없었다.

[0004] 국제특허출원 PCT/JP2004/002457호(국제출원일 2004. 2. 27)에서는 중간엽 줄기세포를 검출, 분리·식별하기 위한 마커 및 상기 마커를 사용한 중간엽계 줄기세포의 검출, 분리·식별방법을 제공한다. 또한 상기 중간엽계 줄기세포 마커 유전자 검출용 프로브 및 상기 중간엽계 줄기세포 유전자 마커의 검출시에, 피검세포의 상기 유전자를 증폭하기 위한 PCR용 프라이머를 포함하며, 중간엽계 줄기세포 마커 유전자가 발현하는 폴리펩티드로 이루어지는 중간엽계 줄기세포 검출용 폴리펩티드 마커, 상기 폴리펩티드 마커를 검출하기 위한 상기 폴리펩티드 마커에 특이적으로 결합하는 항체, 또한 중간엽계 줄기세포 마커 유전자 검출용 프로브, 폴리펩티드 마커에 특이적으로 결합하는 항체를 사용한 중간엽계 줄기세포의 식별, 분리방법이 개시되어 있다. 하지만 중간엽줄기세포를 분리 동정하기 위한 마커로서 FAP α에 대한 언급은 없다.

[0005]

[0006] 본 발명자들은 세프라제(seprase)라고도 불리는 섬유아세포 활성 단백질 α(fibroblast activation protein α; **FAP α**)이 거대 구형 엑토도메인(ectodomain)을 가진 필수 막 단백질을 코딩하고 있고[10], 정상 성체 세포 조직에서는 그 활성이 억제되는 것으로 알려져 있어[11-14], 중간엽줄기세포 특이적 마커로 좋은 특성을 가지고 있어서, 이에 대한 추가 연구를 수행한 결과, 인간 골수로부터 중간엽줄기세포를 분리 동정하기 위한 표면 단백질 마커로서 FAP α를 사용할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명은 인간 골수, 탯줄혈액, 말초혈액 및 지방조직으로부터 중간엽줄기세포를 분리 동정하기 위한 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한 본 발명은 중간엽줄기세포를 특이적으로 분리 동정할 수 있는 조성물, 장치 또는 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0009] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 항-섬유아세포 활성 단백질 α(fibroblast activation protein α; **FAP α**) 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 분리 또는 동정용 조성물을 제공한다. 상기 항체는 단일 클론 항체이거나, 폴리 클론 항체 또는 단쇄 항체 또는 재조합 항체 일 수 있다. 상기 항체와 중간엽 줄기세포 특이적인 FAP α와의 결합을 확인을 용이하게 하기 위하여 상기 항체에 리간드, 자기 비드, 효소 등을 결합시킬 수 있다. 상기 리간드는 이에 한정되는 것은 아니나, 바이오틴, 아비딘 또는 스트렙토아비딘 일 수 있고, 상기 효소는 이에 한정되는 것은 아니나, 루시페라아제, 퍼옥시다아제 또는 베타 갈락토시다아제 일 수 있다. 당업자는 항체의 확인을 위하여 적절한 리간드, 비드 및 효소를 선정하여 사용할 수 있다.

[0010] 본 발명은 항-FAP α 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 분리 장치를 제공한다. 상기

항-FAP α 항체와 FAP α 의 복합체를 분리하기 위하여 형광물질이 결합된 항체 및 세포 분리를 이용하여 분리할 수 있고, 자기 비드가 연결된 항체와 자기 장치를 이용하여 분리할 수 있으며, 특정 리간드 결합과 이를 분리하기 위한 컬럼을 이용하여 분리할 수 있다.

[0011] 본 발명은 항-FAP α 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 동정 키트를 제공한다. 상기 항-FAP α 항체와 FAP α 의 복합체를 확인하기 위하여 형광물질이 결합된 항체 및 형광분석장치를 이용하여 확인할 수 있고, 자기 비드가 연결된 항체와 자기 장치를 이용하여 확인할 수 있으며, 특정 효소와 기질 반응을 통하여 확인할 수 있다. 상기 동정 키트는 구체적으로 항-FAP α 항체를 포함하는 중간엽줄기세포 동정용 단백질 칩일 수 있다.

[0012] 본 발명은 또한 항-FAP α 항체를 시료 세포와 접촉시키는 단계; 상기 시료 세포의 FAP α 와 상기 FAP α 항체의 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포를 동정 방법을 제공한다. 상기 항원-항체 복합체 형성을 확인 방법은 라디오면역측정법(RIA), 효소 면역측정법(ELISA), 면역형광법, 색침입자결합법, 또는 화학발광물질결합법으로 중간엽줄기세포를 이용할 수 있다.

[0013] 본 발명은 또한 중간엽줄기세포가 들어 있는 액체 생물학적 배지를 항-FAP α 항체와 접촉시켜 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 항원-항체 복합체를 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포를 분리 정제하는 방법을 제공한다. 상기 항원-항체 복합체 회수하는 단계는 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나의 리간드를 이용하여 회수할 수도 있고, 자기 비드와 자기 장치를 이용하여 회수할 수도 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 제 1의 태양은 항-FAP α 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 분리 또는 동정용 조성물에 관한 것이다.

[0015] 본 발명에서 말하는 "섬유아세포 활성화 단백질 α (fibroblast activation protein α ; FAP α)"은 세린 프로티아제 패밀리에 속하는 동형이량체의 세포막 내재성 젤라틴나아제이다. 이 단백질은 발달, 조직 수선 및 상피세포의 암화 동안에 상피-간엽세포 상호작용 또는 섬유아세포의 성장에 관여하는 것으로 생각된다. 이들 유전자에 대한 서열은 NCBI 접근 번호 NM_004460으로, 이 단백질에 대한 서열은 NCBI 접근번호 NP_004451 및 AAH26250 등으로 알려져 있다.

[0016] 본 발명에서 말하는 "항체"는 통상적으로 생체 내에 존재하는 형태의 항체 이외에, 항체의 H쇄 또는 L쇄의 가변 영역 또는 그의 조합으로 형성되는 항원 결합 부위를 적어도 1개 갖는 분자를 포함한다. 예를 들면, H쇄의 가변 영역만 포함하는 펩티드, 1조의 H쇄 단편과 L쇄 단편으로 이루어진 Fab, 2조의 H쇄 단편과 L쇄 단편으로 이루어진 (Fab')₂, H쇄 단편과 L쇄 단편이 동일 펩티드 상에 직렬로 결합된 단쇄 항체 "ScFv" 등도 포함된다.

