

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2010년 4월 15일 (15.04.2010)



(10) 국제공개번호
WO 2010/041892 A2

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/18 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/005778
- (22) 국제출원일: 2009년 10월 9일 (09.10.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0099782 2008년 10월 10일 (10.10.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울대학교산학협력단 (SNU R & DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울시 관악구 신림동 산 56-1, 151-742 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김성훈 (KIM, Sunghoon)** [KR/KR]; 서울시 강남구 도곡2동 타워펠리스 에프동 1709 호, 135-536 Seoul (KR). **한정민 (HAN, Jung Min)** [KR/KR]; 서울시 관악구 봉천5동 관악드림타운아파트 138 동 601 호, 151-774 Seoul (KR).

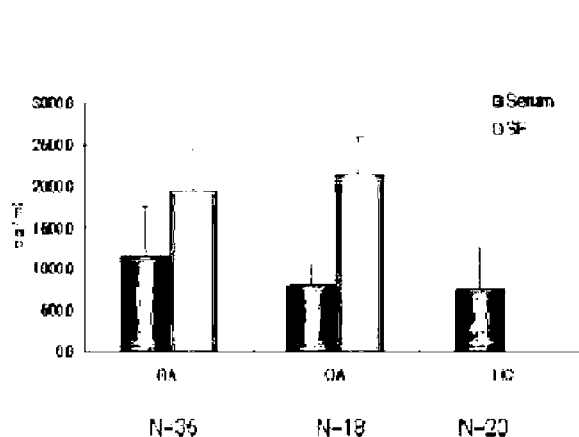
- (74) 대리인: **이희숙 (LEE, Hee Sook)** 등; 서울시 강남구 역삼동 837-11 번지 유니온센타 1404 호 시공국제특허법률사무소, 135-754 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL APPLICATION OF AIMP1 POLYPEPTIDE

(54) 발명의 명칭 : AIMP1 폴리펩티드의 신규한 용도

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a novel application of AIMP1 polypeptide and more specifically to a composition for diagnosis of rheumatoid arthritis including an antibody against AIMP1; a diagnostic kit including same; and a method for diagnosis of rheumatoid arthritis comprising a step wherein a specimen is obtained from an object and a step wherein the AIMP1 polypeptide included in said specimen is detected; and to an antibody against the AIMP1 polypeptide for the diagnosis of rheumatoid arthritis. The present invention provides a composition for diagnosis of rheumatoid arthritis as a novel diagnosis marker for rheumatoid arthritis, a diagnostic kit including the same and a method of rheumatoid arthritis diagnosis comprising a step wherein a specimen is obtained from a subject and a step wherein the AIMP1 polypeptide included in said specimen is detected; and the antibody against the AIMP1 polypeptide for the diagnosis of rheumatoid arthritis. The composition, diagnosis kit, diagnosis method and the antibody against the AIMP1 polypeptide of the present invention enable rheumatoid arthritis to be readily diagnosed from the specimen of a patient, and thus may be used for early diagnosis and confirmation of rheumatoid arthritis.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2010/041892 A2

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 AIMP1 폴리펩티드의 신규한 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 AIMP1에 대한 항체를 포함하는 관절염 진단용 조성물, 이를 포함하는 진단 키트, 개체로부터 검체(specimen)를 획득하는 단계; 및 상기 검체에 포함된 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 진단방법 및 관절염 진단을 위한 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체에 관한 것이다. 본 발명은 관절염에 대한 신규한 진단 마커로서, AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 포함하는 관절염 진단용 조성물, 이를 포함하는 진단 키트, 개체로부터 검체(specimen)를 획득하는 단계; 및 상기 검체에 포함된 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 진단방법 및 관절염 진단을 위한 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 제공한다. 본 발명의 조성물, 진단 키트, 진단 방법 및 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체는 환자의 시료로부터 손쉽게 관절염 여부를 진단할 수 있으므로 관절염의 조기 진단 및 확정을 위하여 사용할 수 있다.

