

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2019-0042281 (43) 공개일자 2019년04월24일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 5/12</i> (2006.01) <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>G01N 33/68</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>C12N 5/12</i> (2013.01) <i>C07K 16/28</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2017-0134025 (22) 출원일자 2017년10월16일 심사청구일자 2017년10월16일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 전태훈 서울특별시 송파구 양재대로 1218, 236동 1802호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 최창용 서울특별시 성북구 인촌로7가길 56, 103호(안암동2가) (74) 대리인 김순웅

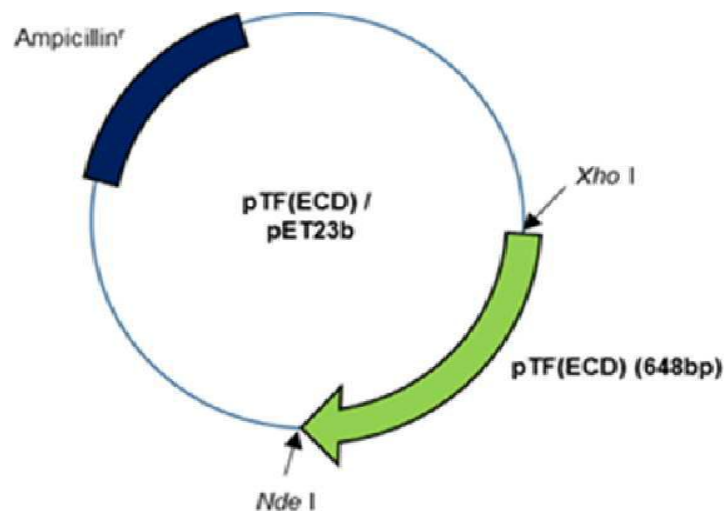
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주, 상기 단일클론항체를 포함하는 장기이식 거부반응 억제용 조성물, 돼지 조직인자 검출용 조성물, 검출키트 및 검출방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 돼지 조직인자를 항원으로 하는 단일클론항체는 돼지 조직인자의 1차 및 3차 구조를 인식하고, 이에 대한 친화력이 높다는 효과를 가지고 있어, 장기 표면의 조직인자를 차단함으로써, 항응고, 항혈소판, 항보체 활성을 나타내는바, 이중 장기이식 거부반응 억제 및 면역억제 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/68 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

G01N 2333/705 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01113001

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업_동물분자유전육종사업

연구과제명 돼지 소모성질병 제어를 위한 PCV2와 숙주세포 간의 면역 조절 기전 구명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 하이브리도마 세포주.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 하이브리도마 세포주는 수탁번호 KCTC18584P인 것을 특징으로 하는 하이브리도마 세포주.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 하이브리도마 세포주로부터 생산된 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 단일클론항체는 돼지 조직인자 세포외 도메인의 1차 또는 3차 구조를 인식하는 것을 특징으로 하는 단일클론항체.

청구항 6

제4항에 따른 단일클론항체를 포함하는 장기이식 거부반응 억제용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 거부반응은 초급성 거부반응, 급성혈액 매개성 거부반응 또는 급성세포매개성 거부반응인 것을 특징으로 하는 장기이식 거부반응 억제용 조성물.

청구항 8

제4항에 따른 단일클론항체를 포함하는 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질 검출용 조성물.

청구항 9

제4항에 따른 단일클론항체를 포함하는 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질 검출키트.

청구항 10

(a) 제4항에 따른 단일클론항체를 시료와 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 시료에서 돼지 조직인자와 상기 단일클론항체가 결합하여 생성된 항원-항체 복합체의 형성을 확인하는 단계;를 포함하는 돼지 조직인자를 검출하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (b) 단계의 항원-항체 복합체의 형성 확인은 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블로팅(Western Blotting), 면역형광(Immunofluorescence), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry staining), 유세포 분석법(Flow cytometry), 면역세포화학법, 방사능면역분석법(RIA), 면역침전분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay) 및 단백질 칩(Protein Chip)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 돼지 조직인자를 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주, 상기 단일클론항체를 포함하는 장기이식 거부반응 억제용 조성물, 돼지 조직인자 검출용 조성물, 검출키트 및 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

초기 이종장기이식을 위한 장기 공여 동물은 인간과 유전적으로 가장 유사하고, 체구 또한 비슷한 영장류를 후보로 하여 시도되었다. 하지만, 영장류는 번식에 어렵고, 면역학적 장벽이 있으며, AIDS와 같은 수인성 전염병에 대한 우려가 있기 때문에, 공여 동물로서 배제하게 되었다. 그 후 고려의 대상이 된 동물인 돼지는 비록 영장류보다 생물학적으로 인간과 차이가 있지만, 대량생산이 가능하고, 인간과 돼지 사이의 교차 감염 위험이 적기 때문에 이종장기이식의 공여 동물로 적합하다고 알려져 있다.

