



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0048069
(43) 공개일자 2020년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/16 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 5/163 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0129740
(22) 출원일자 2018년10월29일
심사청구일자 2018년10월29일

(71) 출원인
재단법인대구경북과학기술원
대구 달성군 현풍면 테크노중앙대로 333,
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
임현호
대구광역시 동구 초례로 50, 1202동 701호 (숙천
동, 대구혁신도시 서한이다음 4차)
김현정
대구광역시 동구 금강로21길 10, 104동 1305호 (괴전동, 안심역우방아이유셀)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

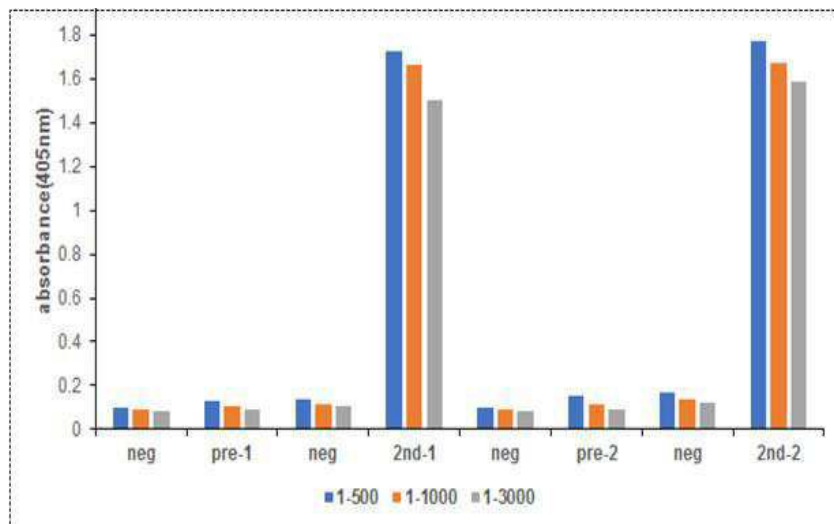
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 인간 TREM2 세포막 단백질에 대한 단일클론항체, 이를 생산하는 하이브리도마 세포주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 TREM2 세포막 단백질에 대한 단일클론항체, 이를 생산하는 하이브리도마 세포주 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 기탁번호 KCTC 13471BP 또는 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포에 의해 생산되고 TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체, 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포, 상기 하이브리도마 세포의 제조방법, 상기 TREM2에 대한 단일클론항체를 포함하는 인간 TREM2 단백질 검출용 조성물, 뇌질환 진단용 조성물 및 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)
C12N 2510/02 (2013.01)
G01N 2333/705 (2013.01)
G01N 2800/2814 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)
G01N 2800/2835 (2013.01)
G01N 2800/2878 (2013.01)

이재홍

서울특별시 광진구 아차산로 552, 3동 401호 (광장동, 광장극동아파트)

(72) 발명자

최희순

경상북도 경산시 하양읍 하양로37길 19, 203동 2908호 (하양2차코아루)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 18-BR-01
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국뇌연구원
연구사업명 한국뇌연구원 운영지원사업 기관고유사업
연구과제명 뇌신경망 구조, 기능 및 인지연구
기 여 율 1/2
주관기관 한국뇌연구원
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI18C1254020018
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건산업진흥원
연구사업명 국가치매극복기술개발사업
연구과제명 TREM2 특이적 항체 및 정제된 TREM2 단백질을 이용한 신규 리간드의 탐색, 생물학적 검증 및 검출 플랫폼 개발
기 여 율 1/2
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.30 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC 13471BP의 하이브리도마 세포에 의해 생산되고 TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체.

청구항 2

기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포에 의해 생산되고 TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단일클론항체는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 TREM2 항원결정부위에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 단일클론항체.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 단일클론항체는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 TREM2 항원결정부위에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 단일클론항체.

청구항 5

제1항의 TREM2에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 기탁번호 KCTC 13471BP의 하이브리도마 세포.

청구항 6

제2항의 TREM2에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포.

청구항 7

인간 TREM2 단백질을 사용하여 마우스를 면역화시키는 단계;

상기 면역화시킨 마우스의 비장세포를 골수종 세포와 융합하여 배양하는 단계; 및

융합된 하이브리도마 세포에서 인간 TREM2 단백질에 특이적인 단일 클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선별하는 단계를 포함하는,

기탁번호 KCTC 13471BP 또는 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 인간 TREM2 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 하이브리도마 세포의 제조방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항의 단일클론항체를 포함하는, 인간 TREM2 단백질 검출용 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항의 단일클론항체를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia) 및 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 뇌질환 진단용 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항의 단일클론항체를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia) 및 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 TREM2 세포막 단백질에 대한 단일클론항체, 이를 생산하는 하이브리도마 세포주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)는 DAP12라는 어댑터 단백질을 통해 신호전달을 수행하는 수용체로서 골수 세포(myeloid cell) 기능을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 사이토카인의 발현을 억제하여 염증반응을 억제하는 것으로 나타나 TREM2가 면역조절에 관여하는 것으로 확인되었다. TREM2 단백질은 주로 신경아교세포(microglia)에 존재하며 치매 표적인자, 아밀로이드- 베타의 식세포작용과 손상된 신경세포 처리 및 면역세포 항상성 유지와 같은 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다.

[0003] 최근에는 TREM2의 돌연변이체가 알츠하이머 발병율을 3배 증진시킨다는 연구 보고가 발표되면서 알츠하이머성 치매와 같은 뇌질환 연구를 위한 바이오 마커 또는 새로운 뇌질환 치료제 타겟으로 더욱 부각되고 있다.

[0004] 그러나 TREM2는 세포막 단백질로서 세포 내 고유의 기능을 최대한 그대로 유지하면서 세포 내 고유의 온전한 형태의 정제가 어려울 뿐만 아니라 TREM2 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 항체 또한 개발이 미비한 실정이다.

[0005] 이에 본 발명자들은 알츠하이머성 치매의 바이오 마커인 인간 TREM2 세포막 단백질을 특이적으로 정확하게 검출할 수 있는 새로운 단일클론항체 및 상기 단일클론항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포주를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2006-0135280호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 기탁번호 KCTC 13471BP의 하이브리도마 세포에 의해 생산되고 TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포에 의해 생산되고 TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 TREM2에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 기탁번호 KCTC 13471BP의 하이브리도마 세포를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 TREM2에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 기탁번호 KCTC 13470BP의

하이브리도마 세포를 제공하는 것이다.

- [0011] 본 발명의 다른 목적은 TREM2에 대한 단일클론항체를 생산하는 기탁번호 KCTC 13471BP 또는 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 TREM2에 대한 단일클론항체를 포함하는 인간 TREM2 단백질 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 TREM2에 대한 단일클론항체를 포함하는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia) 및 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 뇌질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 TREM2에 대한 단일클론항체를 포함하는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia) 및 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 기탁번호 KCTC 13471BP의 하이브리도마 세포에 의해 생산되고 TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포에 의해 생산되고 TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단일클론항체는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 TREM2 항원결정부위에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단일클론항체는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 TREM2 항원결정부위에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [0019] 또한 본 발명은 TREM2에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 기탁번호 KCTC 13471BP의 하이브리도마 세포를 제공한다.
- [0020] 또한 본 발명은 TREM2에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포를 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은, 인간 TREM2 단백질을 사용하여 마우스를 면역화시키는 단계; 상기 면역화시킨 마우스의 비장세포를 골수종 세포와 융합하여 배양하는 단계; 및 융합된 하이브리도마 세포에서 인간 TREM2 단백질에 특이적인 단일 클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선별하는 단계를 포함하는, 기탁번호 KCTC 13471BP 또는 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 인간 TREM2 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0023] 또한 본 발명은 인간 TREM2 단백질에 대한 단일클론항체를 포함하는, 인간 TREM2 단백질 검출용 조성물을 제공한다.
- [0024] 또한 본 발명은 인간 TREM2 단백질에 대한 단일클론항체를 포함하는, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia) 및 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 뇌질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한 본 발명은 인간 TREM2 단백질에 대한 단일클론항체를 포함하는, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia) 및 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명은 인간 TREM2 세포막 단백질에 대한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 구축하였고, 상기 하이브리도마 세포주로부터 인간 TREM2 세포막 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단일클론항체를 제조하였으며, 본 발명에 따른 인간 TREM2에 대한 단일클론항체는 알츠하이머, 파킨슨, 전두측두엽 치매 또는 근위축성측색경화증과 같은 뇌질환 진단 및 약학적 조성물의 용도로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 마우스에 인간 TREM2 단백질을 면역화하여 마우스 혈액 내 인간 TREM2에 대한 항체 생성여부를 확인한 것이다.

도 2는 하이브리도마 세포의 배양액을 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법을 통해 항체를 생산하는 하이브리도마 세포군을 선별한 것을 나타낸 표이며, 선택된 후보 세포군을 제한희석법 (limiting dilution) 을 이용하여 단클론으로 분리하였다.

도 3은 항체 정제 방법을 결정하기 위해 항체 Ig subtype을 결정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 protein G resin을 이용하여 TREM2 단클론 항체를 정제한 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에서 제조한 TREM2에 대한 단일클론항체 2종 모두에 대한 항원(hTREM2) 특이적 결합 여부를 IB (immunoblotting)과 IP (immunoprecipitation)방법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다. 이때 항원은 HEK293 세포에 이형발현된 인간 TREM2 단백질을 사용하였다.

도 6은 수용액상에서 정제한 TREM2 단백질과 항체간의 안정적인 항원-항체 복합체의 형성여부를 확인한 결과이다.

도 7은 정제한 TREM2 단백질들과 각각의 항체(T3A11C2, T10D3F2) 간의 항원-항체 결합을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 각 항체(T3A11C2, T10D3F2)의 정제 과정을 나타낸 것이며, 정제를 통해 항체절편 Fab와 Fc 부분을 분리하였고 SDS-PAGE 결과로 확인한 것을 나타낸 것이다.