명세서

AIMP1 폴리펩티드의 신규한 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 AIMP1 폴리펩티드의 신규한 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 AIMP1에 대한 항체를 포함하는 관절염 진단용 조성물, 이를 포함하는 진단 키트, 개체로부터 검체(specimen)를 수득하는 단계; 및 상기 검체에 포함된 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 진단방법 및 관절염 진단을 위한 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 관절염이란 관절에 어떤 원인에 의해서든 염증성 변화가 생긴 것을 총괄해서 지칭하는 병명으로 뼈와 뼈 마디를 연결하여 매끈하게 움직이게 하는 연골이 소실되는 것을 말한다. 관절염은 퇴행성관절염 또는 골관절염, 류머티즘 관절염, 대퇴골두 무혈성괴사, 외상성 관절염, 결핵 및 화농성 관절염 등 여러 종류로 나뉜다.
- [3]
- [4] 그 중, 류마티스 관절염은 관절의 라이닝(lining) 또는 활막(synovium)에 발생하는 염증이 주된 특징인 만성질환이다. 류마티스 관절염은 장기간의 관절 손상으로 이어질 수 있어 만성 통증, 기능 상실 및 장애를 초래한다. 류마티스 관절염은 3단계로 진행된다. 첫 번째 단계는 통증, 열, 경직(stiffness), 붉게 됨(redness) 및 관절 주위의 팽창을 초래하는 활막 라이닝(synovial lining)의 팽창(swelling)이다. 두 번째 단계는 세포의 빠른 분열 및 성장, 또는 판누스(pannus)이며, 이는 활막이 두꺼워지게 한다. 세 번째 단계에서 염증이 일어난 세포가 뼈 및 연골을 분해하는 효소를 방출하여, 연관된 관절의 형태 및 정렬의 상실, 더 강한 통증 및 운동의 상실을 초래하게 한다. 류마티스 관절염을 진단하는 것은 프로세스(process)이다. 류마티스 관절염을 가지고 있다고 얘기해 줄 수 있는 확실한 검사법은 존재하지 않는다. 따라서, 류마티스 관절염의 진단을 위한 간편한 방법의 개발이 지속적으로 요구되고 있다.
- [5]
- [6] 또한, 골관절염(퇴행성 관절염)은 관절을 구성하는 여러가지 성분중에서 연골과 그 주위의 뼈에 퇴행성 변화가 나타나서 생기는 관절염으로 주로 체중을 많이 받는 관절, 즉 무릎 관절, 엉덩이 관절 등에 심한 통증이 나타나고 움직이기가 힘들어지며 오랫동안 방치할 경우 관절의 변형까지 초래하는 관절 질환이다. 골관절염은 크게 두 가지 원인이 있는데 관절의 연골이나 뼈는 정상적인데 비해 관절에 과도한 부하가 걸려 관절 조직이 손상을 받거나, 부하는 정상적인데 비해 관절의 연골이나 뼈가 약한 경우가 있다.
- [7]

- [8] 한편, AIMP1(ARS-interacting multi-functional protein 1)은 종래에 p43 단백질로 알려진 것으로서 본 발명자들에 의해 재명명 된 것이다(Sang Gyu Park, et al., *Trends in Biochemical Sciences*, 30:569-574, 2005). 상기 AIMP1은 312개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서, 다중 tRNA 합성효소 복합체(multi-tRNA synthetase complex)에 결합하여(Deutscher, M. P., *Method Enzymol*, 29, 577-583, 1974; Dang C. V. et al., *Int. J. Biochem.* 14, 539-543, 1982; Mirande, M. et al., *EMBO J.* 1, 733-736, 1982; Yang D. C. et al., *Curr. Top Cell. Regul.* 26, 325-335, 1985) 상기 다중-tRNA 합성효소의 촉매적 활성(catalytic activity)을 증진시키는 단백질이다(Park S. G. et al., *J. Biol. Chem.* 274, 16673-16676, 1999). AIMP1은 전립선 암, 면역 및 형질전환 세포를 포함하는 다양한 형태의 세포로부터 분비되며 이의 분비는 TNF α 및 열 쇼크와 같은 다양한 자극에 의해 유도된다(Park S. G. et al., *Am. J. Pathol.*, 166, 387-398, 2005; Barnett G. et al., *Cancer Res.* 60, 2850-2857, 2000). 분비된 AIMP1은 단핵구/마크로파지, 내피세포 및 섬유아세포와 같은 다양한 표적세포에 작용하는 것으로 알려져 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 이에 본 발명자들은 AIMP1 단백질의 생리적 기능에 대해서 연구하던 중 AIMP1 단백질의 혈청(serum) 및 활액(synovial fluid)내 수준이 관절염 환자에서 상승되어 있음을 알아내어, AIMP1 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 관절염 진단용 조성물을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[10]

