



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0017929
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0102515
(22) 출원일자 2016년08월11일
심사청구일자 2016년08월11일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최은경
경기도 안양시 동안구 관평로170번길 15, 한림대학교 일송생명과학연구소
김용선
경기도 안양시 동안구 관평로170번길 15, 한림대학교 일송생명과학연구소
장병기
경기도 안양시 동안구 관평로170번길 15, 한림대학교 일송생명과학연구소
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 10 항

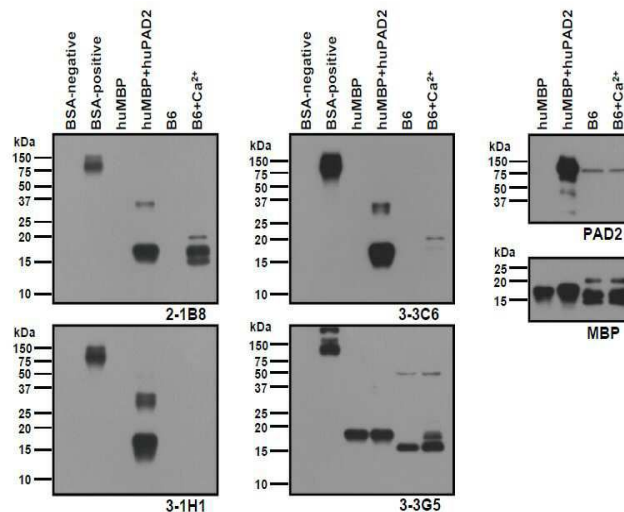
(54) 발명의 명칭 시트룰린화 미엘린 염기성 단백질에 대한 모노클론 항체 및 이를 이용한 신경 퇴행성 질환 진단 키트

(57) 요약

해결하려는 과제: CJD, 스크래피 질환, 프리온 질환, 알츠하이머 등의 신경퇴행성 질환에서 발생하는 MBP 시트룰린화를 탐지할 수 있는 모노클론 항체를 제공하는 것.

해결수단: 본 발명은 시트룰린화 MBP 단백질에 특이적으로 결합하고, 비시트룰린화 MBP 단백질에는 실질적으로 반응하지 않는 모노클론 항체 및 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 2800/2821 (2013.01)

G01N 2800/2828 (2013.01)

G01N 2800/285 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011K3A1A1003362

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외거점융연구센터사업

연구과제명 단백질응집 관련 퇴행성 뇌질환의 기술융합적 연구를 위한 한림-읍살라 연구센터

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.04.01 ~ 2016.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C0965010016

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 프리온 질환 모델을 이용한 치료제 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.17 ~ 2016.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1D1A1A01059584

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 펩티달아르기닌 탈아민화효소에 의한 단백질 번역후 변형으로 유도된 자가항원의 발굴 및 항체의 개발을 통한 자가면역질환내 작용 기전 연구

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역,
- (b) 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역 또는
- (c) 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역을 포함하는 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 시트룰린화 미엘린 염기성 단백질에 특이적으로 결합하는 시트룰린화 미엘린 염기성 단백질 특이적 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 신경퇴행성 질환 진단에 이용함을 특징으로 하는, 시트룰린화 미엘린 염기성 단백질 특이적 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 다발성 경화증, 프리온 질환, 크로이츠펠트야콥병 또는 알츠하이머병임을 특징으로 하는, 시트룰린화 미엘린 염기성 단백질 특이적 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

청구항 1의 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 이용하여 시료 내 시트룰린화 미엘린 염기성 단백질의 항원-항체 반응을 면역 측정하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 면역 측정은 웨스턴 블롯팅, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법, 방사선면역확산법, 면역형광분석법, 면역 블롯팅, 오크틸로니 면역확산법 (Ouchterlony Immunodiffusion), 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역 침전분석법, 보체 고정 분석법 (complete fixation assay), FACS (fluorescence-activated cell sorter) 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택되는 면역학적 분석에 의한 것임을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 다발성 경화증, 프리온 질환, 크로이츠펠트야콥병 또는 알츠하이머병임을 특징으로 하

는, 신경퇴행성 질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 7

청구항 1의 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 신경퇴행성 질환의 진단용 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 다발성 경화증, 프리온 질환, 크로이츠펔트야콥병 또는 알츠하이머병임을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 진단용 조성물.

청구항 9

청구항 1의 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 신경퇴행성 질환의 진단용 키트.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 다발성 경화증, 프리온 질환, 크로이츠펔트야콥병 또는 알츠하이머병임을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 시트룰린화 미엘린 염기성 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 모노클론 항체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 모노클론 항체를 포함하는 시트룰린화 미엘린 염기성 단백질 검출용 조성물 및 검출 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 모노클론 항체를 포함하는 시트룰린화된 미엘린 염기성 단백질 관련 질환의 진단용 조성물 및 진단 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중추신경계에서 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte)로부터 형성되는 미엘린은 도약 전도 (saltatory conduction)에 의하여 활동전위의 전도를 용이하게 해주는 액손을 둘러싸는 다중라멜라 막구조의 하나이며, 감각, 인지, 기억 및 동작 기능에 중요하다. 미엘린의 필수적인 구성요소는 콜레스테롤, 인지질 및 글라이코스핑고리피드와 같은 70% 지방과 미엘린-결합 당단백질, 미엘린 염기성 단백질 (MBP), 미엘린/희소돌기아교세포 당단백질 및 프로테오리피드 단백질과 같은 30%의 단백질이다 [Morell P and Quarles RH, 1999; Boggs JM, 2006; Jahn O et al., 2009].

[0003] MBP는 아르기닌과 라이신 잔기가 많은 단백질이며, 이 잔기들이 총 미엘린 단백질의 30~35%를 차지한다 [Pierre Morell and Richard H Quarles, 1999]. 고전적인 MBP 동형체 (isoforms) (14-21.5 kDa)는 희소돌기아교세포 계통 (Gollis) 유전자와 MBP 전사 개시 부위로부터 선택적으로 스플라이싱되어 암호화된다. 인간 중추신경계 미엘린에서 18.5 kDa MBP는 주요 동형체이고 필수적으로 중추신경계 미엘린 형성을 유지하며 [Harauz G and Musse AA, 2007; Harauz, 2013], 세포골격 조합과 막 확장, Fyn-매개 신호전달경로, 칼슘 항상성 유지에서 역할을 수행한다고 제시된바 있다 [Boggs JM, 2006; Harauz G and Boggs JM, 2013].

[0004] MBP는 높은 양전하를 띠며 (+19) 평균 소수도가 낮아 안정적인 3차원 구조를 형성하기 어렵다. 시트룰린화 (또는 탈아민화; 아르기닌이 시트룰린으로 바뀜), 인산화, 탈아미드화 및 메틸화를 포함하는 수많은 번역후 변형은 MBP에 전하 분포를 일으키며, 이는 구조 동역학 (conformational dynamics)을 통하여 미엘린 쉬트의 압축도와 구조를 변화시킨다 [Kim JK et al., 2003; Harauz G et al., 2009]. 시트룰린화는 고농도 칼슘-의존적 PAD 효

소 활성화에 의하여 매개된다. 다섯 개의 아이소타입 PADs (1-4 및 6)는 인간과 설치류에서 조직 및 기질 특이적으로 발현된다. PAD2는 뇌에 우세한 타입이며 시트룰린화된 단백질은 MBP를 포함하여 자가항원으로서 기능한다 [Vossenaar ER et al., 2003]. 종래에 CM52 양이온교환 컬럼을 이용하여 다발성 경화증 (multiple sclerosis; MS) 뇌의 백질로부터 C1 내지 C8 (18.5 kDa 동형체)로 알려진 여러 개의 전하 변이를 분리했다는 보고가 있다 (Moscarello et al., 1994). C1 요소는 중성 pH에서 순전하 +19를 가지며, 가장 적게 변형되고 가장 높은 양전하를 가지며, 건강한 성인에게서 풍부하게 발견되는 동형체이다. 나머지 요소 C2-C8 중, 가장 많이 변형되고 가장 양전하가 적은 C8 요소는 19개의 아르기닌 중 적어도 여섯 개가 시트룰린화된 것이며 [Wood DD and Moscarello MA, 1989], 순전하가 <+13으로 감소하며 접히지 않은 구조가 되어 인지질 간의 상호작용을 약화시키고, 프로테아제에 의해 빠르게 분해된다 [Vossenaar ER et al., 2003; Boggs JM, 2006; Moscarello MA and Musse AA, 2007; Harauz G et al., 2009]. 정상 뇌에서는 총 MBP의 20%가 여섯 개의 시트룰린 잔기를 가지는 반면, 다발성 경화증에서 시트룰린화된 MBP는 45%를 차지하며 PAD2 발현도 상향조절되었다 [Wood DD and Moscarello MA, 1989; Mastronardi FG et al., 2007]. 뿐만 아니라, 급성 MS에서는 시트룰린화 MBP가 전체 MBP의 80-90%를 차지한다 [Wood DD et al., 1996]. 흥미롭게도, 두 살짜리 유아와 MS 환자에서 시트룰린화 MBP의 분포가 유사하였다. 그러므로, MBP 시트룰린화의 증가는 초기 중추신경계 발달 및 MS 중증 정도 양쪽 모두와 관련이 있다고 제안되었다 [Moscarello MA et al., 1994; Harauz G, 2007].

[0005] 비록 MBP 시트룰린화의 의미가 탈수초성 질환인 다발성 경화증에서 잘 밝혀졌지만 [Moscarello MA and Musse AA, Neurochem Res, 2007], 본 발명자들은 CJD 환자를 포함하는 다른 질병에서 시트룰린화 MBP가 증가하여 탈수초화 상태 및 점진적으로 진행되는 신경학적 이상을 반영하는지 질문을 제기하였다. 시트룰린화된 MBP는 또한 CJD 환자, 스크래피 감염 마우스 및 알츠하이머 질환의 뇌에서 시트룰린화 후보로 밝혀졌기 때문이다 [Jang et al., 2008; Jang et al., 2010; Jang et al., 2011; Ishigami et al., J Neurosci Res 2005]. 뿐만 아니라, 인 비보에서 MBP 시트룰린화 정도는 완전히 이해되지 못하고 있다. 프리온 질환은 비정상적 프리온 단백질 (PrP^{Sc}) 축적, 공포 형성 (vacuolation) 및 신경아교증을 포함하는 신경학적 변화를 특징으로 하는 치료 불가능하고 불가피하게 치명적인 신경퇴행성 질환이며 [Colby DW and Prusiner SB, 2011], PAD2 발현이 증가하고 시트룰린화 농도가 높아진다 [Jang et al., 2008, 2010, 2011].