도 9는 TREM2 단백질과 정제한 각 항체(T3A11C2, T10D3F2) 절편(Fab)간의 결합여부를 확인한 결과이다.

도 10은 TREM2 단백질과 각 항체(T3A11C2, T10D3F2) 절편(Fab)의 결합 부위가 서로 다를 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 TREM2 단백질과 각 항체(T3A11C2, T10D3F2)와의 결합(epitope) 부위를 웨스턴-블롯으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 인간 TREM2 세포막 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 제공함에 특징이 있다.

[0029] TREM2 세포막 단백질은 정상인의 혈청 또는 뇌척수액 보다는 알츠하이머성 치매 환자의 혈청 또는 뇌척수액에서 발현 수준이 높게 나타나는 알츠하이머성 치매 특이적 단백질 마커이다. 이에 본 발명자들은 TREM2를 타겟으로 하는 알츠하이머성 치매의 진단 및 치료를 위한 TREM2 특이적 단일클론항체에 대한 연구를 진행하였고, 그 결과, TREM2 특이적 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 구축하고, 이를 이용하여 TREM2 특이적 단일클론항체를 생산할 수 있었다.

[0030] 따라서 본 발명은, 기탁번호 KCTC 13471BP의 하이브리도마 세포에 의해 생산되고 TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이브리도마 세포에 의해 생산되고 TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2)에 대해 특이적으로 결합하는 단일클론항체; 상기 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포 및 이의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 상기 TREM2는 단백질 그 자체, 그의 유전자 재조합 단백질 및 이들의 인공변이체 및 돌연변이체뿐만 아니라 단백질의 천연 형태 및 이의 기능적 등가물을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 또한 서열번호 2의 아미노산으로 이루어진 TREM2는 단백질을 코딩하는 TREM2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

- [0032] 본 발명의 인간 TREM2 단백질에 대해 특이적인 단일클론항체는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있는 융합 방법(fusion method)에 의해 제조될 수 있다(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조). 단일클론 항체를 분비하는 '하이드리도마'를 만들기 위해 융합되는 두 세포 집단 중 하나의 집단은 인간 TREM2 단백질을 주사한 마우스와 같은 면역학적으로 적합한 숙주동물의 세포를 이용하고, 나머지 하나의 집단으로는 암 또는 골수종 세포주를 이용한다. 이러한 두 집단의 세포들을 폴리에틸렌글리콜과 같은 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지되어 있는 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 수득하고 나서, 인간 TREM2 단백질에 대해 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이드리도마 세포주를 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 또는 웨스턴블롯 분석법으로 선별하고, 표준 기술에 따라 시험관 내에서 또는 생체 내에서 대량으로 배양한다. 상기 생체내 대량배양은 하이드리도마 세포주를 마우스의 복강에 주사하여 고농도의 항체 생산을 유도한 후, 복수액(ascites)에서 분리하는 것을 의미한다.
- [0033] 상기 하이드리도마 세포주가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용하거나, 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용할 수 있다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 항원 컬럼 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액(ascites)에서 분리할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 단일클론항체를 생산하는 하이드리도마 세포를 각각 "T3A11" 및 "T10D3"로 명명하였고, 이들 세포주를 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2018년 1월 26일자로 각각 기탁하여 기탁번호를 부여받았는데, "T3A11" 세포주에 대해서는 기탁번호 KCTC 13471BP를 부여받았고, "T10D3" 세포주에 대해서는 기탁번호 KCTC 13470BP를 부여받았다. 또한, "T3A11" 세포주로부터 생산되는 TREM2에 대한 단일클론항체는 "T3A11C2 항체"로 명명하였고, "T10D3" 세포주로부터 생산되는 TREM2에 대한 단일클론항체는 "T10D3F2 항체"로 명명하였다.
- [0035] 한편, 항원을 검출하기 위해 단일클론항체를 사용하는 경우의 유용한 점은 단일 에피토프, 즉 항원결정부위를 인지함으로써 특정한 상호작용을 갖는다는 것이다. 이와 같이 항원과 항체간의 상호작용에 관여하는 에피토프를 맵핑(mapping)하기 위해 다양한 접근 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 콰지 디스플레이 펩타이드 라이브리를 사용하여 바이오패닝, 항원 폴리펩타이드를 프로테아제로 분해하여 생성된 단편을 면역블롯팅하여 스크리닝함으로써 에피토프 서열을 포함하는 단편을 결정, 활성화된 막 또는 폴리에틸렌 핀과 같은 고체상에 고정된 펩타이드 어레이를 스크리닝, 에피토프 서열내의 각각의 아미노산 서열 잔기의 중요성을 가용성 펩타이드를 사용한 경쟁적 ELISA 검정방법 등이 있다.
- [0036] 본 발명의 일실시예에서는 본 발명의 단일클론항체가 인지하는 TREM2의 에피토프를 확인하기 위해, TREM2의 단편을 각기 달리 제조한 후, 본 발명에 따른 단일클론항체와의 결합여부를 크기배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE 전기영동을 통한 웨스턴블롯을 분석하였다.
- [0037] 그 결과, 기탁번호 KCTC 13471BP 및 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이드리도마 세포에서 생산되는 TREM2의 단일클론항체 각각은 서로 다른 TREM2 부위를 인식하는 것으로 나타났다.
- [0038] 즉, 기탁번호 KCTC 13471BP의 하이드리도마 세포에서 생산되는 단일클론항체는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 TREM2 항원결정부위(서열번호 2의 TREM2 아미노산 서열에서 1~159번째 서열로 이루어진 펩타이드)를 인식하는 것으로 나타났고, 기탁번호 KCTC 13470BP의 하이드리도마 세포에서 생산되는 단일클론항체는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 TREM2 항원결정부위(서열번호 2의 TREM2 아미노산 서열에서 118~159번째의 서열로 이루어진 펩타이드)를 인식하는 것으로 나타났다.
- [0039] 따라서 본 발명의 TREM2 단일클론항체인 "T3A11C2 항체" 및 "T10D3F2 항체"는 TREM2에 대한 항원결정부위가 서로 다를 수 있었고, 각 단일클론항체가 특이적인 항원결정부위에 결합하여 항원-항체 복합체를 형성함을 알 수 있었다. 상기 단일클론항체의 항원과의 결합 친화성은 통상의 방법에 따라 결정할 수 있으며, 이러한 방법으로는 특별히 제한하지는 않으나, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역측정법(ELISA), 면역침강법, 면역형광법, 색채입자결합법, 화학발광물질결합법 또는 면역블롯팅을 통해 항원과의 결합 친화성을 측정할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 "단일클론항체"란 당해 분야에 공지된 용어로서 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도의 특이적인 항체를 의미한다. 통상적으로, 상이한 에피토프(항원결정기)들에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론 항체와는 다르게, 단일클론 항체는 항원상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 단일클론항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 또한 하이드리

도마 배양에 의해 합성되기 때문에 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 장점을 갖는다.

- [0041] 본 명세서에서는 인간 TREM2에 대한 항체로서, 전체 항체 형태일 뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다(cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)).
- [0042] 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂, 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 이황화 결합을 이루고 있다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 국제 공개특허 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. dsFv(이체 Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 scFv(단쇄 Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 단쇄의 가변영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C 말단에서 바로 연결되어 있어서 dsFv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다. 본 발명에서 항체는 바람직하게는 Fab 형태이거나 전체 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 본 발명의 TREM2에 대한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0044] 바람직하게 상기 하이브리도마 세포의 제조방법은, 인간 TREM2 단백질을 사용하여 마우스를 면역화시키는 단계; 상기 면역화시킨 마우스의 비장세포를 골수종 세포와 융합하여 배양하는 단계; 및 융합된 하이브리도마 세포에서 인간 TREM2 단백질에 특이적인 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선별하는 단계를 포함한다.
- [0045] 이러한 본 발명의 방법으로 제조된 TREM2에 대한 단일클론항체는 인간 TREM2 단백질 검출용을 위한 용도로 사용될 수 있다.
- [0046] 따라서 본 발명은 본 발명의 TREM2에 대한 단일클론항체를 포함하는 인간 TREM2 단백질 검출용 조성물을 제공할 수 있으며, 나아가 본 발명의 TREM2에 대한 단일클론항체를 포함하는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia) 및 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 뇌질환 진단용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 사용된 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 상기 뇌질환의 발병 여부를 확인하는 것이다.
- [0048] 본 발명에서 사용된 용어, "진단 마커"란 뇌질환 환자를 건강한 사람과 구분하여 진단할 수 있는 물질로 건강한 사람에 비하여 뇌질환이 발병된 개체에서 증가를 보이는 유기 생체 분자를 말한다. 상기 유기 생체 분자로는 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나, 폴리펩타이드, 단백질, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 및 당 등이 포함된다. 본 발명에서는 바람직하게는, 상기 유기 생체 분자는 단백질 또는 폴리펩타이드를 말한다.
- [0049] 본 발명의 항체를 이용하여 질병 유발 환자의 혈액 또는 뇌척수액에 포함된 상기 진단 마커를 분석하는 방법으로는 통상의 항원-항체반응의 분석법을 사용할 수 있으며, 이러한 방법으로는 이에 제한되지는 않으나, 면역 검정(측정)법으로는 효소 면역 측정법(ELISA), 형광면역 측정법(FIA), 방사선 면역 측정법(RIA), 발광 면역 측정법, 면역블롯(immunoblot)법, 웨스턴 블롯(western blot)법, 면역 염색법 등을 사용할 수 있다.
- [0050] 웨스턴 블롯(western blot)법은, 생체 시료 중에 존재하는 해당 단백질의 분자량을 알기 위하여 유효한 방법이다. 예를 들어, 장기 조직 유래의 추출액 등의 생체 시료액을 아크릴아미드 겔(gel) 전기 영동 시킨 뒤, PVDF 멤브레인에 전이하고, 해당 단백질 또는 해당 펩타이드를 인식하는 항체와 반응시키고, 생성하는 면역 복합체를

표지 제 2항체를 이용하고 검출하는 것이다.