- [11] 따라서, 본 발명의 목적은 AIMP1 폴리펩티드의 신규한 용도를 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

- [12] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 AIMP1 폴리펩티드를 포함하는 관절염 진단용 조성물을 제공한다.

[13]

- [14] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 관절염 진단 키트를 제공한다.

[15]

- [16] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 관절염 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 항원-항체 반응을 통해 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 방법을 제공한다.

[17]

- [18] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 개체로부터 검체(specimen)를 수득하는 단계; 및 상기 검체에 포함된 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 진단방법을 제공한다.

[19]

[20] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 관절염 진단을 위한 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 제공한다.

[21]

[22] 이하 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명하기로 한다.

[23] 본 발명의 조성물은 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 포함하며, 관절염의 진단의 목적으로 사용될 수 있다.

[24]

[25] 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드는 종래 p43으로 알려진 단백질로, 312개의 아미노산으로 이루어졌으며, 다중 tRNA 합성효소 복합체(multi-tRNA synthetase complex)에 결합하여 이의 촉매적 활성(catalytic activity)을 증진시키는 단백질이다. 상기에서 AIMP1 폴리펩티드는 이에 제한되지는 않으나, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 또한, 상기 AIMP1 폴리펩티드는 Genbank Accession No. NM_004755, BC014051, CR542281에 기재된 것일 수 있다. 또한, 상기 AIMP1 폴리펩티드는 이들의 기능적 동등물을 포함한다.

[26]

[27] 상기 기능적 동등물이란 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 폴리펩티드를 말한다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 것으로, AIMP1 폴리펩티드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서, "실질적으로 동질의 생리활성"이란 다중 tRNA 합성효소 복합체(multi-tRNA synthetase complex)에 결합하여 이의 촉매적 활성(catalytic activity)을 증진시키는 것을 비롯하여 AIMP1 폴리펩티드의 본래의 활성을 보이는 것을 의미한다. 상기 기능적 동등물은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 일부가 부가, 치환 또는 결실의 결과 생성될 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 또한 상기 기능적 동등물에는 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드의 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드의 생리활성에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해 있다. 또한 아미노산의 결실은 바람직하게는 AIMP1 폴리펩티드의 생리활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 아울러 상기 AIMP1 폴리펩티드의 아미노산

서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다. 또한 본 발명의 기능적 동등물의 범위에는 본 발명에 따른 AIMP1 폴리펩티드의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 일부 화학 구조가 변형된 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다.

[28]

[29] 본 명세서에서 서열 상동성 및 동질성은 AIMP1 폴리펩티드의 아미노산 서열과 후보 서열을 정렬하고 갭(gaps)을 도입한 후 각각의 아미노산 서열에 대한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 필요한 경우, 최대 백분율 서열 동질성을 수득하기 위하여 서열 동질성의 부분으로서 보존적 치환은 고려하지 않는다. 또한, AIMP1 폴리펩티드의 아미노산 서열의 N-말단, C-말단 또는 내부 신장, 결손 또는 삽입은 서열 동질성 또는 상동성에 영향을 주는 서열로서 해석되지 않는다. 또한, 상기 서열 동질성은 두 개의 폴리펩티드의 아미노산 서열의 유사한 부분을 비교하기 위해 사용되는 일반적인 표준 방법에 의해 결정할 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램은 두 개의 폴리펩티드를 각각의 아미노산이 최적으로 매칭되도록 정렬한다(하나 또는 두 서열의 전장서열을 따라 또는 하나 또는 두 서열의 예측된 부분을 따라). 상기 프로그램은 디폴트 오픈링 페널티(default opening penalty) 및 디폴트 갭 페널티(default gap penalty)를 제공하며 컴퓨터 프로그램과 함께 연계되어 사용될 수 있는 PAM250(표준 스코어링 매트릭스 Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp 3, 1978)와 같은 스코어링 매트릭스를 제공한다. 예를 들어, 백분율 동질성은 다음과 같이 계산할 수 있다. 일치하는 서열(identical matches)의 총 수에 100을 곱한 다음 대응되는 스패(matched span) 내의 보다 긴 서열의 길이와 두 서열을 정렬하기 위해 보다 긴 서열 내로 도입된 갭(gaps)의 수의 합으로 나눈다.