[0017] 상기 항체는 단일 클론 항체이거나, 폴리 클론 항체 또는 단쇄 항체 또는 재조합 항체 일 수 있다. 상기 항체와 중간엽줄기세포 특이적인 FAP α 와의 결합의 확인을 용이하게 하기 위하여 상기 항체에 리간드, 자기 비드, 효소 등을 결합시킬 수 있다. 상기 리간드는 이에 한정되는 것은 아니나, 바이오틴, 아비딘 또는 스트렙토아비딘 일 수 있고, 상기 효소는 이에 한정되는 것은 아니나, 루시페라아제, 피옥시다아제 또는 베타 갈락토시다아제 일 수 있다. 당업자는 항체의 확인을 위하여 적절한 리간드, 비드 및 효소를 선정하여 사용할 수 있다.

[0018] 본 발명의 제 2의 태양은 항-FAP α 항체를 이용한 중간엽줄기세포 분리 장치 및 동정키트에 관한 것이다.

[0019] 본 발명의 항-FAP α 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 분리 장치로는 상기 항-FAP α 항체와 FAP α 의 복합체를 분리하기 위하여 형광물질이 결합된 항체 및 세포 분리를 이용하여 분리할 수 있고, 자기 비드가 연결된 항체와 자기 장치를 이용하여 분리할 수 있으며, 특정 리간드 결합과 이를 분리하기 위한 컬럼을 이용하여 분리할 수 있다.

- [0020] 본 발명의 항-FAP α 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포 동정 키트로는 상기 항-FAP α 항체와 FAP α 의 복합체를 확인하기 위하여 형광물질이 결합된 항체 및 형광분석장치를 이용하여 확인할 수 있고, 자기 비드가 연결된 항체와 자기 장치를 이용하여 확인할 수 있으며, 특정 효소와 기질 반응을 통하여 확인할 수 있다. 상기 동정 키트는 구체적으로 항-FAP α 항체를 포함하는 중간엽줄기세포 동정용 단백질 칩일 수 있다.
- [0021] 본 발명에 사용되는 용기 형상으로는 수불용성 담체를 충전한 칼럼, 수불용성 담체를 충전한 플라스크형 또는 플라스크형 케이스가 예시된다. 이러한 용기 형상과 항체를 직접 또는 간접적으로 고정화시킨 불용성 담체를 조합함으로써 FAP α 양성 세포 분리 장치를 제작할 수 있다. 또한, 이들 장치는 세포 현탁액, 생리식염수 등을 흘러보내는 펌프와 조합함으로써 세포 분리 시스템으로서 이용성을 높일 수 있다.
- [0022] 항체를 수불용성 담체에 고정화시킬 때, 항체와 수불용성 담체 사이에 스페이서를 개재하여 결합시키는 것도 유용하다. 또한, 필요에 따라 수불용성 담체와 화합물을 임의의 길이의 분자 (스페이서)를 통해 서로 결합시킬 수도 있다. 스페이서에 관한 상세한 내용은 예를 들면, 문헌["Affinity Chromatography" K. Kasai 등, Tokyo Kagaku Dojin Publishing (1991) p.105-108]를 참조할 수 있다. 스페이서의 예로서는 폴리메틸렌 사슬과 폴리에틸렌글리콜 사슬 등을 들 수 있다. 스페이서의 길이는 500Å 이하인 것이 바람직하고, 200Å 이하인 것이 더 바람직하다. 화합물을 스페이서를 통해 수불용성 담체에 결합시키는 방법으로는 예를 들면 수불용성 담체로서 아가로스를 사용하는 경우, 아가로스의 히드록실기와 스페이서로서 사용하는 헥사메틸렌 디이소시아네이트의 한 쪽 이소시아네이트기를 반응시켜 결합시키고, 남은 이소시아네이트기와 항체의 아미노기, 히드록실기 또는 카르복실기 등을 반응시켜 결합시키는 방법 등을 들 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 말하는 수불용성 담체는 실온의 수용액 중에서 고정 상태인 것을 말하며 어떠한 형상이어도 좋다. 형상의 예로는 구형, 입방형, 평면형, 칩형, 섬유형, 평막형, 스폰지형, 중공사형 등을 들 수 있다. 이들 중에서 세밀한 충전이 쉽고, 항체를 표면에 비교적 균질하게 유지시킬 수 있고, 실유효 면적을 비교적 많이 확보할 수 있으며 세포 현탁액의 유동성의 면에서 구형, 입자형 및 섬유형의 것이 바람직하다.
- [0024] 수불용성 담체의 재질은 표면에 항체를 유지할 수 있으면 무기 화합물이거나 유기 화합물이거나 상관없지만, 세포 현탁액과 접촉시 용출물이 적고, 형상 제어가 보다 쉽다는 점에서 유기 고분자 화합물이 바람직하다. 그 예로는 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리메타크릴레이트 에스테르, 폴리아크릴레이트 에스테르, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올 등의 비닐계 화합물 또는 그의 유도체의 중합체 및 공중합체; 나일론 6 또는 나일론 66 등의 폴리아미드계 화합물; 폴리에틸렌 테레프탈레이트 등의 폴리에스테르계 화합물; 셀룰로오스 등의 식물 유래 다당류계 화합물 등을 들 수 있다. 또한, 이들과 자석을 조합함으로써 이들 수불용성 담체를 쉽게 회수할 수도 있다.
- [0025] 수불용성 담체를 수식하고 표면에 친수성을 부여하는 것도 본 발명에서 바람직하게 이용된다. 알부민, 글로브린 등의 생체 유래 단백질을 고정화시키고, 합성 관능기를 도입함으로써 수불용성 담체 표면에 친수성을 부여할 수 있다. 친수성을 부여하는 합성 관능기의 예로는 반복 단위 2 내지 1500의 폴리에틸렌글리콜 사슬, 히드록실기, 아미드기, 에테르기 및 에스테르기를 포함한다. 단, 폴리에틸렌글리콜 사슬과 히드록실기는 서로 결합할 수 있거나 별도로 존재할 수 있다. 친수성을 부여하는 폴리에틸렌글리콜 사슬을 갖는 단량체의 예로는 메톡시디에틸렌글리콜 메타크릴레이트, 메톡시트리에틸렌글리콜 메타크릴레이트 등의 말단 메톡시메타크릴레이트; 메톡시디에틸렌글리콜 아크릴레이트, 메톡시트리에틸렌글리콜 아크릴레이트 등의 말단 메톡시아크릴레이트; 및 메틸기 대신 수소 원자가 결합된 말단 히드록실기를 갖는 메타크릴레이트 및 아크릴레이트; 또는 말단에 중합성 관능기를 1개 이상 갖는 반복 단위 2 내지 1500의 폴리에틸렌글리콜 사슬을 갖는 단량체 전반을 들 수 있다. 또한, 담체에 직접 결합시키는 경우, 반복 단위 2 내지 1500의 폴리에틸렌글리콜 유도체도 포함된다. 친수성을 부여하는 그 밖의 다른 치환기를 갖는 단량체의 예로는 비닐피롤리돈 등을 들 수 있지만 이것으로 한정되는 것은 아니다. 또한, 중합성 관능기가 1개 이상 존재할 수도 있다. 중합성 관능기는 단독 또는 2개 이상의 관능기에 의해 중합할 수 있는 관능기를 나타내며, 그 예로는 비닐기, 아세틸렌기, 디엔기 등의 탄소-탄소 다중 결합과 에폭시기, 옥세탄기 등의 환 구조 등을 들 수 있지만 이것으로 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 또한, 비이온성 관능기가 상기 관능기와 함께 존재할 수도 있으며, 그 예로는 비이온성 관능기, 특히 친수성 향상을 목적으로 한 디메틸아미드기, 디에틸아미드기, 디소프로필아미드기 등의 아미드기; 폴리에틸렌 테레프탈레이트 사슬, 폴리부틸렌 테레프탈레이트 사슬 등의 방향족 폴리에스테르 사슬 및 지방족 폴리에스테르 사슬 등의 폴리에스테르 사슬; 메틸렌글리콜 사슬 및 프로필렌글리콜 사슬과 같은 폴리에테르 사슬; 폴리카르보네이트 사슬 등의 비이온성 친수성 관능기, 또는 소수성 부여를 목적으로 한 알킬 사슬, 불화알킬 사슬, 알릴 사슬 등의 비이온성 관능기 전반을 포함한다. 이상의 임의의 관능기가 공존할 수도 있지만, 바람직하게는 비이온성 친

