

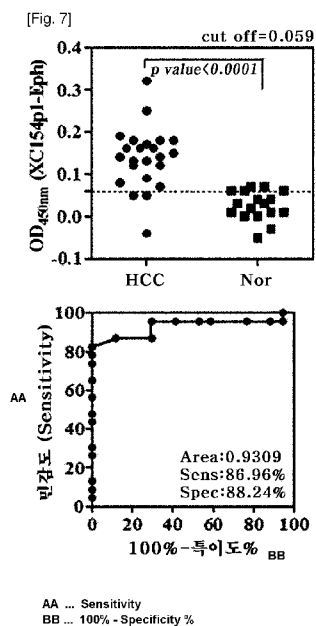


- (51) 국제특허분류:
C07K 16/30 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) C12N 5/16 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/004396
- (22) 국제출원일: 2012년 6월 4일 (04.06.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0053509 2011년 6월 2일 (02.06.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동), 305-806 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 조은위 (CHO, Eun Wie) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 허창규 (HEO, Chang Gyu) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 고정현 (KO, Jeong Heon) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 우미경 (WOO, Mi Kyung) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 유향숙 (YOO, Hyang Sook) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 황해민 (HWANG, Hai Min) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 테헤란로 87길 36, 6층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), 135-973 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MARKER FOR DIAGNOSING LIVER CANCER CONTAINING ANTI-ATIC AUTOANTIBODY, AND COMPOSITION FOR DIAGNOSING LIVER CANCER CONTAINING ANTIGEN THEREOF

(54) 발명의 명칭: 항-A T I C 자가면역항체를 포함하는 간암 진단 마커 및 이의 항원을 포함하는 간암 진단용 조성물



용 키트 개발에 효과적이다.

(57) Abstract: The present invention relates to a fragment comprising an autoantibody which specifically binds to ATIC or an antigen-binding site (i.e. paratope) of the autoantibody, a composition for diagnosing liver cancer containing an agent which measures the expression level of the fragment, a hybridoma cell line producing the autoantibody, a diagnostic kit for liver cancer containing the composition, a method for diagnosing liver using the composition, and a method for screening a liver cancer therapeutic agent using the autoantibody. Using the anti-ATIC specific autoantibody of the present invention as a marker for diagnosing liver cancer, the occurrence of liver cancer can be diagnosed using a non-invasive biological sample such as blood, plasma, serum, lymph tissue, and the like, with a sensitivity of about 87% and a specificity of about 88%, and as liver cancer can be easily diagnosed using an amino acid sequence identified in the present invention, the autoantibody is effective for developing a diagnostic kit for liver cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체(autoantibody) 또는 이의 항원결합부위(antigen-binding site, paratope)를 포함하는 단편, 상기 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암 진단용 조성물, 상기 자가면역항체를 생산하는 하이브리도마 세포주, 상기 조성물을 포함하는 간암 진단용 키트, 상기 조성물을 이용한 간암 진단 방법 및 상기 자가면역항체를 이용한 간암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 항-ATIC 특이반응 자가면역항체를 간암 진단 마커로 사용하면, 혈액, 혈장, 혈청, 림프액 등과 같은 비침습적 생물학적 시료를 이용하여 약 87%의 민감도와 약 88%의 특이도로 간암의 발병 여부를 진단할 수 있으며, 본 발명에서 동정된 아미노산 서열만을 이용하여 용이하게 간암을 진단할 수 있어 간암 진단



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서와 별도로 규칙 13 의 2 에 의하여 제출한 기탁
된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13 의
2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 항-A T I C 자가면역항체를 포함하는 간암 진단 마커 및 이의 항원을 포함하는 간암 진단용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체(autoantibody) 또는 이의 항원결합부위(antigen-binding site, paratope)를 포함하는 단편, 상기 자가면역항체에 특이적으로 결합하는 항원 단편, 상기 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암 진단용 조성물, 상기 자가면역항체를 생산하는 하이브리도마 세포주 및 본 발명의 조성물을 포함하는 간암 진단용 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 조성물을 이용한 간암 진단 방법 및 상기 자가면역항체를 이용한 간암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 간염, 간경변, 간암 등을 포함한 간질환은 한국, 일본, 대만, 중국, 대부분의 동남아 국가에서 단일 질병으로는 가장 많은 환자가 발생하고 있고, 장기별 기준으로 간암은 전체 암 발생 중에서 국내 5위(9.2%)를 차지하고 있으며(보건복지가족부 2007), 한국 남성들의 간암 사망률은 세계 1위로 알려져 있다.
- [4] 현재까지 간암 진단을 위하여, 조직검사를 실시하거나 AFP와 같은 간암표지 단백질 검사를 실시하여 왔다. 또한 이러한 진단, 예후판정, 또는 치료평가에 몇 가지 바이오 마커가 알려져 있으며, 그 중 가장 잘 알려진 마커로 상기 AFP 및 PIVKA-II가 있으나 이들은 특이도, 민감도와 관련하여 여전히 한계점을 갖는다. 최근, 지노믹스(Genomics), 프로테오믹스(Proteomics) 연구에 의해 몇 가지 종류의 간암 마커 후보 단백질과 유전자가 보고되고 있으나, 보고된 유전자들은 주로 조직을 대상으로 한 유전자들이며 혈액 분비 여부 및 혈액으로의 진단 가능성에 대해서는 여전히 밝히지 못하고 있는 실정이다. 이는 상기 바이오마커의 본질적 특성으로 인해 대부분의 종양 표지자 발굴이 조직의 유전자 발현차이를 중심으로 연구되고 있으며, 바이오 마커의 성질상 조직에서 유전자 발현이 높다고 해서 뇨 또는 혈청으로 진단이 가능한 것은 아니기 때문이다. 따라서 진단의 편의성을 위하여 혈액이나 뇨에서 분비되는 종양 표지자 발굴이 중요하며, 이전과는 다른 접근방식으로 바이오 마커를 분석하고, 간암을 포함하는 간질환을 진단하는 방법이 요구되고 있다.
- [5] 상기와 같은 문제점에 의해 혈액, 조직, 배설물로부터 다수의 종양 표지자가 개발되어 있으나, 많은 종류의 종양 표지자는 암이 없어도 증가하거나 검출되는 경우가 있다. 따라서 이러한 진단 마커를 이용한 암의 진단 방법은 어디까지나

부수적인 수단에 불과하고, 그 자체로서 독립적 진단 도구로 사용되지 못하고 있다.

[6]

[7]

한편, 면역시스템은 개체 생성 초기에 자기(self)와 비자기(non-self)를 구별해내는 독특한 시스템으로 구축되고, 그 결과 정상적인 개체의 상태에서 면역시스템에 노출되는 외래항원들에 대해서만 항원-항체반응(humoral immune response), 면역세포반응(cellular immune response)을 유도할 수 있도록 발달한다. 하지만 특정 질병들의 경우에는 자가 유래의 항원(self-antigen)에 대해서도 항체를 생성하는 것이 확인된 바 있는데, 이러한 경우, 해당 항원의 발현 위치가 정상과는 달라 세포 내 발현 단백질이 세포 밖으로 분비되거나, 변형된 형태가 나타나거나, 또는 그 밖의 특징들이 정상적인 개체와 다르게 나타나기 때문인 것으로 보고되었다. 암 발병의 경우에도 비정상적인 암세포 성장에 동반하여 암세포 유래의 항원들에 대한 자가면역 항체들이 생성된다는 사실이 1970년대 이후 계속 보고되고 있으며, 이들 항원을 암유래 항원(tumor-associated antigen; TAA)이라 한다. 현재까지 확인된 암유래 항원들의 종류는 매우 다양한데, 그 중 HER-2/neu oncoprotein은 세포막에 존재하는 수용체 단백질로서 자가면역항체를 유도한다고 알려져 있고, 암세포 성장억제기능을 갖는 단백질인 p53 또한 자가면역항체를 유도한다고 보고되었다. 또한 세포 증식과 관련된 단백질인 cyclin B1 및 CENP-F(centromere protein F), 및 onconeurological protein 인 Hu와 Yo도 자가면역 항체를 유도한다고 알려져 있다. 이와 같은 결과들로 볼 때 더 많은 종류의 암 유래 항원들에 대한 자가면역 항체가 존재할 것이라고 추측되어, 이에 따른 암 관련 자가면역 항체들을 대량으로 스크리닝해 내기 위한 시도들이 계속되고 있다.

[8]

또한, 하나의 자가면역항체보다는 서로 다른 자가면역항체를 한꺼번에 검출하는 암진단법이 훨씬 더 효과적일 수 있다는 결과들이 제시되어 자가면역항체의 다중검출에 대한 연구가 중요한 과제로 제시된 바 있다. 예를 들면 ASB-9, SERAC1, RELT에 대한 자가면역항체를 함께 검출함으로써 100%의 특이도와 80%의 민감도로 유방암을 진단할 수 있음이 보고된 바 있고(L. Zhong et al. Breast Cancer Res 10:3(2008) R40), PIM1, MAPKAPK3, ACVR2B에 대한 자가면역항체의 동시검출로 74%의 특이도와 83%의 민감도로 대장암을 진단할 수 있음이 확인되었다(I. Babel et al. Mol Cell Proteomics 8:10(2009) 2382-2395). 이와 같이 암유래 자가면역항체를 이용한 암진단이 높은 유효성을 보여줌에 따라 암유래 자가면역항체의 신규 발굴은 암바이오마커 도출의 중요한 분야로 자리잡게 되었다.

[9]

자가면역 항체를 동정하기 위하여 종래에는 암세포 유래 단백질 발현 라이브러리를 대상으로 암 환자의 혈액의 반응성을 분석하여 자가면역 항체를 찾는 SEREX (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries of human tumors with autologous serum) 기법을 이용하였다. 그러나, 상기 방법은

암세포 유래 단백질을 라이브러리 수준에서 최대한의 다양성을 갖도록 발현해내는데 한계가 있고, 단백질의 최종산물은 전사(transcription) 이후에도 여러 가지 변형과정(posttranslational modification; PTM)을 거치기 때문에, 이러한 점이 반영되지 않는 단백질 발현 라이브러리는 자가면역항원 검출용으로 충분치 못한 분명한 한계점이 존재한다.

[10]

[11] 이에 대한 대안으로 최근 단백체학 기법을 기본으로 하는 자가면역 항체 발굴연구가 진행되고 있다. 단백체학 기법은 암세포 유래 단백질을 이차원 전기영동(2D-PAGE)으로 펼치고, 암환자의 혈장을 자가면역 항체 시료로 사용하여 반응성을 보이는 단백질 스팟을 확인해낸 후, 확인된 단백질을 질량분석기술로 동정해내는 과정을 포함하는 것으로, 약칭하여 SERPA(serological proteome analysis)라고도 한다. 또한 환자 혈액에서 분리해 낸 항체들을 결합(conjugation)시킨 친화성 크로마토그래피 레진(affinity chromatography resin)을 제조하고 여기에 암세포 단백질을 흘려주어 결합하는 단백질을 잡아 질량분석법으로 동정해내는 MAPPING (Multiple affinity protein profiling) 기법도 사용되고 있다. 또한 암세포 파쇄액을 수천 개의 분획으로 나눠 단백질 칩을 제조하고 이들에 대한 환자혈액의 반응성을 조사하는 방법으로 자가면역항체를 찾아내기도 한다.

