



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0098537
(43) 공개일자 2017년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6818 (2013.01)

C12Q 1/6876 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0020573

(22) 출원일자 2016년02월22일

심사청구일자 2016년02월22일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

이원중

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 생명공학부
29호관 511호(송도동, 인천대학교)

정승아

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 생명공학부
29호관 511호(송도동, 인천대학교)

(74) 대리인

차준용

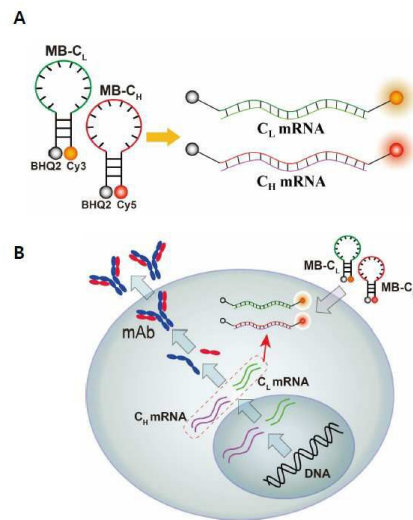
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 분자 비컨을 이용한 살아 있는 세포에서 단일클론항체의 경쇄와 중쇄 mRNA 검출에 의한 세포주 선별방법

(57) 요약

본 발명은 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간 단일클론항체(mAb)의 경쇄 및 중쇄 불변영역과 상보적으로 결합하도록 제작된 분자 비컨(Molecular beacons; MB- C_L , MB- C_H)을 프로브로 사용함으로써, 살아 있는 세포 내에서 발현된 타겟 단일클론항체의 경쇄 및 중쇄 mRNA를 각각 동시에 검출할 수 있어 생산되는 항체의 양과 더불어 품질에 대한 정보를 획득할 수 있고, 이를 통해 항체 치료제 생산을 위한 우수 세포주 구축 및 선별 단계에서 생산성과 품질을 함께 보장할 수 있는, 살아 있는 세포에서의 단일클론항체 생산 세포주 선별방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2565/626 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 인간 단일클론항체(Monoclonal antibody; mAb)의 경쇄(Light chain) 불변영역 mRNA 및 중쇄(Heavy chain) 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합할 수 있는 각각의 분자 비컨(Molecular beacon; MB)을 제작하는 단계;
- b) 상기 a) 단계에서 제작된 각각의 분자 비컨을 단일클론항체 생산 세포주의 세포 내부로 운반하여, 각각의 분자 비컨이 단일클론항체를 생산하는 살아 있는 세포 내에서 발현된 경쇄 불변영역 mRNA 및 중쇄 불변영역 mRNA와 각각 특이적으로 결합하도록 하는 단계; 및
- c) 상기 b) 단계에 의한 각각의 결합에 의해 나타나는 형광 신호를 측정하여, 살아 있는 세포에서 타겟 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA를 동시에 검출해내는 단계;를 포함하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 a) 단계는 분자 비컨의 루프(Loop) 부분을 단일클론항체의 경쇄 불변영역 mRNA 및 중쇄 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합하도록 제작하는 것임을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 분자 비컨은 시아닌(Cyanine) 계열의 형광체와, ?처(Quencher)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

경쇄 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합하는 분자 비컨(MB-C_L)은 하기 서열번호 1로 표시되고,

중쇄 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합하는 분자 비컨(MB-C_H)은 하기 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법:

[서열번호 1]

5'-Cy3-GCGGTCCCTGCTCTGTGACACTCTCCGACCGC-BHQ2-3'

[서열번호 2]

5'-Cy5-CCGCAGCCATTGCTCTCCCACTCCACCTGCGG-BHQ2-3'.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 b) 단계는 경쇄 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합하는 분자 비컨(MB-C_L)과 중쇄 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합하는 분자 비컨(MB-C_H)을 독립적으로 세포 내부로 운반하거나, 함께 혼합하여 세포 내부로 운반하는 것임을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 b) 단계는 스트렙토라이신 O(Streptolysin O)를 이용하여 분자 비컨을 세포 내부로 운반하는 것임을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 b) 단계는 분자 비컨을 스트렙토라이신 O(Streptolysin O) 및 TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphine)이 혼합된 혼합용액 하에서 세포와 접촉시키는 것을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 b) 단계 이전에, 실시간 PCR(Real-time PCR)을 이용하여, 살아 있는 세포 내에서 발현된 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA를 정량 분석하는 과정을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

하우스키핑(Housekeeping) 유전자로 인간 액틴(Actin) mRNA를 사용하고,

하기 서열번호 3으로 표시되는 포워드 프라이머(Forward primer), 및 하기 서열번호 4로 표시되는 리버스 프라이머(Reverse primer)를 사용하는 것을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법:

[서열번호 3]

5'-ATGAAGTGTGACGTTGACATCCG-3'

[서열번호 4]

5'-GCTTGCTGATCCACATCTGCTG-3'.

청구항 10

제9항에 있어서,

경쇄에 대한 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머는 각각 하기 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되고,

중쇄에 대한 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머는 각각 하기 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 것임을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법:

[서열번호 5]

5'-CTGCACCATCTGTCTTCATCT-3'

[서열번호 6]

5'-AGGCGTAGACTTTGTGTTTCT-3'

[서열번호 7]

5'-CCGAGAACCACAGGTGTAT-3'

[서열번호 8]

5'-ATTTACCCGGAGACAGGGA-3'.