[0004]

이종장기이식에 있어서 가장 큰 장벽은 동종이식의 경우보다 더 빠르고 강한 면역거부반응이 일어나게 된다는 점이다. 이종장기이식의 거부반응은 발생 순서에 따라 초급성 거부반응, 급성혈관성 거부반응, 급성세포매개성 거부반응 등이 있다. 특히 혈액응고 반응이 심한 급성혈액매개성 염증반응(Instant blood mediated inflammatory reaction, IBMIR)은 혈액응고시스템의 활성화 및 혈소판의 활성화, 혈청 내 보체의 활성화를 통해 이식 세포의 용해와 선천면역세포의 이식 장기 내 침윤 등의 반응을 일으키며, 이는 이종장기이식 실패의 경우에 가장 큰 이유를 차지하는 반응으로 알려져 있다. 이를 조절하기 위해서 급성혈액매개성 염증반응을 조절할 수 있는 항응고, 항혈소판, 항보체 등의 물질들의 개발이 필요한 상황이지만 아직까지 미비한 단계이다. 그러므로 이러한 조직인자 매개 급성혈액매개성 염증반응을 진단하고 제어하기 위한 연구가 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

이에 본 발명자들은 전술한 바와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 돼지 조직인자를 항원으로 하는

단일클론항체를 제조하고, 상기 단일클론항체가 돼지 조직인자의 1차 및 3차 구조를 인식하며, 이에 대한 친화력이 높다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은, 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 하이브리도마 세포주로부터 생산된 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 포함하는 장기이식 거부반응 억제용 조성물, 돼지 조직인자 세포의 도메인 검출용 조성물, 검출키트 및 검출방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 하이브리도마 세포주로부터 생산된 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 상기 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 포함하는 장기이식 거부반응 억제용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 포함하는 돼지 조직인자 세포의 도메인 검출용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 포함하는 돼지 조직인자 세포의 도메인 검출키트를 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 상기 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 시료와 접촉시키는 단계 및 돼지 조직인자와 상기 단일클론항체가 결합하여 생성된 항원-항체 복합체의 형성을 확인하는 단계를 포함하는 돼지 조직인자를 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 돼지 조직인자를 항원으로 하는 단일클론항체는 돼지 조직인자의 1차 및 3차 구조를 인식하며, 이에 대한 친화력이 높다는 효과를 가지고 있어, 장기 표면의 조직인자를 차단함으로써, 항응고, 항혈소판, 항보체 활성을 나타내는바, 이종 장기이식 거부반응 및 면역 억제 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 돼지 조직에서 조직인자의 mRNA 발현을 확인한 결과이다(Mw, 분자량; MLN, 장간막 림프절; M, 근육; K, 신장; H, 심장; Lv, 간; Lu, 폐; Sp, 비장; T, 흉선; Si, 소장; Li, 대장).

도 2는 돼지 조직인자의 세포의 도메인 단백질 제조를 위한 재조합 벡터의 벡터맵을 나타낸 것이다.

도 3은 SDS-PAGE 방법으로 본 발명의 실시예에 따라 제조된 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질의 정제 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 SDS-PAGE 방법으로 본 발명에 따른 단일클론항체의 정제 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 유세포 분석법으로 본 발명에 따른 단일클론항체의 돼지 조직인자 3차 구조에 대한 친화력 확인 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 웨스턴 블롯팅 방법으로 본 발명에 따른 단일클론항체의 돼지 조직인자 1차 구조에 대한 친화력 확인 결

과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.
- [0023] 또한 본 발명은 상기 하이브리도마 세포주로부터 생산된 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 제공한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, “단일클론항체”는 당해 분야에 공지된 용어로서, 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도의 특이적인 항체를 의미한다. 통상적으로, 상이한 결정기(epitope)들에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론항체와는 다르게, 단일클론항체는 항원상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 단일클론항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 융합 배양에 의해 합성되기 때문에 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 또 다른 장점을 갖는다. 상기 단일클론항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법 또는 파지 항체 라이브러리 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마 세포는 항원 단백질을 주사한 마우스와 같은 면역학적으로 적합한 숙주 동물로부터의 면역 세포와 암 세포주를 융합함으로써 만들어진다. 이런 두 집단의 세포 융합은 폴리에틸렌 글리콜과 같이 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지되어 있는 방법을 이용하여 융합시켜 하이브리도마 세포를 표준적인 배양 방법에 의해 증식시킨다. 한계 희석법(limited dilution)에 의한 서브 클로닝을 실시하여 균일한 세포 집단을 수득하고 난 뒤 항원에 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포를 시험관 또는 생체 내에서 대량으로 배양한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, “하이브리도마 세포주”는 2개의 다른 종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 세포를 의미한다. 하이브리도마 세포는 폴리에틸렌글리콜 등 세포융합을 일으키게 하는 물질이나 특정 종의 바이러스를 사용하여 둘 이상의 동종 세포나 이종 세포를 융합시킴으로써 제조되는데, 하이브리도마 세포를 형성시킴으로써 각기 다른 세포가 갖는 다른 기능을 하나의 세포에 통합시킬 수 있게 된다. 이러한 하이브리도마 세포는 일반적으로 시험관 내에서도 증식이 되는 암세포와 생체로부터 추출한 어느 특성의 분화 형질을 가진 대형 세포를 융합시켜 제조될 수 있다. 대표적인 하이브리도마는 림프구 하이브리도마로서, 골수종세포와 B세포를 융합시킨 하이브리도마 세포, T세포와 종양세포를 융합시킨 하이브리도마 세포 및 림포카인(생리활성물질)을 만들어내는 T 세포와 종양세포를 융합시킨 하이브리도마 세포 등이 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포주는 당업자의 선택에 따라 본 발명의 단일클론항체를 효과적으로 생산하기 위한 최적의 조건으로 융합 및 배양될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에서는 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질로 면역화 된 마우스의 비장에서 B 세포를 확보하고, 이를 마우스 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마 세포를 제조하였다. 보다 구체적으로 상기 제조된 하이브리도마 세포 중 한계희석법을 이용하여 단일클론항체를 생산하고, 증식능력이 우수한 하이브리도마 세포주를 선별하였다. 선별된 하이브리도마 세포주는 pIF 20F5로 명명하였으며, 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2017년 7월 4일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC18584P를 부여받았다.
- [0027] 본 발명에 있어서, “조직인자”는 혈액응고계에 관여하는 인자 중 혈액응고 제Ⅲ인자를 의미하며, 조직인자(tissue factor, TF) 또는 조직 트롬보플라스틴(tissue thromboplastin)이라고 불리운다. 조직인자는 세 개의 도메인 단백질로 구성되며, 보다 상세하게는 세포의 도메인(extracellular domain), 막관통 영역(transmembrane domain) 및 세포질 카복실기 말단 도메인(cytoplasmic COOH-terminal domain)으로 구성된다. 상기 조직인자는 혈관 내피세포의 소포체에 존재하며 평상시에는 혈액응고에 영향주지 않지만, 물리적 손상을 받았을 때 혈액응고 반응의 보조인자(cofactor)로 작용하여 혈액응고의 외인계 및 내인계 경로를 개시시키는 기능을 한다. 따라서 항조직인자 항체의 처리, 조직인자 발현 유전자의 전사억제 및 세포막 변형 등의 방법으로 조직인자를 저해시킴으로써, 면역 반응을 조절할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 구체예에서는 단일클론항체가 돼지 조직인자를 타겟하며, 보다 상세하게는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 타겟한다. 또한 상기 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질의 범위에는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 상기 “기능적 동등물”이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을

