

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 7월 18일 (18.07.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/105707 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/004074
- (22) 국제출원일: 2012년 5월 23일 (23.05.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0004205 2012년 1월 13일 (13.01.2012) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 가톨릭대학교 산학협력단 (CATHOLIC UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 137-701 서울 서초구 반포동 505, Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 주지현 (JU, Ji-Hyeon) [KR/KR]; 448-160 경기도 용인시 수지구 죽전동 꽃매마을 아파트 301 동 1001 호, Gyeonggi-do (KR). 김영균 (KIM, Young-Kyun) [KR/KR]; 133-882 서울 성동구 도선동 69 성동삼성세르빌 102 동 1506 호, Seoul (KR). 이효주 (YI, Hyo-Ju) [KR/KR]; 151-836 서울 관악구 청룡동 881-31 봉대오피스텔 705 호, Seoul (KR). 김주련 (KIM, Ju-Ryun) [KR/KR]; 664-807 경남 사천시 사천읍 정의리 398-5, Gyeongnam (KR). 정혜린 (JEONG, Hye-Rin) [KR/KR]; 440-813 경기도 수원시 장안구 연무동

244-2, Gyeonggi-do (KR). 문수진 (MOON, Su-Jin) [KR/KR]; 156-030 서울 동작구 상도동 431 래미안 상도 3 차 아파트 309 동 1204 호, Seoul (KR). 강귀영 (KANG, Kwi-Young) [KR/KR]; 361-102 충북 청주시 흥덕구 사직 2 동 푸르지오캐슬아파트 301 동 502 호, Chungbuk (KR). 김인제 (KIM, In-Je) [KR/KR]; 150-102 서울 영등포구 양평동 2 가 1-2 월드메르디앙 1406 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 135-080 서울시 강남구 역삼동 649-10 서림빌딩, Seoul (KR).

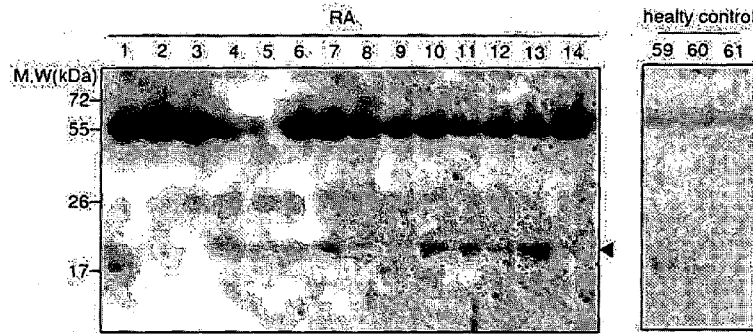
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

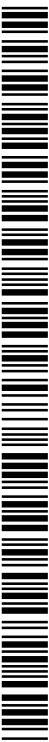
(54) Title: CITRULLINATED PROTEIN-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AND HYBRIDOMA CELL LINE PRODUCING SAME

(54) 발명의 명칭 : 시트룰린화된 단백질에 특이적인 단클론 항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포주



(57) Abstract: The present invention relates to a monoclonal antibody for specifically detecting a protein containing a citrulline residue, and a hybridoma cell line producing same. In addition, the present invention relates to a composition for detecting the protein containing the citrulline residue comprising the monoclonal antibody and a detection kit. Also, the present invention relates to a composition for diagnosing diseases related to a citrullinated protein containing the monoclonal antibody, and a diagnosis kit.

(57) 요약서: 본 발명은 시트룰린 잔기를 함유하는 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 단클론 항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 단클론 항체를 포함하는 시트룰린 함유 단백질 검출용 조성물 및 검출 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 단클론 항체를 포함하는 시트룰린화된 단백질 관련 질환의 진단용 조성물 및 진단 키트에 관한 것이다.



WO 2013/105707 A1



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 공개:
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

시트룰린화된 단백질에 특이적인 단클론 항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포주

5

【기술분야】

본 발명은 시트룰린 잔기를 함유하는 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 단클론 항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 단클론 항체를 포함하는 시트룰린 함유 단백질 검출용 조성물 및 검출 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 단클론 항체를 포함하는 시트룰린화된 단백질 관련 질환의 진단용 조성물 및 진단 키트에 관한 것이다.

10

【배경기술】

시트룰린화 (citrullination) 란 단백질의 번역 후 변형 과정에서 단백질 내 아미노산 잔기 중 아르기닌이 펩티딜아르기닌 탈아미노화효소 (peptidylarginine deiminase, PAD)의 작용에 의해 탈아미노화되어 시트룰린으로 변환되는 과정을 말한다 (도 1). 아르기닌은 중성 pH 에서 양성 전하를 띠지만 시트룰린은 전하를 띠지 않기 때문에, 아르기닌에서 시트룰린으로의 변환은 단백질의 구조 및 기능에 중요한 영향을 미친다. 예를 들어, 단백질의 소수성이 증가하여 단백질 폴딩에 영향을 미칠 수 있다.

15

20

25

체내에 시트룰린 잔기를 포함하는 단백질로는 MBP (myelin basic protein), 필라그린 (filaggrin), GFAP (glial fibrillary acidic protein), 히스톤 단백질, 피브린, 피브리노겐, 콜라겐, 알파-에놀라제, 및 비멘틴 등이 알려져 있다. 이들 단백질의 시트룰린화는 세포 사멸 또는 조직 염증의 과정에서 주로 일어나는 것으로 알려져 있으며, 자가면역질환 환자에서 시트룰린화된 단백질이 검출된 예들이 보고되면서, 시트룰린화가 병리학적 상태와 관련이 있는 것으로 인식되고 있다.

예를 들어, 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis, RA) 환자의 관절

내에서 시트룰린화 과정이 촉진되어 단백질의 항원성이 증가되어 자가 항체
 인 항-시트룰린화된 단백질 항체 (anti-citrullinated protein antibody,
 ACPA)의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있으며, ACPA 는 류마티스 관절염
 진단 마커로 활용되고 있다. Hoet 등은 필라그린이 ACPA 생성의 원인 물질이
 5 라고 보고하였고 (Ann Rheum Dis., 1991, 50:611- 8), Masson-Bessiere 등은
 류마티스 관절염 환자의 활막에 피브리노겐의 알파- 및 베타- 사슬의 시트룰린화
 가 존재한다고 보고하였으며 (J Immunol., 2001, 166:4177- 84), Nogueira 등
 은 시트룰린화된 피브리노겐이 혈청 내 ACPA 검출에 높은 특이도 및 민감도
 를 가진다고 보고하였다 (Arthritis Res., 2002;4:A30). 또한, Despres 등은
 10 인간의 태반, 비장 및 류마티스 관절염 환자의 활액에서 50 kDa 의 Sa 항원
 을 검출하였다고 보고하였으며 (J Rheumatol., 1994, 21:1027- 33),
 Vossenaar 등은 항-Sa 항체가 류마티스 관절염 환자에 특이적으로 존재하며
 시트룰린화된 비멘틴을 인식한다고 보고하였고 (Arthritis Res., Ther 2004,
 6:R142- 50), Baeten 등은 류마티스 관절염 환자의 활막에 ACPA 와 함께 세
 15 포내 시트룰린화된 단백질 (intracellular citrullinated protein)이 존재한
 다고 보고하였다 (Arthritis Rheum., 2001, 44:2255- 62). 또한, Mamoru
 Yoshida 등은 류마티스 관절염에 시트룰린화된 콜라겐이 자가면역성과 관련
 이 있다고 보고하였고 (Mod Rheumatol, 16:276-281, 2006), Kinloch 등은 시
 트룰린화된 알파-에놀라제 (α -enolase)가 류마티스 관절염의 자가 항원 후
 20 보 물질이라고 보고하였다 (Arthritis Research & Therapy, 7:R1421-29,
 2005).

다른 예로, Nicholas 등은 인간 중추 신경계에 MBP 및 GFAP 의 시트룰
 린화가 존재한다고 보고하였으며 (Glia, 2002,37:328- 336), 여러 연구팀에
 서 다발성 경화증 (multiple sclerosis, MS)환자의 뇌척수액에서 이들 단백
 25 질이 증가하고 다발성 경화증의 병리학적 상태를 심화시키는 것으로 보고하
 였다 (Moscarello et al., J Neurosci Res., 1986, 15:87- 99; Moscarello et
 al., J Clin Invest., 1994, 94:146- 154; Nicholas et al., J Comp Neurol.,
 2004, 473:128- 136).

다른 예로, Ishigami 등은 알츠하이머병 환자의 뇌에서 펩티달아르기

닌 탈아미노화효소 2가 증가되고 시트룰린화된 단백질, 예컨대 MBP, 비메틴, GFAP 등이 많이 축적된다고 보고하였다 (J Neurosci Res., 2005, 80 (1):120-128).

5 다른 예로, 건선에서, Ishida-Yamamoto 등은 기작은 알려져 있지 않지만 건선 표피에서 비정상적인 시트룰린화가 PAD1과 관련되어 있다고 보고하였다 (J Invest Dermatol, 2000, 114:701-705).

10 이와 같이, 단백질의 시트룰린화가 각종 자가면역질환 등에 미치는 병리학적 영향에 대하여 많은 연구들이 수행되고 있으나, 체내에 시트룰린화된 단백질의 절대적 존재량이 적고 이들을 검출하기 위한 실험적 도구가 마땅치 않아 연구를 수행함에 있어서 일차적인 한계점이 있다.

예를 들어, 시트룰린화된 단백질을 검출하는 수단으로서 Tatsuo 등의 문헌이 알려져 있다 (Anal Biochem (1992) 203:94-100). 상기 문헌에서는 단백질의 시트룰린화 부위를 디아세틸모노옥심 (monoxime) 및 안티피린 (antipyrine)을 이용하여 화학적으로 유도체화하고, 그 유도체화한 부위를 15 인식하는 항체를 사용하여 시트룰린화된 단백질을 검출하는 기술을 제공하고 있다. 그러나 상기에 의하여 시트룰린화된 단백질을 검출하는 경우에는, 측정 대상의 시트룰린화된 단백질에 관해서 시트룰린의 유도체화를 행할 필요가 있어 조작성이 번잡한 문제가 있다.

