(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0051388
(43) 공개일자 2025년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/00 (2006.01) *C07K 16/44* (2006.01)
G01N 33/563 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/001 (2013.01)
C07K 16/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0134436
(22) 출원일자 2023년10월10일
심사청구일자 2023년10월10일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
황철상
서울특별시 관악구 청룡길 77, 203동 102호
김다솜
서울특별시 성북구 개운사1길 22
박규상
강원특별자치도 원주시 판부면 시청로 264, 103동 703호
(74) 대리인
위병갑

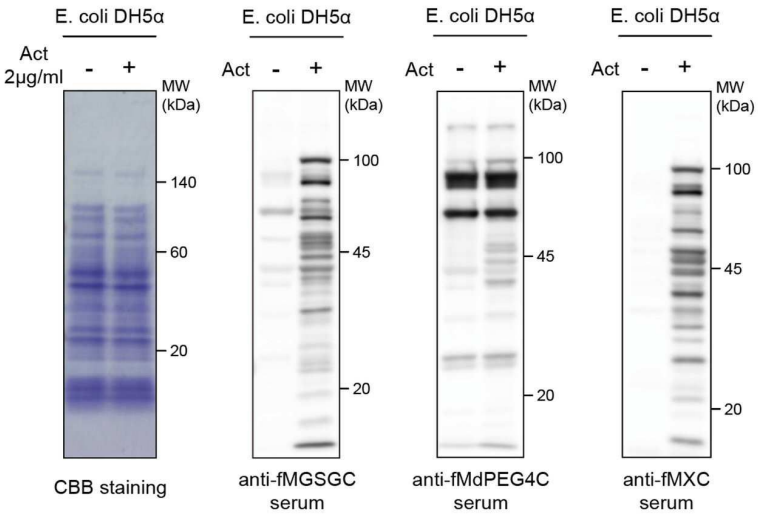
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **포밀메티오닌 항체 제작을 위한 항원 펩타이드**

(57) 요 약

본 발명은 포밀메티오닌 항체 제작을 위한 신규한 혼합 펩타이드 항원에 관한 것으로, 본 발명의 항원 펩타이드를 이용하여 제작한 포밀메티오닌 특이적 항체는 포밀메티오닌을 포함하는 펩타이드 또는 단백질에 보편적으로 결합하여 포밀메티오닌을 검출할 수 있으며, 종래의 단일 항원 펩타이드를 이용한 항체에 비해 민감도가 높은 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/563 (2019.05)
G01N 33/6812 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711192901
과제번호 2020R1A3B2078127
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 N-말단 암호 인식 단백질분해신호 경로 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711057538
과제번호 2017R1A5A2015369
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 미토콘드리아 스트레스 자기방어 연구센터
기 여 율 1/2
과제수행기관명 연세대학교 원주산학협력단
연구기간 2017.06.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는, 포밀메티오닌(formylmethionine, fMet, fM)에 특이적인 항체 제조용 항원 펩타이드:

fM-X-C (일반식 1, 서열번호 1)

상기 식에서,

fM는 포밀메티오닌이며; 및

X는 G(Gly), A(Ala), V(Val), L(Leu), I(Ile), T(Thr), S(Ser), C(Cys), M(Met), D(Asp), N(Asn), E(Glu), Q(Gln), K(Lys), R(Arg), H(His), F(Phe), Y(Tyr), W(Trp) 또는 P(Pro)이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, X는 G(Gly), A(Ala), V(Val), L(Leu), I(Ile), T(Thr), S(Ser), C(Cys), M(Met), D(Asp), N(Asn), E(Glu), Q(Gln), K(Lys), R(Arg), H(His), F(Phe), Y(Tyr), W(Trp) 및 P(Pro)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 항원 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, fMGC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMAC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMVC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMLC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMIC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMTC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMSC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMCC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMMC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMDC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMNC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMEC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMQC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMKC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMRC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMHC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMFC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMYC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMWC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 fMPC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 항원 펩타이드.

청구항 4

제 1항에 있어서, 운반 단백질을 추가로 포함하는, 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 항원 펩타이드.

청구항 5

제 4항에 있어서, 운반 단백질이 링커를 통해 결합된, 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 항원 펩타이드.

청구항 6

제 5항에 있어서, 링커는 sulfo-SMCC(sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)인, 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 항원 펩타이드.

청구항 7

제 1항의 항원 펩타이드를 포함하는, 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, fMGC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMAC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMVC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMLC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMIC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMTC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMSC의 아미노산 서열을 포함하는

펩타이드, fMCC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMMC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMDC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMNC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMEC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMQC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMKC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMRC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMHC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMFC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMYC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMWC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 및 fMPC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 조성물.

청구항 9

제 1항의 항원 펩타이드를 포함하는, 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 키트.

청구항 10

a) 제 1항의 항원 펩타이드 또는 제 7항의 조성물을 인간을 제외한 숙주에 복수회 접종하여 면역화 반응을 유도하는 단계; 및

b) 숙주의 혈액에서 혈청을 수득하는 단계를 포함하는, 포밀메티오닌에 특이적인 항체의 제조방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 혈청에서 포밀메티오닌 항체를 정제하는 단계를 추가로 포함하는, 포밀메티오닌에 특이적인 항체의 제조방법.