- [0051] 면역 염색법은 조직 및 세포에 있어서 대상 폴리펩티드(polypeptide)의 발현 부위를 해석하기 위하여 유효한 방법으로, 예를 들어, 슬라이드글라스 상에 고정되는 조직 절편, 세포 등을 본 발명의 항체와 반응시키고, 생성하는 면역 복합체를 표지 제2항체를 이용하고 검출하는 것에 따라 실시한다.
- [0052] 한편, 생물학적 시료 중에서 특정 단백질의 존재여부는 시료를 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시켜 항원-항체 복합체의 형성여부를 측정함으로써 확인할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"란 생물학적 시료 중의 특정 단백질과 이를 특이적으로 인지하는 항체의 결합물을 의미한다.
- [0053] 본 발명에서 사용된 용어 "생물학적 시료" 또는 "시료"는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 시료를 말한다. 바람직하게는, 상기 생물학적 시료 또는 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 조직, 세포, 체액, 뇌척수액 등에서 선택된 어느 하나일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 시료는 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터 수득될 수 있다. 상기 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리 할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 시료로부터 핵산 및 단백질을 분리하여 검출에 사용할 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명의 진단용 조성물은 TREM2에 특이적인 본 발명의 단일클론항체 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당업계에 공지된 시약 및 TREM2 마커에 특이적인 다른 종류의 다클론 또는 단일클론항체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0055] 상기에서 면역학적 분석은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 상기 항원-항체반응의 분석법의 방법과 동일한 방법으로도 수행할 수 있다.
- [0056] 면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함되며, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.
- [0057] 상기에서 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지는 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하는데, 이의 예로는 효소, 형광물질, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사성 동위원소 등이 있다. 효소로는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라아제, 글루코즈 옥시다아제, 헥소키나제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있다. 형광물질로는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리트린, 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, 다이이미드, 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.
- [0058] 본 발명에 따른 상기 진단용 조성물은 뇌질환 진단을 위한 키트 또는 마이크로어레이 형태로 제공할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 진단용 조성물은 진단의 신속도 및 편리성을 높이기 위해, 공지된 다양한 방법을 이용하여 적합한 담체 또는 지지체상에 고정된 상태로 제공될 수 있다. 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 텍스트란, 세파텍스, 세파로즈, 리포솜, 카르복시메틸셀룰로즈, 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.
- [0060] 상기 진단용 키트로써 예를 들면, 시료 중의 특정 단백질을 검출하기 위해 면역 크로마토그래피법을 기초로 하는 측방 유동 검정 키트(lateral flow assay kit)의 형태로 제공될 수 있다. 측방 유동 검정 키트는 통상 시료가 적용되는 샘플패드(sample pad), 탐지용 항체가 코팅되어 있는 방출패드(releasing pad), 시료가 이동하여 분리되고 항원-항체 반응이 일어나는 전개용 막(예를 들어 니트로셀룰로스) 또는 스트립, 그리고 흡수패드(absorption pad)로 이루어진다.
- [0061] 상기 마이크로어레이는 일반적으로 특정 시약으로 처리된 슬라이드글라스 표면 위에 항체를 부착하여 항원-항체

반응에 의해 상기 항체에 특이적으로 부착하는 단백질을 검출할 수 있도록 하는 것이다.

- [0062] 본 발명의 진단용 조성물을 통한 뇌질환 진단은 항원-항체 결합반응을 통하여 항체 단백질에 대한 항원을 정량 분석 또는 정성 분석함으로써 뇌질환을 진단할 수 있으며, 상기 항원-항체 결합반응은 통상의 ELISA, RIA (Radioimmunoassay), 샌드위치 측정법 (Sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯, 면역 블롯 분석 또는 면역조직화학염색 방법(Immunohistochemical staining)으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 검체 및 대조군을 표면에 코팅시킨 96 웰 마이크로플레이트 등을 이용하여 재조합 모노클로날 항체 단백질과 반응하는 ELISA를 수행하도록 상기 진단물의 형태를 제공할 수 있다.
- [0063] 나아가 본 발명은 본 발명의 TREM2에 대한 단일클론항체를 포함하는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia) 및 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0064] 앞서 기술한 바와 같이, TREM2의 변이체들은 알츠하이머 및 치매와 같은 뇌질환이 발병할 경우, 정상에 비해 발현 수준이 증가하여 비정상적인 세포 내 작용을 유도하여 뇌질환을 유발시킨다.
- [0065] 따라서 본 발명에 따른 TREM2에 특이적인 단일클론항체는 TREM2 또는 TREM2 변이체들에 특이적으로 결합하여 이들의 비정상적인 발현 또는 기능을 억제할 수 있으므로 TREM2에 의해 야기되는 뇌질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [0066] 특히 TREM2는 치매와 같은 뇌질환의 주된 독성단백질인 올리고머 아밀로이드에 특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있으며, 과도하게 활성화되거나 과도한 발현수준으로 존재할 경우, 건강한 시냅스를 손상시키는 염증반응을 유발할 수 있다. 따라서 TREM2는 체내에서 적정 수준으로 존재하는 것이 중요하며, 이를 조절할 수 있는 단일클론항체의 개발이 필수적이다. 한편, 현재까지 TREM2를 타겟팅하는 뇌질환의 치료제 개발은 미비한 실정이다.
- [0067] 이러한 점에서 본 발명은 TREM2에 대한 특이적 단일클론항체를 개발한 것으로, 본 발명의 TREM2 단일클론항체는 알츠하이머, 치매, 파킨슨 또는 근위축성측색경화와 같은 뇌질환을 조기 진단할 수 있으며, 이러한 뇌질환을 치료할 수 있는 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [0068] 따라서 TREM2에 대한 단일클론항체를 유효성분으로 포함하는 조성물은 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 전두측두엽 치매(Frontotemporal dementia) 및 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [0069] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.001~20 중량 % 함유할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 었, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.
- [0071] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 TREM2에 대한 본 발명의 단일클론 항체를 포함하는 조성물 100중량부에 대해 0.1 ~ 90중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0072] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calciumcarbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0073] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0074] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 등의 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0075] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 TREM2에 대한 본 발명의 단일클론항체를 포함하는 조성물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0077] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0079] <실시예 1>

[0080] 인간 TREM2 항원 단백질의 제조

[0081] 본 발명자들은 인간 TREM2 항원 단백질을 제조하기 위해, 인간 TREM2 유전자를 포함하는 재조합 벡로로바이러스로 Hi5 곤충세포를 감염시킨 후, 상기 세포에서 발현되는 TREM2 단백질의 발현 유무를 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 분석 결과, Hi5 곤충세포에서의 당화(N20, N79 아미노산 자리) 정도에 따라서 3개의 단백질 형태로 TREM2 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 또한 웨스턴 블롯은 재조합 TREM2 유전자의 C-말단에 있는 His-tag을 고려하여 penta anti-His 항체를 이용하여 수행하였다. 이후 상기 곤충세포에서 내에서 발현된 Hig-태그된 TREM2 단백질의 분리를 위해 Ni-NTA 아가로스 및 Co-NTA Superflow의 매트릭스를 사용하였고, 상기 매트릭스의 사용량은 매트릭스의 결합력(binding capacity, 1ml의 고정된 매트릭스에 50~100mg의 단백질 결합)을 고려하여 적정량을 결정하여 사용하였다. 또한 Hi5 세포는 20mM Tris·Cl pH8.0, 150mM NaCl 버퍼에 용해한 후, 50초 실행/10초 휴지의 과정으로 10분 동안 4℃에서 초음파 분해하였고, 그 후 6000rpm, 30분, 4℃에서 원심분리하여 세포 파편(cell debris)을 제거한 상층액에 최종 부피의 2%(w/v) DDM (n-Dodecyl-β-D-maltoside)을 첨가하여 TREM2 세포막 단백질을 용출시켰다. 그런 뒤, 상기 과정으로 용출된 TREM2 단백질을 포함하는 세포 용출액을 Cobalt-NTA 레진(1ml/1L 발현 Hi5 세포)을 사용하여 His-태그된 단백질만을 분획하였고, Hig-태그 되지 않은 오염된 단백질의 결합을 최소화하기 위해 20mM 이미다졸(imidazole)을 포함하는 버퍼(20mM Tris·Cl pH8.0, 300mM NaCl, 5mM DDM)를 이용하여 세척하였다. 그 후, 400mM 이미다졸을 포함하는 버퍼로 TREM2 세포막 단백질을 용출(elution)시켰다. 각 과정 중의 수집된 분획물, 즉 컬럼 통과 분획물, 세척 분획물, 용출 분획물을 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(SDS-PAGE)를 통해 확인하였다. 이후, 용출 분획물에 함유된 TREM2 단백질의 순도(purity)를 확인한 후 20mM Tris·Cl pH8.0, 100mM NaCl, 1mM DDM 버퍼를 이용하여 크기배제 크로마토그래피를 진행하였다. 순도에 따라 이온 교환 크로마토그래피를 추가하여 고순도의 TREM2 단백질을 수득하였다. 크기배제 크로마토그래피는 superdex 200 (10/300)을 이용하였고 컬럼을 통과하는데 필요한 시간; 머무름 시간(retention time)은 단백질의 수용액 상의 상태에 의존하며 이는 단백질이 지니는 고유한 특징이다. TREM2 단백질은 분당 1ml의 유속으로 크기배제 크로마토그래피를 실시한 경우, 12.5분 정도에서 일정하게 용출되었으며, 용출된 TREM2 세포막 단백질을 TREM2 항체 제조를 위한 항원 단백질로 사용하였다. 또한 상기에서 인간 TREM2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 사용하였으며, 재조합 벡로로바이러스에는 서열번호 1의 TREM2 염기서열에서 1~45번째의 염기서열이 제거된 서열번호 1의 46~690번째의 염기서열로 이루어진 TREM2 유전자 서열이 포함되도록 하였다. 또한 상기 항체 제조를 위해 사용한 TREM2 항원 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 사용하였다.

