



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0107967
(43) 공개일자 2019년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/3046 (2013.01)
G01N 33/57446 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2018-0029352
(22) 출원일자 2018년03월13일
심사청구일자 2018년03월13일

(71) 출원인
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박지원
세종특별자치시 달빛로 135, 605동 1003호(상록어
울림아파트 6단지)
장대영
서울특별시 서초구 신반포로 9, 반포아파트 76동
203호
박병권
강원도 춘천시 후석로228번길 24, 209동 102호(석
사2지구아파트)
(74) 대리인
조정환

전체 청구항 수 : 총 8 항

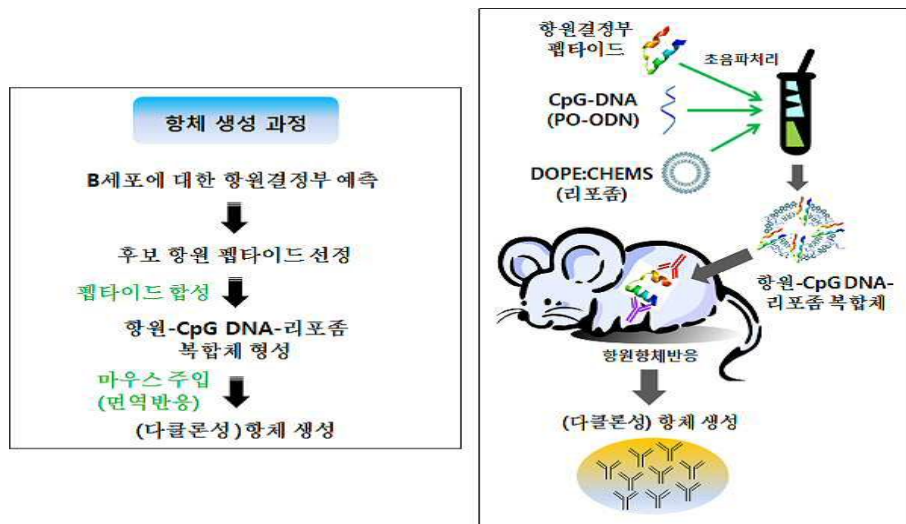
(54) 발명의 명칭 **한국인 위암 연관 유전자 단클론 항체 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 위암과 관련 있는 RNF43 유전자를 이용한 항체 및 이의 용도에 관한 것으로서, 상기 단클론 항체는 RNF43 항원펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체를 이용하여 위암진단에 사용할 수 있다.

또한, 본 발명의 항원 펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체로 제작된 단일클론 항체는 항체 생산 및 백신개발의 비용 및 시간을 단축시킬 수 있으며, 제작이 까다로운 항체도 용이하게 발명할 수 있다는 장점이 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 15182 한임평 512

부처명 식품의약품안전처

연구관리전문기관 독성평가연구부 임상연구과

연구사업명 주요사업

연구과제명 한국인 특이적 위암 원인유전자 발굴 및 표적치료제 선별 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2017.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제1번 내지 제6번으로 표시되는 아미노산 서열 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 항원 펩타이드를 포함하여 형성되는 것을 특징으로 하는 위암 진단을 위한 단클론 항체

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 아미노산 서열 1번 내지 6번 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 항원 펩타이드를 이용하여 항원 펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체를 형성하여 사용하는 것을 특징으로 하는 위암 진단을 위한 단클론 항체

청구항 3

RNF43 단백질을 이용하여 항원 펩타이드로 이용가능한 부위를 선정하는 단계: 상기 선정된 항원 펩타이드와 CpG-DNA-리포좀 복합체를 결합하는 단계: 상기 결합된 복합체를 마우스에 주입하여 B세포를 획득하는 단계: 상기 B세포를 종양세포와 융합하여 융합세포를 획득하는 단계: 상기 융합세포를 선별하고 클로닝하는 단계: 및 상기 클로닝한 세포를 이용하여 단클론 항체를 획득하는 단계를 포함하는 위암진단을 위한 단클론 항체의 제조방법

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 종양세포는 골수종 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 위암진단을 위한 단클론 항체의 제조방법

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 항원 펩타이드는 서열번호 1번 내지 6번 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 위암진단을 위한 단클론 항체의 제조방법

청구항 6

제 1항 또는 제 2항의 단클론 항체를 포함하여 이루어지는 위암 진단을 위한 키트.

청구항 7

위암에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 서열목록 제1번 내지 제6번으로 표시되는 아미노산 서열 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 항원 펩타이드를 포함하여 형성되는 단클론 항체를 이용하는 것을 특징으로 하는 위암에 대한 정보를 제공하는 방법

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 방법은 상기 아미노산 서열 1번 내지 6번 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 항원펩타이드를 이용하여 항원 펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체를 형성하여 사용하는 단클론 항체를 이용하는 것을 특징으로 하는 위암에 대한 정보를 제공하는 방법

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 RNF43를 이용한 단클론 항체 및 상기 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다

배경 기술

[0002] 암 또는 종양은 제어되지 않는 비정상적인 세포 성장으로부터 비롯되는 종양 덩어리인데, 양성 또는 악성일 수

있다. 양성 종양은 일반적으로 국소적이다. 악성 종양이 집합적으로 암으로 지칭된다. 용어 "악성"은 일반적으로, 종양이 이웃한 신체 조직을 침입하여 이를 파괴시킨 다음, 먼거리 부위까지 확산되어 사망에 이르게 할 수 있는 것을 의미한다

