



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월19일
 (11) 등록번호 10-1810551
 (24) 등록일자 2017년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
A61K 38/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7020322(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2011년05월26일
 심사청구일자 2016년08월22일
 (85) 번역문제출일자 2016년07월25일
 (65) 공개번호 10-2016-0102066
 (43) 공개일자 2016년08월26일
 (62) 원출원 특허 10-2012-7033484
 원출원일자(국제) 2011년05월26일
 심사청구일자 2012년12월21일
 (86) 국제출원번호 PCT/CN2011/074687
 (87) 국제공개번호 WO 2011/147320
 국제공개일자 2011년12월01일

(30) 우선권주장
 201010183905.9 2011년05월26일 중국(CN)

(56) 선행기술조사문헌
 Wang, Yan, et al., Acad J Sec Mil Med Univ.
 2006, Vol.27, No. 11, pp.1190-1195.
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 씨에스피씨 종콰이 팔마씨우티컬 테크놀로지 (스
 자광) 컴퍼니 리미티드
 중국 허베이 050035 스좌좡 후양호 스트리트 넘버
 226
 시추안 유니버시티
 중국 시추안 610065, 첩두, 이후안 로드, 사우스
 섹션 1, 24

(72) 발명자
양 리
 중국, 시추안 610065, 첩두, 이후안 로드, 사우스
 섹션 1, 24
웨이 위추안
 중국, 시추안 610065, 첩두, 이후안 로드, 사우스
 섹션 1, 24

(74) 대리인
이정현

전체 청구항 수 : 총 20 항

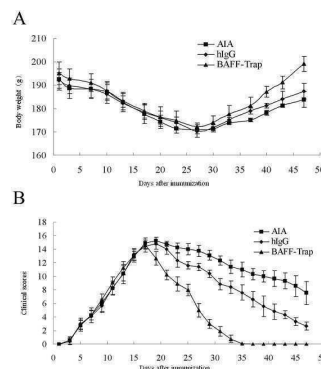
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **B세포 활성화인자길항제 및 그의 제조방법과 용도**

(57) 요약

본 발명은 유전자공학의 약물분야에 속하며 구체적으로 새로운 B세포 활성화 인자 (BAFF) 길항제, 이의 제조방법 및 용도를 말한다. 본 발명이 해결하고자하는 기술문제는 자가면역질환을 치료 및 예방하는데 새로운 선택을 할 수 있게 하는 것이다. B세포 활성화 인자 길항제는 주로 TACI 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD2 도메인과 Br3 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD 도메인의 융합에 의해 수득되고, 또한 IgG1의 Fc 단편과도 융합될 수 있다. 실험결과, 새로운 융합단백질 분자는 BAFF 길항제의 기능을 가지므로 자가면역질환을 치료할 수 있으며 자가면역질환의 치료 및 예방에 새로운 선택 기회를 제공한다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C12N 15/62 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Hymowitz, Sarah G. et al. J biol chem. 2005,
Vol. 280, No. 8, pp. 7218-7227.

Gordon, Nathaniel C. et al. Biochemistry.
2003, Vol. 42, pp.5977-5983.

JP2010501622 A

JP2005510208 A

명세서

청구범위

청구항 1

활성 구조 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 상기 활성 구조 도메인이 TACI 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD2 도메인과 Br3 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD 도메인의 직접적인 융합에 의해 획득되는 구조 도메인이며, 상기 단백질이 B세포 활성 인자 길항제의 기능을 구비하고; 서열번호 1에 표기된 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 1에 표기된 아미노산 서열의 C-말단부에서 인체 면역글로불린의 Fc 단편과 연결된 아미노산 서열을 갖는 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열번호 2에 표기된 아미노산 서열을 갖는 단백질.

청구항 5

제1항, 제3항, 및 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, N-말단부에서 신호 펩티드와 연결된 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 서열번호 3에 표기된 아미노산 서열을 갖는 단백질.

청구항 7

제3항 또는 제4항에 있어서, 인체 면역글로불린의 Fc 단편에 의해 이합체 단백질 형태인 단백질.

청구항 8

제1항, 제3항, 및 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 암호화하는 유전자.

청구항 9

제8항에 있어서, 서열번호 10에 표기된 뉴클레오티드 서열 또는 이의 축퇴 서열을 갖는 유전자.

청구항 10

제8항에 있어서, 서열번호 4에 표기된 뉴클레오티드 서열 또는 이의 축퇴 서열을 갖는 유전자.

청구항 11

제8항에 있어서, 서열번호 5에 표기된 뉴클레오티드 서열 또는 이의 축퇴 서열을 갖는 유전자.

청구항 12

제8항의 유전자를 포함하는 유전자운반체.

청구항 13

제12항의 유전자운반체를 포함하는 숙주세포.

청구항 14

제1항, 제3항, 및 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 활성 성분으로 포함하는 자가면역질환의 치료 약물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 자가면역질환이 류마티스관절염, 전신성 홍반성 낭창 또는 쇼그렌 증후군인 약물.

청구항 16

제8항의 유전자를 활성 성분으로 포함하는 자가면역질환의 치료 약물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 자가면역질환이 류마티스관절염, 전신성 홍반성 낭창 또는 쇼그렌 증후군인 약물.

청구항 18

제1항, 제3항, 및 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 암호화하는 유전자를 발현 매개체에 넣는 단계, 발현 매개체를 숙주세포로 전이하는 단계, 숙주세포를 배양 및 증식하는 단계, 및 숙주세포 및 배양 상청액을 분리정제하여 융합 단백질을 수득하는 단계를 포함하는, 제1항, 제3항, 및 제4항 중 어느 한 항의 융합 단백질의 제조 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 발현 매개체가 진핵 플라스미드 발현 매개체, 아데노바이러스 매개체 또는 아데노바이러스의존 바이러스 매개체인 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 숙주세포가 진핵세포인 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 분리정제 단계가 숙주세포의 대량 배양 상청액을 Mab-Select 응고겔 칼럼 및 SP 칼럼 색층분석 후 B세포 활성 인자 길항 단백질을 수득하는 것인 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 유전자공학의 약물분야에 관한 것으로서, 더 구체적으로 새로운 B세포 활성 인자 (B cell activating factor: BAFF) 길항제 및 그의 제조방법과 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 자가면역질환, 예를 들어 류마티스관절염 (Rheumatoid arthritis: RA), 전신성 홍반성 낭창 (systemic lupus erythematosus: SLE), 쇼그렌 증후군 (Sjogren syndrome) 등은 모두 자기 체내의 B세포 또는 플라스마세포의 과대증식, 체액면역활성과 밀접한 연관이 있다.

[0003] B세포 활성 인자는 또한 BLyS, TALL-1, THANK, zTNF4 또는 TNFSF-13B 라고도 한다. 1999년에 발견된 TNF의 구성원이며 [1], 적합한 수용체와의 결합을 통해 하부정보통로를 가동하고 B세포의 생존과 성숙 그리고 분화를 조절한다 [2]. BAFF는 그 외의 3가지 리간드 (APRIL, EDA 및 TWEAK)와 동일한 형태에 속하고 유사한 기능과 구조적 특징이 가진다 [2]. BAFF는 II형 막관통 단백질이며, 막결합 및 가수분해 2가지 형식을 가진다. 막결합식 막관통 단백질은 285개의 아미노산으로 구성되며, 단백질 가수분해효소작용에 의해 폴리펩티드사슬을 R133과 A134에서 분리시켜 152개의 아미노산으로 구성된 가수분해성 단백질을 형성한다. 이러한 과정은 세포와 인자의 조절을 받는다 [3]. 정상적인 생리 환경에서 가수분해성 BAFF는 트리머형식으로 존재하며 대생물작용을 한다 [4]. BAFF는 주로 말초혈액의단핵세포 (PBMC)로 발현된다. 여기에는 비장과 림프선 중의 대식세포, 단핵세포와 수지상세포가 포함된다 [5].