[12]

이와 같은 다양한 단백체학적 분석기법들은 전사후 변형(PTM) 특성까지 유지하고 있는 암세포 유래 단백질들에 대한 항체반응성을 직접 확인할 수 있다는 장점을 갖고 있어 SEREX 기법으로는 찾지 못했던 여러 자가면역항체들을 확인해낼 수 있었으나, 여전히 또 다른 한계를 갖는다. 첫째, 항체의 양적인 문제이다. 분석하고자 하는 대상이 두 가지 이상의 혼합물인 경우에는 그 중 양이 많은 것에 대한 분석이 우선되기 때문에 나머지들은 분석 가능한 범위에서 제외될 가능성이 많은데, 환자 혈청은 수많은 항체들의 혼합물이며 이를 구성하는 자가면역항체들의 양적인 차이 및 항원에 대한 친화력 차이에 의해 분석 가능 수준을 결정하게 되어 목적하는 자가면역항체에 대한 분석이 불가능할 수 있다. 둘째, 분석할 자가면역항체 시료를 환자에 의존하기 때문에 암 발병 상태에 따른 자가면역항체 생성을 체계적으로 분석하는데 한계가 있으며, 또한 환자혈액을 실험용으로 과량 채취하는 것이 어려운 일이기 때문에 연구를 진행하는 자체에 한계가 있다. 마지막으로, 항체가 반응하는 항원결정부위(epitope)의 보존에 관한 문제이다. 현재까지 알려진 면역학적 지식에 의하면, 항체반응 부위는 두 가지로 구분될 수 있는데, 하나는 단백질 서열 의존적 항원결정부위(sequential epitope)이고, 또 다른 하나는 단백질 구조 의존적인 항원결정부위(conformational epitope)이다. 생체 내에서 특정항원에 대한 항체가 유도될 때에는 면역세포 항체와 처음 만나는 항원의 상태가 반영되는데, 이는 용액상태에서 항원-항체반응이 진행되고 항원 단백질은 혈액 내에 용해되어있는 상태를 유지하는 구조를 가지고 있다는 것을

뜻한다. 따라서 체외에서 진행되는 항원-항체반응 검사의 경우에도 용액 상에서 진행되는 것이 본래의 결합 상태를 잘 반영하기 때문에 항원-항체 반응 검사조건으로 바람직하다. 하지만 앞에서 언급한 SERPA 분석법의 경우, 단백질 혼합액의 분석을 위해 이차원 전기영동법 즉, 분석대상 단백질을 SDS와 urea를 이용해 변성시켜 펼쳐 놓은 상태에서 항체와의 반응을 검사하는 방법을 이용하고 있다. 따라서 항원결정부위가 단백질 서열 의존적인 경우에는 검출가능하나, 구조 의존적인 경우에는 검출되지 않는 한계가 있다.

[13]

[14] 상기와 같이 기존에 보고된 암 발병 관련 마커로 사용 가능한 자가면역항체 연구는 제시된 활용 가능성에도 불구하고 진단효과가 미미하여 여전히 자가면역항체를 암 진단용 바이오마커로 활용하는데 한계가 있고, 자가면역항체 검출 방법 또한 수많은 경우의 수를 포함하지 못하거나 과도한 실험을 요구하는 방법으로서 수행하는데 한계가 존재하여 간암을 진단하기 위한 자가면역항체 마커를 발굴하지 못하고 있는 실정이다.

[15]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

[16] 본 발명자들은 간암 진단을 위한 자가면역항체를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 간암 모델 마우스에서 효과적인 암관련 자가면역항체의 동정방법을 개발하였고, ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체가 간암 모델 마우스에서 유도됨을 확인하였다. 또한, 이에 특이반응하는 항원결정부위(에피토프) 발현 파아지를 펩타이드 라이브러리로부터 스크리닝하여 자가면역항체 검출을 위한 ELISA법을 고안하였으며 이를 이용하여 인체 간암 개체를 진단할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[17]

과제 해결 수단

[18] 본 발명의 하나의 목적은 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 자가면역항체에 특이적으로 결합하는 항원 단편을 제공하는 것이다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 자가면역항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공하는 것이다.

[22] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 조성물을 포함하는 간암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

- [23] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 조성물을 이용한 간암 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [24] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 자가면역항체를 이용한 간암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[25]

발명의 효과

- [26] 본 발명의 항-ATIC 특이반응 자가면역항체를 간암 진단 마커로 사용하면, 침습적인 진단 방법을 이용하지 않고, 혈액, 혈장, 혈청, 림프액 등과 같은 비침습적 생물학적 시료를 이용하여 약 87%의 민감도와 약 88%의 특이도로 간암의 발병 여부를 진단할 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 마커와 반응하는 서열을 동정함으로써, 마커를 동정하기 위해 복잡한 반응물질을 디자인할 필요 없이 동정된 아미노산 서열만을 이용하여 용이하게 간암을 진단할 수 있어, 간암 진단용 키트 개발에 효과적이다.

[27]

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 간암 마우스 유래 XC154 자가면역항체의 확보 및 이를 이용한 암 진단 방법의 제안을 나타낸다. HBx 간암 모델 마우스 유래 B세포 하이브리도마 클론들로부터 얻은 자가면역항체들의 간암세포에 대한 반응성을 확인하여 XC154 항체를 확보하였다. 간암 세포주인 HepG2, Hep1c1c7 세포를 고정화하고, 세포막을 투과화한 후 간암 모델 마우스 유래 자가면역항체들을 처리하였고, 형광표지가 붙은 이차항체를 반응 후 유성세포측정법(flow cytometric ananlysis)으로 확인하였다. 고리형 구조를 형성하는 파아지 발현 고리형 펩타이드 라이브러리(Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library kit; New England Biolabs 사)를 사용하여 패닝 방법으로 확보한 XC154 항체에 대응하는 에피토프를 모사하는 파아지를 선별하고 선별된 파아지를 이용하여 간암환자와 정상인자의 차이를 확인하는 방법을 제안하였다.
- [29] 도 2a 및 2b는 TAB-XC154 자가면역항체의 CDR 서열로서, 확보한 XC154 항체의 중쇄 변이영역(V_H , 도 2a)와 경쇄 변이영역 (V_L , 도 2b)의 상보성 결정부위(CDR)를 분석한 결과를 나타낸다. XC154 항체 생성 B세포 하이브리도마로부터 추출한 총 RNA(total RNA)에 대해 cDNA를 합성하고, 중쇄 변이영역 상보성 결정부위 프라이머와 경쇄 변이영역 상보성 결정부위 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응(PCR)으로 증폭한 후 pTOP Blunt V2 벡터에 붙여(ligation) 재조합 플라스미드를 제조하였다. 재조합 플라스미드를 숙주세포에서 증폭시키고, 추출하여 해당부위를 염기서열 분석하였다. 분석된 염기서열로부터 단백질 서열을 확인하고, Kabat CDR 정의를 바탕으로 CDR 서열을 결정하였다.
- [30] 도 3은 각종 암세포들에 대한 XC154 항체 반응성 확인을 위한 유성세포분석(a)

및 세포내 염색(b)의 결과를 나타낸다. 각종 암세포들에 대한 XC154 항체의 반응성을 암세포내 염색 후 유성세포측정법으로 분석한 결과, HepG2, SK-Hep1 등의 간암 세포주 뿐만 아니라 여러 다른 암세포에서도 높은 반응성을 보이는 결과를 확인하였다. 또한, XC154 항체가 인지하는 항원단백질의 세포내 발현위치를 형광염색법으로 확인한 결과, 암세포주인 HepG2, Hepa-1c1c7에서는 세포질에서 세포막 쪽으로 집중됨을 볼 수 있는 것에 비해 정상인 간세포에 가까운 Chang 세포주에서는 세포질에 주로 집중됨을 확인하였다.

- [31] 도 4는 XC154 자가면역항체 특이반응 항원 단백질의 확인을 위한 웨스턴 블롯팅의 결과를 나타낸다. 여러 종류의 암세포주들의 세포파쇄액 및 혈청이 첨가되지 않은 세포배양액을 정량하여 50 μ g씩 10% SDS-PAGE 상에 전개한 후 XC154 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅을 실시한 결과, 64KDa 정도의 분자량을 인지함을 확인하였다(M, 분자량마커; 1, Hepa1c1c7; 2, HepG2; 3, HT-29).
- [32] 도 5는 TAB-XC154 항체 특이반응 에피토프 발현 파아지의 스크리닝 결과로서, XC154 항체로 파아지 고리형 펩타이드 라이브러리를 스크리닝하여 XC154 항체 특이반응 항원 발현 파아지를 선별해낸 결과를 나타낸다. 도 5의 a에서는 XC154 항체를 이용한 패닝을 5차에 걸쳐 진행하였고, 서로 다른 펩타이드 서열을 갖는 4종의 파아지들(XC154p1, XC154p2, XC154p4, XC154p9)을 선별해냈다. 도 5의 b에서는 이들의 XC154 항체에 대한 반응성을 ELISA법으로 확인한 결과, XC154p1 파아지가 TAB-XC154 항체 특이 반응성이 가장 높음을 확인하였다.
- [33] 도 6은 XC154p1 에피토프 발현 파아지에 의한 TAB-XC154 항체의 세포반응의 경쟁적 억제를 나타낸다. 선별된 XC154p1 파아지가 TAB-XC154 항체와 결합하는 항원의 에피토프 구조를 모사하여 TAB-XC154 항체-항원 결합을 경쟁적으로 억제함을 확인하였다. 간암 세포주인 HepG2, 전립선암 세포주인 LNCap/LN3 세포를 고정화하고, 세포막을 투과화한 후 XC154p1 파아지와 먼저 반응시킨 XC154 항체를 처리하였고, 형광표지가 붙은 이차항체를 반응 후 유성세포측정법으로 확인하였다. 그 결과 XC154p1 파아지가 세포발현항원의 항체반응을 거의 완전히 억제함을 확인하여 파아지발현 에피토프가 원래 항원의 항원결정부위 구조를 잘 모사하고 있음을 확인하였다.
- [34] 도 7은 XC154p1 에피토프 발현 파아지를 이용한 간암 진단의 결과를 나타낸다. TAB-XC154 항체 특이반응 펩타이드 발현 파아지인 XC154p1을 코팅항원으로 사용한 ELISA법으로 간암환자와 정상인 혈청 분석을 실시하였다. 그 결과, cutoff 값을 0.059로 정할 때 86.96%의 민감도(sensitivity)와 88.24%의 특이도(specificity)로 간암환자를 구별해낼 수 있음을 확인하였다.
- [35] 도 8은 XC154p1 에피토프 발현 파아지를 이용한 유방암 진단의 결과를 나타낸다. XC154 항체 특이반응 펩타이드발현 파아지인 XC154p1을 코팅항원으로 사용한 ELISA법을 유방암 환자 및 정상인 혈청 분석에 활용하였을 때, 간암의 경우와는 달리 유방암 환자 혈청은 정상인의 혈청에 대해 구별되지 않았다.

