(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0043642
(43) 공개일자 2013년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7033484
(22) 출원일자(국제) 2011년05월26일
심사청구일자 2012년12월21일
(85) 번역문제출일자 2012년12월21일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2011/074687
(87) 국제공개번호 WO 2011/147320
국제공개일자 2011년12월01일
(30) 우선권주장
201010183905.9 2010년05월26일 중국(CN)

(71) 출원인
시추안 유니버시티
중국 시추안 610065, 쳉두, 이후안 로드, 사우스 섹션 1, 24
씨에스피씨 종콰이 팔마씨우티컬 테크놀로지 (스자좡) 컴퍼니 리미티드
중국 허베이 050035 스좌좡 후앙호 스트리트 넘버 226
(72) 발명자
양 리
중국, 시추안 610065, 쳉도, 이후안 로드, 사우스 섹션 1, 24
웨 위추안
중국, 시추안 610065, 쳉도, 이후안 로드, 사우스 섹션 1, 24
(74) 대리인
엄진

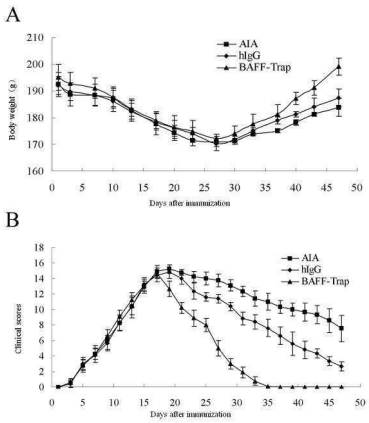
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **B세포활성인자길항제 및 그의 제조방법과 용도**

(57) 요 약

본 발명은 유전자공학의 약물분야에 속하며 구체적으로 신형 B세포활성인자(BAFF) 길항제의 제조방법과 사용도를 말한다. 본 발명이 해결하고자하는 기술문제는 자가면역질환을 예방, 치료하는데 새로운 선택을 할 수 있게 하는 것이다. 이 B세포활성인자수용체의 길항제는 주로 TACI수용체가 BAFF와 결합한 구조집합2와 Br3수용체가 BAFF와 결합한 구조집합이 서로 융합하고,또한 IgG1의Fc단편과도 융합하여 얻은 새로운 융합단백질을 말한다. 실험결과: 새로운 융합단백질분자는 BAFF길항제의 기능을 가지고있어서 자가면역질환을 치료할 수 있으며 자가면역질환의 예방에 새로운 선택기회를 제공한다.

대 표 도 - 도9



특허청구의 범위

청구항 1

① 아래와 같은 구조 도메인을 함유한 융합단백질: TACI수용체 중의 BAFF와 결합한 CRD2 구조 도메인과 Br3수용체 중의 BAFF와 결합한 CRD 구조 도메인이 서로 융합되어 얻은 구조 도메인이며;

상기 ①에서 한정된 융합단백질의 아미노산 서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, 상기 ①에서 한정된 융합단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질인 것을 특징으로 하는 B세포활성인자길항제.

청구항 2

제 1항에 있어서,

SEQ ID를 가지고 있고, No.1에 표기한 아미노산 서열의 단백질이며;

SEQ ID No.1에 표기된 아미노산 서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, SEQ No.1에 표기된 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질인 것을 특징으로 하는 B세포활성인자길항제.

청구항 3

제 1항에 있어서,

① 아미노산서열은 SEQ No.1에 표기된 아미노산서열의 C-말단부분에 다시 인체면역단백질의 Fc단편을 연결한 아미노산서열구조를 가진 단백질이며;

② 상기 ①에서 한정된 아미노산서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, 상기 ①의 기능과 동일하거나 유사한 단백질인 것을 특징으로 하는 B세포활성인자길항제.

청구항 4

제 3항에 있어서,

아미노산서열이 SEQ ID No.2에 표기된 단백질이며,

SEQ ID No.2에 표시된 아미노산서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, 상기 ①의 SEQ ID No.2에 표기된 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질인 것을 특징으로 하는 B세포활성인자길항제.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 B세포활성인자길항제 단백질의 N-말단에 신호 펩티드가 연결되는 것을 특징으로 하는 B세포활성인자길항제.

청구항 6

제 5항에 있어서,

아미노산서열이 SEQ ID No.3에 표기된 단백질이며;

SEQ IDNo.3에 표시된 아미노산서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, 상기 ① SEQ ID No.2에 표시된 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질인 것을 특징으로 하는 B세포활성인자길항제.

청구항 7

제 3항 내지 제 4항 중의 어느 한 항이 있어서,

상기 B세포활성인자길항제는 인체면역글로불린의 Fc단편에 의하여 이합체 형식의 단백질이 형성되는 것을 특징으로 하는 B세포활성인자길항제.

청구항 8

제 1항 내지 제 4항 중의 어느 한 항의 상기 B세포활성인자길항제를 암호화하는 뉴클레오시드서열.

청구항 9

제 8항에 있어서,

① SEQ ID No.10에 표기한 뉴클레오시드서열 또는 그의 축퇴 서열이며;

② 상기 ①에서 한정된 뉴클레오시드서열 중에 적어도 한 개의 뉴클레오시드유도체를 대체하거나/결실되거나/첨가하여 얻은 뉴클레오시드서열이며, SEQ ID No.10의 뉴클레오시드 서열코드기능과 동일하거나 유사한 단백질인 것을 특징으로 하는 상기 암호화한 B세포활성인자길항제의 뉴클레오시드서열.

청구항 10

제 9항에 있어서,

① SEQ ID No.4에 표기한 뉴클레오시드 서열 또는 그의 축퇴 서열이며;

② 상기 ①에서 한정된 뉴클레오시드서열 중에 적어도 한 개의 뉴클레오시드유도체를 대체하거나/결실되거나/첨가하여 얻은 뉴클레오시드 서열이며, SEQ ID No.4에 표기된 뉴클레오시드 서열코드기능과 동일하거나 유산한 단백질인 것을 특징으로 하는 상기 암호화한 B세포활성인자길항제의 뉴클레오시드서열.

청구항 11

제 10항에 있어서,

① SEQ ID No.5에 표기한 뉴클레오시드 서열 또는 그의 축퇴 서열이며;

② 상기 ①에서 한정된 뉴클레오시드서열 중에 적어도 한 개의 뉴클레오시드유도체를 대체하거나/결실되거나/첨가하여 얻은 뉴클레오시드 서열이며, SEQ ID No.4에 표기된 뉴클레오시드 서열코드기능과 동일하거나 유사한 단백질인 것을 특징으로 하는 상기 암호화한 B세포활성인자길항제의 뉴클레오시드서열.