[0003] 인간이 제조하는 항체(Man-made antibodies), 특히 단클론 항체 및 제작된 항체 또는 항체 단편은 암, 자가면역 질환, 감염성 질환, 염증성 질환 및 심혈관 질환(Cardiovascular disease)을 포함하는 다른 여러 가지 인간 질환 뿐만 아니라 암의 검출 및 치료에서 폭넓게 조사되고 가치를 보여준다(Filpula and McGuire, Exp. Opin. Ther. Patents(1999) 9: 231-245). 항체 또는 항체 유도 체계의 임상적 사용은 특이적 질병과 관련된 특이적으로 표적화된 항원에 결합하는 이들의 능력에 주로 의존한다. 선택성은 특히 진단용 또는 치료용 체계가 인체의 정상조직에 유독한 경우의 인간 질병의 검출 및 치료 단계 동안에 표적화 위치에 동위원소, 약물, 독소, 사이토카인, 호르몬, 호르몬 길항제, 효소, 효소 억제제, 올리고뉴클레오타이드, 성장인자, 방사성핵종, 혈관형성 억제제, 또는 금속과 같은 진단용 또는 치료용 체계를 운반하기 위하여 중요하다. 방사성라벨된 항체는 난소암, 결장암 및 림프종을 포함하는 다수의 암에서 일부가 성공적으로 사용된다

[0004] 상기 항체 시스템의 잠재적 한계는 Goldenberg, The American Journal of Medicine, 94: 298-299 (1993)에 기재되어 있다. 검출 및 치료 기술에서 중요한 매개변수는 주입되는 표적 세포가 존재하는 부위에 특이적으로 위치하는 복용량 및 흡수율, 즉, 주변 정상 조직에 존재하는 방사성 농도에 대해 특이적으로 결합한 항체의 농도 비율이다. 항체가 혈류에 주입되는 경우, 대사되고 분비되어 많은 구획을 통과하여 지나간다. 항체는 인체의 나 머지를 통과하여 지나는 동안 표적 세포 항원에 위치하여 결합할 수 있어야 한다. 항원 표적을 조절하는 인자는 위치, 크기, 항원 농도, 항원 접근성, 병리학적 조직의 세포 조성 및 표적하는 항체의 약물 생체 반응학을 포함 한다. 항체에 의해 종양 표적화에 특이적으로 영향을 주는 다른 인자는 종양 및 다른 조직 모두에서 표적 항원의 발현 및 방사성 라벨된 항체의 느린 혈액 제거로 인해 발생하는 골수 독성을 포함한다. 표적화된 종양에 의해 공생하는 표적 항체의 양은 종양의 혈관형성, 종양의 항체 침투 방벽 및 종양내 압력에 의해 영향을 받는다. 간, 신장 또는 골수와 같은 비표적 기관에 의한 비특이적 흡수는 골수의 조사가 종종 복용량-한정 독성을 야기 하여 방사성 면역치료법(radioimmunotherapy)에 대한 기술의 또 다른 잠재적 한계가된다

[0005] 다클론 항체는 단클론 항체에 비해 항체의 항원에 대한 특이성이 높지 않으며, 반응성에 있어서 불안정하므로, 단클론을 이용한 항체에 대한 필요성이 대두되고 있다.

[0006] 본 출원에서 임의의 참조 문헌의 언급은, 참조 문헌이 본 출원에 대한 관련 선행 기술이라는 것을 허용하는 것은 아니다.

[0008] 선행기술문헌

[0009] -비특허문헌

[0010] (비특허문헌 1) Filpula and McGuire, Exp. Opin. Ther. Patents(1999) 9: 231-245

[0011] (비특허문헌 2) Goldenberg, The American Journal of Medicine, 94: 298-299 (1993)

[0012] (비특허문헌 3) Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); and Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 항체의 항원에 대한 특이성이 높고, 반응성이 안정한 단클론 항체를 제공 하는 것이다

[0015] 본 발명의 목적은 위암과 관련되는 RNF43 항체 제작을 위한 항원 펩타이드를 선정하고 이를 이용한 단클론 항체를 제공하는 것이다

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항원 펩타이드를 이용하여 항원 펩타이드-Cpg-DNA-리포좀 복합체를 제조하고 이를 활용한 단클론 항체를 제공하는 것이다

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항원 펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체를 사용한 단클론 항체를 제조하는 방법을

제공하는 것이다

- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론 항체를 포함하는 진단키트를 제조하여 이를 위암 진단에 사용하기 위한 키트를 제공하는 것이다