20 **【발명의 상세한 설명】**

【기술적 과제】

이에, 본 발명자들은 체내 시트룰린화된 단백질을 특이적으로 인식 및 25 검출할 수 있는 항체를 개발하기 위하여 노력하였다. 먼저 류마티스 관절염에서 자가항체 생성의 원인 물질로 알려진 필라그린에서 가장 반응성이 높은 보존 서열을 토대로 하여 항체 제조를 위한 항원을 선정하고, 상기 항원을 마우스에 투여하여 수득한 비장 세포를 미엘로마 세포와 융합하여 하이브리도마 세포주들을 제조한 뒤, 수차례의 선별 과정을 통하여 단백질의 시트룰린 부위를 높은 특이성으로 인식하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 최종 선별하여 본 발명을 완성하였다.

【기술적 해결방법】

본 발명은 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 이의 시트룰린화된 단백질 검출 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

구체적으로, 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역을 포함하는, 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다. 바람직하게, 상기 단클론 항체는 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마에 의해 생산되는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는, 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마에 의해 생산되는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화된 단백질 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 시트룰린화된 단백질 검출용 조성물을 포함하는 시트룰린화된 단백질 검출용 키트를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 시료 내 시트룰린화된 단백질의 항원 항체 반응을 면역 측정하는 단계를 포함하는, 시료 내 시트룰린화된 단백질을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화 관련 질환의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 자가면역질환 진단용 조성물을 포함하는 시트룰린화 관련 질환의 진단용 키트를 제공하는 것이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 L-아르기닌이 펩티딜알기닌 탈아미노화효소 (peptidylarginine deiminase, PAD)의 작용에 의하여 L-시트룰린으로 전환되는 시트룰린화 (citrullination) 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 마우스에서 단클론 항체를 만드는 기본 과정을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에서 CCP(cyclic citrullinated peptide)에 특이적으로 결합하는 마우스 단클론 항체를 만들기 위한 과정을 타임 스케줄로 나타낸 것이다.

도 4는 네 마리의 마우스에 각각 두 번에 걸쳐 항원인 CCP 를 주입한 뒤, 마우스 혈청으로부터 항-CCP 및 항-CRP ELISA 를 시행한 결과를 450 nm 파장에서 흡광도(O.D)로 나타낸 것이다. 각 마우스는 #1, #2, #3, #4로 명명하였으며, 마우스 혈청은 단계별로 희석하여 사용하였다 (1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:50000, 1:100000). PBS 는 음성대조군을 나타내며, 0차 는 마우스에게 항원을 주입하기 전에 얻어낸 혈청으로 이 혈청 내에는 항-CCP 항체가 존재하지 않았을 때의 초기값을 설정하기 위해 다른 음성대조군으로 사용되었다.

도 5는 항원으로 CCP 를 주입한 마우스 #2의 비장에서 분리한 플라즈마 세포를 미엘로마 세포와 융합하여 하이브리도마 세포를 만든 후 항-CCP 및 항-CRP ELISA 를 수행한 결과를 나타낸다 (5 weeks, Fusion ELISA). 각 숫자는 450 nm 파장에서의 흡광도(O.D) 값을 나타내는 것으로, 항 CCP 항체가 표적 펩타이드인 CCP 를 인지하여 결합하였을 때의 결합 강도를 발광되는 빛의 값으로 환산하여 나타낸 것이다. (+) 와 (-)로 표시된 값은 각 실험에서의 양성, 음성 대조군 값을 의미한다.

도 6은 CCP 및 CRP 를 이용하여 2회의 하이브리도마 스크리닝 후 항-CCP 및 항-CRP ELISA 를 수행한 결과를 나타낸다 (10 weeks, 2nd Cloning). 각 숫자는 450 nm 파장에서의 흡광도(O.D) 값을 나타내며, (+) 와 (-)로 표시된 값은 각 실험에서의 양성, 음성 대조군 값을 의미한다.

도 7은 CCP 및 CRP 를 이용하여 3회의 하이브리도마 스크리닝 후 선별된 두 개의 클론 11G1 및 12G1 에 대하여 항-CCP 및 항-CRP ELISA 를 수행한

결과를 나타낸다 (13 weeks, 3rd Cloning). 각 숫자는 450 nm 파장에서의 흡광도(O.D) 값을 나타내며, (+) 와 (-)로 표시된 값은 각 실험에서의 양성, 음성 대조군 값을 의미한다.

5 도 8은 류마티스 관절염 환자의 조직에서 항체 12G1을 사용하여 면역조직화학염색을 수행한 결과이며, Mock 는 기능성이 없이 구조만 동일한 마우스 IgG 를 사용하여 음성대조군(isotype control)을 설정한 것이다. 항체 12G1 에 반응할 경우 갈색으로 반응하게 되며 시트룰린화된 단백질이 존재함을 의미한다.

10 도 9는 다른 류마티스 관절염 환자의 조직에서 항체 12G1 을 사용하여 면역조직화학염색을 수행한 결과를 나타내며, 시트룰린화된 단백질이 검출됨을 알 수 있다.

도 10은 또 다른 류마티스 관절염 환자의 조직에서 항체 12G1 을 사용하여 면역조직화학염색을 수행한 결과를 나타내며, 시트룰린화된 단백질이 검출됨을 알 수 있다.

15 도 11은 염증성 반응이 존재하지 않는 퇴행성 관절염 환자의 조직에서 항체 12G1을 사용하여 면역조직화학염색을 수행한 결과를 나타내며, 시트룰린화된 단백질이 검출되지 않음을 알 수 있다.

20 도 12는 흡연자의 편도 조직에서 항체 12G1을 사용하여 면역조직화학염색을 수행한 결과를 나타내며, 시트룰린화된 단백질이 검출됨을 알 수 있다.

도 13은 류마티스 관절염 환자 (RA) 및 건강한 사람 (HC)의 혈액 시료에 대하여 정제된 항체 12G1 을 사용하여 시료 내 시트룰린화된 항원을 검출한 웨스턴 블롯 결과를 나타낸다.

25 【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역을 포함하는, 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

바람직하게, 본 발명은 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마에 의해 생산되는, 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

또한, 바람직하게, 본 발명의 하이브리도마는 서열번호 1의 아미노산 5 서열을 가지는 펩타이드를 항원으로 하여 제조된 것일 수 있다.

또한, 바람직하게, 본 발명의 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 C-반응성 단백질 (C-reactive protein, CRP) 에는 결합하지 않는 것일 수 있다.

또 하나의 양태로서, 본 발명은 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는, 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마에 관한 것이다.

또 하나의 양태로서, 본 발명은 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마에 의해 생산되는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화된 단백질 검출용 조성물에 관한 것이다.

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 시트룰린화된 단백질 검출용 조성물을 포함하는 시트룰린화된 단백질 검출용 키트에 관한 것이다.

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 시료 내 시트룰린화된 단백질의 항원-항체 반응을 면역 측정하는 단계를 포함하는, 시료 내 시트룰린화된 단백질을 검출하는 방법에 관한 것이다.

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화 관련 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 시트룰린화 관련 질환의 진단용 키트에 관한 것이다.

바람직한 양태로서, 상기 시트룰린화 관련 질환은 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 건선 또는 알츠하이머일 수 있다.

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

본 발명은 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하고, 비시트룰린화 단백질, 예를 들어 C-반응성 단백질에는 실질적으로 반응하지 않는 단클론

항체 및 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

본원에서 용어, "시트룰린화된 단백질", "시트룰린 잔기를 함유하는 단백질" 또는 "시트룰린 함유 단백질" 이란 단백질을 구성하는 아미노산 잔기 중에 시트룰린 잔기를 포함하는 단백질로, 상기 시트룰린 잔기는 단백질의 번역 후 변형 과정에서 아르기닌 잔기가 펩티딜아르기닌 탈아미노효소 (PAD)의 작용에 의해 탈아미노화되어 시트룰린 잔기로 변환되어 단백질을 구성하게 된다.

시트룰린 잔기는 단백질 번역 과정 동안 단백질 내로 도입되지 않는 아미노산이지만, PAD에 의해 아르기닌 잔기의 번역 후 변형에 의해 발생할 수 있다. 즉, 시트룰린에 대한 tRNA는 존재하지 않고, 단백질에서 시트룰린 잔기의 존재는 오로지 번역 후 변형의 결과이다.

시트룰린 잔기를 함유하는 단백질로는 MBP, 필라그린 (fillagrin), GFAP, 히스톤 단백질, 피브린, 피브리노겐, 콜라겐, 알파-에놀라제, 및 비멘틴 등이 알려져 있다. 이들 단백질의 시트룰린화는 세포 사멸 또는 조직 염증의 과정에서 주로 일어나는 것으로 알려져 있으며, 자가면역질환 환자에서 시트룰린화된 단백질이 검출된 예들이 보고되면서, 시트룰린화가 병리학적 상태와 관련이 있는 것으로 인식되고 있다.

본 발명에서 제공하는 항체는 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하고, 비시트룰린화 단백질, 예를 들어 C-반응성 단백질에는 실질적으로 반응하지 않는 단클론 항체 및 그의 항원 결합 단편으로, 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

본원에서 용어, "항체" 는 시트룰린화된 단백질의 시트룰린화 부위에 특이적으로 결합하는 항체로서, 완전한 항체 형태뿐만 아니라 그의 항원 결합 단편을 포함한다.

완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드 결합으로 연결되어 있다.