갖는 것으로, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. 또한, 본 발명의 단백질은 생체내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위해서 N 말단 또는 C 말단을 변형하거나 여러 유기단으로 보호한 형태일 수 있다. 즉, 상기 단백질의 C 말단은 안정성을 증가시키기 위해서 변형될 수 있는 형태라면, 특별한 제한은 없으나 바람직하게는 히드록시기(-OH) 또는 아미노기(-NH₂)로 변형되는 것일 수 있다. 또한 상기 단백질의 N 말단은 안정성을 증가시키기 위해서 변형될 수 있는 형태라면, 특별한 제한은 없으나 바람직하게는 아세틸(Acetyl)기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐(Fmoc)기, 포르밀(Formyl)기, 팔미토일(Palmitoyl)기, 미리스틸(Myristyl)기, 스테아릴(Stearyl)기 및 폴리 에틸렌글리콜(PEG)로 이루어진 군에서 선택되는 기로 변형되는 것일 수 있다.

[0029] 발명의 일 구체예에 따라 제조된 단일클론항체는 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질 구조를 인식하며, 보다 상세하게는 단백질의 1차 또는 3차 구조를 인식한다.

[0031] 또한 본 발명은 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 포함하는 장기이식 거부반응 억제용 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명에 있어서, “장기이식 거부반응”은 동종 또는 이종 장기이식으로 인하여 면역 체계가 이식된 장기를 이물질로 인식하여 공격하는 면역반응을 의미하며, 상기 면역반응은 세포매개면역 및 체액성면역 모두 관여한다. 장기이식 거부반응은 초급성 거부반응, 급성 거부 혈관염, 급성혈액 매개성 거부반응 및 급성세포매개성 거부반응을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 상기 장기이식 거부반응 억제용 조성물은 투여를 위하여 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 제제화 할 수 있다.

[0034] 상기 장기이식 거부반응 억제용 조성물은 추가적인 성분을 더 포함할 수 있다. 추가적인 성분의 예로는 만니톨, 증류수, 인산II수소나트륨 및 이성화당이 있다. 또한 상기 장기이식 거부반응 억제용 조성물은 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체와 함께 면역억제 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0035] 상기 장기이식 거부반응 억제용 조성물은 비경구 투여하는 것이 바람직하며, 이식부위에 직접적으로 처치되는 것이 더 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다. 상기 장기이식 거부반응 억제용 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0037] 또한 본 발명은 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 포함하는 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질 검출용 조성물을 제공한다.

[0038] 상기 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질 검출용 조성물은 시료에 처리했을 때 돼지 조직인자 세포의 도메인과 본 발명의 검출용 조성물이 반응하여 항원-항체 복합체를 형성하는 것이 바람직하다.

[0040] 또한 본 발명은 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 포함하는 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질 검출키트를 제공한다.

[0041] 상기 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질 검출키트는 본 발명의 단일클론항체 뿐만 아니라, 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 선별적으로 인지할 수 있는 한 다클론항체, 키메라-항체, 인간화-항체, 단일클론항체의 단편과 같은 다른 항체를 더 포함할 수 있다.

[0042] 또한 상기 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질 검출키트에는 면역학적 분석에 사용되는 도구 및 시약이 포함될

수 있다. 상기 도구 및 시약으로는 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제 등이 포함된다. 상기 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 함께 포함할 수 있다. 상기 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS; 불용성 담체, 예를 들어 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스투란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0043] 상기 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질 검출키트는 항원-항체 복합체의 형성 여부를 확인하여 검출하는 것이 바람직하다. 상기 항원-항체 복합체의 형성 여부 확인을 위해 본 발명에 따른 검출 키트는 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블로팅(Western Blotting), 면역형광(Immunofluorescence), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry staining), 유세포 분석법(Flow cytometry), 면역세포화학법, 방사능면역분석법(RIA), 면역침전분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay) 및 단백질 칩(Protein Chip)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 실험을 수행하기 위한 키트 형태일 수 있다.