청구항 12

제 8항 내지 제 11항의 상기 뉴클레오시드서열 유전자운반체.

청구항 13

제 12항의 상기 유전자운반체의 숙주세포.

청구항 14

제 1항 내지 제 7항 중의 어느 한 항의 상기 B세포활성인자길항제, 제 8항 내지 제 11항 중의 어느 한 항의 상기 암호화한 B세포활성인자길항제의 뉴클레오시드서열, 제 12항의 상기 유전자운반체, 또는 제 13항의 상기 숙주세포는 자가면역질환의 치료 약물을 제조하는 데의 용도.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 자가면역질환은 류마티스관절염, 전신성 홍반성 낭창 또는 건조합병증(쇼그렌 증후군)인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 16

제 1항 내지 제 7항 중의 어느 한 항의 상기 B세포활성인자길항제, 또는 제 8항 내지 제 11항 중의 어느 한 항의 상기 암호화한 B세포활성인자길항제의 뉴클레오시드서열, 또는 제 12항의 상기 유전자운반체를 주요 활성성

분으로 하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 치료 약물.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 자가면역질환은 류마티스관절염, 전신성 홍반성 낭창 또는 건조합병증(쇼그렌 증후군)인 것을 특징으로 하는 자가면역질환 치료 약물.

청구항 18

암호화한 B세포활성인자길항제의 유전자를 발현 매개체에 넣고, 발현 매개체를 숙주로 전이하고 숙주를 배양 및 증식한 후에 숙주세포에서 상청액을 분리순화하여 B세포활성인자길항제를 얻는 절차를 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 제 1항 내지 제 7항 중의 어느 한 항의 B세포활성인자길항제의 제조방법.

청구항 19

제 18항에 있어서,

상기 발현 매개체는 진핵플라스미드 발현 매개체, 아데노바이러스 매개체 또는 아데노바이러스의존 바이러스 매개체인 것을 특징으로 하는 상기 B세포활성인자길항제의 제조방법.

청구항 20

제 19항에 있어서,

상기 숙주는 진핵세포인 것을 특징으로 하는 상기 B세포활성인자길항제의 제조방법.

청구항 21

제 20항에 있어서,

상기 분리순화방법은 대량으로 숙주의 상청액을 배양하여 미국GE회사의 응고겔 Mab-Select칼럼을 순화과정을 거치며, 다시 SP 칼럼을 거쳐 색층분석후 B세포활성인자길항제를 얻는 것을 특징으로 하는 상기 B세포활성인자길항제의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전자공학의 약물분야에 관한 것으로서, 더 구체적으로 신형 B세포활성인자(BAFF) 길항제 및 그의 제조방법과 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

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

[0003] B세포활성인자(B cell activating factor, BAFF) 는 또한 BLyS, TALL-1, THANK, zTNF4 또는 TNFSF-13B 라고도 한다. 1999년에 발견된 TNF의 구성원[1]이며, 적합한 수용체와의 결합을 통해 하부정보통로를 가동하고 B세포의 생존과 성숙 그리고 분화를 조절한다[2]. BAFF는 그 외의 3가지 리간드 (APRIL、EDA와 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 조정을 받는다[3]. 정상적인 생리 환경에서 가수분해성 BAFF는 트리머형식으로 존재하며 대생물작용을 한다[4]. BAFF는 주로 말초혈액의단핵세포 (PBMNCs) 로 발현된다. 여기에는 비장과 림프선 중의 대식세포, 단핵세포와 수지상세포가 포함된다[5].

[0004] 현재까지 BAFF의 3가지 수용체를 발견했다. (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 여러 개의 시스틴(cysteine-rich domain, CRD)구역이 있다. 매개의 CRD는 6개의 시스틴잔기로 3개의 이황화결합을 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)SEQ ID No.8)[6]참조. Br3은 4개의 시스틴잔기로 구성된 한 개의 CRD만 가지고 있고 Br3 (aa.18-35):SEQ ID No.9) 참조, BAFF와의 결합집합은 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 (수용성수용체TACI-Fc, Br3-Fc 또는 항BAFF항체 등이 포함된다) BAFF의 대생물작용을 억제하므로 류마티스관절염, 쇼그렌증후군, 전신성 홍반성 낭창 등의 자가면역질환을 치료하는 효과가 있다. 현재 FDA의 승인을 거쳐 2011년 3월부터 항BAFF단일 복제항체 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 임상실험에 들어갔고, 가수분해성 수용체 TACI-Fc가 SLE와 RA를 치료하는 연구도 II/III기 임상실험단계에 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. CrystalstructureoftheBAFF-BAFF-Rcomplexanditsimplicationsforreceptoractivation.NatStructBiol, 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 말하자면 상기 B세포활성인자길항제의 구조는:

[0016] ① 아래와 같은 구조 도메인을 함유한 융합단백질: TACI수용체 중의 BAFF와 결합한 CRD2 구조 도메인과 Br3수용체 중의 BAFF와 결합한 CRD 구조 도메인이 서로 융합되어 얻은 구조 도메인이며;

[0017] 또는 상기 ①에서 한정된 융합단백질의 아미노산 서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, 상기 ①에서 한정된 융합단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다. 상기 B세포활성인자길항제에 함유된 구조 도메인은 상기 B세포활성화인자가 결합하는데 중요한 역할을 한다.

[0018] 그 중에서, 상기 B세포활성화인자길항제는:

[0019] ① SEQ ID를 가지고 있고, No.1에 표기한 아미노산 서열의 단백질이며;

[0020] ② SEQ ID No.1에 표기된 아미노산 서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, SEQ No.1에 표기된 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.

[0021] 더 구체적으로 상기 B세포활성인자길항제는:

[0022] ① 아미노산서열은 SEQ No.1에 표기된 아미노산서열의 C-말단부분에 다시 인체면역단백질의 Fc단편을 연결한 아미노산서열구조를 가진 단백질이며;

[0023] ② 상기 ①에서 한정된 아미노산서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, 상기 ①의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.

[0024] 더 구체적으로, 상기 B세포활성인자길항제는 아미노산서열이 SEQ ID No.2에 표기된 단백질이다.

[0025] 또는: SEQ ID No.2에 표시된 아미노산서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, 상기 ①의 SEQ ID No.2에 표기된 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.

[0026] 인체면역글로불린의 Fc단편을 첨가하므로 유전자공학방식으로 제조한 융합단백질은 이합체 형식으로 존재한다.