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1237002호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Boggs JM (2006) Myelin basic protein: a multifunctional protein. Cell Mol Life Sci 63:1945-1961

(비특허문헌 0002) Brand-Schieber E, Werner P (2004) Calcium channel blockers ameliorate disease in a mouse model of multiple sclerosis. Exp Neurol 189:5-9

(비특허문헌 0003) Caverzasi E. et al., (2014) White matter involvement in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Brain 137:3339-3354

(비특허문헌 0004) Colby DW, Prusiner SB (2011) Prions. Cold Spring Harb Perspect Biol 3:a006833

(비특허문헌 0005) Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. Nat Rev Immunol 15:545-558

(비특허문헌 0006) Erickson AK et al., (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 265:19728-19735

(비특허문헌 0007) Harauz G, Boggs JM (2013) Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. J Neurochem 125:334-361

- (비특허문헌 0008) Harauz G, Ladizhansky V, Boggs JM (2009) Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry* 48:8094-8104
- (비특허문헌 0009) Harauz G, Musse AA (2007) A tale of two citrullines--structural and functional aspects of myelin basic protein deimination in health and disease. *Neurochem Res* 32:137-158
- (비특허문헌 0010) Hirschberg D. et al., (2003) Thr94 in bovine myelin basic protein is a second phosphorylation site for 42-kDa mitogen-activated protein kinase (ERK2). *J Protein Chem* 2003 22:177-181
- (비특허문헌 0011) Jang B. et al., (2010) Involvement of peptidylarginine deiminase-mediated post-translational citrullination in pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 119:199-210
- (비특허문헌 0012) Jang B. et al., (2008) Accumulation of citrullinated proteins by up-regulated peptidylarginine deiminase 2 in brains of scrapie-infected mice: a possible role in pathogenesis. *Am J Pathol* 173:1129-1142
- (비특허문헌 0013) Jang B. et al., (2015) Peptidylarginine deiminase inhibition impairs Toll-like receptor agonist-induced functional maturation of dendritic cells, resulting in the loss of T cell-proliferative capacity: a partial mechanism with therapeutic potential in inflammatory settings. *J Leukoc Biol* 97:351-362
- (비특허문헌 0014) Jang B. et al., (2011) Subcellular localization of peptidylarginine deiminase 2 and citrullinated proteins in brains of scrapie-infected mice: nuclear localization of PAD2 and membrane fraction-enriched citrullinated proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:116-124
- (비특허문헌 0015) Kim JK et al., (2003) Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis. *Mol Cell Proteomics* 2:453-462
- (비특허문헌 0016) Lee H. et al., (2012) Cerebral white matter disruption in Creutzfeldt-Jakob disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 33:1945-1950
- (비특허문헌 0017) Lee HP et al., (2005) Activation of mitogen-activated protein kinases in hamster brains infected with 263K scrapie agent. *J Neurochem* 95:584-593
- (비특허문헌 0018) Martin R. et al., (1994) Citrulline-containing myelin basic protein is recognized by T-cell lines derived from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *Neurology* 1994 44:123-129
- (비특허문헌 0019) Mastronardi FG et al., (2007) Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *J Neurosci Res* 85:2006-2016
- (비특허문헌 0020) Micu I. et al., (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature* 439:988-992
- (비특허문헌 0021) Moscarello MA et al., (2013) Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis. *Dis Model Mech* 6:467-478
- (비특허문헌 0022) Moscarello MA, Mastronardi FG, Wood DD (2007) The role of citrullinated proteins suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem Res* 32:251-256
- (비특허문헌 0023) Moscarello MA, Wood DD, Ackerley C, Boulias C (1994) Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *J Clin Invest* 94:146-154
- (비특허문헌 0024) Nishida N. et al., (1999) A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* 79:689-697
- (비특허문헌 0025) Morell P and Quarles RH. Characteristic Composition of Myelin. In: Siegel GJ,

Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999

(비특허문헌 0026) Rossi S. et al., (2013) Opposite roles of NMDA receptors in relapsing and primary progressive multiple sclerosis. PLoS One 8:e67357

(비특허문헌 0027) Shimada N. et al., (2010) Developmental and age-related changes of peptidylarginine deiminase 2 in the mouse brain. J Neurosci Res 88:798-806

(비특허문헌 0028) Tranquill LR, Cao L, Ling NC, Kalbacher H, Martin RM, Whitaker JN (2000) Enhanced T cell responsiveness to citrulline-containing myelin basic protein in multiple sclerosis patients. Mult Scler 6:220-225

(비특허문헌 0029) Vassall KA, Bamm VV, Harauz G (2015) MyelStones: the executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis. Biochem J 472:17-32

(비특허문헌 0030) Witalison EE et al., (2015) Inhibiting protein arginine deiminases has antioxidant consequences. J Pharmacol Exp Ther 353:64-70

(비특허문헌 0031) Wood DD et al., (1996) Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. Ann Neurol 40:18-24

(비특허문헌 0032) Wood DD, Moscarello MA (1989) The isolation, characterization, and lipid-aggregating properties of a citrulline containing myelin basic protein. J Biol Chem 264:5121-5127

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 CJD, 스크래피 질환, 프리온 질환, 알츠하이머 등의 신경퇴행성 질환에서 발생하는 MBP 시트룰린화를 탐지할 수 있는 모노클론 항체를 제공하는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명에서 우리들은 시트룰린화 MBP 펩타이드에 대한 마우스 모노클론 항체를 발명하였고, MBP 시트룰린화가 CJD 및 스크래피 감염 마우스의 병인에 관련이 있는지를 연구하였다. 본 발명의 항체는 신경퇴화 중추신경계에서 MBP 시트룰린화의 변화를 직접적으로 평가할 수 있게 해주었다.

[0010] 펩티딜아르기닌 다이미네이즈 (PAD)에 의한 미엘린 염기성 단백질 (MBP) 시트룰린화는 불완전한 단백질-지방 이중 상호작용을 유도하여 단백질 분해효소에 취약해지게 하여 중추신경계에서 수초 (myelin sheath) 조직을 파괴하기 때문에 MBP 시트룰린화는 다발성 경화증에서 탈수초화의 특징으로 제시되고 있다. 최근의 증거들은 MBP 시트룰린화가 다른 신경퇴행성 질환에서도 일어남을 제시한다. 그러나, 구체적으로 이 기작에 어떤 분자들이 관여하는지는 알려져 있지 않다. 본 발명자들은 최초로 항-시트룰린화 MBP 모노클론 항체 IgG1 (클론 1B8, 1H1 및 3C6) 그리고 IgM (클론 3G5) 항체를 발명하였고, 이 항체들은 각각 인간 R25, R122, R130 잔기에서 인간 MBP 시트룰린화와 16 a.a C-말단 부분 (또는 마우스 MBP의 해당 부분)을 인식한다. 프리온 질환의 스크래피 감염 마우스 모델에서 MBP R23 잔기는 PAD에 특이적으로 취약하지만, MBP R128 잔기는 내성이 있었다. 흥미롭게도, 총 MBP는 액손의 관을 따라 섬유모양으로 염색되었으며, 반면 MBP R23 시트룰린화는 진한 작은 반점으로 보였는데, 이것은 스크래피 감염 마우스의 뇌량 (corpus callosum), 줄무늬체 및 소뇌 백질 부분에서 관찰되었으나, 이러한 면역반응성과 염색 패턴은 대조군에서는 관찰되지 않았다. 크로이츠펠트 야콥 병 환자의 뇌에서 MBP R25, R122 및 R130은 현저히 시트룰린화되었으나 대조군은 그렇지 않았다. 특히, CJD 환자의 중뇌와 연수 같은 백질 부분은 다른 부분과 비교하여 고농도의 MBP 시트룰린화를 나타내었다. MBP 시트룰린화 농도는 낮은 프리온 발현과 관련이 있었으나, PAD2 발현과는 상관관계가 없었다. 클론 3G5 IgM 항체는 스크래피 감염 마우스 및 CJD 환자에서 마우스와 인간의 MBP 변이체 적어도 세 개를 인식하였고, 18.5 kDa 및/또는 21.5 kDa 변이체는 대조군과 비교하여 발현이 현저히 증가하였다. 본 발명자들의 연구 결과, 현저한 MBP 시트룰린화는 탈수초화 변화를 반영하는 것으로 보이며, 탈수초화는 프리온 질환에서 세포-세포 소통 붕괴를 유발할 것으로 예상된다. 또한, 본 발명의 새로운 항체는 탈수초화 판단에 유용한 도구가 될 것이다.

- [0012] 본 발명은 시트룰린화 MBP 단백질에 특이적으로 결합하고, 비시트룰린화 MBP 단백질에는 실질적으로 반응하지 않는 모노클론 항체 및 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0013] 본 발명에서 용어, "시트룰린화 단백질", "시트룰린화 MBP 단백질", "시트룰린화 MBP 펩타이드", "시트룰린화된 단백질", "시트룰린화된 MBP 단백질", "시트룰린 잔기를 함유하는 단백질", "시트룰린 잔기를 함유하는 MBP 단백질", "시트룰린 함유 MBP 단백질" 또는 "시트룰린 함유 단백질"이라 함은 단백질을 구성하는 아미노산 잔기 중에 시트룰린 잔기를 포함하는 MBP 단백질로, 상기 시트룰린 잔기는 단백질의 번역 후 변형 과정에서 아르기닌 잔기가 펩타이드아르기닌 디이미네이즈 (PAD)의 작용에 의해 탈아미노화되어 시트룰린 잔기로 변환된 것이다.
- [0014] 시트룰린 잔기는 단백질 번역 과정 동안 단백질 내로 도입되지 않는 아미노산이나, PAD 효소에 의해 아르기닌 잔기의 번역 후 변형으로 생성될 수 있다. 즉, 시트룰린에 대한 tRNA는 존재하지 않으며, 단백질에서 시트룰린 잔기는 번역 후 변형의 결과로서만 생성된다. 단백질의 시트룰린화는 세포 사멸 또는 조직 염증 과정에서 주로 일어나는 것으로 알려져 있으며, 자가면역질환 환자에서 시트룰린화 단백질이 검출된 사례들이 보고되면서, 시트룰린화가 병리학적 상태와 관련이 있는 것으로 인식되고 있다.
- [0015] 본 발명의 항체는 시트룰린화 미엘린 염기성 단백질 (MBP)에 특이적으로 결합하고, 비시트룰린화 MBP에는 반응하지 않는 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역, 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명에서 "항체"는 시트룰린화된 MBP 단백질의 시트룰린화 부위에 특이적으로 결합하는 항체로서, 완전한 항체뿐만 아니라 그의 항원 결합 단편을 포함하는 의미로 사용한다. 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다.
- [0017] 항체 분자의 항원 결합 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역 (CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. F(ab')는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역이 있다는 점이 Fab와의 차이이다. F(ab')₂는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 이황화 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변 부위 및 경쇄 가변 부위만을 가지는 최소의 항체 조각을 말한다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있다. 예컨대 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있으며, 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0018] 본 명세서에서 "가변 영역"이라 함은 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상 많은 변이를 나타내는 항체 분자의 일부를 의미하고, 가변 영역에는 상보성 결정 영역 (complementarity determining region, CDR)인 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. CDR은 항체 표면에 고리 모양으로 존재하며, 상기 CDR 사이에는 프레임 워크 영역 (framework region, FR)이 존재하여 CDR 고리를 지지하는 기능을 수행한다.
- [0019] 본 명세서에서 "상보성 결정 영역 (CDR)"이라 함은 항원의 인식에 관여하는 고리모양의 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이 결정된다.
- [0020] 본 명세서에서 "중쇄"라 함은 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 세 개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 말한다.
- [0021] 또한, 본 명세서에서 "경쇄"라 함은 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0022] 본 발명의 항체는 본 발명이 속하는 기술분야에 알려진 기술을 참고하여 하이브리도마 방법에 의하여 제조되었다. 본 발명에서 "하이브리도마"는 항체를 생산하는 B 림프구와 골수종 암세포 (미엘로마 세포)를 융합하여 얻은 세포를 의미하며, 미엘로마 세포는 형질전환된 세포로서 배양접시에서 오랜 기간 배양할 수 있는 장점이 있어 한 가지 항체만을 만들어 내는 미엘로마 하이브리도마를 분리해 내면 손쉽게 모노클론 항체를 대량으로 획득할 수 있다. 본 발명에서는 항체를 각각 1B8, 1H1 및 3C6으로 명명하였으며, 이의 중쇄 및 경쇄 가변영역 서열

을 분석한 결과, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역, 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역을 포함하는 것으로 분석되었다.