청구항 12

제 10항의 방법으로 제조된 포밀메티오닌에 특이적인 항체.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 항체는 폴리클로날(polyclonal) 항체인, 포밀메티오닌에 특이적인 항체.

청구항 14

제 12항에 있어서, 상기 항체는 포밀메티오닌을 포함하는 펩타이드 또는 단백질에 특이적으로 결합하는, 포밀메티오닌에 특이적인 항체.

청구항 15

제 12항의 항체를 포함하는 포밀메티오닌 검출용 조성물.

청구항 16

제 12항의 항체를 포함하는 포밀메티오닌 검출용 키트.

청구항 17

제 12항의 항체를 시료에 처리하여 항원-항체 반응을 유도하는 단계를 포함하는 포밀메티오닌을 포함하는 펩타이드 또는 단백질을 검출하는 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 첫 번째 아미노산이 포밀메티오닌인 펩타이드 또는 단백질을 검출하는, 포밀메티오닌을 포함하는 펩타이드 또는 단백질을 검출하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 포밀메티오닌 항체 제작을 위한 신규한 혼합 펩타이드 항원에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 메티오닌은 대부분의 생체 시스템에서 펩타이드 사슬(예로서 단백질 합성)을 성장시키기 위한 일반적인 출발 아미노산 잔기이다. 개시 아미노산인 메티오닌의 가장 현저한 두 가지 변형은 메신저 RNA(mRNA) 번역의 시작 이전에 메티오닌 분자에 N-포밀기를 첨가하는 것과 그 후에 연속되는 미성숙 펩타이드의 아미노(N-) 말단 메티오닌으로부터 N-포밀기의 제거를 포함한다. N-말단 포밀화는 단백질 변형의 한 종류로서, 주로 박테리아, 미토콘드리아, 엽록체에서 관찰되며, 특정 스트레스 상황에서는 진핵세포의 세포질에서도 관찰된다고 알려져 있다. 세포내 단백질의 포밀화에 주요한 역할을 하는 효소는 포밀메티오닐-트렌스퍼라제이며, 이 효소는 메티오닐-tRNA에 포밀기를 부착하여 포밀메티오닐-tRNA를 만들어 낸다. 이후 포밀메티오닐-tRNA가 단백질 합성 개시에 쓰이게 되면, N-말단에 포밀메티오닌을 포함하는 단백질이 합성된다. N-포밀기는 펩타이드 디포밀라제에 의해서 제거된다. 펩타이드 디포밀라제(PDF)는 기질 특이성 반응에서 대부분의 미성숙 포밀메티오닌-펩타이드로부터 포밀기를 분리시킨다. 그러나 PDF의 일반적인 작용에는 예외가 있다. 예를 들어, 일부 대장균 단백질들은 일부가 포밀화되어 존재한다 (하우스차일-로갓, P., 1968 ; 마라스코, W.A. 등, 1984 ; 및 밀리건, D.L. 및 코쉬랜드, 주니어.,D.E.,1990).

[0003] 한편, 단백질의 N-말단 포밀화를 특이적으로 검출하기 위한 항체들을 만드는 방법은 오래전부터 제시되어 왔다. 예시로 포밀-MLF라는 펩타이드를 인식하는 항체를 만들기 위해서는, 포밀-MLF 유사 펩타이드를 운반 단백질에 부착하고 이를 항원으로 하여 항체를 만드는 방법이 사용되어 왔다. 그러나, 이와 같이 단일 펩타이드 항원을 이용해 제작할 경우, 펩타이드 항원과 비슷한 구조 또는 서열을 포함하는 펩타이드/단백질만을 강하게 인식하고 펩타이드 항원과 다른 구조 또는 서열을 가지는 펩타이드/단백질은 약하게 잘 인식하지 못한다는 단점을 가지고 있다. 예를 들어, 최근에 fMGSGC를 항원으로 사용하여 제작한 다클론 항체의 경우, fMG로 시작하는 펩타이드는 강하게 인식하나 그 외의 fM로 시작하는 펩타이드는 상대적으로 약하게 인식하여 항체 자체의 민감도를 낮추는 원인으로도 작용한다. 따라서 기존의 방법을 사용할 경우, 각각의 포밀 펩타이드를 인식하는 항체를 별도로 제작해야 하며 단백질의 서열의 다양성을 고려하게 되면 비효율성이 두드러지게 된다.

[0004] 따라서, 종래 기술의 한계점을 극복하고 펩타이드/단백질을 보편적으로 인식할 수 있는 항체 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 포밀메티오닌(formylmethionine, fMet, fM)에 특이적인 항체 제조용 항원 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 포밀메티오닌에 특이적인 항체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 포밀메티오닌에 특이적인 항체를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 목적은 포밀메티오닌 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 목적은 포밀메티오닌 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 아울러, 본 발명의 목적은 포밀메티오닌을 포함하는 펩타이드 또는 단백질을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 항원 펩타이드를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 항원 펩타이드를 포함하는 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 항원 펩타이드를 포함하는 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 키트를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 포밀메티오닌에 특이적인 항체의 제조방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 포밀메티오닌에 특이적인 항체를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 포밀메티오닌 검출용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 포밀메티오닌 검출용 키트를 제공한다.