과제의 해결 수단

- [0020] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 위암과 관련 있는 RNF43유전자의 항원 펩타이드를 이용한 단클론 항체 및 이를 제조하는 방법을 제공한다
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 서열목록 제 1번 내지 제 6번의 아미노산 서열 중 하나 이상 선택되어 형성되는 항원 펩타이드를 포함하는 단클론 항체를 제공한다
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 항원 펩타이드를 이용하여 항원펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체를 제조하여 형성되는 것을 특징으로 하는 단클론 항체를 제공한다
- [0023] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, RNF43 유전자를 이용하여 항원 펩타이드를 선정하는 단계: 상기 선정된 항원펩타이드와 CpG-DNA-리포좀 복합체를 결합하는 단계: 상기 결합된 복합체를 마우스에 주입하여 B세포를 획득하는 단계: 상기 B세포를 종양세포와 융합하여 융합세포를 획득하는 단계: 상기 융합세포를 선별 하고 클로닝하는 단계: 및 상기 클로닝한 세포를 이용하여 단 클론 항체를 획득하는 단계를 포함하여 이루어지는 위암 진단에 사용되는 단클론 항체의 제조방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 종양세포는 골수종 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 단클론 항체의 제조방법을 제공한다
- [0025] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 본 발명의 RNF43에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다
- [0026] 하기 본 발명에 대한 설명에서, 재조합 DNA 및 면역학에서 사용되는 많은 용어들이 광범위하게 사용된다. 본원 명세서 및 특허청구범위에 대한 보다 더 명료하고 일관된 이해를 제공하기 위해서, 하기와 같은 정의를 제공한다.
- [0027] 용어 "항체"는 당해 분야에 공지된 용어이며 공지된 항원에 결합하는 분자 또는 분자의 활성 단편을 의미한다. 공지된 항원에 결합하는 활성 단편의 예는 Fab 및 F(ab)2 단편을 포함한다. 상기 활성 단편은 수 많은 기술에 의해서 본 발명의 항체로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, 정제된 단클론 항체는 펩신 같은 효소에 의해 절단되어 HPLC 겔 여과시킬 수 있다. Fab 단편을 함유하는 적합한 분획을 수집하여 막 여과 등에 의해 농축시킬 수 있다. 항체의 활성 단편 분리에 대한 일반적인 기술들에 대한 설명은 문헌(Khaw, B.A. et al., J. Nucl. Med. 23: 1011-1019 (1982))을 참조한다. 용어 "항체"는 또한 이특이적(bispecific) 및 키메라(chimeric) 항체를 포함한다.
- [0028] 용어 "단클론 항체"는 당해 분야에 공지된 용어이며, 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도로 특이적인 항체이다. 전형적으로 상이한 항원 결정기(에피토프)에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론 항체와는 다르게, 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 본 발명의 단클론 항체는 통상적인 클로닝 및 세포 융합 기술들을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 관심 대상의 면역원(항원)을 야생형이나 육종된 마우스(예를 들면, BALB/c)에 투여하여 천연 또는 사람 단클론 항체를 생산할 수 있다. 이러한 항원은 단독으로 투여 되거나, 애주번트와 혼합하여 투여되거나, 백터로부터 발현될 수 있으며 DNA 또는 융합 단백질로서 면역 반응을 유도할 수 있다. 융합 단백질은 면역 반응에 의도된 펩타이드와 커플링된 담체 단백질, 예를 들면, β -갈락토시다제, 글루타티온 S-트랜스퍼라제, 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 및 소혈청 알부민을 포함하며, 담체 단백질은 이에 제한되지는 않는다. 상기의 경우에 펩타이드는 담체 단백질에 대해서 합텐(hapten)으로 작용한다. 단클론 항체 제조 방법을 간략히 설명하면 다음과 같다. 동물을 부스팅시킨 후, 비장을 제거하고 비장 세포를 추출하여 당해 분야에 공지된 방법으로 골수종 세포와 융합시킨다. 수득되는 하이브리드 세포를 통상적인 방법, 예를 들면, 제한 희석으로 클로닝하고, 목적하는 단클론 항체를 생산하는 수득된 클론을 배양하는 것이다. 단클론 항체는 항원-항체 결합을 사용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 또한, 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에, 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 또 다른 장점을 갖는다.