[0045] 또한 본 발명은 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 시료와 접촉시키는 단계 및 돼지 조직인자와 상기 단일클론항체가 결합하여 생성된 항원-항체 복합체의 형성을 확인하는 단계를 포함하는 돼지 조직인자를 검출하는 방법을 제공한다.

[0046] 상기 시료는 그 종류에 제한이 없다. 시료는 동물에서 채취된 다양한 생체 내 기관 또는 조직 또는 장기이며, 더욱 상세하게는 장간막 림프절, 근육, 신장, 심장, 간, 폐, 비장, 흉선 및 대장을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 상기 항원-항체 복합체의 형성 확인은 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블로팅(Western Blotting), 면역형광(Immunofluorescence), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry staining), 유세포 분석법(Flow cytometry), 면역세포화학법, 방사능면역분석법(RIA), 면역침전분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay) 및 단백질 칩(Protein Chip)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 의해 이루어진다.

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0051] 실시예 1. 돼지 조직인자 유전자의 발현 분석

[0052] 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 돼지 조직인자 유전자의 발현을 분석하기 위하여, 돼지의 각 조직으로부터 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하였다.

[0053] 구체적으로 돼지의 각 조직을 채취하고, 채취한 조직에 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml 당 200 μ l 의 클로로폼(chloroform, sigma)을 넣어 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA 1 μ g을 주형으로 하여 수퍼스크립트 III(Superscript III, Invitrogen) 역전사 효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 또한 유전자 데이터베이스를 이용하여 합성된 cDNA를 주형으로 하는 프라이머를 제작하였으며, 제작된 프라이머의 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

유전자	프라이머	서열 (5'-3')
돼지 조직인자	Forward	ATGTGACCGTAGAAGCTGCTC
	Reverse	AACACCACCGCTCCAACGATG
GAPDH	Forward	ATGACCACAGTCCATGCCATC
	Reverse	CCTGCTTACCACCTTCTTG
돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질	Forward	ACAGGACTACAGATGTAATT
	Reverse	TTCTCGGGACACAGCTTTCTC

- [0056] 표 1에 따른 프라이머를 사용하여 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 수행함으로써 돼지 조직인자의 유전자 발현을 분석하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였다. 돼지 조직인자 유전자의 발현 분석 결과는 도 1에 나타내었다.
- [0057] 도 1에 나타난 바와 같이 돼지의 췌도 조직을 포함한 대부분의 조직에서 316 bp의 돼지 조직인자 유전자의 mRNA가 확인되었다.
- [0059] **실시예 2. 돼지 조직인자의 세포외 도메인 단백질 제조**
- [0060] 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 돼지 조직인자 단백질을로부터 세포외 도메인 단백질을 동정하기 위하여, 돼지 췌도 조직으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 추출된 전체 RNA는 표 1의 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며, 이를 통해 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 돼지 조직인자의 세포외 도메인 단백질(33 내지 248 번째 아미노산 서열)을 동정하였다.
- [0061] 또한 상기 돼지 조직인자의 세포외 도메인 단백질을 제조하기 위하여, 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 돼지 조직인자의 세포외 도메인 단백질 유전자를 C-term 6His-tag를 갖는 pET-21b 벡터에 삽입하였다. 또한 상기 벡터에 5' 말단에 제한효소 Nde I의 절단 부위 서열을 삽입하고, 3' 말단에는 Xho I의 절단 부위 서열을 삽입하여 재조합 벡터 pTF/pET23b를 제작하였다. 상기 재조합 벡터 pTF/pET23b의 벡터맵은 도 2에 나타내었다. 상기 재조합 벡터 pTF/pET23b를 BL21 세포주에 도입하였다. 재조합 벡터가 도입된 BL21 세포 및 이의 배양액으로부터 히스티딘이 태그된(his tagging) 돼지 조직인자의 세포외 도메인 단백질을 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA) 친화도 법으로 분리 및 정제하였다.
- [0062] 정제된 돼지 조직인자의 세포외 도메인 단백질을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하고, 쿠마시블루 염색을 통해 단백질의 정제 결과를 확인하였다. 돼지 조직인자의 세포외 도메인 단백질을 이용하여 SDS-PAGE를 수행 결과는 도 3에 나타내었다.
- [0063] 도 3에 나타난 바와 같이, 돼지 조직인자의 세포외 도메인 단백질이 성공적으로 분리 및 정제되었다는 것을 알 수 있다.
- [0065] **실시예 3. 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질을 항원으로 하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주 제작**
- [0066] 실시예 2에서 제조된 돼지 조직인자의 세포외 도메인 단백질을 항원으로 하는 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제작하기 위하여, BALB/c 마우스에 항원 면역 실시하였다. 구체적으로, 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질 및 보강제 FCA(Freund Complete Adjuvant)와 함께 마우스에 복강주사 하였다. 복강주사 2주 후 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질 및 FIA(Freund Incomplete Adjuvant)를 마우스에 복강주사 하였다. ELISA법을 이용하여, 항원면역이 실시된 마우스 혈청의 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질에 특이적인 항체 존재를 확인하였다.
- [0067] 또한 하이브리도마 세포주 제작을 위하여, 상기 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질에 대하여 면역화된 마우스의 비장세포를 추출하였다. 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 마우스의 비장세포와 골수종 세포(myeloma cell) SP2/0를 융합시켜 하이브리도마 세포를 제작하였다. 상기 세포융합에 사용된 골수종 세포 SP2/0는 HGPRT(hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)이 존재하지 않아 HAT 배지에서는 생존할 수 없는 특성이 있고, 이러한 특성을 이용하면 제조된 하이브리도마 세포주를 쉽게 선별할 수 있다. 클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 선별하기 위하여, 한계희석법을 이용하여 단일클론항체를 생산하고, 증식능력이 우수한 하이브리도마 세포주를 선별하였다. 선별된 하이브리도마 세포주는 pTF 20F5로 명명하였으며, 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2017년 7월 4일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC18584P를 부여받았다.