- [0023] 본 발명에서 상기 항체를 제조하기 위해 표 2의 아미노산 서열을 가지는 시트룰린화 MBP 펩타이드 항원을 사용하였다.
- [0024] 본 발명에서 적용한 하이브리도마 방법을 간략히 설명하면, 먼저 항원을 주사한 마우스와 같은 면역학적으로 적합한 숙주 동물로부터의 세포를 준비하고, 나머지 하나의 집단으로는 암 또는 미엘로마 세포주를 준비한다. 이러한 두 집단의 세포들을 폴리에틸렌글리콜과 같은 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 융합시킨 후 항체-생산세포를 표준적인 조직 배양 방법에 의해 증식시킨다. 한계 희석법 (limited dilution technique)에 의한 서브클로닝에 의해 균일한 세포 집단을 수득한 후, 시트룰린화된 MBP 단백질에 대해 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마를 표준 기술에 따라 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양한다.
- [0025] 하이브리도마의 스크리닝은 주지의 방법에 의하여 행할 수 있다. 예를 들면, 면역원으로서 이용한 시트룰린화된 MBP 단백질을 고체 지지체에 결합시키고, 하이브리도마 배양 상청액에 대하여 ELISA 등의 주지의 면역 측정을 수행하여 본 발명의 모노클론 항체를 산생하는 하이브리도마를 스크리닝할 수 있다.
- [0026] 이때, 시트룰린화되지 않은 MBP 단백질을 결합시킨 고체 지지체를 이용한 면역측정도 함께 수행하고, 시트룰린화된 MBP 단백질에 대한 반응성이 비시트룰린화 MBP 단백질에 대한 반응성보다도 높은 것을 선별함으로써, 비시트룰린화 MBP 단백질에의 교차 반응성이 낮은 모노클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 선택할 수 있다.
- [0027] 상기한 하이브리도마가 생산하는 모노클론 항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 고순도로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 제공하는 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, 체내에 존재하는, 또는 생체 시료 내 존재하는 시트룰린화 MBP 단백질을 특이적으로 검출함으로써 다양한 연구 목적, 예를 들어, 시트룰린화 MBP 관련 질환의 연구에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0029] 시트룰린화 MBP 관련 질환은 본원에서 단백질의 시트룰린화가 질환의 발병에 있어서 일정한 역할을 수행하는 질환으로서 정의된다. 본 발명의 항체를 사용하여, 시트룰린화 단백질의 생성이 질환의 발병에 있어서 일정한 역할을 수행하는지 여부를 당업자가 용이하게 확인할 수 있다. 예를 들어, 시트룰린화 MBP 관련 질환은 영향 받은 조직 또는 질환 관련 조직에서 비정상적인 수준의 시트룰린 함유 단백질이 존재하므로, 본 발명의 항-시트룰린화 MBP 단백질 항체를 이용하여 목적 조직 시료로부터 웨스턴 블롯 또는 ELISA와 같은 면역학적 분석에 의하여 시트룰린 생성의 수준을 분석할 수 있다.
- [0030] 이러한 시트룰린화 MBP 관련 질환은 염증 관련 질환 및 자가면역질환, 예를 들어, 다발성 경화증, 알츠하이머, 크로이츠펠트야콥병 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 따라서, 본 발명은 본 발명의 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 시료 내 시트룰린화 MBP 단백질의 항원-항체 반응을 면역 측정하는 단계를 포함하는, 시료 내 시트룰린화 MBP 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 시트룰린화 MBP 단백질의 검출 방법은 대조군 및 실험군에 본 발명의 항체를 처리한 후 항원-항체 반응의 반응 수준을 비교할 수 있는데, 본 발명에서 항원-항체 반응 수준이란 시료 중의 상기 단백질 항원과 이를 인지하는 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부위와 결합된 양을 의미하며, 항원-항체 복합체의 양을 의미한다.
- [0033] 이러한 항원-항체의 반응 수준은 당업계에서 통상적으로 사용되는 측정방법을 제한 없이 사용하여 비교할 수 있으며, 예를 들어, 검출표지(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다. 상기 면역 측정은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 방법이라면 모두 포함할 수 있다. 이러한 방법들은 본 발명이 속하는 기술분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 웨스턴 블롯팅 (western blotting), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법 (Radioimmunoassay, RIA), 방사선면역 확산법 (Radioimmunodiffusion), 면역형광분석법 (Immunofluorescence assay, IFA), 면역 블롯팅 (immunoblotting),

오크틸로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 (Rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역 침전분석법 (immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법 (complete fixation assay), FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) 또는 단백질 칩 (protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 ELISA 법을 이용하여 시료 내 시트룰린화 MBP 단백질을 검출할 수 있다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 또는 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법이 바람직하다. 예를 들어, 고체 지지체에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된 항체를 부착시켜 효소적으로 발색 하거나 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색하는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출할 수 있다. 이와 같이 항원 및 항체의 복합체 형성 정도를 확인하여, 시료 내 시트룰린화된 단백질을 검출할 수 있다.

- [0034] 본 발명에서 용어 "시료"란 개체의 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 활액, 뇨, 객담, 림프액 및 뇌척수액 등을 포함하며, 시트룰린화 MBP 단백질을 검출할 수 있는 세포를 포함하는 시료이면 제한되지 않는다.
- [0035] 또한, 본 발명은 시트룰린화 MBP 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화 MBP 단백질 검출용 조성물 및 검출 키트를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 시트룰린화 MBP 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화 MBP 관련 질환의 진단용 조성물 및 진단 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 시트룰린화 MBP 단백질에 대한 항체 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당 업계에 공지된 도구 또는 시약을 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 상기에서 면역학적 분석은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사선면역분석법, 방사면역 확산법, 면역형광분석법, 면역 블롯팅, 오크틸로니 면역 확산법, 로켓 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역 침전분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 면역학적 분석에 사용되는 도구 또는 시약으로는 적합한 담체 또는 지지체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제, 및 안정화제 등을 포함할 수 있다. 적합한 담체로는 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 및 반응정지제 등을 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 키트에 포함되는, 시트룰린화 MBP 단백질에 대한 항체는 바람직하게는 적합한 담체 또는 지지체에 문헌에 개시된 바와 같은 다양한 방법을 이용하여 고정될 수 있으며 (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988), 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 PBS, 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 텍스트란, 세파텍스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 금속, 유리, 글래스 비드, 또는 자성 입자 등이 포함된다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형 (비드), 원통형 (시험관 또는 웰 내면), 평면형 (시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다.
- [0040] 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지는 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정 가능하게 하며, 이의 예로는 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미소입자 (microparticle), 레독스 분자 및 방사성 동위원소 등을 사용할 수 있다. 효소로는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, 우레아제, 퍼옥시다제 (호스라디시 퍼옥시다제 등), 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라아제, 글리코즈 옥시다아제, 헥소키나제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있다. 형광물질로는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 플루오르신이소티오시아네이트 등을 사용할 수 있다. 리간드로는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 발광물질로는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있다. 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있고 레독스 분자로는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 다이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논 등이 있다. 방사성 동위원소로는 ^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 있다. 그러나, 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0041] 효소 발색 기질로는 예컨대 효소 표지로서 호스래디쉬 퍼옥시데이즈 (HRP)를 선택한 경우에는 기질로서 3-아미노-9-에틸카르바졸, 5-아미노살리실산, 4-클로로-1-나프톨, o-페닐렌디아민, 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤티아졸린-6-술폰산), 3,3'-디아미노벤지딘, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, o-디아니시딘, 또는 3,3'-디메톡시벤지딘 포함 용액 등을 사용할 수 있다. 또한, 효소 표지로서 알칼라인 포스파타아제를 선택한 경우에는 기질로서 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트, 니트로블루 테트라졸륨, 또는 p-니트로페닐 포스페이트 포함 용액을 사용할 수 있다. 또한, 효소 표지로서 β -D-갈락토시다제를 선택한 경우에는 기질로서 o-니트로페닐- β -D-갈락토시드 또는 5-브로모-4-클로로-3-인돌- β -D-갈락토피라노시드 포함 용액을 사용할 수 있다. 이 외에도 본 발명이 속하는 기술분야에 알려진 다양한 효소 및 효소 발색 기질을 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0042] 현저한 MBP 시트룰린화는 탈수초화 변화를 반영하는 것으로 보이며, 탈수초화는 프리온 질환에서 세포-세포 소통 붕괴를 유발할 것으로 예상된다. 또한, 본 발명의 새로운 시트룰린화 MBP에 대한 모노클론 항체 또는 그의 항원결합 단편은 탈수초화 판단에 유용한 도구가 될 것으로 예상되어 본 발명의 모노클론 항체 또는 그의 항원결합 단편을 이용하면 CJD, 스크래피 질환, 프리온 질환, 알츠하이머 등의 신경퇴행성 질환의 진행 진단에 유용할 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1a 내지 도 1c는 시트룰린화 MBP 펩타이드에 대한 마우스 모노클론 항체의 개발과 특성규명에 관한 것이다.

도 1a는 항-시트룰린화 MBP 항체의 특이성을 제조함 인간 PAD2 (2 μ g/ml), 10 mM Ca^{2+} 및 5 mM DTT를 가하거나 가하지 않고 37°C에서 24시간 동안 배양하고, 정제된 인간 MBP (huMBP; 100 μ g/ml)를 이용하거나, 10 mM Ca^{2+} 와 5 mM DTT와 함께 6시간 동안 37°C에서 배양한 C57BL/6 마우스 뇌 용균액 (B6; 1 mg/ml)을 이용한 웨스턴 블롯팅으로 규명한 것이다. BSA-음성 대조군, BSA-결합 비시트룰린화 MBP 펩타이드; BSA-양성 대조군, BSA-결합 시트룰린화 MBP 펩타이드. 항-PAD2 (클론 hPAD2-2110) 항체는 인간과 마우스의 PAD2를 탐지하기 위해 사용하였다. 항-MBP는 MBP의 아미노산 82-87 부분에 대한 항체이며, 총 MBP를 탐지하는 용도로 사용하였다.

도 1b는 ELISA에 의해 확인된 바와 같이 마우스 모노클론 항체 아이소타입을 확인한 것이다.

도 1c는 표 2에 기재된 합성 펩타이드를 이용한 ELISA로 결정된 클론 1B8, 3C6 및 1H1의 인식된 시트룰린 부위이다. R, 아르기닌; X, 시트룰린. 숫자는 인간 MBP의 아미노산 위치를 나타낸다.

도 2는 스크래피 감염 마우스에서 R23에서의 MBP 시트룰린화 특이적 축적을 나타낸다. (A) ME7, 22L 및 139A 스크래피 감염 마우스의 뇌에서 클론 1B8, 3C6과 3G5로 웨스턴 블롯하여 MBP 시트룰린화를 평가한 것이다. 총 MBP는 아미노산 82-87 부분에 대한 랫트 모노클론 항-MBP 항체를 이용하여 측정하였다. 클론 1B8에 의해 탐침된 시트룰린화 MBP가 ME7, 22L 및 139A 스크래피 감염 마우스의 뇌에서 15 ~ 20 kDa 사이에 나타난다. 도 2A의 두 번째 패널의 별표는 비특이적 밴드 또는 IgG를 나타낸다. 도 2A의 삼각형은 클론 3G5에 의해 상향 조절된 MBP 밴드를 나타낸다. 클론 3G5-탐침된 블롯에서 MBP R23cit (B; 화살표로 표시됨) 및 18.5kDa 밴드 (C; 삼각형으로 표시됨)는 총 MBP로 표준화되었다. kDa로 표시된 분자량은 왼쪽 측면에 나타내었다.

도 3은 스크래피 감염 마우스에서 MBP R23 시트룰린화 염색이 작은 반점으로 나타남을 보여준다. 대조군의 뇌 절단면 (A-C 및 G-I) 그리고 22L 스크래피 감염 마우스의 뇌 절단면 (D-F 및 J-L)을 랫트 모노클론 항-MBP 항체 (A-F)로 염색하여 MBP를 확인하였고, 클론1B8 항체를 이용하여 R23에서 MBP의 시트룰린화를 확인하였다 (G-L). 작은 네모 안은 높은 배율로 확대한 것이다. 배율 = 4X.

도 4는 MBP R23 시트룰린화를 형광염색한 것이다. 대표적인 형광현미경 사진은 대조군과 22L 스크래피 감염 마우스의 뇌 조직에서 시트룰린화 MBP (적색, MBP R23Cit)와 총 MBP (녹색) 염색을 수행한 결과를 보여준다. 소뇌의 백질 부분은 점선 안쪽이다. 크기 막대 = 20 μ m.

도 5는 크로이츠펠트-야콥병 환자의 전두엽 피질에서 시트룰린화 MBP의 발현을 나타낸다. R25, R122 및 R130에서의 MBP 시트룰린화 발현은 크로이츠펠트-야콥병 환자의 전두엽 피질에서 클론 1B8, 1H1 및 3C6으로 웨스턴 블롯팅하여 평가하였다. 시트룰린화 부위를 포함하는 MBP의 C 말단 부분은 클론 3G5로 탐침하였다. 대조군 1-3 (Control 1-3), 비 크로이츠펠트-야콥병 환자 (non-CJD patients); CJD1-3, 산발성 (sporadic) CJD; CJD4, 가족성 (familial) CJD (V203I). 랫트 모노클론 항-MBP 항체는 총 MBP 탐지에 이용하였다. kDa로 표시된 분자량

은 왼쪽 측면에 나타내었다.