청구항 11

제10항에 있어서,

실시간 PCR 수행 결과 나타나는 C_T (Threshold cycle) 값은 경쇄 mRNA의 경우 18.9, 중쇄 mRNA의 경우 30.2인 것을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 c) 단계는 형광 측정기 또는 유세포 분석기를 이용하여 결합에 의해 나타나는 형광 신호를 측정하는 것임을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 선별방법은 생산되는 단일클론항체의 양과 더불어 품질에 대한 정보를 제공할 수 있는 것임을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 생산되는 단일클론항체의 품질은 검출된 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA의 양적 비율에 따라 결정되는 것임을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

선별된 세포주는 치료용 단일클론항체의 생산에 사용되는 것을 특징으로 하는, 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간 단일클론항체(mAb)의 경쇄 및 중쇄 불변영역과 상보적으로 결합하도록 제작된 분자 비컨(Molecular beacons; MB-C_L, MB-C_H)을 프로브로 사용함으로써, 살아 있는 세포 내에서 발현된 타겟 단일클론항체의 경쇄 및 중쇄 mRNA를 각각 동시에 검출할 수 있어 생산되는 항체의 양과 더불어 품질에 대한 정보를 획득할 수 있고, 이를 통해 항체 치료제 생산을 위한 우수 세포주 구축 및 선별 단계에서 생산성과 품질을 함께 보장할 수 있는, 살아 있는 세포에서의 단일클론항체 생산 세포주 선별방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 항체 의약품의 경우 합성 의약품과 달리 햄스터와 인간 등 포유동물세포에서 생산될 수 있기 때문에 전체 의약품 개발 분야에 있어 중요한 부분을 차지하고 있다. 특히 최근 치료용 단일클론항체(Monoclonal antibody; mAb)를 중심으로 한 바이오 의약품 시장이 급속도로 성장하면서 재조합 항체 생산 기술에 대한 필요성이 대두되고 있으며, 항체 생산에 사용되는 우수 세포주를 효율적으로 선별하는 기술 개발에 대한 니즈가 지속적으로 증가하고 있다.

[0003] 이를 위해 치료용 항체 발현 벡터가 트랜스펙션(Transfection)된 세포군을 희석하여 세포주를 선별하는 방식이 고전적으로 사용되었다면, 최근에는 FACS (Fluorescence activated cell sorter)를 기반으로 세포로부터 배출되는 치료용 항체를 세포 표면에서 검출하는 방식의 기술이 많이 사용되고 있다. FACS 기반 방식의 경우, 항체가 배출되면서 일시적으로 세포 표면에 존재하게 되는데, 이렇게 생산된 항체 중쇄(Heavy chain)의 불변영역(Constant region)을 형광 부착 항체로 표지하여 검출하는 방법이 주로 사용된다. 이 방법은 비교적 단시간 내에 다수의 세포주 생산성을 평가하여 우수한 세포주 후보들을 선별할 수 있다는 장점을 갖고 있다.

[0004] 그러나, 이러한 방법들은 세포주의 생산성 예측 측면에서는 유용하게 사용될 수 있지만, 생산된 항체의 품질(Quality)에 대한 정보를 제공할 수 없는 한계가 있다. 신약뿐만 아니라 기존 바이오 의약품들의 글로벌 특허 만료가 다가오고 바이오시밀러 항체 개발을 위한 경쟁이 심화되고 있는 현 상황에서, 치료용 항체의 품질은 생산성과 더불어 새로운 항체 기반 바이오 의약품의 성공적인 개발과 상업화를 위해 매우 중요한 요소가 된다. 따라서 세포주의 초기 선별 과정에서 생산되는 단일클론항체의 양과 더불어 품질에 대한 정보를 얻을 수 있는 새로운 방법이 필요하다.

[0005] 이와 관련하여, 최근 제넨텍(Genentech, Inc.)은 세포에서 항체 경쇄(Light chain)와 중쇄(Heavy chain)의 mRNA 양적 비율이 생산되는 단일클론항체의 양은 물론 품질(Quality)을 결정하는 중요한 변수가 된다고 보고한 바 있다.

[0006] 그러나, 현재까지 세포에서 생산되는 단일클론항체의 양과 질 모두에 기반하여 세포주를 선별하는 구체적인 기술은 개발된 바 없고, 특히 세포가 살아 있는 상태에서 경쇄와 중쇄의 mRNA를 검출하는 기술 또한 전무한 상황이다.

[0007] 이에, 하나의 살아 있는 세포 내부에서 경쇄와 중쇄의 mRNA 모두를 동시에 검출함으로써, 높은 항체 생산성과 더불어 고품질의 요구를 함께 충족시킬 수 있는 새로운 세포주 선별 기술에 대한 개발이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1312354호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자 한 것으로, 단일클론항체를 생산하는 살아 있는 세포에서 항체의 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA 모두를 효율적으로 검출할 수 있는 새로운 방법을 제공하는 것을 기술적 과제로 한다.