[0069] **실시예 4. 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 항원으로 하는 단일클론 항체의 정제**

[0070] 실시예 3에서 제조된 하이브리도마 세포주로부터 단일클론항체를 분리 및 정제하였다. 구체적으로 단백질 A 세파로오스(protein A sepharose) 컬럼에 완충액 A(20 mM, sodium-phosphate pH7.0)을 통과시킨 후, 하이브리도마 세포주의 배양상층액을 통과시켰다. 컬럼에 흡착된 단백질을 용출하기 위하여, 상기 컬럼에 완충액 B(0.1 M citric acid-NaOH pH3.0)를 통과시켜 단백질을 용출시켰다. 용출된 단백질은 완충액 A를 이용하여 투석하였다. 투석된 단백질을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여, 정제된 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 항원으로 하는 단일클론항체를 확인하였다. 상기 단일클론항체의 정제 결과는 도 4에 나타내었다.

[0071] 도 4에 나타난 바와 같이, 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 항원으로 하는 단일클론항체가 성공적으로 정제되었다는 것을 알 수 있다.

[0073] **실시예 5. 돼지 조직인자 세포의 도메인 단백질을 항원으로 하는 단일클론항체의 효능 평가**

[0074] **5-1. 단일클론항체의 돼지 조직인자 3차 구조에 대한 친화력 확인**

[0075] 실시예 4에서 정제된 단일클론항체의 돼지 조직인자 3차 구조에 대한 친화력(affinity)를 확인하기 위하여, 돼지 대식세포주 3D3/31에 실시예 3에서 제조된 하이브리도마 세포주 배양액을 처리하였다. 또한 상기 돼지 대식세포주 3D3/31에 마우스 이뮤노글로불린 분자에 특이적으로 결합하는 알렉사 488 컨쥬게이트드 염소 항 마우스 IgG 항체(Alexa 488 conjugated goat anti-mouse IgG antibody)로 염색하였다. 유세포 분석기를 이용하여 염색된 돼지 대식세포주 3D3/31의 조직인자에 대한 단일클론항체의 친화력을 확인하였다. 상기 단일클론항체의 돼지 조직인자 3차 구조에 대한 친화력 확인결과는 도 5에 나타내었다.

[0076] 도 5에 나타난 바와 같이, 실시예 3에서 제조된 하이브리도마 세포주는 평균 형광 강도(mean fluorescence intensity, MFI)가 매우 높은 것을 알 수 있다. 이는 실시예 3에서 제조된 하이브리도마 세포주에서 생산된 단일클론항체가 돼지 조직인자의 3차 구조를 인식하고, 이에 대한 친화력이 높다는 것을 의미한다.

[0078] **5-2. 단일클론 항체의 돼지 조직인자 1차 구조에 대한 친화력 확인**

[0079] 실시예 4에서 정제된 단일클론항체의 돼지 조직인자 1차 구조에 대한 친화력(affinity)를 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 확인하였다. 구체적으로, 돼지 대식세포주인 3D4/31 및 돼지 신장상피세포인 PK15 세포를 단백질 분해효소 억제제 콕테일(proteinase inhibitor cocktail)이 포함된 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1.0 % NaCl, 1.0 % Triton X-100, pH7.2)로 용해시켰다. 세포 용해액은 10 % SDS 폴리아크릴아미드 겔에 전기영동시킨 후, 이모빌론 P 멤브레인(immobilon P membrane, Millipore Corporation)에 트랜스퍼(transfer)하였다. 상기 이모빌론 P 멤브레인에 실시예 3에서 제조된 하이브리도마 세포주 배양액을 함유한 3 % BSA/TBST 버퍼를 처리하였다. 또한 상기 이모빌론 P 멤브레인에 마우스 이뮤노글로불린 분자에 특이적으로 결합하는 염소 항 마우스 IgG-HRP 항체로 염색하였다. 그 후 ECL 시스템(GE healthcare)을 이용하여 상기 염색된 멤브레인을 반응시켜 돼지 조직인자의 발현 정도를 측정하였다. 대조군으로는 항 β -액틴(β -actin) 항체를 사용하였다. 단일클론항체의 돼지 조직인자 1차 구조에 대한 친화력 확인결과는 도 6에 나타내었다.

[0080] 도 6에 나타난 바와 같이, 실시예 3에서 제조된 하이브리도마 세포주로부터 생산된 단일클론항체는 돼지 조직인자의 1차 구조를 인식한다는 것을 알 수 있다.