- [36] 도 9는 XC154 항체 특이반응 항원 단백질의 동정을 나타낸다. 도 9의 a는 XC154 항체 반응 항원 단백질의 정제를 나타낸다. TAB-XC154 항체 반응 항원이 과량발현되는 LnCap-LN3 세포 파쇄액을 제조하여 음이온교환수지인 HitrapQ-sepharose로 분획하여 해당 항원을 부분 정제하였다. 해당 항원이 과량존재하는 분획만을 농축하여 SDS-PAGE 상에 전개하고 XC154 항원 해당부위만을 추출하여 in-gel digestion 후 질량분석법으로 단백질 동정을 실시하였다. 도 9의 b는 XC154 항체 특이반응 항원 단백질의 질량분석 결과를 나타낸다. XC154 항원을 단백질 동정한 결과, ATIC가 가장 스코어값이 높음을 확인하였다. ATIC는 퓨린 생합성에 관여하며 암세포의 증식에 중요한 기능을 하는 단백질로 알려져 있으며 계산된 단백질분자량이 64.5 KDa로써 XC154 항원의 분자량과 유사하다.
- [37] 도 10은 동정된 XC154 항체 특이반응 항원 단백질의 검증을 나타낸다. 도 10의 a는 siRNA를 이용한 ATIC 발현억제를 나타낸다. ATIC에 특이적으로 작용하는 siRNA를 HepG2 세포에 형질주입하고 48 시간 후에 해당유전자의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과, 50% 이상 발현을 억제함을 확인하였다. 도 10의 b는 ATIC 유전자 발현 억제 후 XC154 항체반응을 확인하기 위한 유성세포 분석의 결과를 나타낸다. 위와 동일한 방법으로 siRNA를 처리한 세포에 대한 XC154 항체의 반응성을 확인한 결과, 항체 반응이 20% 정도 감소함을 확인하였다. 도 10의 c는 ATIC유전자 발현 억제 후 XC154 항체 반응을 확인하기 위한 웨스턴 블롯팅의 결과를 나타낸다. 발현 억제된 단백질이 XC154 항체 반응 단백질인지 확인하기 위해 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 그 결과, ATIC의 발현이 억제된 세포의 경우 XC154 항체반응도 없어짐을 확인하여 XC154 항원이 ATIC임을 확인하였다.
- [38] **발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [39] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편을 제공한다.
- [40] 본 발명에서 용어, "ATIC(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase)"는 퓨린의 신생(de novo) 생합성 과정의 마지막 두 단계 반응을 촉매하는 두 기능을 가진 단백질이다. 퓨린과 피리미딘의 생합성 과정은 DNA 및 RNA 합성에 필요한 뉴클레오타이드를 생성하는 반응으로, 정상 세포에서는 거의 활용되지 않으나, 암세포와 같이 빨리 분열하는 세포에서는 활발히 작용한다. 그러나, ATIC와 암 발병과 관계된 연구결과들이 거의 제시되어 있지 않으며, 본 발명에서 처음으로 간암환자 혈액에서 항-ATIC 자가면역항체를 확인하였으며 그에 특이반응하는 신규 에피토프 구조를 이용하여 간암 진단이 가능한 것을 규명하게 되었다.
- [41] 본 발명에서 용어 "자가면역항체(autoantibody)"는 자기의 체성분과 특이적으로

반응하는 항체를 의미하며, 자가항체 또는 오토항체라고도 한다. 일반적으로 개체는 자신이 본래적으로 가지고 있는 본질에 대해서는 면역반응을 일으키지 않으므로, 항체를 생성하지 않는다. 그러나, 특정한 경우 본래 자신이 가진 물질을 항원으로 인식하여 항체를 생성하기도 하는데, 질병으로 나타나는 현상으로 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus) 및 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)과 같은 자가면역질환(autoimmune disease)을 일으킨다. 본 발명의 자가면역항체는 상기와 달리 정상적이지 않은 암세포 성장에 수반되는 암세포 유래의 항원에 대해 생성되는 항체를 의미하며, 구체적으로는 암유래 항원인 ATIC에 대해 생성되는 항체로서, 본 발명에서는 "항-ATIC 자가면역항체" 또는 "ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체"와 혼용된다.

- [42] 본 발명에의 일실시에에서는 간암 모델 마우스 유래의 하이브리도마 클론들로부터 얻은 자가면역항체들의 간암세포에 대한 반응성을 확인하여 "XC154 자가면역항체" 또는 "TAB-XC154 자가면역항체"로 명명하였다. 이후, 상기 항체에 대한 특이반응 항원 단백질을 동정한 결과, 최종적으로 64.5KDa의 분자량을 갖는 ATIC임을 확인하여, 상기 자가면역항체가 항-ATIC 자가면역항체임을 확인할 수 있었다(도 9 및 10).
- [43] 본 발명에서 용어 "항원결합부위(antigen-binding site, paratope)"는 항원과 결합하는 항체의 부위를 의미한다. 상기 항원결합부위는 항체의 Fv 부위의 작은 부위로서 항체의 중쇄와 경쇄의 부분을 포함하며, 항원의 항원결정부위(antigenic determinant, epitope)와 결합한다.
- [44] 본 발명에서 상기 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 바람직하게는 서열번호 17 내지 20으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 인식하는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열을 인식하는 것일 수 있다.
- [45] 본 발명의 일실시에에서는 상기 자가면역항체의 구체적인 항원결정부위 서열을 동정하기 위하여 펩타이드 발현 라이브러리로부터 XC154 항체 특이반응 항원을 스크리닝한 결과, 본 발명의 CLPSWFHRC(Cys-Leu-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; 서열번호 17), CAPSWLHRC(Cys-Ala-Pro-Ser-Trp-Leu-His-Arg-Cys; 서열번호 18), CSPSGLFSC(Cys-Ser-Pro-Ser-Gly-Leu-Phe-Ser-Cys; 서열번호 19) 및 CTPSWFHRC(Cys-Thr-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; 서열번호 20)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열과 특이적으로 반응할 수 있음을 확인하였고, 그 중에서 CLPSWFHRC(Cys-Leu-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; 서열번호 17)의 아미노산 서열과 가장 반응성이 높음을 확인하였다(도 5).
- [46]
- [47] 일반적으로 하나의 항체 분자에는 두 개의 중쇄(heavy chain)와 두 개의 경쇄(light chain)가 있으며, 각각의 중쇄와 경쇄는 그의 N-말단에 가변영역을

포함한다. 각 가변영역은 3개의 상보성 결정부위(Complementarity determining region: CDR)와 4개의 구조형성부위(framework regions: FRs)로 구성되는데, 상보성 결정 부위들은 항체의 항원 결합 특이성을 결정하고, 가변영역의 구조형성 부위들로 유지되는 비교적 짧은 펩타이드 서열로 존재한다. 바람직하게 본 발명의 자가면역항체는 중쇄 가변영역의 일부로서, 서열번호 3의 CDR1 서열, 서열번호 4의 CDR2 서열 또는 서열번호 5의 CDR3 서열로 구성된 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편을 포함할 수 있으며, 상기 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열을 모두 포함하는 자가면역항체 또는 이의 단편일 수 있다. 또한, 본 발명의 자가면역항체는 경쇄 가변영역의 일부로서, 서열번호 6의 CDR1 서열, 서열번호 7의 CDR2 서열 또는 서열번호 8의 CDR3 서열로 구성된 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편을 포함할 수 있으며, 상기 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열을 모두 포함하는 자가면역항체 또는 이의 단편일 수 있다. 나아가 상기 서열을 코딩하는 핵산 서열 또한 발명에 포함됨은 자명하다.

[48] 본 발명의 자가면역항체는 보다 바람직하게는, 중쇄 가변영역 서열로서 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편일 수 있고, 경쇄 가변영역 서열로서 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편을 포함할 수 있다. 또한 상기 중쇄 및 경쇄는 목적에 따라 각각 또는 함께 사용될 수 있으며, 당업자가 목적하는 바에 의해 통상적인 유전공학적 방법에 따라 다수의 CDR 서열 및 경쇄와 중쇄의 자유로운 조합이 가능하다.

[49] 본 발명의 일실시예에서는 상기 자가면역항체의 특성을 연구하기 위하여 상보성 결정부위(Complementarity determining region: CDR) 서열을 분석한 결과, 본 발명의 자가면역항체가 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 4로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 5로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역과 서열번호 6으로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 7로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 8로 기재된 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 확인하였고, 서열번호 1로 기재된 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 2로 기재된 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 자가면역항체임을 확인하였다(도 2).

[50] 본 발명의 자가면역항체는 2개의 전장을 포함하는 중쇄 또는 항체-항원 결합을 달성할 수 있는 항체 분자의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장을 포함하는 경쇄 또는 항체-항원 결합을 달성할 수 있는 항체 분자의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 항체 분자의 면역학적 활성을 가진 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 항체 단편의 예는 (i) 경쇄의 가변영역(V_L) 및 중쇄의 가변영역(V_H)과 경쇄의 불변영역(C_L) 및 중쇄의 첫번째 불변 영역(C_{H1})으로 이루어진 Fab 단편; (ii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로

이루어진 Fd 단편; (iii) 단일클론항체의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편; (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) V_H 도메인 및 V_L 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv 분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody) 등을 포함하며 이에 제한되는 것은 아니다.

- [51] 본 발명의 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 바람직하게는 기탁번호 KCTC 11873BP의 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편일 수 있다.
- [52]
- [53] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체에 특이적으로 결합하는 항원 단편을 제공한다.
- [54] 본 발명에서 "ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체에 특이적으로 결합하는 항원"은 상기 자가면역항체 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 모두 포함하며, 특정 단백질 또는 폴리펩타이드에 제한되지 않는다. 바람직하게 상기 항원은 항-ATIC 자가면역항체에 의해 인식될 수 있으면 그의 단편 또는 그의 변형체 등을 모두 포함할 수 있다. 상기 항원은 최소 9개의 아미노산으로 이루어질 수 있고, 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다.
- [55] 상기 항원은 본 발명의 자가면역항체 마커에 의해 인식될 수 있는 항원결정부위 서열일 수 있다. 상기 서열은 본 발명의 자가면역항체에 의해 인식 가능한 서열이면, 서열의 크기나 종류에 제한되지 않으며, 바람직하게 상기 서열은 7개의 아미노산의 끝에 시스테인이 존재하는 폴리펩타이드 서열일 수 있다. 이러한 7개의 아미노산의 끝에 시스테인이 존재하는 서열은 CLPSWFHRC(Cys-Leu-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; 서열번호 17), CAPSWLHRC(Cys-Ala-Pro-Ser-Trp-Leu-His-Arg-Cys; 서열번호 18), CSPSGLFSC(Cys-Ser-Pro-Ser-Gly-Leu-Phe-Ser-Cys; 서열번호 19) 및 CTPSWFHRC(Cys-Thr-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; 서열번호 20)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열일 수 있으며, 상기 시스테인의 존재로 고리형 구조를 형성하여 자가면역항체에 의한 인식이 더 효과적일 수 있다. 그러나, 상기 예에 의해 본 발명의 자가면역항체에 의해 인식 가능한 서열의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [56]
- [57] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공한다.
- [58] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것으로서, 본 발명의 목적상 간암의 발병 여부를 확인하는 것뿐만 아니라 간암의 치료 후

해당 개체의 재발, 전이, 약물 반응성, 내성 등과 같은 여부를 판단하는 것을 포함할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체를 이용하는 경우, 간암 의심 개체의 시료로부터 ATIC 발현 수준을 확인함으로써 해당 개체의 간암 발병 여부뿐 아니라, 향후 해당 개체의 예후가 좋을 것인지 여부에 대해서까지 예측이 가능하다.

[59] 본 발명에서 용어, "시료"는 간암 진단의 지표인 항-ATIC 자가면역항체의 발현 수준이 차이 나는 전혈, 혈청, 혈액, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 뇌척수액 및 세포간액으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 시료일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[60] 본 발명에서 용어, "진단 표지자, 진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)"는 암세포를 정상 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포 또는 예후가 좋은 암 세포에 비하여 예후가 좋지 않은 암을 가진 세포에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 간암 진단 마커는 정상 간을 가진 개체의 전혈, 혈액, 혈청 또는 혈장 등에 비하여, 간암을 나타내는 개체의 전혈, 혈액, 혈청 또는 혈장 등에서 특이적으로 높은 수준의 발현을 보이는 항-ATIC 자가면역항체이다.

[61] 본 발명에서 용어 "간암 (liver cancer)"이란 일반적으로 간세포에서 기원하는 암을 의미한다. 간암에는 처음부터 간에서 생기는 원발성 간암과 다른 조직에서 발생한 암이 간에 전이되어 발병하는 전이성 간암이 있다. 원인은 대부분 불분명하나, 간경변이 있는 경우가 많으며, 간경변이 있는 환자와 만성 활동성 B형 간염, 또는 B형 간염 보균자에서 간암이 잘 발생하는 것으로 밝혀지고 있다. 본 발명자들은 본 발명의 자가항체 마커를 사용하는 경우, 개체로부터 간암의 발병 여부에 대해 높은 수준의 민감도 및 특이도를 가지고 진단할 수 있음을 확인하였다.