[0010] 구체적으로, 본 발명자들은 예의 연구를 거듭한 결과, 올리고뉴클레오타이드 프로브인 분자 비컨(Molecular beacon; MB)을 이용하여 상기 기술적 과제를 달성할 수 있었고, 이 경우 하나의 세포에서 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA가 동시에 효율적으로 검출됨을 형광 분석 및 유세포 분석을 통해 실증하였다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은
- [0012] a) 인간 단일클론항체(Monoclonal antibody; mAb)의 경쇄(Light chain) 불변영역 mRNA 및 중쇄(Heavy chain) 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합할 수 있는 각각의 분자 비컨(Molecular beacon; MB)을 제작하는 단계;
- [0013] b) 상기 a) 단계에서 제작된 각각의 분자 비컨을 단일클론항체 생산 세포주의 세포 내부로 운반하여, 각각의 분자 비컨이 단일클론항체를 생산하는 살아 있는 세포 내에서 발현된 경쇄 불변영역 mRNA 및 중쇄 불변영역 mRNA와 각각 특이적으로 결합하도록 하는 단계; 및
- [0014] c) 상기 b) 단계에 의한 각각의 결합에 의해 나타나는 형광 신호를 측정하여, 살아 있는 세포에서 타겟 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA를 동시에 검출해내는 단계;를 포함하는,
- [0015] 분자 비컨을 이용한 단일클론항체 생산 세포주의 선별방법을 제공한다.
- [0016] 구체적으로, 본 발명은 항체 발현 세포에서 경쇄 및 중쇄 mRNA의 양과 비율에 따라 해당 세포주의 배양 중 항체 발현량과 품질이 미리 결정될 수 있다는 점에 착안한 것으로, 분자 비컨(MB)을 이용한 mRNA의 살아 있는 세포에서의 검출 기술을 제공하는 것이다.
- [0017] 상기 a) 단계는 살아 있는 세포에서 경쇄 및 중쇄 mRNA를 검출하기 위한 프로브로서, 항체의 경쇄 불변영역 mRNA 및 중쇄 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합할 수 있는 각각의 분자 비컨(MB- C_L , MB- C_H)을 설계하는 단계이다.
- [0018] 본원에서, 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 조건 또는 엄중 조건(Stringent condition) 하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, “실질적으로 상보적(Substantially complementary)” 및 “완전히 상보적(Perfectly complementary)”인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0019] 상기 분자 비컨(MB)은 스템(Stem)과 루프(Loop) 구조로 이루어져 있는 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드로서, 5' 말단에 형광체(또는 형광물질, Fluorescence dye)가, 3' 말단에 ?처(또는 소광체, Quencher)가 존재한다. MB와 상보적으로 결합하는 타겟 mRNA가 없을 경우 스템 부분이 열리지 않게 되어 ?처와 형광체가 가까이 존재하기 때문에 형광을 나타내지 않는다. 그러나 타겟 mRNA가 존재하는 경우 MB 루프 부분과 타겟이 상보적으로 결합하여 스템 부분이 열리게 되며, 이때 ?처와 형광체가 멀어지게 되어 형광을 나타낸다. 따라서 MB는 타겟 mRNA의 존재 유무에 따라 온/오프 신호를 줄 수 있기 때문에 살아 있는 세포 내에서 타겟 mRNA와 결합하지 않은 MB를 분리할 필요가 없으며, 결합 특이성이 상당히 높기 때문에 살아 있는 세포에서의 mRNA 검출에 유용하게 사용될 수 있다(도 1 참조). 즉 본 발명에서는 MB의 루프 부분을 인간 단일클론항체의 경쇄 및 중쇄의 불변영역(C_L , C_H) mRNA와 상보적으로 결합하도록 제작하여 각각의 MB를 단일클론항체 생산 세포주에 운반함으로써 타겟 mRNA들을 검출할 수 있다.
- [0020] 상기 분자 비컨(MB)에 포함되는 형광체로는 플루오레세인(Fluorescein), Cy3, Cy5, 텍사스 레드(Texas red), 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 운반의 용이성 측면에서는 Cy3, Cy5와 같은 시아닌(Cyanine) 계열의 형광체를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0021] 또한, 상기 분자 비컨(MB)에 포함되는 ?처로는 특정의 형광체 결합할 수 있는 적절한 ?처를 선택할 수 있으며, 예컨대 3'-DABCYL(4-(4-dimethyl-aminophenylazo)benzoic acid) 또는 블랙 홀 소진체(Black Hole Quencher; BHQ)를 사용할 수 있다. 형광체로서 Cy3 또는 Cy5를 사용하는 경우는 BHQ2를 ?처로 사용하는 것이 적절하다.
- [0022] 일 구체예에서, 경쇄 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합하는 분자 비컨(MB- C_L)은 하기 서열번호 1로 표시되는 것, 중쇄 불변영역 mRNA와 상보적으로 결합하는 분자 비컨(MB- C_H)은 하기 서열번호 2로 표시되는 것일 수 있으나, 분자 비컨은 각각의 표적 mRNA에 따라 다르게 설계되는 것인바 그 형태가 반드시 이에 한정되는 것은 아니

다.

- [0023] [서열번호 1]
- [0024] 5'-Cy3-GCGGTCCCTGCTCTGTGACACTCTCCGACCGC-BHQ2-3'
- [0025] [서열번호 2]
- [0026] 5'-Cy5-CCGCAGCCATTGCTCTCCCACTCCACCTGCGG-BHQ2-3'
- [0027] 상기 b) 단계는 상기 a) 단계에서 제작된 분자 비컨(MB-C_L, MB-C_H)을 세포에 접촉 및 그 내부로 도입하여, 두 가지 분자 비컨이 대상 세포 내에서 발현된 경쇄 및 중쇄 불변영역 mRNA와 각각 상보적으로 결합하도록 하는 단계이다.
- [0028] 이때, MB-C_L과 MB-C_H는 각각 독립적인 공정으로 세포 내부에 운반된 후 각 mRNA와 상보적으로 결합하여 형광 검출될 수 있을 뿐만 아니라, MB-C_L과 MB-C_H를 함께 혼합하여 하나의 공정으로 세포 내부에 운반한 후 동시에 형광 검출을 하여도 각각의 결합 특이도가 저하되지 않음을 실험결과 확인하였다. 즉 경쇄와 중쇄를 각각 검출하는 방식과 더불어 둘을 한 세포 내에서 동시에 검출할 수 있는 장점이 있다.
- [0029] 일 구체예에서, 상기 분자 비컨은 스트렙토라이신 O(Streptolysin O)를 이용하여 세포 내부로 효율적으로 운반될 수 있으며, 더욱 상세하게는 스트렙토라이신 O(Streptolysin O) 및 TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphine)이 혼합된 혼합용액 하에서 대상 세포와 접촉될 수 있다. 이때, TCEP는 SLO가 산화되어 쉽게 활성을 잃는 현상을 억제하여 그 활성을 유지시켜 주는 역할을 한다.
- [0030] 또한, 상기 b) 단계 이전에, 실시간 PCR(Real-time PCR)을 이용하여, 살아 있는 세포 내에서 발현된 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA를 정량 분석하는 과정이 더 포함될 수 있다. 이때, 인간 액틴(Actin) mRNA를 하우스키핑(Housekeeping) 유전자로, 하기 서열번호 3으로 표시되는 것을 포워드 프라이머(Forward primer)로, 하기 서열번호 4로 표시되는 것을 리버스 프라이머(Reverse primer)로 사용하여 실시간 PCR를 수행할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] [서열번호 3]
- [0032] 5'-ATGAAGTGTGACGTTGACATCCG-3'
- [0033] [서열번호 4]
- [0034] 5'-GCTTGCTGATCCACATCTGCTG-3'
- [0035] 또한, 경쇄에 대한 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머로는 각각 하기 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 것, 중쇄에 대한 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머로는 각각 하기 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 것을 사용할 수 있다. 이때, 실시간 PCR 수행 결과 나타나는 C_T(Threshold cycle) 값은 경쇄 mRNA의 경우 18.9, 중쇄 mRNA의 경우 30.2 정도의 수치를 나타낸다.
- [0036] [서열번호 5]
- [0037] 5'-CTGACCATCTGTCTTCATCT-3'
- [0038] [서열번호 6]
- [0039] 5'-AGGCGTAGACTTTGTGTTTCT-3'
- [0040] [서열번호 7]
- [0041] 5'-CCGAGAACCACAGGTGTAT-3'
- [0042] [서열번호 8]
- [0043] 5'-ATTTACCCGGAGACAGGA-3'
- [0044] 상기 c) 단계는 분자 비컨과 mRNA의 특이적 결합에 의해 나타나는 형광 신호를 소정의 방법으로 측정하여, 타겟 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA를 동시에 검출해내는 단계이다. 본 발명에서는 경쇄 및 중쇄 mRNA와 상보적으로 결합되도록 설계된 두 가지 분자 비컨을 프로브로 사용함에 따라, 살아 있는 세포 내에서 경쇄 및 중쇄 mRNA 각각의

발현량은 물론 이들의 비율에 관한 데이터까지 획득할 수 있는바, 생산되는 단일클론항체의 양과 더불어 품질에 대한 정보를 제공할 수 있는 장점이 있다. 이때, 생산되는 단일클론항체의 품질은 검출된 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA의 양적 비율에 따라 결정된다.