[0020] 아울러, 본 발명은 포밀메티오닌을 포함하는 펩타이드 또는 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 항원 펩타이드를 이용하여 제작한 포밀메티오닌 특이적 항체는 포밀메티오닌을 포함하는 펩타이드 또는 단백질에 보편적으로 결합하여 포밀메티오닌을 검출할 수 있으며, 종래의 단일 항원 펩타이드를 이용한 항체에 비해 민감도가 높은 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 대장균에서 본 발명의 포밀메티오닌 항체의 포밀메티오닌에 대한 항원 결합능을 확인한 도이다:

Act: 악티노닌;

CBB staining: 쿠마시 염색 이미지;

anti-fMGSGC serum: 종래의 fMGSGC 항원을 이용하여 제작한 항체를 포함하는 혈청;

anti-fMdPEG4C serum: fMdPEG4C 항원을 이용하여 제작한 항체를 포함하는 혈청; 및

anti-fMXC serum: 혼합 항원 fMXC을 이용하여 제작한 항체를 포함하는 혈청.

도 2는 포유동물 세포에서 본 발명의 포밀메티오닌 항체의 포밀메티오닌에 대한 항원 결합능을 확인한 도이다:

Act: 악티노닌;

anti-fMGSGC serum: 종래의 fMGSGC 항원을 이용하여 제작한 항체를 포함하는 혈청;

anti-fMdPEG4C serum: fMdPEG4C 항원을 이용하여 제작한 항체를 포함하는 혈청; 및

anti-fMXC serum: 혼합 항원 fMXC을 이용하여 제작한 항체를 포함하는 혈청.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0024] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.

[0025] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α-아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:

[0026] 알라닌: Ala, A; 아르기닌: Arg, R; 아스파라긴: Asn, N; 아스파르트산: Asp, D; 시스테인: Cys, C; 글루탐산: Glu, E; 글루타민: Gln, Q; 글리신: Gly, G;히스티딘: His, H; 이소류신: IIe, I; 류신: Leu, L; 리신: Lys, K; 메티오닌: Met, M; 페닐알라닌: Phe, F; 프롤린: Pro, P; 세린: Ser, S; 트레오닌: Thr, T; 트립토판: Trp, W; 티로신: Tyr, Y; 및 발린: Val, V.

[0028] 일 측면에서, 본 발명은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는, 포밀메티오닌(formylmethionine, fMet, fM)에 특이적인 항체 제조용 항원 펩타이드에 관한 것이다:

[0029] fM-X-C (일반식 1, 서열번호 1)

[0030] 상기 식에서,

[0031] fM는 포밀메티오닌이며; 및

[0032] X는 G(Gly), A(Ala), V(Val), L(Leu), I(Ile), T(Thr), S(Ser), C(Cys), M(Met), D(Asp), N(Asn), E(Glu), Q(Gln), K(Lys), R(Arg), H(His), F(Phe), Y(Tyr), W(Trp) 또는 P(Pro)이다.

[0033] 일 구현예에서, 상기 X는 G(Gly), A(Ala), V(Val), L(Leu), I(Ile), T(Thr), S(Ser), C(Cys), M(Met), D(Asp), N(Asn), E(Glu), Q(Gln), K(Lys), R(Arg), H(His), F(Phe), Y(Tyr), W(Trp) 및 P(Pro)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 본 발명의 항원 펩타이드는 fMGC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMAC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMVC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMLC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMIC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMTC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMSC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMCC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMMC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMDC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMNC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMEC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMQC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMKC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMRC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMHC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMFC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMYC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMWC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 fMPC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함할 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, 본 발명의 항원 펩타이드는 fMGC (서열번호 2), fMAC (서열번호 3), fMVC (서열번호 4), fMLC (서열번호 5), fMIC (서열번호 6), fMTC (서열번호 7), fMSC (서열번호 8), fMCC (서열번호 9), fMMC (서열번호 10), fMDC (서열번호 11), fMNC (서열번호 12), fMEC (서열번호 13), fMQC (서열번호 14), fMKC (서열번호 15), fMRC (서열번호 16), fMHC (서열번호 17), fMFC (서열번호 18), fMYC (서열번호 19), fMWC (서열번호 20) 및 fMPC (서열번호 21)를 포함하는 혼합 펩타이드일 수 있다.

[0036] 일 구현예에서, 상기 항원 펩타이드는 운반 단백질을 추가로 포함할 수 있으며, 운반 단백질은 키홀-림펫 헤모시아닌(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH), BSA(bovine serum albumin) 또는 OVA(ovalbumin)일 수 있다.

[0037] 일 구현예에서, 상기 항원 펩타이드에 운반 단백질을 링커를 통해 결합시킬 수 있으며, 상기 링커는 화학적 링커일 수 있고, sulfo-SMCC(sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)일 수 있다.

[0038] 일 구현예에서, 상기 운반 단백질은 항원 펩타이드의 시스테인에 운반 단백질이 결합/부착될 수 있다.

[0039] 일 구현예에서, 상기 운반 단백질은 항원 펩타이드의 C-말단에 결합/부착될 수 있으며, C-말단의 카르복실기(carboxyl group)에 결합/부착될 수 있다.

[0040] 일 구현예에서, 상기 항원 펩타이드의 시스테인(Cys)기와 운반 단백질인 키홀-림펫 헤모시아닌의 리신(Lys)기를 Sulfo-SMCC를 이용하여 결합/연결할 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 포밀화는 화합물 내에 포밀기(CHO-)를 도입하는 작용을 의미한다. 본 발명에서 "포밀화"는 아미노산의 α-아미노기의 포밀화를 의미한다.