[0027] 바람직하게는, 상기 B세포활성인자길항제 단백질의 N-말단에 신호 펩티드가 연결된다.

[0028] 더 바람직하게는, 상기 B세포활성인자길항제는 아미노산서열이 SEQ ID No.3에 표기된 단백질이며;

[0029] 또는: SEQ IDNo.3에 표시된 아미노산서열 중에 적어도 한 개의 아미노산을 대체하거나/결실되거나/첨가해 얻으며, 상기 ① SEQ ID No.2에 표시된 단백질의 기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.

[0030] 본 발명은 상기 본질이 단백질인 B세포활성인자길항제를 제공하는 동시에, 상기 B세포활성인자길항제의 뉴클레오시드서열을 암호화한다.

[0031] 그 중에서, 상기 암호화한 B세포활성인자길항제의 뉴클레오시드서열은:

[0032] ①: SEQ ID No.10에 표기한 뉴클레오시드서열 또는 그의 축퇴 서열이며;

[0033] 또는: ② 상기 ①에서 한정된 뉴클레오시드서열 중에 적어도 한 개의 뉴클레오시드유도체를 대체하거나/결실되거나/첨가하여 얻은 뉴클레오시드서열이며, SEQ ID No.10의 뉴클레오시드 서열코드기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.

[0034] 그 중에서, 상기 암호화한 B세포활성인자길항제의 뉴클레오시드서열은:

[0035] ①: SEQ ID No.4에 표기한 뉴클레오시드 서열 또는 그의 축퇴 서열이며;

[0036] 또는: ② 상기 ①에서 한정된 뉴클레오시드서열 중에 적어도 한 개의 뉴클레오시드유도체를 대체하거나/결실되거나/첨가하여 얻은 뉴클레오시드 서열이며, SEQ ID No.4에 표기된 뉴클레오시드 서열코드기능과 동일하거나 유산한 단백질이다.

[0037] 그 중에서, 상기 암호화한 B세포활성인자길항제의 뉴클레오시드서열은:

[0038] ①: SEQ ID No.5에 표기한 뉴클레오시드 서열 또는 그의 축퇴 서열이며;

[0039] 또는: ② 상기 ①에서 한정된 뉴클레오시드서열 중에 적어도 한 개의 뉴클레오시드유도체를 대체하거나/결실되거나/첨가하여 얻은 뉴클레오시드 서열이며, SEQ ID No.4에 표기된 뉴클레오시드 서열코드기능과 동일하거나 유사한 단백질이다.

[0040] 본 발명은 상기 뉴클레오시드 서열을 함유한 유전자운반체를 제공한다.

[0041] 바람직하게는, 상기 유전자운반체는 뉴클레오시드 서열을 표현하기 위한 매개체이다.

[0042] 본 발명은 상기 유전자운반체를 함유하는 숙주세포를 제공한다.

[0043] 본 발명은 상기 B세포활성인자길항제, 뉴클레오시드 서열, 또는 유전자운반체가 자가면역질환의 치료 약물을 제조하는 과정에서의 중요한 역할을 제공한다.

[0044] 본 발명은 상기 B세포활성인자길항제, 뉴클레오시드 서열, 유전자운반체를 주요 활성성분으로 자가면역질환 예방약물을 제공한다.

[0045] 상기 자가면역질환은 주로 류마티스관절염, 전신성 홍반성 낭창, 건조합병증(쇼그렌 증후군)이다.

[0046] 본 발명은 상기 B세포활성인자길항제의 제조방법을 제공한다. 상기 제조방법의 절차는 아래와 같다. 암호화한 B세포활성인자길항제의 유전자를 발현 매개체에 넣고, 발현 매개체를 숙주로 전이하고 숙주를 배양 및 증식한 후에 숙주세포에서 상청액을 분리순화하여 B세포활성인자길항제를 얻는다.

[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 B세포활성인자길항제의 제조방법 중의 상기 분리순화방법은 대량으로 숙주의 상청액을 배양하여 미국GE회사의 응고겔 Mab-Select칼럼을 순화과정을 거치며, 다시 SP 칼럼을 거쳐 색층분석후 B세포활성인자길항제를 얻는다.

[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 TACI수용체와 BAFF가 결합한 구조 도메인2(CRD2)과 Br3수용체와 BAFF가 결합한 구조 도메인(CRD)이 서로 융합이 되어 길항BAFF단편을 설계하고 구성하였다(아미노산 배열순서는 SEQ ID No.1에 표기한바와 같이 SEQ ID No.10에 표기한 뉴클레오시드배열코드이다). 체내의 안정성을 높이고 반감기를 연장하기 위하여 면역글로불린의 Fc단편과 융합하여 새로운 융합단백질분자를 얻는다. 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG4의 Fc단편과 융합한다. 본 발명의 실시예 중에 IgG의 1Fc단편과 융합하여 새로운 융합단백질분자를 얻으며, 그 이름을 BAFF Trap(아미노산 배열순서는 SEQ ID No.2에 표기한 바와 같이 SEQ ID No.4에 표기한 뉴클레오시드배열코드이다)이라고 부른다. 실험 결과에 따르면, 이는 B세포활성인자길항제의 기능을 가지고 있다. 물론, 본 발명의 B세포활성인자길항제는 단백질이므로 주요제조방법은 기존의 유전자공학방법을 참조하여 발효생산을 진행해야 한다. 또한 유전자공학 발효생산을 진행할 때, 용이하게 산물 회수하기 위하여 일반적으로 BAFF Trap의 배열코드 N부분에 여러 가지의 자주 사용하는 분비 신호 펩티드인 뉴클레오시드배열코드를 첨가한다. 예를 들어 인체의 IL-2 신호 펩티드의 뉴클레오시드배열코드이이다(인체의 IL-2 신호 펩티드를 첨가한 후, 아미노산의 배열순서는 SEQ ID No.3에 표기한 것과 같이 SEQ ID No.5에 표기한 뉴클레오시드배열코드를 사용할 수 있다).