[30]

[31] 상기에서 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체는 AIMP1 폴리펩티드의 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 항체는 AIMP1 폴리펩티드에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.

[32]

[33] 상기한 바와 같은 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 다클론 항체는 상기 AIMP1 폴리펩티드 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.

[34]

- [35] 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [36]
- [37] 하이브리도마 방법은 항원을 주사한 마우스와 같은 면역학적으로 적합한 숙주 동물로부터의 세포를 이용하고, 나머지 하나의 집단으로는 암 또는 골수종 세포주를 이용한다. 이러한 두 집단의 세포들을 폴리에틸렌글리콜과 같은 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 융합시키고 나서 항체-생산 세포를 표준적인 조직 배양 방법에 의해 증식시킨다. 한계 희석법(limited dilution technique)에 의한 서브클로닝에 의해 균일한 세포 집단을 수득한 후, AIMP1 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마를 표준 기술에 따라 시험관내에서 또는 생체내에서 대량으로 배양한다. 상기한 하이브리도마가 생산하는 단클론 항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 고순도로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 파지 항체 라이브러리 방법은 세포내에 존재하는, 다양한 항체 유전자(Single chain fragment variable, scFv 형태)를 획득하여 이를 파아지의 표면에 융합 단백질 형태로 발현함으로써 항체 라이브러리를 시험관 내에서 제작하고, 이 라이브러리로부터 폐암 단백질과 결합하는 모노클로날 항체를 분리, 제작하는 방법이다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리한다.
- [38]
- [39] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [40]
- [41] 상기에서 항원으로 사용되는 AIMP1 폴리펩티드는 천연에서 추출, 분리하거나 유전공학적 방법에 의해 작제될 수 있다. 예를 들면, 통상적인 방법에 따라 상기 AIMP1 폴리펩티드 또는 이의 기능적 동등물을 암호화하는 핵산을 작제한다. 상기 핵산은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(Biosearch 또는 Applied Biosystems 사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 작제된 핵산은 이에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 핵산의 발현을 조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다.

생성된 형질전환체를 상기 핵산이 발현되기에 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 핵산에 의해 발현된, 실질적으로 순수한 폴리펩티드를 회수한다. 상기 회수는 당업계에 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 "실질적으로 순수한 폴리펩티드(substantially pure polypeptide)"라 함은 본 발명에 따른 폴리펩티드가 숙주세포로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다. 본 발명의 폴리펩티드 합성을 위한 유전공학적 방법은 다음의 문헌을 참고할 수 있다: Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning; A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Editions *Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology*, Guthrie & Fink(eds.), Academic Press, San Diego, Calif, 1991; 및 Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:12073-12080, 1990.

[42]

[43] 또한, 상기 AIMP1 폴리펩티드는 당업계에 공지된 화학적 합성(Creighton, *Proteins; Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman and Co., NY, 1983)에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은 아니지만 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다(*Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, Williams *et al.*, Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; *A Practical Approach*, Atherton & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989).

[44]

[45] 본 발명의 관절염은 관절에 염증성 변화가 생겨 발생하는 질환으로, 예를 들어, 퇴행성관절염 또는 골관절염, 류머티즘 관절염, 대퇴골두 무혈성괴사, 외상성 관절염, 결핵 및 화농성 관절염일 수 있으며, 바람직하게는 류마티스 관절염 또는 골관절염(퇴행성 관절염)일 수 있다.