[0042] 본 발명에 있어서, "펩타이드(peptide)"란 아미노산의 중합체로서, 보통 소수의 아미노산이 연결된 형태를 펩타이드라 하며, 많은 아미노산이 연결되면 단백질이라 부른다. 펩타이드 또는 단백질 구조에서 아미노산 간의 연결은 아미드(amide) 결합 또는 펩타이드 결합으로 이루어져 있다. 펩타이드 결합이란 카르복실기 (-COOH)와 아미노기(-NH_2) 사이에 물(H_2O)이 빠져나가고 -CO-NH- 형태를 이루는 결합을 지칭한다. 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술 (solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수 있으며 (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)), 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다.

[0043] 본 발명에서 '특정 서열번호로 구성되는 펩타이드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

[0044] 본 발명에서, 펩타이드 서열의 변형은 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion)

및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형된 것일 수 있다. 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노헥산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다. 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.

[0045] 또한, 본 발명의 항원 펩타이드의 범위에는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 기능적 동등물 더욱 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 기능적 동등물 및 그들의 염을 포함한다.

[0046] 상기 기능적 동등물이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과 서열번호 1의 펩타이드와 적어도 75% 이상의, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 것으로 예를 들면, 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 것을 포함하며, 서열번호 1의 펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 본 명세서에서 서열 상동성 및 동질성은 서열번호 1의 아미노산 서열과 후보 서열을 정렬하고 갭(gaps)을 도입한 후 서열번호 1의 아미노산 서열에 대한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 필요한 경우, 최대 백분율 서열 동질성을 수득하기 위하여 서열 동질성의 부분으로서 보존적 치환은 고려하지 않는다. 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단, C-말단 또는 내부 신장, 결손 또는 삽입은 서열 동질성 또는 상동성에 영향을 주는 서열로서 해석되지 않는다.

[0047] 또한 상기 서열 동질성은 두 개의 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 유사한 부분을 비교하기 위해 사용되는 일반적인 표준 방법에 의해 결정할 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램은 두개의 폴리펩타이드를 각각의 아미노산이 최적으로 매칭(matching)되도록 정렬한다(하나 또는 두 서열의 전장서열을 따라 또는 하나 또는 두 서열의 예측된 부분을 따라). 상기 프로그램은 디폴트 오프닝 패널티(default opening penalty) 및 디폴트 갭 페널티(default gap penalty)를 제공하며 컴퓨터 프로그램과 함께 연계되어 사용될 수 있는 PAM250(표준 스코어링 매트릭스)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 스팬(matched span) 내의 보다 긴 서열의 길이와 두 서열을 정렬하기 위해 보다 긴 서열내로 도입된 갭(gaps)의 수의 합으로 나눈다.

[0048] 본 발명의 기능적 동등물의 범위에는 유도체(derivative) 및 유사물(mimetics/peptidomimetics)를 포함하며, "유도체(derivative)"란, 서열번호 1의 펩타이드의 기본골격을 유지하면서 펩타이드의 일부 화학 구조가 변형된 유사한 펩타이드를 총칭하며, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것, 하나 이상의 아미노산이 추가된 것, 하나 이상의 아미노산이 결실된 것, 또는 펩타이드의 반감기를 증가시키는 화합물(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 등)을 융합시키는 것일 수 있다. 본 발명에 있어서 상기 유도체는 본 발명에 따른 펩타이드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등이 유지되거나, 증가하거나, 또는 감소될 수 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, "항체"는 혈청의 기능 성분을 나타내며 종종 분자의 집합(항체들 또는 면역글로불린) 또는 하나의 분자(항체 분자 또는 면역글로불린 분자)로서 언급된다. 항체 분자는 특정 항원성 결정인자(항원 또는 항원성 에피토프)에 결합되거나 이와 반응하여 차례로 면역학적 이펙터 메커니즘을 유도할 수 있다. 개개 항체 분자는 일반적으로 일특이적인 것으로 간주되며, 항체 분자의 조성물은 모노클로날(즉, 동일한 항체 분자로 구성됨) 또는 폴리클로날(즉, 동일한 항원 또는 별개의 다른 항원 상에서 동일하거나 상이한 에피토프와 반응하는 상이한 항체 분자로 구성됨)일 수 있다. 각 항체 분자는 이것이 이의 상응하는 항원과 특이적으로 결합될 수 있게 하는 독특한 구조를 지니며, 모든 천연 항체 분자는 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄의 동일한 전체 기본 구조를 지닌다. 항체는 총괄하여 면역글로불린으로서도 공지되어 있다. 본 발명에서 사용된 항체 또는 항체들이라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며 본래의 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 완전한 사람 및 단쇄 항체뿐만 아니라 항체의 결합 단편, 예컨대 Fab, Fv 단편 또는 scFv 단편, 및 다합체 형태, 예컨대 이합 IgA 분자 또는 5가 IgM을 포함한다.