- [0029] 용어 "에피토프" 는 당해 분야에 공지된 용어로서, 일반적으로 항체와 상호 작용하는 항원의 영역을 의미한다. 펩타이드 또는 단백질 항원의 에피토프는 항원의 연속하는 또는 비연속하는 아미노산 서열로부터 형성될 수 있다. 많은 단백질이 많은 에피토프를 함유할 수 있다. 본 발명의 항체에 의해서 인식되는 에피토프는 본 발명의 한 양태를 형성한다. 특정 에피토프를 인식하는 항체는 특정 에피토프를 정제하기 위한 면역친화도 컬럼에서 사용될 수 있다. 항원성 에피토프는 5개 정도의 적은 아미노산 잔기에 의해서 나타날 수 있는 것으로 보고되어 있기 때문에, 특정 에피토프의 말단 절단형도 또한 가능할 수 있다.
- [0030] 용어 "하이브리도마" 는 당해 분야에 공지되어 있으며, 항체 생산 세포와 불멸 세포, 예를 들면 골수종 세포와의 융합에 의해서 형성된 세포를 의미한다. 상기 하이브리드 세포는 항체를 지속적으로 공급할 수 있다.
- [0031] 용어 "(생물학적) 시료" 는 세포, 조직 또는 생물학적 유체를 포함하는 생물학적 물질을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0032] RNF43 유전자가 코딩하는 단백질은 RING-type E3 ubiquitin ligase이며, transmembrane domain, protease-associated domain, ectodomain, 세포질 RING domain을 포함 할 것으로 예측되며, 이 단백질은 Wnt 신호 전달을 부정적으로 조절하는 것으로 생각되며, 상기 유전자의 발현은 felled receptors의 ubiquitination을 증가시키며, 세포 내 분포를 변화시켜 이들 수용체의 표면 수준을 감소시킨다. 대장암 및 자궁 내막암을 비롯한 여러 종양 세포에서 상기 유전자의 돌연변이가 보고되었다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명은 항원 펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체를 항체로 사용함으로써, 분자량이 큰 항원 단백질의 발현 및 정제 과정이 필요 없으며, 항체 제조 후 항원 결정부를 따로 규명할 필요가 없다는 효과가 있다.
- [0035] 또한, 상기 발명의 항원 펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체로 제작된 단일클론 항체는 항체 생산 및 백신개발의 비용 및 시간을 단축시킬 수 있으며, 제작이 까다로운 항체도 용이하게 발명할 수 있다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 항원 펩타이드-CpG DNA-리포좀 복합체를 이용한 항체제작 과정의 모식도를 나타낸다
- 도 2는 RNF43 항체제작을 위한 항원 펩타이드 선정결과를 나타낸다
- 도 3은 RNF43 항체 제작을 위한 항원 펩타이드의 적합성 평가결과를 나타낸다
- 도 4는 단일클론 항체 제작과정 모식도 및 제작 일정을 나타낸다
- 도 5는 RNF43 단일클론 항체를 효소부착 면역흡수 분석법(ELISA)을 통해서 단일클론항체 생산 및 효율 검사결과를 나타낸다
- 도 6은 293T 세포에서 RNF43 밴드 확인한 것을 나타낸다
- 도 7은 293T 세포에서 RNF43 Immunoprecipitation 한 후 밴드 확인한 것을 나타낸다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] I. RNF43 항원펩타이드 선정 및 항원펩타이드 복합체 제작
- [0039] 전사체 분석을 통해 확인된 유전자 중 가장 빈도가 높고, 한국인에게 특이적이며 독창성을 지닌 RNF43유전자를 선정하였다.
- [0040] 본 발명자들은 이전 연구에서 이미 백신 및 항체 생산에 이용 가능한 면역보조제를 개발하였으며, 항원 결정부 펩타이드(epitope peptide)만을 항원으로 이용하여도 마우스에서 효과적으로 항체를 생산 할 수 있는 항원 펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체 시스템을 확립하였다(도 1).
- [0041] 상기 항원펩타이드는 마우스 B세포의 항원으로 작용되며, 상기 CpG-DNA는 비메틸화 되면 B세포의 항원-항체 반응성을 촉진시킨다. 또한, 상기 리포좀은 상기 마우스 체내에 항원 복합체를 안정적으로 전달하기 위한 전달체

로 작용한다

[0042] 또한, 상기 항원 펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체는 분자량이 큰 항원 단백질의 발현 및 정제과정이 필요 없으며, 항체 제조 후 항원 결정부를 따로 규명할 필요가 없다는 장점이 있으며, 또한, 항체생산 및 백신개발의 비용 및 시간을 단축할 수 있으며, 제작이 까다로운 항체도 용이하게 제작할 수 있다는 장점이 있다.

[0043] 이에 본 발명에서 상기 항원 펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체를 이용하여 RNF43에 대한 단클론 항체를 생산하는데 적용하였다. 먼저, 본 발명자들은 위암과 관련 있는 RNF43유전자 항원 펩타이드 6종을 선정하고, 상기 항원 펩타이드를 이용하여 항원펩타이드-CpG-DNA-리포좀 복합체를 제형화하였다.

[0045] 2. 리포좀 복합체에 캡슐화된 RNF-43 펩타이드 에피토프의 면역화에 의한 항-RNF-43항체 생산

[0047] 다음, 본 발명자들은 10일 간격으로 3 회 상기 복합체로 BALB/c 마우스를 면역화하였다. 세번째 면역화 후, 마우스 혈청을 모아서 항체 데이터에 대해 분석하였다. ELISA 결과는 인간 RNF-43 펩타이드 에피토프-특이적 IgG의 현저한 증가를 명확하게 나타내었다.

[0048] 10일 후, 마우스 splenocytes 모아서 하이브리도마 세포를 제조하는데 사용하였다. splenocytes를 통상적인 하이브리도마 기술에 의하여 SP2/0 myeloma 세포와 융합하였다.

[0049] 상기 융합세포를 효소부착 면역흡수 분석법(ELISA: Enzyme-Linked immunosorbent Assay)방식으로 분석하여 항체 생산 및 효율을 검사한 결과, 6개 후보 항원 펩타이드 중 4개의 경우(S41, K81, C252, Y684)에서 효율이 높은 항체가 양호하게 생산되고 있음을 확인하였다(도 5).

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0054] Oligodeoxynucleotides

[0056] 본 발명자들은 전에 Mycobacterium bovis genomic DNA으로부터 면역조절 활성을 가지는 phosphodiester bond CpG-DNA (MB-ODN 4531(0))를 개발하였다. 그 합성된 oligonucleotide MB-ODN 4531(0)를 삼천리 제약(Seoul, Korea)으로부터 얻었다. MB-ODN 4531는 세 CpG motifs를 포함하는 아래에 표시되는 20 개의 염기로 구성되었다: AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT.