[0045] 본 단계에서, 상기 형광 신호의 측정은 형광 측정기 또는 유세포 분석기를 이용하여 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명에 따르면 살아 있는 세포에서 생산되는 단일클론항체(mAb)의 경쇄 mRNA 및 중쇄 mRNA를 동시에 높은 특이도로 검출할 수 있다.

[0047] 따라서, 생산되는 항체의 양과 더불어 품질에 대한 정보를 제공할 수 있는바, 항체 치료제 생산을 위한 우수 세포주 구축 및 선별 단계에서 생산성과 품질 제고를 위해 매우 적합하게 활용될 수 있다.

[0048] 아울러, 본 발명은 타겟 mRNA와 결합하지 않은 프로브(즉, MB)를 따로 분리할 필요가 없어 검출 공정이 간편하다.

[0049] 본 발명의 분자 비컨을 이용한 세포주 선별방법은 인간 항체의 불변영역에 해당되는 mRNA 부분을 검출하는 방식을 취하는바, 치료용 단일클론항체의 생산은 물론 현재 상용화되었거나 개발 중인 모든 항체 치료제에 적용될 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 분자 비컨(MB)을 이용한 살아 있는 세포에서의 단일클론항체 mRNA 검출에 관한 것으로, (A)는 분자 비컨, 각 분자 비컨과 C_L 및 C_H mRNA와의 혼성화(Hybridization)를 보여주는 개략도, (B)는 분자 비컨을 이용한 항체 발현 세포주 선별방법에 관한 개략도이다. (* mAb를 인코딩하는 플라스미드가 트랜스펙션된 후, C_L 및 C_H DNA가 세포 내에서 mRNA 및 단백질로 전사 및 번역됨. 번역, 폴딩 및 어셈블링 이후 mAb가 세포로부터 분비됨. C_L 및 C_H mRNA 각각에 특이적인 분자 비컨(MB- C_L 및 MB- C_H)을 이용해 살아 있는 세포에서 C_L 및 C_H 를 검출함.)

도 2는 mAb 플라스미드의 일시적 트랜스펙션(Transient transfection) 후, C_L 및 C_H mRNA의 Real-time PCR 분석 결과를 나타낸 그래프이다. (* 전체 RNA를 트랜스펙션된 세포로부터 추출 및 분리하고, mAb mRNA에 대해 Real-time PCR을 수행함. β -actin, C_L 및 C_H mRNA의 C_T (Threshold cycle) 값은 각각 23.1, 18.9 및 30.2로 나타남.)

도 3은 용액에서 분자 비컨(MB)과 그 타겟 미믹(Mimics)과의 혼성화에 관한 것으로, (A)는 MB- C_L 을 각각 다른 농도의 C_L mRNA 미믹 조건으로 배양한 경우, (B)는 MB- C_H 를 각각 다른 농도의 C_H mRNA 미믹 조건으로 배양한 경우, (C)는 MB- C_L 및 MB- C_H 를 각각 다른 농도의 C_L 및 C_H mRNA 미믹 또는 랜덤 타겟 조건으로 배양한 경우이다.

도 4는 트랜스펙션 전(w/o TF)과 후(w/ TF) 살아 있는 세포에서의 인간 단일클론항체의 mRNA 이미징에 관한 것으로, (A) 및 (B)는 형광 측정기를 이용한 경우, (C) 및 (D)는 동일한 샘플들에 대해 유세포 분석기를 이용한 경우이다. (* MB- C_L (A) 또는 MB- C_H (B)는 mAb 플라스미드 트랜스펙션 이틀 후 세포 내로 각각 운반되었고, 형광 강도는 형광 측정기를 이용해 측정함. C_L mRNA (C) 및 C_H mRNA (D) 검출에 있어 각 MB로부터 발생된 형광이 모두 증가함.)