[62] 본 발명에서 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 제제는 간암 발병 또는 의심 개체의 전혈, 혈청, 혈장, 림프액 및 세포간액 등에서 발현이 증가하는 마커인 항-ATIC 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 바람직하게는 상기 자가면역항체에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 자가면역항체에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 CLPSWFHRC(Cys-Leu-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; 서열번호 17), CAPSWLHRC(Cys-Ala-Pro-Ser-Trp-Leu-His-Arg-Cys; 서열번호 18), CSPSGLFSC(Cys-Ser-Pro-Ser-Gly-Leu-Phe-Ser-Cys; 서열번호 19) 및 CTPSWFHRC(Cys-Thr-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; 서열번호 20)으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열인 것일 수 있다. 이를 위한 분석 방법의 예로는

웨스턴 블롯(Western blot), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 및 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기와 같은 분석 방법들을 통하여 정상 대조군에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 간암 발병 또는 의심 개체에서의 항원-항체 복합체 형성량을 비교할 수 있으며, 이를 통해 실제 간암 의심 개체에서의 간암 발병 여부에 대해 진단할 수 있게 된다.

[63]

[64] 간암을 진단하는 방법은 본 발명의 항-ATIC 자가면역항체 및 이와 특이적으로 결합하는 항원 간에 항체-항원 반응을 통하여 달성될 수 있는데, 본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란 간암 마커인 자가면역항체와 이에 특이적인 항원의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.

[65]

이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소의 예로는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 펄록시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 형광물의 예로는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, α -프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 리간드의 예로는 바이오틴 유도체 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 발광물의 예로는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 미소입자의 예로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자의 예로는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[Mo(CN)_8]^{4-}$ 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소의 예로는 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 포함되나, 이로 제한되지 않는다.

[66]

본 발명자들은 본 발명의 자가면역 항체에 결합하는 에피토프 서열을 동정하기 위하여, 7개의 아미노산의 서열 끝에 시스테인이 존재하여 고리형 구조를 형성하는 파아지 디스플레이 사이클릭 펩타이드 라이브러리 시스템을 사용하였으며, 바람직하게는 항-ATIC 자가면역항체와 특이적으로 결합하는 파아지를 선별하는 한편, 선별된 파아지 중 본 발명의 항체인 항-ATIC

자가면역항체와의 반응성이 좋은 그룹만을 정제하여 코팅항원으로 처리 후, 상기 항원에 결합하는 면역항체와의 반응성을 확인함으로써, 이들 아미노산 서열을 확인하였다(표 1).

[67]

[68] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 조성물의 간암 진단 용도를 제공한다.

[69] 상기 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편 및 이의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 조성물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같으며, 본 발명에서는 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편 자체, 또는 이의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 조성물을 이용하여 간암 진단을 위한 용도로 사용할 수 있다.

[70]

[71] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 자가면역항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.

[72] 본 발명에서 용어, "하이브리도마"는 2개의 다른 종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 세포로, 폴리에틸렌글리콜 등 세포융합을 일으키게 하는 물질이나 어떤 종의 바이러스를 사용하여 둘 이상의 동종 세포나 이종 세포가 융합된 세포를 말한다. 하이브리도마는 각기 다른 세포가 갖는 다른 기능을 하나의 세포 속에 통합시킨 것으로, 하이브리도마의 대표적인 것은 대표적인 것은 림프구이다. 특히 골수종 세포(myeloma cell)와 비장이나 림프절에 들어 있는 림프구 가운데 항체 생성세포의 선구세포인 B세포를 융합시킨 잡종세포는 단일 클론항체를 만들어내므로 연구와 임상에 널리 응용된다. 그 밖에 림포카인(생리활성물질)을 만들어내는 T세포와 그 종양세포인 하이브리도마 등도 실용화되고 있다. 본 발명의 자가면역항체를 생산하는 하이브리도마는 당업계에 공지된 세포를 당업자에 의해 적절하게 변형하여 사용할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 HBx 형질전환마우스들 중 간암 발생이 확인된 개체들의 지라 세포를 B 세포군으로 확보하여 마우스 골수종 세포인 Sp2/0 과 세포 융합하여 B 세포 하이브리도마 세포군을 제조하고, TAB-XC154 클론 분비 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 선택하여 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2011년 2월 21일자로 기탁하였고, 수탁번호 KCTC 11873BP를 부여받았다. 바람직하게 상기 하이브리도마 세포주는 기탁번호 KCTC 11873BP인 세포주일 수 있다.

[73]

[74] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 간암 진단용 키트를 제공한다.

[75] 본 발명의 간암 진단용 키트는 간암을 진단하는 표지자인 항-ATIC 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을

측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.

[76] 또한, 본 발명에서 상기 진단 표지자인 ATIC를 암호화하는 유전자들의 코딩에 의해 발현된 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.

[77] 상기 키트에서 단백질 수준을 측정하기 위한 분석방법으로는, 웨스턴 블롯(Western blot), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 및 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니며, 바람직하게 본 발명의 키트는 ELISA 방법을 이용한 키트일 수 있다.

[78] 단백질 발현수준 측정을 위한 ELISA 방법으로는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 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 방법을 포함한다. 예를 들어, 고체 지지체에 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. 진단 표지자인 항-ATIC 자가면역항체의 발현 정도를 확인하여, 간암 발병 여부를 확인할 수 있다. 바람직하게는, 서열번호 17 내지 20으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 항-ATIC 자가면역항체를 포획하는 포획자로 사용할 경우, 더욱 바람직하게는 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열을 사용할 경우, 높은 민감도와 특이도로 간암을 진단할 수 있다.

[79] 본 발명의 일실시예에서는 펩타이드 파아지 라이브러리를 이용하여 본 발명의 자가면역항체와 반응하는 에피토프 서열을 동정하였으며, 상기 동정된 서열을

이용하여 시료 내의 자가면역항체인 1차 항체와 반응시키고, 이를 다시 이차항체로서 항-인간 IgGAM-HRP와 반응시킴으로써 항원-항체 복합체의 형성 여부 및 형성량을 확인한 결과, 정상 개체와 간암 개체의 혈청에서 확실하게 구별되는 패턴을 관찰할 수 있었다(도 7). 이와 같은 방법으로 항-ATIC 자가면역항체를 검출 및 이를 이용하여 간암을 진단하는 경우, 높은 특이성과 민감성을 가지고 간암을 진단할 수 있으며, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하여 검출한 결과, 약 87%의 민감도와 약 88%의 특이도로 정상 개체와 간암 개체를 구분 및 진단할 수 있음을 확인하였다(도 7). 또한, 동일한 방법으로 유방암 환자 혈청에 대해서도 실시한 결과, 유방암 환자 혈청에 대해서는 정상과 구별되지 않는 결과를 보임에 따라 본 발명의 방법이 간암을 진단하는데 특이적임을 확인하였다(도 8).

[80] 본 발명에서 용어, "민감도"는 질병이 있는 개체를 양성으로 검출하는 비율을 의미하며, 진단법을 사용하였을 때 실제로 이에 해당하는 개체를 얼마나 잘 찾아내는지의 기준이 된다. 또한, 용어 "특이도"는 정상 개체를 음성으로 검출하는 비율을 의미하며, 질병에 해당하지 않는 개체를 얼마나 잘 분류하는가 하는 기준이 된다.

[81] 또한, 상기 진단표지자에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 이용할 수 있다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 간암의 발병 여부를 확인할 수 있다. 또한, 상기 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 조직 면역 염색을 실시할 수 있다. 간암 발병 또는 의심 개체에서 조직을 채취 및 고정된 후, 당업계에서 널리 공지된 방법으로 파라핀 포맷 블록을 제조한다. 이들을 수 μm 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후, 이와 본 발명의 자가면역항체의 항원결합부위를 포함하는 단편을 공지의 방법에 의하여 반응시킨다. 이후, 반응하지 못한 항체는 세척하고, 상기에 언급한 검출라벨 중의 하나로 표지하여 현미경 상에서 항체의 표지 여부를 판독한다. 또한, 상기 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용할 수 있다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여, 간암의 발병 여부를 확인할 수 있다.

[82]

[83] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 이용하여 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편을 검출하는 단계를 포함하는, 간암 진단 방법을 제공한다.

[84] 본 발명의 간암 진단 방법은 바람직하게는, (a) 간암이 의심되는 개체의

시료로부터 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

- [85] 본 발명에서 용어, "개체"는 이에 제한되지는 않으나, 인간을 포함한 포유류로서, 말, 개, 고양이, 돼지, 염소, 토끼, 햄스터, 원숭이, 기니피그(guinea pigs), 랫트, 마우스, 도마뱀, 뱀, 양, 소, 물고기 및 새를 포함하며, 바람직하게는 인간을 포함한다.
- [86] 본 발명에서 용어, "대조군"은 항-ATIC 자가면역항체의 발현이 간암 발병 또는 의심개체에 비해 낮은 수준으로 발현되는 개체에서 유래한 시료로, 본 발명의 항-ATIC 자가면역항체를 이용한 항원-항체 반응으로 간암을 진단하는데 기준이 되는 시료를 말한다.
- [87] 본 발명에서 용어, "시료"는 간암 진단의 지표인 항-ATIC 자가면역항체의 발현 수준이 차이나는 전혈, 혈청, 혈액, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 뇌척수액 및 세포간액으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 시료일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [88] 본 발명에서 상기 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 방법으로는, 웨스턴 블롯(Western blot), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 및 단백질 칩 방법 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 단백질의 발현 수준 측정 방법의 자세한 내용은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [89]
- [90] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 자가면역항체를 이용한 간암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다. 구체적으로, (a) ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 간암 치료용 후보물질을 투여하는 단계; 및 (c) ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준이 상기 (a) 단계에 비해 감소되는 것을 확인하는 단계를 포함하는 간암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [91] 본 발명에서 상기 (a) 단계는 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 단계로서 상기에서 설명한 바와 같이 통상의 발현 수준을 측정하는 방법을 제한없이 사용할 수 있다.
- [92] 본 발명에서 상기 (b) 및 (c) 단계는 간암 치료용 후보물질을 투여하는 단계 및 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준이 상기 (a) 단계에 비해 감소되는 것을 확인하는

단계이다.

- [93] 본 발명에서 용어, "간암 치료용 후보물질"은 간암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질로, 직접 또는 간접적으로 간암을 호전 또는 개선시킬 수 있을 것으로 예상되는 물질이면 제한 없이 사용 가능하며, 화합물, 유전자 또는 단백질 등의 모든 치료가능 예상물질을 포함한다. 본 발명의 스크리닝 방법은 상기 후보물질의 투여 전후의 항-ATIC 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 확인하는 한편, 상기 발현 수준이 후보물질 투여 전에 비해 감소된 경우, 해당 후보물질을 간암 치료제로서 결정할 수 있다.

[94]

발명의 실시를 위한 형태

- [95] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[96]

[97] 실시예 1: HBx 마우스 유래의 XC154 자가면역항체 확보

- [98] 암 발생에 동반하여 생성되는 자가면역항체를 확보하기 위해 인체 간암과 유사한 형태의 간암이 발생하는 것으로 이미 보고된 HBx 형질전환 마우스를 활용하였다. 사육 중인 HBx 형질전환 마우스들 중 간암 발생이 확인된 개체들의 지라(spleen) 세포를 B세포군으로 확보하여 마우스 골수종 세포인 Sp2/0 과 세포 융합하여 B세포 하이브리도마 세포군을 제조하였다. 세포융합은 일반적인 B세포 하이브리도마 제조법을 따랐다. 융합세포들은 HAT 배지(hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium)를 이용해 1차 선별하였고, 클론을 형성한 세포들만을 따로 배양하였다. 이들 중 세포배양액 중에서 암세포 반응 항체가 검출된 세포들만을 또 다시 선택하여 유지하였다.