도 6은 크로이츠펠트-야콥병 환자의 뇌조직에서 MBP 발현 프로파일을 나타낸다. (A) 시트룰린화 MBP의 발현 패턴은 클론 1B8 (R25Cit), 1H1 (R122Cit), 3C6 (R130Cit) 및 MBP로 크로이츠펠트-야콥병 환자의 각기 다른 뇌 부분에서 웨스턴 블롯 분석하여 평가하였다. (B) PAD2와 프리온 단백질 (PrP)은 각각 클론 PAD2-2110과 3F4로 탐침하였다. CJD1-3, 산발성 CJD; CJD4, 가족성 CJD (V203I). Fc, 전두엽 피질(frontal cortex); Tc, 측두부 피질 (temporal cortex); Pc, 두정부 피질 (parietal cortex); Oc, 후두부 피질 (occipital cortex). kDa로 표시된 분자량은 왼쪽 측면에 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0046] <인간 시료>

[0047] 인간 뇌 시료는 기초연구원 브레인뱅크 (Institute for Basic Research brain bank; Staten Island, New York)의 Dr. Piotr B. Kozlowski와 CJD 생물안전성 수준 III 부검센터 (한림대학교 부속 성심병원)으로부터 입수하였다. 인간 검체에 대한 자세한 내용은 표 1에 나타내었다. 본 연구는 한림대학교 임상시험심사위원회의 승인을 받았다.

[0049] <동물과 스크래피 감염>

[0050] C57BL/6과 BALB/c 암컷 마우스 (6-8주령)를 구입 (Orient bio, Seongnam, Korea)하였다. 동물실험 및 연구 프로토콜은 한림대학교 임상실험동물 보호 및 이용 위원회의 승인을 받았다. ME7, 22L 및 139A를 주사한 C57BL 마우스 또는 대조군 마우스에서 얻은 1% 뇌 균질액을 PBS (phosphate-buffered saline)에 용해하고, 30 μ l를 마우스 대뇌에 주사하였다. 스크래피 종으로 접종한 후 임상소견이 분병해지는 시기인 150 $\pm$ 10일 후 16.5% 우레탄 하에서 마우스를 희생하였다.

[0051] <모노클론 항체 개발>

[0052] 마우스 모노클론 항체를 개발하기 위하여 시트룰린을 포함하는 인간 MBP의 펩타이드 서열 네 가지를 합성하였다 (PEPTRON, Daejeon, Korea) (표 2). KLH (keyhole limpet hemocyanin)-결합된 펩타이드 (50 μ g)를 완전 또는 불완전 프로트 항원보강제 (Freud's adjuvant) (Sigma)와 함께 BALB/c 마우스에 복강주사하여 면역화하였다 [Jang et al., 2012]. 하이브리도마는 폴리에틸렌글라이콜 1500 (Roche Diagnostics)을 이용하여 마우스 미엘로마 세포주 Sp2/0으로 면역화된 마우스의 비장 세포를 융합하여 제조하였고, 10% 우태혈청 (FBS; Biowest), 4 mM l-글루타민, 4500 mg/L d-글루코스, 피루브산 나트륨, 10 mM HEPES 완충액, 하이포잔틴-아미노프테린-티미딘 보충제 (hypoxanthine-aminopterin-thymidine supplement; GIBCO), 100 units/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신 (GIBCO)을 함유한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 영양세포층과 함께 37 $^{\circ}$ C에서 5% CO₂ 분위기에서 배양하였다. 항체 생산과 특이성을 선별하기 위하여 탄산염-중탄산염 완충액 (Thermo Scientific, Rockford, IL)에 희석한 1 μ g/ml의 시트룰린화 또는 비시트룰린화 MBP 펩타이드를 96-웰 플레이트 (Maxisorp; Nunc) 상에 코팅하고 상온에서 두 시간 동안 또는 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양한 다음 하이브리도마 배지를 위의 플레이트에 넣어 37 $^{\circ}$ C로 한 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 플레이트는 씻고 염소 항-마우스 IgG/IgM/IgA 호스래디쉬 퍼옥시데이즈 (HRP)-결합된 2차 항체 (Millipore or Life Technology)와 함께 배양하였다. 면역활성 신호는 제조자의 권유대로 TMP (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하여 나타내었다. 양성 클론은 20% FBS, 10% NCTC-109 배지, 70% DMEM 배지, 10 mM HEPES pH 7.4, 100 units/ml 페니실린 및 and 100 μ g/ml의 스트렙토마이신, 0.1 mM 하이포잔틴 나트륨 및 16 μ M 티미딘 (GIBCO)을 함유한 배지에서 배양하였다. 항체의 면역글로불린 아이소타입 및 항체 서브클래스는 Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit (Thermo Scientific)를 이용하여 확인하였다.

[0054] <인 비트로 시트룰린화>

[0055] 정제된 인간 MBP (biorbyt, San Francisco, CA, USA) 10 μ g에 0.1 M Tris-HCl pH 7.2, 10 mM Ca^{2+} 및 5 mM 다 이티오프레이트이트 (DTT) 함유 완충액에 용해한 200 ng의 재조합 인간 PAD2 (Origene)를 가하거나 가하지 않고 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 밤새 반응하였다.

[0057] <웨스턴 블롯팅>

[0058] 조직을 균질화하고 용균 완충액 내에서 얼음 위에 한 시간 동안 두어 용균하였다. 용균완충액의 조성은 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% 노닐 페녹시폴리에톡시에탄올-40 (nonyl phenoxypolyethoxylethanol-40), 0.5% 테옥시콜린산 (deoxycholic acid), 1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 및 프로테이즈 억제제 혼합물 (Roche)이다. 16,000g $\times$ 10분간 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 원 심분리하여 용균액을 얻고, BCA (bicinchoninic acid) 단백질 분석 (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 정 량하였다. 용균액은 램리 (Laemmli) 완충액과 혼합하고 SDS-PAGE 상에서 분리한 후 폴리비닐리덴 다이플로라이 드 막으로 이동시켰다. 마우스 항-PAD2 [Shimada N et al., 2010], 랫트 항-MBP (1:10,000; Millipore), 마우스 항-액틴 (1:10,000; Sigma), 염소 항-마우스-HRP (Cell Signaling), 염소 항-토끼-HRP (Cell Signaling), 염소 항-마우스 IgM-HRP (Millipore) 및 염소 항-랫트-HRP (Millipore) 항체는 구입하였다. 화학형광 신호들은 ECL 웨스턴 블롯팅 탐지제 (Enzo Life sciences)를 이용하여 X-선 필름 (Agfa) 상에서 탐지하였다.

[0060] <면역조직화학>

[0061] 중성 완충액을 혼합한 포르말린으로 고정된 뇌를 6 μ m 두께의 절편으로 자르고, 이 절편은 면역조직화학 염색에 이용하였다. 마우스 모노클론 항-Cit-MBP를 포함하는 1차 항체로 배양한 이후, 절편은 세척하고 바이오틴이 결 합된 항-마우스 IgG 또는 항-토끼 IgG와 배양한 다음 ABC 키트 (Vector)를 이용하여 아비딘-바이오틴 퍼옥시데 이즈 복합체와 함께 배양하였다. 절편은 50 mM 트리스 완충액 내의 0.03% DAB (3,3-diaminobenzidine) 및 0.003% H_2O_2 와 함께 반응시켰다. 핵은 헤마톳자일린으로 역염색하고, 최종적으로 절편은 광현미경 (BX51; Olympus)으로 촬영하였다.

[0063] <면역세포화학>

[0064] 면역형광염색을 위하여 조직을 4% 파라포름알데하이드로 고정하고 0.1% Triton X-100을 함유하는 PBS로 침투 가 능하도록 하였다. 랫트 항-MBP 및 마우스 항-시트룰린화 MBP (2-1B8) 항체와 같은 1차 항체에 노출시킨 고정된 조직들은 염소 항-마우스 Alexa Fluor 568 또는 염소 항-랫트 Fluor 488 (Life Technologies)로 표지하고 공초 점 레이저 스캔 현미경으로 촬영하였다 (LS700; Carl Zeiss).

[0066] <통계 분석>

[0067] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 실험군 간의 통계학적으로 유의한 차이는 두 표본 t 검정으로 평가하였다.

[0069] <결과 1: 모노클론 항체 개발>

[0070] MBP 상에서 여섯 개 또는 그 이상의 시트룰린 잔기들의 서열이 결정되었다 (Kim JK et al., 2003; Wood DD and Moscarello MA, 1989). 이들 중 본 발명자들은 일곱 개의 아르기닌 잔기 (R25, R33, R122, R130, R159, R162, and R169)를 선택하고 면역화를 위하여 두 개 또는 세 개의 시트룰린 잔기를 포함하는 합성 펩타이드 서 열을 디자인하였다 (도 1). 면역화된 마우스 유래 비장 B 세포와 SP2/0 미엘로마를 융합한 하이브리도마로부터 네 개의 모노클론 항체를 얻었다 (도 1A). 펩타이드 1에서 생성된 클론 1B8는 인간 및 마우스 MBP 시트룰린화를 특이적으로 인식하였고, 펩타이드 2로부터 생성된 클론 1H1 및 3C6는 각각 인간 MBP 시트룰린화 또는 인간과 마 우스 MBP 시트룰린화 모두를 특이적으로 인식하였다. 펩타이드 4에서 생성된 클론 3G5는 BSA-결합된 시트룰린화 MBP 펩타이드를 특이적으로 인식하였으나, 시트룰린화되지 않은 펩타이드는 인식하지 못하였다. 그러나, 이 항 체는 인 비트로 상에서 시트룰린화된 인간과 마우스의 MBP 및 원래의 MBP를 모두 인식하였다. 펩타이드 3로부터

터 몇 개의 클론이 생성되었으나, 특이적인 클론이 선택되지는 않았다. 1B8, 1H1 및 3C6 클론들의 아이소타입은 IgG1/κ 이고, 클론 3G5의 아이소타입은 IgM/κ 였다 (도 1B). 이들 중 1B8, 1H1 및 3C6 클론들은 시트룰린화 MBP를 특이적으로 인식하였고, 본 발명자들은 이 항체들의 시트룰린 인식 부위를 표 1에 기재된 여러 합성 펩타이드를 이용하여 확인하였다. ELISA 결과, 1B8, 1H1 및 3C6 클론은 R25, R122 및 R130에서 인간 MBP 시트룰린화를 인식하였고, 이 클론들은 R23 및 R128에서 마우스 MBP의 시트룰린화를 인식하였다 (도 1C).

[0072] <결과 2: 스크래피 감염 마우스에서 R23의 MBP 시트룰린화의 특이적인 추적>

[0073] 시트룰린화 MBP는 프리온 질환 (스크래피 감염 마우스 및 CJD 환자), 알츠하이머병, 다발성 경화증을 포함하는 신경퇴행성 질환에서 확인되었다 (Jang B et al., 2010; Ishigami A et al., 2005; Moscarello MA et al., 1994). 클론 1B8 및 3C6은 마우스 MBP의 인 비트로 시트룰린화를 인식하였다. 항체로 인 비보 시트룰린화를 탐지할 수 있는지를 시험하기 위하여 ME7-, 22L- 및 139A-스크래피 감염 마우스 유래 뇌조직에 대하여 면역블롯팅을 수행하였다. MBP R23 시트룰린화는 특이적으로 그리고 유의하게 상향조절되었다 (도 2A와 2B의 맨 위 패널). 그러나, MBP R128 시트룰린화는 스크래피 감염 마우스에서 탐지되지 않았다 (도 2A의 두 번째 패널). 이는 스크래피 감염 중 R128 잔기에서 MBP가 PAD 효소에 잘 반응하지 않음을 말해준다. 클론 3G5는 적어도 세 개의 변이에서 탐지될 수 있다. 흥미롭게도 18.5 kDa 및 21.5 kDa (예상 크기) 변이체는 스크래피 감염 마우스에서 극적으로 증가하였으나 (도 2A 및 2C의 세 번째 패널), 오히려 총 MBP는 대조군보다 약간 낮아졌다 (도 2A의 맨 아래 패널). 이 결과는 신경퇴화 모델에서 클론 3G5가 시트룰린화 변이체를 인식할 수 있음을 제시한다. 종합하면, 클론 1B8 및 3G5는 인 비보에서 시트룰린화된 MBP를 탐지하는데 유용하며, 프리온 감염된 마우스 뇌에서 MBP 과시트룰린화는 새로운 병리학적 발견이다.