[0083] <실시예 2>

[0084] **마우스 면역화 및 항원성 검사**

[0085] TREM2에 대한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조에 필요한 면역화된 마우스를 얻기 위하여, 상기 실시예 1에서 제조한 TREM2 세포막 단백질($50\mu\text{g}/200\mu\text{l}$)을 인산염 완충액 (phosphate buffered saline; PBS)에 희석하고, 동일한 부피의 프로인트 완전 아주반트(complete Freund's adjuvant, Sigma)와 1: 1 혼합하여 에멀전을 제조하였다. 상기 에멀전을 6주령의 암컷 Balb/c 마우스의 복강 내에 1차 주사 (8주) 하였다. 1차 면역화 후 마우스의 면역성을 높이기 위하여 2주 후에 상기 TREM2 단백질과 동일한 부피의 프로인트 불완전 아주반트(incomplete Freund's adjuvant, Sigma)를 혼합하여 에멀전을 제조한 후, 이를 마우스의 복강 내에 2차 주사하였다. 2차 주입 후 혈액 테스트를 통해 면역 반응을 강하게 보이는 마우스에 대해 3차 주사(12주, IP or tail vein)를 수행하였고, 이러한 과정으로 면역화된 마우스를 에테르로 마취시킨 후 헤파린 처리된 주사기로 심장에서 혈액을 채혈한 후, 혈액을 4℃에서 하룻밤 정치시키고 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 80℃에 보관하였다. 채취한 혈청을 ELISA 법으로 항체의 역가를 확인하였고 항체 생성력이 있음을 확인하였다.

[0086] 이후, 상기 방법으로 수득한 혈청 내에 TREM2 세포막 단백질에 대한 항체가 생성되었는지 항원성 검사를 수행하였다. 이를 위해 상기 항원으로 쓰인 동일한 TREM2 세포막 단백질을 20ug/ml 농도로 준비하고, Ni-NTA His Sorb 96웰 플레이트에 50ul 씩 TREM2 단백질을 첨가한 후, 상온에서 2시간 결합 반응을 수행하였다. 그 후 PBS-DDM 용액에 3차례 세척하고, PBS-BSA-DDM 용액에 면역화한 마우스의 혈청을 1:1000의 비율로 희석하여 100ul 씩 첨가하고 1시간 반응시켰다. 이후 3차례 PBS-DDM 용액으로 세척하고 rabbit anti-mouse IgG (AP-conjugated)를 1:2000 비율로 희석 첨가한 PBS-BSA-DDM 용액을 첨가하고 45분간 배양하였다. 3차례 PBS-DDM 용액으로 세척하고 PNPP 반응버퍼로 2번 세척하고, PNPP (1mg/ml) 100ul를 첨가하여 반응시킨 후 2M NaOH 50ul를 추가하여 반응을 종결하였다. 이후, 96웰 플레이트를 405nm에서 ELISA 측정하여 항원성 여부를 분석하였다.

[0087] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, TREM2 세포막 단백질이 항원으로 작용하여 이에 대한 항체가 형성되었음을 알 수 있었다.

[0089] **<실시예 3>**

[0090] **하이브리도마 세포주의 제조**

[0091] **<3-1> 세포융합**

[0092] 항원단백질인 TREM2 세포막 단백질로 면역화된 마우스로부터 비장세포를 적출하고 적출된 비장세포와 골수종 세포인 SP2/0 세포를 10:1의 비율로 혼합한 후, 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 첨가하여 세포융합시키고 배양하였다.

[0093] 구체적으로는, 상기 실시예에서 면역화된 마우스의 혈청에서 ELISA 법으로 항체 역가를 확인하여 항체 생성력이 있음을 확인한 후, 면역화된 마우스를 에테르로 마취시키고 몸통의 좌측에 위치한 비장세포(spleen cell)를 적출하였다. 적출된 비장세포를 혈청이 첨가되지 않은 DMEM 배지에 첨가하고 배양 디쉬에 옮겨 지방과 연결조직을 제거한 후, 두 장의 슬라이드 글라스 사이에 넣고 조직을 갈아주었다. 그 후 1000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였고 멸균된 ACT(tris-ammonium chloride) 5ml를 첨가하여 10분간 배양하여 RBC를 용해(lysis)시켰다. 그 후 상기 혼합된 배지를 20ml 첨가하여 원심분리 후 상층액을 제거하고 다시 20ml의 혼합 배지를 첨가하여 세포 개수를 측정하였다. 골수종 세포인 SP2/0 세포는 75T 플라스크에 5장을 배양하여 준비하였다. 1000rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 20ml의 퓨전 배지를 첨가한 후 계수하였다.

[0094] 비장세포(1.3×10^8 cells)와 골수종 세포(2.6×10^7 cells)를 5:1의 비율로 섞어준다. 퓨전 배지를 첨가하여 50ml로 맞춰준 후 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 여기에 PEG 1500(50% w/v)을 1ml씩 1분 동안 천천히(drop by drop) 넣으면서 반응시키고 퓨전 배지를 총 부피가 15ml이 되도록 손으로 감싸고 온도 유지를 하면서 천천히 첨가하였다. 그 후 1000rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 20ml의 FBS를 첨가하고 15분 상온에 놓았다. CM-HAT 배지를 180ml 첨가하여 잘 섞어준 후 웰당 2×10^4 cells이 되도록 96웰 플레이트 10판에 플레이팅 하였다. 7~10일 배양 후 1차 스크리닝을 하였다.

[0096] **<3-2> TREM2 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주의 선별**

- [0097] 상기 실시예에서 제조한 융합세포군 중에서 TREM2 단백질에만 특이적으로 반응하는 융합세포들을 선별하고 이들 세포들 중에서 TREM2 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 다음과 같은 방법으로 스크리닝 하였다.
- [0098] 먼저, 비장세포(1.3×10^8 cells)와 골수종 세포(2.6×10^7 cells)를 5:1의 비율로 혼합한 후, 혼합배지를 첨가하여 50ml로 맞춰준 후 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 여기에 PEG 1500(50% w/v)을 1ml씩 1분 동안 천천히(drop by drop) 넣으면서 반응시키고 혼합 배지를 총 부피가 15ml이 되도록 손으로 감싸고 온도를 유지하면서 천천히 첨가하였다. 그 후 1000rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 20ml의 FBS를 첨가하고 15분 동안 상온에 방치시켰다. CM-HAT 배지를 180ml 첨가하여 잘 섞어준 후 웰당 2×10^4 세포수가 되도록 96웰 플레이트 10판에 플레이팅 하고 7일 배양 후 1차 스크리닝 하였다.
- [0099] 이후, TREM2 단백질을 20ug/ml 농도로 준비하여 웰당 50ul 씩 96웰 플레이트 10판에 플레이팅하고 상온에서 2시간동안 결합시킨다. 이후 PBS-DDM 용액으로 3차례 세척하였고, 그 후 상기 세포융합하여 7일간 배양했던 융합세포의 배양액 50ul을 첨가하고 상온에서 1시간 방치하였다. 이후, PBS-DDM 용액으로 3차례 세척하고 Rabbit anti-mouse IgG (AP-conjugated)를 1:2000 비율로 희석 첨가한 PBS-BSA-DDM 용액을 넣어준 후 45분간 배양하였다. 3차례 PBS-DDM 용액으로 세척하고 PNPP 반응버퍼로 2번 세척하였고, PNPP (1mg/ml) 100ul를 첨가하여 반응시킨 후 2M NaOH 50ul를 추가하여 반응을 종결하였다. 이후 405nm에서 ELISA를 이용하여 TREM2항체를 생성하는 세포군을 확인하였다.
- [0100] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, TREM2 항체를 생산하는 하이브리도마 세포군을 1차로 선별하였다.
- [0102] 이후, 상기 1차 선별된 세포군을 대상으로 TREM2 단백질을 native한 상태와 denature한 상태로 준비한 후, 동일 방법을 통하여 2차 스크리닝을 수행하였다. 상기 1차 선별된 세포군(클론들)을 24웰 플레이트로 옮겨 배양하였다. 보다 구체적으로, 24웰 플레이트의 융합세포 농도를 확인하고, 96웰 플레이트에 웰당 0.5, 1, 5개의 세포가 되도록 7ml 씩의 배양액에 융합세포를 희석하여 각 웰당 200ul 씩 분주하였다. 현미경으로 검경하여 1개의 세포가 들어있는 웰을 체크하였다. 세포가 어느 정도 자란 웰의 상층액을 수득하고 ELISA 및 웨스턴 블롯을 수행하여, TREM2 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 2차 스크리닝 하였다. 이후 스크리닝된 융합세포(하이브리도마 세포)를 다시 배양 플라스크로 옮겨 배양하고 ELISA로 흡광도 측정하여 흡광도가 1이 넘는 융합세포만 선택하였다.
- [0103] 이상의 방법으로 최종 선택된 하이브리도마 세포를 각각 "T3A11" 및 "T10D3"로 명명하였고, 이들 세포주를 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2018년 1월 26일자로 각각 기탁하여 기탁번호를 부여받았는데, "T3A11" 세포주에 대해서는 기탁번호 KCTC 13471BP를 부여받았고, "T10D3" 세포주에 대해서는 기탁번호 KCTC 13470BP를 부여받았다.
- [0105] <실시예 4>
- [0106] 본 발명의 하이브리도마 세포주로부터 생산되는 TREM2에 대한 단일클론항체의 isotype 결정
- [0107] 상기 실시예 3에서 선별된 하이브리도마 세포의 배양액을 1% BSA/PBS 용액에 1:5의 비율로 희석한 후, 15ml 튜브에 150ul 희석액을 넣고 볼텍싱을 하였다. 이 후 Roche사의 IsoStrip을 이용하여 상기 본 발명의 하이브리도마 세포로부터 생산되는 단일클론항체의 isotype을 확인하였고(도 3 참조), 확인된 결과를 토대로 이후 TREM2의 단일클론항체 정제방법을 결정하였다. 일반적으로 면역글로불린(Immunoglobulin)은 총 5가지의 class인 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD으로 나뉘며, 상기 실험을 통해 본 발명에 따른 TREM2 단일클론항체(T3A11C2 및 T10D3F2 항체)의 isotype이 IgG 타입인 것을 확인할 수 있었고, 정제 방법으로서 protein G 컬럼을 이용한 정제방법을 결정하였다.
- [0109] <실시예 5>
- [0110] TREM2에 대한 단일클론항체의 생산 및 정제
- [0111] 상기 실시예를 통해 선별된 하이브리도마 세포의 배양액으로부터 TREM2에 대한 단클론항체를 정제하였는데, 이를 위해 먼저 저장액(20% 에탄올)에 저장되어 있는 Protein G Fast Flow Beads를 컬럼에 채우고 20% 에탄올을