- [99] 암세포에 대한 자가면역항체의 반응성의 확인은 고정화 및 투과화(fixation & permeabilization)시킨 암세포주에 대한 세포 내 염색(intracellular staining) 후 유성세포측정법(flow cytometric ananlysis) 분석으로 수행하였다. 상세한 설명은 다음과 같다. 70~80% confluency 상태의 HepG2 또는 Hepa1c1c7 세포를 트립신 처리로 세포 배양 플레이트로부터 떼어내고 PBS로 세척한 후 2×10^5 세포당 $100 \mu\text{l}$ 의 Cytofix/Cytoperm 용액(BD사)를 4°C 에서 20분간 처리하여 고정화 및 투과화시켰다. 반응 후에는 Cytowash/Cytoperm 용액(BD사)을 1ml씩 첨가하여 잘 섞어준 후 1700rpm에서 5분간 원심분리하여 세포침전을 얻는 과정으로 세포 세척을 실시하였다. 세척이 끝난 시료에는 $50 \mu\text{l}$ 의 1차 항체용액(B cell hybridoma 세포배양액 또는 정제한 1차 항체 용액)을 첨가하여 4°C 에서 40분간 반응시켰다. 반응 후 다시 세포세척을 세 차례 실시하고 항-마우스 Igs-FITC(anti-mouse Igs-FITC(DaKo사))를 4°C 에서 40분간 처리하였다. 반응 후 다시 세포세척을 3회 실시하고, $300 \mu\text{l}$ 의 PBS에 세포침전을 풀어

FACScalibur(BD사)로 분석을 실시하였다. 항체반응에 해당하는 형광수치의 평균값(mean fluorescence)을 얻어 각각의 반응을 비교하였다. 항체반응이 없는 대조군에는 1차 항체 없는 DMEM 배지를 50 μ l씩 첨가하였다.

- [100] 그 결과, B세포 하이브리도마세포들 중 자가면역항체생성 클론들을 여러 가지 확인할 수 있었는데, 본 발명에서는 그들 중의 하나인 TAB-XC154 클론 분비 항체에 대한 분석을 실시하였다(도 1). 이와 같이, TAB-XC154 클론 분비 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 2011년 2월 21일자로 한국생명공학연구원(KRIBB) 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC 11873BP를 부여받았다.

[101]

- [102] 실시예 2: XC154 항체의 상보성 결정부위(Complementary Determining Region, CDR)의 분석 및 항체의 정제

- [103] XC154 항체가 암세포에서 발현되는 항원을 특이하게 인지함을 확인한 후, XC154 항체의 항원인지 특이성에 대한 정보를 확보하기 위해 해당 항체의 상보성 결정부위(Complementary Determination Region, CDR) 서열을 분석하였다. 상세한 방법은 다음과 같다.

- [104] XC154 항체 생성 세포를 10⁶개 정도 수집하여 RNA 추출키트(Qiagen 사)를 이용하여 총 RNA(total RNA)를 추출하였다. 상보성 DNA 합성(complementary DNA (cDNA) synthesis) 키트(Invitrogen 사)를 이용하여 총 RNA 5 μ g으로부터 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA 1 μ g과 마우스 중쇄영역 프라이머(Mouse heavy chain constant region primer) F 5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3'(서열번호 21), R 5'-GGA AGA TCT GAC ATT TGG GAA GGA CTG ACT CTC-3'(서열번호 22)과 마우스 경쇄영역 프라이머(Mouse light chain constant region primer) F 5'-GGG AGC TCG AYAT TGT GMT SAC MCA RWC TMC A-3'(서열번호 23), R 5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3'(서열번호 24)을 이용한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 마우스 중쇄와 경쇄의 CDR 포함부위를 증폭한 후 TOPcloner Blunt kit(Enzymomics 사)를 사용하여 pTOP Blunt V2 벡터에 접합(ligation)하였다. 재조합 플라스미드는 E. coli DH5 α 에 형질전환(transformation)하였고 앰피실린(ampicilin)을 포함한 LB 제한배지 플레이트에 도말하여 37°C에서 15시간 배양하였다. 플레이트에 형성된 콜로니들 중 하나씩 LB 액체제한배지에서 12시간 이상 배양하고 플라스미드를 추출하여, 해당 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열로부터 단백질 서열을 결정하였고, 이를 Kabat CDR 정의를 기준으로 분석하여 XC154 항체의 CDR을 결정하였다(도 2).

[105]

- [106] XC154 항체 특이반응에 대한 분석을 위해서는 단일성분으로 정제된 자가면역항체가 필요하다. 따라서 본 발명에서는 XC154 항체 생성클론을 대량

배양한 세포배양액이나 항체 생성세포를 마우스 복강에 주사하여 복수액(ascites fluid)을 확보하여 항체 정제를 위해 사용하였다. XC154 항체를 아이소타이핑(isotyping) 한 결과, IgM임을 확인하였고, 따라서 IgM 정제를 위한 친화성 크로마토그래피를 위해 MBP-아가로스(Mannose-binding protein immobilized agarose, Pierce사) 또는 단백질 L 아가로스(Protein L agarose)를 사용하였다. 정제된 항체는 SDS-PAGE 후 쿠마시 염색(comassie staining)하여 확인하였고 브래드포드(Bradford) 방법으로 정량하여 사용하였다.

[107]

[108] 실시예 3: XC154 항체 특이반응 항원의 각종 암세포에서의 발현 확인

[109] XC154 자가면역항체의 여러 암세포주들에 대한 반응성을 확인하기 위해 상기 실시예 1과 같이 각종 암세포들을 세포 내 염색한 후 유세포분석법(flow cytometric analysis)으로 분석하였다(도 3). 그 결과, XC154 항체반응 단백질의 발현이 HepG2, SK-Hep-1 등의 간암 세포주와 HeLa, LNCap-LN3, A549 등 여러 다른 종의 암세포주에서 과발현됨을 확인하였다.

[110] 또한 세포 내의 발현위치를 확인하기 위해서 세포 내 염색 후 공초점 형광현미경으로 관찰하였으며, 세포질 위치 또는 세포막 위치에서 염색이 강하게 확인되었다(도 3).

[111]

[112] 실시예 4: XC154 자가면역항체 특이반응 항원 단백질의 확인

[113] XC154 항체 특이반응 항원 단백질의 발현을 웨스턴 블롯팅 방법으로 암세포주에서 확인하였다. 분석대상인 세포들을 수집하여 NP40 버퍼(NP40 buffer: PBS containing 1.0 % (v/v) NP40, protease inhibitor cocktail(Roche사))에 녹여 단백질 분석 시료로 사용하였다. 단백질 정량은 브래드포드(Bradford) 방법으로 실시하였다. 준비된 단백질 시료는 50 μ g씩 10% 환원된 SDS-PAGE 조건에서 전개하였고, PVDF 막(membrane)에 이동시켰다. 이동(transfer)이 끝난 막은 5%(w/v) 스킴 밀크(skim milk)/TBS(Tris-buffered saline)에 담가 블로킹(blocking)하고 1차 항체를 처리하였다. 1차 항체로는 정제한 XC154 항체를 0.1 μ g/ml의 농도로 블로킹 용액에 희석하여 사용하였다. 1차 항체 처리 후 TBST(0.1%(v/v) tween-20 포함하는 TBS)로 충분히 세척해주고 이차 항체(항-마우스 IgGAM-HRP)를 처리한 후 증대된 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 방법으로 항체반응 단백질 밴드를 확인하였다. 그 결과, HepG2 간암 세포주 및 HT29 대장암세포에서 XC154 항체 특이반응 항원 단백질이 64KDa 정도의 분자량을 갖는 밴드로 확인되었다(도 4).

[114] 이상의 결과들로 간암 마우스 유래 자가면역항체가 인체간암세포에 발현되는 특정단백질을 인지함을 확인하였으며, 이러한 근거 하에 XC154 항체의 항원결정부위 모사체를 무작위 펩타이드 발현 라이브러리로부터 스크리닝하여 항체 검출법을 도출하고자 하였다.

[115]

- [116] 실시예 5: XC154 항체 특이반응 펩타이드 항원 발현 파아지(phage)의 탐색
- [117] XC154 항체 특이반응 항원결정부위는 인체 혈청 중에 동일한 항원결정부위에 대한 자가면역항체가 존재하는지 확인하는 검출법의 구성에 가장 중요한 요소이다. XC154 항체 특이반응부위로 전체 항원 단백질을 사용하지 않고 간편히 항원결정부위만을 활용하기 위해 무작위 펩타이드 발현 라이브러리로부터 XC154 항체 특이반응 펩타이드 항원을 스크리닝하였다. 펩타이드 발현 라이브러리는 7개의 아미노산이 무작위서열로 발현되고 양 끝에 시스테인 잔기가 있어 7개의 아미노산이 고리형 구조를 형성하는 파아지 발현 고리형 펩타이드 라이브러리(Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library kit; New England Biolabs 사)를 사용하였고, 패닝 과정은 제조사가 제시한 방법을 따랐다.
- [118] XC154 항체 300 ng을 2×10^{11} 개의 서로 다른 펩타이드를 발현하는 파아지 비리온(virion)들과 200 μ l TBST 용액 중에 혼합하여 상온에서 20분간 반응시키고 미리 블로킹 용액(0.1 M NaHCO₃, pH 8.6, 5 mg/ml BSA, 0.02%(w/v) NaN₃)을 처리한 단백질 L-아가로스 비드(protein L-agarose bead) 25 μ l와 섞어 상온에서 15분간 반응시켰다. 항체 반응 파아지들은 항체-파아지-단백질 L-아가로스(antibody-virion-protein L agarose) 결합체 형태로 원심분리에 의해 침전물 형태로 회수하고, TBST로 여러 차례 세척해 준 후 pH 2.2의 용출액(0.2 M Glycine-HCl, pH 2.2, 1 mg/ml BSA)을 1 ml 처리하여 용출하였다. 그리고 재빨리 pH 9.1의 1 M Tris-HCl 용액을 첨가하여 중성 pH로 전환시켰다. 용출해낸 파아지들 중의 일부는 파아지 수를 적정(titration) 하는데 사용하고 나머지는 파아지를 증폭시키는데 사용하였다. 증폭된 파아지에 대해서는 다시 상기한 방식대로 패닝을 실시하였다.
- [119] 그 결과, XC154 항체에 대한 5번의 패닝 과정 후 4개의 서로 다른 펩타이드 서열을 갖는 파아지를 확보하였다. XC154 항체를 이용한 패닝 과정에서는 4차까지 횟수 증가에 따라 증폭된 파아지의 수가 증가하여 특이 결합을 하는 파아지들이 증폭되고 있는 것을 짐작할 수 있었다(도 5의 a). 확보된 파아지들 중 10개를 무작위로 선정하여 펩타이드 부위의 서열을 DNA 염기서열 분석으로 결정하고 이로부터 얻은 아미노산 서열을 결정하였다(표 1). 확보된 항원 모사체의 서열을 비교해 본 결과 PSWFHR의 서열이 6가지의 항원 모사체 서열에서 반복적으로 확인되어 항원 모사체의 서열로 중요함을 짐작할 수 있었다.
- [120]
- [121] 표 1

[Table 1]

파아지	에피토프 서열	서열목록
XC154p1	C L P S W F H R C	서열번호 17
XC154p2	C A P S W L H R C	서열번호 18
XC154p4	C S P S G L F S C	서열번호 19
XC154p9	C T P S W F H R C	서열번호 20

[122]

[123]

