(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C07K 16/18

(11) 공개번호 10-2005-0003795
(43) 공개일자 2005년01월12일

(21) 출원번호 10-2003-0045296
(22) 출원일자 2003년07월04일

(71) 출원인 한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자 최인성
대전광역시유성구신성동두레아파트102동1504호

최용경
대전광역시동구용전동한숲아파트103동1504호

김재화
대전광역시유성구어은동한빛아파트132동403호

윤선영
대전광역시유성구신성동126-8번지210호

이영희
대전광역시유성구신성동한울아파트105동801호

주종혁
대전광역시유성구신성동136-5번지진석빌라301호

김진숙
대전광역시서구관저동구봉마을아파트907동2001호

강호범
대전광역시중구유천동325-3117통3반

임종석
대전광역시유성구송강동송강마을아파트202동904호

권두한
대전광역시유성구전민동엑스포아파트308동204호

(74) 대리인 백남훈
이학수

심사청구 : 있음

(54) 인간 ＣａｃｙＢＰ／ＳＩＰ에 대한 단일클론 항체 및 이를생산하는 융합세포주

요약

본 발명은 인간 CacyBP/SIP에 대한 단일클론 항체 및 이를 생산하는 융합세포주에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인간의 대장암 조직에서 발현이 증가하는 CacyBP/SIP(Calcyclin and Siah-1-interacting Protein)를 특이적으로 인식하는 항체로서 CacyBP/SIP의 아미노말단의 특정서열을 포함한 재조합 단백질을 항원으로 하여 생산한 단일클론 항체와 이를 생산하는 융합세포주에 관한 것이다. 본 발명의 항체와 이를 생산하는 융합세포주는 아직까지 특정

종양세포에서 과발현하는 S100A6과 결합하여 암화(oncogenesis) 기전에 어떤 역할을 하는지 거의 알려져 있지 않으므로 CacyBP/SIP 단백질의 세포내 기능의 연구와 나아가 특이적인 항원-항체 결합을 통하여 암의 임상적 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 본다.

대표도

도 6

색인어

CacyBP/SIP(Calcyclin and Siah-1-interacting Protein), 단일클론항체, 융합세포주

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 항 인간 CacyBP/SIP 단일클론 항체에 대한 항원으로 사용되는 NSIP 재조합 단백질(pET28a-NSIP)과 본 발명에서 생산한 항체의 교차반응성을 확인하기 위하여 코마시 블루(Coomassie blue)로 염색한 결과이다.

도 2a는 본 발명의 항 인간 CacyBP/SIP 단일클론 항체에 대한 항원으로 사용되는 NSIP 재조합 단백질과 본 발명에서 생산한 항체의 교차반응성을 확인하기 위하여 SDS-PAGE로 분리한 결과이다.

도 2b는 도 2a에서 제시된 대로 분리된 각각의 NSIP 와 CSIP 재조합단백질을 분리, 정제하여 농축한 후 12% SDS-PAGE상에서 확인한 결과이다.

도 3a는 NSIP 재조합 단백질에 특이적인 단일클론 항체의 역가를 간접효소결합 면역흡착법(ELISA)으로 확인한 결과이다.

도 3b는 면역화된 생쥐의 비장세포와 모세포(parent cell)를 융합하여 생성된 본 발명의 융합세포주가 생산하는 항 CacyBP/SIP 단일클론 항체의 면역글로블린의 아형을 결정하기 위하여 면역글로블린 아형 분서키트를 사용하여 분석한 결과이 다.

도 4는 본 발명의 항 CacyBP/SIP 단일클론 항체의 항원은 His · tag-NSIP 재조합단백질로서 His · tag 부분을 포함하는 다른 재조합단백질에 대한 교차 반응성을 확인하기 위하여 간접 ELISA 방법으로 CacyBP/SIP 단백질의 카르복시기 말단부위의 His · tag-CSIP와 His · tag-IL-5 재조합단백질에 대한 항체의 반응성을 확인한 결과이다

도 5는 본 발명의 항 CacyBP/SIP 단일클론 항체가 항원으로 사용한 NSIP 재조합단백질에만 특이적인 항원-항체 반응을 하고 있음을 웨스턴 블랏팅 결과로 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 융합 세포주 SIP60 1G3로부터 얻은 인간 CacyBP/SIP 단백질에 대한 단일클론 항체로 웨스턴 블럿 분석을 수행한 결과이다.

도 7은 특정 암세포에서 S100A6의 결합단백질로 알려져 있는 CacyBP/SIP 유전자의 발현을 암화가 진행됨에 따라 S100A6 발현이 증가하는 인간 대장암 조직에서 확인한 결과이다.

도 8은 본 발명의 단일클론 항체의 항원특이성을 인체 대장암 환자로부터 절제한 정상 조직과 암 조직에서 면역조직화학 염색법을 이용하여 검증한 결과이다[NC(Normal colon cells); 정상 대장세포, S(Stromal cells); 간질조직, CC(Cancer colon cells); 대장암세포].

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인간 CacyBP/SIP에 대한 단일클론 항체 및 이를 생산하는 융합세포주에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인간의 대장암 조직에서 발현이 증가하는 CacyBP/SIP(Calcyclin and Siah-1-interacting Protein)를 특이적으로 인식하는 항체로서 CacyBP/SIP의 아미노말단의 특정서열을 포함한 재조합 단백질을 항원으로 하여 생산한 단일클론 항체와 이를 생산하는 융합세포주에 관한 것이다.

인간 CacyBP/SIP 단백질은 2001년에 Reed 그룹에서 개체 발생이나 암화기전에 중요한 역할을 수행하는 β-카테닌의 분해에 관련한 Siah(mammalian homologs of Drosophia Sina) 유비퀴틴 리가아제의 결합단백질로서 Two-hybrid 시스템으로 확인하였다[Matsuzawa, S and Reed, J. C., Mol Cell, 7:915-926, 2001]. 기존에 보고된 마우스 CacyBP/SIP 유전자와 약 93% 염기서열이 동일하며 229개의 아마노산으로 구성되었으며 아미노말단부분(aa1-80)에는 β-카테닌의 분해에 관여하는 Siah-1 유비퀴틴 리가아제와 결합하는 부분이고 아미노산 73번부터 155번까지의 서열 또한 β-카테닌 분해시 생성되는 복합체를 이루는 Skp-1과 결합하는 부분이며 카르복실 말단(aa125-229) 서열은 Ca^{2+} 결합단백질인 S100A6(Calcyclin)단백질과 결합하는 부분으로 현재까지 보고되고 있다. 1996년에 최초로 보고된 마우스의 CacyBP/SIP 단백질은 상피세포 기원의 EAT(Ehelich ascites tumor) 세포에서 발현이 증가된 S100A6과 결합하는 새로운 유전자로 규명되었고[Filip, A. and Wojda, U., Biochem. J., 320:585-587, 1996], 약 30 kDa 크기의 Ca^{2+} 농도에 따라 세포내 위치 이동이 있는 단백질임이 밝혀져 있다[Filip. A. et al., J. Biol. Chem., 277(23):21103-21109, 2002]. 2001년도에 밝혀진 인간 CacyBP 유사단백질인 SIP(Siah-1-interacting protein)는 Sina/Siah 단백질군과 SCF 복합체군의 한 구성성분인 Skp-1 단백질의 연결단백질로서 여러 사이클린, p27kip1, p21waf-1, E2F, IκB 그리고 β-카테닌과 같은 세포 내 중요 신호기전 단백질들의 분해에 중요한 역할을 수행한다고 보고되었다[Matsuzawa, S and Reed, J. C., Mol Cell, 7:915-926, 2001]. 이외에도 CacyBP/SIP 단백질은 에리트로포이에틴 수용체 활성화(erythropoietin receptor activation)에 의해 그발현이 증가하며 JAK2 활성에 의한 c-myc 그리고 dpp-1과 같은 전사인자 활성과 비례적으로 그 발현이 증가하는 것이 보고되어 있다[Xia, Z. B. et al., J. Hematother. Stem Cell Res., 9:651-658, 2000; Pircher, T. J. et al., J. Biol. Chem., 276:8995-9002, 2001]. 인간 CacyBP/SIP 단백질이 각종 암 세포, 특히 상피세포 기원의 종양세포에서 그 발현이 증가하는 S100A6와의 직접적인 결합은 보고되지 않았으나 93% 이상의 유사성을 지닌 마우스나 랫트의 CacyBP/SIP단백질에서는 그 결합 부위와 구조적인 결정, 그리고 결합 해리상수 등을 연구할 정도로 심도있는 연구결과가 보고되어 있다[Nowotny, M. et al., J. Biol. Chem., 275:31178-31182, 2000; Filipek, A. et al., J. Biol. Chem., 277:28848-28852, 2002; Matsuzawa, S. et al., J. Biol. Chem., 278:1837-1840, 2003]. 따라서, 인간 CacyBP/SIP 단백질 또한 Ca^{2+} 농도 에 따른 신호기전이 활발하게 진행되는 신경세포에서나 분열이 왕성히 이루어지는 상피세포 기원의 각종 암 세포에서의 CacyBP/SIP 발현의 증감이나 그 기전에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다. 또한, 세포에 제노톡식(genotoxic)을 유도한 경우 p53 활성화에 따른 β-카테닌 분해를 유도하여 세포 사멸(cell apoptosis)에 관여하기도 하나 반대로 특정세포에서는 세포의 분열과 증식, 그리고 분화와 대사에 관련된 S100 단백질군과의 결합으로 이와 밀접한 기전에 중요한 역할을 수행할 가능성이 있다고 판단된다. 현재까지 인간 CacyBP/SIP 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체 및 이를 생산하는 융합세포주는 보고된 바가 없으며 β-카테닌 분해와 관련한 기전 외에 S100A6이 과발현하는 특정 종양세포에서의 발현이나 기능연구는 미비한 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 인간 CacyBP/SIP 단백질의 세포 내 기능분석 및 특정 종양관련 연구와 활용을 위하여 인간 CacyBP/SIP 단백질에 특이적으로 결합하는 생쥐 유래의 단일클론 항체를 생산하는 융합 세포주를 제조하고 이로부터 생산된 한 CacyBP/SIP 단일클론 항체가 종양세포에서 과발현하고 있는 CacyBP/SIP 단백질을 특이적으로 인식함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