[0082] 종합적으로 이상의 실험 결과를 통해 본 발명에 따른 돼지 조직인자를 항원으로 하는 단일클론항체는 돼지 조직인자의 1차 및 3차 구조를 인식하고, 친화력이 높다는 것을 확인하였다. 이는 이종 장기이식 시 장기 표면의 조직인자를 차단함으로써, 항응고, 항혈소판 및 항보체 활성을 나타내어 면역억제를 억제할 수 있음을 의미하는 바, 본 발명의 돼지 조직인자를 항원으로 하는 단일클론항체는 이종 장기이식 및 면역억제 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0084] 이하, 제제예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 제제예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것

으로서, 본 발명의 범위가 제제예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.

[0086] 제제예 1. 장기이식 거부반응 억제용 조성물의 제조

[0087] 1-1. 주사제의 제조

[0088] 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체 1 μ g

[0089] 만니톨 180 mg

[0090] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0091] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0092] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0094] 1-2. 액제의 제조

[0095] 돼지 조직인자 세포외 도메인 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론항체 1 μ g

[0096] 이성화당 10 g

[0097] 만니톨 5 g

[0098] 정제수 적량

[0099] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0101] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0103]

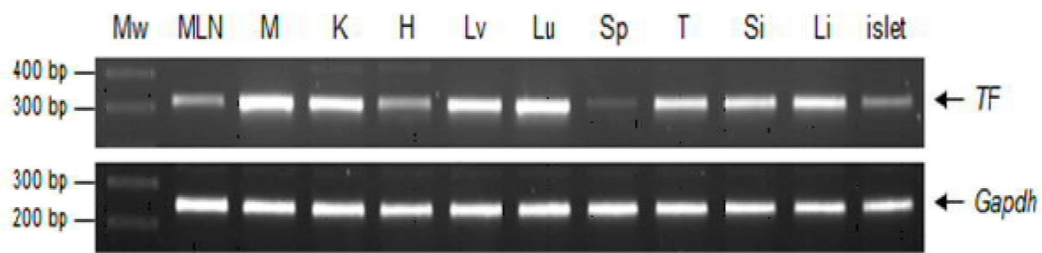
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC18584P