항체 분자의 항원 결합 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단

편을 의미하며, Fab, F (ab'), F (ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 결합 단
 편 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
 5 힌지 영역 (hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F (ab')₂ 는
 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다.
 Fv는 중쇄 가변 부위 및 경쇄 가변 부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각
 을 말한다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수
 있고, 예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있
 10 고 펩신으로 절단하면 F (ab')₂ 단편을 얻을 수 있으며, 바람직하게는 유전자
 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

본원에서 용어, "가변 영역"이란 항원과 특이적으로 결합하는 기능을
 수행하면서 서열상의 많은 변이를 보이는 항체 분자의 부분을 의미하고, 가
 변 영역에는 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR)인
 15 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. 상기 CDR 사이에는 프레임 워크 영역
 (framework region, FR) 부분이 존재하여 CDR 고리를 지지해주는 역할을 한
 다.

본원에서 용어, "상보성 결정 영역"은 항원의 인식에 관여하는 고리모
 양의 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이
 20 결정된다.

본원에서 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변
 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3 개의
 불변 영역 도메인 C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을
 모두 의미한다.

또한 본원에서 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한
 25 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_L 및 불
 변 영역 도메인 C_L을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한
 다.

본 발명의 항체는 당업계 알려진 기술을 참고하여 하이브리도마 방법

에 의하여 제조되었다 (예, Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조).

본원에서 용어, "하이브리도마" 는 항체를 생산하는 B 림프구와 골수 종 암세포 (미엘로마 세포)를 융합하여 얻은 세포를 의미하는데, 미엘로마 세포는 형질전환된 세포로, 배양접시에서 오랜 기간 배양할 수 있는 장점이 있어, 한 가지 항체만을 만들어 내는 미엘로마 하이브리도마를 분리해 내면 손쉽게 단일클론항체를 대량으로 획득할 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 하이브리도마는 수탁번호 KCLRF-BP-00276 의 하이브리도마 세포주이다. 본 발명에서는 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마에 의해 생산되는 항체를 12G1 으로 명명하였으며, 이의 중쇄 및 경쇄 가변영역 서열을 분석한 결과, 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역을 포함하는 것으로 분석되었다.

본 발명에서 상기 항체를 제조하기 위해 사용한 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 시트룰린화 폴리펩타이드 항원은, 류마티스 관절염에서 자가항체 생성의 원인 물질로 알려진 필라그린 중에 가장 반응성이 높은 보존 서열을 토대로 하여 제조한 것이다.

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-생산 세포를 표준적인 조직 배양 방법에 의해 증식시킨다. 한계 희석법 (limited dilution technique)에 의한 서브클로닝에 의해 균일한 세포 집단을 수득한 후, 시트룰린화된 단백질에 대해 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마를 표준 기술에 따라 시험관내에서 또는 생체내에서 대량으로 배양한다.

하이브리도마의 스크리닝은 주지의 방법에 의하여 행할 수 있다. 예를 들면, 면역원으로서 이용한 시트룰린 함유 폴리펩타이드를 고체 지지체에 결합시키고, 하이브리도마 배양 상청액에 대하여 ELISA 등의 주지의 면역 측정을 수행하여 본 발명의 단클론 항체를 산생하는 하이브리도마를 스크리닝할

수 있다. 이 때, 시트룰린화 되어 있지 않은 단백질, 예컨대 C-반응성 단백질을 결합시킨 고체 지지체를 이용한 면역 측정도 함께 수행하고, 시트룰린화된 폴리펩타이드에 대한 반응성이 비시트룰린화 단백질에 대한 반응성보다도 높은 것을 선별함으로써, 비시트룰린화 단백질에의 교차 반응성이 낮은 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 선택할 수 있다.

상기한 하이브리도마가 생산하는 단클론 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 전지영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리할 수 있다.

본 발명에서 제공하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, 체내에 존재하는, 또는 생체 시료 내 존재하는 시트룰린화된 단백질을 특이적으로 검출함으로써 다양한 연구 목적, 예를 들어, 시트룰린화-관련 질환의 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

시트룰린화-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-관련 질환은 영향 받은 조직 또는 질환 관련 조직에서 비정상적인 수준의 시트룰린 함유 단백질이 존재하므로, 본 발명의 항-시트룰린화 단백질 항체를 이용하여 목적 조직 시료로부터 웨스턴 블롯 또는 ELISA와 같은 면역학적 분석에 의하여 시트룰린 생성의 수준을 분석할 수 있다.

이러한 시트룰린화-관련 질환은 염증 관련 질환 및 자가면역질환, 예를 들어, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 건선, 및 알츠하이머 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

따라서, 본 발명은 본 발명의 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 시료 내 시트룰린화된 단백질의 항원-항체 반응을 면역 측정하는 단계를 포함하는, 시료 내 시트룰린화된 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.

본 발명의 시트룰린화된 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 항원결합부위와 결합된 양을 의미하며, 항원-항체 복합체의 양을 의미한다. 이러한 항원-항체의 반응 수준은 당
5 업계에서 통상적으로 사용되는 측정방법을 제한 없이 사용하여 비교할 수 있으며, 예를 들어, 검출 라벨 (detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.

상기에서 면역 측정은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며
10 예를 들어, 웨스턴블랏 (western blotting), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법 (Radioimmunoassay, RIA), 방사면역 확산법 (Radioimmunodiffusion), 면역형광분석법 (Immunofluorescence assay, IFA), 면역 블롯 (immunoblotting), 오우크레로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 (Rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역 침전분석법
15 (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 시트룰린화된 단백질을 검출할 수 있다.

20 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 지지체
25 에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키거나 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출할 수 있다. 이와 같이 항원 및 항체의 복합체 형성 정도를 확인하여, 시료 내 시트룰린화된 단백질을 검출

할 수 있다.

본 발명에서 용어 "시료"란 개체의 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 활액, 뇨, 객담, 림프액 및 뇌척수액 등을 포함하며, 시트룰린화된 단백질을 검출할 수 있는 세포를 포함하는 시료이면 제한되지 않는다.

5 또한, 본 발명은 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화된 단백질 검출용 조성물 및 검출 키트를 제공한다.

또한, 본 발명은 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화 관련 질환의 진단용
10 조성물 및 진단 키트를 제공한다.

본 발명의 키트는 시트룰린화된 단백질에 대한 항체 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당 업계에 공지된 도구 또는 시약을 추가로 포함할 수 있다.

상기에서 면역학적 분석은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 있는
15 는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 웨스턴블랏, ELISA, 방사선면역분석법, 방사면역 확산법, 면역형광분석법, 면역 블롯, 오우크레로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역 침전분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

면역학적 분석에 사용되는 도구 또는 시약으로는 적합한 담체 또는
20 지지체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제, 및 안정화제 등을 포함할 수 있다. 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 및 반응 정지
25 제 등을 포함할 수 있다.

본 발명의 키트에 포함되는, 시트룰린화된 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, 폴

리스틸렌, 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.

10 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지는 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 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, 피옥시다아제 (호스라디시 피옥시다제 등), 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라아제, 글리코즈 옥시다아제, 헥소키나제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있다. 형광물질로는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 플루오르신이소티옥시아네이트 등을 사용할 수 있다. 리간드로는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 발광물질로는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시퍼라아제 등이 있다. 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있고 레독스 분자로는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 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.

25 효소 발색 기질로서, 예를 들어 효소 표지로서 호스라디시 피옥시다제 (HRP) 를 선택한 경우에는 기질로 3-아미노-9-에틸카르바졸, 5-아미노살리실산, 4-클로로-1-나프톨, o-페닐렌디아민, 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산), 3,3-디아미노벤지딘, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, o-디아

ul씩 넣어준 뒤 상온에서 2시간 동안 인큐베이션을 하였다. 음성대조군으로
 는 PBS와, 마우스에 항원을 주입하기 전에 얻어낸 혈청을 각각 사용하였다.
 그 뒤에 PBS를 이용해서 앞에서 언급한 세척 과정을 4회 반복하여 진행한
 뒤에 Mouse IgG를 인지 할 수 있는 항체 중 HRP가 연결되어 있는 항체를 2차
 5 항체로 사용하여 각 웰에 100 ul씩 넣어주었다. 이 때 사용된 항체는 1;5000
 으로 희석하여 사용하였다. 이렇게 2차 항체를 넣어준 뒤 1시간 동안 상온에
 서 인큐베이션 한 뒤에 4회 세척하였다. 세척이 끝난 뒤에 잔존하고 있는 용
 액의 여분을 확실히 제거하고 HRP substrate를 각 well에 100 ul씩 넣어준
 뒤에 빛을 차단한 채로 30분간 인큐베이션하여 발색 반응을 유도하였다. 30
 10 분 뒤에 stop solution을 넣어준 뒤에 바로 450nm파장에서 single point
 photo mode로 발색 정도를 측정하였다. 본 실험에서는 HRP 발생을 위한
 substrate로 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)를 사용하였으며, 이데
 따른 Stop Solution 은 0.16 M sulfuric acid 를 사용하였다.
 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 희석시킬 때의 기울기가 급격할수록
 15 항원 특이도 (specificity)가 떨어진다고 볼 수 있으며, CCP 에 대하여 높은
 특이도를 나타내고 CRP 에는 특이도가 낮은 마우스 #2 를 선별하였다 (도
 4).

【표 1】

구분	아미노산 서열	서열번호
Filaggrin 유래 CCP	HQCHQESTXGRSRGRCCGRSGS; 여기에서 X는 시트룰린을 나타냄. 밑줄 친 두 개의 "C" 사이에 화학결합 형성	1
CRP	HQCHQESTRGRSRGRCCGRSGS	2

20

1-2. 하이브리도마 세포의 제조

상기 선별된 마우스 #2 를 이용하여 본 발명에서 하이브리도마 방법을
 통하여 단클론 항체를 제조하는 기본 과정을 도 2에 나타내었다.