XC154 항체에 대한 특이결합으로 선택된 파아지들의 XC154 항체에 대한 반응성을 확인하기 위해서는 파아지를 코팅항원으로 사용하고 XC154 항체를 일차 항체로 ELISA법을 실시하였다. 상세한 내용은 다음과 같다. 펩타이드 서열 결정 결과로 서로 다른 서열의 파아지(XC154p1, XC154p2, XC154p4, XC154p9)가 선별되었음을 확인하였고, 이들을 증폭하고 PEG/NaCl 용액 처리로 부분 정제하여 ELISA 코팅항원으로 사용하였다. 100 μ l의 코팅 용액(0.1 M 중탄산나트륨 버퍼, pH 8.6)에 정제된 파아지를 10^{10} 개씩 희석하여 96-웰 Maxisorp ELISA 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 항원 코팅을 위해서 파아지가 첨가된 플레이트는 4°C에서 16시간 이상 보관하였다. 파아지 코팅 후 스킴밀크 용액(5%(w/v) skim milk/TBST)을 300 μ l씩 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켜 항원 코팅 후 남은 부위를 블로킹하였다. 블로킹이 끝난 후에는 TBST(TBS containing 0.1% Tween-20)로 2번 세척해내고 XC154 항체를 100 ng/100 μ l씩 첨가하고 90분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후에는 다시 TBST로 6회 세척해주고 이차 항체인 항-마우스 IgGAM-HRP(Pierce 사)를 1:2500의 비율로 희석하여 처리하였다. 이차 항체 역시 상온에서 90분 동안 반응시킨 후 TBST로 6회 세척한 후 HRP의 기질로 TMB용액(Pierce 사)을 사용하여 발색반응 하였으며, 450nm에서 흡광도를 측정하여 항원-항체반응을 정량화하였다. 그 결과, 항원으로 사용된 4개의 파아지 중 XC154p1이 가장 높은 반응성을 나타냄을 확인하였다(도 5의 b).

[124]

[125]

실시예 6: XC154p1 에피토프 발현 파아지를 이용한 XC154 항체의 간암세포반응에 대한 경쟁적 억제

[126]

항체 특이적으로 선별된 파아지들이 암세포 발현 항원단백질의 항원결정부위(에피토프)를 충분히 모사하고 있는지 확인하기 위해서 XC154 항체의 세포발현 항원 단백질과의 반응을 유성세포분석법으로 측정할 때 XC154 항체 특이반응 파아지를 첨가하여 반응이 경쟁적으로 억제되는지 확인하였다.

유성세포측정법의 자세한 방법은 실시예 1에 기술한 바와 같다. 일차 항체로는 XC154 항체만 단독으로 처리한 경우와 XC154 항체를 XC154p1 파아지와 미리 섞어 1시간 동안 반응시킨 후 처리한 두 가지 경우를 비교하였다. 이때 항체는 100 ng씩 사용하였고 파아지는 10^{11} 또는 10^{12} 개 사용하였다. 대조군으로는 항원

웹타이드를 발현하지 않는 M13 phage(Eph)를 사용하였으며 HepG2 및 LnCap-LN3 세포에서 반응을 확인하였다.

- [127] 도 6에 제시된 결과를 보면, XC154p1 파아지는 XC154 항체의 HepG2 또는 LnCap-LN3 세포에 대한 반응을 위에 제시한 조건에서 90% 이상 억제하는 것을 알 수 있다. 이 결과로 XC154p1 파아지가 XC154 항체 특이 반응 항원 단백질의 에피토프 부위를 충분히 모사하고 있음을 입증하였다.

[128]

[129] 실시예 7: XC154p1 에피토프 발현 파아지를 이용한 간암 진단

- [130] 일반적으로 단백질 항원들이 체내 면역시스템을 자극하여 항체반응을 유도하는 부위(에피토프)는 전체 단백질구조 중 아미노산 20개 이내의 크기에 해당하는 특정 부위로 한정되어 있다. 또한 이러한 에피토프 부위의 특성은 인간, 마우스, 염소 등으로 개체가 달라도 유사하게 작용함이 잘 알려져 있다. 이러한 사실에 근거한다면 간암 모델 마우스로부터 얻게 된 자가면역항체 반응 에피토프는 인체에서도 동일한 작용을 할 것으로 예상된다. 이에 XC154 항체 반응특이성이 확인된 XC154p1 파아지를 인체 자가면역항체의 검출에 적용시켜 인체혈청 내의 자가면역항체를 검출할 수 있음을 확인하였다. 상세한 내용은 다음과 같다.

- [131] ELISA 플레이트의 각 웰 당 항 M13 파아지 항체 100 ng을 100 μ l의 0.1 M 중탄산나트륨 버퍼, pH 8.6 용액에 희석 후 첨가하여 4°C에서 16시간 코팅하였다. 코팅 후, 잉여 항체를 제거하고 무단백질 블로킹 버퍼(protein-free blocking buffer, Pierce 사)를 각 웰당 300 μ l씩 첨가하여 블로킹을 실시하였다. 블로킹 후 TBST로 2회 세척하고 웰당 10^{10} 개의 XC154p1 파아지를 100 μ l의 무단백질 블로킹 버퍼에 희석하여 처리하였다. 처리 후 TBST로 6회 세척하고 간암 환자 및 정상인 혈청을 1차 항체로 처리하였다. 1차 항체 반응은 상온에서 2시간 동안 진행하였고, 반응 후 잉여의 항체들은 TBST로 6회 씻어냈다. 이차항체로는 항-인간 IgGAM-HRP(anti-human IgGAM-HRP, Pierce 사)를 무단백질 블로킹 용액에 1:5000의 비율로 희석하여 100 μ l 처리하고 상온에서 90분 반응시켰다. 반응 후에는 다시 TBST로 6회 씻어내었고, TMB 용액을 100 μ l씩 첨가하여 HRP 반응을 진행시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. XC154p1을 사용한 인간혈청에 대한 ELISA는 3회 이상 반복하여 재현성을 확인하였으며 그 중 가장 대표적인 결과를 도 7에 제시하였다.

- [132] 도 7에서 볼 수 있듯이 XC154p1 파아지를 이용하여 정상인과 간암환자 혈청을 86.96%의 민감도와 88.24%의 특이도로 구별해낼 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 본 발명에서 제안하는 XC154 항체 항원결정부위 모사체인 XC154p1 파아지를 이용한 인간혈청 ELISA법이 간암 진단 기법으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

[133]

[134] 실시예 8: XC154p1 에피토프 발현 파아지를 이용한 유방암 진단

- [135] XC154p1 파아지를 이용한 유방암 환자의 진단이 가능한지 확인하기 위해 상기와 동일한 방법으로 준비한 ELISA법을 유방암 환자 혈청에 대해서도 실시하였다.
- [136] XC154 항체는 간암 모델 마우스로부터 얻은 자가면역항체이나 다른 종류의 암세포주와의 반응성 역시 높아 유방암 진단효과도 기대할 수 있었으나, 도 8에서 보는 바와 같이 유방암환자 혈청의 경우에는 간암환자의 경우와는 달리 정상과 구별되는 결과를 보이지 않았다.
- [137] 이상의 결과들을 종합할 때, XC154 자가면역항체에 대한 항원반응부위를 모사하는 XC154p1 파아지 항원으로 간암진단에 특이성을 갖는 ELISA 진단법을 구성할 수 있었다.
- [138]
- [139] 실시예 9: XC154 항체가 인지하는 단백질의 확인
- [140] 이상의 결과에서 XC154 자가면역항체가 간암에서 의미있는 바이오마커임을 확인할 수 있었다. XC154 자가면역항체의 간암에서의 의미를 좀 더 도출해내기 위해서는 항원 단백질을 확인하고 그의 암발생 과정에서의 역할에 대한 규명이 필요하였다. 이에 본 발명자들은 XC154 항체 특이반응 항원 단백질의 동정과정을 실시하였다. 상세한 내용은 다음과 같다.
- [141] XC154 항체 특이반응 항원 단백질을 확인해내기 위해서 해당 항원 단백질의 발현이 높은 LN-Cap-LN3 세포 파쇄액(RIPA 완충액 사용)을 HiTrap-Q(GE healthcare사) 컬럼으로 분획하였다. 각각의 분획에 대한 웨스턴 블롯팅 결과로부터 XC154 항체 특이반응 항원 단백질을 포함한 분획을 선별하였고, 그 분획을 아세트온 침전하여 농축하였다. 농축된 항원 단백질 용액을 8~10% SDS-PAGE 겔에서 분리하여 일부는 웨스턴 블롯팅으로 XC154 항원의 존재를 확인하는데 사용하고, 나머지는 쿠마시 염색에 의해 단백질 밴드를 확인한 후 XC154 항체 반응 위치에 해당하는 단백질 밴드를 잘라내 트립신 단백질 분해효소를 이용한 in-gel digestion 반응을 실시하였다(도 9의 a). 그리고 in-gel digestion 후 추출한 펩타이드 분획에 대한 질량분석법으로 단백질 서열에 대한 정보를 확보하고, 그 결과로부터 XC154 항체 반응 항원이 ATIC(5-aminoimidazole-4-carboxamideribonucleotideformyl-transferase/IMPcyclohydrolase)임을 확인하였다(도 9의 b).
- [142] 질량분석법으로 확인한 단백질동정 결과를 검증하기 위해서 siRNA를 이용해 ATIC의 발현을 억제한 세포들에 대해 XC154 항체 반응이 감소하는지 확인하였다. 상세한 내용은 다음과 같다. ATIC의 발현을 억제하는 siRNA는 Bioneer사에서 제공하는 siRNA를 사용하였고, 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000, Invitrogen 사)을 이용하여 HepG2 세포에 투입하였다. siRNA처리 48시간 후에 세포들을 수거하여 총 RNA를 추출하였고 5 μ g의 RNA를 주형으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 다시 ATIC 유전자에 특이성을 갖는 프라이머들로 중합효소연쇄반응을 실시하고 그 결과를 1% 아가로스겔 상에서

분석하였다(도 10의 a). 그 결과, ATIC의 발현이 50% 이상 억제된 것을 확인할 수 있었다. RT-PCR로 ATIC의 발현이 억제된 것을 확인된 세포들에 대해 XC154 항체에 대한 유성세포분석(Flow cytometric analysis)을 상기 방법대로 실시하였다. 그 결과, ATIC의 발현이 억제된 상황에서 XC154 항체 특이반응이 감소함을 확인하였다(도 10의 b). 이러한 경향은 웨스턴 블롯팅 결과에서도 확인할 수 있었다. ATIC에 대한 siRNA를 처리한 후 웨스턴 블롯팅한 결과, XC154 항체반응 항원 단백질의 양을 현저히 감소시켰다(도 10의 c). 이러한 결과들로 XC154 항체 특이반응 항원은 ATIC임을 확인할 수 있었다.