[0004] 현재까지 BAFF의 3가지 수용체를 발견했다. BCMA (B cell maturation antigen), TACI (transmembrane activator and CAML interactor) 및 BAFF-R (BAFF receptor, Br3)은 모두 III형 막관통 단백질이다. BAFF와 APRIL은 강한 친화성으로 TACI와 BCMA와 결합한다. 그러나 BAFF는 BAFF-R과도 결합할 수 있다. TNF수용체의 세포외구역에는 다수 개의 시스테인-농축 도메인 (cysteine-rich domain: CRD)이 있다. 각각의 CRD는 6개의 시스테인 잔기로 3개의 이황화 결합을 형성한다. BCMA는 단일 CRD를 가지고 있다. BCMA와 비교했을 때, TACI는 두 개의 전형적인 CRD를 포함하고 있다. 즉 CRD1과 CRD2이다. 그 중에 CRD2만 리간드결합에 참여한다 (TACI (aa.70-104) 서열번호 8) [6]. Br3은 4개의 시스테인 잔기로 구성된 1개의 CRD만 가지고 있고 (Br3 (aa.18-35): 서열번호 9), BAFF와의 결합 도메인은 줄어서 아미노산이 26개밖에 되지 않는다 [7].

[0005] BAFF는 B세포의 생존을 촉진하는 작용 이외에, 배중심에서의 반응을 유지하고, 동일유형전환과 T세포의 활성화 등의 면에서도 아주 중요한 조절작용을 한다. 따라서 BAFF와 그 수용체는 자가면역질환을 치료하는 새로운 분야로서 많은 관심을 한몸에 받고 있다. BAFF의 특이한 길항제는 (수용성 수용체 TACI-Fc, Br3-Fc 또는 항BAFF 항체 등이 포함된다) BAFF의 대생물작용을 억제하므로 류마티스관절염, 쇼그렌증후군, 전신성 홍반성 낭창 등의 자가면역질환을 치료하는 효과가 있다. 현재 FDA의 승인을 거쳐 2011년 3월부터 항-BAFF 단일 클론 항체 Belimumab (상품명: Benlysta)는 시중에 판매되고 있다. 그 치료범주는 SLE이다. 이 항체는 50여 년 동안 처음으로 시중에 판매되는 낭창을 치료하는 신약이 되었으며, RA의 치료도 III기 임상시험에 들어갔고, 가수분해성 수용체 TACI-Fc가 SLE와 RA를 치료하는 연구도 II/III기 임상시험 단계에 들어섰다.

선행기술문헌

[0006] 1. Moore PA, Belvedere O, Orr A, et al. BlyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. Science, 1999; 285: 260-2632.

[0007] 2. Mackay F, Ambrose C: The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity. Cytokine Growth Factor Rev 2003, 14(3-4):311-324

[0008] 3. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H et al: BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J Exp Med 1999, 189(11):1747-1756.

[0009] 4. Sutherland AP, Mackay F, Mackay CR: Targeting BAFF: immunomodulation for autoimmune diseases and lymphomas. Pharmacol Ther 2006, 112(3):774-786.

[0010] 5. Scapini P, Nardelli B, Nadali G, et al. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BlyS. J Exp Med, 2003; 197: 297-302.

[0011] 6. Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ, et al. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. J Biol Chem, 2005; 280: 7218-7227.

[0012] 7. Kim HM, Yu KS, Lee ME, et al. Crystal structure of the BAFF-BAFF-R complex and its implications for receptor activation. Nat Struct Biol, 2003; 10: 342-348

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명이 해결하고자하는 기술문제는 자가면역질환을 예방하고, 특히 BAFF에 대한 길항작용을 이용하여 자가면역질환을 예방하고 효과적으로 치료하는 B세포활성인자길항제 및 그의 제조방법과 용도를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상술한 기술문제를 해결하는 본 발명은 신형 B세포활성인자길항제를 제공하는 것이다. 상기 B세포활성인자길항제는 단백질의 일종이다.

[0015] 구체적으로, 상기 B세포 활성 인자 길항제는,

[0016] ① TACI 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD2 도메인과 Br3 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD 도메인이 서로 융합되어

수득되는 구조 도메인을 포함하는 융합 단백질; 또는

- [0017] ② 상기 ①에서 한정된 융합단백질의 아미노산 서열 중 적어도 1개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가하여 수득되고, 상기 ①에서 한정된 융합단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다. 상기 B세포 활성화 인자 길항제에 함유된 구조 도메인은 상기 B세포 활성화 인자가 결합하는데 중요한 역할을 한다.
- [0018] 더 구체적으로, 상기 B세포 활성화 인자 길항제는,
- [0019] ① 서열번호 1에 표기된 아미노산 서열의 단백질; 또는
- [0020] ② 서열번호 1에 표기된 아미노산 서열 중 적어도 1개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가하여 수득되고, 서열번호 1에 표기된 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.
- [0021] 더 구체적으로 상기 B세포활성인자길항제는:
- [0022] ① 서열번호 1에 표기된 아미노산 서열의 C-말단부에 인체 면역글로불린의 Fc 단편을 연결한 아미노산 서열 구조를 가진 단백질; 또는
- [0023] ② 상기 ①에서 한정된 아미노산 서열 중 적어도 1개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가하여 수득되고, 상기 ①의 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.
- [0024] 더 구체적으로, 상기 B세포 활성화 인자 길항제는,
- [0025] 서열번호 2에 표기된 아미노산 서열의 단백질이거나, 서열번호 2에 표기된 아미노산 서열 중 적어도 1개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가하여 수득되고, 서열번호 2에 표기된 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.
- [0026] 인체면역글로불린의 Fc단편을 첨가하므로 유전자공학방식으로 제조한 융합단백질은 이합체 형식으로 존재한다.
- [0027] 바람직하게는, 상기 B세포 활성화 인자 길항제 단백질의 N-말단부에 신호 펩티드가 연결된다.
- [0028] 더 바람직하게는, 상기 B세포 활성화 인자 길항제는,
- [0029] 서열번호 3에 표기된 아미노산 서열의 단백질이거나, 서열번호 3에 표기된 아미노산 서열 중 적어도 1개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가하여 수득되고, 서열번호 3에 표기된 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.
- [0030] 본 발명은 상기 본질이 단백질인 B세포 활성화 인자 길항제를 제공하는 동시에, 상기 B세포 활성화 인자 길항제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 제공한다.
- [0031] 그 중에서, 상기 B세포 활성화 인자 길항제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은,
- [0032] ① 서열번호 10에 표기된 뉴클레오티드 서열 또는 그의 축퇴 서열; 또는
- [0033] ② 상기 ①에서 한정된 뉴클레오티드 서열 중 적어도 1개의 뉴클레오티드 유도체를 대체하거나/결실되거나/첨가하여 수득되고, 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0034] 그 중에서, 상기 B세포 활성화 인자 길항제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은,
- [0035] ① 서열번호 4에 표기된 뉴클레오티드 서열 또는 그의 축퇴 서열; 또는
- [0036] ② 상기 ①에서 한정된 뉴클레오티드 서열 중 적어도 1개의 뉴클레오티드 유도체를 대체하거나/결실되거나/첨가하여 수득되고, 서열번호 4에 표기된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0037] 그 중에서, 상기 B세포 활성화 인자 길항제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은,
- [0038] ① 서열번호 5에 표기된 뉴클레오티드 서열 또는 그의 축퇴 서열; 또는
- [0039] ② 상기 ①에서 한정된 뉴클레오티드 서열 중 적어도 1개의 뉴클레오티드 유도체를 대체하거나/결실되거나/첨가하여 수득되고, 서열번호 5에 표기된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다.