[0074] 종래에는 MBP 인산화는 덜 조밀한 미엘린과 관련이 있고, 전체적인 수준은 다발성 경화증 (MS)에서 감소한다고 알려져 있었다 [Kim et al., 2003]. 다음으로 본 발명자들은 스크래피 감염 마우스에서 MBP 시트룰린화가 증가할 때 MBP 인산화가 변화하는지를 시험하였다. 다발성 경화증과 반대로, T95에서 MBP 인산화는 현저히 감소하였고 (도 2B), 이는 프리온 질병에서 MBP가 광범위한 시트룰린화와 인산화를 겪음을 말해준다.

[0076] <결과 3: 스크래피 감염 마우스에서 MBP R23 시트룰린화 균주에는 작은 반점이 형성된다.>

[0077] 본 발명자들은 대조군과 스크래피 감염 마우스 뇌에서 총 MBP와 시트룰린화 MBP에 대하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 먼저 총 MBP에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였다. 오류 음성 데이터를 배제하기 위하여 총 MBP를 탐지하는 에피토프 82-87 (DENPVV)에 대한 MBP 항체를 선택하였다. 이 에피토프 부분은 인산화되지 않았고, 시트룰린화되지도 않았다. 전형적으로 MBP 염색은 뇌 전체에 널리 분포하며, 액손의 관을 섬유 모양으로 염색하며 (도 3A와 3D), 소뇌 백질을 진하게 염색한다 (도 3B와 3E). 특히, 줄무늬체에서 섬유 다발이 진하게 염색되었다 (도 3C와 3F). 그러나, 대조군과 22L-스크래피 감염 조직 간에 유의한 차이는 발견할 수 없었다.

[0078] 다음으로 우리는 클론 1B8을 이용하여 시트룰린화 MBP 염색을 수행하였다. 시트룰린화 MBP는 진한 작은 반점으로 보였는데, 이것은 22L-스크래피 감염 조직에서 뇌량 (corpus callosum) 부분, 소뇌의 백질 및 섬유 다발에서 관찰되었다 (도 3J-L). 대조군 소뇌에서 양성 점이 관찰되었으나, 대조군 해마와 줄무늬체에서는 신호가 관찰되지 않았다 (도 3G-I). 유사한 결과가 ME7- 및 139A-감염 마우스에서 얻어졌다 (데이터 나타내지 않음).

[0079] 다음으로, 시트룰린화 MBP가 총 MBP 발현 부분과 공존하는지를 면역형광염색으로 시험하였다. 면역조직화학 염색결과와 유사하게 시트룰린화 MBP는 작은 반점과 같이 양성으로 염색되었고, 이 양성신호는 주로 스크래피 감염 마우스의 담창구 (globus pallidus) (관상단, 줄무늬체 근처), 줄무늬체 및 소뇌 백질에 위치한다 (도 4). 이러한 결과들은 클론 1B8이 스크래피 감염 마우스의 특정 부분에 있는 시트룰린화 MBP를 특이적으로 인식함을 말해준다.

[0081] <결과 4: sCJD 환자 뇌조직에서 증가된 MBP 시트룰린화>

[0082] MBP 시트룰린화가 CM52 양이온 교환수지 컬럼을 이용하여 MS 뇌의 백질에서 분리된 이후, 시트룰린화 MBP 변이체는 인간 시료에서 면역 블롯팅 또는 ELISA로 나타나지 않았는데, 그것은 이용 가능한 특이적인 항체가 생성되지 않았기 때문이다. 다음으로 본 발명자들은 정상인, CJD 환자 및 알츠하이머 환자의 전두엽 피질에서 MBP 시트룰린화를 시험하였다. 도 5와 같이, 클론 1B8 항체는 CJD 환자 네 사람 중 세 사람의 MBP에서 R25가 높은 수

준으로 시트룰린화되었음을 보여주었다. 시트룰린화 MBP R122 (클론 1H1)는 CJD 환자에서 현저히 축적되었다. 특히, MBP R122 시트룰린화는 CJD 환자 1번과 4번의 R25와 비교할 때 좀 더 특이적인 부위인 것으로 보인다. MBP R130 시트룰린화도 확인되었으나 CJD 네 환자 중 세 환자에서 약하게 탐지되었다.

[0083] 반대로, 비-CJD 환자 대조군에서는 MBP의 R25, R122 및 R130에서 시트룰린화가 관찰되지 않았다. 스크래피 감염 마우스와 유사하게 클론 3G5는 MBP의 시트룰린화 또는 비시트룰린화 C-말단 부분 (17.3 kDa 및 18.5 kDa 변종)을 모두 인식하였고, 모든 시료에서 MBP가 충분히 발현되었음에도 불구하고 대조군과 비교하여 모든 CJD 환자에서 18.5 kDa 변종의 광범위한 면역반응성이 관찰되었다.

[0085] <결과 5: CJD 환자의 백질에서 MBP의 강한 시트룰린화가 관찰되었다.>

[0086] 위에서 본 발명자들은 CJD 1번 환자의 경우 몇몇 아르기닌 잔기가 시트룰린화되지 않거나 또는 탐지되지 않았고, R130을 포함하는 아르기닌 잔기들이 잘 시트룰린화되지 않음을 보여주었다. MBP가 총 미엘린 단백질의 30~35%를 차지하고 중추신경계 백질이 미엘린의 절반이기 때문에 [Morell P and Quarles RH, 1999], 이러한 결과는 MBP의 농도가 다르기 때문일 수 있다. 다음으로, 본 발명자들은 CJD 환자의 분할된 뇌조직 간에 MBP 시트룰린화 수준이 다른지를 시험하였다. CJD 1번 환자의 전두엽 피질에서는 MBP R25의 시트룰린화가 관찰되지 않았으나 (도 5), 두정부 피질과 연수에서는 MBP R25의 시트룰린화가 우세하였고, 연수에서는 다중의 MBP R25 시트룰린화가 관찰되었다 (도 6A). MBP R25 시트룰린화는 다른 부분과 비교하여 두정부 피질, 해마 및 연수에서 광범위하게 관찰되고 높게 나타났으며, R130 잔기의 시트룰린화는 연수에서 높게 나타났다.

[0087] 2번 CJD 환자에서는 두정부 피질, 중뇌 및 연수 부분에서 MBP R25, R122 및 R130 잔기에 현저한 시트룰린화가 일어났다. 다른 환자들과 비교하여 MBP의 광범위한 시트룰린화는 3번 CJD 환자에게서 관찰되었다. 특히, 시트룰린화된 MBP 변종은 중뇌, 시상 및 연수에 축적되었다. 마지막으로 4번 CJD 환자 (가족성 CJD, V203I)는 중뇌, 시상 및 연수에서 광범위한 MBP 시트룰린화를 나타내었다. 비록 MBP 발현이 해마 및 소뇌와 같은 몇몇 구역에 적합하지만, 시트룰린화는 약하게 관찰되었다. 이는 시트룰린화가 반드시 MBP 발현을 대표하는 것은 아님을 말해준다. 그럼에도 불구하고, 이러한 결과는 CJD 환자의 백질에서 MBP 시트룰린화가 자주 일어남을 제시한다.

[0088] 다음으로 우리는 MBP 시트룰린화 정도가 PAD2 발현과 상관관계가 있는지를 시험하였다. 비록 다른 부분과 비교하여 대부분의 중뇌, 시상 및 연수에서 PAD2 발현이 높았지만, 피질 부분의 PAD2 발현도 유사하였다 (도 6B). 이는 PAD2가 CJD의 다른 부분보다 백질에서 좀 더 활성이 높음을 암시한다. 다음으로, 본 발명자들은 PrP^C 발현을 확인하였는데, 이는 PrP^C가 미엘린을 유지하는 것으로 알려져 있기 때문이다 [Nishida N et al., 1999; Bremer J et al., 2010]. 도 6B와 같이, 고농도의 PrP^C가 피질 부분에서 발견되었고, 낮은 농도의 PrP^C는 중뇌, 시상 및 연수에서 발현되었다. 이 결과는 MBP 시트룰린화 수준이 PrP^C 농도와 관련이 있음을 말해준다.

[0090] <결과 6: 세 개의 모노클론 항체 중쇄 및 경쇄의 항원 인지부분 서열>

[0091] 위에서 제조한 세 개의 모노클론 항체 중쇄 및 경쇄의 항원 인지부분을 시퀀싱한 결과는 다음과 같다.

[0093] 3C6 중쇄 가변영역 (115 a.a.)(서열번호 1)

[0094] Val-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Lys-Leu-Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Thr-Tyr-Trp-Met-His-Trp-Val-Lys-Gln-Arg-Pro-Gly-Gln-Gly-Leu-Glu-Trp-Ile-Gly-Asp-Ile-Asn-Pro-Ser-Asn-Gly-Arg-Thr-Asn-Tyr-Ser-Glu-Ile-Phe-Lys-Asn-Lys-Ala-Thr-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Ser-Ser-Thr-Ala-Tyr-Met-Gln-Leu-Ser-Ser-Leu-Thr-Ser-Glu-Asp-Ser-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Arg-Gly-Gly-Pro-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Thr-Leu-Thr-Val-Ser-Ser-Ala-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Ser-Val-Tyr-Arg-Ser-Ser

[0096] 3C6 경쇄 가변영역 (111 a.a.)(서열번호 2)

[0097] Ser-Leu-Gly-Asp-Gln-Ala-Ser-Ile-Ser-Cys-Arg-Ser-Ser-Gln-Ser-Ile-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-Glu-Trp-Tyr-Leu-Gln-Lys-Pro-Gly-Gln-Ser-Pro-Lys-Leu-Leu-Ile-Tyr-Lys-Val-Ser-Asn-Arg-Phe-Tyr-Gly-Val-

Pro-Asp-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Asp-Phe-Thr-Leu-Lys-Ile-Ser-Arg-Val-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gly-Val-Tyr-Tyr-Cys-Phe-Gln-Gly-Ser-His-Val-Pro-Pro-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Ala-Asp-Ala-Ala-Pro-Thr-Val-Ser-Ala-Cys-Thr

[0099] 1B8 중쇄 가변영역 (123 a.a.)(서열번호 3)

[0100] Ala-Arg-Pro-Trp-Ala-Ser-Val-Lys-Ile-Ser-Cys-Gln-Ala-Phe-Tyr-Thr-Phe-Ser-Arg-Arg-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile-Arg-Asp-Thr-Lys-Tyr-Met-Gln-Trp-Ile-Lys-Gln-Arg-Pro-Gly-Gln-Gly-Leu-Gln-Trp-Ile-Gly-Thr-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Lys-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu-Thr-Ala-Asp-Lys-Ser-Ser-Ser-Thr-Ala-Tyr-Ile-Gln-Leu-Ser-Ser-Leu-Thr-Ser-Glu-Asp-Ser-Ala-Val-His-Tyr-Cys-Ala-Pro-Thr-Met-Val-Thr-Thr-Val-Cys-Leu-Leu-Gly-Pro-Arg-Asp-Ser-Gly-His-Cys-Leu-Cys-Ser-Gln-Asn-Asp-Thr-Pro-Ile-Cys-Leu

[0102] 1B8 경쇄 가변영역 (111 a.a.)(서열번호 4)

[0103] Ser-Ser-Met-Tyr-Ala-Ser-Leu-Gly-Glu-Arg-Val-Thr-Ile-Thr-Cys-Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Ile-Asn-Ser-Tyr-Leu-Thr-Trp-Phe-Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Lys-Ser-Pro-Lys-Thr-Leu-Ile-Tyr-Arg-Ala-Asn-Arg-Leu-Val-Gly-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Gln-Asp-Tyr-Ser-Leu-Thr-Ile-Ser-Ser-Leu-Asp-Tyr-Glu-Asp-Met-Gly-Ile-Tyr-Tyr-Cys-Leu-Gln-His-Asp-Glu-Phe-Pro-Pro-Thr-Ser-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Ala-Asp-Ala-Ala-Pro-Thr-Val-Ser-Ala-Cys-Thr