수성 관능기를 갖는 경우가 우수한 결과를 제공한다.

- [0027] 수불용성 담체를 수식하고 그 표면에 친수성을 부여하는 방법으로는 공유 결합, 이온 결합, 방사선 또는 플라즈마에 의한 그래프트법; 물리 흡착; 임베딩 (embedding); 또는 기재 표면으로의 침전물의 불용화 등 모든 공지된 방법을 사용할 수 있다. 따라서, 방사선 또는 플라즈마 등을 사용하여 고분자 화합물 또는 그 단량체를 그래프트 중합시키거나 또는 공유 결합을 형성하는 등의 공지된 방법에 의해 표면 개질 (일본 특허 공개(평)1-249063호 공보, 일본 특허 공개(평)3-502094호 공보)을 수행하는 방법이 본 발명에 바람직하게 이용된다.
- [0028] 수불용성 담체의 표면에 항체를 고정화시키는 방법으로는 수불용성 담체 표면에 항체를 화학적 수단이나 방사선 또는 전자선을 이용한 그래프트법에 의해 공유 결합시키는 방법, 또는 화학적 수단에 의해 수불용성 담체의 표면 상의 관능기를 통해 공유 결합시키는 방법 등이 있다. 이 중에서 관능기를 통한 공유 결합 방법이 사용시 항체 용출의 위험이 없어 바람직하다. 수불용성 담체가 피복층을 갖는 경우, 항체를 피복층 표면 상에 불용화시킬 수도 있다.
- [0029] 수불용성 담체 또는 그의 피복층의 표면에 항체 고정화를 위한 활성기를 얻는 방법의 일례로서 할로겐화 시안법, 에피클로로히드린법, 비스에폭시드법, 브로모아세틸브로마이드법, 할로겐화 아세트아미드법 등이 있다. 구체적으로는 아미노기, 카르복실기, 히드록실기, 티올기, 산무수화물, 숙시닐아미드기, 치환성 할로겐기, 알데히드기, 에폭시기, 트리실기 등을 들 수 있다. 항체 고정화의 용이성의 면에서 브로모시안법, N-히드로숙신이미드기법, 할로겐화 아세트아미드법이 특히 바람직하다.
- [0030] 활성기에 사용되는 할로아세트아미노메틸화제로서는 N-히드록시메틸클로로아세트아미드, N-히드록시메틸플루오로아세트아미드, N-히드록시메틸브로모아세트아미드, N-히드록시메틸요도아세트아미드 등을 유리하게 사용할 수 있다. 이 중에서도 경제성과 안정성의 면에서 바람직하게는 N-히드록시메틸브로모아세트아미드, N-히드록시메틸요도아세트아미드 등을 유리하게 사용할 수 있다. 수불용성 담체에 도입된 플루오로기 또는 클로로기는 활성기를 도입시킨 후, 요오드화칼륨 또는 브롬화칼륨 용액으로 처리함으로써 쉽게 요오드기 또는 브롬기로 전환시킬 수 있다. 이들 활성기를 도입시킨 수불용성 담체의 제조에 사용되는 산 촉매로는 강산 특히 프로톤산이면 어떤 것도 좋지만, 비제한적인 예로는 트리플루오로메탄, 메탄, 벤젠, 톨루엔 등의 술폰산 유도체; 및 황산, 염화아연, 염화알루미늄, 사염화주석 등의 프리델-크래프트(Friedel-Crafts) 촉매 등을 유리하게 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 제 3의 태양은 항-FAP α 항체를 이용한 중간엽줄기세포 분리 동정 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 항-FAP α 항체를 시료 세포와 접촉시키는 단계; 상기 시료 세포의 FAP α 와 상기 항-FAP α 항체의 항원-항체 복합체 형성을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포를 동정 방법을 제공한다.
- [0032] 상기 항원-항체 복합체 형성을 확인 방법은 항원항체반응을 이용한 면역학적 측정법(이뮤노어세이 (immunoassay))이 있다. 이뮤노어세이 중, 가장 일반적인 측정방법은, 효소 면역측정법(ELISA)이다. 상기 ELISA 법으로서는, 라디오이뮤노어세이(radioimmunoassay)(RIA), 형광 이뮤노어세이(FIA), 엔자임 이뮤노어세이 (enzyme immunoassay)(EIA, ELISA), 색체입자결합법 및 화학발광물질결합법 등이 알려져 있다.
- [0033] 또한 본 발명은 중간엽줄기세포가 들어 있는 액체 생물학적 배지를 항-FAP α 항체와 접촉시켜 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 항원-항체 복합체를 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽줄기세포를 분리 정제하는 방법을 제공한다. 상기 항원-항체 복합체 회수하는 단계는 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나의 리간드를 이용하여 회수할 수도 있고, 자기 비드와 자기 장치를 이용하여 회수할 수도 있다.
- [0034] 항체를 이용하여 중간엽줄기세포만을 특이적으로 분리시키는 방법으로는 형광 항체로 표식하여 세포 분리기 (cell sorter)로 분리하는 방법, 수불용성 담체 상에 중간엽줄기세포에 특이적인 FAP α 에 친화성이 있는 항-FAP α 항체를 고정화시키고 여기에 중간엽줄기세포를 직접 또는 간접적으로 결합시키는 방법, 면역 흡착 칼럼에 의한 분리방법 및 면역 자기 비드를 이용하는 분리방법 등이 있다.