본 발명의 목적은 인간 CacyBP/SIP 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체와 이를 생산하는 융합세포주를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론 항체를 이용한 CacyBP/SIP 단백질 의 세포 내 기능분석 및 종양관련 연구로의 활용을 위함이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 인간 CacyBP/SIP 단백질에 특이성을 갖는 단일클론 항체 및 그를 생산하는 융합 세포주를 그 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 상기 인간 CacyBP/SIP 단백질에 특이적인 단일클론 항체를 대량으로 생산하는 방법을 제공한다.

이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 인간의 대장암 조직에서 발현이 증가하는 CacyBP/SIP(Calcyclin and Siah-1-interacting Protein)를 특이적으로 인식하는 항체로서 CacyBP/SIP의 아미노말단의 특정서열을 포함한 재조합 단백질을 항원으로 하여 생산한 단일클론 항체와 이를 생산하는 융합세포주에 관한 것이다.

인간 CacyBP/SIP 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체 및 그를 생산하는 융합세포주를 제조하기 위하여는, 우선 CacyBP/SIP 단백질을 확보하여야 한다. CacyBP/SIP 단백질은 공지된 아미노산 서열을 이용하여 합성하거나 유전공학적 방법에 의해 재조합 단백질로서 생산할 수 있다. 예를 들면, NIH 프로그램의 GenBank상에 등재된 CacyBP/SIP 유전자를 이용하여 CacyBP/SIP 단백질을 재조합단백질 형태로 발현하는 발현벡터를 제조하는 단계; 상기 발현벡터를 대장균에 형질전환시켜 CacyBP/SIP 재조합 단백질을 생산하는 형질전환체를 얻는 단계; 상기 형질전환체를 배양하여 인간 CacyBP/SIP 재조합 단백질을 분리, 정제하는 단계에 의해 CacyBP/SIP 단백질을 제조할 수 있다. 본 발명에서는 GenBank 등록번호; NM-014412로 등재된 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 인간 CacyBP/SIP 유전자를 사용하였다.

상기 재조합 단백질의 분리 · 정제를 용이하게 하기 위하여 인간 CacyBP/SIP 단백질이 히스티딘-표지(His · tag)가 융합된 His · tag-CacyBP/SIP 재조합 단백질 형태로 발현시켜 히스티딘-표지에 대한 친화성 크로마토그래피를 이용하여 상기 융합 단백질을 용이하게 분리할 수 있다. 상기와 같이 대장균 형질전환체로부터 생산된 His · tag-CacyBP/SIP 재조합 단백질을 확인하기 위하여 코마시블루 염색을 수행한 결과, CacyBP/SIP 단백질의 아미노 말단 1 60번까지의 아미노산 서열을 포함하는 재조합 단백질인 His · tag-NSIP는 약 10 kDa의 분자량을 가지고 있으며 카르복실 말단의 151 228번 아미노산 서열을 포함하는 재조합 단백질인 His · tag-CSIP는 약 16 kDa의 분자량을 가지는 것으로 확인되었다.

대장균 형질전환체로부터 분리 · 정제된 각각의 NSIP와 CSIP 재조합 단백질 중 NSIP 재조합 단백질을 생쥐의 면역화 및 세포 융합을 통해 단일클론 항체를 생산하는 융합 세포주를 선별하고 분석하기 위한 간접 효소결합 면역흡착분석 (indirect enzyme-linked immunosorbant assay, ELISA)을 위한 항원으로 사용된다.

융합세포주의 개발에 필요한 면역화된 생쥐는 상기에서 분리 · 정제된 NSIP 재조합 단백질과 동량의 프로인트 완전 보조항원(Freund' complete adjuvant)을 유상화될 때까지 잘 혼합하여 생쥐의 복강 내에 주사한다. 첫 번째 면역주사 후 생쥐의 면역성을 높이기 위해 추가로 부스터 주사(booster injection)하는데, 이때 는 완전 보조항원을 사용하지 않고 NSIP 재조합 단백질과 불완전 보조항원(Freund' incomplete Adjuvant)을 동량으로 섞어 생쥐의 복강 내에 추가로 3회에 걸쳐 부스터 주사하는 것이 바람직하다.

이와 같이 인간 NSIP 재조합 단백질 항원이 주사되어 면역화된 생쥐로부터 혈청을 채취하여 항체의 역가를 측정하고 항체 형성이 확인된 생쥐의 비장세포와 세포융합 모세포, 예를 들어, NS-1 골수종 세포(myeloma cell)를 세포수를 기준으로 10 : 1의 비율로 혼합하고 폴리에틸렌글리콜을 넣어 세포융합 반응을 시킨 다음 배양용 배지, 예를 들어, RPMI 1640 배지를 가하여 희석시킨다. 다음에 융합된 세포들을 선별용 배지(HAT 배지)에 옮겨 배양한 후 융합세포군들의 성장이 명확히 확인되는 시점에 배양용 배지를 HT 배지로 바꾸어 세포의 증식이 촉진되도록 한다.

HT 배지에서 성장하는 융합세포군 중 NSIP 재조합단백질 항원에만 특이적으로 반응하는 융합세포군을 간접 효소결합 면역흡착검사(indirect enzyme-linked immunosorbant assay, ELISA) 분석방법을 사용해 선별한다. 효소결합 면역흡착검사 판독기(ELISA reader)로 흡광도를 측정하여 정제된 인간 NSIP 재조합 단백질과 높은 결합력을 갖는 항체를 분비하는 융합세포주를 선별하고, 선별된 세포가 단일클론이 되도록 제한 희석법(limiting dilution)을 사용해 융합세포를 희석한 후 하나의 세포로부터 증식한 세포들로 이루어진 세포주를 확립한다. 이와 같이 선별된 본 발명의 융합 세포주는 'SIP60 1G3'으로 명명하여 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 2003년 3월 7일자로 기탁하였으며, 수탁번호는 KCTC 10443BP로 부여받았다.