우선, CCP에는 결합하고 CRP 에는 결합하지 않는 항체를 생성하는 마

우스 #2 의 비장을 떼어내어 림프구를 분리한 다음, 미리 배양한 미엘로마 세포와 융합시켰다. 융합된 세포를 hypoxanthin, aminopterin, 그리고 thymidine이 첨가되어 있는 배지 (HAT medium)에서 배양하여 미엘로마 세포와 B 림프구만이 융합된 세포 (하이브리도마)를 선택적으로 수득하였다. 미엘로마 세포와 B 림프구를 융합하게 되면 원하는 하이브리도마 외에도, 융합되지 않고 남아있는 미엘로마 세포나 B 림프구들도 존재하게 되며, 심지어는 미엘로마 세포끼리 또는 B 림프구끼리 융합된 세포들도 존재하게 된다. 따라서, 이들 여러 세포로부터 미엘로마 세포와 B 림프구만이 융합된 하이브리도마 세포를 얻기 위하여, 미엘로마 세포의 경우 B 림프구와 융합되지 못하면 선택되어 죽어버리도록 thymidine kinase (TK)와 hypoxanthin guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) 돌연변이가 유도되어 있는 세포주를 사용하였다. 이렇게 해서 살아남은 하이브리도마 세포를 각각의 서로 다른 배양접시에 배양하였다. 배양이 어느 정도 이루어지면, 배지를 이용하여 항원과 반응시켜보아 원하는 항체가 만들어진 하이브리도마 클론을 ELISA 를 통해 선별하였다 (도 5).

하이브리도마 선별을 위하여, 먼저 준비된 CCP 펩타이드와 CRP 펩타이드를 최종 농도 250ng/well 이 되도록 PBS 혹은 카보네이트 버퍼에 희석하였다. 이렇게 희석된 용액을 96 well plate에 50 ul씩 분주하여 상온에서는 2시간, 4°C에서는 밤새도록 인큐베이션 하였다. 그 뒤에 PBS 200 ul씩 각 웰에 넣어 세척하였다. 세척시에는 plate를 뒤집어 내부에 있는 용액이 모두 밖으로 쏟아지게 한 뒤에 paper towel 위에 plate를 내리쳐 내부의 용액을 완전히 제거하였다. 하이브리도마 세포를 키운 미디어의 상층액을 걷어서 이를 1:1000으로 희석하여 각 well에 100 ul씩 넣어준 뒤 상온에서 2시간 동안 인큐베이션을 하였다. 그 뒤에 PBS를 이용해서 앞에서 언급한 세척 과정을 4회 반복하여 진행한 뒤에 Mouse IgG를 인지 할 수 있는 항체 중 HRP가 연결되어 있는 항체를 2차 항체로 사용하여 각 웰에 100 ul씩 넣어주었다. 이 때 사용된 항체는 1:5000으로 희석하여 사용하였다. 이렇게 2차 항체를 넣어준 뒤 1시간 동안 상온에서 인큐베이션 한 뒤에 4회 세척하였다. 세척이 끝난 뒤에 잔존하고 있는 용액의 여분을 확실히 제거하고 HRP substrate를 각

well에 100 ul씩 넣어준 뒤에 빛을 차단한 채로 30분간 인큐베이션하여 발색 반응을 유도하였다. 30분 뒤에 stop solution을 넣어준 뒤에 바로 450nm파장에서 single point photo mode로 발색 정도를 측정하였다. 본 실험에서는 HRP 발생을 위한 substrate로 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)를 사용하였다. 5

이후, 하이브리도마 세포들로부터 CCP 및 CRP 를 이용한 반복적인 스크리닝을 통하여 최종 단계에서 두 개의 클론 11G1 및 12G1을 수득하였다 (도 6 및 도 7). 도 5 내지 도 7은 하이브리도마의 각 스크리닝 단계에서 항 CCP 항체가 표적 펩타이드인 CCP 를 인지하여 결합하였을 때의 결합 강도를 450nm 파장에서의 흡광도로 측정하여 나타낸 값이다. (+) 와 (-)로 표시된 값은 각 실험에서의 양성, 음성 대조군 값을 의미하는데, 이를 기준으로 각 하이브리도마 클론들이 얼마나 효과적인 항-CCP를 분비하고 있는지를 측정하여 선별 후, 그것을 반복적으로 계대배양함으로써 효과적인 항-CCP만을 분비하는 클론이 우점하도록 유도하여 특정화된 세포주를 형성하도록 유도하는 방식으로 두 개의 클론 11G1 및 12G1 을 선별하였고, 이 중 12G1 세포주는 2011년 11월 15일자로 한국 세포주 연구재단 (서울시 종로구 연건동 28번지 서울대학교 의과대학 암연구소)에 기탁하였으며, 수탁번호 KCLRF-BP-00276을 부여받았다. 15

또한, 상기 12G1 하이브리도마 세포주에서 생산되는 단클론 항체를 12G1 으로 명명하였으며, 이의 가변영역 염기서열을 자동서열분석기로 분석한 결과, 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역을 확인할 수 있었다. 20

25 실시에 2. 류마티스 관절염의 조직 내 시트룰린화된 단백질의 검출 (면역조직화학염색)

본 발명에 따른 항체 12G1 이 류마티스 관절염 환자의 조직 내에 존재하는 시트룰린화 펩타이드를 특이적으로 검출할 수 있는지 면역조직화학염색법으로 확인하였다.

파라핀 포매되어 있는 조직을 4um로 절단 하여 면역조직화학염색을

- 위해 준비하였다. 60°C dry oven에서 40분간 인큐베이션하여 탈과라핀한 뒤에 에탄올을 순차적 비율로 낮추어 가며, dipping하였다 (100%~70%). 이를 Tap water로 세척하여 3% H_2O_2 에 담가서 13분간 인큐베이션한 뒤에 15분간 세척하였다. 사용하고자 하는 12G1항체가 마우스 유래 항체이기에 VECTASTAIN
- 5 Elite ABC Kit ((Mouse IgG) Catalog# PK-6102)을 사용하여 염색하였다. 간략히 설명하자면, normal serum으로 60분간 blocking을 수행한 뒤에 1차 항체를 1:100으로 희석하여 각 슬라이드에 분주 후 4°C에서 overnight한 뒤에 tris buffer로 5분간 3회 세척하였다. 바이오틴이 부착된 2차 항체를 사용하여 40분간 인큐베이션한 후 DAB peroxidase substrate kit(Vector Lab
- 10 Catalog# SK-4100)으로 2분간 발색한 뒤에 tap water로 dipping하여 stop하였다. 이후 배경염색을 위해 mayer's Hematoxylin (Wako Catalog# 131-09665)을 이용 2분 염색한 뒤에 tap water로 완전히 세척해 주었다. 그 뒤에 xylene을 이용, Mounting Medium (Vector Lab Catalog# H-5000)으로 mount한 뒤에 현미경으로 관찰하였다.
- 15 그 결과, 류마티스 관절염 환자 3명 모두의 조직에서 항체 12G1에 반응하여 갈색 염색이 나타났으므로 시트룰린화된 단백질이 존재함을 확인할 수 있었다 (도 8 내지 도 10). 한편, 염증성 반응이 존재하지 않는 퇴행성 관절염 환자의 조직에서는 시트룰린화된 단백질이 검출되지 않았다 (도 11).

20 **실시예 3. 흡연자의 편도 조직 내 시트룰린화된 단백질의 검출 (면역조직화학염색)**

흡연이 편도 조직에서 시트룰린화를 촉진시킨다는 보고가 있다 (Arthritis & Rheumatism, 54(1):38-46, 2006). 상기 보고에 의하면, 흡연자의 경우 시트룰린을 발현하는 기관지폐포세척 세포(bronchoalveolar lavage

25 cell)의 비율이 비흡연자에 비하여 높았으며 폐 염증을 가진 흡연자의 경우 그 비율이 가장 높았다.

이에, 본 발명에 따른 항체 12G1 이 흡연자의 편도 조직 내에 존재하는 시트룰린화 펩타이드를 특이적으로 검출할 수 있는지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 3과 같은 방법으로 면역조직화학염색을 수행하였다. 그 결과,

흡연자의 편도 조직에서 항체 12G1에 반응하여 갈색 염색이 나타났으므로 시트룰린화된 단백질이 존재함을 확인할 수 있었다 (도 12).

실시예 4. 류마티스 관절염 환자의 혈액 내 시트룰린화된 단백질의 검

5 출 (웨스턴 블랏)

본 발명에 따른 항체 12G1 이 류마티스 관절염 환자의 혈액 시료 내에 존재하는 시트룰린화 펩타이드를 특이적으로 검출할 수 있는지 웨스턴 블랏을 통해 실험하였다.

우선, 류마티스 관절염 (RA) 환자 14명의 혈액 시료와, 건강한 사람 (HC) 3명의 혈액 시료를 준비하였다. 각 시료에서 전체 단백질을 분리하고 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 시트룰린화를 검출하는 항체와 반응시켰다. 상기 검출을 위한 항체로는 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마에 의해 생산되는 항체 12G1을 사용하였다. 웨스턴 블랏 실험 조건은 다음과 같다.

- 15 12% SDS-PAGE gel, 40ug loading
- Transfer 2h
- Blocking (5% skim milk) 30분
- 1차 항체 : 정제된 항체 12G1, 또는 하이브리도마(KCLRF-BP-00276) 배양 배지 상층액
- 20 2차 항체 : 항-마우스
- Develop : exposure time 20min

도 13은 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마에 의해 생산되는 항체 12G1 을 정제된 상태로 사용하여 시료 내 시트룰린화된 항원을 검출한 결과를 나타낸다. 웨스턴 블랏에 의해 검출된 밴드를 보면, 류마티스 관절염 (RA)을 가진 4명의 환자의 시료 중 특이적으로 3명에게서 약 17 kDa 에 해당 하는 밴드가 나타났으며, 건강한 사람 (HC)의 시료에는 해당 밴드가 나타나지 않았다. 즉, 류마티스 관절염 환자의 시료에서만 특이적으로 시트룰린화된 항원이 검출되는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여, 본 발명의 항체가 류마티스 관절염 환자의 혈액 시료 내에 존재하는 시트룰린화

단백질을 특이적으로 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.