[0052] 본 발명에 있어서, "SEQ ID NO.1 중의 뉴클레오시드서열이 적어도 한 개의 뉴클레오시드유도체서열을 대체하거나 결실하거나 첨가하는 과정을 거친다"는 내용중의 유전자배열은 일반적으로 SEQ ID NO.1에서 암호화한 단백질활성폴리펩티드의 뉴클레오시드서열 및 축퇴 서열을 말한다. 상기 축퇴 서열은 상기 서열 중에 한 개 또는 여러 개의 코돈이 코드번호가 동일한 아미노산 축퇴 코돈에 의해 대체되어 생성되는 서열이다. 코돈이 축퇴성이 있기 때문에 SEQ ID NO.1과 동원성이 89%나 낮은 축퇴 서열도 SEQ ID NO.1에서 상기 서열로 재암호화할 수 있다. 또한, "SEQ ID NO.1 중의 뉴클레오시드서열은 적어도 한 개의 뉴클레오시드유도체서열을 대체하거나/결실하거나/첨가하는 과정을 거친다"는 의미는 중도환경하에서, 바람직하게는 고도환경하에서 SEQ ID NO.1의 뉴클레오시드서열과 잡교하여 얻는 뉴클레오시드서열도 포함된다. 이 전문용어는 SEQ ID NO.1 중의 뉴클레오시드서열과 동원율이 최소 80%, 비교적 양호할 때는 최소 89%, 좀 더 양호할 때는 최소90%, 최상일 때는 최소95%인 뉴클레오시드서열이란 것도 포함된다. 본 발명에서도 동일한 기능을 가지고있다는 것은 BAFF와 결합하여 BAFF대생물작용에 대한 길항작용을 말하는 것이다.

[0053] 이 전문용어는 "SEQ ID NO.1에 표기한 뉴클레오시드서열이 적어도 한 개의 뉴클레오시드유도체서열을 대체하거나/결실되거나/첨가하는 과정을 거친다"는 의미에는 SEQ ID NO.1에서 암호화한 동일기능의 단백질의 SEQ ID NO.1에서의 오픈리딩프레임의 변이형식도 포함이 된다. 이러한 변이형식에는 여러 개의(일반적으로 1-90개, 비교적 양호할 때 1-60개, 더 양호할 때 1-20개, 최상일 때는 1-10개이다) 뉴클레오시드가 결실되거나 삽입되거나 또는 대체되는 형식 및 5'와 3'부분에 여러 개의 (일반적으로 60개 이내, 비교적 양호할 때 30개 이내, 좀 더

양호할 때는 10개 이내, 최상일 때는 5개 이내)뉴클레오시드를 첨가하는 형식이 포함된다.

[0054] 본 발명중, "상기 아미노산서열 중에 적어도 한 개의 아미노산유도체서열을 대체하거나/결실하거나/첨가하는 과정을 거쳐 얻은 아미노산서열"의 표시에는 여러 개의 (일반적으로 1-50개, 비교적 양호할 때 1-30개, 더 양호할 때 1-20개, 최상일 때는 1-10개이다)아미노산의 결실, 삽입과 대체 및 C말단 또는 N말단부분에 한 개 또는 여러 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 대체과정을 진행할 때, 일반적으로 단백질의 기능은 변하지 않는다. 또 예를 들자면, C말단 혹은 N말단부분에 한 개 또는 여러 개의 아미노산을 첨가할 경우에도 그 단백질의 기능은 변하지 않는다. 이 전문용어는 상기 단백질의 활성 단편과 유도물체를 포함한다. 본 발명에서의 동일한 기능이란 BAFF와 결합하여 BAFF대생물작용에 대한 길항작용을 말하는 것이다.

[0055] "상기 아미노산서열 중에 적어도 한 개의 아미노산유도체서열을 대체하거나/결실하거나/첨가하는 과정을 거쳐 얻은 아미노산서열"의 표시에는 (이에 국한되지 않음) 최대 10개(즉 1개 또는 여러 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 유전변이체

가 있다. 유도변이체는 여러 가지 기술을 통해 얻을 수 있다. 예를 들어 방사선과 뮤타겐(돌연변이 물질)에 의해 얻을 수 있고, 지정유도법 또는 기타 분자생물학기술을 통해 얻을 수 있다. 유사체에는 자연적인L-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 체내 혹은 체외 폴리펩티드의 화학적유도형식, 즉 아세틸화 혹은 카보닐화이다. 이 수식형식에는 당기화도 포함된다. 예를 들면 폴리펩티드의 합성과 프로세싱과정에서 당기화수식을 진행해 얻은 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 프러모터즈통제서열이 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 TACI수용체와 BAFF가 결합한 구조 도메인2(CRD2)와 Br3수용체와 BAFF가 결합한 구조 도메인(CRD)이 융합된 단편을 설계하고 구축했다. 체내의 안정성을 높이고 반감기를 연장하기 위해 면역글로불린의 Fc단편과 융합시킨다. 예를 들면 IgG1、IgG2 또는 IgG4의 Fc단편과 융합시키는 것이다.

[0061] 분비발현을 이상적으로 진행하기 위하여 N-말단에 신호펩티드를 연결하여 일련의 새로운 융합단백질 분자를 얻는다. 본 발명의 신형B세포활성인자길항제-BAFF Trap은 BAFF의 결합효과를 향상시키고 치료사용량을 낮추므로 최상의 자가면역질환치료효과를 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-TACI-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, 구

체적인 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** 단백질코드유전자의 구성 및 표기

[0065] 1. **BAFF Trap** 단백질코드유전자의 획득

[0066] 유전자합성방법을 이용하여 TACI 구조 도메인2와 Br3구조 도메인(CRD)이 cDNA단편과 융합을 이루어내고 5'단부에 인체 I1-2 신호펩티드서열을 포함한다.

[0067] 동시에, 아래와 같은 프리머를 설계하여 IgG1 Fc단편인 cDNA를 확증시킨다.

[0068] 5' 프리머 (SEQ ID No.6): 5' CGG GAT CCG ACA AAA CTC ACA CAT GCC 3'

[0069] 3'프리머 (SEQ ID No.7) : 5' AGC TTT GTT TAA ACT CAT TTA CCC GGA GAC AGG 3'

[0070] PCR산물을 복제매개체에 삽입하기 위하여 5'프리머에 BamHI위치를 설계하고 3'프리머에 Pme I위치를 설계한다.

[0071] 인체의 임파세포 RNA를 양식으로 RT-PCR이 IgG1 Fc단편을 증폭시키는 반응조건은 아래와 같다.

[0072] RT-PCR반응혼합물은 50도에서 변질되고 30분 후에 아래와 같은 반응들이 진행된다.

[0073] 역전사반응: 94도에서 30초 변질; 55도에서 30초 열처리; 68도에서 1분으로 연장; 10번 순환으로 반응한다.

[0074] PCR반응: 94도에서 30초 변질; 55도에서 30초 열처리; 68도에서 1분으로 연장; 25번 순환으로 반응한다. 그리고 68도에서 12분으로 연장한다.