- [0035] 형광 항체로 표식한 세포의 분리법은 먼저 세포 혼합액을 표적 세포 상에 발현되는 막 항원을 인식하는 형광 표식된 모노클론 항체와 함께 인큐베이트한 후 처리된 세포에 세포 분리기(cell sorter) 등으로 레이저광을 조사하여, 항체가 결합된 세포만 발광하는 것을 이용하여 형광 항체가 결합된 세포를 분리하는 방법이다.
- [0036] 수불용성 담체 상에 단일클론 항체를 고정화시키는 방법은 담체 또는 장치에 고정화시킨 모노클론 항체에 대해 상기 항원 양성 세포가 직접 또는 간접적으로 결합하여 수행되는 세포 분리 방법이다.
- [0037] 국제 특허 공개 공보 제W0 87-04628호에는 표적 세포의 막 표면에 존재하는 항원에 대한 모노클론 항체를 분리 장치의 표면에 직접 고정화시켜 이용하는 방법과, 먼저 세포 혼합액을 표적 세포 상의 막 항원에 결합하는 모노클론 항체와 함께 인큐베이트한 후, 세포 표면상의 항체에 결합하는 항-면역글로불린 항체와 같은 리간드를 고정화시킨 세포 분리 장치에서 처리하는 방법이 기재되어 있다. 이들 방법에서는 항체를 고정화시킨 플라스틱 살레 상에서 분리가 일어나며, 세포 혼합액을 최초 항체를 고정화시킨 플라스틱 살레 상에 붓고, 항체를 표적 세포 상의 막 항원과 결합시키기 위해 인큐베이트시킨다. 인큐베이트시킨 후, 플라스틱 살레를 세정하여 결합하지 않은 세포를 제거하여 분리시킨다.
- [0038] 면역흡착 칼럼법은 표적 세포 상의 막 항원에 대한 항체 등의 리간드를 비드 표면에 고정화시키고, 이것을 칼럼에 충전시켜 여기에서 세포 분리를 수행하는 것이다.
- [0039] 국제 특허 공개 공보 제W0 91-16116호에는 표적 세포 상의 막 항원에 대해 바이오틴 표식한 항체를 세포 혼합액 중에 첨가하여 인큐베이트함으로써 세포-항체-바이오틴 결합을 형성한 후, 다공질 아크릴아미드 겔에 아비딘을 고정화시킨 비드를 충전시킨 칼럼을 통해 통과시킴으로써, 바이오틴-아비딘의 강한 결합을 이용하여 표적 세포를 칼럼 내에 결합시켜 분리하는 방법이 기재되어 있다.
- [0040] 면역 자기 비드법에서는 먼저 세포 혼합액을 항체가 결합된 자기 비드와 함께 인큐베이트하여 표적 세포를 자기 비드로 표식시킨다. 표식시킨 후, 자기 장치를 이용하여 표식되지 않은 세포로부터 표식된 세포를 분리한다.
- [0041] 예를 들면, 바이오틴 또는 자기 비드를 미리 세포에 고정화시킬 항체에 결합시킨 후, 바이오틴 또는 자기 비드에 결합하기 쉬운 물질, 예를 들면 아비딘 또는 자석에 결합하거나 이를 포함하는 수불용성 담체를 반응시킴으로써 세포가 결합된 수불용성 담체를 쉽게 회수할 수 있다. 또한, 표적 조혈 미분화 세포에 섬유아세포 활성 단백질 α 항체를 반응시킨 후, 항-면역글로불린 항체가 결합된 수불용성 담체와 반응시키고 수불용성 담체를 세정하거나 회수함으로써, 표적 세포만을 선택적으로 분리할 수 있다. 수불용성 담체인 자기 비드에 고정화시킨 항체를 이용하면, 자석 등에 의해 보다 효율적으로 분리할 수도 있다. 본 발명에 사용되는 용기 형상으로는 수불용성 담체를 충전한 칼럼, 수불용성 담체를 충전한 플라스크형 또는 플라스크형 케이스가 예시된다. 이러한 용기 형상과 항체를 직접 또는 간접적으로 고정화시킨 불용성 담체를 조합함으로써 조혈 미분화 세포 분리 장치를 제작할 수 있다. 또한, 이들 장치는 세포 현탁액, 생리식염수 등을 흘려보내는 펌프와 조합함으로써 세포 분리 시스템으로서 이용성을 높일 수 있다.
- [0042] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [0043] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] <실시예 1> 골수 유래 중간엽줄기세포에 FAP α 의 선택적 발현 확인
- [0045] (1) 세포 준비
- [0046] 냉동 보존된 인간 골수 및 말초혈액 유래 단핵 세포(mononuclear cells; MNCs)는 론자 회사(lonza Inc., Allendale, NJ)로부터 구매하였다. 그리고 탯줄혈액 및 지방 조직은 지역 병원으로부터 구입하여, 탯줄혈액은 바로 200 x g에서 10 분간 원심분리를 통해 버피코트층 (buffy coat layer)의 단핵세포를, 지방조직은 콜라제네

이즈 I (Sigma, St Louis, MO)를 상온에서 약 1 시간 처리후, 200 x g에서 10 분간 원심분리를 통해 기질도관층(stromal vascular fraction)의 단핵세포를 획득하여 본 실험에 사용하였다. 모든 인간 암 세포주들은 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 얻었다.