실시예 5. 류마티스 관절염의 진단 유용성 검증

본 발명에 따른 항체 12G1 이 대표적인 시트룰린화-관련 질환인 류마
5 티스 관절염을 진단하기 위한 진단 키트에 사용될 수 있는지 그 진단 유용
성을 검증하였다.

현재 류마티스 관절염의 진단 키트로서, 류마티스 관절염의 혈청학적
표지자인 류마티스 유사인자 (Rheumatoid factor, RF)를 검출하는 진단 키트
와, 펠라그린 펩타이드의 고리형 변이체(cyclic citrullinated peptide, CCP)
10 를 이용하여 혈청시료 내 항-시트룰린화 단백질 항체를 검출하는 항-CCP
(anti-CCP) 진단 키트가 사용되고 있다. 상기 항-CCP 진단 키트의 원리는 유
전자 재조합 기술에 의해 생산된 CCP를 마이크로 웰에 부착하고, 검체 시료
를 분주하여 항원-항체 반응을 유도하여, 검체 시료 내 존재하는 항-CCP 항
체를 검출하는 것이다. 반면, 본 발명에서 제공하는 키트는 항체 12G1 을 포
15 함하며 검체 시료 내에 존재하는 시트룰린화된 항원을 검출한다는 점에서
항-CCP 진단 키트와 차이가 있다.

본 발명자들은, 본 발명의 12G1 항체를 이용한 진단 키트가 기존에 사
용되던 RF 진단 키트 및 항-CCP 진단 키트와 상관관계가 있는지를 확인하기
위하여 48명의 류마티스 관절염 환자를 대상으로 통계적 분석을 수행하였으
20 며, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

통계적 분석 결과 $P < 0.05$ 일 경우 유의한 상관관계가 있음을 나타내는
데, 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에서 12G1 항체를 이용하여 시료 내 시
트룰린화된 항원을 검출하는 진단 키트의 경우 RF 키트와 상관관계가 다소
떨어지는 것으로 나타났으나, 기존의 항-CCP 진단 키트와는 매우 유의한 상
25 관관계를 나타내었다. RF 진단 키트의 경우 그 진단 특이성이 항-CCP 키트에
비해 떨어지는 것으로 보고되어 있으며, 본 발명의 키트는 기존의 항-CCP 진
단 키트와 동등한 성능을 나타내었으므로, 류마티스 관절염 진단에 유용성을
가짐을 확인할 수 있다.

또한, 류마티스 관절염 진단을 위한 기존의 항-CCP 진단 키트의 경우

시료 내 존재하는 항체를 검출하는 방식으로 작동하는 것과는 달리, 본 발명의 키트는 12G1 항체를 사용하여 시료 내 존재하는 시트룰린화된 항원을 검출한다는 점에 특징이 있으며, 이는 아직 시도되지 않은 새로운 진단 방식이다. 본 발명의 키트가 항-CCP 진단 키트와 높은 상관관계를 나타내었다는 것은, 본 발명의 항체를 사용하여 기존의 진단 결과와 유사하거나 혹은 더 나은 방식의 진단 시스템의 도입이 가능하다는 것을 의미한다.

【표 2】

(n=48)	Density	P값
RF titer	0.108	0.464
CCP titer	0.334	0.020

10 **【산업상 이용가능성】**

본 발명에서 제공하는 단클론 항체는 시트룰린화된 단백질을 검출하는데 이용될 수 있어 연구실 등에서 유용한 실험 재료로써 세포 사멸, 조직 염증, 및 자가면역질환의 진단 및 치료 등 다양한 분야에서 응용할 수 있다. 구체적으로, 시트룰린 관련 질환의 세포적 프로세스를 연구하거나, 항-시트룰린화 단백질 자가 항체가 병리학적 상태에 미치는 영향을 연구하거나, 시트룰린화 관련 질환의 치료제를 개발하는 연구 등에 본 발명의 항체를 이용할 수 있다.

(번역문)

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국제양식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된
원기탁에 의한 수탁증

수신: 주지현

대한민국 서울시 서초구 반포대로 222 서울성모병원 8102 호

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: 12G1	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCLRF-BP-00276
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: [x] 과학적 성질 [x] 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 항목 I에 표시된 미생물을 수탁받고 2011년 11월 15일자로 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국세포주연구재단 주소: 대한민국 서울시 종로구 연건동 28번지 서울대학교 의과대학 암연구소 (우) 110-744	대표자 서명: 서명일: 2011. 12. 09.

위 번역문 원본과 상위 없음	
-----------------	--

【청구의 범위】

【청구항 1】

서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역을 포함하는, 시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마에 의해 생산되는 것인 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

10

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 C-반응성 단백질 (C-reactive protein, CRP) 에는 결합하지 않는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

【청구항 4】

시트룰린화된 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는, 수탁번호 KCLRF-BP-00276 인 하이브리도마.

【청구항 5】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화된 단백질 검출용 조성물.

20

【청구항 6】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 시트룰린화된 단백질 검출용 키트.

25

【청구항 7】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 시료 내 시트룰린화된 단백질의 항원-항체 반응을 면역 측정하는

단계를 포함하는, 시료 내 시트룰린화된 단백질을 검출하는 방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 면역 측정은 웨스턴블랏 (western blotting),
 5 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법
 (Radioimmunoassay, RIA), 방사면역 확산법 (Radioimmunoassay), 면역형
 광분석법 (Immunofluorescence assay, IFA), 면역 블롯 (immunoblotting), 오
 우크레로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 (Rocket) 면역전기영동, 조
 직면역 염색, 면역 침전분석법 (immunoprecipitation assay), 보체 고정 분
 10 석법 (complete fixation assay), FACS, 및 단백질 칩 (protein chip)으로 이
 루어진 군에서 선택되는 면역학적 분석에 의한 것인 방법.

【청구항 9】

제7항에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타
 15 액, 활액, 뇨, 객담, 림프액 및 뇌척수액으로 이루어진 군에서 선택되는 면
 역학적 분석에 의한 것인 방법.

【청구항 10】

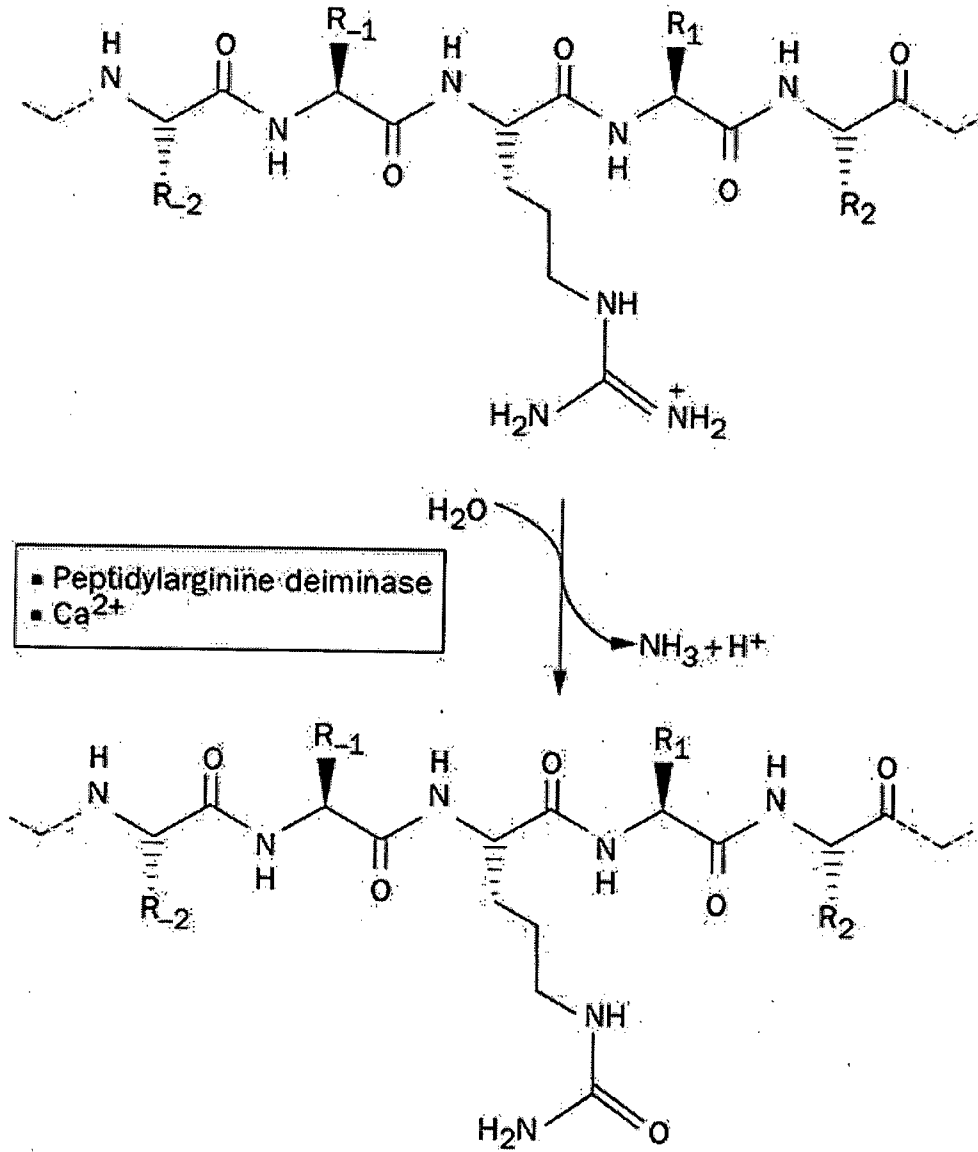
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단클론 항체 또는 그의 항원 결합
 20 단편을 포함하는, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 건선 및 알츠하이머에
 서 선택되는 시트룰린화 관련 질환의 진단용 조성물.