[46]

[47] 한편, 본 발명은 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 포함하는 관절염 진단 키트를 제공한다.

[48]

[49] 본 발명의 키트는 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당업계에 공지된 도구 및/또는 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[50]

[51] 상기에서 면역학적 분석은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 면역세포화학 및 면역조직화학, 방사선 면역 분석법(radioimmunoassays), 효소결합면역법(ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent assay), 면역 블롯(immunoblotting), 파아르 분석법(Farr assay),

면역침강, 라텍스 응집, 적혈구 응집, 비탁계법, 면역확산법, 카운터-전류 전기영동법, 단일 라디칼 면역확산법, 단백질 칩 및 면역형광법이 있다.

[52]

[53] 면역학적 분석에 사용되는 도구 및/또는 시약으로는 적합한 담체 또는 지지체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.

[54]

[55] 본 발명의 진단용 키트에 포함되는 AIMP1 폴리펩티드에 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 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 텍스트란, 세파덱스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 유리, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 컵, 플랫 팩(flat packs) 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.

[56]

[57] 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, 펄록시다아제, 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, 루시페라아제 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.

[58]

[59] 또한, 본 발명의 관절염 진단 키트는 종래에 알려진 관절염 진단 마커를 검출하기 위한 구성을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 종래에 알려진 류마티스 관절염 진단 마커는 이에 한정되지는 않으나, 류마티스 인자(rheumatoid factor), 싸이클릭 시트룰리네이티드 펩타이드(cyclic citrullinated peptide), 시트룰린 항체(citrulline antibody), 안티뉴클리어 항체(antinuclear antibody), C-리액티브 프로테인(C-reactive protein)(Critical reviews in clinical laboratory sciences, vol.44, pp339-363 (2007))일 수 있다.

[60]

[61] 또한, 본 발명은 관절염 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 항원-항체 반응을 통해 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 방법을 제공한다. 이 때, 시료 및 항원-항체 반응에 대해서는 상기에서 기재한 바와 같다.

[62]

[63] 한편, 본 발명은 개체로부터 검체(specimen)를 수득하는 단계; 및 상기 검체에 포함된 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 진단방법을 제공한다.

[64]

[65] 본 발명에서 사용된 용어 "개체(subject)"란 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물을 의미한다. 상기 개체는 진단이 필요한 환자(patient)일 수 있다.

[66]

[67] 본 발명에서 사용된 용어 "검체(또는 시료)"는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 시료, 생검 표본, 조직 배양과 같은 고형 조직 시료 또는 이로부터 유래된 세포가 포함된다. 보다 구체적으로 예를 들면 이에 한정되지는 않으나 조직, 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 노, 젖, 복수액, 활액, 복막액 등일 수 있으며, 바람직하게는 혈청 또는 활액일 수 있다. 상기 시료는 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터 수득될 수 있다. 상기 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 시료로부터 단백질을 분리하여 검출에 사용할 수 있다.

[68]

[69] 본 발명에서 사용된 용어 검출은 표적인 AIMP1 폴리펩티드, 그의 서브유닛의 존재 또는 부재를 분석, 영상화, 확인, 확립하는 것을 말한다.

[70]

[71] 한편, 본 발명은 관절염 진단을 위한 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 제공한다. 아울러, 관절염 진단 제제의 제조를 위한 AIMP1 폴리펩티드의 용도를 제공한다.

[72]

[73] 참고로, 본 발명에서 언급한 뉴클레오티드 및 단백질 작업에는 다음의 문헌을 참조할 수 있다(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold

Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)).