흘려 내린 후, 5 Bed 볼륨의 PBS 결합 완충액으로 세척하였다. 이후 하이브리도마 세포로부터 분리되는 TREM2에 대한 항체를 포함하는 배양액을 0.45um로 여과시키고 Protein G 컬럼에 로딩하였다. 분리된 항체를 포함하는 배양액을 로딩한 후 PBS 용액으로 5 Bed 볼륨 씻어준 후, 0.1M Glycine (pH2.7) 용액으로 4ml씩 분획하여 용출하였다. 각 분획을 1ml의 중화 완충액(1M Tris-HCl, pH 8.0)으로 중화시켰고, 각 단일클론항체는 배양액 리터당 100mg 정도의 수율을 얻는 것을 확인하였다. 정제한 항체의 순도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 또한 본 발명자들은 "T3A11" 하이브리도마 세포주로부터 생산되는 TREM2에 대한 단일클론항체를 "T3A11C2 항체"로 명명하였고, "T10D3" 세포주로부터 생산되는 TREM2에 대한 단일클론항체를 "T10D3F2 항체"로 명명하였다.

[0113] <실시예 6>

[0114] TREM2 항원에 대한 본 발명의 단일클론항체(T3A11C2 항체 및 T10D3F2 항체)의 결합 특이성 분석

[0115] 본 발명의 하이브리도마 세포(T3A11 및 T10D3)에서 생산된 단일클론항체인 T3A11C2 항체 및 T10D3F2 항체의 TREM2 항원에 대한 결합 특이성을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 HEK293 세포를 웰당 3×10^5 세포수로 6웰 플레이트에 준비하고, 이후 pcDNA3.1 발현벡터에 인간 TREM2-6His 유전자를 클로닝하여 midi-prep한 플라스미드를 상기 세포에 형질감염시켰다. 이 때 DNA와 Fugene HD를 1:3의 비율로 섞어 사용하였으며 형질감염 후 24시간동안 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 RIPA 버퍼에 용해하고 이 중 일부를 전기영동(SDS-PAGE)한 후, PVDF 멤브레인으로 이동시켰다. 3% BSA 용액으로 4℃에서 밤새도록 블로킹하였고, 각각의 1차 항체는 1:1000 비율로 희석하여 사용하였다. 그 후 3차례 PBST 용액으로 세척하고 2차 항체는 1:3000 비율로 희석하여 사용하였다.

[0116] 그 결과, TREM2 항원에 대해 하이브리도마 세포주에서 생산된 T3A11C2 항체와 T10D3F2 항체 모두가 TREM2 항원에 대한 결합 특이성이 있는 것을 확인하였다(도 5 왼쪽 도면 참조).

[0118] 또한, 상기와 같은 방법으로 HEK293 세포에 인간 TREM2-6His 유전자를 형질감염하여 준비하고, 이 세포를 IP 버퍼에 용해시키고 준비한 bead 500ul를 정제한 각각의 항체 2ug에 첨가하여 4℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 IP 버퍼로 씻어주고 SDS 시료 버퍼 20ul에 녹여 penta-His 항체를 이용하여 웨스턴 블랏 실험을 수행하였다.

[0119] 그 결과, 상기 결과와 동일하게 본 발명의 하이브리도마 세포주에서 생산된 T3A11C2 항체 및 T10D3F2 항체 모두 TREM2 항원에 대한 결합 특이성이 있음을 알 수 있었다(도 5 오른쪽 도면 참조).

[0121] <실시예 7>

[0122] 항원-항체 복합체 확인

[0123] TREM2 항원과 하이브리도마 세포주에서 생산된 T3A11C2 항체 및 T10D3F2 항체를 각각 정제하여 in-vitro 상태에서 항원-항체 결합여부를 확인하였다. TREM2 항원과 각 항체는 1:1.6의 비율로 섞어준 후 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 그런 다음 크기배제 크로마토그래피를 수행하였고 각 피크 분획의 샘플을 SDS-PAGE로 전기영동하여 확인하였다.

[0124] 그 결과, T3A11C2 항체 및 T10D3F2 항체 모두 TREM2 항원 단백질과 1:1 결합하는 것을 확인하였다. 도 6에서 도 6A는 T3A11C2 항체에 대한 항원-항체 복합체를 확인한 결과이고, 도 6B는 T10D3F2 항체에 대한 항원-항체 복합체를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[0126] <실시예 8>

[0127] TREM2 결합부위 확인

[0128] 본 발명에서 제조한 발명자들은 T3A11C2 항체 및 T10D3F2 항체가 항원단백질인 TREM2 단백질의 어떤 부분을 인식하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0129] 이를 위해 상기 실시예에서 발현 및 정제한 인간 TREM2 단백질(전장부분(16~230 a.a; 서열번호 2의 1~215번째의

서열로 이루어진 폴리펩타이드) 및 세포외부분(16~132 a.a; 서열번호 2의 1~117번째의 서열로 이루어진 폴리펩타이드)을 준비하여 1ug 씩 SDS-PAGE 전기영동 하였다. 그 후 PVDF 멤브레인으로 이동시키고 본 발명의 항체인 T3A11C2 및 T10D3F2 항체로 각각 반응시킨 후, 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0131] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 두 종류의 항체 모두 인간 TREM2 단백질의 전장부분(서열번호 2의 1~215번째의 서열로 이루어진 폴리펩타이드)에 결합하는 것을 확인할 수 있었으며, 반면, 세포외부분(서열번호 2의 1~117번째의 서열로 이루어진 폴리펩타이드)의 TREM2에는 결합하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명의 2종류 항체 모두 TREM2 단백질에 대해 서열번호 2의 118~230번째의 서열로 이루어진 폴리펩타이드 부위에 결합한다는 것을 알 수 있었다.

[0133] <실시예 9>

[0134] TREM2 단일클론항체의 절편 정제 및 항원과의 복합체 형성 확인

[0135] 하이브리도마 세포주에서 생산되는 TREM2에 대한 단일클론항체를 포함하는 세포 배양액을 protein G 컬럼을 이용하여 IgG 타입의 항체를 분리하였다. 이후 papain을 1:100의 비율로 추가하여 상온에서 2시간 처리하여 절단하고 이를 HQ 컬럼에 로딩하여 FT로 항체절편(Fab)과 Fc를 분리하여 정제하였다. 정제 과정 중의 단백질은 SDS-PAGE하여 상태를 확인하였고, 그 후 항체절편(Fab)만을 농축하여 복합체 형성에 이용하였다. 이때 상기 항체절편(Fab)과 Fc를 분리 결과를 도 8에 나타내었다.

[0136] 또한, TREM2 단백질과 하이브리도마 세포주에서 생산된 각각의 항체를 정제한 항체절편을 이용하여 in-vitro 상태에서 결합여부를 확인하였다. 이를 위해 TREM2와 각 항체절편은 1:1.6의 비율로 섞어준 후 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 그런 다음 크기배제 크로마토그래피를 수행하였고 각 피크 분획의 샘플을 SDS-PAGE로 전기영동하여 확인하였다.

[0137] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, T3A11C2 항체절편 및 T10D3F2 항체절편 모두는 TREM2 항원 단백질과 1:1 결합하는 것을 알 수 있었다.

[0139] <실시예 10>

[0140] T3A11C2 항체절편 및 T10D3F2 항체절편에 대한 TREM2 항원인식 부위 확인

[0141] T3A11C2 항체절편과 T10D3F2 항체절편이 TREM2에 대해 서로 다른 인식부위를 갖는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 먼저 TREM2 단백질에 T3A11C2 항체절편을 결합시켜 크기배제 크로마토그래피를 수행한 후, TREM2-T3A11C2 항체절편(Fab) 복합체를 SDS-PAGE로 확인한 후, 이 단백질 분획에 T10D3F2 항체절편을 1:1.6의 비율로 추가 첨가하였다. 이후 상온에서 1시간 반응시킨 후 크기배제 크로마토그래피를 수행하였다.

[0143] 분석 결과, T10D3F2 항체절편을 추가로 첨가한 경우, TREM2-T3A11C2 항체절편(Fab) 복합체 보다 크로마토그래피로 분리된 분획의 피크가 앞쪽으로 이동되어 있는 것으로 나타났다(도 10의 왼쪽 도면). 이는 두 항체가 TREM2에 대하여 서로 다른 인식부위를 갖는다는 것을 의미하는 것으로, TREM2-T3A11C2 항체절편(Fab) 복합체에 대해 T10D3F2 항체절편을 첨가한 경우, TREM2에 대해 T3A11C2 항체절편과 다른 부위에 결합하여 복합체의 크기가 더 증가되어 빠르게 용출되기 때문이다. 이 외에도 동시에 두 항체절편을 TREM2와 결합시킨 경우에도 동일한 결과를 확인함에 따라(도 10의 오른쪽 도면), T3A11C2 항체 및 T10D3F2 항체는 TREM2에 대해 서로 다른 부위를 인식한다는 것을 알 수 있었다.