[0105] 1H1 중쇄 가변영역 (117 a.a.)(서열번호 5)

[0106] Val-Met-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Lys-Ile-Ser-Cys-Lys-Thr-Gln-Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Glu-Tyr-Thr-Met-His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-His-Gly-Lys-Ser-Leu-Glu-Trp-Ile-Gly-Thr-Ile-Asn-Pro-Lys-Asn-Gly-Asp-Ala-Arg-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Arg-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Ser-Ser-Thr-Ala-Tyr-Met-Glu-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Ser-Glu-Asp-Ser-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Thr-Leu-Asp-Leu-Tyr-Phe-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Thr-Leu-Thr-Val-Ser-Ser-Ala-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Ser-Val-Tyr-Arg-Ser-Ser

[0108] 1H1 경쇄 가변영역 (111 a.a.)(서열번호 6)

[0109] Thr-Ile-Gly-Gln-Pro-Ala-Ser-Ile-Ser-Cys-Lys-Ser-Ser-Gln-Ser-Leu-Leu-His-Ser-Asn-Gly-Lys-Thr-Tyr-Leu-Asn-Trp-Leu-Leu-Gln-Arg-Pro-Gly-Gln-Ser-Pro-Lys-Arg-Leu-Ile-Tyr-Leu-Val-Ser-Lys-Leu-Asp-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe-Thr-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Asp-Phe-Thr-Leu-Lys-Ile-Ser-Arg-Val-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gly-Val-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Gln-Gly-Thr-His-Phe-Pro-Leu-Thr-Phe-Gly-Ala-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Leu-Lys-Arg-Ala-Asp-Ala-Ala-Pro-Thr-Val-Ser-Ala-Cys-Thr

[0111] MBP 시트룰린화는 다발성 경화증, 프리온 질환, 알츠하이머병 및 외상에 의한 뇌 손상 같은 중추신경계 질환에서 자주 보고되고 있다 [Moscarello MA et al., 1994; Ishigmai et al., 2005; Jang et al., 2008, 2010]. 본 발명에서 우리는 신경퇴행성 프리온 질환 모델과 환자에서 MBP 시트룰린화 정도를 연구하였다. Cit25, Cit122 및 Cit130을 포함하는 MBP 펩타이드에 대한 모노클론 항체는 시트룰린화 MBP의 발현과 분포를 시험하는데 이용할 수 있다. 또한, 본 발명자들의 연구는 다음과 같은 질문에 대한 가능한 답을 제시한다: 1) MBP 시트룰린화는 언제 일어나는가? 2) MBP 시트룰린화는 다발성 경화증에 특이적인가? 그리고 3) MBP 시트룰린화는 신경퇴행성 질환에 유용한 마커인가?

[0112] 선행 연구는 C8 요소가 다발성 경화증 환자에서는 45%를 차지하지만, 정상인, 알츠하이머병, 근위축성 측색 경화증 및 파킨슨병과 같은 다른 환자들에서는 20%를 기록했다고 밝혔다 [Moscarello MA et al., 1994]. 본 발명자들은 대조군과 비교하여 CJD 환자와 스크래피 감염 뇌에서 MBP 시트룰린화가 현저히 증가하였음을 밝혔고, 그리하여 MBP 시트룰린화가 프리온 병인과 관련이 있음을 제시하였다. 본 발명자들은 MBP 시트룰린화 중 세 개의 다른 부위 즉, R25, R122 및 R130만 확인하였으나, 시트룰린화는 적어도 R25, R49, R54, R65, R97, R122, R130

및 R162에서 일어난다 [Moscarello MA et al., 1994; Kim JK et al., 2003]. 시트룰린을 포함한 MBP의 총 변이 정도는 마버그형 (Marburg's type) 다발성 경화증과 같은 심한 탈수초화 질병의 원인이 되는 것으로 보인다 [Wood DD et al., 1996]. 또한, 우리는 프리온 질병의 T95에서 MBP 인산화가 증가하는 것을 밝혔다 (도 2). MBP는 MAPKs에 의해 인산화되는데 [Erickson AK et al., 1990; Hirschberg D et al., 2003], 인산화도 프리온 질병에서 활성화된다 [Lee HP et al., 2005]. 그러므로, 이 발견은 신뢰할 만하다. 종합하면, MBP의 시트룰린화 및 인산화는 모두 MBP의 순 양전하를 감소시키며, 이는 프리온 질환에서 미엘린 기능 상실 및 불안정한 구조의 강력한 증거가 될 수 있다.

[0113] 본 발명에서 우리는 표 2에 기재된 것과 같이 시트룰린 포함 MBP의 16 a.a C-말단에 대한 IgM 항체 MBP_CP4를 발명하였다. 이 항체는 적어도 세 개의 변이체 (17.3 kDa, 18.5 kDa 및 >25kDa)를 탐지할 수 있고, 비 CJD와 비교하여 CJD 환자에서는 18.5 kDa 변이체가 현저히 발현된 반면, 다른 IgG1 항체에 의해 탐지되는 R25, R122 및 R130에서의 MBP 시트룰린화는 각 CJD 환자의 전두엽 피질에서 다양하게 나타났다 (도 4). 이 패턴과 유사하게, MBP의 18.5 kDa 및 21.5kDa 변이체가 스크래피 감염 마우스에서 현저히 증가하였고 (도 2), 이는 클론 3-3G5가 신경퇴행성 질환을 진단 평가하는데 유용한 도구가 될 수 있음을 말해준다. 그러나, 이 클론이 BSA 결합 시트룰린 함유 MBP 펩타이드만 탐지함에도 불구하고 왜 클론 3-3G5 IgM 항체가 정제된 인간 MBP 또는 PAD 처리 MBP를 동량 탐지하는지는 분명하지 않다 (도 1).

[0114] MBP는 중추신경계 미엘린에 풍부한 단백질이며 액손 트랙을 따라 섬유상으로 형성된다. 우리는 대조군과 스크래피 감염 뇌에서 MBP 염색이 차이를 나타내지 않고 전형적인 패턴을 보임을 밝혔다 (도 3). 반면, MBP 시트룰린화는 스크래피 감염 마우스에서 작은 반점의 집중을 일으킨다. 소뇌에서, 이러한 작은 반점의 집중은 주로 백질에 일어난다. 또한, MBP의 시트룰린화 형태는 섬유 묶음에서 분명하게 발견되었다. 웨스턴 블롯팅과 유사하게, MBP R23 시트룰린화의 축적과 분포는 ME7, 22L 및 139A 스크래피 종 간에 차이가 없었다. 이 결과는 본 발명의 새로운 항체를 프리온 질환을 포함하는 신경퇴행성 질환의 MBP 분포와 패턴 염색 조사에 응용할 수 있음을 제시한다.

[0115] 본 발명자들은 비 CJD와 CJD 환자들의 전두엽 피질에서 시트룰린화 MBP의 발현 패턴을 연구하였는데, 그것은 이 실험에서 입수 가능한 시료에 제한이 있기 때문이다. 우리는 스크래피 감염 마우스와 유사하게 CJD 환자의 MBP가 R25, R122 및 R130에서 시트룰린화되었음을 확인하였다 (도 4). 그러나, 이 아르기닌 잔기들은 1번 CJD 환자의 전두엽 피질에서는 거의 시트룰린화되지 않았다. 본 발명자들은 MBP 시트룰린화가 피질보다는 백질 부분에서 자주 일어날 것으로 생각하였다. 예상했던 대로, MBP 시트룰린화는 피질, 해마 및 소뇌보다는 중뇌 및 연수에서 주로 일어났다 (도 5). 몇 부분 중 시트룰린화된 MBP는 일반적으로 연수에 축적되었고, 세 환자의 경우는 중뇌 및 시상에서 높은 MBP 시트룰린화 농도를 나타내었다. 이 결과는 이 실험에서 MBP 시트룰린화가 CJD 환자의 백질 부분에서 주로 일어남을 말해준다. 흥미롭게도 PAD2 발현은 MBP 시트룰린화 정도와 상관관계가 없었다 (도 5B). 이 발견은 PAD 활성화 환경이 이들 구역에서 바람직하며, MBP는 PAD 효소에 잘 노출됨을 가리킨다.

[0116] 프리온 질병이 질병 관련 프리온 단백질 (PrP^{Sc}) 축적과 더불어 공포 형성, 신경 사멸 및 아교세포 활성화로 특징지어지는 반면 [Colby DW and Prusiner SB, 2011], MS는 미엘린 및 액손의 손상을 수반하는 뇌와 척수의 만성 신경염증성 질환이라는 특징을 나타낸다 [Dendrou CA et al., 2015]. 달리 표현하면, MBP 시트룰린화는 프리온 질환에서보다는 탈수초화 질환인 MS에서 좀 더 특이적으로 나타나는 것으로 보인다. 산발성 CJD에서 CNS 탈수초화가 일어나지만 [Caverzasi E et al., 2014], CJD에서 왜 수초화가 일어나는지는 아직 밝혀지지 않았다. PrP^{C} 의 감소가 탈수초화의 원인이라고 제안할 수 있는데, 이는 PrP^{C} 가 미엘린 유지에 필수적이기 때문이다 [Nishida N et al., 1999; Bremer J et al., 2010]. 우리는 또한 백질 부분에서의 낮은 PrP^{C} 농도도 확인하였다 (도 5B). 본 발명자들은 프리온 질환에서 현저한 MBP 시트룰린화가 탈수초화 변화를 증명하는 것이라고 제안한다.

[0117] PAD 활성화를 위해서는 인 비트로 또는 인 비보에서 고농도의 Ca^{2+} 가 필수적이다. 달리 말하면, 시트룰린화 단백질의 출현은 세포 항상성의 격한 변화를 반영한다. 본 발명자들 및 다른 연구 그룹은 MBP가 PAD에 취약함을 발견하였다 [Ishigami A et al., 2005; Jang B et al., 2008, 2010; Moscarello MA et al., 1994]. 그러나, 왜 MBP가 시트룰린을 선호하는지는 여전히 이해되지 못하고 있다. 이런 맥락에서 본 발명자들은 MBP 시트룰린화를 구조적으로 그리고 환경적으로 고찰한다: 1) 단순히, MBP는 충분한 아르기닌 잔기로 이루어져 있고 백질에서 풍부하게 발현된다; 2) 많은 번역후 변형은 질병 부위를 선호한다 [Gao J and Xu D, 2012]. 그러므로, 본질적으로 질병 단백질인 MBP는 시트룰린화에 영향을 쉽게 받고, 즉 PAD 활성화 부위에 노출되기 쉽다; 3) CNS 미엘린은

PAD2와 Ca^{2+} ATPase를 발현한다 [Jahn O et al., 2009]; 4) 뇌손상에 대한 반응으로, NMDA 글루타메이트 수용체 매개 Ca^{2+} 축적은 미엘린 손상을 개시한다 [Micu I et al., 2006]. 따라서, MBP 시트룰린화는 뇌 손상 하에서 피할 수 없는 과정이다.

[0118] 앞서 언급한 바와 같이, 구조, 결합력 및 단백질분해 동역학과 같은 MBP의 생물학적 특성은 시트룰린화에 의해 변화한다 [Vossenaar ER et al., 2003; Boggs JM, 2006; Moscarello MA and Musse AA, 2007; Harauz G et al., 2009]. 그러므로, 시트룰린화는 의심의 여지 없이 MS 발병을 증명하는 표장이다. PAD 저해제를 이용한 PAD 표적화는 PAD 활성화와 탈수초화 마우스를 포함하는 질병모델의 시트룰린화 수를 감소시켜 질병의 진행, 중증도 및 임상 소견을 개선한다 [Moscarello MA et al., 2013]. 불행하게도, 인 비보 모델에서 PAD 저해제 처리에 의한 MBP 시트룰린화 정도는 평가하지 않았다. 탈수초화 모델에서 PAD 저해제를 처리하는 경우 MBP 시트룰린화 정도가 감소하는지는 항시트룰린화 항체를 이용하여 앞으로 연구가 필요하다.