- [0040] 본 발명은 상기 뉴클레오타이드 서열을 함유한 유전자운반체를 제공한다.
- [0041] 바람직하게는, 상기 유전자운반체는 뉴클레오타이드 서열을 표현하기 위한 매개체이다.
- [0042] 본 발명은 상기 유전자운반체를 함유하는 숙주세포를 제공한다.
- [0043] 본 발명은 상기 B세포활성인자길항제, 뉴클레오타이드 서열, 또는 유전자운반체가 자가면역질환의 치료 약물을 제조하는 과정에서의 중요한 역할을 제공한다.
- [0044] 본 발명은 상기 B세포활성인자길항제, 뉴클레오타이드 서열, 유전자운반체를 주요 활성성분으로 자가면역질환 예방약을 제공한다.
- [0045] 상기 자가면역질환은 주로 류마티스관절염, 전신성 홍반성 낭창, 건조합병증(쇼그렌 증후군)이다.
- [0046] 본 발명은 상기 B세포 활성 인자 길항제의 제조방법을 제공한다. 상기 제조방법의 절차는 아래와 같다. B세포 활성 인자 길항제를 암호화하는 유전자를 발현 매개체에 넣고, 발현 매개체를 숙주로 전이하고, 숙주를 배양 및 증식한 후에 숙주세포 및 배양 상청액을 분리정제하여 B세포 활성 인자 길항제를 수득한다.
- [0047] 그 중에서, 상기 B세포활성인자길항제의 제조방법 중의 발현 매개체는 진핵플라스미드 발현 매개체, 아데노바이러스 매개체 또는 아데노바이러스의존 바이러스 매개체이다.
- [0048] 그 중에서, 상기 B세포활성인자길항제의 제조방법 중의 상기 숙주는 진핵세포이다.
- [0049] 그 중에서, 상기 B세포 활성 인자 길항제의 제조방법 중의 상기 분리정제 방법은 숙주세포의 대량 배양 상청액을 미국 GE회사의 응고겔 Mab-Select칼럼에 이어 다시 SP 칼럼을 거쳐 색층분석후 B세포 활성 인자 길항제를 수득한다.
- [0050] 상기 방법 중의 발현 매개체는 통상적인 진핵발현매개체를 사용할 수 있다. 유전자공학에서 상용적인 숙주세포 분리순화방법도 기존의 방법을 참조하여 순도가 높은 B세포활성인자길항제를 얻을 수 있다. 또한 암호화한 B세포활성인자길항제의 유전자를 발현매개체에 넣고 발현매개체를 숙주로 전이한다. 이 과정은 각종 유전자공학수칙과 구체적으로 사용된 매개체와 숙주세포에 대한 설명을 참조하여 진행할 수 있다.
- [0051] 본 발명은 TACI 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD2 도메인과 Br3 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD 도메인이 서로 융합된 BAFF 길항 단편을 설계하고 구성하였다 (아미노산 서열은 서열번호 1에 표기되고 서열번호 10에 표기된 뉴클레오타이드 서열을 갖는다). 생체내의 안정성을 높이고 반감기를 연장하기 위하여 면역글로불린의 Fc 단편과 융합하여 새로운 융합단백질 분자를 수득한다. 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG4의 Fc 단편과 융합한다. 본 발명의 실시예에서는 IgG의 1Fc 단편과 융합하여 새로운 융합단백질 분자를 수득하며, 그 이름을 BAFF Trap (아미노산 서열은 서열번호 2에 표기되고 서열번호 4에 표기된 뉴클레오타이드 서열을 갖는다)이라고 부른다. 실험 결과에 따르면, 이는 B세포 활성 인자 길항제의 기능을 가지고 있다. 물론, 본 발명의 B세포 활성 인자 길항제는 단백질이므로 주요 제조방법은 기존의 유전자공학방법을 참조하여 발효생산을 진행해야 한다. 또한 유전자공학 발효생산을 진행할 때, 용이하게 산물 회수하기 위하여 일반적으로 BAFF Trap의 서열 N-부분에 여러 가지의 자주 사용하는 분비 신호 펩티드의 뉴클레오타이드 서열을 첨가한다. 예를 들어 인체의 IL-2 신호 펩티드의 뉴클레오타이드 서열이다 (인체의 IL-2 신호 펩티드를 첨가한 후, 아미노산의 서열은 서열번호 3에 표기된 것과 같고 서열번호 5에 표기된 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다).
- [0052] 본 발명에 있어서, "서열번호 1 중의 뉴클레오타이드 서열이 적어도 1개의 뉴클레오타이드 유도체 서열을 대체하거나 결실하거나 첨가하는 과정을 거친다"는 내용중의 유전자 서열은 일반적으로 서열번호 1의 단백질 활성 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 축퇴 서열을 말한다. 상기 축퇴 서열은 상기 서열 중의 1개 또는 다수 개의 코돈의 코드번호가 동일한 아미노산 축퇴 코돈에 의해 대체되어 생성되는 서열이다. 코돈이 축퇴성이 있기 때문에 서열번호 1과 동원성이 89%나 낮은 축퇴 서열도 서열번호 1에서 상기 서열로 재암호화할 수 있다. 또한, "서열번호 1 중의 뉴클레오타이드 서열은 적어도 1개의 뉴클레오타이드 유도체 서열을 대체하거나/결실하거나/첨가하는 과정을 거친다"의 의미에는 중도 환경 하에서, 바람직하게는 고도 환경 하에서 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 잠교하여 수득되는 뉴클레오타이드 서열도 포함된다. 이 용어는 서열번호 1 중의 뉴클레오타이드 서열과 동원율이 최소 80%, 비교적 양호할 때는 최소 89%, 좀 더 양호할 때는 최소 90%, 최상일 때는 최소 95%인 뉴클레오타이드 서열이란 것도 포함된다. 본 발명에서도 동일한 기능을 가지고 있다는 것은 BAFF와 결합하여 BAFF 대생물작용에 대한 길항작용을 말하는 것이다.
- [0053] 용어 "서열번호 1에 표기한 뉴클레오타이드 서열이 적어도 1개의 뉴클레오타이드 유도체 서열을 대체하거나/결실되

거나/첨가하는 과정을 거친다"의 의미에는 서열번호 1에서 암호화한 동일기능의 단백질의 서열번호 1에서의 오픈리딩프레임의 변이형식도 포함이 된다. 이러한 변이형식에는 다수 개의 (일반적으로 1-90개, 비교적 양호할 때 1-60개, 더 양호할 때 1-20개, 최상일 때는 1-10개이다) 뉴클레오티드가 결실되거나 삽입되거나 또는 대체되는 형식 및 5'와 3'부분에 다수 개의 (일반적으로 60개 이내, 비교적 양호할 때 30개 이내, 좀 더 양호할 때는 10개 이내, 최상일 때는 5개 이내) 뉴클레오티드를 첨가하는 형식이 포함된다.

[0054] 본 발명중, "상기 아미노산 서열 중 적어도 1개의 아미노산 유도체 서열을 대체하거나/결실하거나/첨가하는 과정을 거쳐 수득되는 아미노산 서열"의 표시에는 다수 개의 (일반적으로 1-50개, 비교적 양호할 때 1-30개, 더 양호할 때 1-20개, 최상일 때는 1-10개) 아미노산의 결실, 삽입 및 대체 및 C-말단부 또는 N-말단부에 1 또는 다수 개의 (일반적으로 20개 이내, 비교적 양호할 때 10개 이내, 좀 더 양호할 때는 5개 이내) 아미노산을 첨가하는 것을 말한다. 예를 들어, 상기 단백질 중, 기능이 비슷한 아미노산으로 대체 과정을 진행할 때, 일반적으로 단백질의 기능은 변하지 않는다. 또한, 예를 들어, C-말단부 또는 N-말단부에 1개 또는 다수 개의 아미노산을 첨가할 경우에도 그 단백질의 기능은 변하지 않는다. 이 용어는 상기 단백질의 활성 단편과 유도체를 포함한다. 본 발명에서의 동일한 기능이란 BAFF와 결합하여 BAFF대생물작용에 대한 길항 작용을 말하는 것이다.

[0055] "상기 아미노산 서열 중 적어도 1개의 아미노산 유도체 서열을 대체하거나/결실하거나/첨가하는 과정을 거쳐 수득되는 아미노산서열"의 표시에는 (이에 국한되지 않음) 최대 10개 (즉 1개 또는 다수 개), 비교적 양호할 때 8개, 더 양호할 때 최대 5개의 아미노산이 성질이 비슷한 아미노산에 의해 교체되어 폴리펩티드를 형성한다. 즉 보수적인 폴리펩티드 변이이다. 이러한 보수적인 폴리펩티드 변이는 표1 (아미노산 교체표)에 의해 교체진행되어 생성된 것이다.