인간 CacyBP/SIP 단백질에 특이적인 본 발명의 단일클론 항체는;

1) 상기 융합 세포주를 생쥐의 복강 내로 주사하는 단계;

2) 복강이 부풀어 오른 생쥐로부터 복수액을 채취하는 단계; 및

3) 복수액으로부터 인간 CacyBP/SIP 단백질에 대한 단일클론 항체 단백질을 분리를 통해 대량 생산될 수 있다.

본 발명에서 확립된 세포주로부터 분비되는 인간 CacyBP/SIP 단백질에 대한 단일클론 항체는 항체의 아형이 면역글로불린 G_1 타입(IgG_1)이며, 본 발명의 융합 세포주 SIP60 1G3으로부터 분리, 정제된 단일클론 항체의 NSIP 아미노산 서열의 특이적 반응성을 측정하기 위하여 다른 히스티딘-표지 재조합단백질들에 대한 교차반응성을 간접 효소

결합 면역흡착검사와 웨스턴 방법으로 수행하였다. 그 결과 본 발명의 인간 NSIP 재조합 단백질에 대한 단일클론 항체가 인간 CacyBP/SIP 단백질의 아미노 말단 부분에만 특이적으로 반응하는 항체임을 확인하였다. 또한, 항원이 아닌 인간 세포 내에서 발현하는 약 30 kDa 크기 분자량의 CacyBP/SIP 단백질에 본 발명의 단일클론 항체가 특이적인 반응을 하는지 확인하였다.

인간 CacyBP/SIP 단백질은 기존에 S100A6 단백질의 결합 단백질로서 알려졌으나 상피세포 기원의 종양세포에서의 S100A6 유전자나 단백질의 발현은 현저히 증가한다는 사실이 많이 보고되어 있다. 반면에 S100A6의 결합 단백질인 CacyBP/SIP의 발현은 이러한 종양세포에서 S100A6과 유사한 발현형태를 보이는지 아니면 암화기전에는 영향을 미치지 않는지에 관한 보고는 전혀 이루어져 있지 않 다. 따라서, 인체 대장암 환자의 정상조직과 암조직을 수술 시 절제하여 얻은 후 각각의 29명의 정상 또는 암조직으로부터 mRNA를 추출하여 인간 CacyBP/SIP 유전자의 ORF에 해당하는 부분을 RT-PCR로 비교 분석하였다. 대부분의 환자의 조직에서 정상조직에 비하여 암조직에서 CacyBP/SIP 유전자의 발현이 높음을 확인할 수 있었고 본 발명의 단일클론 항체를 이용하여 인체 대장암의 정상조직과 암 조직에 존재하는 CacyBP/SIP 단백질의 항원에 면역조직화학염색법을 이용하여 반응시킨 결과, 암 조직의 대장세포에서 강하게 갈색으로 발현되어 나타났다. 따라서, 본 발명의 단일클론 항체는 환자의 세포내 CacyBP/SIP 단백질 항원의 농도 결정 뿐 아니라 발암 관련성에 대한 연구에도 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 단일클론 항체를 이용하여 암을 진단하는 방법은 당분야에 공지된 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay; RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔상의 웨스턴 블럿 또는 면역 블럿 분석 등의 방법에 의해 대상자의 생체 시료 중에 상기 단백질이 발현되었는지를 확인함으로써 진단할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 단일클론 항체를 생물학적 마이크로칩(biological microchip) 상에 고정시킨 후 대상자의 생체 시료와 반응시켜 상기 항체 단백질에 대한 항원을 검출할 수 있는 단백질 칩을 제공한다. 이를테면, ELISA 방법과 더불어 공지의 생물학적 마이크로칩(biological microchip) 및 자동화된 미세배열 시스템(microarray system)을 이용하여 대량으로 시료를 분석할 수 있다.

아울러, 본 발명은 특정한 인체 종양, 예를 들면 대장암 같은 상피세포 기원 의 암을 진단하기 위하여 상기 단일클론 항체 단백질을 포함하는 진단키트를 제공한다.

상기 진단키트는 본 발명의 단일클론 항원-항체 결합반응을 통하여 항체 단백질에 대한 항원을 정량분석 또는 정성분석 함으로써 각종 암을 진단할 수 있으며, 상기 항원-항체 결합반응은 통상의 ELISA, RIA, 샌드위치 측정법, 폴리아크릴아미드 겔상의 웨스턴 블럿 또는 면역 블럿 분석의 방법으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 상기 재조합 단일클론 항체 단백질을 표면에 코팅시킨 96 웰 마이크로타이터 플레이트 등을 이용하여 ELISA를 수행하도록 상기 진단키트를 제공할 수 있다. 항체 단백질이 코팅될 수 있는 기질로는 니트로셀룰로오즈 막, 폴리비닐(Polyvinyl) 수지로 합성된 96 웰 플레이트(96 well plate), 폴리스티렌 (Polystyrene) 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있다. 이와 같은 진단키트는 단일클론 항체 단백질이 표면에 고정된 생물학적 마이크로칩 외에도 적당한 완충용액, 표준항체, 발색효소 또는 형광물질이 결합된 2차 항체, 발색 기질액 등을 추가로 포함할 수 있다. 항체에 결합된 발색효소로는 퍼옥시다제(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있다. 발색 기질액은 ABTS[2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD(o-Phenylenediamine), TMB(Tetramethyl Benzidine) 등이 사용될 수 있다.

또한, 상기 진단키트는 각종 암의 진단을 위해 생물학적 마이크로칩을 이용한 자동화된 분석 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 상기 재조합 단일클론 항체 단백질을 표면에 코팅시킨 슬라이드 글래스 등의 단백질 칩을 이용하여 ELISA를 수행하도록 상기 진단키트를 구성할 수 있다.

이하, 본 발명은 다음 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는바, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1:인간 CacyBP/SIP 아미노 말단 및 카르복실 말단 부분의 재조합 단백질을 생산하는 발현벡터의 제조

우선 인간 CacyBP/SIP의 재조합 단백질을 제조하기 위하여 필요한 인간 CacyBP/SIP 유전자의 염기서열의 확보는 본 연구그룹에서 준비한 인간 간암세포주인 HepG2(ATCC, HB-8065)로부터 추출한 mRNA를 역전사(reverse transcription)하여 획득한 cDNA를 주형으로 하여 GenBank 상의 등록번호(Accession number: NM-014412)를 기본으로 하여 아미노 말단의 CacyBP/SIP 유전자의 절편의 증폭은 서열번호 2 및 서열번호 3으로 기재되는 CacyBP/SIP 유전자 특이적인 프라이머 쌍을 이용하였고 카르복실 말단의 유전자 절편의 증폭은 서열번호 4 및 서열번호 5로 기재되는 CacyBP/SIP 유전자 특이적인 프라이머 쌍을 이용한 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 통해 각각 DNA 절편을 증폭한 후, 이를 제한효소인 BamHI 과 XhoI으로 절단한 다음 각각 180 bp와 240 bp 크기의 DNA 절편을 분리, 정제하였다. 이를 BamHI과 XhoI으로 절단하여 분리한 pET28a 발현벡터[Novagen 사]와 접합시켜 각각 플라스미드 pET28a-NSIP와 pET28a-CSIP를 제조하였다. pET28a 발현벡터는 발현시키 고자 하는 단백질에 6개의 히스티딘(histidin

e) 잔기를 붙여 발현시킬 수 있는 것으로서, pET28a-NSIP와 pET28a-CSIP 발현벡터를 대장균에 형질전환시킨 후 재조합 단백질을 유도하면 6개의 히스티딘 잔기가 포함된 His · tag-NSIP와 His · tag-CSIP 단백질이 생산되었다.