[0047] (2) RT-PCR 분석

[0048] 인간 말초혈액(peripheral blood; PB) 분획물 MTC(multiple tissue cDNA) 패널은 클론테크사(Clontech Laboratories Inc. Mountain View, CA)로부터 얻었다. 트라이졸(Trizol) 시약을 이용하여 모든 다른 세포 시료 들에서 총 RNA를 추출하였고 cDNA로 역전사 하였다. FAP α 증폭을 위한 프라이머는 정방향으로 5'-CAA GTG GCA AGT GGGAGG-3' (서열번호 1) 및 역방향으로 5'-GGT TTT CAG ATT CTG ATA-3'(서열번호 2)이고, 증폭된 PCR 산물은 1152bp이었다. β -액틴 증폭을 위한 프라이머는 정방향으로 5'-AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC-3'(서열번호 3) 및 역방향으로 5'-CCA TCT CTT GCT CGA AGT CC-3'(서열번호 4)이고, 증폭된 PCR산물은 410bp이었다.

[0049] (3) 유세포 분석(flow cytometry)

[0050] 모든 분석은 FAP α , CD74, CD90 및 CD105(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)에 대한 마우스 단 일클론 항체와 알렉사488 접합 염소 항-마우스 IgG(Alexa488-conjugated goat anti-mouse IgG, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 베크만 코울터 에픽스 XL 유세포 분석기(Miami, FL)로 수행하였다.

[0051] (4) 결과

[0052] 여러 인간 세포들에서 FAP α 발현에 대한 분석을 시작하기 전에 본 발명자들은 인간 중간엽줄기세포들의 막 단백질체 결과를 주의깊게 살펴보았다[15]. FAP α 는 높은 염기서열 커버리지(coverage)로 발견된 엑토도메인(ectodomain) 포함 막 결합 단백질 중의 하나로 밝혀졌다(도 1). 이러한 사실로 인해 이 타입 II 막 단백질을 가장 중요한 표면 단백질 마커 후보로 선정하였다.

[0053] 우선 FAP α 가 골수 중간엽줄기세포에 대한 선택적인 마커로서의 가능성이 있는지 알아보기 위해서, RT-PCR을 이용하여 골수 유래 중간엽줄기세포와 단핵세포 사이의 FAP α 발현을 비교하였다. 다행하게도 FAP α 는 골수 유래 중간엽줄기세포에서는 높게 발현되었지만 단핵세포에서는 발현되지 않았다(도 2). 또한 유세포 분석을 통하여 FAP α 가 중간엽줄기세포 표면에서는 강하게 발현되지만 단핵세포에서는 미미한 수준으로 발현되는 것을 밝혀냈다(도 3). 이는 골수 기질에서 중간엽줄기세포만이 유일한 FAP α 발현 세포군이라는 것을 제시한다.

[0054] 더 나아가 다른 인간 혈액 세포들에서도 FAP α 발현을 조사하기 위하여 RT-PCR 분석을 수행하였다. MTC(multiple tissue cDNA) 패널 스크리닝 결과, FAP α 는 휴면상태 뿐만 아니라 활성 CD8+(활성 T 림프구), CD4+(보조 T 림프구), CD14+(myeloid cells) 또는 CD19+(B lymphocytes) 혈액 분획물에서도 발현되지 않았다(도 4). 이는 인간 혈류의 FAP α 발현 세포들은 이런 조혈계 세포에 속하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0055] 다음으로 FAP α 의 발현이 골수 유래 중간엽줄기세포에서만 특이적으로 일어나는 것인지 아니면 탯줄 혈액(umbilical cord blood; UCB)이나 지방 조직(adipose tissue; AT)으로부터 유래된 다른 중간엽줄기세포군에서도 일반적으로 일어나는지 알아보았다. 그 결과 세 가지의 모든 중간엽줄기세포군에서 FAP α 가 높은 수준으로 발현되었다(도 5). 물론 대조군인 단핵세포군에서는 발현되지 않았다(도 2, 도 4 및 도 5). 이러한 결과들은 FAP α 의 발현이 골수 유래 뿐만 아니라 말초혈액(peripheral blood; PB), 탯줄 혈액(umbilical cord blood; UCB) 및 지방 조직(adipose tissue; AT) 같은 다른 세포 기원의 중간엽줄기세포도 특이적으로 구별할 수 있다는 사실을 알아냈다.

[0056] 또한 흥미롭게도 Hek293, THP-1, Jurkat, SH-SY5Y 및 CaCo-2 같은 다양한 인간 암세포주도 FAP α 를 발현하지 않았다(도 6). FAP α 는 HeLa 세포에서 약하게 발현되었지만 이는 FAP α 가 종종 HeLa 세포 유래 상피암들에서 상승 조절된다는 이전의 보고가 있다[12-14]. 이러한 결과들을 통틀어보면, FAP α 의 발현은 중간엽줄기세포들 이외에, 전부가 아니라면 대부분의 다른 인간 세포에서 강하게 억제되고 있다는 것을 제시한다.

[0057] <실시예 2> 단일 클론 항-FAP α 항체를 이용한 중간엽줄기세포의 선택적 분리

[0058] 본 발명자들은 단일클론 항-FAP α 항체를 가진 자기 비드 면역선택법(magnetic bead immunoselection)을 이용하여 냉동 보존된 골수 및 말초혈액유래 단핵세포뿐만 아니라, 탯줄혈액 및 지방조직으로부터 추출한 단핵세포로부터도 FAP α 발현 세포를 분리할 수 있고, 세포표면항원 분석을 통해 분리된 세포가 순수한 중간엽줄기세포임을 입증하였다.

[0059] (1) 면역선택법

[0060] 약 25 μl의 (1천만개의 비드가 포함)의 다이나비드 판 마우스 IgG(Dynabeads Pan mouse IgG, DYNAL BIOTECH, Oslo, Norway)을 항-FAP α 마우스 단일클론 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 0.5 μg과 섞어, 30 분간 실온에서 반응시킨 후, 골수, 말초혈액, 탯줄혈액 및 지방세포로부터 각기 추출한 2×10⁷ 단핵 세포에 넣어 4℃에서 20 분간 반응시켰다. 외부 자석을 이용하여 비드에 부착된 FAP α 발현 세포를 회수하여 식염수로 2차례 세척한 뒤 기본 세포 배양액이 든 배양 플라스크에 넣어 세포 증식을 3 주 동안 관찰하였다.