【청구항 11】

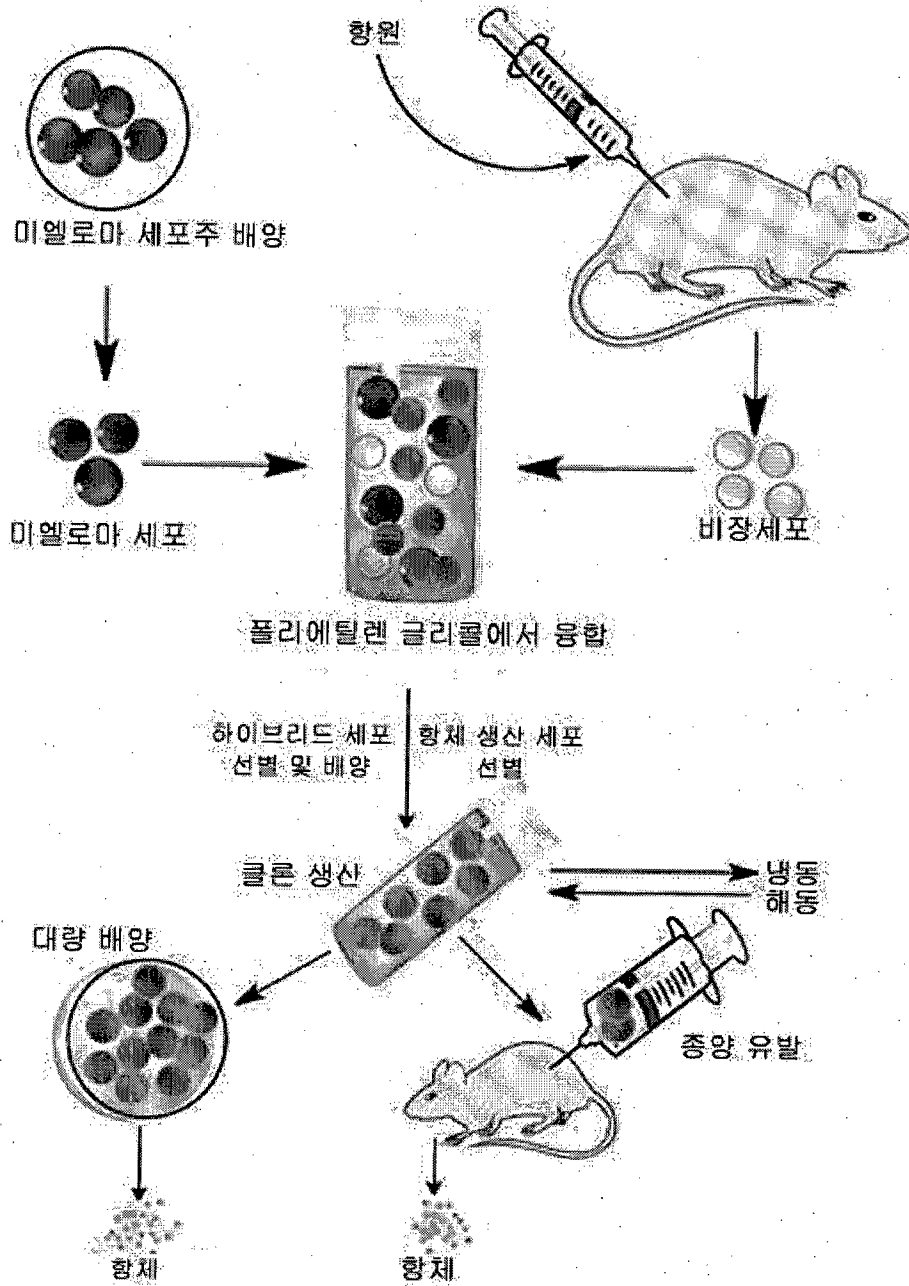
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단클론 항체 또는 그의 항원 결합
 25 단편을 포함하는, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 건선 및 알츠하이머에
 서 선택되는 시트룰린화 관련 질환의 진단용 키트.

【도면】

【도 1】



【도 2】



【도 3】

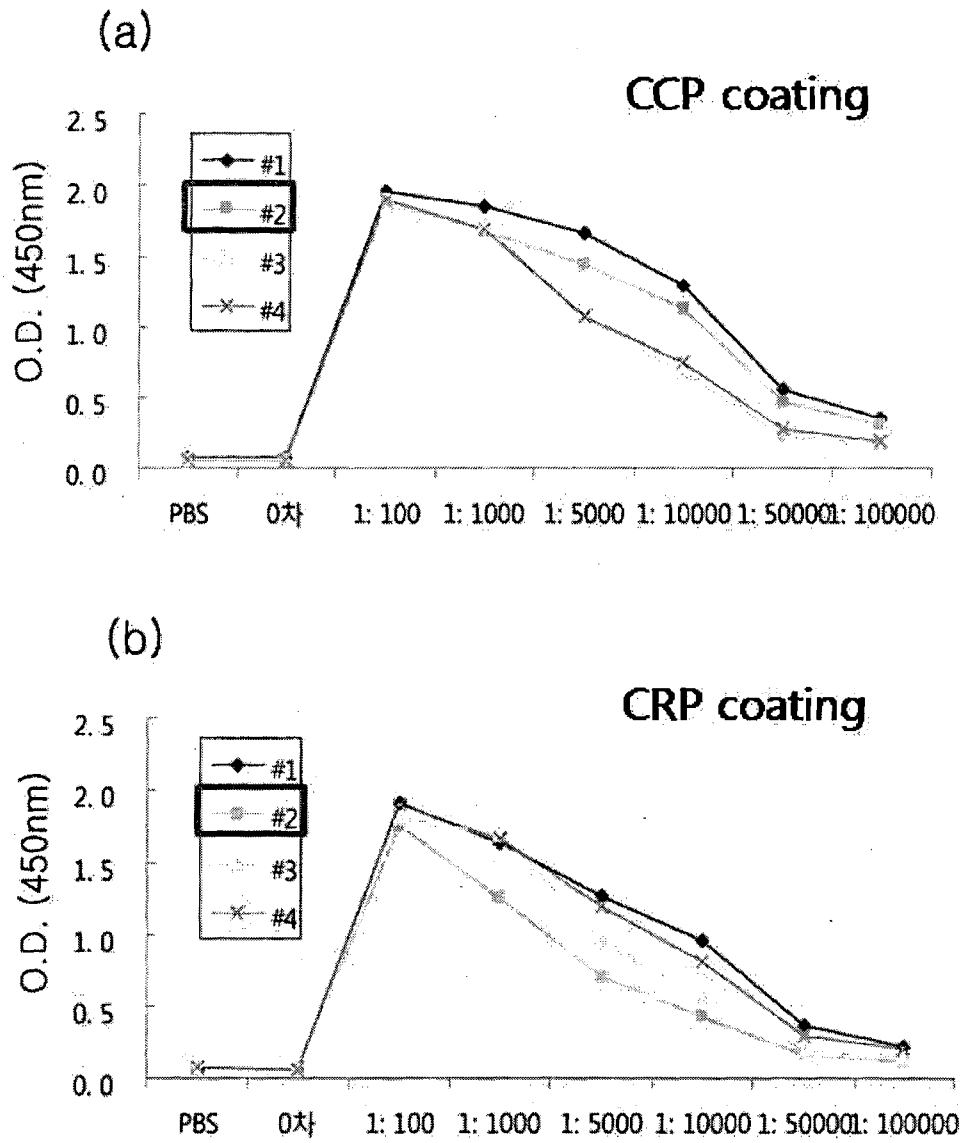
<ul style="list-style-type: none"> • Antigen : CCP • 4 mice / 17 week schedule
--

Immunize Schedule table

Initiation	Primary Injection	1 st Boosting	1 st Bleeding ELISA test	2 nd Boosting	Fusion
2011.06.28	2011.06.28	2011.07.12	2011.07.13	-	2011.07.15

0 weeks	Injection	12 weeks	Screening
3 weeks	Fusion	13 weeks	3 rd Cloning
5 weeks	Fusion ELISA	15 weeks	Screening
6 weeks	Screening	16 weeks	Freezing
7 weeks	1 st Cloning	17 weeks	Final Screening
9 weeks	Screening	21 weeks	Ascites (additional order)
10 weeks	2 nd Cloning		

【도 4】



【도 5】

CCP coating

2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.055	0.056	0.062	0.059	0.055	0.083	0.070	0.055	0.070	0.058	0.061	0.077
B	0.057	0.052	0.053	0.066	0.063	0.080	0.067	0.058	0.058	0.056	0.053	0.051
C	0.057	0.059	0.070	0.052	0.055	0.059	0.053	0.051	0.055	0.068	0.064	0.058
D	0.051	0.058	0.067	0.063	0.065	0.090	0.061	0.073	0.053	0.051	0.057	0.070
E	0.061	0.062	0.057	0.061	0.057	0.092	0.073	0.064	0.086	0.071	0.055	0.074
F	0.064	0.056	0.060	0.084	0.087	0.075	0.074	0.064	0.055	0.064	0.060	0.060
G	0.076	0.055	0.077	0.063	0.072	0.077	0.056	0.060	0.074	0.065	0.069	0.048 (-)
H	0.057		0.069	0.059	0.061	0.060	0.072	0.064	0.065	0.057	0.061	1.363 (+)