[0145] <실시예 11>

[0146] T3A11C2 항체 및 T10D3F2 항체의 TREM2 인식부위 확인

[0147] HEK 293 세포에 각기 다른 부위의 TREM2 단백질(서열번호 2의 아미노산 서열에서, 1-117번째 서열로 이루어진 폴리펩티드; 1-159번째 서열로 이루어진 폴리펩티드; 1-215번째 서열로 이루어진 폴리펩티드)로 각각 형질전환

(transfection)한 후, 본 발명의 항체(T3A11C2 또는 T10D3F2)가 TREM2의 어떤 부분을 인식하여 결합하는지 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0148] 구체적으로 실험 하루 전, 웰당 3×10^5 세포를 6 well 플레이트에 분주하여 준비하고, 다음 날 TREM2 유전자(서열번호 2의 1-117, 1-159, 1-215 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드) 각각을 함유한 pCDNA3.1C-6His 벡터(1 μ g)로 상기 세포를 각각 형질전환 시켰다. 그 후 CO₂ 인큐베이터에서 세포를 48시간 배양하였다. 그 후 프로테아제 억제제가 함유된 용해(lysis) 버퍼를 이용하여 형질전환된 세포로부터 단백질을 용출하였고, 용출된 각각의 단백질 분획을 SDS-PAGE에 10 μ l 씩 로딩한 후, PVDF 멤브레인으로 이동시킨 후, 각각의 항체(T3A11C2, T10D3F2, anti-His)로 반응시켜 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0150] 그 결과, 2가지 항체 모두 TREM2의 세포외 부분에 결합하는 것으로 나타났는데, 특히 T3A11C2 항체의 경우 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 TREM2 펩타이드(서열번호 2의 1~159번째 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드) 부분을 인식하여 결합하는 것으로 나타났고, T10D3F2 항체는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 TREM2 펩타이드(서열번호 2의 118~159번째 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드) 부분을 특이적으로 인식하여 결합하는 것으로 나타났다(도 11 참조).

[0152] 따라서 이러한 결과를 통해, 본 발명의 T3A11C2 항체 및 T10D3F2 항체는 TREM2 항원에 대해 각기 다른 부위를 특이적으로 결합한다는 것을 알 수 있었고, 이들 항체를 이용하여 뇌질환의 바이오마커인 TREM2를 효과적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었을 뿐만 아니라, 이들 항체를 알츠하이머성 치매의 진단 및 치료제의 용도로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0154] 이제까지 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0155]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13471BP

수탁일자 : 20180126

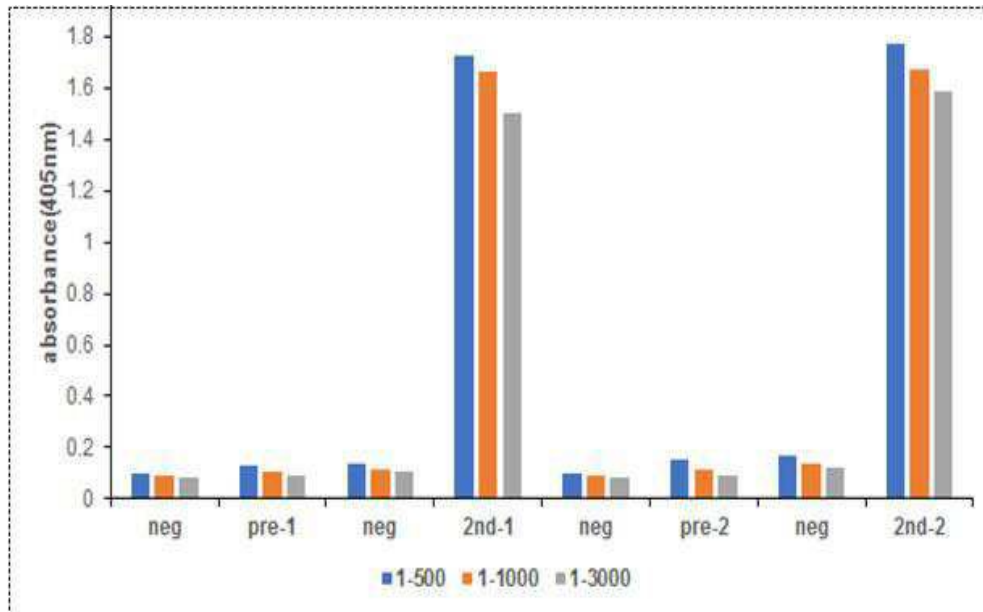
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13470BP

수탁일자 : 20180126

도면

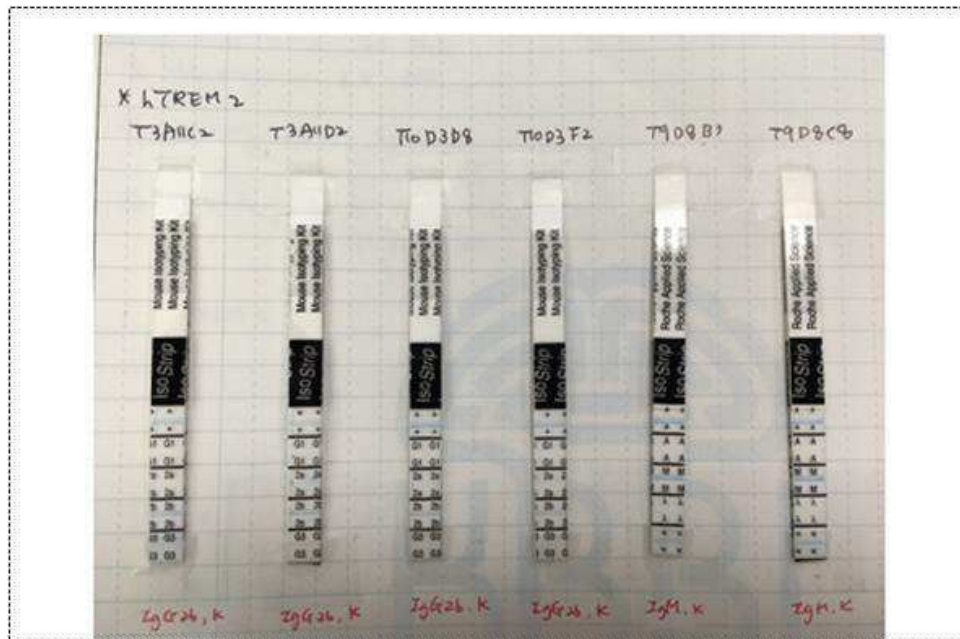
도면1



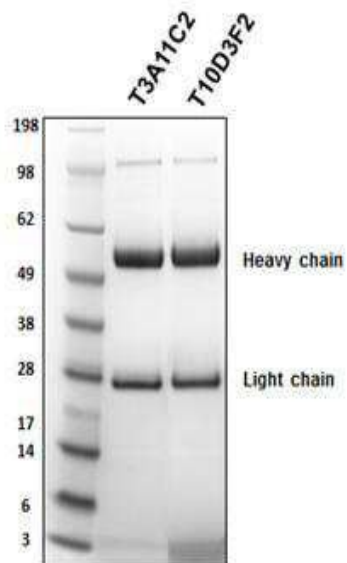
도면2

HTREM2	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	sum
>0.11	3	1	8	8	4	1	3	3	5	6	42
>0.13	2	3	1	0	4	5	4	8	6	4	37
>0.16	2	1	1	2	7	4	1	1	3	6	28
>0.30	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	4
	A4, 0.139	C2, 0.131	A11, 1.3609	F6, 0.2337	A1, 0.1815	A2, 0.1512	C5, 0.1377	A8, 0.1313	B1, 0.1459	A12, 1.4913	
	B12, 0.1314	D3, 0.1514	E4, 0.1321	G9, 0.1787	A3, 0.1699	B2, 0.1584	D10, 0.1951	B6, 0.1493	B9, 0.1486	B6, 0.1554	
	C7, 0.1898	D9, 0.2692	H6, 0.2528		A6, 0.1437	B4, 0.1445	F3, 0.159	C3, 0.135	D5, 0.1807	C7, 0.1505	
	E10, 0.3058	E6, 0.136			B2, 0.1355	D4, 0.1333	F12, 0.146	D12, 0.1526	D6, 0.1692	C8, 0.2052	
	G9, 0.1616				B5, 0.1618	G3, 0.1896	H11, 0.1512	E6, 0.1327	D8, 0.2975	C9, 0.2021	
					B10, 0.1759	G5, 0.1388		F2, 0.1803	E10, 0.1388	D9, 2.724	
					C4, 0.1945	G8, 0.2308		F3, 0.1353	H3, 0.1371	E8, 0.1703	
					E9, 0.2575	H3, 0.1693		G3, 0.131	H8, 0.1399	E9, 0.1817	both 7
					F9, 0.141	H8, 0.1616		G10, 0.1374	H9, 0.1405	F1, 0.1307	native 3
					G2, 0.1538					F11, 0.1792	denature 11
					G4, 0.2416					G7, 0.1542	
										G9, 0.1722	
	5	4	3	2	11	9	5	9	9	12	69