실시예 2: 인간 CacyBP/SIP 재조합 단백질들의 분리 및 정제

인간 CacyBP/SIP의 아미노 말단 부분의 유전자를 포함하고 있는 발현벡터 pET28a-NSIP와 인간 CacyBP/SIP의 카르복실 말단 부분의 유전자를 포함하고 있는 발현벡터 pET28a-CSIP로 대장균 BL21(λDE3)를 형질전환시키고, 이를 25 μg/㎖의 가나마이신(kanamycin)을 포함한 LB배지에서 37 ℃로 진탕 배양하여 상기 발현벡터가 형질전환된 콜로니만을 선별하였다. 선발된 대장균 형질전환체로부터 인간 NSIP와 CSIP 재조합 단백질의 생산을 유도하기 위하여 세포의 대수적 증식기에 배양액에 1 mM IPTG를 가하였다. 이때 생산이 유도된 재조합 단백질들의 확인을 12% SDS-PAGE상에서 분리한 후 이를 코마시불루 염색으로 확인하였다[도 1]. 상기 배양액을 원심분리하여 대장균체를 회수한 후 세포 분해용액(100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris. HCl, 6M Guanidine HCl at pH 8.0)으로 완전히 분해하고 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액은 히스티딘 잔기에 친화성이 있는 NTA 아가로스[Quiagen사] 비드(bead)로 만든 친화성 컬럼에 결합시켜 정제하였다. 상등액에 존재하는 히스티딘 잔기를 포함한 재조합 단백질들을 NTA 아가로스 비드에 결합시킨 후 비특이적인 결합을 줄이기 위해 세척용액(100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris. HCl, 8M Urea at pH 6.3)으로 2회 정도 컬럼을 세척하였다. 비드로부터의 재조합단백질 회수는 용출 용액 E1(100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris. HCl, 8M Urea at pH 4.5), E2(200 μM immidazole, 100mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris. HCl, 8M Urea at pH 4.5), E3(400 μM immidazole, 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris. HCl, 8M Urea at pH 4.5), E4(600 μM immidazole, 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris. HCl, 8M Urea at pH 4.5), E5(800 μM immidazole, 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris. HCl, 8M Urea at pH 4.5) 그리고 E6(1 mM immidazole, 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris. HCl, 8M Urea at pH 4.5) 순으로 재조합단백질을 용출한 후 각 단계별의 용출액을 12% SDS-PAGE 젤에 전기영동시켜 분리상태를 확인한 결과는 도 2a와 같다. NSIP 재조합 단백질은 약 10 kDa 크기이며 CSIP 재조합 단백질은 약 16 kDa 크기로 12% SDS-PAGE 상에서 확인되었다. 상기 분리과정으로 확보한 재조합 단백질들을 NTA 비드에 비특이적으로 결합하여 붙은 다른 단백질들을 제거하여 순수 분리 정제를 하기 위하여 각각의 재조합 단백질을 분리시킨 SDS-PAGE 젤을 25 mM $CuCl_2$ 용액으로 염색한 후 Cu^{2+} 이온과 결합하지 않은 각각의 재조합 단백질들을 절단하여 전기영동으로 젤 상에서 추출하였다. 추출된 이 재조합 단백질들을 인산완충용액으로 투석하여 농축하였다. 최종 시료를 대상으로 브레드포드법(Bradford method)에 의해 측정 한 단백질의 농도는 1 ㎎/㎖이었다. 상기 분리, 정제 과정의 각 단계에서 얻은 시료 10 μℓ씩을 전기영동(SDS-PAGE)한 결과는 도 2b와 같다.

상기 대장균 형질전환체로부터 생산된 단백질이 His · tag-NSIP와 His · tag-CSIP 재조합 단백질임을 확인하기 위하여 도 2b에서와 같이 전기영동한 재조합 단백질들을 특이적으로 인식하는 항체(T7 · tag IgG-HRP conjugate 항체[Novagen사])를 사용하여 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 우선 12%의 SDS-PAGE로 분리된 단백질들을 전기적인 방법으로 막 필터에 옮긴 후 막필터의 비특이적인 반응을 줄이기 위하여 소 혈청 알부민 용액으로 2 시간 동안 막을 차단시켰다. 여기에 항 T7 · tag IgG-HRP 결합 항체를 첨가하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 막 필터를 0.5% 트윈 20(Tween 20)이 포함된 인산염 완충용액으로 세척한 후 ECL 용액[한국 아머샴-파마샤사]을 이용하여 형광 발색시키고 이를 X-ray 필름 [Kodak 사]에 감광시켜 확인하였다[도 5의 좌측패널].

상기 도 2a와 2b의 결과로부터, 대장균으로부터 생산된 NSIP와 CSIP 재조합 단백질이 순수하게 분리정제 되었음을 확인할 수 있었다.

본 실시예에서 분리 · 정제된 재조합 단백질들 중 NSIP 재조합 단백질은 인간 CacyBP/SIP 단백질에 대한 단일클론 항체를 생산하는 융합세포주를 제조하기 위한 항원으로 사용되었으며 또한 융합세포주의 선별 및 분석을 위하여 시행한 효소결합 면역흡착검사법을 위한 항원으로 사용되었다. 반면에 CSIP 재조합 단백질은 NSIP 재조합단백질을 항원으로 하여 제조된 단일클론 항체의 교차반응성을 검증하는 실험에 사용되었다.

실시예 3: 생쥐의 면역화

융합세포주의 제작에 필요한 면역화된 생쥐를 얻기 위하여, 상기 실시예 2에서 제조한 인산완충용액에 용해된 인간 NSIP 재조합 단백질을 20 μg/100μℓ 농도로 용해시킨 후 동일한 부피의 프로인트 완전 보조항원(Freund's complete adjuvant, FCA)을 유상화 될 때까지 잘 혼합하여 생후 6 내지 8주령의 Balb/c 생쥐[한국생명공학연구원의 실험동물실로부터 분양 받음]의 복강 내에 주사하였다. 10일 후에 처음 면역 주사한 것과 동일한 양의 인간 NSIP 재조합 단백질을 동량의 불완전 보조 항원(Freund's incomplete adjuvant, FIA)과 혼합한 후 생쥐의 동일 부위에 주사하였다. 그로부터 4 내지 5일 경과 후 생쥐의 눈 부위 혈관에서 소량의 피를 뽑아내어(eye bleeding) 항체의 역가를 ELISA방법으로 확인하였고, 세포융합 실험을 실시하기 3 내지 4일 전에 0.85% 생리식염수에 녹인 20 μg의 인간 NSIP 재조합 단백질을 생쥐의 복강 내에 주사하여 생쥐의 면역성을 배가시킨 후 세포융합에 사용될 생쥐를 확보하였다.

실시예 4: 세포 융합

상기 실시예 3과 같은 방법으로 면역화된 생쥐를 에테르로 마취시킨 후 몸통의 좌측에 위치한 비장(spleen)을 꺼내서 조직 균질기(tissue homogenizer)로 곱게 파쇄한 후 RPMI1640 배지를 이용하여 현탁액을 만들고, 이때 얻어진 비장세포를 15 ㎖의 원심분리관에 넣어서 원심분리하였다. 이 과정을 2회 반복하여 비장 세포 를 RPMI1640 배지로 충분히 세척하였다.

한편, 세포융합의 모세포(parent cell)로서 NS-1 골수종 세포에서 기원한 FOX-NY 세포주(ATCC, CRL-1732)를 5 ×10 ^{5} /㎖ 정도로 유지시키면서 10% 소 태아 혈청(FBS)을 함유하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 모세포인 FOX-NY도 RPMI1640 배지를 이용하여 2회 원심분리하여 세척하였다.

비장세포와 모세포를 각각 10 ㎖이 되도록 RPMI1640 배지에 다시 현탁시킨 후 각 현탁액 내의 세포 수를 세어서 생쥐의 비장세포 10 ^{8} 개와 모세포 10 ^{7} 개가 되도록 두 현탁액을 50 ㎖의 원심분리관에서 섞은 다음 다시 원심분리하여 침전시켰다. 원심분리관 내의 침전물을 손가락으로 가볍게 두드려서 분산시키고, 37 ℃에서 1분간 정치한 후 인산화 완충용액 배지에 들어있는 45% 폴리에틸렌글라이콜(polyethylene glycol, PEG)-5% 디엠에스오(DMSO)의 푸소겐(fusogen) 1 ㎖를 1분간에 걸쳐서 천천히 가하고 또 다시 1분간 약간 흔들어 주었다. 그 후 배양용 배지(RPMI1640) 9 ㎖을 3분간에 걸쳐 천천히 첨가하고, 다시 가볍게 흔들어 주면서 서서히 배양용 배지(RPMI1640)를 첨가하여 최종적으로 현탁액의 용적이 50 ㎖이 되도록 하였다. 이 현탁액을 다시 원심분리한 후 세포 침전물을 10% 소태아 혈청을 포함한 분리용 배지(HAT 배지)에 1 2 ×10 ^{5} /㎖ 정도로 재현탁시키고, 96웰(well) 마이크로 타이터 플레이트에 0.2 ㎖씩 분주한 후 37 ℃로 유지된 가습 이산화탄소 세포배양기에서 배양하였다.