표 1

초기의 잔기	전형적인 교체	바람직한 교체
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro ; Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Leu
Leu (L)	Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr

[0056]

[0057] 본 발명은 보호할 단백질 또는 폴리펩티드의 유사체를 더 포함한다. 이런 유사체와 원래의 단백질의 차이는 아미노산서열상의 차이라고 할 수 있다. 또한 서열에 영향을 주지않는 범위 내에서 수식형식상의 차이라고도 한다. 또는 두 가지 차이점을 동시에 가지는 것을 말한다. 이런 단백질에는 자연적인 것과 유도해낸 유전변이체가 있다. 유도 변이체는 여러 가지 기술을 통해 수득될 수 있다. 예를 들어 방사선과 뮤타젠 (돌연변이 물질)에 의해 수득될 수 있고, 지정유도법 또는 기타 분자생물학 기술을 통해 수득될 수 있다. 유사체에는 자연적인 L-아미노산의 잔기 (D-아미노산)와 다른 유사체 및 자연존재하지 않는 합성된 아미노산 (β , γ -아미노산)의 유사체가 있다. 본 발명의 단백질 또는 펩티드는 위에서 나열한 대표적인 단백질과 폴리펩티드에만 국한되지 않는다는 것을 알 수 있다.

[0058] 수식형식 (일반적으로 기본구조를 변화시키지 않는다)은 생체내 혹은 시험관내 폴리펩티드의 화학적 유도 형식, 즉 아세틸화 혹은 카보닐화이다. 이 수식형식에는 당기화도 포함된다. 예를 들면 폴리펩티드의 합성과 프로세싱 과정에서 당기화수식을 진행하여 수득되는 폴리펩티드이다. 이러한 수식은 폴리펩티드를 당기화효소 (예를 들어, 포유동물의 당기화효소 혹은 당제거효소)에 노출시켜 완성된다. 수식형식에는 인산화된 아미노산 잔기의 서열도 포함된다. 또한 수식과정을 거쳐 항단백질 가수분해기능이 향상되며, 용해기능이 최적화된 폴리펩티드도 포함된다.

[0059] 본 발명에서 상기 "조작형식으로 연결하는 것"은 아래와 같은 상황을 말한다. 즉 선형 DNA서열의 한 부분이 동종의 DNA서열의 다른 부분의 활성작용에 영향을 주는 것을 말한다. 예를 들어, 신호 펩티드가 폴리펩티드분비에 참여한다면, 신호펩티드 (분비선구서열) DNA는 조작형식으로 폴리펩티드DNA에 연결된 것이다. 만일 프로모터즈 통제서열이 전이된다면 이는 조작형식으로 암호화된 서열에 연결된 것이다. 만일 리보솜결합위치가 번역할 수 있는 위치에 놓여있다면 이는 조작형식으로 암호화된 서열에 연결된 것이다. 일반적으로 "조작형식으로 연결함"은 서로 인접함을 의미하며 분비선구서열은 리딩프레임 중에서의 서로 인접함을 의미한다.

발명의 효과

[0060] 본 발명의 유익한 효과는 아래와 같습니다. 본 발명은 TAC1 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD2 도메인과 Br3 수용체의 BAFF에 결합하는 CRD 도메인이 융합된 단편을 설계하고 구축했다. 생체내의 안정성을 높이고 반감기를 연장하기 위해 면역글로불린의 Fc 단편과 융합시킨다. 예를 들면 IgG1, IgG2 또는 IgG4의 Fc 단편과 융합시키는 것이다.

[0061] 분비발현을 이상적으로 진행하기 위하여 N-말단부에 신호펩티드를 연결하여 일련의 새로운 융합단백질 분자를 수득한다. 본 발명의 새로운 B세포 활성 인자 길항제 (BAFF Trap)는 BAFF의 결합 효과를 향상시키고 치료 용량을 낮추므로 최상의 자가면역질환 치료 효과를 가지며 또한 자가면역질환을 치료하는데 새로운 길을 열어주었다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 BAFF와 그의 수용체의 상호작용의 설명도이다, 출처 Nature Review Immunology, 2002, 2 : 465-475;
- 도 2는 BAFF Trap의 구조설명도이다, Fc단편을 첨가하므로 융합단백질은 이합체 형식으로 존재한다;
- 도 3은 IgG1 Fc의 RT-PCR결과도이다(1% Agarose전기영동법), M : 100bp DNA Ladder(Invitrogen)1 : RT-PCR산물;
- 도 4는 프라스미드복원 pEF-BT의 구성과정 설명도이다;
- 도 5는 진핵 발현 매개체 pEF1/V5-His A의 프라스미드 도면이다;
- 도 6은 프라스미드복원 pEF-TAC1-Br3의Kpn I/BamH 더블효소감정결과도(1% Agarose전기영동법), M : 1kb DNA Ladder(Invitrogen); 11, 15, 16, 26, 27 각각 다른 복제를 대표한다;
- 도 7은 프라스미드복원 pEF-BT의Kpn I/BamH 더블효소감정결과도이다(1% Agarose전기영동법), M : 1kb DNA Ladder(Invitrogen); 11, 15, 16, 26, 27 각각 다른 복제를 대표한다;
- 도 8은 순화과정을 거친 단백질의 전기영동 도면이다(12%SDS-PAGE), M : 단백질분자량기준; 1 : 비복원조건 2 : 복원조건;
- 도 9는 류마티스관절염 모본중 체중 및 임상평가의 변화도이다, A는 체중변화; B는 임상평가변화;
- 도 10은 류마티스관절염 모본중 발목관절의 HE설명도(확대비율:40) 및 병리평가분석이다, A는 HE설명도, 그 중:

a는 정상적인 랫트이고, b는 모본제작그룹이고, c는 hIgG이고, d는 BT이다; B는 병리평가분석;

도 11은 B220유동식 측정도면이다, A: 정상적인 랫트그룹 B: 생리식염수그룹 H: hIgG그룹 B: BT그룹.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 이하, 본 발명의 첨부 도면과 같이 본 발명의 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 아래 실시예 중에, 구체적인 실험조건을 표기하지 않은 것은 모두 해당 분야 기술자들이 공지된 통상 조건하에서 진행되는 것이다. 예를 들어 Sambrook J, Russell D.W., 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual (3rd ed), SpringHarborLaboratoryPress에서 기재된 조건 또는 제조회사에서 제시한 조건이다.
- [0064] 실시예 1: BAFF Trap 암호화 유전자의 구성 및 발현
- [0065] 1. BAFF Trap 암호화 유전자의 획득
- [0066] 유전자 합성 방법을 이용하여 TACI 구조 도메인2 (CRD2)와 Br3 구조 도메인 (CRD)이 융합된 cDNA 단편을 수득하고 단편의 5' 말단에 인체 I1-2 신호 펩티드 서열을 포함한다.
- [0067] 동시에, 아래와 같은 프라이머를 설계하여 IgG1 Fc 단편인 cDNA를 증폭시킨다.
- [0068] 5' 프라이머 (SEQ ID No.6): 5' CGG GAT CCG ACA AAA CTC ACA CAT GCC 3'
- [0069] 3' 프라이머 (SEQ ID No.7): 5' AGC TTT GTT TAA ACT CAT TTA CCC GGA GAC AGG 3'
- [0070] PCR 산물을 클로닝 매개체에 삽입하기 위하여 5' 프라이머에 BamHI 위치를 설계하고 3' 프라이머에 PmeI 위치를 설계한다.
- [0071] 인체의 임파세포 RNA를 양식으로 RT-PCR이 IgG1 Fc 단편을 증폭시키는 반응조건은 아래와 같다.
- [0072] RT-PCR 반응 혼합물은 50℃에서 변성되고 30분 후에 아래와 같은 반응들이 진행된다.
- [0073] 역전사 반응: 94℃에서 30초 변성; 55℃에서 30초 열처리; 68℃에서 1분으로 연장; 10번 순환으로 반응한다.
- [0074] PCR 반응: 94℃에서 30초 변성; 55℃에서 30초 열처리; 68℃에서 1분으로 연장; 25번 순환으로 반응한다. 그리고 68℃에서 12분으로 연장한다.
- [0075] 반응이 끝난 후, 1%의 아가로스젤 전기영동법으로 RT-PCR 산물을 측정한다. 도 3에 도시된 바와 같이 예상크기 (~700bp)인 DNA 단편을 수득하였다.
- [0076] 전장의 BAFF Trap의 뉴클레오티드 및 단백질 서열은 각각 서열번호 5 및 서열번호 3에 표기된 것과 같다. Fc 단편을 첨가하므로 융합단백질은 이황화 사슬을 통해 이합체 형식으로 존재한다. BAFF Trap의 구조설명도는 도 2와 같다.
- [0077] 2. BAFF Trap 암호화 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드의 구성
- [0078] 상술한 바와 같이, 유전자합성단편 (TACI-Br3) 중의 5' 단에 KpnI 효소위치를 설계해 넣는다. 이렇게 하면 TACI-Br3의 cDNA 단편을 직접적으로 진행 발현 매개체인 pEF1/V5-HisA (미국 Invitrogen 회사 제품 구입, 도 5 참조)의 복합적인 클로닝 위치 KpnI/BamHI에 삽입할 수 있다. IgG1 Fc 단편을 복합적인 클로닝 위치 BamHI/PmeI 속에 삽입하면 바로 BAFF Trap 융합 단편을 수득할 수 있다. (도 4 참조)
- [0079] ① 재조합 플라스미드 pEF-TACI-Br3의 구성
- [0080] 유전자 합성 단편 TACI-Br3을 pEF1/V5-HisA의 KpnI/BamHI 위치에 삽입한다. pEF-TACI-Br3 산물에 연결하여 대장균 JM109으로 전환한다. 그리고 임의로 28개의 클론을 취하여 선별작업을 한다. 11, 15, 16, 26과 27번 클론은 모두 KpnI/BamHI을 이용하여 최종 목적의 단편을 만들어내고 재조합 플라스미드 pEF-TACI-Br3의 효소감정 결과는 도 6을 참조한다. 26번 클론을 선택하여 서열 분석을 진행한다. 그 서열이 정확하면 더 나아가 IgG1 Fc와 융합할 수 있는 유전자를 만든다.
- [0081] ② 재조합 플라스미드 pEF-BT 구성
- [0082] pEF-TACI-Br3 26번 클론을 기본으로 IgG1 Fc 단편을 BamHI/PmeI 위치에 삽입한다. pEF-BT산물에 연결하여 대장균 JM109으로 전환한다. 그리고 임의로 12개의 클론을 취하여 선별작업을 한다. 재조합 플라스미드 pEF-BT의 효소감정결과는 도 7 참조, 1, 2, 6, 7, 10번 클론은 모두 KpnI/PmeI을 이용하여 최종목적의 단편을 만들어내고