도면3

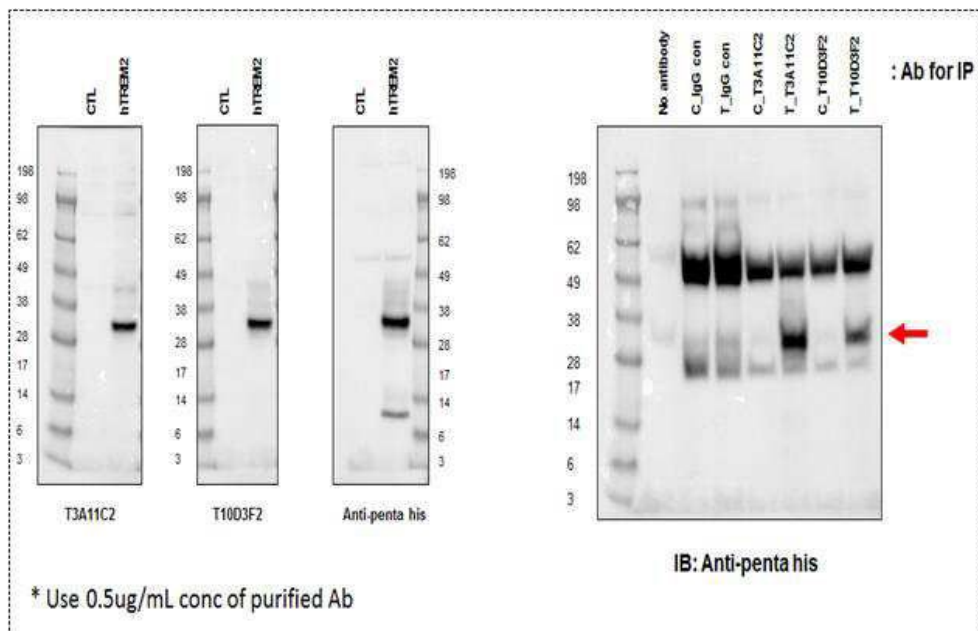


도면4

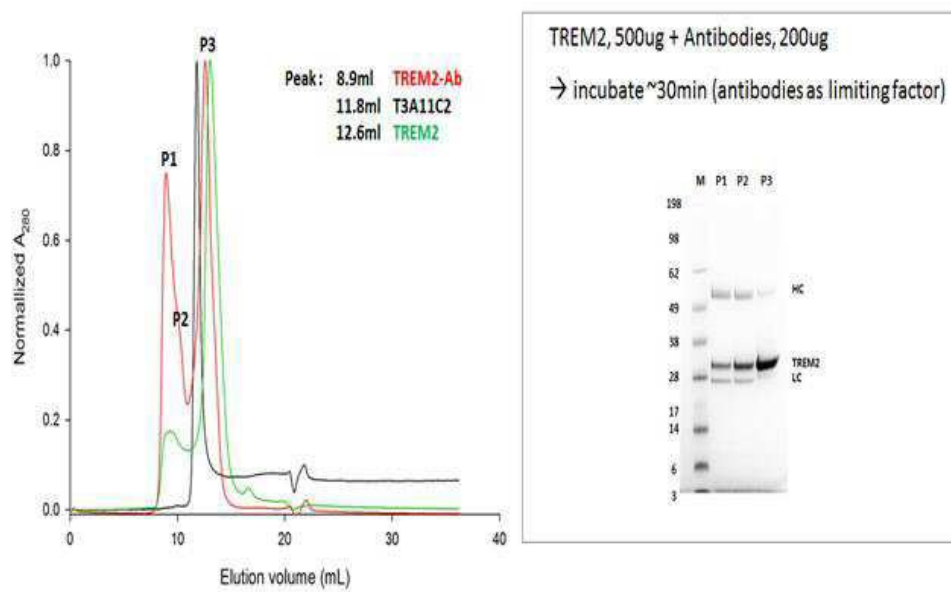


Yield	mg/L
T3A11C2	100
T10D3F2	94

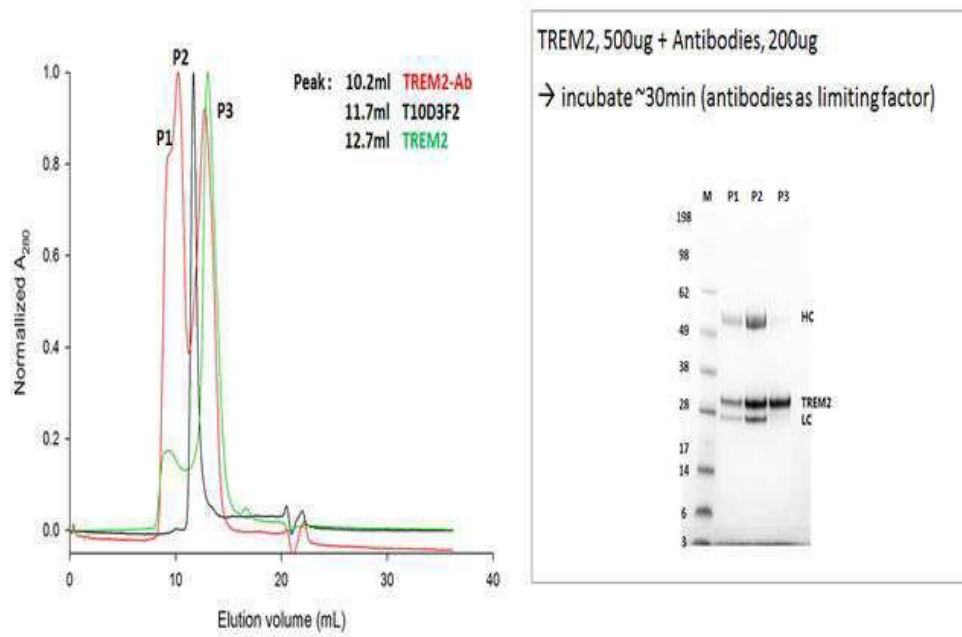
도면5



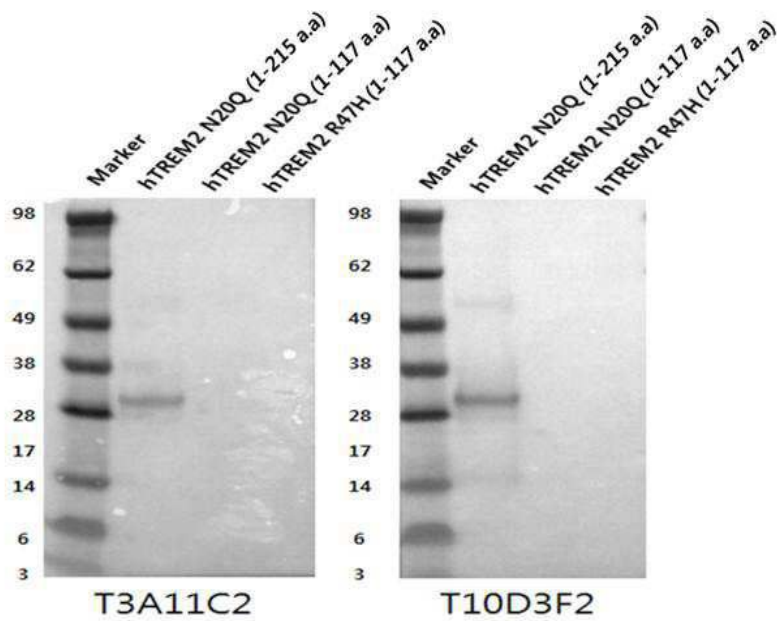
도면6a



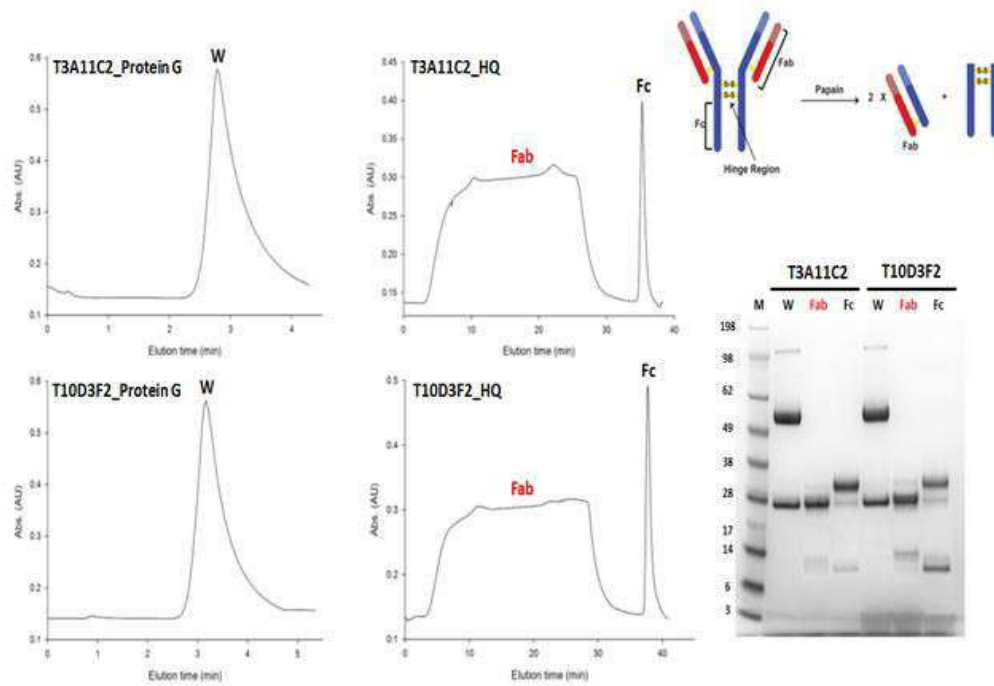
도면6b



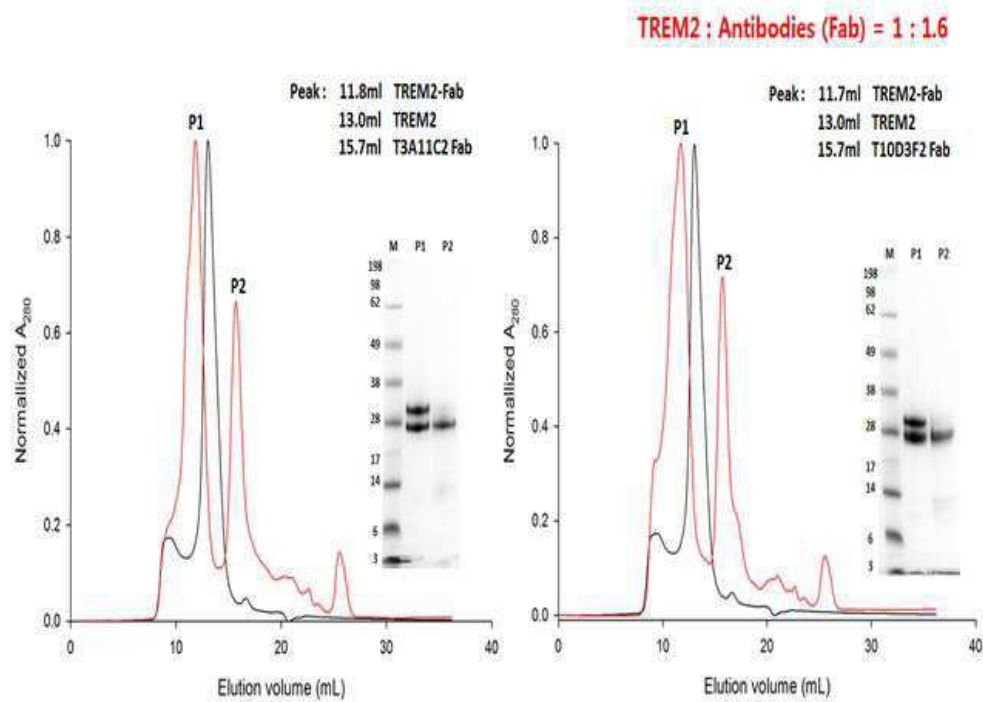
도면7



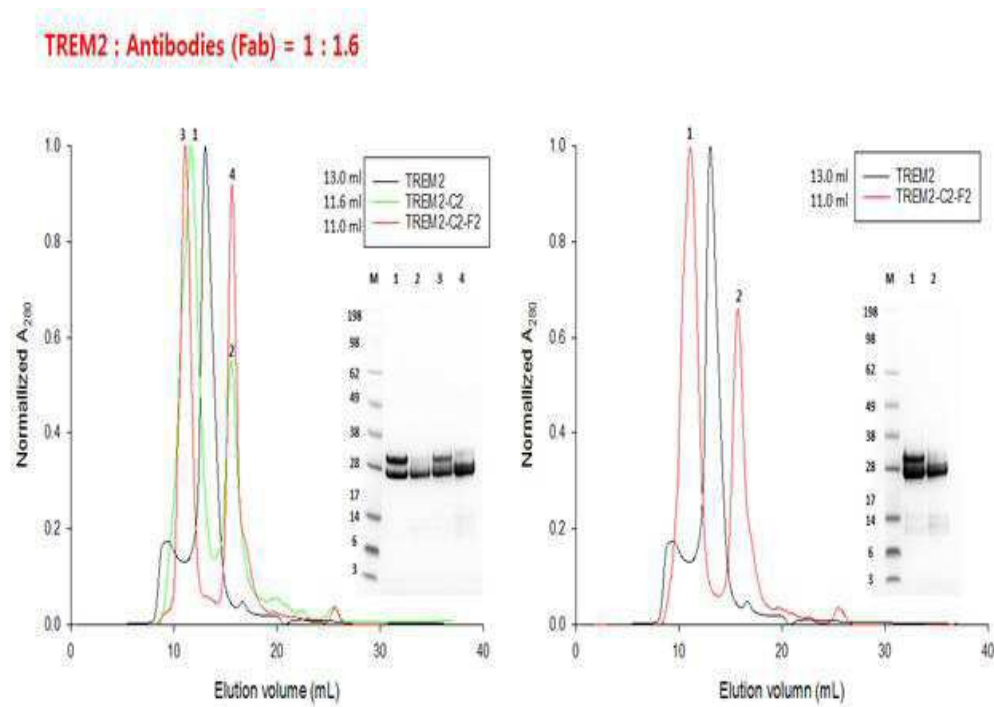
도면8



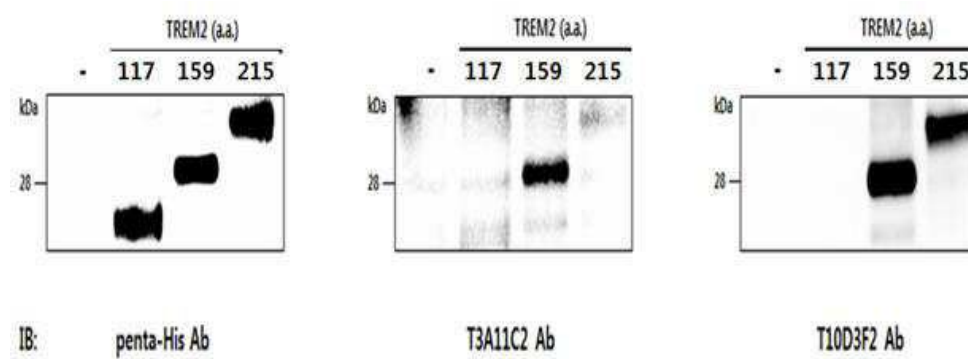
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Korea Brain Research Institute
- <120> Monoclonal antibody with specificity for human TREM2 protein,
hybridoma cell line producing the same and use thereof
- <130> NPDC67067
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 690
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> human TREM2 DNA sequence

<400> 1

atggagcctt tgaggctgct ctttttctg ttcgtcaccg aactgtctgg agcgcaccag 60

accactgttt tccagggagt ggctggacag tcgctgcaag tttctgccc ttacgactcc 120

atgaagcatt ggggtcgccg taaagcctgg tgccgccagc tgggagagaa gggaccatgt 180

caacgtgtgg tcicaactca caacctctgg ctcttgagtt tcttgaggag atggcagggt 240

tcgactgcta ttacagacga tacgttgggt ggacactga cgatcacct gcgcaacctc 300

caacccacg acgttggtct gtaccagtgt cagtcctgc acggttccga ggctgataca 360

ctccgtaaag ttttgggtga agtcctggcc gaccactcg atcacagaga cgcaggcgat 420

ctgtggttcc ctggtgaatc cgagtccttc gaggacgctc acgtcgaaca ttccatctcc 480

cgctccctgc tggaggcgga aatccattc cctccacat ccattttgct gctcttgccc 540

tgcattcttct tgatcaagat tctggctgcc agcgactct gggcagcggc ttggcacggt 600

cagaaaccgg gcacgatcc accgtccgaa ctggactgtg gacacgatcc tggttaccag 660

ttgcaaacc tgcccggact ccgcgatact 690

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human TREM2 amino acid sequence

<400> 2

Ser Gly Ala His Gln Thr Thr Val Phe Gln Gly Val Ala Gly Gln Ser

1 5 10 15

Leu Gln Val Ser Cys Pro Tyr Asp Ser Met Lys His Trp Gly Arg Arg