[0061] (2) 결과

[0062] 단일 클론 항-FAP α 항체를 이용하여, 골수, 말초혈액, 탯줄혈액 및 지방세포로부터 면역 선택한 결과, 선택되지 않은 세포(FAP α 음성 세포)는 모두 형태학적으로 불균질(heterogeneous) 하지만, 선택된 세포(FAP α 양성 세포)는 중간엽줄기세포와 유사한 형상을 유지한 채 신속하게 증식하여, 2-3 주째에 이르러 수 천개의 세포로 이루어진 세포 콜로니를 형성하였다 (도 7). 더구나 FAP α 양성 세포는 중간엽줄기세포의 특징적인 표면 마커인 CD73, CD90 및 CD105에 양성반응을 나타냈다(도 8). 이 실험 결과는 항-FAP α 항체에 의해 양성적으로 선택된 세포가 중간엽줄기세포임을 입증한다.

[0063]

산업이용 가능성

[0064] 본 발명에 따른 FAP α 단백질은 인간 골수, 말초혈액, 탯줄혈액 및 지방세포로부터 중간엽줄기세포를 분리 동정하기 위한 표면 단백질 마커로서 매우 유용하다. 단일클론 항-FAP α 항체를 가진 자기 비드 면역선택법(magnetic bead immunoselection)을 이용하여 FAP α 을 가진 중간엽줄기세포를 특이적으로 신속하게 분리할 수 있다. 인간 중간엽줄기세포는 골, 연골, 근육 및 지방세포 등의 중배엽 관련 조직세포로 분화할 수 있을 뿐 아니라, 조혈모세포에 의한 조혈작용을 보조하거나 면역기능을 조절하는 능력을 가지고 있기 때문에 그 응용 영역이 가장 광범위한 세포의 하나로 인식되고 있다. 이 줄기세포는 다른 줄기세포에 비해 윤리 및 법적 문제점이 적고, 탁월한 자가증식 능력을 보유하고 있으며, 줄기세포의 특성에 영향을 주지 않고 장기간 냉동보관이 가능하며, 전분화능(Pluripotency)에 가까운 분화능력을 보유하고 있으며, 유전자 조작 후 높은 세포 안정성을 보이기 때문에 유망한 세포치료제로 각광을 받고 있다. 따라서 중간엽줄기세포의 특이 마커인 FAPα는 인간의 골수, 말초혈액, 탯줄혈액 및 지방세포로부터 중간엽줄기세포를 간편하게 동정하고 분리시킴으로 앞으로 진행될 중간엽줄기세포 기반 세포치료제 개발에 적극 사용될 것이기 때문에, 산업상 이용 가능성이 아주 높을 뿐 아니라, 중간엽줄기세포에 대한 세포생물학적, 분자생물학적 기초 연구에도 사용되어, 자가증식과 분화 연구에 관련된 주요 세포신호전달기전을 규명하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 전망된다.

[0065] [References]

[0066] 1. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society of Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-395.

[0067] 2. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507-520.

[0068] 3. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trend Mol Med* 2001;7:259-264.

- [0069] 4. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. Hematol J. 2003;4:92-96.
- [0070] 5. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, et al. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. Blood 2007;109:1743-1751.
- [0071] 6. Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, et al. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. Blood 2007;109:4245-4248.
- [0072] 7. Dominici M, Le Blanc JK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006;8:315-317.
- [0073] 8. Jeong JA, Hong SH, Gang EJ, et al. Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray. Stem Cells 2005;23:584-593.
- [0074] 9. Jeong JA, Ko KM, Bae S, et al. Genome-wide differential gene expression profiling of human bone marrow stromal cells. Stem Cells 2007;25:994-1002.
- [0075] 10. Aertgeerts K, Levin I, Shi L, et al. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein α . J Biol Chem 2005;280:19441-19444.
- [0076] 11. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Beresford HR, et al. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:3110-3114.
- [0077] 12. Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, et al. Molecular cloning of fibroblast activation protein α , a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. Proc Natl Acad Sci 1994;91:5657-5661.
- [0078] 13. Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, et al. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. J Biol Chem 1999;274:36505-36512.
- [0079] 14. Dolznig H, Schweifer N, Puri C, et al. Characterization of cancer stroma markers: In silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. Cancer Immun 2005;5:10.
- [0080] 15. Jeong JA, Ko KM, Park HS, et al. Membrane proteomic analysis of human mesenchymal stromal cells during adipogenesis. Proteomics 2007; in press.

도면의 간단한 설명

- [0081] **도 1**은 섬유아세포 활성 단백질 α (fibroblast activation protein α ; **FAP α**) 서열의 탠덤 질량분석기 커버리지(tandem mass spectrometry coverage) 지도를 나타낸다. 진한 이탤릭체 서열은 탠덤 질량분석(~24% 커버리지)에 의해 결정된 12개의 서열들의 위치를 표시한다. N-말단(terminus)에 네모로 표시된 서열은 FAP α 의 단일 α -나선 막투과 도메인(α -helical transmembrane domain)을 나타낸다.
- [0082] **도 2**는 단핵세포에 비하여 골수 유래 중간엽줄기세포에서 FAP α 발현이 선호적임을 보이는 RT-PCR 분석결과를 나타낸다. BM-MS; 골수 유래 중간엽줄기세포(bone marrow (BM) derived mesenchymal stromal cell (MSC)), BM-MNC; 골수 유래 단핵세포(bone marrow (BM) derived mononuclear cell (MNC))
- [0083] **도 3**은 FAP α 가 중간엽줄기세포(회색 프로파일)에서 독점적으로 발현되고, 단핵세포(흰색 프로파일)에서 발현이 되지 않음을 보이는 유세포 분석 결과를 나타낸다.
- [0084] **도 4**는 인간 말초혈액 분획물들에서 FAP α 발현이 되지 않는 것을 보이는 MTC(multiple tissue cDNA) 패널 스크리닝 결과를 나타낸다.
- [0085] **도 5**는 UCB-MS; BM-MS 및 AT-MS에서의 FAP α 가 강하게 발현이 되고, UCB-MNC 및 AT 세포에서는 FAP α 가 발현이 되지 않는 것을 보이는 RT-PCR 분석결과를 나타낸다. BM-MS: 골수 유래 중간엽줄기세포; UCB-MS: 탯줄 혈액(umbilical cord blood, UCB) 유래 중간엽줄기세포; AT-MS: 지방 조직(adipose tissue, AT) 유래 중간엽

줄기세포; UCB-MNC: 탯줄 혈액 유래 단핵세포; AT:지방 조직(adipose tissue)

[0086] 도 6은 인간 암세포주에서의 FAP α가 발현되지 않음을 보이는 RT-PCR 분석결과를 나타낸다.

[0087] 도 7은 골수(BM), 말초혈액(PB), 탯줄혈액(UCB) 및 지방조직(AT)으로부터 면역선택법에 의해 분리된 FAP α 발현 세포가 2-3 주 후에 고순도의 세포 콜로니를 형성하는 결과를 보여준다(배율 40×).