실시예 5 : 단일클론 항체를 생산하는 융합세포의 선별

상기 실시예 4 에서 제조한 융합세포군 중에서 인간 CacyBP/SIP의 NSIP 재조합 단백질 항원에만 특이적으로 반응하는 융합세포들을 선별하기 위해 정제된 각각의 NSIP 재조합단백질을 항원으로 이용해 효소결합 면역흡착검사법으로 스크리닝을 수행하였다.

마이크로타이터 플레이트(micro-titer plate)에 상기 실시예 2에서 얻은 인간 CacyBP/SIP의 NSIP 재조합 단백질을 인산완충용액에 용해시킨 용액을 각 웰당 50 ㎕(1 ㎍/㎖)씩 가하여 플레이트 표면에 부착시킨 후, 반응하지 않은 항원은 인산완충용액-트윈 20(PBST) 용액으로 세척하여 제거하였다. 이 플레이트에 융합세포의 배양액을 각 웰당 50 ㎕씩 가하고 1시간 동안 반응시킨 후 인산 완충용액-트윈 20 용액으로 충분히 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거하였다. 여기에 염소 항-마우스 IgG-호스래디쉬 퍼옥시다제(goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase(HRP)) [Sigma 사]를 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 인산완충용액-트윈 20 용액으로 충분히 세척하였다. 세척이 끝난 각각의 웰에 퍼옥시다제의 기질용액(OPD)을 넣어 반응시키고, 그 반응 정도를 효소결합 면역흡착검사 판독기를 사용해 파장 492 nm에서 흡광도를 측정해 결정하였다.

실험의 결과로부터 각각의 NSIP 재조합 단백질 항원에 특이적으로 높은 결합력을 갖는 항체를 분비하는 융합세포들을 우선 선별한 후, 선별된 세포들을 대상으로 상기 과정에서 다른 HIs · tag 재조합 단백질인 CSIP 재조합 단백질과 본 발명자들이 보관하고 있는 인간 IL-5 사이토카인(GenBank 상의 Accession number, NM- 000879)의 카르복실말단부분의 재조합 단백질인 His · tag-CIL-5 단백질을 각각 상기와 동일한 방법으로 마이크로타이터 플레이트에 부착시킨 후 2차 선별로 NSIP 아미노산 서열에 특이적으로 반응하는 융합세포 집단을 재선별한 다음, 이 세포들의 집합을 단일클론이 되게 제한 희석법으로 희석하여 우수한 단일클론 항체를 생산하는 하나의 세포로부터 유래한 융합세포주를 확립하였다. 이때 최종적으로 선별한 NSIP 재조합 단백질에 특이적인 항체를 생산하는 융합세포주는 SIP60 1G3으로 명명하고 이 클론을 순수하게 클로닝한 다음 동결보존하였다. 또한, 융합세포주 SIP60 1G3은 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 2003년 3월 7일자로 기탁하였으며, 수탁번호는 KCTC 10443BP로 부여받았다.

상기 융합세포주를 배양한 후 상등액을 이용하여 효소면역법으로 항체의 역가를 측정하고 ImmunoType ™ Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit[Sigma-Aldrich사]로 단일클론 항체들의 면역글로블린의 아형을 결정하였다. 효소면역법으로 확인한 단일클론 항체의 역가의 결과는 도 3a에 제시한 것이며 NSIP 재조합 단백질에 특이적인 단일클론 항체의 역가를 효소결합 면역흡착법으로 확인한 결과이다. 항원으로 사용한 NSIP 재조합 단백질에 정상 생쥐의 혈청에 존재하는 항체들은 결합력에 있어 반응성은 거의 없으며 또한 항 인간 IL-5 단일클론 항체가 NSIP 재조합 단백질에 대한 교차 반응성도 거의 없고 항체를 유도한 항원에만 특이적으로 결합함을 확인하였다. 그 결합력은 상등액을 200배 희석해도 효소결합 면역흡착법으로 확인이 가능한 결과를 얻었다. 따라서, 본 발명에서는 인간 CacyBP/SIP 단백질의 아미노 말단 부위에 특이성을 지니며 결합력이 높은 항체를 생산한 것이다. 또한, 본 발명의 단일클론 항체가 여러 His · tag 결합 재조합 단백질과의 교차반응성이 없는지 확인하기 위하여 His · tag-CSIP와 His · tag-CIL-5 재조합 단백질에 항원-항체 반응을 시행해본 결과 도 4에서 보는 바와 같이 다른 His · tag 결합 재조합 단백질에는 전혀 반응성을 나타내지 않으며 본 발명의 항원으로 사용한 His · tag-NSIP 재조합 단백질에만 특이적으로 높은 결합력을 나타내고 있음을 확인하였다.

상기 융합 세포주 SIP60 1G3을 배양한 후 상등액을 이용하여 효소 면역법으로 면역글로블린 아형 분석키트(Immuno

globulin Isotyping Kit)[Sigma 사]를 사용하여 면역글로블린의 아형을 결정한 결과, 분리된 클론의 아형은 IgG1으로 판명되었으며 도 3b에서는 이를 확인된 결과를 보여준 그림이다.

실시예 6: 단일클론 항체의 대량 생산

상기 실시예 5 에서 확립한 융합세포주로부터 인간 CacyBP/SIP의 NSIP 재조합 단백질에 대한 단일클론 항체를 대량으로 생산하기 위하여, 우선 생쥐(Balb/c) 한 마리당 0.5 ㎖의 프리스텐(pristane)을 복강 내로 주사하였다. 1주일이 지난 다음 융합세포들을 생쥐 1마리당 5 ×10 ^{6} 개씩 주사하고, 복강이 부풀어 오른 생쥐에서 복수액을 채취하였다. 이 복수액은 높은 농도로 자란 융합세포를 포함하고 있으므로, 채취된 복수액을 10,000 rpm에서 원심분리하여 융합세포를 침전시 킨 후, 상층액만을 취하였다. 이 채취된 상층액은 항체 단백질을 정제할 때까지 - 70 ℃에서 보관하였다.

인간 CacyBP/SIP의 NSIP 재조합 단백질에 대한 단일클론 항체를 복수액으로부터 정제하기 위하여 채취된 복수액의 상층액에 포화된 황산암모늄(ammonium sulfate) 용액을 동량으로 첨가하여 단백질만을 침전시켰다. 침전물을 인산완충용액에 용해시킨 후 24 내지 42 시간 동안 인산완충용액에서 투석하고 프로틴 G 아가로즈 친화성 컬럼(Protein G agarose affinity column)[Bio-Rad사]을 이용하여 분리한 후 항체 단백질의 양을 브레드포드[Biorad사] 측정법으로 정량하여 - 70 ℃에서 보관하였다.

실시예 7: 본 발명의 단일클론 항체와 인간 CacyBP/SIP 단백질의 항원-항체 반응 확인

상기 실시예 6에서 융합 세포주 SIP60 1G3으로부터 분리, 정제된 단일클론 항체의 인간 CacyBP/SIP 단백질에 대한 특이적 반응성을 측정하기 위하여 하기와 같이 웨스턴 블럿 분석을 수행하였다.