CRP coating

2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.112	0.103	0.100	0.096	0.093	0.101	0.100	0.081	0.103	0.101	0.090	0.094
B	0.086	0.071	0.059	0.065	0.063	0.067	0.066	0.070	0.059	0.065	0.064	0.064
C	0.088	0.066	0.071	0.056	0.059	0.062	0.060	0.053	0.059	0.068	0.064	0.069
D	0.091	0.073	0.063	0.061	0.066	0.078	0.066	0.064	0.054	0.058	0.061	0.068
E	0.080	0.069	0.065	0.060	0.055	0.068	0.062	0.064	0.071	0.075	0.061	0.074
F	0.091	0.089	0.070	0.076	0.079	0.069	0.068	0.070	0.058	0.067	0.061	0.067
G	0.096	0.068	0.064	0.075	0.063	0.078	0.059	0.068	0.077	0.067	0.077	0.064 (-)
H	0.096	0.091	0.082	0.090	0.081	0.089	0.091	0.087	0.096	0.082	0.080	1.800 (+)

【도 6】

- CCP coating

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.078	0.079	0.083	0.085	0.056	0.065	0.062	0.066	0.071	0.073	0.082	0.101
B	0.082	0.071	0.083	0.083	0.084	0.117	0.065	0.071	0.100	0.076	0.115	0.091
C	0.076	0.094	0.090	0.079	0.100	0.075	0.081	0.082	0.085	0.087	0.089	0.073
D	0.090	0.104	0.107	0.075	0.112	0.064	0.110	0.076	0.079	0.259	0.092	0.090
E	0.079	0.071	0.074	0.104	0.103	0.103	0.081	0.089	0.061	0.091	0.079	0.091
F	0.057	0.090	0.072	0.074	0.100	0.074	0.089	0.083	0.100	0.077	0.087	0.076
G	0.083	0.090	0.094	0.086	0.075	0.068	0.088	0.112	0.088	0.058	0.085	0.085 (-)
H	0.083	0.056	0.084	0.074	0.069	0.076	0.076	0.065	0.082	0.091	0.079	2.035 (+)

- CRP coating

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.071	0.088	0.065	0.057	0.053	0.063	0.056	0.068	0.059	0.110	0.108	0.124
B	0.079	0.058	0.064	0.131	0.062	0.094	0.055	0.071	0.121	0.074	0.119	0.123
C	0.079	0.093	0.093	0.066	0.092	0.062	0.077	0.071	0.074	0.088	0.069	0.093
D	0.079	0.088	0.104	0.061	0.091	0.050	0.072	0.052	0.060	0.088	0.115	0.081
E	0.084	0.075	0.119	0.085	0.092	0.078	0.086	0.090	0.056	0.066	0.088	0.117
F	0.077	0.112	0.073	0.081	0.100	0.065	0.064	0.091	0.100	0.069	0.080	0.122
G	0.088	0.109	0.082	0.074	0.079	0.056	0.084	0.082	0.094	0.058	0.081	0.136 (-)
H	0.075	0.067	0.084	0.103	0.101	0.094	0.075	0.081	0.072	0.083	0.093	1.917 (+)

【도 7】

- CCP coating

11Q1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.098	1.800	1.462	0.067	1.954	0.066	0.055	0.049	0.070	0.378	0.067	1.917
B	0.063	1.290	0.184	1.773	0.056	1.732	0.053	0.057	0.059	0.057	1.617	0.063
C	1.691	0.154	0.050	1.888	0.932	0.052	1.644	0.049	0.069	0.049	0.050	0.252
D	1.647	0.074	1.821	1.888	0.310	1.025	0.050	1.720	0.052	0.050	1.171	0.062
E	1.725	1.666	0.058	0.071	0.066	0.645	1.739	0.048	0.052	0.052	0.052	0.062
F	0.071	0.210	0.075	1.615	0.053	0.057	1.631	0.053	0.126	0.053	1.619	0.069
G	0.517	1.175	0.054	0.085	0.057	0.432	0.442	0.057	0.160	1.741	1.267	0.062 (-)
H	0.097	1.775	0.081	1.756	0.088	1.760	0.200	1.751	0.449	0.095	0.068	2.001 (+)

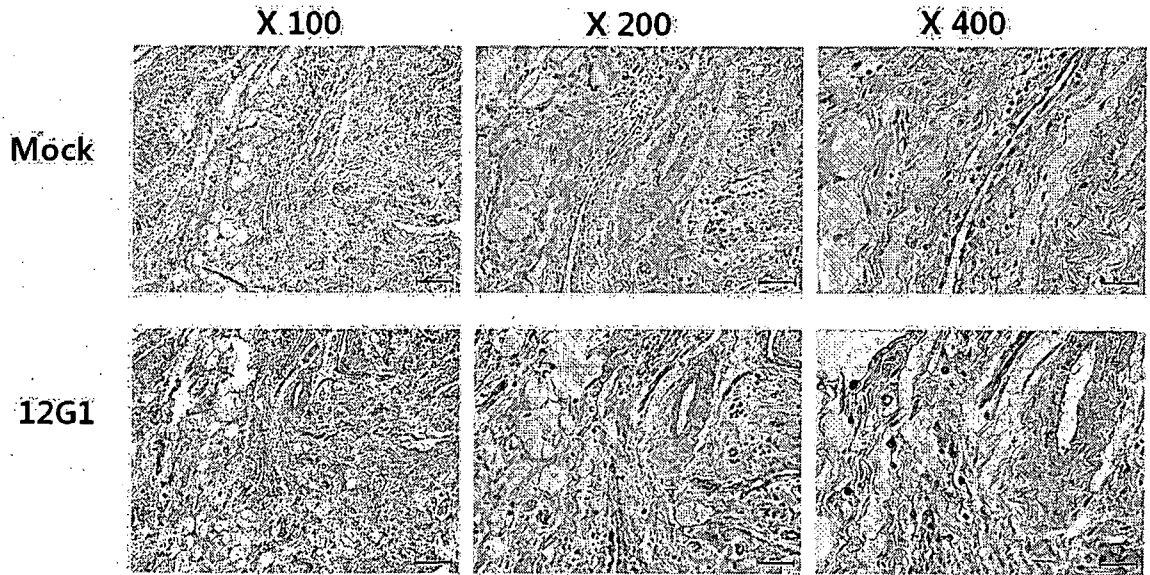
12Q1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.180	1.847	0.071	1.609	0.066	1.380	1.721	0.062	1.774	1.636	0.473	0.097
B	0.074	0.072	0.084	0.050	1.009	0.083	1.391	1.290	0.071	0.569	0.051	0.145
C	0.068	0.659	1.588	1.620	1.332	0.178	0.081	1.651	0.052	1.224	0.552	1.668
D	0.067	0.100	1.858	0.219	0.070	0.045	1.530	0.044	0.120	1.212	0.334	0.124
E	1.370	0.055	0.160	0.263	1.309	0.228	0.048	1.185	0.057	0.055	0.060	0.074
F	0.358	0.174	0.080	0.186	1.850	0.061	0.187	0.222	0.454	1.749	1.004	0.071
G	0.187	0.078	0.081	0.064	1.714	0.091	0.110	0.178	0.201	1.783	1.769	0.077 (-)
H	1.242	0.078	0.090	1.757	1.800	0.095	0.068	1.280	0.096	0.096	0.835	2.093 (+)

- CRP coating

11Q1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.088	0.082	0.069	0.083	0.074	0.057	0.050	0.058	0.114	0.079	0.066	0.059
B	0.069	0.053	0.047	0.048	0.045	0.045	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.059
C	0.077	0.051	0.046	0.045	0.043	0.043	0.045	0.044	0.046	0.046	0.048	0.060
D	0.078	0.051	0.047	0.047	0.049	0.047	0.046	0.047	0.048	0.048	0.051	0.069
E	0.071	0.052	0.047	0.047	0.054	0.045	0.050	0.048	0.048	0.048	0.050	0.062
F	0.070	0.050	0.048	0.047	0.047	0.048	0.047	0.047	0.050	0.052	0.051	0.064
G	0.079	0.056	0.051	0.052	0.055	0.055	0.052	0.054	0.054	0.058	0.058	0.077 (-)
H	0.089	0.077	0.073	0.072	0.067	0.072	0.065	0.070	0.086	0.067	0.067	1.908 (+)

12Q1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.115	0.101	0.079	0.082	0.079	0.075	0.063	0.065	0.066	0.064	0.065	0.104
B	0.087	0.068	0.054	0.057	0.051	0.055	0.052	0.048	0.048	0.052	0.061	0.060
C	0.080	0.065	0.053	0.056	0.048	0.047	0.049	0.046	0.047	0.052	0.057	0.084
D	0.074	0.058	0.052	0.050	0.045	0.047	0.046	0.047	0.046	0.051	0.053	0.069
E	0.073	0.054	0.050	0.051	0.048	0.048	0.049	0.050	0.052	0.051	0.058	0.073
F	0.077	0.059	0.053	0.049	0.060	0.049	0.050	0.052	0.051	0.054	0.058	0.070
G	0.086	0.064	0.060	0.058	0.065	0.056	0.061	0.063	0.066	0.070	0.078	0.094 (-)
H	0.098	0.085	0.078	0.080	0.090	0.093	0.081	0.084	0.088	0.101	0.097	2.059 (+)