[0050] 본 발명에 있어서, "에피토프"는 동물, 바람직하게는 포유동물, 및 가장 바람직하게는 사람에서 항원성 또는 면역원성 활성을 지니는 더 큰 분자의 부분 또는 더 큰 분자의 일부(예컨대, 항원 또는 항원성 부위)를 기술하는

데 일반적으로 사용된다. 면역원성 활성을 지니는 에피토프는 동물에서 항체 반응을 일으키는 더 큰 분자의 부분이다. 항원성 활성을 지니는 에피토프는 당 분야에 널리 공지된 임의의 방법, 예를 들어 본원에 기술된 면역검정에 의해 결정되는 항체가 면역특이적으로 결합되는 더 큰 분자의 부분이다. 항원성 에피토프가 반드시 면역원성일 필요는 없다. 항원은 항체 또는 항체 단편이 면역특이적으로 결합되는 물질, 예컨대 독신, 바이러스, 세균, 단백질 또는 DNA이다. 항원 또는 항원성 부위는 이들이 매우 소형이 아니라면 종종 하나를 초과하는 에피토프를 지니며, 종종 면역 반응을 자극할 수 있다. 동일한 항원상의 상이한 에피토프에 결합하는 항체는 에피토프의 위치에 따라서 이들이 결합되는 항원의 활성에 대해 다양한 효과를 지닐 수 있다. 항원의 활성 부위에서 에피토프에 결합되는 항체는 항원의 기능을 완전히 차단하는 한편, 상이한 에피토프에 결합되는 또 다른 항체는 다만 항원의 활성에 전혀 또는 거의 영향을 미칠 수 없다.

[0051] 본 발명에 있어서, "폴리클로날(다클론) 항체"는 동일하거나 상이한 항원상에서 수 개의 상이한 특이적 항원성 결정인자/에피토프에 결합되거나 이와 반응할 수 있는 상이한(다양한) 항체 분자의 조성물을 나타내며, 조성물 중 개개의 각 항체는 특정 에피토프와 반응할 수 있다. 일반적으로, 폴리클로날 항체의 가변성은 폴리클로날 항체의 소위 가변 영역, 특히 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역에 있다. 본 발명에서, 폴리클로날 항체는 한 포트(pot)에서 생성될 수 있거나, 상이한 폴리클로날 항체의 혼합물일 수 있다. 모노클로날 항체의 혼합물은 개개의 희분에서 생성되며 반드시 동일한 개체 또는 세포주로부터 올 필요가 없어서 예컨대 번역 후 개질 차이를 초래할 것이므로, 그 자체로 폴리클로날 항체로서 고려되지 않는다. 그러나, 모노클로날 항체의 혼합물이 본 발명의 폴리클로날 항체처럼 동일한 항원/에피토프 덮힘(epitope coverage)을 제공한다면, 폴리클로날 항체와 동등한 것으로 고려될 것이다.

[0052] 일 측면에서, 본 발명은 fMGC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMAC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMVC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMLC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMIC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMTC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMSC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMCC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMMC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMDC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMNC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMEC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMQC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMKC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMRC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMHC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMFC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMYC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMWC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 및 fMPC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드로 이루어진 항원 펩타이드 혼합물에 관한 것이다.

[0053] 일 구현예에서, 상기 항원 펩타이드 혼합물 중의 각각의 펩타이드는 단리된(예를 들면, 합성 및/또는 정제된) 펩타이드일 수 있다.

[0054] 본 발명에서, "펩타이드 혼합물"의 펩타이드는 항원으로서 기능하는 펩타이드를 구성하고, 길이는 아미노산 3개인 펩타이드를 의미한다. 따라서, "펩타이드 혼합물"은 상기 펩타이드의 혼합물을 의미한다.

[0055] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항원 펩타이드 또는 상기 항원 펩타이드 혼합물을 포함하는 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 조성물에 관한 것이다.

[0056] 일 구현예에서, 상기 조성물은 fMGC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMAC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMVC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMLC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMIC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMTC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMSC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMCC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMMC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMDC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMNC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMEC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMQC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMKC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMRC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMHC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMFC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMYC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, fMWC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 및 fMPC의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는 항원 펩타이드 혼합물을 포함할 수 있다.

[0057] 일 구현예에서, 상기 조성물은 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 시약 조성물일 수 있다.

[0058] 일 구현예에서, 상기 포밀메티오닌에 특이적인 항체는 펩타이드 또는 단백질의 두 번째 아미노산 종류와 무관하게 첫 번째 포밀메티오닌을 검출할 수 있다.

[0059] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항원 펩타이드 상기 항원 펩타이드 혼합물 또는 상기 조성물을 포함하는 포밀메티오닌에 특이적인 항체 제조용 키트에 관한 것이다.

[0060] 본 발명에 따른 항체 제조용 조성물 및 키트는 상기 항원 펩타이드를 유지 및 보존하기 위한 공지의 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0061] 일 구현예에서, 상기 항체 제조용 조성물 및 키트는 숙주 내에서 면역반응을 유도 및 촉진시키기 위한 공지의 제제를 더 포함할 수 있다.

[0062] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항원 펩타이드 또는 상기 항원 펩타이드 혼합물을 인간을 제외한 숙주에 복수회 접종하여 면역화 반응을 유도하는 단계; 및 숙주의 혈액에서 혈청을 수득하는 단계를 포함하는, 포밀메티오닌에 특이적인 항체의 제조방법에 관한 것이다.

[0063] 일 구현예에서, 상기 숙주는 인간을 제외한 포유동물일 수 있으며, 인간을 제외한 포유동물은 마우스, 토끼, 래트, 기니아피그, 말, 개, 양, 염소, 고양이, 닭, 오리, 원숭이 또는 영장류일 수 있고, 토끼인 것이 더욱 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0064] 일 구현예에서, 상기 혈청에 포밀메티오닌 항체를 포함할 수 있다.