도 5는 분자 비컨(MB)을 이용한 살아 있는 세포에서의 C_L 및 C_H mRNA의 동시 검출을 유세포 분석기를 이용해 분석한 결과이다. (* 세포들은 mAb 플라스미드로 이틀 동안 트랜스펙션되었고, 동일한 세포들에서 MB- C_L 및 MB- C_H 를 세포 내로 운반하여 mRNA를 검출함. 트랜스펙션된 세포에서 C_L mRNA (A) 및 C_H mRNA (B)로부터 발생된 형광이 모두 증가하였는바, 동일한 세포에서 C_L 및 C_H mRNA가 성공적으로 검출되었음을 의미함. (C) 및 (D)는 mAb 플라스미드 트랜스펙션 유무에 따라 세포에서 MB- C_L 및 MB- C_H 로부터 발생된 형광 신호를 나타낸 그래프로, 트랜스펙션되지 않은 세포의 경우 C2 영역에서 전체 세포군이 50.4%에 불과한 반면, 트랜스펙션된 세포의 경우 85.3%로 증가하였는바, MB를 이용하여 서로 다른 경쇄 및 중쇄 mRNA 발현량을 갖는 세포를 선별할 수 있음을 의미함.)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.
- [0052] **실시예**
- [0053] (1) 분자 비컨 설계 및 용액에서의 혼성화 분석
- [0054] 단일클론항체 경쇄 및 중쇄 불변영역에 상보적으로 결합하는 MB(각 MB-C_L, MB-C_H)는 각각 서열이 5'-Cy3-GCGGTCCCTGCTCTGTGACACTCTCCGACCGC-BHQ2-3', 5'-Cy5-CCGCAGCCATTGCTCTCCACTCCACCTGCGG-BHQ2-3' (Bio Basic Canada Inc.)인 것을 사용하였다. 여기서, 밑줄 친 부분은 MB 구조 중 스템(Stem)을 나타내며, 나머지 부분은 각각 경쇄와 중쇄 mRNA와 결합할 수 있도록 설계된 루프(Loop) 부분이다.
- [0055] 각 MB의 결합 특이도를 확인하기 위해 용액 중에서 경쇄와 중쇄 mRNA에 대한 각각의 미믹(Mimic)을 제작하여 결합 정도를 확인하였다. 각 미믹은 인간 단일항체 경쇄와 중쇄 불변 부위의 일부분으로, 서열은 각각 5'-GGAGAGTGTACAGAGCAGC-3', 5'-GTGGAGTGGGAGGCAATGG-3' (Cosmogenetech, Inc.)으로 제작하였다.
- [0056] 비특이적 결합 여부를 확인하기 위해 사용된 무작위 미믹(Random mimic)의 서열은 5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (Cosmogenetech, Inc.)로 하였다.
- [0057] 결합 실험에 사용된 미믹의 농도는 0, 10, 100, 500 nM였으며, 사용된 MB 농도는 100 nM였다. 경쇄와 중쇄 미믹을 각각 또는 동시에 Nuclease free PBS 용액 안에 넣고 MB와 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 형광 측정기 (Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 결합 정도를 측정하였다.
- [0058] 경쇄 결합 MB의 경우에는 여기(Excitation) 파장과 방출(Emission) 파장을 각각 550 nm와 570 nm에서, 중쇄 결합 MB의 경우에는 각각 650 nm와 670 nm의 파장을 사용하였다. 미믹의 농도가 0 nM일 때의 형광 값을 백그라운드로 하여 S/B 비율을 계산하였다.
- [0059] (2) 세포 배양 및 트랜스펙션
- [0060] 실험에 사용된 HeLa 세포는 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Biowest, France)를 사용하여 배양하였으며, 10%(v/v) 소태아혈청(FBS, Biowest)과 1%(v/v) 페니실린을 첨가하여 37℃에서 5% CO₂를 공급한 상태로 배양하여 실험에 사용하였다.
- [0061] 세포 내 단일클론항체 생산을 위해 HeLa 세포를 6 웰 플레이트에 6 x 10⁵ 개/well로 씨딩하고, 24시간 경과 후 단일클론항체 생산 벡터를 jetprime® (Polyplus-transfection Inc., USA)을 이용하여 트랜스펙션하였다.
- [0062] (3) RNA 분리 및 Real-time PCR을 이용한 항체 mRNA 발현 분석
- [0063] 단일클론항체 벡터를 트랜스펙션한 세포에서 발현된 경쇄와 중쇄 mRNA의 정량적 분석을 위해 Real-time PCR을 진행하였다.
- [0064] 먼저, RNA 시료 준비를 위해 단일클론항체 생산 벡터가 트랜스펙션된 HeLa 세포를 48시간 동안 배양한 후 ISOL reagent(5PRIME)를 이용하여 제작사의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출 및 분리하였다. 또한 NanoDrop Lite Spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 RNA의 양 및 순도를 측정하였다. 전체 RNA는 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(TOYOBO, Japan)를 사용하여 cDNA로 역전사하여 합성한 후, Real-time PCR을 진행하였다.
- [0065] PCR 반응을 위해 SYBR® Realtime PCR Master Mix(TOYOBO, Japan) 5 μL, 포워드 프라이머(Forward primer) 0.5 μL(최종 500 nM), 리버스 프라이머(Reverse primer) 0.5 μL(최종 500 nM), 주형(Template) 0.5 μL, Nuclease free water 3.5 μL를 넣어 최종 부피가 10 μL가 되게 하였다.
- [0066] PCR 반응 조건은 변성(Denaturation)은 96℃에서 15초, 어닐링(Annealing)은 60℃에서 20초, 익스텐션(Extension)은 72℃에서 40초 동안 총 40 사이클 수행하였다.
- [0067] 하우스키핑(Housekeeping) 유전자로 인간 액틴(Actin) mRNA를 사용하였으며, 사용된 포워드 프라이머는 5'-ATGAAGTGTGACGTTGACATCCG-3', 리버스 프라이머는 5'-GCTTGCTGATCCACATCTGCTG-3' (Cosmogenetech, Inc.)로 하였다.