10번 클론을 서열분석을 의뢰한다. 서열분석 결과로부터 수득된 재조합 플라스미드 중의 목적유전자와 BAFF Trap 유전자 (TACI-Br3-IgG1 Fc) 서열 (즉 서열번호 5)이 일치한다는 것을 알 수 있다.

[0083]

3. 목적단백질의 안정적인 발현주 **CHO-BT**의 선별 및 감정

[0084]

5g을 취하여 대량제조한 재조합 플라스미드 pEF-BT를 리포솜Lipofectamine2000을 이용하여 CHO-K1세포 (미국 ATCC 제품 구입)에 전이시킨다. 이틀 후에 1:5 비율로 대물림시키고 0.4mg/ml의 G418 (미국 Invitrogen 회사 제품 구입)을 선별한다. 10일 후 콜로니 형성이 완성된다. 96개 가장자리가 뚜렷하게 분리되었고 세포상태가 양호한 단일 클론을 6개의 24-웰 플레이트에 옮겨 배양한다 (1차 선별).

[0085]

이틀이 지난 후 배양한 상청액을 ELISA을 이용하여 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 그 중에서 양성으로 나타난 24개 클론을 24-웰 플레이트에 옮겨 배양한다. (2차 선별) 이틀 배양한 후 상청액을 취하여 ELISA으로 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 그 중에서 발현이 비교적 높은 6개 클론 (1-B2, 1-B8, 1-D7, 1-E1, 2-D1, 2-F6)를 골라 유한 희석법으로 선별을 진행한다.

[0086]

각각 96-웰 플레이트 (1개 세포/웰/200 μ l) (3차 선별) 세포 성장이 끝난 후 (약 8일) 배양된 상청액을 ELISA으로 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 발현이 비교적 높은 6개 클론을 골라 24-웰 플레이트에 옮겨 배양한다. 세포 성장이 끝난 후 6-웰 플레이트으로 옮겨 배양한다. ELISA로 클론 발현 상황을 검사하고, 그 결과는 표 2 (ELISA로 3차 선별해낸 6개 클론의 서브클론 검사 48시간후 상청액의 발현상황)와 같다.

표 2

1-B2	A450	1-B8	A450	1-D7	A450
1-B2-4	0.968	1-B8-1	0.965	1-D7-4	0.632
1-B2-7	1.079	1-B8-2	1.061	1-D7-7	0.775
1-B2-8	0.369	1-B8-3	0.748	1-D7-10	0.758
1-B2-9	0.432	1-B8-5	0.639	1-D7-13	0.302
1-B2-11	0.751	1-B8-8	0.112	1-D7-14	0.456
1-B2-13	0.919	1-B8-11	0.357	1-D7-17	0.34
1-E1	A450	2-D1	A450	2-F6	A450
1-E1-1	0.562	2-D1-2	0.256	2-F6-2	0.607
1-E1-3	0.929	2-D1-3	0.181	2-F6-3	0.873
1-E1-6	0.984	2-D1-4	0.187	2-F6-4	0.835
1-E1-7	0.948	2-D1-5	0.135	2-F6-5	0.352
1-E1-12	0.794	2-D1-9	0.178	2-F6-6	0.904
1-E1-16	0.593	2-D1-13	0.268	2-F6-7	0.281

[0087]

[0088]

발현이 비교적 높은 1-B8-1, 1-D7-7 및 1-E1-7를 취하여 확대배양하여 T75 네모병에 넣는다. 4일 후 수득된 상청액은 Pr.A-Sepharose으로 흡착하여 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 결과는 정제과정을 거쳐 수득된 단백질은 예상 단백질 분자량의 크기와 똑같다. Western Blot를 통해 검증을 진행했다.

[0089]

1-B8-1, 1-D7-7, 1-E1-7 각각 취하여 96-웰 플레이트 (1개 세포/웰/200 μ l) (4차 선별)에 옮기고 배양한다. 세포성장이 끝난 후 (약 10일) 배양된 상청액을 ELISA으로 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 3개의 클론은 동일

한 클론이다. 그 중에서 발현이 가장 높은 클론을 확증하고 보존한다. 각각 CHO-BT (1-B8-1), CHO-BT (1-D7-7), CHO-BT (1-E1-7)로 이름을 정하고, 그 중의 CHO-BT (1-E1-7)를 취하여 다음 단계의 발현과 정제과정을 진행한다.

[0090]

4. 융합단백질 BAFF Trap (BT)의 증가된 발현과 정제

[0091]

선별과정을 거친 CHO-BT (1-E1-7) 세포를 대규모로 배양하고 상청액은 젤 Mab-Select (미국 GE 회사 제품 구입)을 이용하여 정제과정을 진행한다. 이어서 SP칼럼을 통해 색층분석한다. 색층분석 후 단백질의 전기영동법 설명도는 도 8에 도시된 바와 같다. 결과는 정제과정을 거친 목적 단백질은 환원 환경에서의 분자량은 38kDa이고 비-환원 환경에서의 분자량은 76kDa이며, 이합체 형식으로 존재한다. 이것은 예상된 결과이다. 정제과정을 거친 단백질의 순도는 95%이상에 달한다.

[0092]

실시에 2 융합단백질 BAFF Trap (BT)의 감정과 기능실험

[0093]

1. 융합단백질 BAFF Trap (BT)와 BAFF 결합계수의 측정

[0094]

BIAcore T100를 사용하여 BAFF Trap과 BAFF가 시험관내 환경에서의 결합능력을 측정한다. 그 결합계수는 BIAcore T100 Evaluation Software로 분석을 진행한다. 동시에 표준적인 BAFF R-Fc와 TACI-Fc와 대조한다. 결과는 아래와 같다.

[0095]

(1) 결합: HEPES 표준용액을 사용하여 BAFF Trap 단백질을 초보적으로 희석한 후 10mM 초산나트륨 (pH=5.0)을 사용하여 2 μ g/ml 정도로 될 때까지 희석한다. 체적은 200 μ l, 인위적으로 4번 결합한다. 유동 속도와 시간은 정상적으로 진행한다. 그리고 정량의 TACI-Fc과 Br3-Fc (표준물체)를 취하여 초산나트륨용액에 혼합한다. 최종 농도 2 μ g/ml이고, 체적은 200 μ l이다. 같은 방식으로 결합하여 코어판 위에 고정한다.