【도 8】

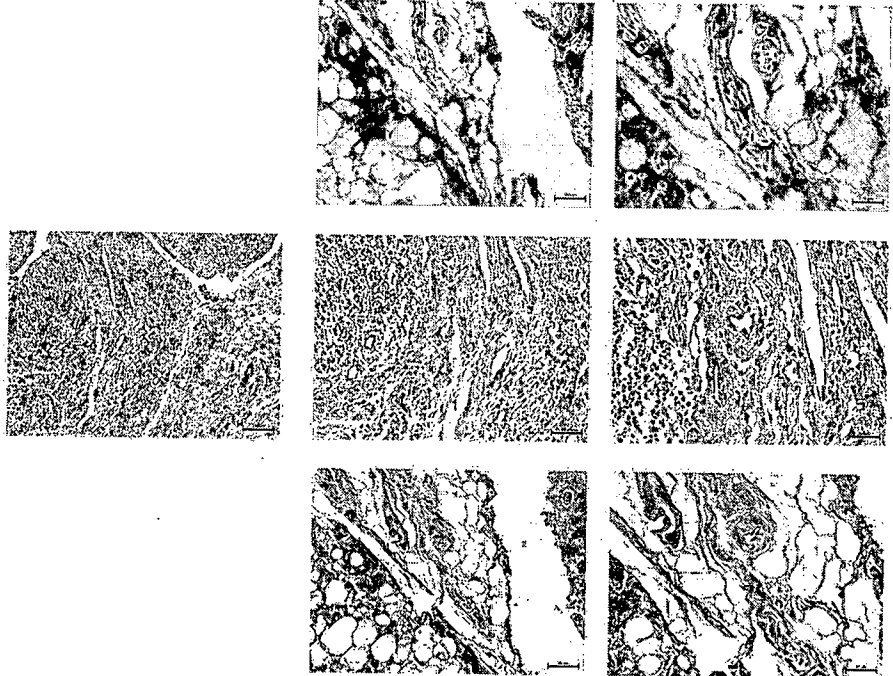


【도 9】

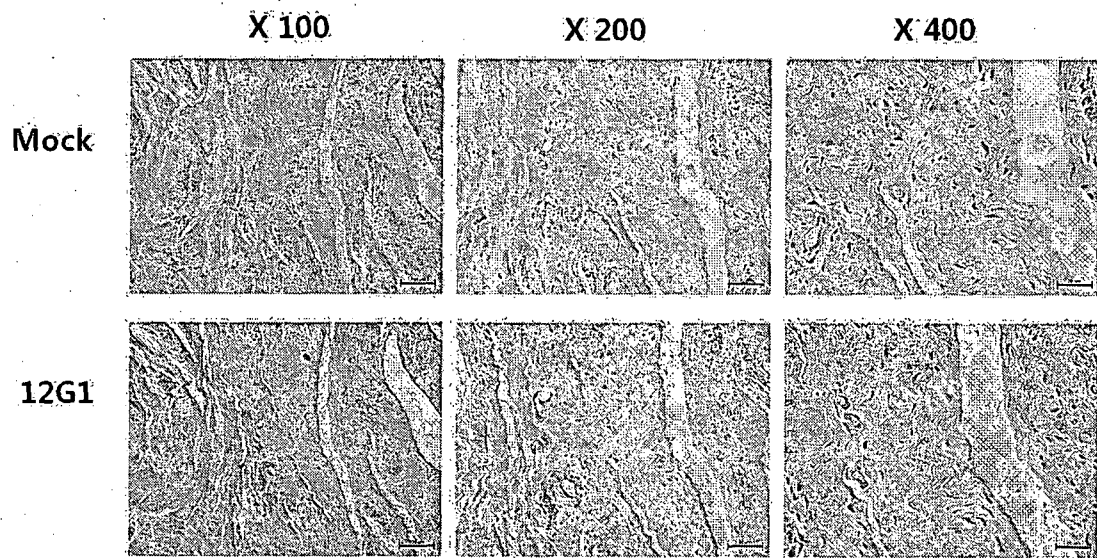
Mock



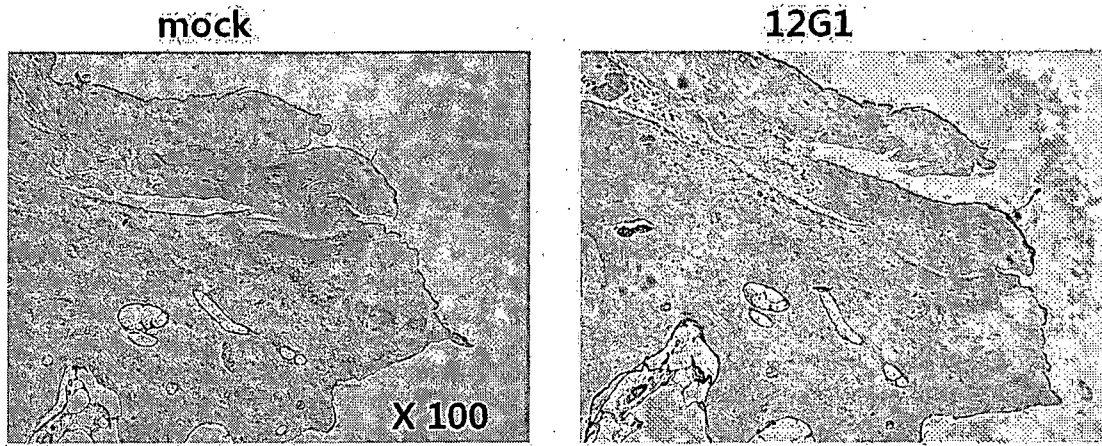
12G1



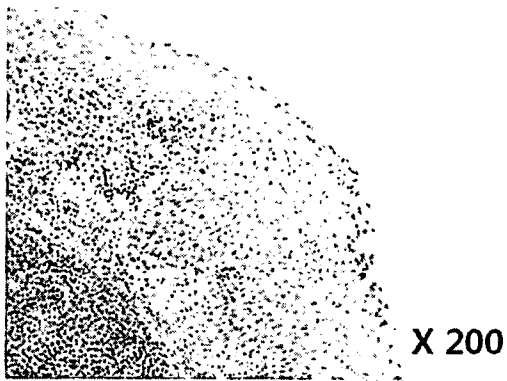
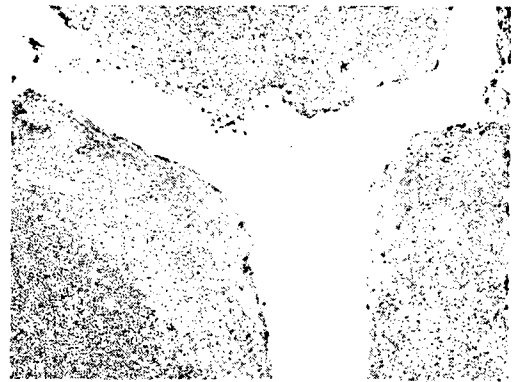
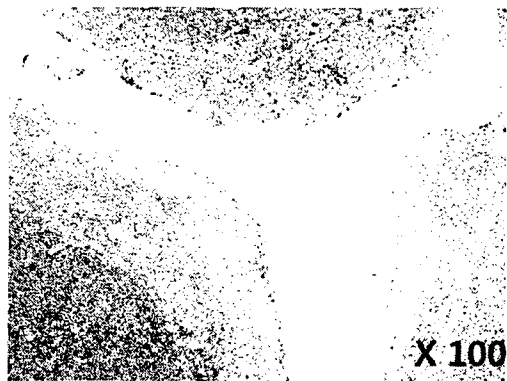
【도 10】



【도 11】



【도 12】



mock

12G1

【도 13】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/004074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18(2006.01)i, C12N 5/12(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/18; C12N 5/06; A61P 37/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: citrullinated protein, heavy chain, light chain, variable region, antigen, coupling, piece, hybridoma, monoclonal, antibody, kit, immunity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KUHN, K. A. et al., THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION (2006) Vol. 116, No. 4, pages 961-973 See the entire document.	1-11
A	Hee Jung Kang et al., Journal of Korean College of Rheumatology (2003) Vol. 10, No. 2, pages 117-125 See the entire document.	1-11
A	WO 2009-132941 A1 (TXCELL et al.) 05 November 2009 See claims 1, 3.	1-11
A	GENBANK NO. ABT11330.1 (10 August 2007) See the entire document.	1-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 NOVEMBER 2012 (27.11.2012)

Date of mailing of the international search report

28 NOVEMBER 2012 (28.11.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/004074

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2009-132941 A1	05.11.2009	AU 2009-242299 A1	05.11.2009
		CA 2722816 A1	05.11.2009
		CN 102076845 A	25.05.2011
		EP 2113560 A1	04.11.2009
		EP 2281032 A1	09.02.2011
		JP 2011-518797 A	30.06.2011
		KR 10-2011-0017373 A	21.02.2011
		US 2011-0038844 A1	17.02.2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/18(2006.01)i, C12N 5/12(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 16/18; C12N 5/06; A61P 37/06

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 시트룰린화 단백질, 중쇄, 경쇄, 가변영역, 항원, 결합, 단편, 하이브리도마, 단클론, 항체, 키트, 면역

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KUHN, K. A. 외 6명, THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION (2006) 116권, 4호, 페이지 961-973 전문참조.	1-11
A	강희정 외 3명, 대한류마티스학회지 (2003) 10권, 2호, 페이지 117-125 전문참조.	1-11
A	WO 2009-132941 A1 (TXCELL 외 7명) 2009.11.05 청구항 1, 3 참조.	1-11
A	GENBANK NO. ABT11330.1 (2007.8.10) 전문참조.	1-11

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2012년 11월 27일 (27.11.2012)	국제조사보고서 발송일 2012년 11월 28일 (28.11.2012)
--	--

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 정재철 전화번호 82-42-481-8403
---	-----------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2009-132941 A1	2009.11.05	AU 2009-242299 A1	2009.11.05
		CA 2722816 A1	2009.11.05
		CN 102076845 A	2011.05.25
		EP 2113560 A1	2009.11.04
		EP 2281032 A1	2011.02.09
		JP 2011-518797 A	2011.06.30
		KR 10-2011-0017373 A	2011.02.21
		US 2011-0038844 A1	2011.02.17