[143]

[144]

[145]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 조은위

대한민국 대전 유성구 과학로 111 한국생명공학연구원

우편번호 305-806

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: TAB-XC154 (mouse B cell hybridoma cell line)	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 11873BP
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: [X] 과학적 성질의 설명 [] 제안된 분류학상의 위치 (적용시 X 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2011년 2월 21일 에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, 에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구원 생물자원센터 주소: 대한민국 대전시 유성구 과학로 111 한국생명공학연구원 우편번호 305-806	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 이정숙 서명일: 2011. 3. 14.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

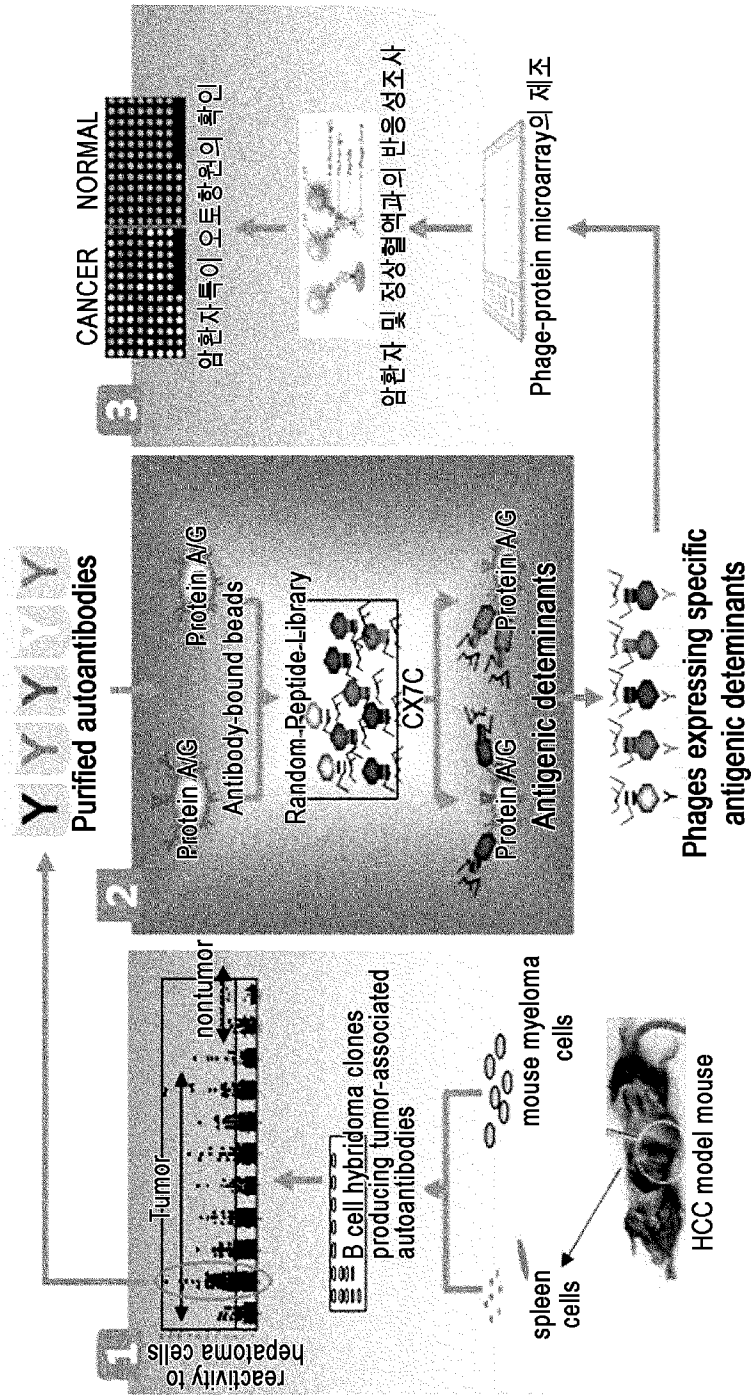
2011 년 6 월 2 일
 변리사 손 민 

청구범위

- [청구항 1] ATIC(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/ IMP cyclohydrolase)에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 서열번호 17 내지 20으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 인식하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열을 인식하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 자가면역항체는 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 4로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 5로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역과 서열번호 6으로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 7로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 8로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것인 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 자가면역항체는 서열번호 1로 기재된 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 2로 기재된 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 기탁번호 KCTC 11873BP의 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편.
- [청구항 7] 제1항의 자가면역항체에 특이적으로 결합하는 항원인 서열번호 17 내지 20으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 단편.
- [청구항 8] 제1항의 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암 진단용 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 서열번호 17 내지 20으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 특이적으로 인식하는 것인 간암 진단용 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 제제는 상기 자가면역항체에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드인 간암 진단용 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 자가면역항체에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 서열번호 17 내지 20으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열인 것인 간암 진단용 조성물.
- [청구항 12] 제1항의 자가면역항체를 생산하는 하이브리도마 세포주.

- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 하이브리도마 세포주는 기탁번호 KCTC 11873BP인 세포주.
- [청구항 14] 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 간암 진단용 키트.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 키트는 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것인 키트.
- [청구항 16] 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물을 이용하여 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편을 검출하는 단계를 포함하는, 간암 진단 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 방법은
 (a) 간암이 의심되는 개체의 시료로부터 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
 (b) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 시료는 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 뇌척수액 및 세포간액으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 시료인 방법.
- [청구항 19] 제17항에 있어서, 상기 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하기 위한 방법은 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것인 방법.
- [청구항 20] (a) ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준을 측정하는 단계;
 (b) 간암 치료용 후보물질을 투여하는 단계; 및
 (c) ATIC에 특이적으로 결합하는 자가면역항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편의 발현 수준이 상기 (a) 단계에 비해 감소되는 것을 확인하는 단계를 포함하는 간암 치료제의 스크리닝 방법.

[Fig. 1]



[Fig. 2a]

TAB-XC154-V_H

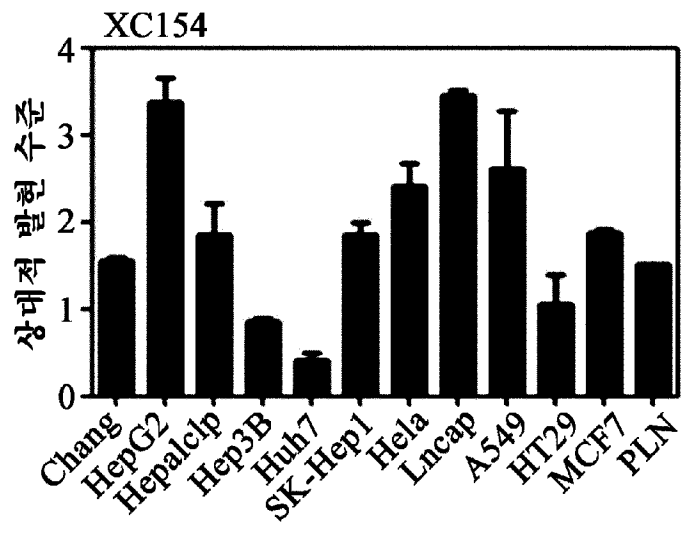
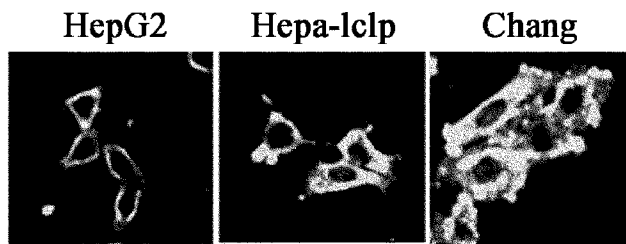
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
GAG	GTK	AAG	CTG	CAG	GAG	TCT	GCG	GCT	GAG	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG
G	X	K	L	Q	G	S	G	A	G	L	V	K	P	G
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
GCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAA	ACT	TCT	GGC	TAC	GCA	TTC	AGT
A	S	V	K	I	S	C	K	T	S	G	Y	A	F	S
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
AAC	TAC	TGG	ATG	AAT	TGG	GTG	AAG	CAG	AGA	CCT	GGA	AAG	GGT	CTT
N	Y	W	M	N	W	V	K	Q	R	P	G	K	G	L
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
GAG	TGG	ATT	GGA	CAG	ATT	TAT	CCT	GGA	GAT	GGT	GAT	ATT	AAT	TAT
G	W	I	G	Q	I	Y	P	G	D	G	D	I	N	Y
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
AAT	GGA	AAG	TTC	AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	GCA	GAC	AAA	TCC
N	G	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
TCC	AGA	ACA	GCC	TAC	ATG	CAA	CTC	AGC	AGT	CTG	ACC	TCT	GAG	GAC
S	R	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	G	D
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
TCT	GCG	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	GGG	ACT	TAT	TGG	GGC	CAA	GGG
S	A	V	Y	F	C	A	R	G	T	Y	W	G	Q	G
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
ACT	CTG	GTC	ACT	GTC	TCT	GCA	GAG	AGT	CAG	TCC	TTC	CCA	AAT	GTC
T	L	V	T	V	S	A	G	S	Q	S	F	P	N	V

[Fig. 2b]

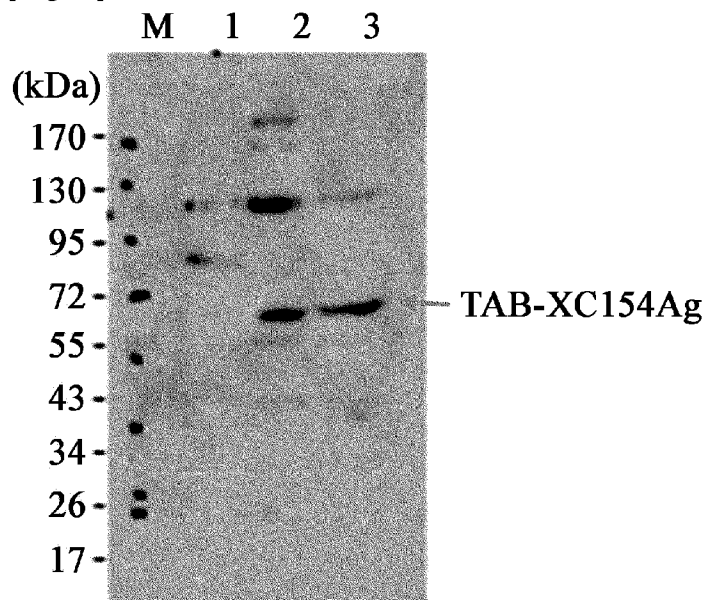
TAB-XC154-V_L

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
GAY	ATT	G _T GTG	CTC	ACM	CAR	WCT	ACA	GCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA
X	I	V	L	X	X	X	T	A	I	M	S	A	S	P
CDR-L1:a.a. 24-33														
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AAT
G	G	K	V	T	M	T	C	S	A	S	S	S	V	N
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
AAC	ATG	TAC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAG	ACA	GGA	TCC	TCC	CCC	AGA	CTC
N	M	Y	W	Y	Q	Q	K	T	G	S	S	P	R	L
CDR-L2:a.a. 49-55														
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
CTG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CTT	GTT	CGT
L	L	Y	D	T	S	N	L	A	S	G	V	P	V	R
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
TTC	AGT	GGC	AAT	G _G GG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	ACA	ATC	AGC
F	S	G	N	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAA	CAG	TGG
R	M	G	A	G	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W
CDR-L3:a.a. 88-96														
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
AGT	AGT	TAT	CCA	TTC	ACG	TTC	GGA	GGA	GGA	ACC	AAG	CTA	GAA	CTA
S	S	Y	P	F	T	F	G	G	G	T	K	L	G	L
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115					
AAA	CGG	GCT	GAT	GCT	GCA	CCA	ACT	GTA	TCC					
K	R	A	D	A	A	P	T	V	S					