[0075] 반응이 끝난 후, 1%의 아가로스젤전기영동법으로 RT-PCR산물을 측정한다. 도 3 도시된 바와 같이 예상크기(~700bp)인 DNA단편을 얻었다.

[0076] 전장의 BAFF Trap의 뉴클레오시드와 단백질서열은 각각 SEQ ID No.5와 SEQ ID No.3에 표기한 것과 같다. Fc단편을 첨가하므로 융합단백질은 이황사슬을 통해 이합체 형식으로 존재한다. BAFF Trap의 구조설명도는 도 2와 같다.

[0077] 2. **BAFF Trap**단백질코드유전자의 복원플라스미드의 구성

[0078] 상술한 바와 같이, 유전자합성단편 (TACI-Br3) 중의 5'단에 Kpn I효소위치를 설계해 넣는다. 이렇게 하면 TACI-Br3의cDNA 단편을 직접적으로 진핵발현매개체인 pEF1/V5-HisA(미국Invitrogen회사제품구입, 도 5 참조)의 복합적인 복제위치Kpn I/BamH I에 삽입할 수 있다. IgG1 Fc단편을 복합적인 복제위치BamH I/Pme I속에 삽입하면 바로 BAFF Trap융합단편을 얻을 수 있다.(도 4 참조)

[0079] ① 복원플라스미드 **pEF-TACI-Br3**의 구성

[0080] 유전자합성단편 TACI-Br3을 pEF1/V5-HisA의 Kpn I/BamH I위치에 삽입한다. pEF-TACI-Br3산물에 연결하여 대장균 JM109으로 전환한다. 그리고 임의로 28개의 복제를 취하여 선별작업을 한다. 11、15、16、26과 27번 복제는 모두Kpn I/BamH I을 이용하여 최종목적의 단편을 만들어내고 복원플라스미드 pEF-TACI-Br3의 효소감정결과는 도 6을 참조한다. 26번 복제를 선택하여 순서측정을 진행한다. 그 서열이 정확하면 더 나아가 IgG1 Fc와 융합할 수 있는 유전자를 만든다.

[0081] ② 복원플라스미드 **pEF-BT** 구성

[0082] pEF-TACI-Br3 26번 복제를 기본으로 IgG1 Fc단편을 BamH I/Pme I위치에 삽입한다. pEF-BT산물에 연결하여 대장균JM109으로 전환한다. 그리고 임의로 12개의 복제를 취하여 선별작업을 한다. 복원플라스미드 pEF-BT의 효소감정결과는 도 7 참조, 1、2、6、7、10번 복제는 모두 Kpn I/Pme I을 이용하여 최종목적의 단편을 만들어내고 10번 복제를 순서측정감정을 의뢰한다. 배열측정결과로부터 우리는 우리가 얻어낸 복원플라스미드 중의 목적유전자와 BAFF Trap유전자 (TACI-Br3-IgG1 Fc) 배열순서가 (즉 SEQ ID No.5) 일치한 것을 알 수 있다.

[0083] 3. 목적단백질의 안정적인 발현주 **CHO-BT**의선별 및 감정

[0084] 5g을 취하여 대량제조한 복원플라스미드 pEF-BT를 리포솜Lipofectamine2000을 이용하여 CHO-K1세포(미국 ATCC제품 구입)에 전이시킨다. 이틀 후에 1:5 비율로 대물림시키고 0.4mg/mℓ의 G418(미국Invitrogen회사제품 구입)을 선별한다. 10일 후 복제가 완성된다. 96개 가장자리가 뚜렷하게 분리되었고 세포상태가 양호한 단일 복제를 6개

의 24구육종판에 옮겨 배양한다.(1차 선별)

[0085] 이틀이 지난 후 배양한 상청액을 ELISA을 이용하여 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 그 중에서 양성으로 나타난 24개 복제를 24구육종판에 옮겨 배양한다.(2차 선별) 이틀 배양한 후 상청액을 취하여 ELISA으로 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 그 중에서 발현이 비교적 높은 6개 복제(1-B2、1-B8、1-D7、1-E1、2-D1、2-F6)를 골라 유한희석법으로 선별을 진행한다.

[0086] 각각 96구육종판(한개세포/구/200㎕)(3차 선별) 세포성장이 끝난 후 (약 8일) 배양된 상청액을 ELISA으로 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 발현이 비교적 높은 6개 복제를 골라 24구육종판에 옮겨 배양한다. 세포성장이 끝난 후 6구육종판으로 옮겨 배양한다. ELISA으로 복제발현상황을 검사하고, 그 결과는 표 2(ELISA로 3차선별해낸 6개복제의 서브복제검사 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	1.051	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 높은1-B8-1、1-D7-7와1-E1-7를 취하여 확대배양하여 T75 네모병에 넣는다. 4일 후 얻은 상청액은 Pr.A-Sepharose으로 흡착하여 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 결과는 순화과정을 거쳐 얻은 단백질은 예상단백질분자량의 크기와 똑같다. Western Blot를 통해 검증을 진행했다.

[0089] 1-B8-1、1-D7-7、1-E1-7 각각 취하여 96구육종판(한개세포/구/200㎕)(4차 선별)에 옮기고 배양한다. 세포성장이 끝난 후 (약 10일) 배양된 상청액을 ELISA으로 융합단백질의 발현상황을 검사한다. 세 개의 복제는 동일한 복제이다. 그 중에서 발현이 가장 높은 복제를 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)취하여 다음 단계의 발현과 순화과정을 진행한다.

[0090] 4. 융합단백질 BAFF Trap (BT)의 대량의 발현과 순화

[0091] 대규모로 선별과정을 거친 CHO-BT(1-E1-7)세포를 배양하고 상청액은 젤Mab-Select(미국GE회사제품구입)을 이용하여 순화과정을 진행한다. 그리고 SP칼럼을 지나 색층분석한다. 색층분석 후 단백질의 전기영동법 설명도는 도8에 도시된 바와 같다. 결과는 순화과정을 거친 목적단백질은 복원환경에서의 분자량은 38kDa이고 비복원환경에

서의 분자량은 76kDa이며, 이합체 형식으로 존재한다. 이것은 예산된 결과이다. 순화과정을 거친 단백질의 순도는 95%이상에 달한다.

[0092] 실시예 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 체외 환경에서의 결합능력을 측정한다. 그 결합계수는 BIAcore T100 Evaluation Softwore로 분석을 진행한다. 동시에 표준적인 BAFF R-Fc와TACI-Fc와 대조한다. 절차는 아래와 같다.