[0096]

(2)결합측정: HEPES 용액으로 BAFF (표준물체)를 경사상태로 희석한다. 즉 1800nm, 600nm, 200nm, 66nm 및 22nm이고, 체적은 최소 120 μ l이고, 순환채취하며 접촉시간은 60s이고, 분리시간은 900s이고, 유동 속도는 30 μ l/min이다.

[0097]

(3)동력학분석: BIAcore T100 Evaluation Software을 이용하여 결합율 (Ka)과 분리율 (Kd)에 대해 분석한다. 결합계수는 $KD=Kd/Ka$ 이다. TACI-Fc와 Br3-Fc 비교했을 때, BAFF Trap은 강한 BAFF 결합능력을 가지고 있다. 그 KD값은 약 12.7nm, 그리고 TACI-Fc와 Br3-Fc가 BAFF와의 결합계수는 각각 14.8 nm와 34nm이다 (표 3참조). (표 3: BAFF Trap와 BAFF의 결합계수분석)

표 3

샘플	K_D (nm)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})
BAFF Trap	12.7	1.10×10^4	1.415×10^{-4}
TACI-Fc	14.8	5.15×10^3	7.630×10^{-5}
Br3-Fc	34.0	1.99×10^4	6.790×10^{-4}

[0098]

[0099]

2. 융합단백질 BAFF Trap (BT) 시험관내 세포결합 감정

[0100]

Raji 세포 (미국 ATCC제품 구입)은 발현성이 높은 BAFF 수용체 (TACI과 Br3)의 인체 B세포주이다. 우리는 이것을 BT 경쟁성을 띤 BAFF 결합에 대한 길항작용을 측정하는데 사용한다. 대수 성장기에 놓여있는 Raji 세포에 농도가 다른 BT 단백질과 항-TACI 항체/항-Br3 항체를 각각 혼합하여 실온에서 1시간 항온처리한다. 세척한 후에 FITC 표시의 이항을 넣어 실온에서 햇빛을 피해 30분 항온처리한다. 세척한 후 유동식세포측정기로 측정한다. 결과는 표4 (BT가 Raji 세포표면에 있는 BAFF 수용체를 차단하는 유동식측정결과)와 같다 (그 중 hIgG은 인체 IgG1 Fc 단편을 포함하고 무관단백질조가 된다).

표 4

양성형광세포비율 \ BAFF수용체	TAC1	Br3
일항	85.2%	34.3%
일항+BT(1 μ g)	71%	22.6%
일항+BT(10 μ g)	58.5%	14.6%
일항+BT(100 μ g)	41.1%	15.2%
일항+hIgG(100 μ g)	80.5%	32.9%

[0101]

[0102]

결과로부터 볼 때 BT는 항체와 Raji 세포 상의 BAFF 수용체 TAC1, Br3와의 결합을 억제할 수 있고 용량 의존관계를 나타낸다. 이는 시험관내 실험과정에서 BT는 길항제로서 BAFF와 이의 세포 표면 수용체의 결합을 억제할 수 있다는 것을 설명해준다.

[0103]

3. 융합단백질 BAFF Trap (BT)의 류마티스관절염 실험쥐에서의 치료작용

[0104]

AIA를 구축하여 BT의 생체내에서의 치료 효과를 연구한다.

[0105]

실험방법: 6-8주 된 랫트의 꼬리 끝부분에 1001 μ l에 BCG 함량이 5mg/ml인 불완전 프로인트항원 보강제를 주사한다. 대조용 실험쥐는 처리하지 않는다. 발병 후 임의로 3개의 조로 나누어 처리한다. 즉 생리식염수 그룹, hIgG 그룹, 융합단백질 BT 그룹 한 그룹에 10마리씩, 복강내 한 마리당 100 μ g/1001 μ l 정도의 약물 투여하고 일주일에 2번 치료한다 (hIgG 그룹은 인체 IgG1 Fc 단편을 포함하고 치료 무관그룹이 된다.) 매일 몸무게를 측정하고 이 중맹검 방법으로 네 다리에 대해 임상평가를 한다. 1주일에 한번 안광정맥 채혈하고 혈청을 분리하고 -80 $^{\circ}$ C 냉장보관한다.

[0106]

45일 치료한 후에 실험쥐를 폐기하고 그 발목관절을 취하고 HE 염색한다. 비장을 채취하여 임파세포를 분리하고 유동식세포측정기로 비장 B세포 함량을 측정한다 (B220 항체 측정).

[0107]

실험결과: 각 그룹의 랫트의 체중 및 임상평가 변화는 도 9를 참조한다. 결과적으로 볼 때 실험 둘째 날부터 랫트의 몸무게가 줄어들기 시작했고, 17일째 되는 날 치료를 받았다. 25일째에는 몸무게가 최소치에 달했고 그 후부터 다시 회복하기 시작했다. 하지만 BAFF Trap 그룹의 회복속도는 hIgG 그룹과 AIA 그룹보다 빠르다. 45일째부터는 통계학적인 의미가 나타났다 ($P < 0.05$). 시간이 흐름에 따라 랫트의 류마티스관절염 증상이 나타나기 시작했고 점점 심해졌다. 따라서 그 임상평점도 높아졌다. 17일째에는 14 \pm 2에 달했다. 그리고나서 임상평점은 점차 낮아졌다. BAFF Trap의 인하속도는 다른 두 그룹보다 현저하게 높다 ($P < 0.05$). 그리고 37일째에 정상으로 회복되었다. 이때 AIA그룹의 평점은 10 \pm 1, hIgG 그룹은 6 \pm 1이다.

[0108]

각 그룹 관절 HE 염색 결과는 도 10A와 같다. AIA 그룹 및 hIgG 그룹에서 임파세포의 침투, 골질의 파괴 및 활막염증 (AIA 그룹 중에서 골질섬유화와 판누스를 발견하기도 한다). 이가 나타나지만 BT 그룹에서는 완전한 관절활막과 임파세포의 침투 및 손상된 골질이 회복되는 것을 볼 수 있으며, 이는 정상적인 랫트의 관절과 비슷하다. 병리학 평가 결과는 도 10B와 같다. AIA 그룹과 hIgG 그룹의 병리학평점은 4점에 달하지만 BT 그룹의 병리학평점은 현저하게 낮고 정상에 가깝다 ($P < 0.05$).

[0109]

B220 유동식측정 결과는 도 11을 참조한다. BT 치료 그룹의 랫트의 비장세포 B220 양성세포 비율은 17.6%이며, 생리식염수 그룹 (32.6%)과 hIgG 치료그룹 (27.1%)보다 현저하게 낮으며, 아주 큰 차이가 가지고 있다 ($P < 0.01$). 정상적인 랫트 (21.4%)와 거의 일치하다.

[0110]

상술한 실시예를 통해 본 발명은 융합단백질 BAFF Trap (BT)를 성공적으로 제조했다는 것을 알 수 있다. 이 융합단백질은 BAFF 수용체의 길항제로 사용할 수 있다. AIA 실험쥐에게 확실한 치료 효과를 가져올 수 있으며 자가면역질환의 치료에 새로운 길을 열어주었다.

서열목록 자유텍스트

[0112]

SEQUENCE LISTING

<110> SICHUAN UNIVERSITY
 <120> B cell activating factor antagonist, preparation method and use thereof
 <130> G11P0014K
 <150> CN 201010183905.9
 <151> 2010-05-26
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> B cell activating factor antagonist
 <40> 1
 Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg
 1 5 10 15
 Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys
 20 25 30
 Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Gly Arg Asp Ala Pro
 35 40 45
 Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
 50 55 60
 His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro
 85
 <210> 2
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> B cell activating factor antagonist

<400> 2

Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg
 1 5 10 15
 Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys
 20 25 30
 Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Gly Arg Asp Ala Pro
 35 40 45
 Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
 50 55 60
 His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 85 90 95
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 100 105 110
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 115 120 125
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 130 135 140
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 145 150 155 160
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 165 170 175
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 180 185 190
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 195 200 205
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 210 215 220
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 225 230 235 240
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 245 250 255
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 260 265 270
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 195 200 205
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 210 215 220
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 225 230 235 240
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 245 250 255
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 260 265 270
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 275 280 285
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 290 295 300
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 305 310 315 320
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 325 330 335

Pro Gly Lys

<210> 4

<211> 951

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> nucleotide sequences encoding B cell activating factor antagonist