실시예 2

[0059] RNF43 항원 펩타이드 선정 기준

[0061] RNF43 단백질의 구조와 성질을 분석하여 친수성 값(hydrophilicity value), 표면접근성 값(surface accessibility values), 베타 감김 구조 값(β -turn region values), 항원지표(antigenicity index), amphipathicity (<http://tools.iedb.org/bcell>)등을 고려하여 B 세포의 인식에 적합한 항원 결정부(epitope)를 예측평가한 후, 총 6종의 후보 항원 결정부를 선정하여 해당 펩타이드를 합성하였다(단백질 N 말단 부위에 2종, 중간 부위에 2종, C 말단 부위에 2종)(도2, 도3).

[0062] 상기 선정된 RNF43 항원 펩타이드 서열은 다음 표와 같다

항원펩타이드	아미노산 서열
RNF43-S41	⁴¹ SAEQKAIIRVIPLKMDPTGKLNLT ⁶⁵
RNF43-K81	⁸¹ KLMQSHPLYLCNASDDDNLEPGFIS ¹⁰⁵
RNF43-C252	²⁵² CRQARGEWPDSGSSCSSAPVCAICL ²⁷⁶
RNF43-P310	³¹⁰ PLCMFNITEGDSFSQSLGPSRSYQE ³³⁴
RNF43-Y684	⁶⁸⁴ YTPSVAYPWSPEAHPLICGPPGLDK ⁷⁰⁸
RNF43-P734	⁷³⁴ PLEPHPPGEGPSEWSSDTAEGRPCP ⁷⁵⁸

[0063]

[0064] 상기 펩타이드를 자동화 펩타이드 합성기(Pepton III-R24, Pepton, Daejeon, Korea)를 사용하여 합성하고, 90% 이상 순도로 분리하였다

실시예 3

[0067] 마우스 및 면역화

[0069] 마우스를 특정 무균 조건 하에 유지시켰다. 본 발명자들은 4 주령 수컷 BALB/c (H-2b) 마우스를 나라 바이오텍 (Seoul, Korea)으로 구입하였다. 본 동물실험은 한림대 동물시험 윤리위원회의 승인을 받았다(Hallym 2015-56). 10일 간격으로 3번에 걸쳐서 리포솜(DOPE: CHEMS)에 캡슐화된 50 ug의 CpG-DNA (MB-ODN-4531(O))로 보충된 50 ug의 RNF43-C252항원 펩타이드를 마우스 복강내 주사하였다. RNF43-C252외의 5종류의 RNE43 항원펩타이드에 대해서도 상기와 같은 방법으로 실험하였다.

실시예 4

[0071] 항원-특이적 Ig ELISA 어세이

[0073] RNF43-C252 항원펩타이드가 주입 된 마우스 혈청을 orbital bleeding으로 얻었다. 전체 IgG를 측정하기 위하여, 96-well 면역플레이트(Nalgen Nunc International, Penfield, USA)를 5 ug/ml의 RNF43-C252항원펩타이드로 코팅한 후 1% BSA를 함유한 0.05%의 PBST(Tween-20 in PBS)로 블럭킹을 한 후 전체 IgG를 측정하였다. RNF43-C252외의 5종류의 RNE43 항원펩타이드에 대해서도 상기와 같은 방법으로 실험하였다.

실시예 5

[0075] 융합세포 생산

[0077] BALB/c 마우스를 대상으로 DOPE:CHEMS 복합체에 캡슐화된 Hrnf43-c252펩타이드 (50 ug) 및 MB-ODN 4531(O) (50 ug)를 상기 마우스의 복강내 주사하였다. 면역화된 마우스로부터의 지라를 표준 하이브리도마 방법에 따라 융합에 사용하였다. 클론 세포 군을 얻기 위하여, HAT 배지 및 HT 배지에서 하이브리도마 클론을 표준 리미팅 희석 프로토콜에 의하여 선택하였다. 복수(ascites)를 얻기 위하여, 선택된 하이브리도마 클론을 BALB/c 마우스의 복

막강(peritoneal cavity)에 주사하였다. RNF43 -C252 단클론 항체를 복수액으로부터 단백질-A 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. RNF43-C252 단클론 항체의 isotype을 결정하기 위하여, isotyping 키트를 사용하였다. RNF43-C252외의 5종류의 RNF43 항원펩타이드에 대해서도 상기와 같은 방법으로 실험하였다