[0088] 도 8은 FAP α-양성세포(회색 프로파일) 및 FAP α-음성세포(흰색 프로파일)에 대한 세포 표면의 항원 특징을 나타낸다.

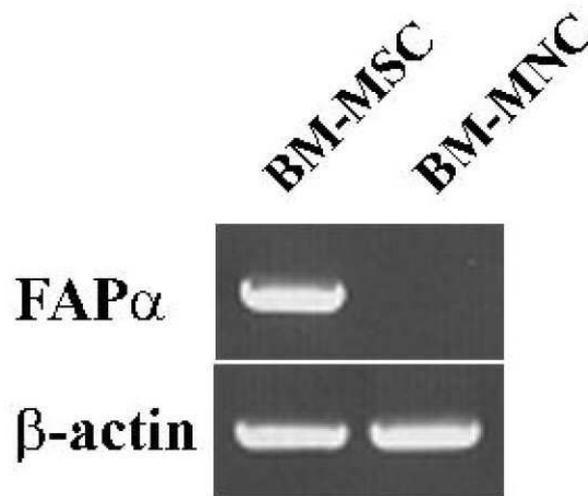
도면

도면1

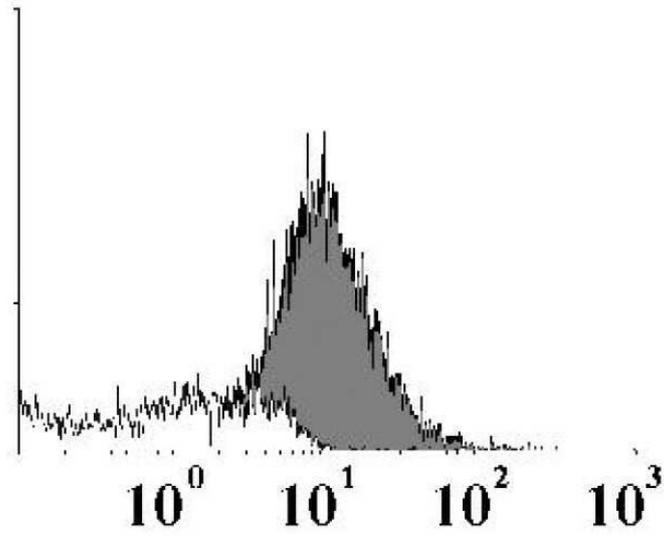
```

1  MKTWVKLVFG VATSAVLALL VMCIVLRPSR VHNSEENTMR ALTLKDILNG TFSYKTFPPN
61  WISGQEYLHQ SADNNIVLYN IETGQSYTIL SNRTMKSUNA SNYGLSPDRQ FVYLESDYSK
121 LWRYSYTATY YIYDLSNGEF VRGNELPRPI QYLCWSPVGS KLAYVYQNNI YLKQRPGDPP
181 FQITFNGREN KIFNGIPDWV YEEEMLATKY ALWWSPNGKF LAYAEFNDDT IPVIAYSYYG
241 DEQYPTINI PYPKAGAKNP VVRIFIIDTT YPAYVGPQEV PVPAMIASSD YYFSWLTWVT
301 DERVCLQWLK RVQNVSVLSI CDFREDWQTW DCPKTQEHIE ESRTGWAGGF FVSTPVFSYD
361 AISYYKIFSD KDGKHIHYI KDTVENAIQI TSGKWEAINI FRVTQDSLFI SSNEFEEYPG
421 RRNIYRISIG SYPPSKKCVT CHLRKERCQY YTASFSDYAK YYALVCYGP IPISTLHDGR
481 TDQEIKILEE NKELENALKN IQLPKKEIKK LEVDEITLWY KMILPPQFDR SKKYPLLIQV
541 YGGPCSQSVR SVFAVNWISY LASKEGMVIA LVDGRGTAFQ GDKLLYAVYR KLGVYEVEDQ
601 ITAVRKFIEM GFIDEKRIAI WGWSYGGYVS SLALASGTGL FKCGLAVAPV SSWEYYASVY
661 TERFMGLPTK DDNLEHYKNS TVMARAEYFR NVDYLLIHGT ADDNVHFQNS AQIAKALVNA
721 QVDFQAMWYS DQNHGLSGLS TNHLYTHMTH FLKQCFSLSD
    
```