[0065] 일 구현예에서, 상기 혈청에서 포밀메티오닌 항체를 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0066] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 방법으로 제조된 포밀메티오닌에 특이적인 항체에 관한 것이다.

[0067] 일 구현예에서, 상기 항체는 폴리클로날(polyclonal) 항체일 수 있다.

[0068] 일 구현예에서, 상기 항체는 포밀메티오닌을 포함하는 펩타이드 또는 단백질에 특이적으로 결합할 수 있으며, 상기 포밀메티오닌은 펩타이드 또는 단백질의 첫 번째 아미노산일 수 있으며, 본 발명의 포밀메티오닌에 특이적인 항체는 펩타이드 또는 단백질의 두 번째 아미노산 종류와 무관하게 첫 번째 포밀메티오닌을 검출할 수 있다.

[0069] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 포함하는 포밀메티오닌 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0070] 일 구현예에서, 상기 조성물은 시약 조성물일 수 있다.

[0071] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 포함하는 포밀메티오닌 검출용 키트에 관한 것이다.

[0072] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 시료에 처리하여 항원-항체 반응을 유도하는 단계를 포함하는 포밀메티오닌을 포함하는 펩타이드 또는 단백질을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0073] 일 구현예에서, 상기 펩타이드 또는 단백질은 첫 번째 아미노산이 포밀메티오닌인 펩타이드 또는 단백질일 수 있다.

[0075] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0077] **실시예 1. fMXC 혼합 펩타이드 항원 제작**

[0078] 포밀메티오닌(formylmethionine, fMet)에 특이적인 항체를 제작하기 위해, fMXC 펩타이드들을 합성하여 혼합 항원을 제작하였다. 구체적으로, 펩타이드 항원의 첫 번째 아미노산 fM은 포밀메티오닌이고, 두 번째 아미노산 X는 글리신(Gly, G), 알라닌(Ala, A), 발린(Val, V), 류신(Leu, L), 이소류신(Ile, I), 트레오닌(Thr, T), 세린(Ser, S), 시스테인(Cys, C), 메티오닌(Met, M), 아스파르트산(Asp, D), 아스파라긴(Asn, N), 글루탐산(Glu, E), 글루타민(Gln, Q), 리신(Lys, K), 아르기닌(Arg, R), 히스티딘(His, H), 페닐알라닌(Phe, F), 티로신(Tyr, Y), 트립토판(Trp, W) 및 프롤린(Pro, P) 중 1종이며, 가교 결합 가능한 잔기(crosslinkable residue)인 세 번째 아미노산은 시스테인(C)인 20종의 항원 펩타이드 (fMGC, fMAC, fMVC, fMLC, fMIC, fMTC, fMSC, fMCC, fMMC, fMDC, fMNC, fMEC, fMQC, fMKC, fMRC, fMHC, fMFC, fMYC, fMWC 및 fMPC)를 혼합 합성하여 혼합 항원 fMXC을 제작하였다. 또한, 합성된 펩타이드에 키홀 림펫 헤모시아닌(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) 운반 단백질을 화학적 링커인 sulfo-SMCC(sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)를 이용하여 부착하여, 최종적으로 fMXC-(sulfo-SMCC)-KLH를 제작하였다.

[0080] **실시예 2. 포밀메티오닌 특이적 항체 제작**

[0081] 상기 실시예 1에서 제작한 혼합 항원 fMXC-(sulfo-SMCC)-KLH과 이의 대조군 항원인 fMGSGC-(sulfo-SMCC)-KLH 및 fMdPEG4-(sulfo-SMCC)-KLH를 각각 완전프로인트항원보강제(complete Freund's adjuvant, CFA)와 혼합하여 토끼 (New Zealand white)에 피하주사하고, 최초 면역 시점에서 4주차, 6주차 및 8주차에 동일 방법으로 면역 부스팅(boosting)을 진행하였으며, 9주차에 심장으로부터 채혈하여 항체를 포함하는 최종 혈청(final serum) (anti-fMGSGC serum, anti-fMdPEG4C serum 및 anti-fMXC serum)을 획득하였다.