<400> 4

ctcagctgcc gcaaggagca aggcaagttc tatgaccatc tcctgaggga ctgcatcagc 60
 tgtgcctcca tctgtggaca gcaccctaag caatgtgcat acttctgtga gaacaagctc 120
 aggagccag gcagggacgc gccagcccc acgccctgcg tcccggccga gtgcttcgac 180
 ctgctggtcc gccactgctg ggccctgctgg ctctctgcga cgccgctgccc gaaaccggcc 240
 ggggccagca gccctgctgccc cggatccgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 300
 cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 360
 atgatctccc ggaccctcta ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct 420
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 480
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 540
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 600

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 660
 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 720
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 780
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 840
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 900
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 951

<210> 5

<211> 1011

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> nucleotide sequences encoding B cell activating factor antagonist

<400> 5

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatc gcactaagtc ttgcattgt cacgaattca 60
 ctacagctgcc gcaaggagca aggcaagttc tatgaccatc tcctgagggga ctgcatcagc 120
 tgtgcctcca tctgtggaca gcaccctaag caatgtgcat acttctgtga gaacaagctc 180
 aggagcccgag gcagggagc gccagcccc acgccctggc tcccggccga gtgcttcgac 240
 ctgctggctc gccactgct ggcttcgagg ctctgcgca cgccgaggcc gaaaccggcc 300
 ggggccagca gccttcgccc cggatccgac aaaactcaca catgccacc gtgccagca 360
 cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc 420
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca gaagaccct 480
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 540
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 600
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc 660
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 720
 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 780
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 840
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 900
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 960
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 1011

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> 5'primer to amplify IgG1 Fc fragment cDNA

<400> 6
 cgggatccga caaaactcac acatgcc 27

<210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> 3' primer to amplify IgG1 Fc fragment cDNA

<400> 7
 agctttgttt aaactcattt acccggagac agg 33

<210> 8
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> CRD2 of TACI

<400> 8
 Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
 1 5 10 15
 Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
 20 25 30
 Phe Cys

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> CRD of Br3

<400> 9
 Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val Ala
 1 5 10 15
 Cys

<210> 10
 <211> 261
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>

<223> nucleotide sequences encoding B cell activating factor antagonist

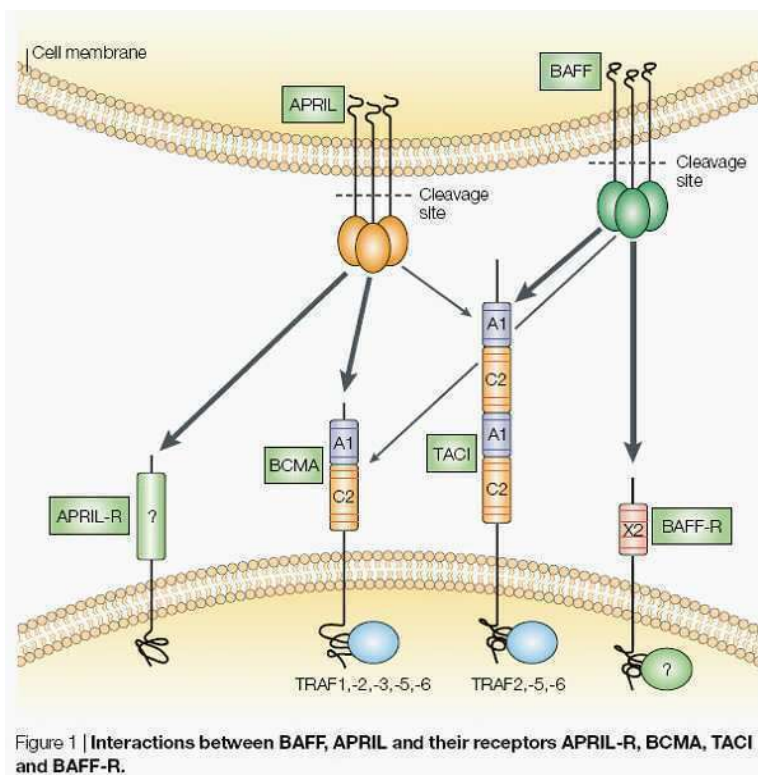
<400> 10

```

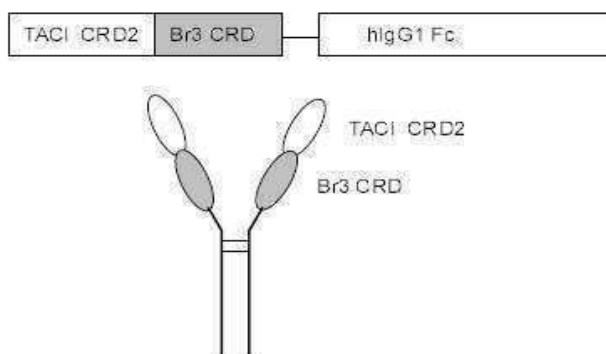
ctcagctgcc gcaaggagca aggcaagttc tatgaccatc tcctgagga ctgcatcagc 60
tgtgctcca tctgtggaca gcacctaaag caatgtgcat acttctgtga gaacaagctc 120
aggagcccag gcagggacgc gccagccccc acgccctgcg tcccggccga gtgcttcgac 180
ctgctggtcc gccactgctg ggcctgctgg ctctctgcga cgccgctggc gaaaccggcc 240
ggggccagca gcctgcgcc c 261
    
```