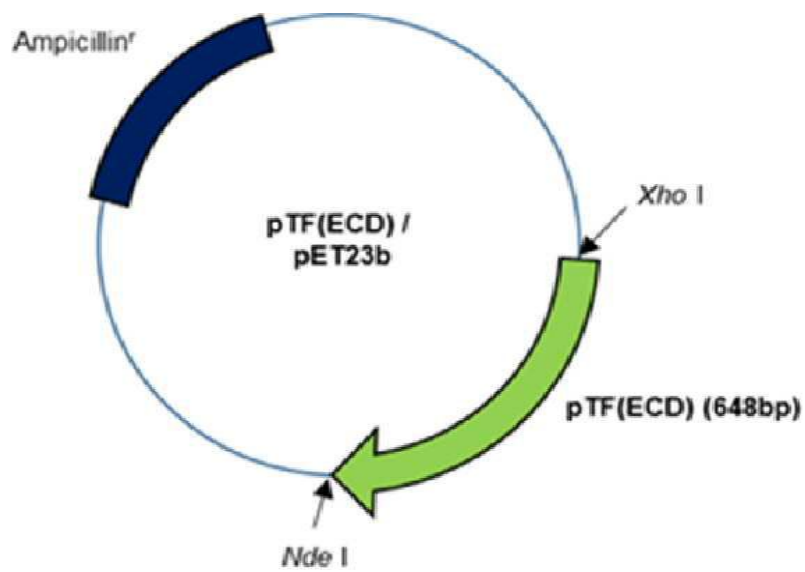
수탁일자 : 20170704

도면

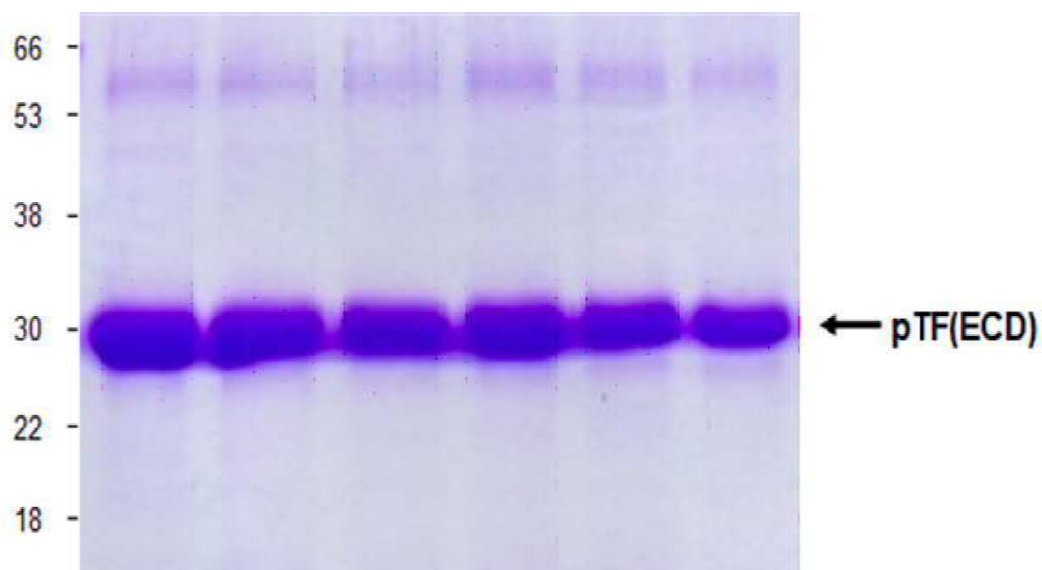
도면1



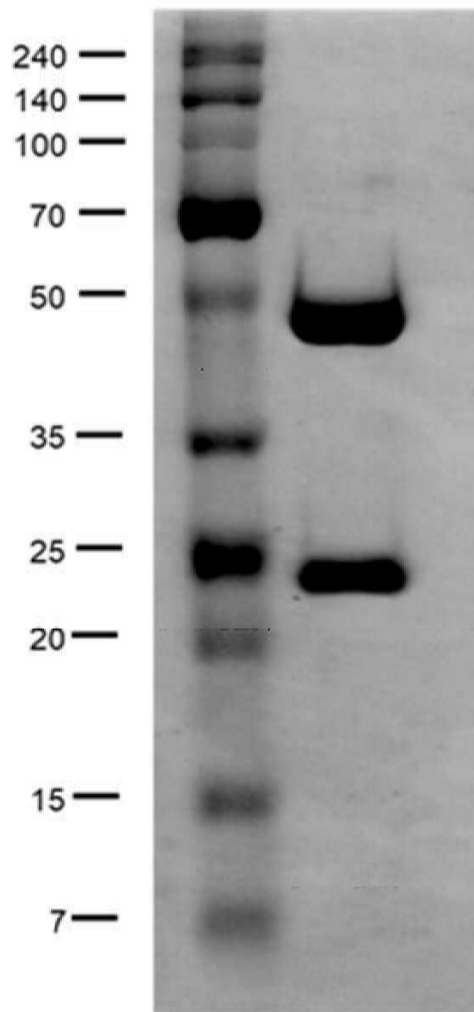
도면2



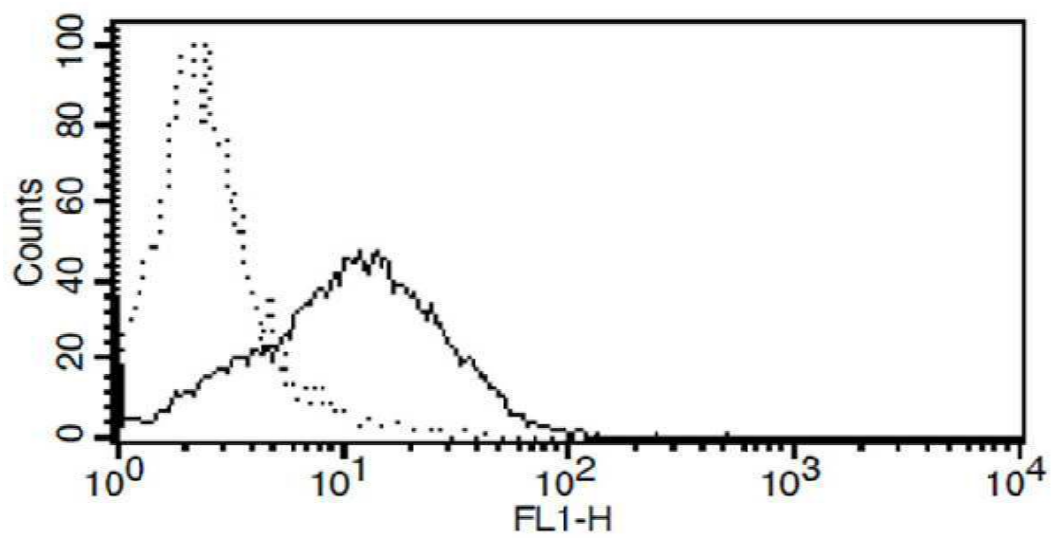
도면3



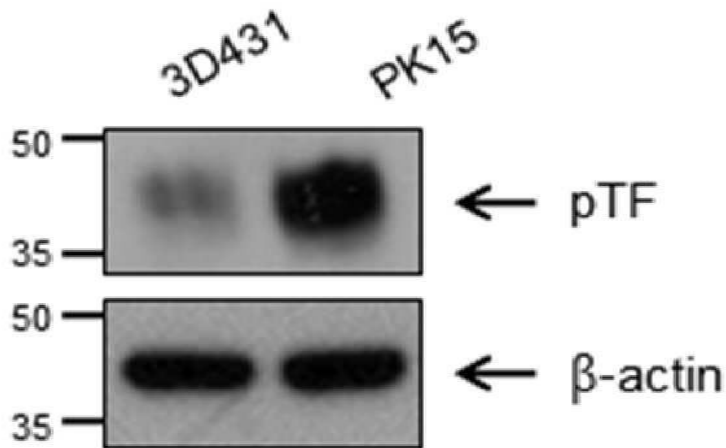
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Monoclonal antibody against porcine tissue factor extracellular domain and uses thereof
- <130> 1-94P
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 882
- <212> DNA
- <213> Sus scrofa
- <400> 1