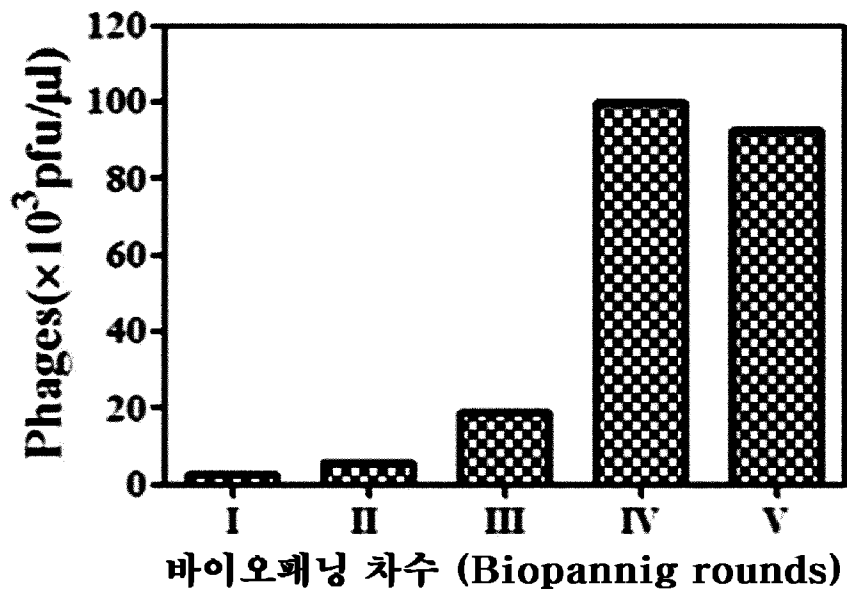
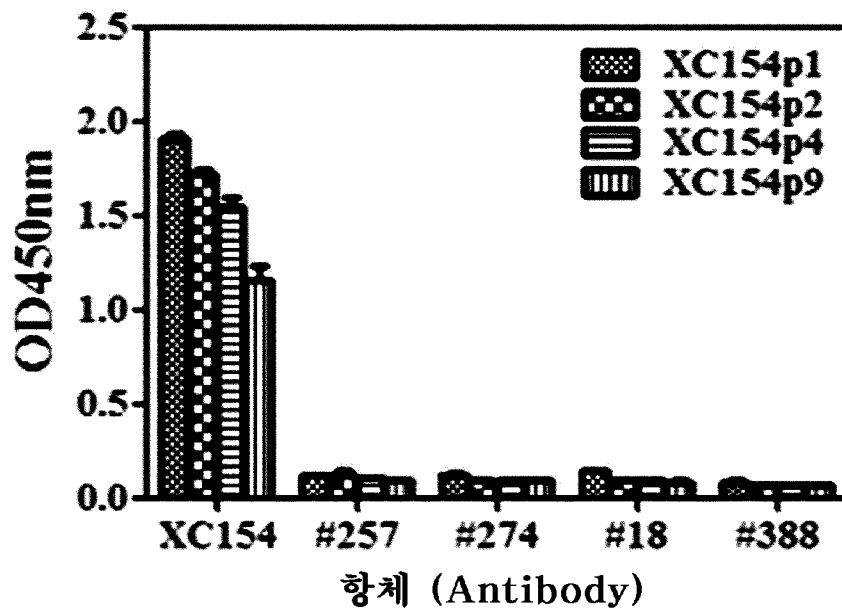
[Fig. 3]

a**b**

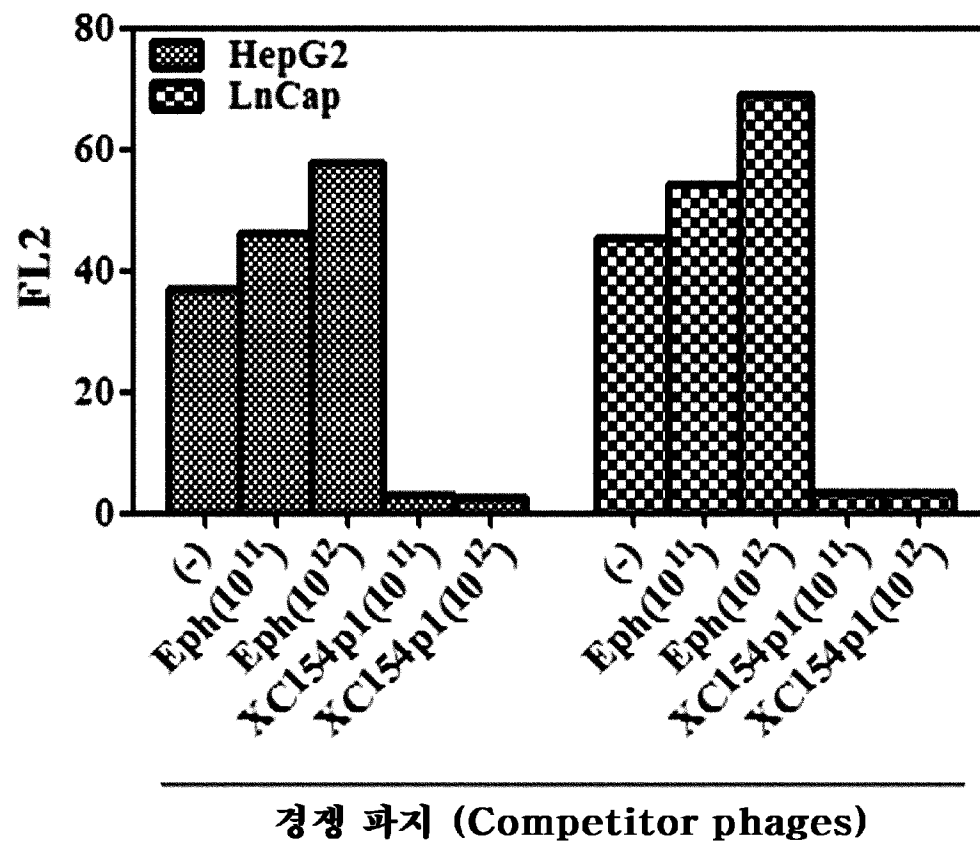
[Fig. 4]



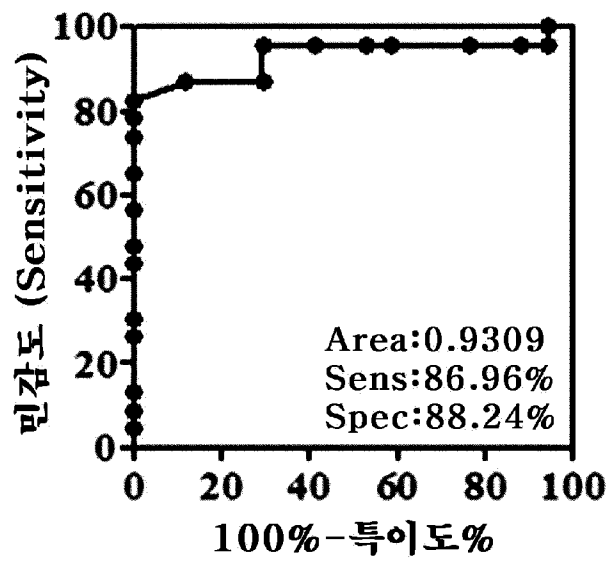
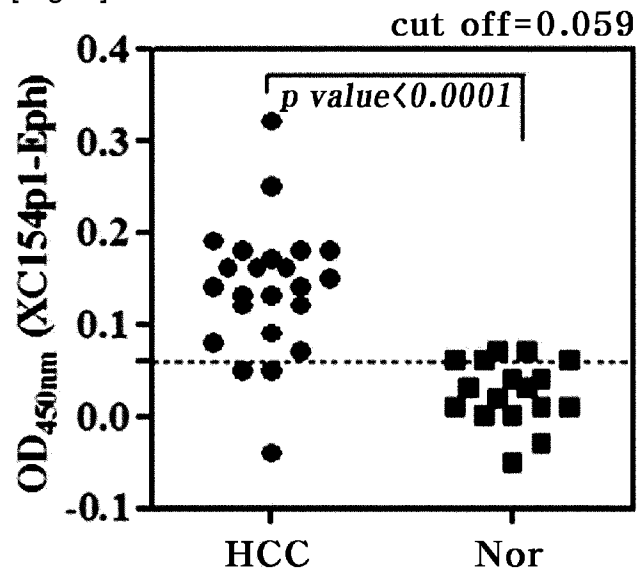
[Fig. 5]

a**b**

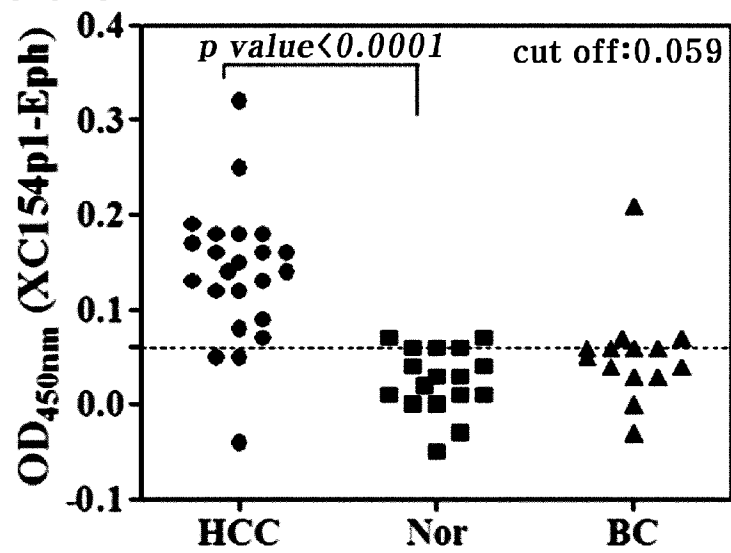
[Fig. 6]



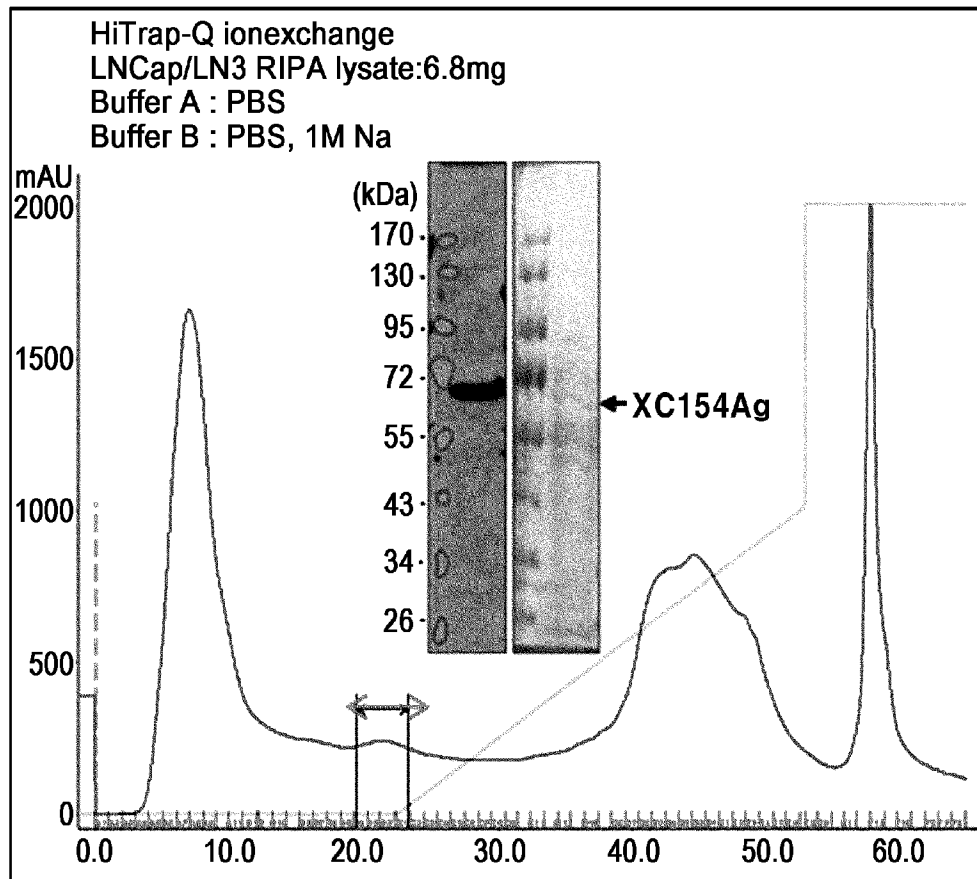
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

a**b**

Gene symbol	Accession number	Molecular mass (Da)	Queries matched	Mascot score
ATIC, bifunctional purine biosynthesis protein, PURH	IPI002894499	64575	85	1780

[Fig. 10]