실시예 6

- [0081] 효소부착 면역흡수 분석법(ELISA)를 통한 단클론 항체 생산 및 효율검사
- [0083] 단클론 항체 생산 및 효율검사를 하기 위해 효소부착 면역흡수 분석법(ELISA)을 수행하였다.
- [0084] 구체적으로, 50mM 카보네이트 버퍼(carbonate buffer, pH 9.6)에 용해된 RNF43-C252 50 μ l 를 가지고 마이크로플레이트에 코팅시키고, 4℃에서 하룻밤 두었다. T-PBS로 4회 세척한 후에, 플레이트는 PBS에 용해된 3% BSA 100 μ l를 가지고 37℃ 에서 2시간 동안 차단되었다
- [0085] PBS에 RNF43-C252을 용해하여 RNF43-C252 표준 용액(stand solution)을 제조하였다. 상기 RNF43-C252 표준 용액은 각각의 웰 마다 PBS 10ng/50 μ l 내지 10 μ g/50 μ l의 범위에서 희석되었다. PBS로 세척한 후에, PBS로 희석된 항체(항체농도: 0.1 ug/ml) 50 μ l와 PBS로 희석된 표준 용액 50 μ l 를 혼합한 후, 혼합액을 마이크로플레이트의 웰 각각에 첨가하였고, 상온에서 2시간 동안 인큐베이션 시켰다.
- [0086] 세척한 후에, 1:2000으로 희석된 HRP-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG(HRP-conjugated goat anti-mouse IgG)를 각각의 웰에 첨가하였고, 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션 시켰다. 이후 세척 후에, TMB 기질 용액 100 μ l 를 각 웰에 첨가하였다. 암실 상온에서 30분 동안 인큐베이션 시킨 후, 0.5M 황산(H2SO4) 50 μ l 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 고체상에 결합된 효소의 활성은 ELISA 리더를 사용하여 450nm에서 측정되었다. 그 결과로서 도5에서 도시된 바와 같은 RNF43-C252 정량을 위한 표준곡선(검량선)을 얻게 된다.
- [0087] 효소부착 면역흡수 분석법(ELISA; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)을 이용한 항체생산 및 효율 검사결과, 6개 후보 항원 펩타이드 중 4개의 경우(S41, K81, C252, Y684)에서 효율이 높은 항체가 양호하게 생산되고 있음이 확인되었다

실시예 7

- [0090] RNF43 -C252 단클론 항체 클로닝
- [0091] 293T 세포에 RNF43 DNA와 RNF43이 없는 DNA를 주입한 후 24 hr 후에 세포를 harvest하여 단백질을 준비한 후 western blot assay를 실행하였다.
- [0092] RNF43-C252-1A8D3 항체를 1:500으로 희석하여 사용한 결과 100kDa 부분에서 RNF43에 해당되는 밴드를 확인하였다 (도 6)
- [0093] 293T 세포에서 RNF43 과발현시킨 다음 Immunoprecipitation을 하고 western blot assay한 결과 RNF43에 해당하는 밴드를 확인하였다(도7)

실시예 8

- [0095] RNF43 -C252 단클론 항체 클로닝
- [0096] RNF43 -C252 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 배양하고 단클론 항체 isotyping 키트(Dipstick format, Bibco BRL or Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 아이소타이핑하였다. 전체 RNAs를 RNeasy Mini

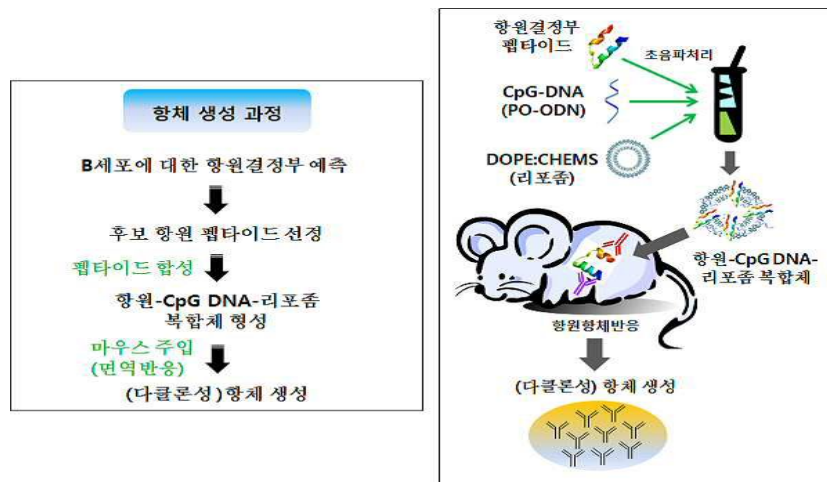
Kit(Qiagen)로 하이브리도마 세포로부터 추출하고 cDNAs를 제조하였다.

[0097]

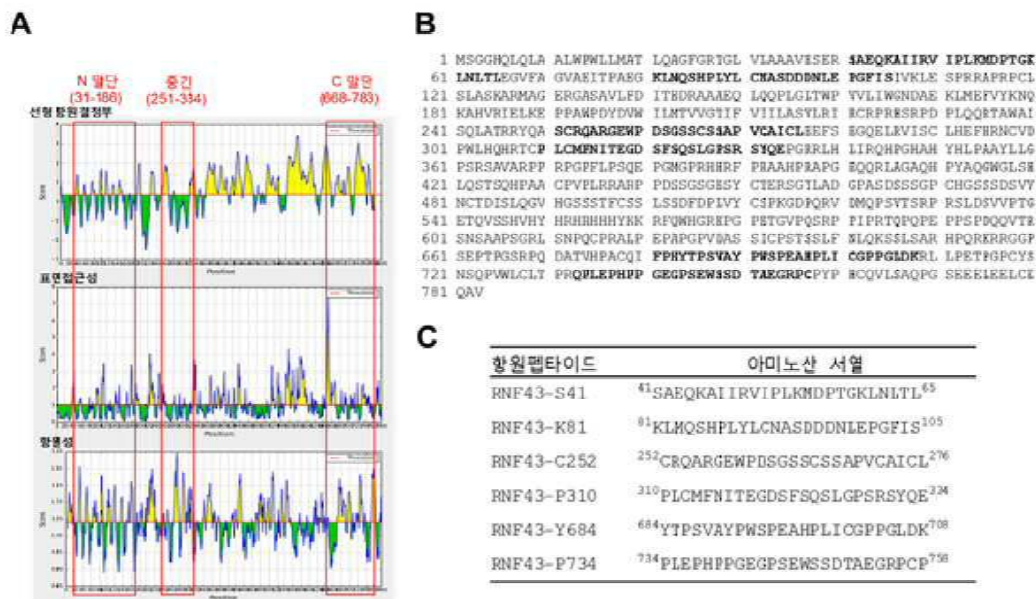
RNE43 -C252 항체를 클로닝하기 위하여, 그 cDNAs 결과물을 하기 프라이머 세트로 Vent polymerase (NEB)를 사용하여 증폭하였다. 중쇄 프라이머로, IGG2A (5'- GGA AGA TCT CTT GAC CAG GCA TCC TAG AGT CA-3') 및 5'MH2 (5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3')를 사용하였고, kappa chain 프라이머로, 3'Kc (5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3') 및 5'Mk (5'-GG GAG CTC GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3')를 사용하였다(Wang Z, Raifu M, Howard M, Smith L, Hansen D, Goldsby R, Ratner D (2000) J Immunol Methods 233, 167-177). 상기 프라이머를 이용하여 표준 PCR 반응을 25사이클 수행하였다. 그 PCR 산물들을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 직접 라이게이션하였다. 클론된 마우스 Ig 인서트를 DNA 시퀀싱으로 분석하였다. RNF43-C252의 5종류의 RNE43 항원펩타이드에 대해서도 상기와 같은 방법으로 실험하였다.