도면

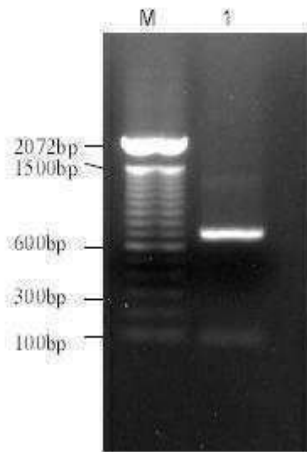
도면1



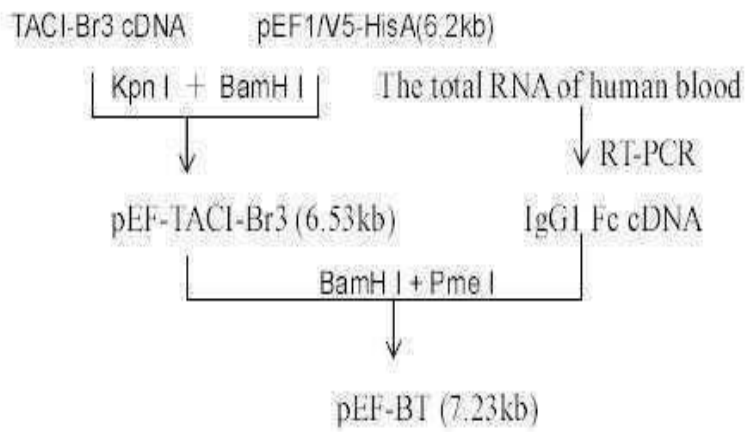
도면2



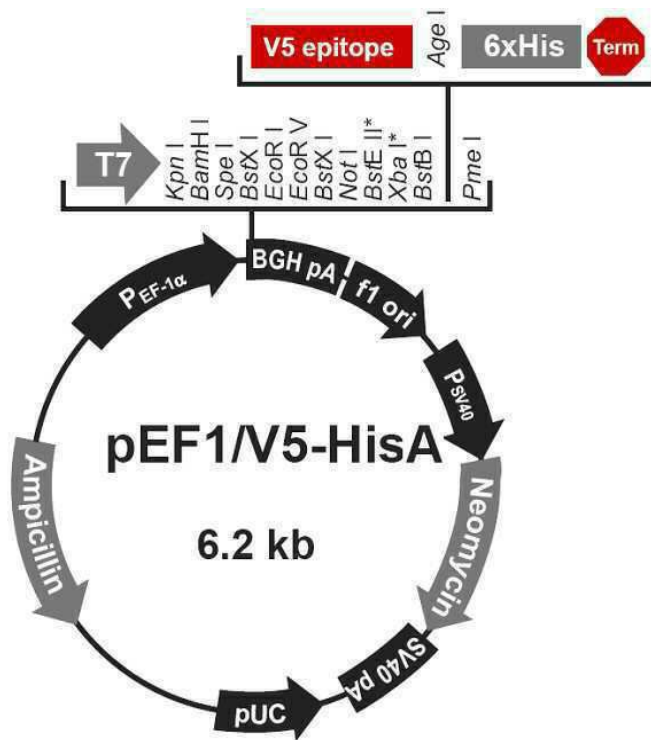
도면3



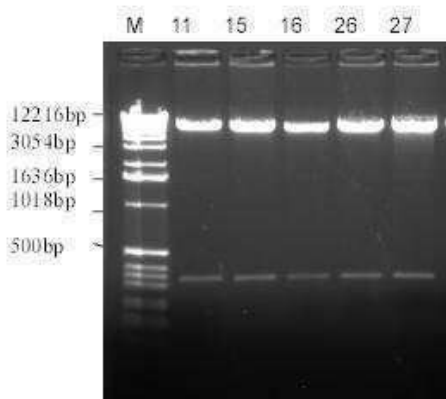
도면4



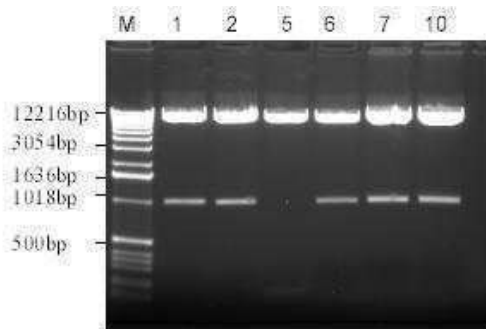
도면5



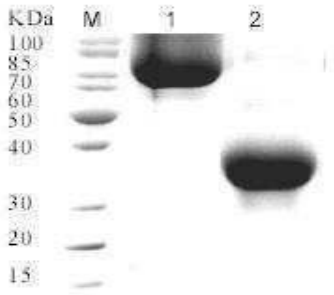
도면6



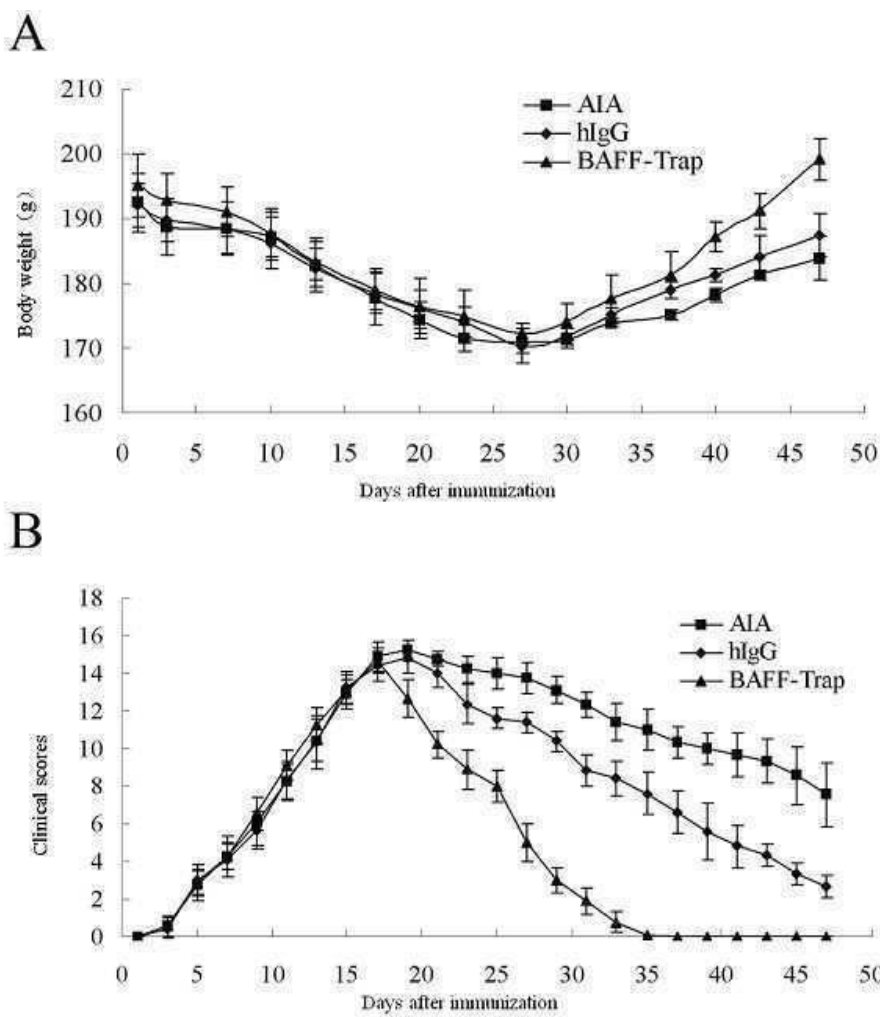
도면7



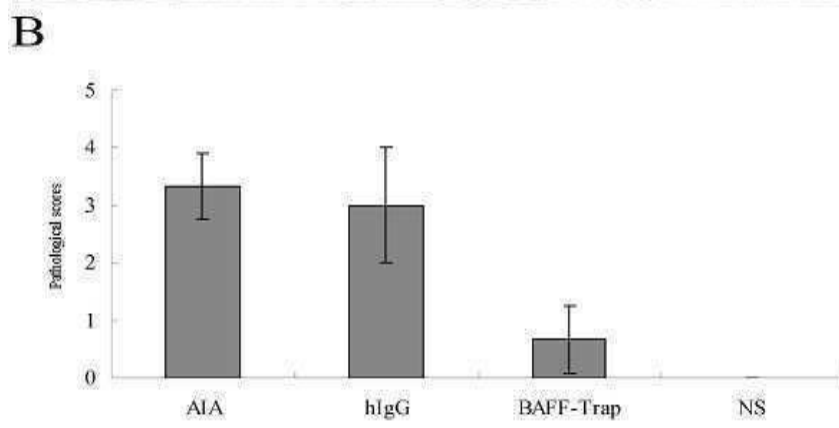
도면8



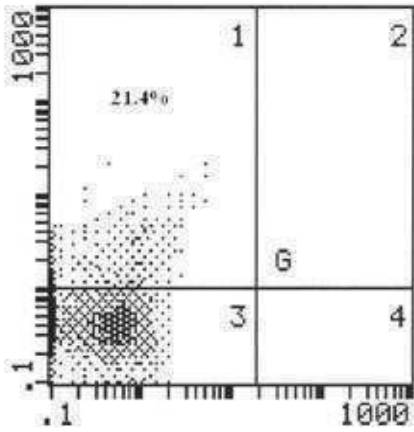
도면9



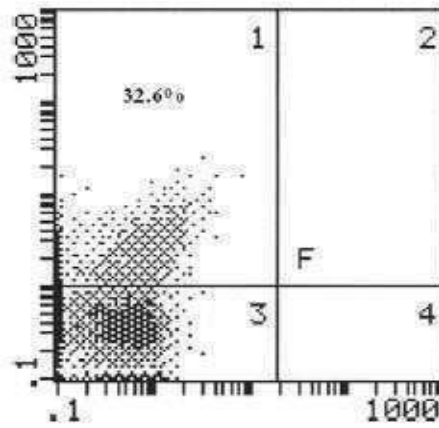
도면10



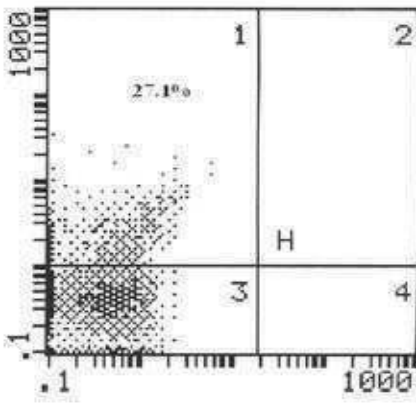
도면11



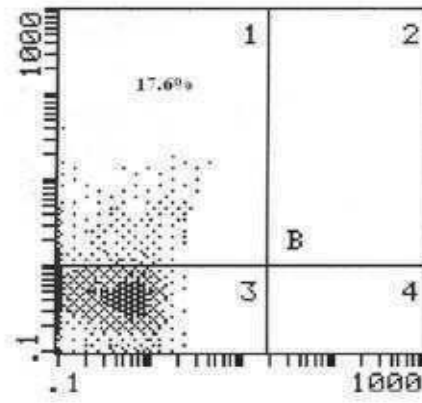
A.



B.



C.



D.