[0083] **실시예 3. 포밀메티오닌 특이적 항체의 항원 결합능 확인**

[0084] 3-1. 대장균에서 항체의 항원 결합능

[0085] 상기 실시예 2에서 제작한 포밀메티오닌 특이적 항체 3종 (anti-fMGSGC serum, anti-fMdPEG4C serum 및 anti-fMXC serum)의 항원 결합능을 대장균에서 확인하기 위해, 쿠마시 블루 염색 및 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 구체적으로, 대장균 DH5α를 LB 배지(LB broth 25g/L)에 접종한 후, 37℃ 배양기에서 밤새 배양하였다. 다음날 LB 배지에 100배 희석하여 다시 배양한 후, OD600이 0.6에 도달했을 때 에탄올(ethanol) 또는 펩타이드 디포밀라제(deformylase) 저해제인 악티노닌(actinonin, Act)을 30분 동안 처리하였다. 이 때, 악티노닌을 에탄올에 20 mg/ml 농도로 녹여 준비하여 최종 농도 2 μg/ml가 되도록 대장균에 처리하였다. 이 후, 배양액을 4℃조건에서 2분간 12000g로 원심분리하여 대장균 펠렛을 수득하고, 프로티에이즈 억제제 칵테일(protease inhibitor cocktail)이 첨가된 2% SDS 용액으로 용해하였다. 이를 수 초간 초음파 파쇄한 뒤, 4℃조건에서 10분간 12000g로 원심분리하여 상청액을 수득하고, 이의 단백질 농도를 BCA protein assay로 측정하였다. 2 μg/μl 농도로 희석한 상청액을 4X SDS 샘플 버퍼와 3:1 (v/v)로 혼합하여 70℃에서 10분간 가열하고 이를 전기영동하여 얻은 멤브레인을 5 % 스킴 밀크 (in PBS-T [(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4 및 0.1% Tween 20 {w/v}])로 1시간 동안 블라킹하고, 상기 실시예 2에서 제작한 포밀메티오닌 특이적 항체 anti-fMXC serum (정제 과정을 거치지 않은 혈청) 및 대조군 항체 2종 (anti-fMGSGC serum 및 anti-fMdPEG4C serum)을 각각 5 % 스킴 밀크에 1:1000 비율로 희석한 용액과 4℃에서 밤새 반응시켰다. 이 후, 멤브레인을 PBS-T로 10분씩 3회 세척한 뒤, 2차 항체 (Goat anti-rabbit IgG HRP conjugate, 5 % skim milk에 1:5000 비율로 희석)와 1시간 동안 반응시키고, PBS-T로 10분씩 3회 세척하였다. 세척한 멤브레인에서 포밀메티오닌을 GE Amersham Imager AI680 장비와 HRP substrate를 이용하여 chemiluminescence 모드에서 검출하였다.

[0086] 그 결과, 혼합 항원 fMXC을 이용하여 제작한 포밀메티오닌 항체는 대장균에서 생성된 포밀메티오닌을 포함하는 단백질에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다 (도 1). 또한, 악티노닌 처리에 의해 대장균에서 포밀메티오닌을 포함하는 단백질의 생성이 증가된 경우에서도 종래의 fMGSGC 항원을 이용하여 제작한 항체와 본 발명의 혼합 항원 fMXC를 이용하여 제작한 항체는 모두 높은 항원 결합력을 나타냈다 (도 1). 반면, fMdPEG4C 항원을 이용하여 제작한 항체는 혼합 항원 fMXC를 이용하여 제작한 항체에 비해 상대적으로 낮은 항원 결합력을 나타냈다 (도 1).

[0088] 3-2. 포유동물 세포에서 항체의 항원 결합능

[0089] 상기 실시예 2에서 제작한 포밀메티오닌 특이적 항체 항체 3종 (anti-fMGSGC serum, anti-fMdPEG4C serum 및 anti-fMXC serum)의 항원 결합능을 포유동물 세포에서 확인하기 위해, 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 구체적으로, 인간 신장 유래 세포인 HK2 세포주를 DMEM/F-12 + 10 % FBS 배지를 이용해 배양한 후, 세포 밀도가 90 %에 도달했을 때 에탄올 또는 펩타이드 디포밀라제 저해제인 악티노닌을 10시간 동안 처리하였다. 이 때, 악티노닌을 에탄올에 20 mg/ml 농도로 녹여 준비하여 최종 농도 10 μg/ml가 되도록 대장균에 처리하였다. 이 후, 트립신 효소를 이용하여 세포를 수득하고, 이를 프로티에이즈 억제제 칵테일이 첨가된 RIPA 버퍼로 용해하였다. 이를 수 초간 초음파 파쇄한 뒤, 4℃조건에서 10분간 12000g로 원심분리하여 상청액을 수득하고, 이의 단백질 농도를 2 μg/μl로 희석한 상청액을 4X SDS 샘플 버퍼와 3:1 (v/v)로 혼합하여 70℃에서 10분간 가열하였다. 이를 전기영동하여 얻은 멤브레인을 5 % 스킴 밀크로 1시간 동안 블라킹하고, 상기 실시예 2에서 제작한 포밀메티오닌 특이적 항체 anti-fMXC serum (정제 과정을 거치지 않은 혈청) 및 대조군 항체 2종 (anti-fMGSGC serum 및 anti-fMdPEG4C serum)를 각각 5 % 스킴 밀크에 1:1000 비율로 희석한 용액과 4℃에서 밤새 반응시켰다. 이후, 멤브레인을 PBS-T로 10분씩 3회 세척한 뒤, 2차 항체 (Goat anti-rabbit IgG HRP conjugate, 5 % skim milk에 1:5000 비율로 희석)와 1시간 동안 반응시키고, PBS-T로 10분씩 3회 세척하였다. 세척한 멤브레인에서 포밀메티오닌을 GE Amersham Imager AI680 장비와 HRP substrate를 이용하여 chemiluminescence 모드에서 검출

하였다.

[0090] 그 결과, 혼합 항원 fMXC을 이용하여 제작한 포밀메티오닌 항체는 세포 내에서 생성된 포밀메티오닌을 포함하는 단백질에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다 (도 2). 또한, 인간 유래 세포의 경우에는 주로 미토콘드리아에서만 포밀메티오닌을 포함하는 단백질의 합성이 일어나기 때문에, 악티노닌 처리에 의해 소량 증가한 포밀메티오닌을 포함하는 단백질에 대해 종래의 fMGSGC 항원을 이용하여 제작한 항체와 fMdPEG4C 항원을 이용하여 제작한 항체는 낮은 항원 결합력을 나타낸 반면, 혼합 항원 fMXC를 이용하여 제작한 항체는 이들에 비해 현저하게 높은 항원 결합력을 나타냈다 (도 2).