- [0068] 경쇄에 대한 포워드 프라이머는 5'-CTGCACCATCTGTCTTCATCT-3', 리버스 프라이머는 5'-AGGCGTAGACTTTGTGTTTCT-3'이었으며, 중쇄에 대한 포워드 프라이머는 5'-CCGAGAACCACAGGTGTAT-3', 리버스 프라이머는 5'-ATTACCCGGAGACAGGA-3'였다.
- [0069] (4) 형광 측정기 및 유세포 분석기를 통한 항체 mRNA 발현 검출
- [0070] 용액 및 세포 내에서 MB와 항체 경쇄 및 중쇄 mRNA와의 결합 정도를 측정하기 위해 형광 측정기(Fluorometer, VarioskanTM Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, USA)와 유세포 분석기(Flow cytometer, GalliosTM, Beckman coulter, USA)를 이용하였다.
- [0071] 세포에서의 항체 경쇄 및 중쇄 mRNA 생산을 위해, HeLa 세포를 단일클론항체 생산 벡터를 트랜스펙션한 후 48시간 동안 배양하였다.
- [0072] 세포 내 MB 운반을 위한 스트렙토라이신 0(SLO, Sigma, USA)를 활성화시키기 위해 0.2 U/mL SLO에 5 mM TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphine)(Thermo, USA)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다.
- [0073] SLO를 활성화시킨 뒤, 세포를 탈착시킨 후, 배양배지를 첨가한 다음, 세포 수를 4×10^5 cells로 맞추어 PBS 버퍼로 세척 후 MB mRNA 검출 실험을 진행하였다. MB의 세포 내 운반을 위해 400 nM의 MB와 활성화된 SLO, 그리고 DMEM 배지(w/o antibiotics, FBS)가 혼합된 MB 운반 배지를 제작하였다.
- [0074] MB 운반 배지를 세포에 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 1차례 세척을 통해 운반되지 않은 MB를 제거한 다음, 새로운 배양배지를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 추가 배양하였다.
- [0075] 이와 같이 준비된 시료를 형광 측정기와 유세포 분석기를 통해 결합 신호를 측정하였다.
- [0076] **실험예**
- [0077] (1) Real-time PCR을 통한 세포 내 발현된 경쇄와 중쇄 mRNA의 정량 분석
- [0078] 살아 있는 세포 내에서 발현된 단일클론항체 경쇄와 중쇄 mRNA를 각각 MB-C_L과 MB-C_H MB로 검출하기 위한 실험을 수행하기에 앞서, 이들의 양을 Real-time PCR로 측정하였다.
- [0079] 먼저, 단일클론항체 생산용 벡터를 세포에 트랜스펙션한 후, 48시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포로부터 전체 RNA를 추출 및 분리한 후 cDNA를 합성을 하였다.
- [0080] 동량의 RNA를 기준으로 경쇄와 중쇄를 검출할 수 있는 프라이머를 이용하여 Real-time PCR을 수행한 결과, 경쇄 mRNA의 경우 C_T(Threshold cycle) 값이 18.9, 중쇄 mRNA의 경우 C_T 값이 30.2가 나왔다(도 2).
- [0081] 이를 통해, 세포 내에서 경쇄와 중쇄 mRNA가 발현이 되었음을 확인할 수 있었으며, 경쇄 mRNA 양이 중쇄 mRNA 발현량에 비해 높은 것을 확인하였다.
- [0082] (2) 용액 분석(Solution assay)을 통한 MB의 결합 특이도(Specificity) 확인
- [0083] 단일클론항체의 경쇄 및 중쇄 mRNA와 결합하도록 제작된 MB(MB-C_L, MB-C_H)의 결합 특이도를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.
- [0084] 이를 위해 경쇄 및 중쇄 mRNA와 같은 서열을 갖는 합성 타겟 DNA(미믹)와 각각의 MB를 용액 중에서 혼합한 후 형광 신호를 측정하였다. 경쇄와 중쇄 미믹 농도를 0, 10, 100, 500 nM로 변화시킨 후 각각에 대해 100 nM의 MB-C_L 또는 MB-C_H와 결합시켰을 경우, 모두 미믹의 농도 증가에 비례하여 MB의 S/B 값이 증가하였다 (도 3A, B).
- [0085] 이어서, 경쇄 및 중쇄 미믹이 용액 중 동시에 존재할 때, MB-C_L과 MB-C_H를 동시에 혼합한 후, 용액 중에서 각각의 결합 특이도 측정해 보았다. 도 3C에서 보는 것과 같이, 경쇄와 중쇄 미믹이 동시에 있을 경우에도 MB는 각 타겟에 대해 높은 S/B 값을 가졌으며, 미믹의 농도가 높아질수록 여전히 S/B 값이 증가함을 확인할 수 있었다.
- [0086] 반면, 경쇄와 중쇄 미믹 대신 MB와 상보성이 전혀 없는 랜덤 타겟 DNA(R DNA)와의 결합 실험에서는 R DNA의 농도가 500 nM까지 증가되었음에도 불구하고 S/B 값의 변화가 없었다.
- [0087] 이를 통해, 경쇄와 중쇄 mRNA에 대한 MB는 높은 결합 특이성을 갖고 있으며, 경쇄와 중쇄 mRNA가 혼합되어 있을

경우에도 여전히 높은 결합력을 갖고 있음을 예상할 수 있다.

[0088] (3) 살아 있는 세포에서 MB-C_L과 MB-C_H를 이용한 단일클론항체 mRNA 검출(형광 측정기)

[0089] 항체를 생산하는 세포 안에서 만들어진 항체 mRNA를 검출하고 이를 기준으로 우수한 세포주를 분리하기 위해서는 세포가 살아 있는 상태에서 분석이 가능해야 한다.

[0090] 이를 위해, 항체의 경쇄와 중쇄 mRNA를 발현하는 항체 생산 세포군에 이들 mRNA와 결합할 수 있는 MB를 각각 운반하여 발생하는 형광 신호를 관찰하였다.

[0091] 이때, MB를 살아 있는 세포 내로 효율적으로 운반하기 위해 MB와 함께 SLO를 배지에 첨가하여 사용하였다. 배지에 들어가는 SLO는 동물세포 표면에 존재하는 콜레스테롤에 달라붙어 이들을 바깥쪽으로 밀어내 30 nm 이내의 구멍을 만들어 주는 역할을 한다.

[0092] 세포가 항체 mRNA를 생산할 수 있도록 단일클론항체 생산 벡터를 트랜스펙션하고 48시간 동안 배양한 후, 세포를 탈착하고 여기에 SLO와 MB가 혼합된 배지를 첨가한 다음, 37℃에서 15분간 배양하였다.

[0093] 세포를 세척한 후 새로운 배지로 바꿔준 뒤 37℃에서 1시간 동안 추가 배양 하여 형광 측정기를 통해 형광 값을 측정하였다. 단일클론항체 벡터를 트랜스펙션 하지 않은 대조군과 단일클론항체 벡터를 트랜스펙션한 실험군간 결합 정도를 비교하였다.

[0094] 단일클론항체를 생산하는 세포의 경우(w/ TF), 생산하지 않는 대조군 세포(w/o TF)에 비해 MB-C_L과 세포 내 경쇄 mRNA와의 결합 S/B 비율이 1.6배 높은 것을 확인하였다(도 4A).

[0095] 항체 중쇄 mRNA의 경우에도 마찬가지로, 단일클론항체 생산 벡터가 트랜스펙션된 세포군(w/ TF)에서 중쇄 mRNA 검출 MB-C_H의 결합 S/B 비율이 1.7배 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 4B).

[0096] 이를 통해, 살아 있는 세포에서 발현된 치료용 단일클론항체의 경쇄와 중쇄 mRNA들을 MB를 이용하여 효율적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0097] (4) 살아 있는 세포에서 MB-C_L과 MB-C_H를 이용한 단일클론항체 mRNA 검출(유세포 분석기)

[0098] 보다 정량적인 실험 결과를 얻기 위해, 유세포 분석기를 활용하여 살아 있는 세포에서 발현된 단일클론항체의 경쇄 및 중쇄 mRNA들을 각각에 대한 MB로 검출할 수 있는지 여부를 확인하였다(도 4C, D).

[0099] 먼저, 항체 발현 벡터를 트랜스펙션하고 2일간 배양한 후, 항체 경쇄 mRNA를 검출할 수 있는 MB를 세포 내로 운반한 뒤 분석한 결과, 세포 내 경쇄 mRNA와 MB-C_L간의 결합에 의한 높은 형광 신호를 보이는 세포들이 많이 관찰되었다(도 4C).