도면

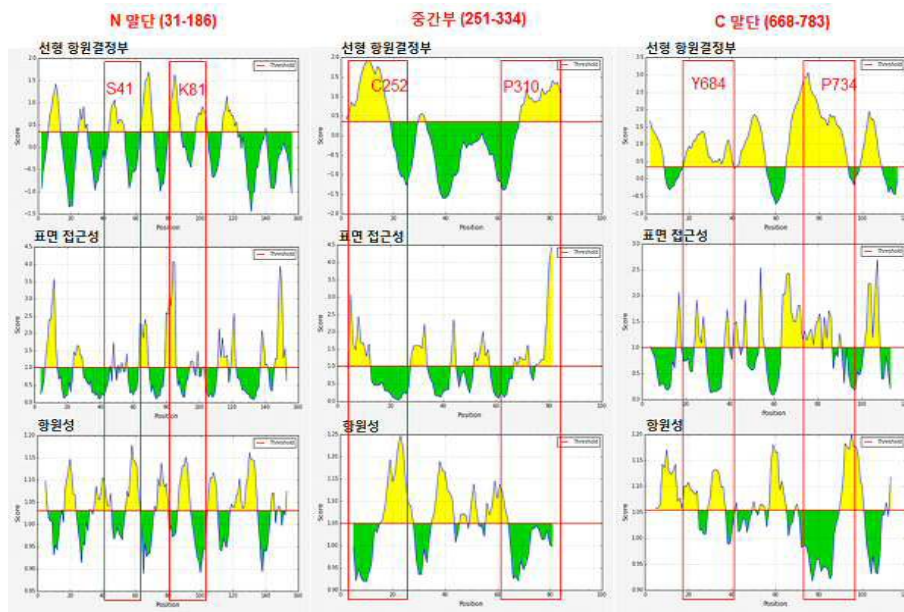
도면1



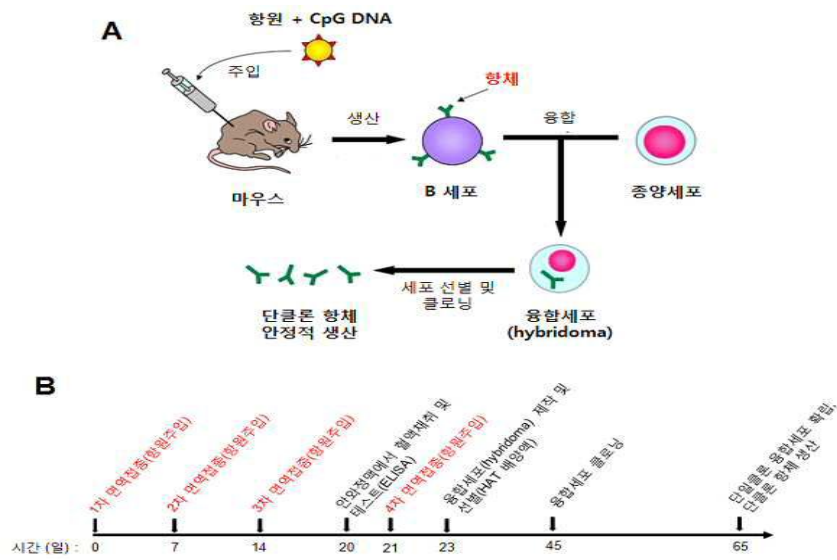
도면2



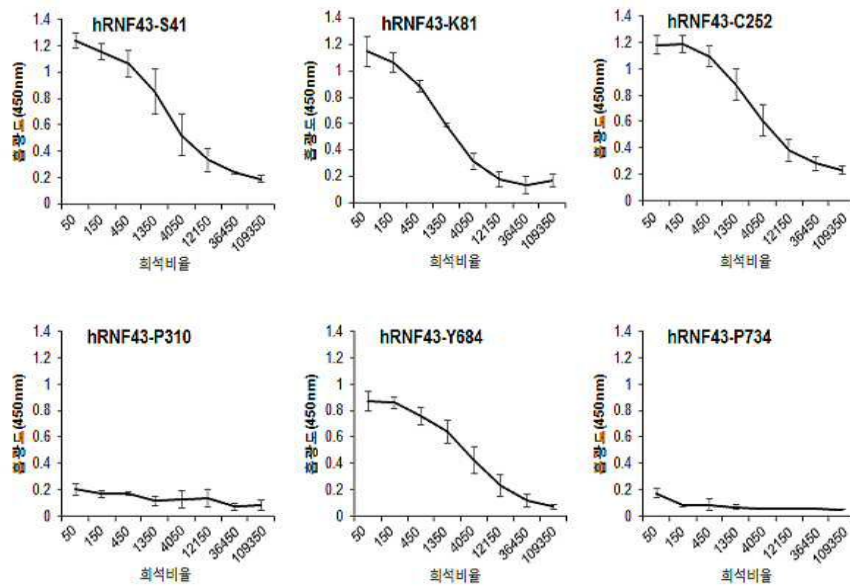
도면3



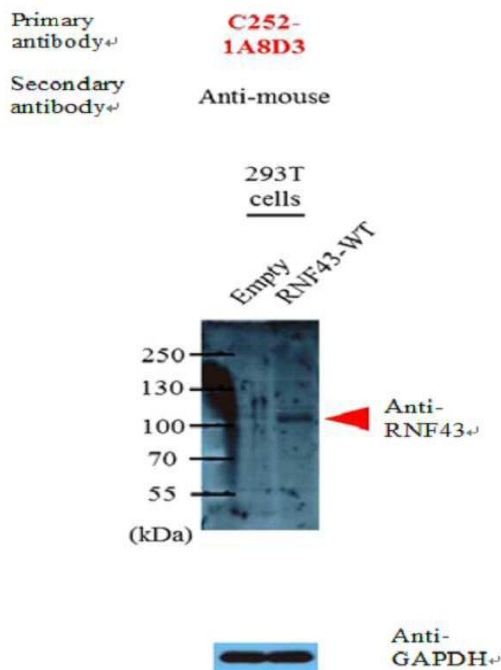
도면4



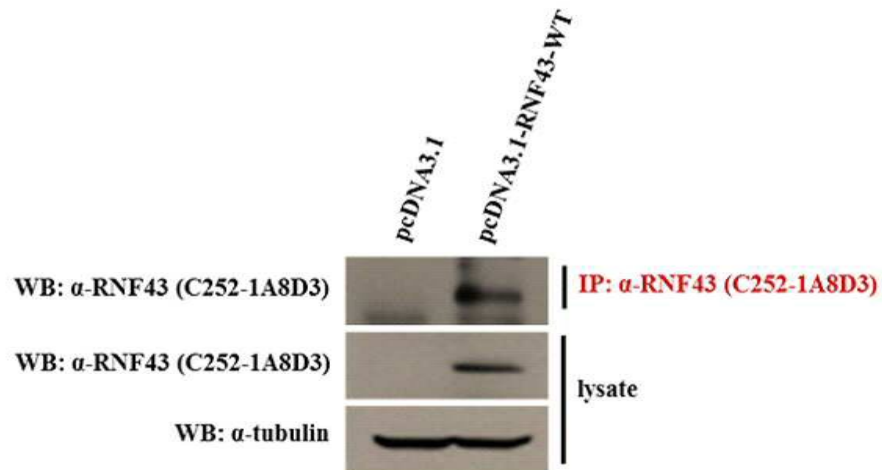
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION
Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> A monoclonal antibody of gene associated with gastric cancer and
a method of producing thereof
- <130> 18-FP-016
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> RNF43-S41
- <400> 1

Ser Ala Glu Gln Lys Ala Ile Ile Arg Val Ile Pro Leu Lys Met Asp

1 5 10 15

Pro Thr Gly Lys Leu Asn Leu Thr Leu

20 25

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNF43-K81

<400> 2

Lys Leu Met Gln Ser His Pro Leu Tyr Leu Cys Asn Ala Ser Asp Asp

1 5 10 15

Asp Asn Leu Glu Pro Gly Phe Ile Ser

20 25

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNF43-C252

<400> 3

Cys Arg Gln Ala Arg Gly Glu Trp Pro Asp Ser Gly Ser Ser Cys Ser

1 5 10 15

Ser Ala Pro Val Cys Ala Ile Cys Leu

20 25

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNF43-P310

<400> 4

Pro Leu Cys Met Phe Asn Ile Thr Glu Gly Asp Ser Phe Ser Gln Ser

1 5 10 15

Leu Gly Pro Ser Arg Ser Tyr Gln Glu

20 25

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNF43-Y684

<400> 5

Tyr Thr Pro Ser Val Ala Tyr Pro Trp Ser Pro Glu Ala His Pro Leu

1 5 10 15

Ile Cys Gly Pro Pro Gly Leu Asp Lys

20 25

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNF43-P734

<400> 6

Pro Leu Glu Pro His Pro Pro Gly Glu Gly Pro Ser Glu Trp Ser Ser

1 5 10 15

Asp Thr Ala Glu Gly Arg Pro Cys Pro

20 25