[0119] 요약하면, 항-시트룰린화 MBP 항체는 탈수초화 판단에 유용한 도구가 될 것이다. 프리온 질환에서 MBP는 현저히 시트룰린화되며, 이는 비정상적 뉴런 활성화에 기여하는 것으로 보인다. MBP 시트룰린화는 신경의 질병상태를 반영하므로, 이러한 변형은 신경퇴행성 질환의 진단 마커로 유용하다.

표 1

No.	Diagnosis	Sex	Age	Brain weight (g)	PMI (hour)
CNT1	Control	M	83	1220	12.0
CNT2	Control	M	86	1100	2.5
CNT3	Control	M	71	1225	7.0
CJD1	Sporadic CJD	M	77	1600	2.5
CJD2	Sporadic CJD	M	49	1150	120
CJD3	Sporadic CJD	F	66	1380	13.0
CJD4	Familial CJD	F	66	1450	13.5

[0120] PMI, Post-mortem interval. Control specimens are non-CJD and non-AD.

표 2

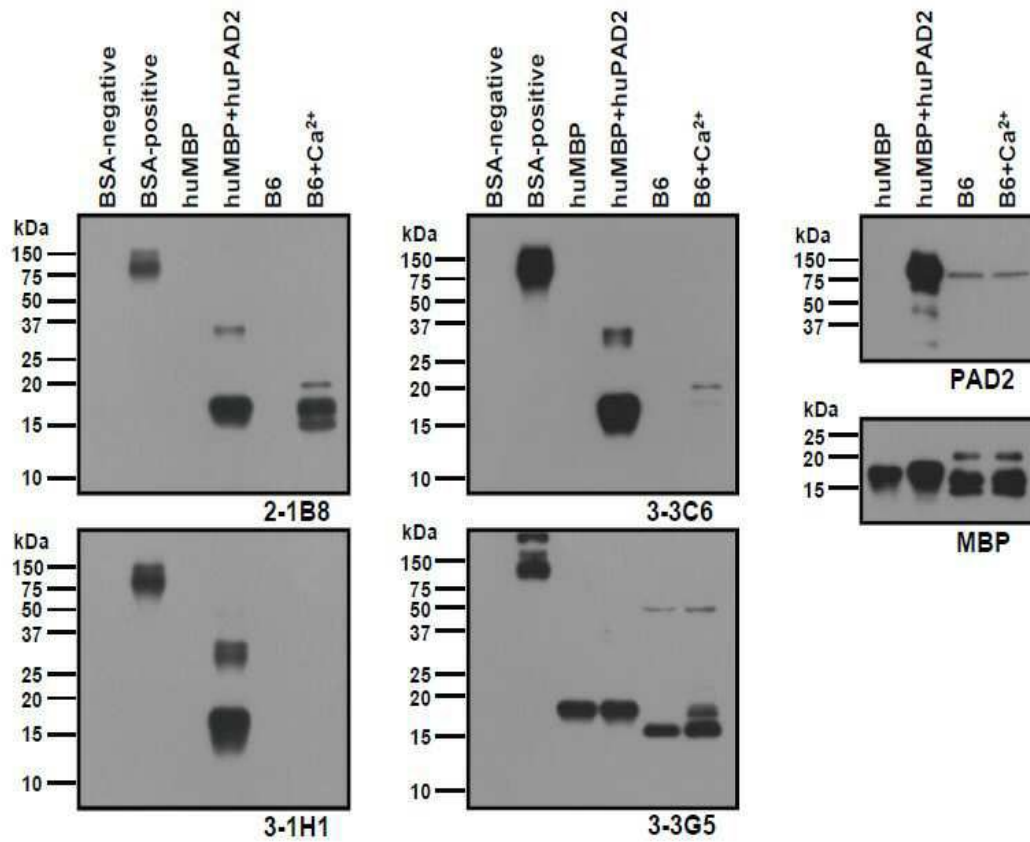
Group	Peptide	Sequence	Applications
1	MBP_PEP1	CMDHARHGFLPRHRDTGIL	ELISA
	MBP_CP1	CMDHAXHGFLPRHXDTGIL	Immunization, ELISA
	MBP_CP1-1	CMDHAXHGFLPRHRDTGIL	ELISA
	MBP_CP1-2	CMDHARHGFLPRHXDTGIL	ELISA
2	MBP_PEP2	CAEGQRPFGYGGGRASDYK	ELISA
	MBP_CP2	CAEGQXPFGYGGGXASDYK	Immunization, ELISA
	MBP_CP2-1	CAEGQXPFGYGGGRASDYK	ELISA
	MBP_CP2-2	CAEGQRPFGYGGGXASDYK	ELISA
3	MBP_PEP3	CKLGGRDSRSGSPMARR	ELISA
	MBP_CP3	CKLGGXDSRSGSPMAXR	Immunization, ELISA
	MBP_CP4	CKLGGXDSXSGSPMAXR	Immunization, ELISA

X, citrulline. C, cysteine residue at the front was used for carrier (KLH or BSA) conjugation.

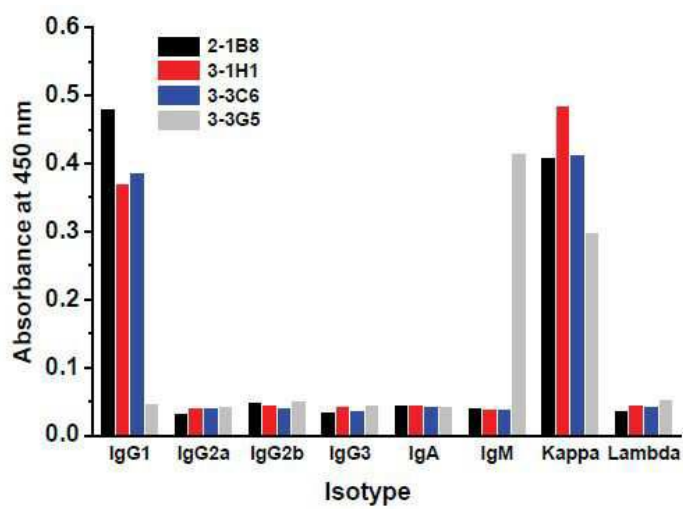
[0121]