[0100] 항체 중쇄 mRNA의 경우에도 마찬가지로, 중쇄 mRNA 결합 MB-C_H에 의해 항체를 발현하지 않는 세포군에 비해 증가된 결합 형광 신호가 관찰되었다(도 4D).

[0101] (5) 살아 있는 세포에서 MB-C_L과 MB-C_H를 이용한 단일클론항체 경쇄 및 중쇄 mRNA의 동시 검출

[0102] 보다 효율적인 방법 개발을 위해, 발현된 항체 경쇄와 중쇄 mRNA들을 살아 있는 세포 내부에서 동시에 검출하기 위한 실험을 수행하였다(도 5).

[0103] 항체 발현 벡터로 세포를 트랜스펙션시키고 2일간 배양한 후, 항체 경쇄와 중쇄 mRNA들과 결합하는 MB-C_L과 MB-C_H를 동시에 세포 내로 운반하였다.

[0104] 유세포 분석기를 통해 각 세포 내 경쇄와 중쇄 mRNA와 결합한 각각의 MB의 형광 신호를 관찰한 결과, 단일 mRNA 검출 결과와 마찬가지로 경쇄(도 5A)와 중쇄(도 5B) mRNA 결합 S/B 비율이 항체 발현 세포군에서 모두 증가됨을 확인할 수 있었다(도 5C, D).

[0105] 본 실험을 통해, 살아 있는 세포에서 발현되는 항체의 경쇄와 중쇄 mRNA들을 각 mRNA에 대해 특이적으로 제작된 MB에 의해 각각 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0106] 또한, 이는 각 세포에서 발현되는 항체 경쇄와 중쇄 mRNA 양을 기준으로 하여 원하는 세포를 살아 있는 상태에서 선별할 수 있음을 의미한다.

[0107] **결과 검토**

[0108] 본 발명은 단일클론항체를 발현하는 살아 있는 세포에서 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변영역 mRNA를 MB로 검출하는 방법에 관한 것으로, 먼저 경쇄와 중쇄의 불변영역에 있는 mRNA 일부와 결합할 수 있는 MB를 제작하여 용액과 살아 있는 세포 내에서 결합 특이도를 확인하였다.

[0109] 세포 내 MB의 효율적인 운반을 위해 SLO를 이용한 방법을 사용하였으며, 경쇄와 중쇄를 각각 검출함은 물론, 둘을 한 세포 내에서 동시에 검출할 수 있음을 규명하였다.

[0110] 본 발명의 실험예에서는 항체를 일시적으로 발현하는 시스템을 사용하였지만, 세포주 제작을 위해 DHFR(Dihydrofolate reductase)이 결합된 세포 시스템의 경우 메토틱세이트(Methotrexate; MTX)를 사용하여 항체 발현 유전자 증폭 및 세포 선별 과정 중에 MB를 적용하여 경쇄와 중쇄 mRNA의 양을 측정하면 된다. 이 경우, 일시적인 발현에 비해 세포 내에서 발현되는 경쇄와 중쇄 mRNA 양이 상당히 크기 때문에 매우 높은 형광 신호가 검출될 것으로 예상된다.

산업상 이용가능성

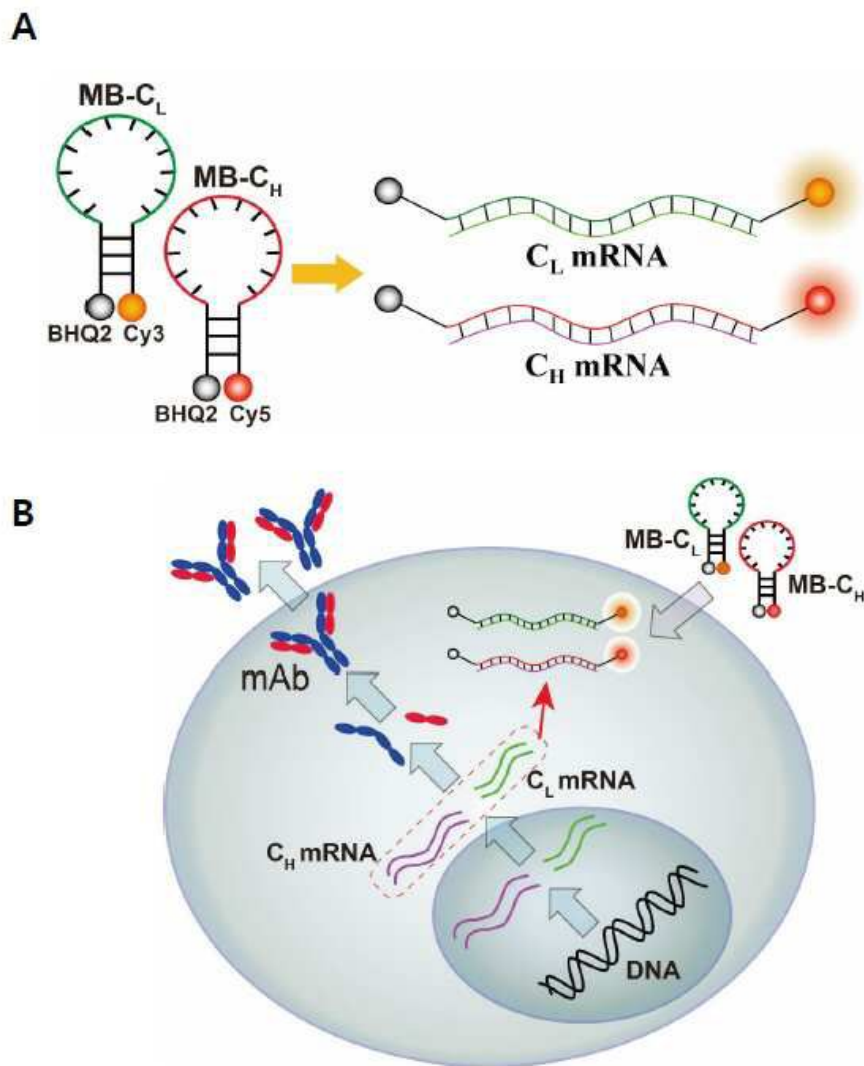
[0111] 본 발명은 세포 외로 배출되는 항체 단백질을 검출하는 종래 방식이 아닌, 세포 내에 발현된 항체의 경쇄와 중쇄 mRNA들을 검출하는 새로운 방법을 제시하였다.