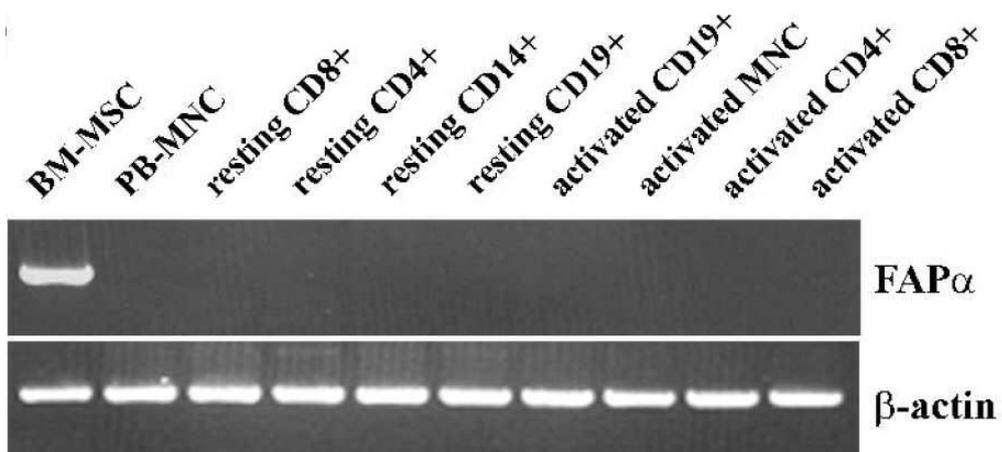
도면2



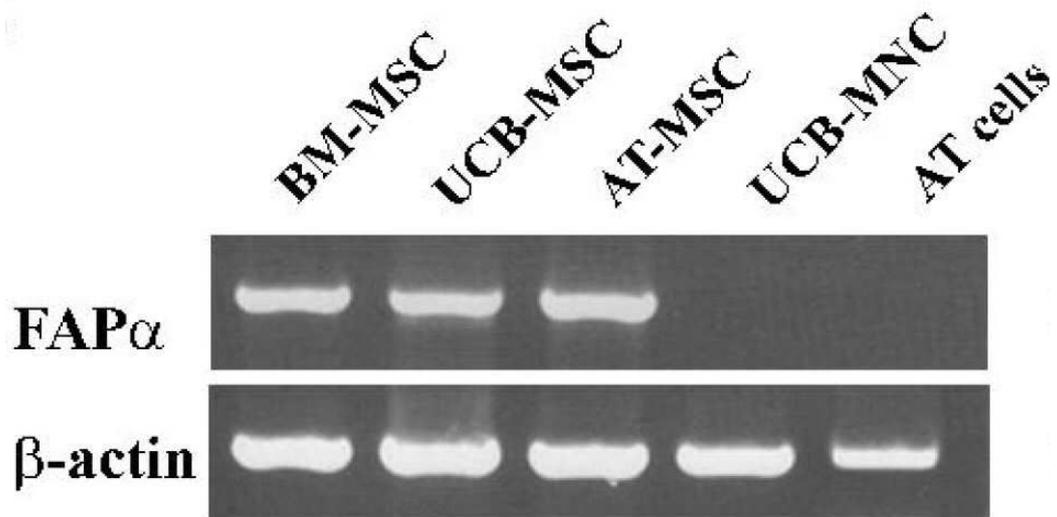
도면3



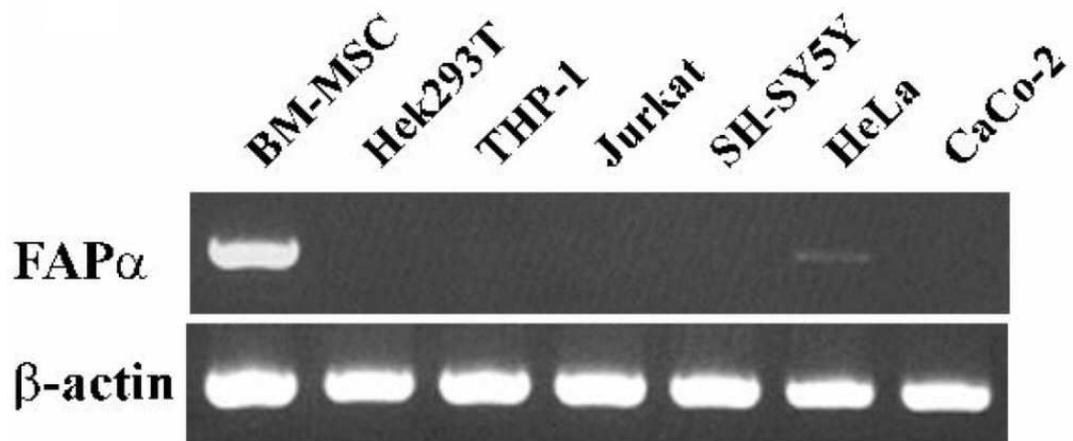
도면4



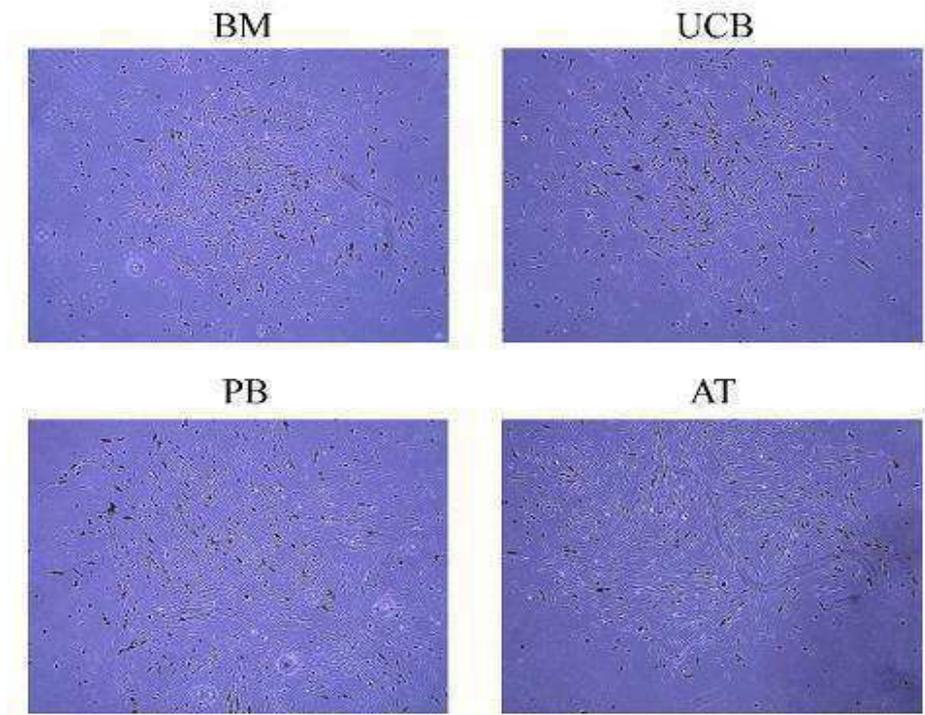
도면5



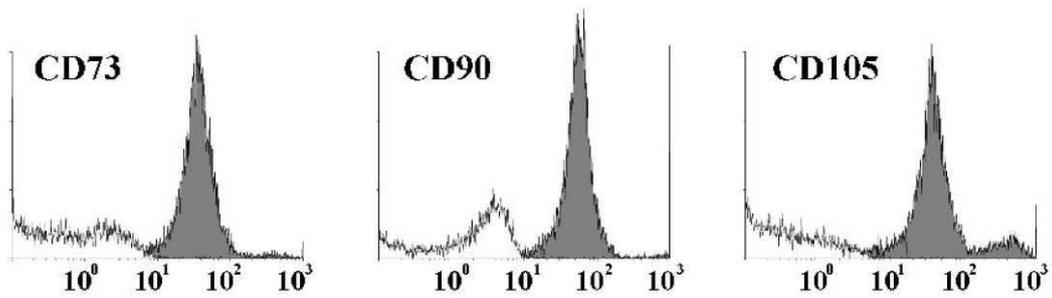
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Genexel-Sein Inc.
- <120> Biomarker for purification or identification of mesenchymal stem cells and methods of purification of mesenchymal stem cells by using it

- <150> US60969959
- <151> 2007-09-05

<150> US60969960
<151> 2007-09-05

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 1
caagtggcaa gtgggagg 18

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
ggttttcaga ttctgata 18

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3

agaaaatctg gcaccacacc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

ccatctcttg ctcgaagtcc

20