[0095] (1) 결합: HEPES 표준용액을 사용하여 BAFF Trap단백질을 초보적으로 희석한 후 10mM 초산나트륨 (pH=5.0)을 사용하여 2㎍/㎖정도로 될 때까지 희석한다. 체적은 200㎕, 인위적으로 4번 결합한다. 유동속도와 시간은 정상적으로 진행한다. 그리고 정량의 TACI-Fc과 Br3-Fc(표준물체)취하여 초산나트륨용액에 혼합한다. 최종 농도 2㎍/㎖이고, 체적은 200㎕이다. 같은 방식으로 결합하여 코어판 위에 고정한다.

[0096] (2)결합측정: HEPES용액으로 BAFF(표준물체)를 경사상태로 희석한다. 즉 1800nm、600nm、200nm、66nm와 22nm이고, 체적은 최소 120㎕이고, 순환채취하며 접촉시간은 60s이고, 분리시간은 900s이고, 유동속도는 30㎕/min이다.

[0097] (3)동력학분석: BIAcore T100 Evaluation Softwore을 이용하여 결합율 (Ka) 과 분리율 (Kd) 에 대해 분석한다. 결합계수는 KD=Kd/Ka이다. TACI-Fc와 Br3-Fc 비교했을 때, BAFF Trap은 강한 BAFF결합능력을 가지고 있다. 그 KD값은 약 12.7nm, 그리고 TACI-Fc와 Br3-Fc가 BAFF와의 결합계수는 각각 14.8 nm와 34nm이다(표 3참조). (표 3BAFF Trap와 BAFF의 결합계수분석)

표 3

[0098]

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}

[0099] 2. 융합단백질 BAFF Trap (BT) 체외세포결합감정

[0100] Raji세포(미국 ATCC제품 구입)은 발현성이 높은 BAFF수용체 (TACI과 Br3) 의인체B세포주이다. 우리는 이것을 BT 경쟁성을 띤 BAFF결합에 대한 길항작용을 측정하는데 사용한다. 대수 성장기에 놓여있는 Raji세포에 농도가 다른 BT단백질과 항TACI항체/항Br3항체를 각각 혼합하여 실온에서 1시간 부화한다. 세척한 후에 FITC표시의 이항을 넣어 실온에서 햇빛을 피해 30분 부화한다. 세척한 후 유동식세포측정기로 측정한다. 결과는 표4(BT가 Raji 세포표면에 있는 BAFF수용체를 차단하는 유동식측정결과)같다.(그 중 hIgG은 인체 IgG1 Fc단편을 포함하고 무관 단백질조가 된다)

표 4

BAFF수용체 / 양성형광세포비율	TACI	Br3
일항	85.2%	34.3%
일항+BT(1μg)	71%	22.6%
일항+BT(10μg)	58.5%	14.6%
일항+BT(100μg)	41.1%	15.2%
일항+hIgG(100μg)	80.5%	32.9%

[0101]

[0102] 결과로부터 볼 때 BT는 항체가 Raji세포위의 BAFF수용체TACI, Br3와의 결합을 억제할 수 있다. 그리고 사용량의 의존관계를 나타낸다. 체외 실험과정에서 BT는 길항제로서 BAFF와 그 세포막표면수용체의 결합을 억제할 수 있다는 것을 설명해준다.

[0103] 3. 융합단백질 BAFF Trap (BT)이 류마티스관절염 실험쥐에 대한 치료작용

[0104] AIA를 구축하여 BT가 체내에서의 치료효과를 연구한다.

[0105] 실험방법: 6-8주 된 랫트의 꼬리 끝부분에 100l㎕에 BCG함량이 5mg/mℓ인 불완전프로인트항원보강제를 주사한다.대조용 실험쥐는 처리하지 않는다. 발병 후 임의로 3개의 조로 나누어 처리한다. 즉 생리식염수그룹, hIgG그룹, 융합단백질BT그룹 한 그룹에 10마리씩, 복강내 한 마리당 100㎍/100l㎕정도의 약물투여하고 일주일에 두 번 치료한다.(hIgG그룹은 인체IgG1 Fc단편을 포함하고 치료 무관그룹이 된다.) 매일 몸무게를 측정하고 이중맹검방법으로 네 다리에 대해 임상평가를 한다. 일주일에 한번 안광정맥채혈하고 혈청을 분리하고 80도 냉장보관한다.

[0106] 45일치료한 후에 실험쥐를 폐기하고 그 발목관절과 HE염색체를 채취한다. 비장을 채취하여 임파세포를 분리하고 유동식세포측정기로 비장B세포함량을 측정한다. (B220항체측정)

[0107] 실험결과: 각 그룹의 랫트의 체중 및 임상평가 변화는 그림9를 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 Trap그룹의 회복속도는 hIgG그룹과 AIA그룹보다 빠르다. 45일째부터는 통계학적인 의미가 나타났다. (P 〈0.05) 시간이 흐름에 따라 랫트의 류마티스관절염증상이 나타나기 시작했고 점점 심해졌다. 따라서 그 임상평점도 높아졌다. 17일째에는 14±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±1, hIgG그룹은 6±1이다.

[0108] 각 그룹 관절HE염색체 결과 도 10A와 같다. AIA그룹 및 hIgG그룹에서 임파세포의 침투, 골질의 파괴 및 활막염증(AIA그룹 중에서 골질섬유화와 판누스를 발견하기도 한다). 이가 나타나지만 BT그룹에서는 완전한 관절활막과 임파세포의 청퇴 및 손상된 골질이 회복되는 것을 볼 수 있으며, 이는 정상적인 랫트의 관절과 비슷하다. 병리학 평가결과는 도 10B와 같다. AIA그룹과 hIgG그룹의 병리학평점은 4점에 달하지만 BT그룹의 병리학평점은 현저하게 낮고 (P 〈0.05) 정상에 가깝다.