[0092] 이를 통해, 본 발명의 혼합 항원 fMXC를 이용하여 제작한 항체가 포밀메티오닌에 대해 종래의 항체보다 우수한 민감도를 가지는 것을 확인하였다.

서열목록 자유텍스트

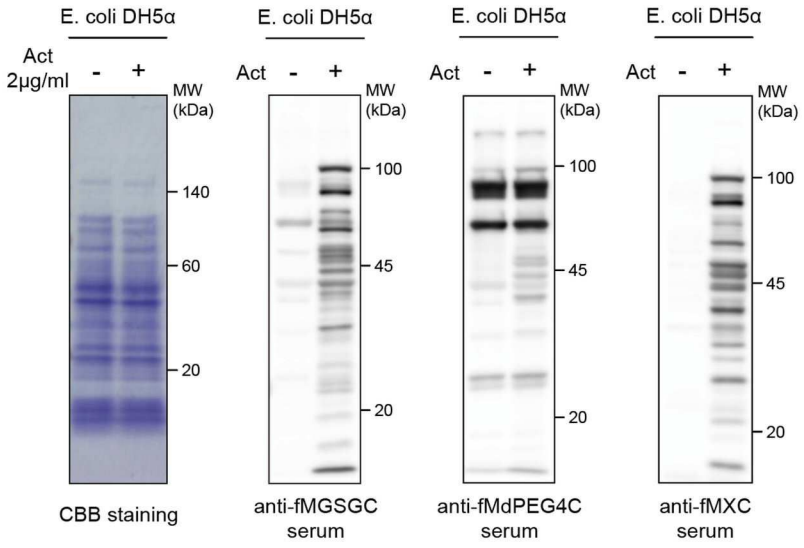
[0095] 본 명세서에 기재된 정의된 아미노산이 4개 미만인 서열번호 1 내지 21에 대한 서열 정보는 하기에 제공된다.

서열번호	서열	서열 타입	생물명
1	fMXC	아미노산	synthetic construct
2	fMGC	아미노산	synthetic construct
3	fMAC	아미노산	synthetic construct
4	fMVC	아미노산	synthetic construct
5	fMLC	아미노산	synthetic construct
6	fMIC	아미노산	synthetic construct
7	fMTC	아미노산	synthetic construct
8	fMSC	아미노산	synthetic construct
9	fMCC	아미노산	synthetic construct
10	fMMC	아미노산	synthetic construct
11	fMDC	아미노산	synthetic construct
12	fMNC	아미노산	synthetic construct
13	fMEC	아미노산	synthetic construct
14	fMQC	아미노산	synthetic construct
15	fMKC	아미노산	synthetic construct
16	fMRC	아미노산	synthetic construct
17	fMHC	아미노산	synthetic construct
18	fMFC	아미노산	synthetic construct
19	fMYC	아미노산	synthetic construct
20	fMWC	아미노산	synthetic construct
21	fMPC	아미노산	synthetic construct

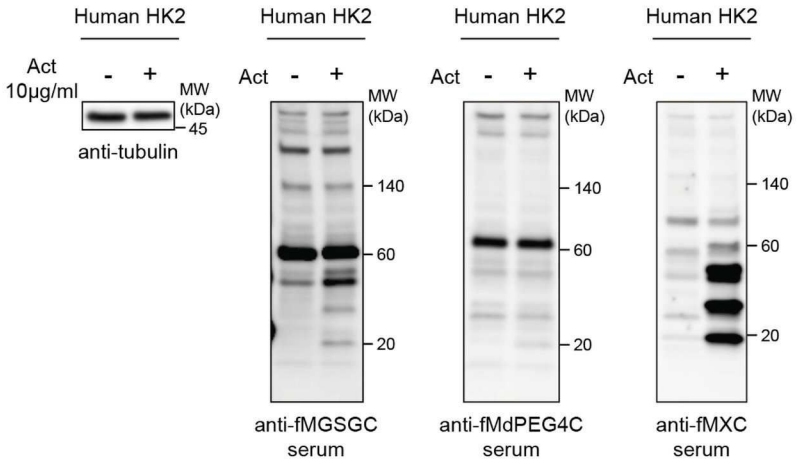
*fM: 포밀메티오닌(formylmethionine, fMet, fM)

도면

도면1


E. coli DH5α
Act
2μg/ml
-
+
MW
(kDa)
140
60
20
CBB staining
E. coli DH5α
Act
-
+
MW
(kDa)
100
45
20
anti-fMGSGC
serum
E. coli DH5α
Act
-
+
MW
(kDa)
100
45
20
anti-fMdPEG4C
serum
E. coli DH5α
Act
-
+
MW
(kDa)
100
45
20
anti-fMXC
serum

도면2


Human HK2
Act
10μg/ml
-
+
MW
(kDa)
45
anti-tubulin
Human HK2
Act
-
+
MW
(kDa)
140
60
20
anti-fMGSGC
serum
Human HK2
Act
-
+
MW
(kDa)
140
60
20
anti-fMdPEG4C
serum
Human HK2
Act
-
+
MW
(kDa)
140
60
20
anti-fMXC
serum