유리한 효과

- [74] 따라서, 본 발명은 관절염에 대한 신규한 진단 마커로서, AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 포함하는 관절염 진단용 조성물, 이를 포함하는 진단 키트, 개체로부터 검체(specimen)를 획득하는 단계; 및 상기 검체에 포함된 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 진단방법 및 관절염 진단을 위한 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 제공한다. 본 발명의 조성물, 진단 키트, 진단 방법 및 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체는 환자의 시료로부터 손쉽게 관절염 여부를 진단할 수 있으므로 관절염의 조기 진단 및 확정을 위하여 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [75] 도 1은 정상군(HC, n=20), 류마티스 관절염 환자군(RA, n=35) 및 골관절염(OA, n=18) 환자군의 활액에서 AIMP1의 양을 ELISA로 확인한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [76] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
[77] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[78]

[79] <실시예 1>

[80] 관절염 환자의 시료에서 AIMP1 수준 확인

[81]

- [82] 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA)으로 진단된 환자 35명, 골관절염(osteoarthritis, OA)로 진단된 환자 18명 및 정상인 20명으로부터 채취한 활액(synovial fluid, SF) 및 혈청(serum)을 이용하여 AIMP1의 수준을 다음과 같이 측정하였다. 이 때, 활액은 상기 환자 및 정상인을 대상으로 연골 조직에서 주사기를 이용하여 환자의 연골조직에서 주사기를 이용하여 관절 천자(arthrocentesis) 또는 관절 흡입법(joint aspiration)을 통해서 채취하였다.

[83]

- [84] 상기에서 채취한 활액 및 혈청에 존재하는 AIMP1의 양을 상용의 ELISA 키트(ELISA kit for human AIMP1 (Cat. No. IMG-100), Imagene, Co. Ltd)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 다음과 같이 측정하였다. 샘플 10 μ l를 희석액 90 μ l와 함께 96웰 ELISA 플레이트에 넣어 2시간 반응을 시키고 나서 세척 버퍼(washing buffer)로 4번 세척하였다. 이후 퍼옥시다아제(peroxidase)가 부착(conjugation)되어 있는 항-AIMP1 항체(anti-AIMP1 antibody) 1 μ l 를 1ml

희석액에 넣은 용액 100 μ l씩을 96 웰에 넣어 1시간 반응시켰다. 세척 버퍼로 4번 세척 후 기질(substrate) 용액을 각각 웰에 100 μ l 씩 넣고 30분간 반응을 시키고 중지 용액(stop solution)을 100 μ l씩 첨가하였다. 이를 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 AIMP1의 양을 측정하였다.

[85]

[86] 그 결과, 도 1에서와 같이, 정상인(HC)의 활액에서는 AIMP1이 검출되지 않았으나, 류마티스 관절염(RA) 또는 골관절염(OA) 환자에서는 다량으로 검출되어 AIMP1이 류마티스 관절염 또는 골관절염에 대한 마커로 활용될 수 있음을 알 수 있었다. 아울러, 류마티스 관절염 환자의 혈청에서는 정상인 보다 AIMP1이 보다 많이 검출되었으며, 골관절염 환자의 경우 크게 차이나지는 않았다.

산업상 이용가능성

[87] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 관절염에 대한 신규한 진단 마커로서, AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 포함하는 관절염 진단용 조성물, 이를 포함하는 진단 키트, 개체로부터 검체(specimen)를 수득하는 단계; 및 상기 검체에 포함된 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 진단방법 및 관절염 진단을 위한 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 제공한다. 본 발명의 조성물, 진단 키트, 진단 방법 및 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체는 환자의 시료로부터 손쉽게 관절염 여부를 진단할 수 있으므로 관절염의 조기 진단 및 확정을 위하여 사용할 수 있다.

청구범위

- [1] AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체를 유효성분으로 포함하는 관절염(arthritis) 진단용 조성물.
- [2] 제1항에 있어서, 상기 AIMP1 폴리펩티드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.
- [3] 제1항에 있어서, 상기 관절염은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) 또는 골관절염(osteoarthritis)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [4] 제1항의 조성물을 포함하는 관절염 진단 키트.
- [5] 관절염 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 항원-항체 반응을 통해 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 방법.
- [6] 개체로부터 검체(specimen)를 수득하는 단계; 및 상기 검체에 포함된 AIMP1 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 관절염 진단방법.
- [7] 관절염 진단을 위한 AIMP1 폴리펩티드에 대한 항체.
- [8] 관절염 진단 제제의 제조를 위한 AIMP1 폴리펩티드의 용도.

[Fig. 1]