[0109] B220유동식측정결과는 도 11을 참조한다. BT치료그룹의 랫트의 비장세포 B220양성세포비율은 17.6%이며, 생리식염수그룹(32.6%)과 hIgG치료그룹(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 융합단백질BAFF Trap (BT)를 성공적으로 제조했다는 것을 알 수 있다. 이 융합단백질은 BAFF수용체의 길항제로 사용할 수 있다. AIA실험쥐에게 확실한 치료효과를 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

275 280 285

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

290 295 300

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

305 310 315

<210> 3

<211> 339

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> B cell activating factor antagonist

<400> 3

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp

20 25 30

His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His

35 40 45

Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Gly

50 55 60

Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp

65 70 75 80

Leu Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg

85 90 95

Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Glu Pro Lys Ser Cys

100 105 110

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

130 135 140

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

145 150 155 160

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

165 170 175

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

180 185 190

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
aggagcccag gcagggacgc gccagccccc acgccctgcg tcccggccga gtgcttcgac 180
ctgctggtcc gccactgcgt ggcctgcggg ctcctgcgca cgccgcggcc gaaaccggcc 240
ggggccagca gccctgcgcc cggatccgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 300
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 360
atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 420
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 480
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 540
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 600

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 660

cccccatccc 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 tccctgtctc 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 gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattca 60

ctcagctgcc gcaaggagca aggcaagttc tatgaccatc tcctgaggga ctgcatcagc 120

tgtgcctcca tctgtggaca gcaccctaag caatgtgcat acttctgtga gaacaagctc 180

aggagcccag gcagggacgc gccagccccc acgccctgcg tcccggccga gtgcttcgac 240

ctgctggtcc gccactgcgt ggcctgcggg ctcctgcgca cgccgcggcc gaaaccggcc 300

ggggccagca gccctgcgcc cggatccgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 360

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 420

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca gaagaccct 480

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 540

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 600

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 660

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 720

cccccatccc 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 tccctgtctc 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 tcctgaggga ctgcatcagc 60

tgtgcctcca tctgtggaca gcaccctaag caatgtgcat acttctgtga gaacaagctc 120

aggagcccag gcagggacgc gccagccccc acgccctgcg tcccggccga gtgcttcgac 180

ctgctggtcc gccactgcgt ggcctgcggg ctcctgcgca cgccgcggcc gaaaccggcc 240

ggggccagca gccctgcgcc c 261

도면

도면1

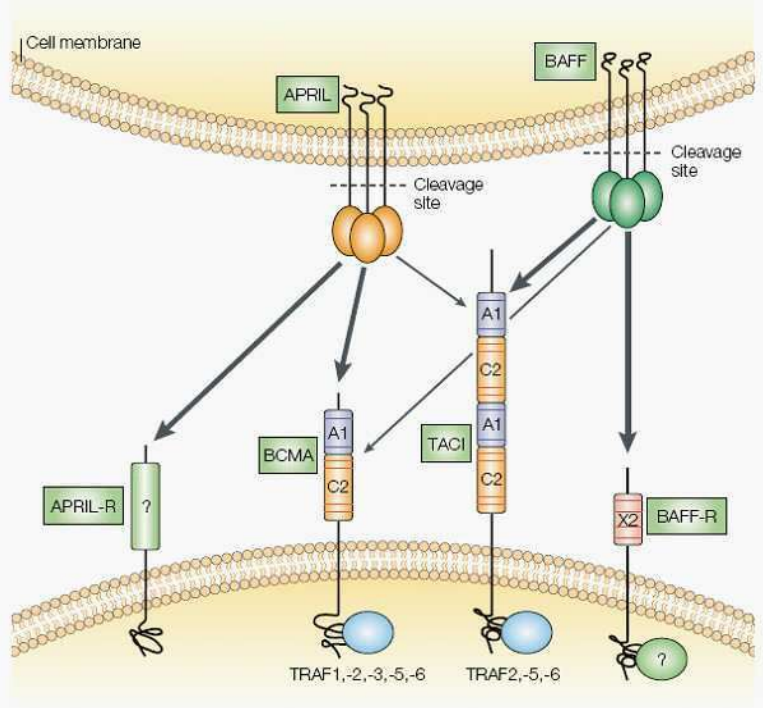
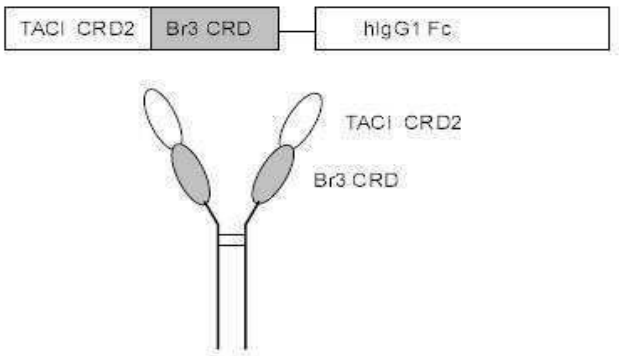
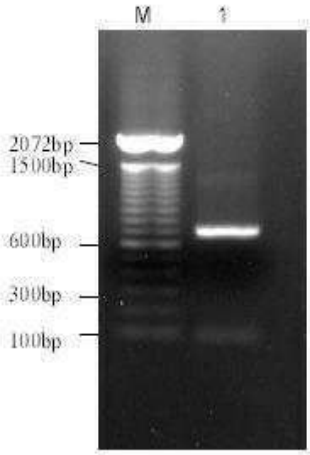


Figure 1 | **Interactions between BAFF, APRIL and their receptors APRIL-R, BCMA, TACI and BAFF-R.**