이를 위하여, 우선 인간 간 관련 세포주인 Chang liver(ATCC CCL-13), HepG2 (ATCC HB-8065) 및 Hep3B(ATCC HB-8064)를 10 % 소 태아 혈청(Fetal bovine serum)을 포함한 DMEM(Gibco/BRL) 세포 배양액에서 증식, 유지하였다. 회수된 세포주들의 세포조액을 얻기 위하여 파쇄 완충액(lysis buffer; 50 mM Tris · HCl[pH 7.6], 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 mM aprotinin, 1 mM PMSF)에 세포들을 현탁시킨 후 4 ℃에서 1시간 동안 방치하고 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 세포내 단백질들을 상등액으로 회수하였다. 각각의 회수된 상등액을 브래드포드 시약으로 정량하여 동일한 양의 세포조액을 12% SDS-PAGE에서 분리한 후 막 필터에 단백질들을 옮겼다. 막 필터에 옮긴 다른 단백질들이 나타내는 비특이적인 반응을 줄이기 위해 3% 소 혈청 알부민 용액으로 1시간 동안 막을 차단시켰다. 1차 항체로 본 발명의 단일클론 항체를 첨가하고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 막 필터를 0.5%의 소 혈청 알부민이 포함된 인산염 완충용액으로 3화 세척한 후 2차 항체로 퍼옥시다제가 결합된 염소의 항-마우스 면역글로블린 G(Goat anti-mouse-IgG-HRP)[ICN사]를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 막 필터를 다시 0.5% 트윈 20이 포함된 인산염 완충용액으로 세척한 후 ECL(Enhanced chemiluminescence) 용액을 이용하여 발색을 유도하였다. 도 6은 본 발명의 융합 세포주 SIP60 1G3으로부터 얻은 인간 CacyBP/SIP 단백질에 대한 단일클론 항체로 웨스턴 블럿 분석을 수행한 결과이다.

상기 도 6의 결과로부터 본 발명의 인간 CacyBP/SIP의 NSIP 재조합 단백질에 대한 단일클론 항체가 인체 간 관련 세포주인 HepG2, Hep3B 그리고 Chang liver 세포에서 약 30 kDa 분자량의 인간 CacyBP/SIP 단백질과 특이적인 반응을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.

실시예 8: 인간 NSIP 재조합 단백질에 대한 단일클론 항체의 인간 대장암 조직에서의 면역조직화학 염색 반응 확인

현재까지 보고된 인간 CacyBP/SIP 단백질은 기존에 여러 인체 종양 세포에서 그 발현이 증가하는 Ca^{2+} 결합 단백질인 S100A6의 발현과 그 상관관계가 보고된 바 없다. 따라서, 본 발명자들은 우선 상피세포 기원의 인체 대장암 환자 29명의 정상 조직과 암 조직을 을지의과대학교의 내과 수술팀과 임상병리학실에서 2000년도부터 현재까지 적출한 샘플에서 확보하여 mRMA를 추출하고 이를 역전사 효소 (reverse transcriptase)를 이용하여 각각의 조직으로부터 cDNA를 합성하였다. 각각의 cDNA를 주형으로 하여 서열번호 2와 서열번호 5로 인간 CacyBP/SIP 유전자를 중합효소 연쇄반응으로 증폭하여 1% 아가로스에서 분리하였다. 도 7에서 보는 바와 같이 인간 CacyBP/SIP 유전자의 발현이 이미 대장암에서 그 발현이 증가하는 것으로 보고된 S100A6 유전자와 유사하게 정상조직에 비해 대부분의 암 조직에서 발현이 증가함을 알 수 있었다. 도 7에서 기입한 번호들은 을지의과대학교에서 보관하고 있는 환자조직의 고유번호이며 각 번호에 해당하는 환자의 병리학적인 소견이 보관되어 있다.

상기 도 7에서의 결과로 미루어 보아 인체 대장암 환자의 암조직에서의 인간 CacyBP/SIP 단백질 발현의 증가를 본 발명의 단일클론 항체를 이용한 특이성 검증의 또 다른 방법으로 이용하여 확인하였다.

우선 종양 환자로부터 적출한 조직을 10% 중성 포르말린(formalin) 완충용액으로 고정한 후 녹아 있는 상태의 파라핀에 포매하였다. 파라핀으로 포매시킨 조직을 마이크로톰(microtome)으로 얇게 박절한 후 상기 절편을 유리 슬라이

드 위 에 고정하여 크실렌(xylene)과 히스토클리어(histoclear) 용매로 파리핀을 제거하였다. 상기 절편을 1M 트리스 완충용액으로 세척한 후 1차 항체로 1M 트리스 완충용액으로 200배 희석한 본 발명의 인간 CacyBP/SIP에 대한 단일클론 항체를 40 ℃에서 20분 동안 처리하였다. 반응하지 않은 항체를 1M 트리스 완충용액으로 완전히 세척하여 제거한 후 2차 항체로 바이오틴(biotin)이 결합된 아비딘-양고추냉이 퍼옥시다제(avidin-horseradish peroxidase) 용액[Immunotech사]을 40 ℃에서 10분 동안 처리하였다. 다시 반응하지 않은 2차 항체를 완전히 세척하여 제거한 후 상기 절편을 퍼옥시다아제 기질용액인 0.05% H_2O_2 를 포함한 3-아민-9-에틸카바졸(3-amine-9-ethylcarbazole) 용액에 반응시켜 메이어 헤마톡실린(Meyer's hematoxylin)으로 상호 염색시키고 슬라이드를 봉합한 뒤 광학 현미경으로 확인하였다.

그 결과, 도 8의 대장암 환자의 대장암 세포(CC, colorectal cancer)에서 인간 CacyBP/SIP 단백질의 발현이 정상 대장세포(NC, Normal colon)에 비해 훨씬 많은 양의 인간 CacyBP/SIP 단백질 항원이 존재하고 있음을 확인하였다.

발명의 효과

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 단일클론 항체는 아직까지 미비하게 알려진 인간 CacyBP/SIP 단백질의 세포 내 기능을 연구하는데 유용한 재료로 활용할 수 있을 것이다. 또한, 본 발명의 항 인간 CacyBP/SIP 단일클론 항체는 인체 대장암의 종양 세포에서 정상세포에 비해 민감한 항원-항체 결합을 함으로서 이를 응용한 웨스턴 블럿 분석이나 면역조직화학 염색을 통하여 실제 임상적 진단 및 실험에 적용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
생쥐 유래의 융합세포주 SIP60 1G3[KCTC 10443BP]에 의해 생산되고, 인간 CacyBP/SIP(Calcyclin and Siah-1-interacting Protein) 단백질의 아미노말단 절편을 특이적으로 인식하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 2.
제 1 항에 있어서, 항체의 아형(subclass type)은 IgG_1 인 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 3.
청구항 1의 단일클론 항체를 생산하는 것을 특징으로 하는 융합 세포주[KCTC 10443BP].

청구항 4.
(1) 융합 세포주[KCTC 10443BP]를 생쥐의 복강 내로 주사하는 단계;

(2) 복강이 부풀어 오른 생쥐로부터 복수액을 채취하는 단계; 및

(3) 상기 복수액으로부터 인간 CacyBP/SIP(Calcyclin and Siah-1-interacting Protein) 단백질에 대한 단일클론 항체를 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 CacyBP/SIP에 대한 단일클론 항체의 대량 생산방법.

청구항 5.
청구항 1의 인간 CacyBP/SIP(Calcyclin and Siah-1-interacting Protein)에 대한 단일클론 항체를 포함하며, 항원-항체 결합반응을 통해 생체 시료 중 CacyBP/SIP 단백질의 발현 정도를 측정하는 것을 특징으로 하는 암 진단키트.

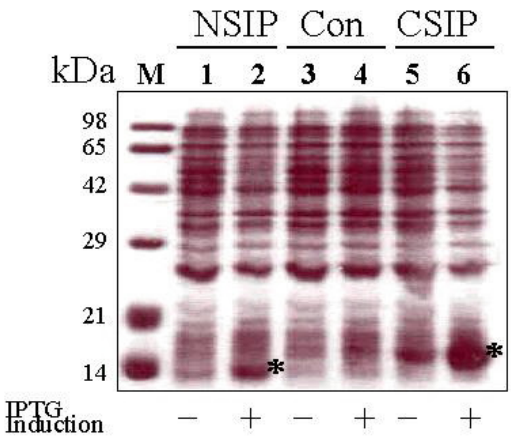
청구항 6.
제 5 항에 있어서, 상기 단백질 발현 정도는 항원-항체 결합반응을 효소결합 면역흡착 분석(ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay; RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블럿법 및 면역 블럿 분석방법 중에서 선택된 방법으로 측정하는 것을 특징으로 하는 암 진단키트.