[0112] 이는 살아 있는 세포 내에서 각 mRNA들에 대해 특이적인 MB를 이용하는 방식으로, 본 발명자들은 실험을 통해 세포 내 발현된 경쇄와 중쇄 mRNA의 검출이 가능함을 구체적으로 규명하였다.

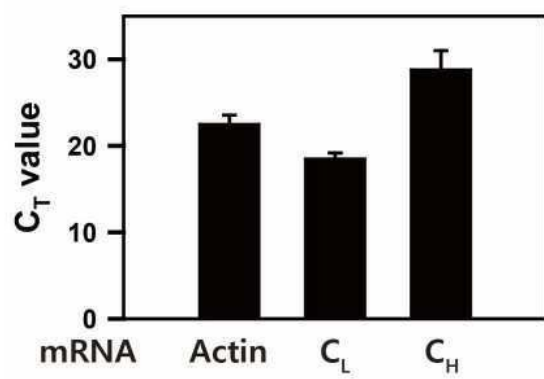
[0113] 본 발명을 통해, 현재 항체 생산 세포주 제작 방법에 있어 항체의 품질과 생산성을 동시에 확보할 수 있을 것으로 기대되며, 궁극적으로는 다양한 항체 기반 바이오 의약품 개발 분야에 있어 직간접적으로 큰 공헌할 수 있을 것으로 예상된다.

도면

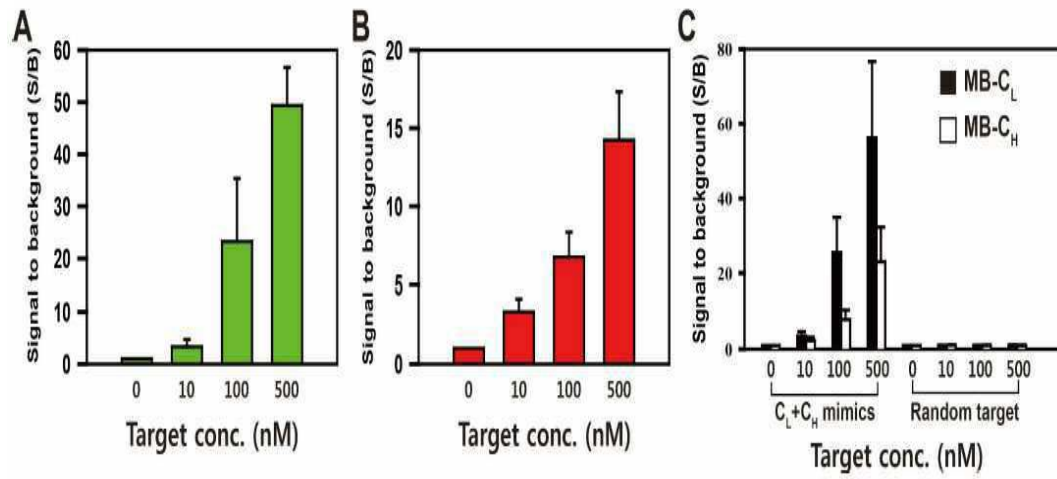
도면1



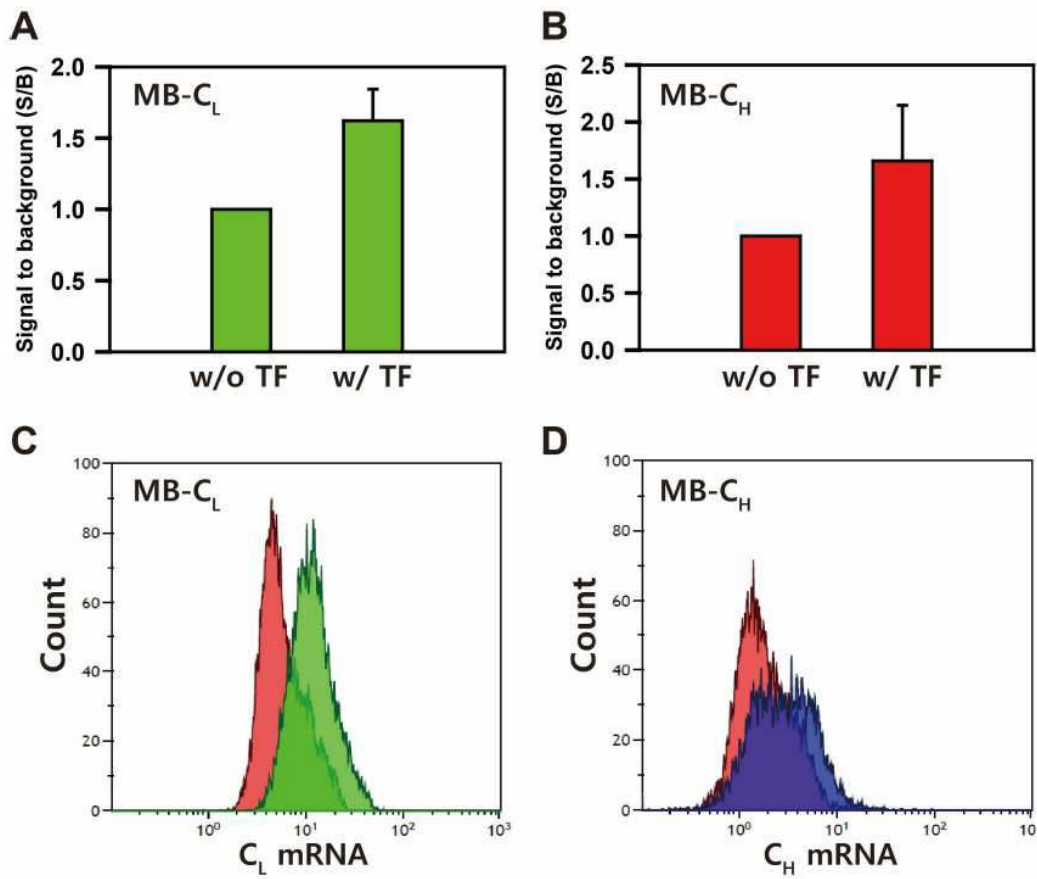
도면2



도면3



도면4



도면5