atggcgaccc ccaccggacc cccggtgtcc tgtcccaagg ccgccgttgc tcgcgcgctc	60
ctgcttggct gggtcctcgt ccaggtggct ggagccacag gcactacaga tgtaattgta	120
gcatataact taacttggaa gtcaactaat ttcaagacca ttttggagtg ggaacccaaa	180
cccattaatt atgtctacac tgttcagata agccctagac taggagattg gaaaaacaaa	240
tgcttcaca cgacagacac ggagtgtgac gtcacggacg agatcatgag gaacgtgaag	300
gagacgtacg tggcgcgggt cctgtcctat cctgcggaca ccgtgctcac cgctcaggag	360
cctccgttta ccaactgcc ccccttcacg ccctacctgg acacaaacct cggacagcca	420
gtgattcaga gttttgaaca agtcgggaca aaactgaatg tgaccgtaga agctgctcgc	480
accttagtca ggggtgaacgg cacattcctc aggctgcggg acgtttttgg caaggacttg	540

aattatacc tttattactg gagagcttcg agtacaggaa agaaaaaggc caccaccaac 600

actaatgagt ttctgattga cgtggataaa ggagaaaact actgtttcag tgttcaagca 660

gtgattccat cccgaagagt taaccagaag agtcccgaag gtcgcattga gtgcaccagc 720

caagagaaag ctgtgtcccg agaactgttc ctcatcgttg gagcgggtgt gtttgcggtc 780

atcgtcttcg tcctcgtccc gcctgtgtct ctgtacaagt gcaggaagga gcgggcaggg 840

cccaattgga aaggaagaac gccccctca aatgtggcgt ga 882

<210> 2

<211> 293

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 2

Met Ala Thr Pro Thr Gly Pro Pro Val Ser Cys Pro Lys Ala Ala Val

1 5 10 15

Ala Arg Ala Leu Leu Leu Gly Trp Val Leu Val Gln Val Ala Gly Ala

20 25 30

Thr Gly Thr Thr Asp Val Ile Val Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

35 40 45

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Ile Asn Tyr

50 55 60

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Pro Arg Leu Gly Asp Trp Lys Asn Lys

65 70 75 80

Cys Phe His Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Val Thr Asp Glu Ile Met

85 90 95

Arg Asn Val Lys Glu Thr Tyr Val Ala Arg Val Leu Ser Tyr Pro Ala

100 105 110

Asp Thr Val Leu Thr Ala Gln Glu Pro Pro Phe Thr Asn Ser Pro Pro

115 120 125

Phe Thr Pro Tyr Leu Asp Thr Asn Leu Gly Gln Pro Val Ile Gln Ser

130 135 140

Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Leu Asn Val Thr Val Glu Ala Ala Arg

145 150 155 160

Thr Leu Val Arg Val Asn Gly Thr Phe Leu Arg Leu Arg Asp Val Phe
165 170 175
Gly Lys Asp Leu Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Arg Ala Ser Ser Thr
180 185 190
Gly Lys Lys Lys Ala Thr Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val
195 200 205
Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser
210 215 220

Arg Arg Val Asn Gln Lys Ser Pro Glu Ser Arg Ile Glu Cys Thr Ser
225 230 235 240
Gln Glu Lys Ala Val Ser Arg Glu Leu Phe Leu Ile Val Gly Ala Val
245 250 255
Val Phe Ala Val Ile Val Phe Val Leu Val Pro Pro Val Ser Leu Tyr
260 265 270
Lys Cys Arg Lys Glu Arg Ala Gly Pro Asn Trp Lys Gly Arg Thr Pro
275 280 285
Pro Ser Asn Val Ala

290

<210> 3

<211> 648

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 3

acaggcacta cagatgtaat ttagcatat aacttaactt ggaagtcaac taatttcaag 60
accattttgg agtgggaacc caaacccatt aattatgtct aactgttca gataagccct 120
agactaggag attggaaaaa caaatgcttc cacacgacag acacggagtg tgacgtcacg 180
gacgagatca tgaggaacgt gaaggagacg tacgtggcgc gggtcctgtc ctatcctgcg 240
gacacgtgc tcaccgtca ggagcctcgc tttaaccaact cgcgccctt cagccctac 300
ctggacacaa acctcggaca gccagtgatt cagagttttg aacaagtcgg gacaaaactg 360

aatgtgaccg tagaagctgc tcgcacctta gtcagggtga acggcacatt cctcaggctg 420
cgggacgttt ttggcaagga cttgaattat accctttatt actggagagc ttcgagtaca 480
ggaaagaaaa aggccacgac caacactaat gagtttctga ttgacgtgga taaaggagaa 540

aactactgtt tcagtgttca agcagtgatt ccatcccgaa gagttaacca gaagagtccc 600
gaaagtcgca ttgagtgcac cagccaagag aaagctgtgt cccgagaa 648

<210> 4
<211> 216
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<400> 4

Thr Gly Thr Thr Asp Val Ile Val Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

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

Asp Thr Val Leu Thr Ala Gln Glu Pro Pro Phe Thr Asn Ser Pro Pro
85 90 95
Phe Thr Pro Tyr Leu Asp Thr Asn Leu Gly Gln Pro Val Ile Gln Ser
100 105 110
Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Leu Asn Val Thr Val Glu Ala Ala Arg
115 120 125
Thr Leu Val Arg Val Asn Gly Thr Phe Leu Arg Leu Arg Asp Val Phe
130 135 140
Gly Lys Asp Leu Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Arg Ala Ser Ser Thr

145 150 155 160
Gly Lys Lys Lys Ala Thr Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val
165 170 175
Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser
180 185 190
Arg Arg Val Asn Gln Lys Ser Pro Glu Ser Arg Ile Glu Cys Thr Ser

195	200	205
Gln Glu Lys Ala Val Ser Arg Glu		
210	215	