청구항 7.
제 5 항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 미세 기판 위에 고정된 단백질 칩 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 암 진단키트.

청구항 8.
제 5 항에 있어서, 추가적으로 완충용액, 표준 항체, 발색 효소 또는 형광 물질로 표지된 2차 항체 및 발색 기질을 포함하는 것을 특징으로 하는 암 진단키 트.

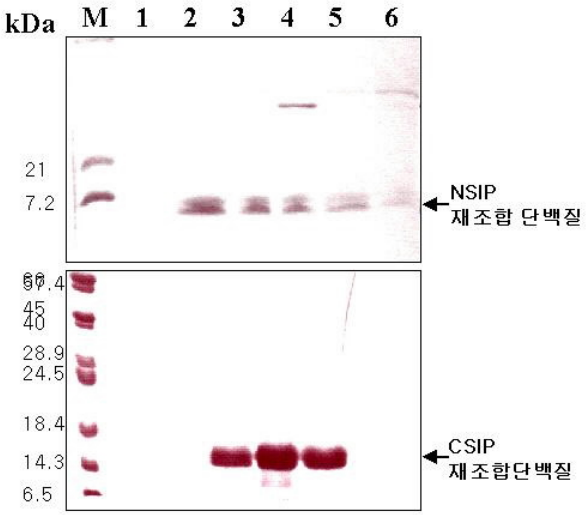
도면

도면1



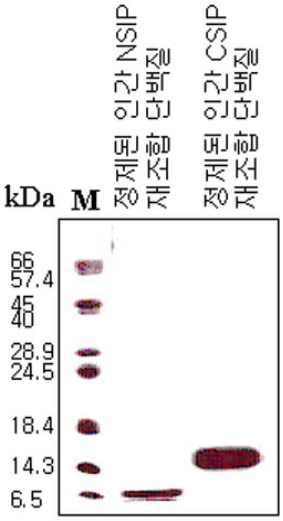
레인 M; 표준 분자량 크기 표지
레인 1; pET28a-NSIP 플라스미드를 BL21(DE3) 대장균에 형질전환시킨 세포조액
레인 2; pET28a-NSIP 플라스미드를 BL21(DE3) 대장균에 형질전환 시킨 후 이를 1mM IPTG로 3시간 재조합 단백질의 발현을 유도한 세포조액 (* ; 약 10kDa의 발현이 유도된 his tag-NSIP 재조합단백질)
레인 3; pET28a 플라스미드를 BL21(DE3) 대장균에 형질전환시킨 세포조액
레인 4; pET28a 플라스미드를 BL21(DE3) 대장균에 형질전환시킨 후 이를 1mM IPTG로 3시간 재조합 단백질의 발현을 유도한 세포조액
레인 5; pET28a-CSIP 플라스미드를 BL21(DE3) 대장균에 형질전환시킨 세포조액
레인 6; pET28a-CSIP 플라스미드를 BL21(DE3) 대장균에 형질전환시킨 후 이를 1mM IPTG로 3시간 재조합 단백질의 발현을 유도한 세포조액 (* ; 16 kDa의 발현이 유도된 his tag-CSIP 재조합단백질)

도면2a

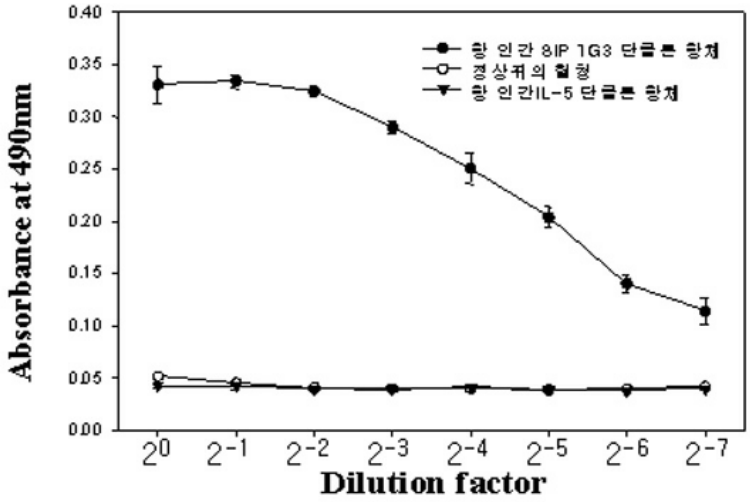


레인 M; 표준 분자량 크기 표지
레인 1; 재조합단백질을 회수용액 B1로 분리한 분획용액
레인 2; 재조합단백질을 회수용액 B2로 분리한 분획용액
레인 3; 재조합단백질을 회수용액 B3로 분리한 분획용액
레인 4; 재조합단백질을 회수용액 B4로 분리한 분획용액
레인 5; 재조합단백질을 회수용액 B5로 분리한 분획용액
레인 6; 재조합단백질을 회수용액 B6로 분리한 분획용액