도면

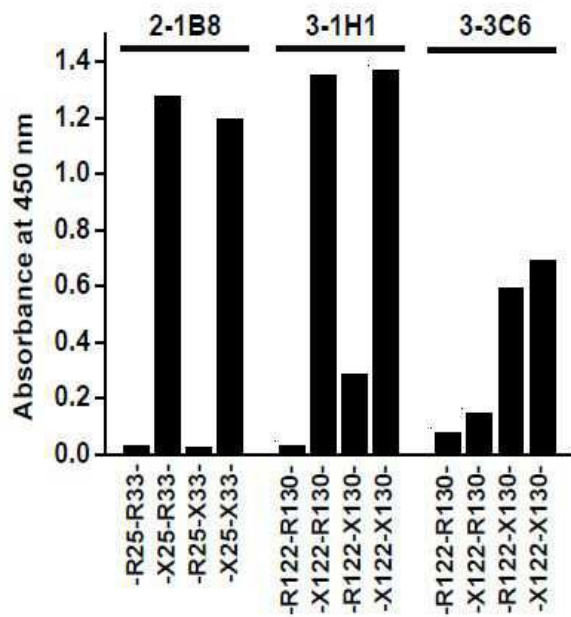
도면1a



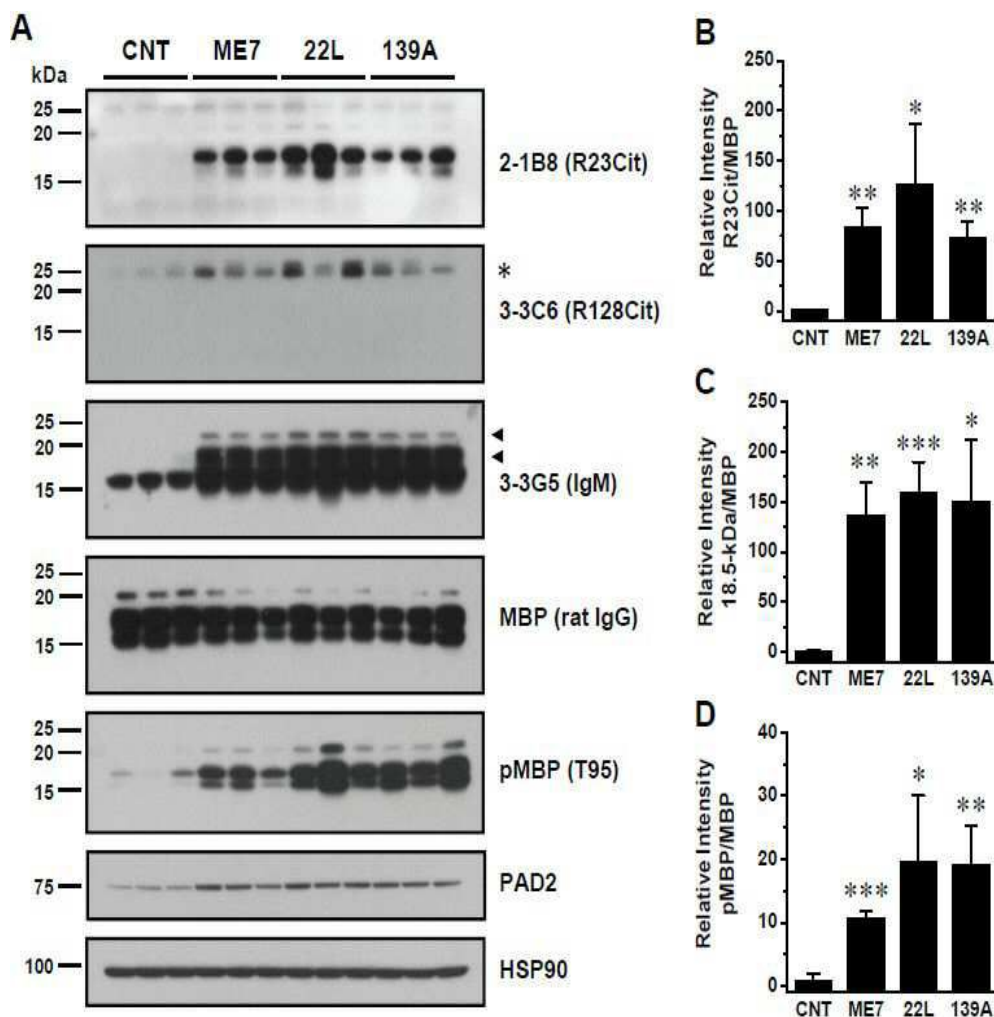
도면1b



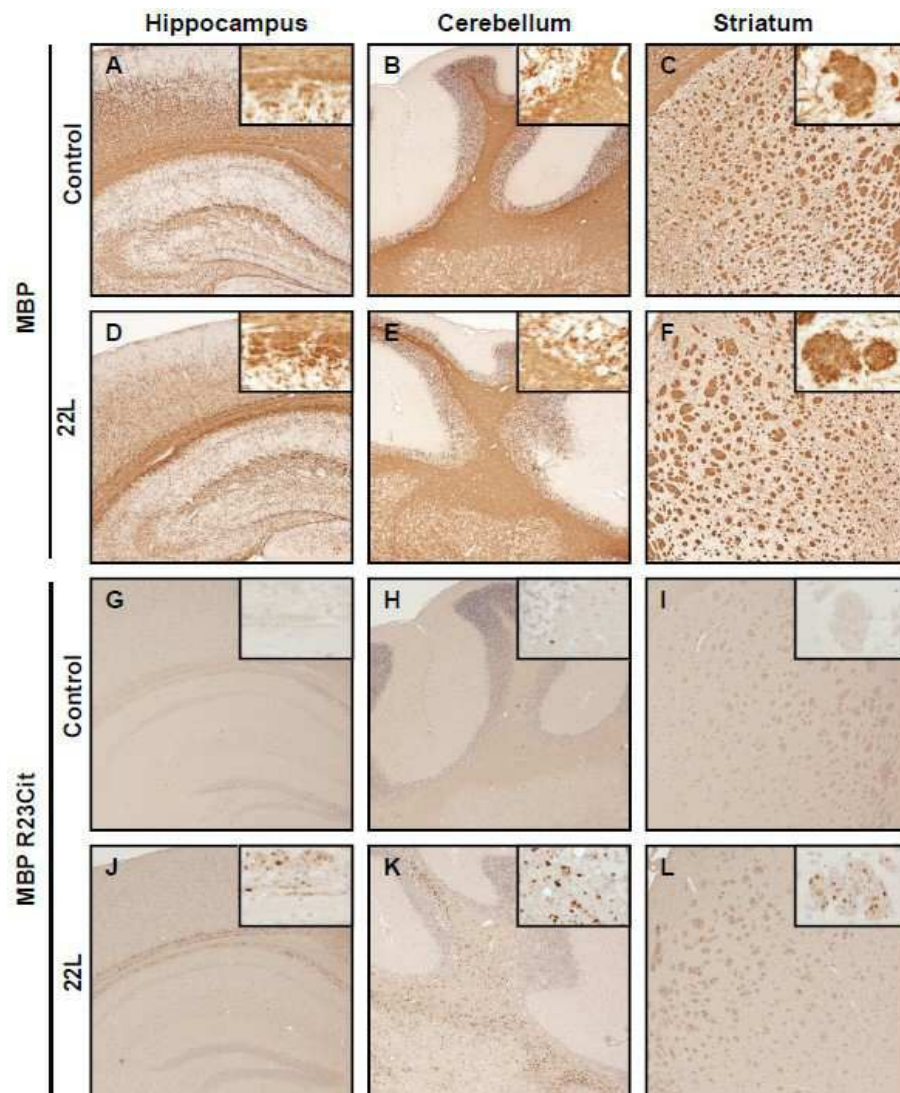
도면1c



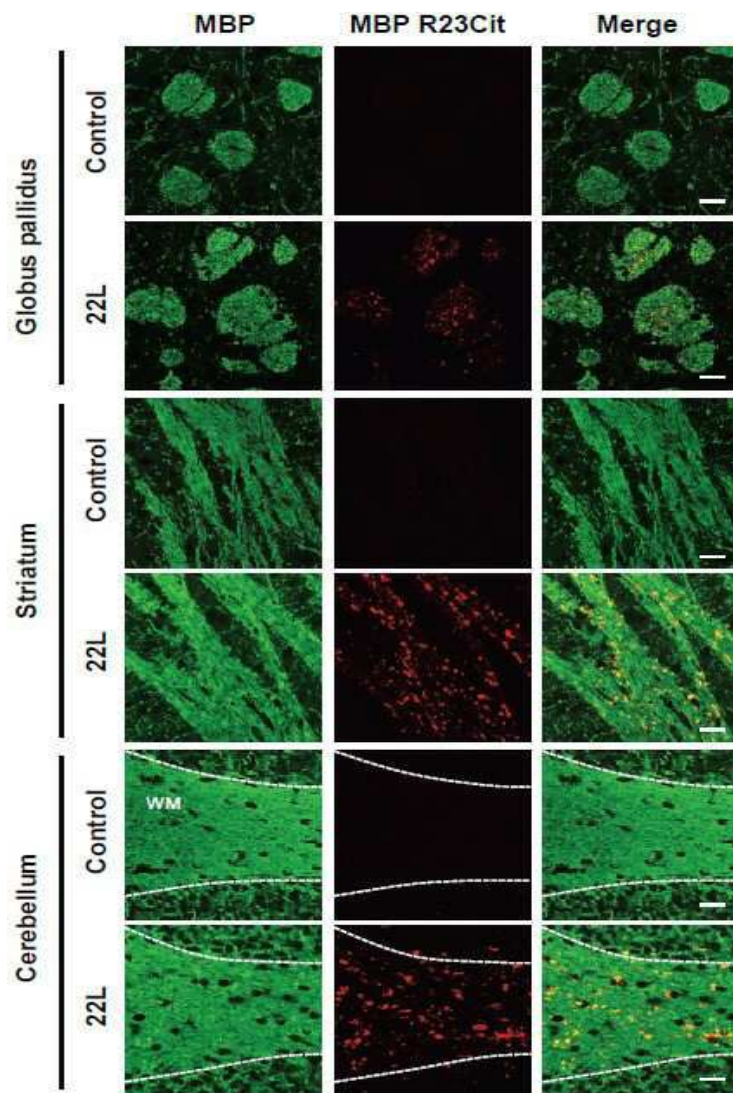
도면2



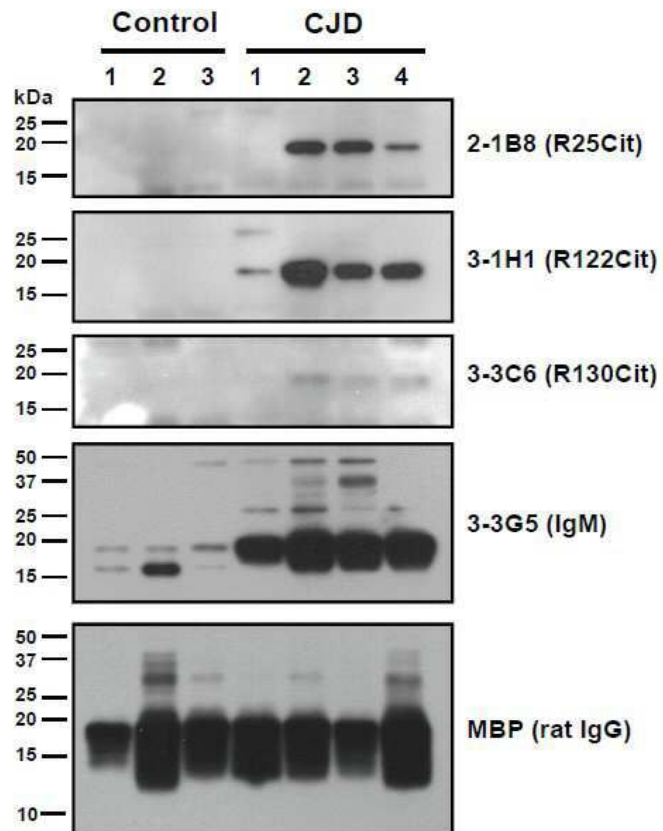
도면3



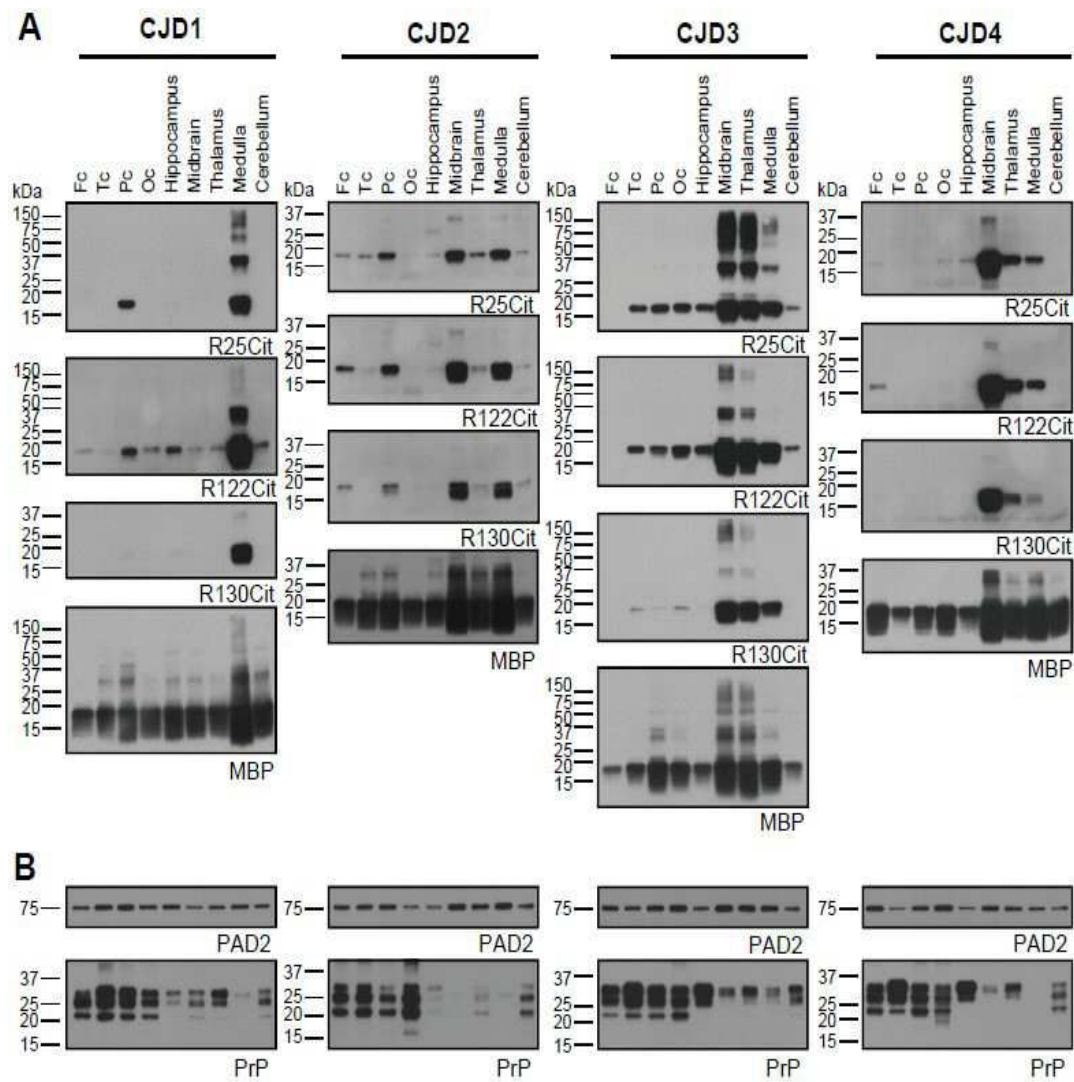
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Anti-citrullinated myelin basic protein monoclonal antibodies and diagnostic kit for neurodegenerative diseases using thereof
- <130> HallymU-citrullinatedMBPAb-160809
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 115
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 3C6 heavy chain variable region
- <400> 1

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
20 25 30

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn
35 40 45

Tyr Ser Glu Ile Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
50 55 60

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
65 70 75 80

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

85 90 95

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
100 105 110

Arg Ser Ser

115

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C6 light chain variable region

<400> 2

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
1 5 10 15

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

20 25 30

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Tyr
35 40 45

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
50 55 60

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
65 70 75 80

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
85 90 95

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ala Cys Thr
100 105 110

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1B8 heavy chain variable region

<400> 3

Ala Arg Pro Trp Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Gln Ala Phe Tyr Thr

1 5 10 15

Phe Ser Arg Arg Val Tyr Phe Ala Ile Arg Asp Thr Lys Tyr Met Gln

20 25 30

Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile Gly Thr Ile

35 40 45

Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys

50 55 60

Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Leu

65 70 75 80

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Pro Thr

85 90 95

Met Val Thr Thr Val Cys Leu Leu Gly Pro Arg Asp Ser Gly His Cys

100 105 110

Leu Cys Ser Gln Asn Asp Thr Pro Ile Cys Leu

115 120

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1B8 light chain variable region

<400> 4

Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys
 1 5 10 15
 Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro
 20 25 30
 Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Gly
 35 40 45
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys
 65 70 75 80
 Leu Gln His Asp Glu Phe Pro Pro Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 85 90 95
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ala Cys Thr
 100 105 110

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1H1 heavy chain variable region

<400> 5

Val Met Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Gln Gly Tyr
 1 5 10 15
 Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys
 20 25 30
 Ser Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Ala Arg
 35 40 45
 Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
 50 55 60
 Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 65 70 75 80
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Leu Asp Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 85 90 95

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

100

105

110

Val Tyr Arg Ser Ser

115

<210> 6

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1H1 light chain variable region

<400> 6

Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

1

5

10

15

Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro

20

25

30

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

35

40

45

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

50

55

60

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

65

70

75

80

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu

85

90

95

Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ala Cys Thr

100

105

110