20 25 30

Lys Ala Trp Cys Arg Gln Leu Gly Glu Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val

35 40 45

Val Ser Thr His Asn Leu Trp Leu Leu Ser Phe Leu Arg Arg Trp Gln

50 55 60

Gly Ser Thr Ala Ile Thr Asp Asp Thr Leu Gly Gly Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Thr Leu Arg Asn Leu Gln Pro His Asp Ala Gly Leu Tyr Gln Cys Gln

85 90 95

Ser Leu His Gly Ser Glu Ala Asp Thr Leu Arg Lys Val Leu Val Glu

100 105 110

Val Leu Ala Asp Pro Leu Asp His Arg Asp Ala Gly Asp Leu Trp Phe

115 120 125

Pro Gly Glu Ser Glu Ser Phe Glu Asp Ala His Val Glu His Ser Ile

130 135 140

Ser Arg Ser Leu Leu Glu Gly Glu Ile Pro Phe Pro Pro Thr Ser Ile

145 150 155 160

Leu Leu Leu Leu Ala Cys Ile Phe Leu Ile Lys Ile Leu Ala Ala Ser

165 170 175

Ala Leu Trp Ala Ala Ala Trp His Gly Gln Lys Pro Gly Thr His Pro

180 185 190

Pro Ser Glu Leu Asp Cys Gly His Asp Pro Gly Tyr Gln Leu Gln Thr

195 200 205

Leu Pro Gly Leu Arg Asp Thr

210 215

<210> 3

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope of T3A11C2 monoclonal antibody

<400> 3

Ser Gly Ala His Gln Thr Thr Val Phe Gln Gly Val Ala Gly Gln Ser

1 5 10 15

Leu Gln Val Ser Cys Pro Tyr Asp Ser Met Lys His Trp Gly Arg Arg

20 25 30

Lys Ala Trp Cys Arg Gln Leu Gly Glu Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val

35 40 45

Val Ser Thr His Asn Leu Trp Leu Leu Ser Phe Leu Arg Arg Trp Gln

50 55 60

Gly Ser Thr Ala Ile Thr Asp Asp Thr Leu Gly Gly Thr Leu Thr Ile

[illegible]

145	150	155
<210>	4	
<211>	42	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	epitope of T10D3F2	monoclonal antibody
<400>	4	

Leu Asp His Arg Asp Ala Gly Asp Leu Trp Phe Pro Gly Glu Ser Glu
1 5 10 15
Ser Phe Glu Asp Ala His Val Glu His Ser Ile Ser Arg Ser Leu Leu
20 25 30
Glu Gly Glu Ile Pro Phe Pro Pro Thr Ser
35 40