도면2b

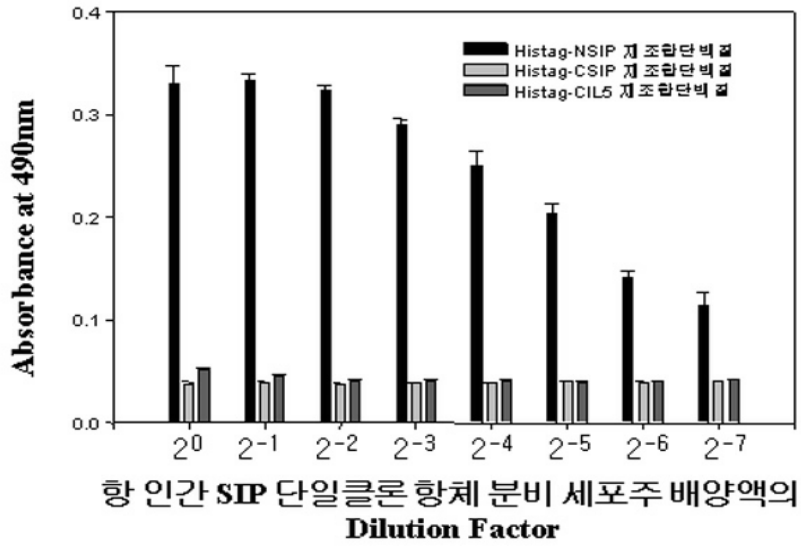


도면3a

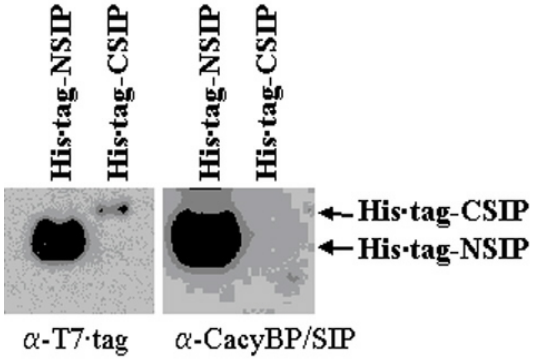


도면3b

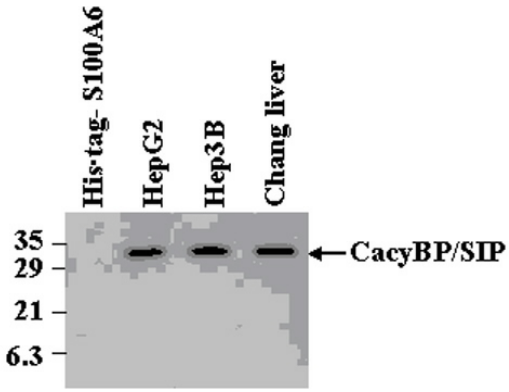
도면4



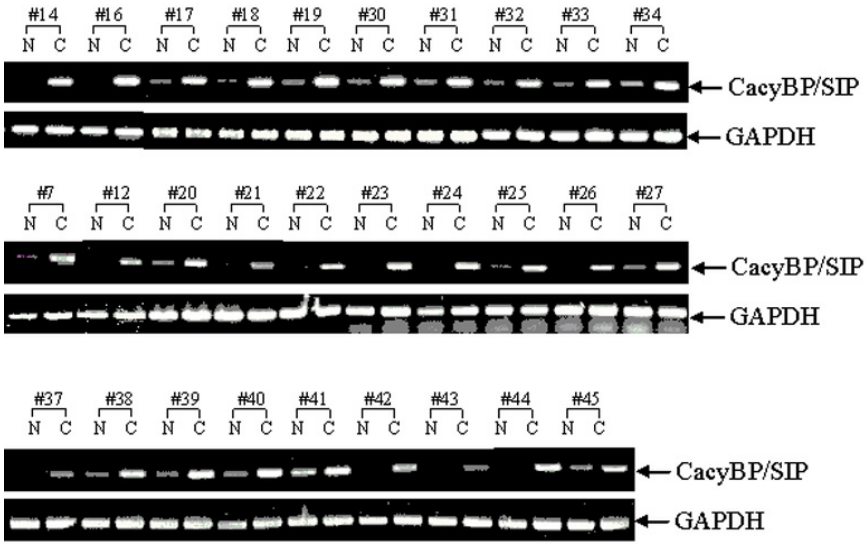
도면5



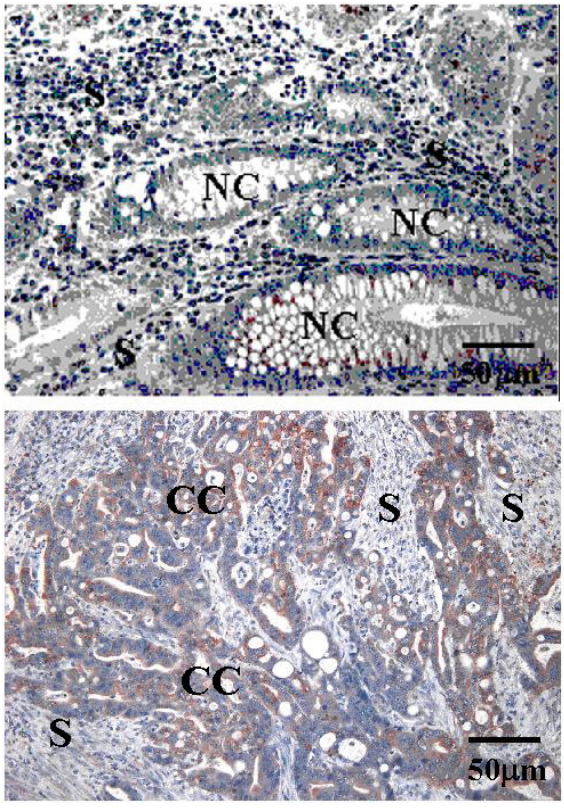
도면6


His-tag- S100A6
HepG2
Hep3B
Chang liver
35
29
21
6.3
CacyBP/SIP

도면7


#14 #16 #17 #18 #19 #30 #31 #32 #33 #34
N C N C N C N C N C N C N C N C N C N C
CacyBP/SIP
GAPDH
#7 #12 #20 #21 #22 #23 #24 #25 #26 #27
N C N C N C N C N C N C N C N C N C N C
CacyBP/SIP
GAPDH
#37 #38 #39 #40 #41 #42 #43 #44 #45
N C N C N C N C N C N C N C N C N C
CacyBP/SIP
GAPDH

도면8


S
NC
S
NC
NC
S
50μm
CC
S
S
CC
S
50μm

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

<120> Monoclonal antibody specific for human Calcyclin and
Siah-1-interacting Protein and fusion cell strain producing same

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2435

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gcagcgccgc gactcgtgcg ggtaggcgtc tgcgctcggt ttgagggctc ggcgcggggt 60

ttcctgttcc tccttctgcg cggctgcagc tcgggacttc ggcctgaccc agcccccatg 120

gcttcagaag agctacagaa agatctagaa gaggtaaagg tgttgctgga aaaggctact 180

aggaaaagag tacgtgatgc ccttacagct gaaaaatcca agattgagac agaaatcaag 240

aacaagatgc aacagaaatc acagaagaaa gcagaacttc ttgataatga aaaaccagct 300

gctgtggttg ctcccattac aacgggctat acggtgaaaa tcagtaatta tggatgggat 360

cagtcagata agtttgtgaa aatctacatt accttaactg gagttcatca agttcccact 420

gagaatgtgc aggtgcattt cacagagagg tcatttgatc ttttggtaaa gaatctaaat 480

gggaagagtt actccatgat tgtgaacaat ctcttgaaac ccatctctgt ggaaggcagt 540

tcaaaaaaag tcaagactga tacagttctt atattgtgta gaaagaaagt ggaaaacaca 600

aggtgggatt acctgaccca ggttgaaaag gagtgcaaag aaaaagagaa gccctcctat 660

gacactgaaa cagatcctag tgagggattg atgaatgttc taaagaaaat ttatgaagat 720

ggagacgatg atatgaagcg aaccattaat aaagcctggg tggaatcaag agagaagcaa 780

gccaaaggag acacggaatt ttgagacttt aaagtcgttt tgggaactgt gatgtgatgt 840

ggaaatactg atgtttccag taagggaata ttggtgagct gcatatataa atttgacaga 900

tagctattta catagccttc taagtaaagg caatgaattc tccatttcct actggaggat 960

ttatttaaat aaaatatgct tattaaacac tcctgcaaag atggttttat tagtaccctg 1020

gtcattttgt tcaaggaagg gttatattgc attctcacgt gaaatataaa aagcaagtct 1080

tgcccaataa aaacgctaca ttgtgtgtat tttttgttca gctaagaatt ggaaaagtat 1140

ttgcttgcct tttaagttac tgacatcagc ttccaccagt gtaaaaattg agtaaaacct 1200

gaagttttgc ataaaatgca aatcggtgcc tgtgcttgaa ggttgctgta gagcatctga 1260

ccccttatta ccaccttaag caatgtatat gccatgcatt accatgcact aattcaatca 1320

caggtgtttc tatctagatt taaatatatt tgtcaatgaa tgtggaatag aaaatctaaa 1380

catgacaata atagacatat ctttgtatgg taccagttag ttttgccgtg gatcagatgg 1440

tttataaaag taataaccat aaagcaaaaa ataatttgaa agcccgtcta ttcctatgct 1500

caataaagtt aagtttttct tcattagaac agttttatga tttatttgtc taggagtatg 1560

tcagaaaaat caggctttta gtaggaatta ctcctattcc ccctgaagtc aggaccagtg 1620

cctgtgatct ccattacttt attttcctgg aggtattagc caacacagtt agatcagaga 1680

aagcaattga agccaggcat gaaggctggc gcccgtaatc ccagctacta aggctggagg 1740

atcacttcag cccaggagtt taaggctgca gtgagctatg atgatgccac tgtactgcag 1800

cttgggtaac agattgagaa cctgtctcat taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagccgttag 1860

acacacagga aaaatccaga agggtaaact aaactaaagc tacaattaat atgggaattt 1920

ggaagaagtg gtaggattta aaatacagaa acagtttatg tataggatag ctataagtaa 1980

atactgaaac acattatgcc tctgtaattg gggttgacac atgaacagaa tagcagacac 2040

aatgcatatg aaagttacag aatatggtaa aagtggggta aagatgggtt tttaatgata 2100

ctaagataac tgaaaatagg catatagata tattccaagc cgcctgacga tctaattgta 2160

aaaagtaaag catacaaata ctagaagaaa atggaggaaa acgacattat atgtgactta 2220

aaacctagaa gaaataaata aaactattga tcaattttaa ctacataaaa atgtttatag 2280

gacaagaaaa accccaccat aacccaaggc aaacaatgta ttgacaggat tccaataatt 2340

aagaatactt catacaaaaa gaaatgtaaa tgacctttaa catgtaaaga tgctcacctt 2400

gttcagaaga gaataaacca gtgtttttac ctttc 2435

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forword primer of NSIP

<400> 2

cgggatccat ggcttcagaa gagctacag 29

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer of NSIP

<400> 3

ccgctcgagt catggttttt cattatcaag aag 33

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forword primer of CSIP

<400> 4

cgggatccct tatattgtgt agaaagaaa 29

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer of CSIP

<400> 5

ccgctcgagt caaaattccg tgtctccttt 30