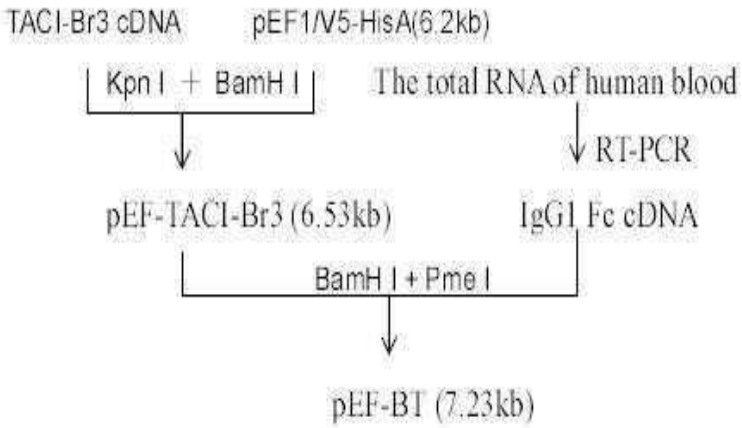
도면2



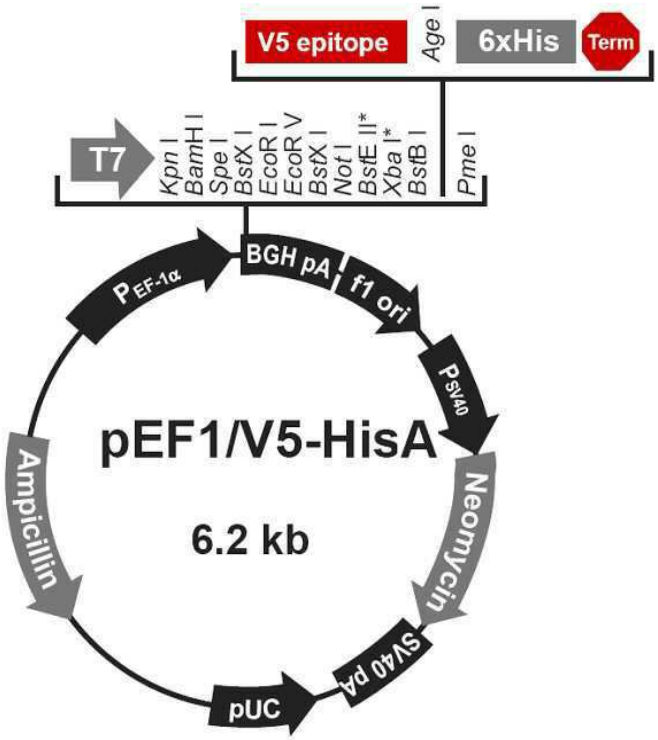
도면3


M
1
2072bp
1500bp
600bp
300bp
100bp

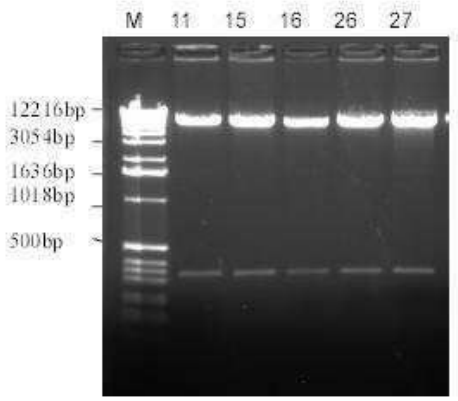
도면4


TACI-Br3 cDNA
pEF1/V5-HisA(6.2kb)
Kpn I + BamH I
The total RNA of human blood
RT-PCR
pEF-TACI-Br3 (6.53kb)
IgG1 Fc cDNA
BamH I + Pme I
pEF-BT (7.23kb)

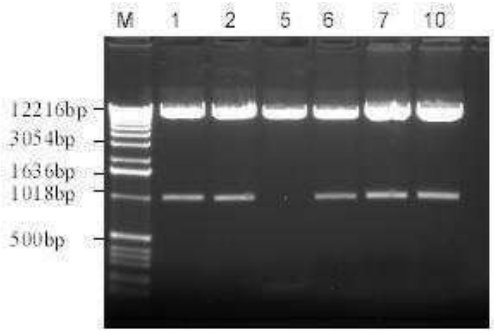
도면5


V5 epitope
Age I
6xHis
Term
T7
Kpn I
BamH I
Spe I
BstX I
EcoR I
EcoR V
BstX I
Not I
BstE II*
Xba I*
BstB I
Pme I
BGH pA
f1 ori
PSV40
Neomycin
SV40 pA
pUC
Ampicillin
PEF-1α
pEF1/V5-HisA
6.2 kb

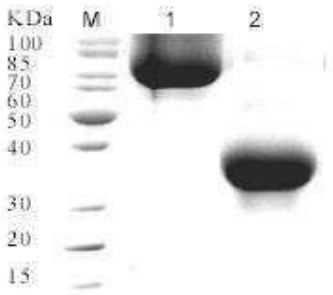
도면6


M
11
15
16
26
27
12216bp
3054bp
1636bp
1018bp
500bp

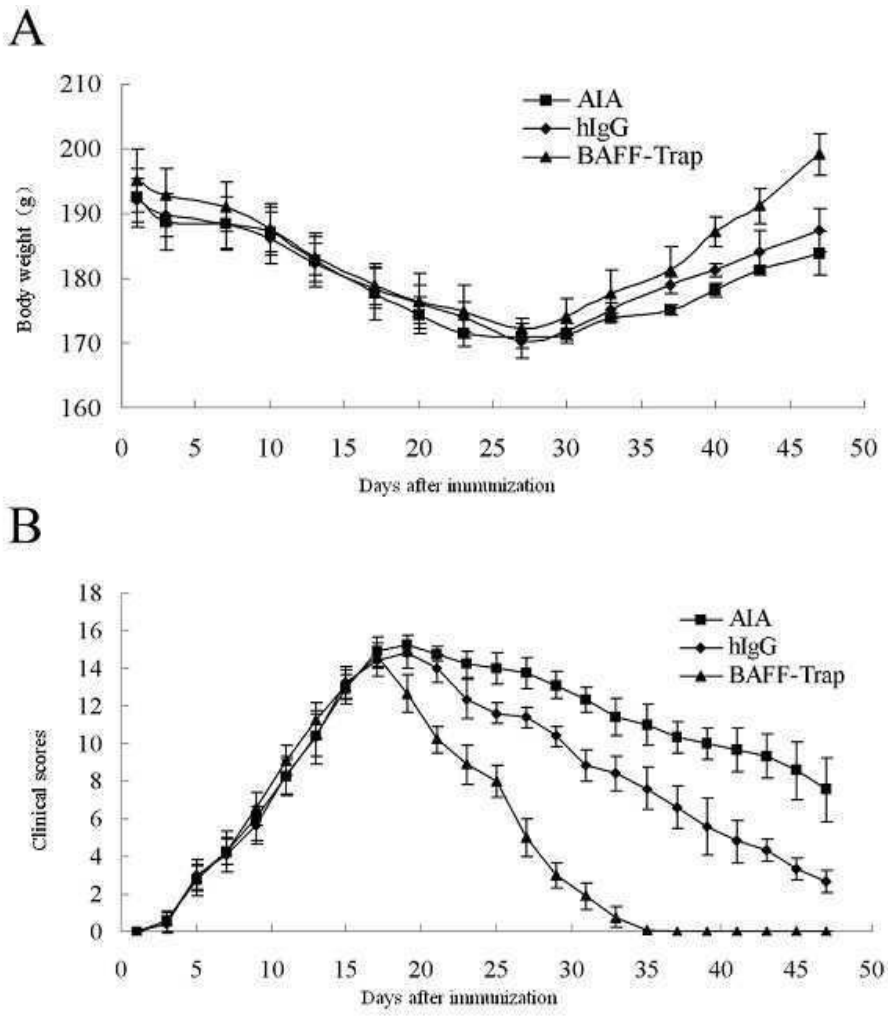
도면7


M
1
2
5
6
7
10
12216bp
3054bp
1636bp
1018bp
500bp

도면8

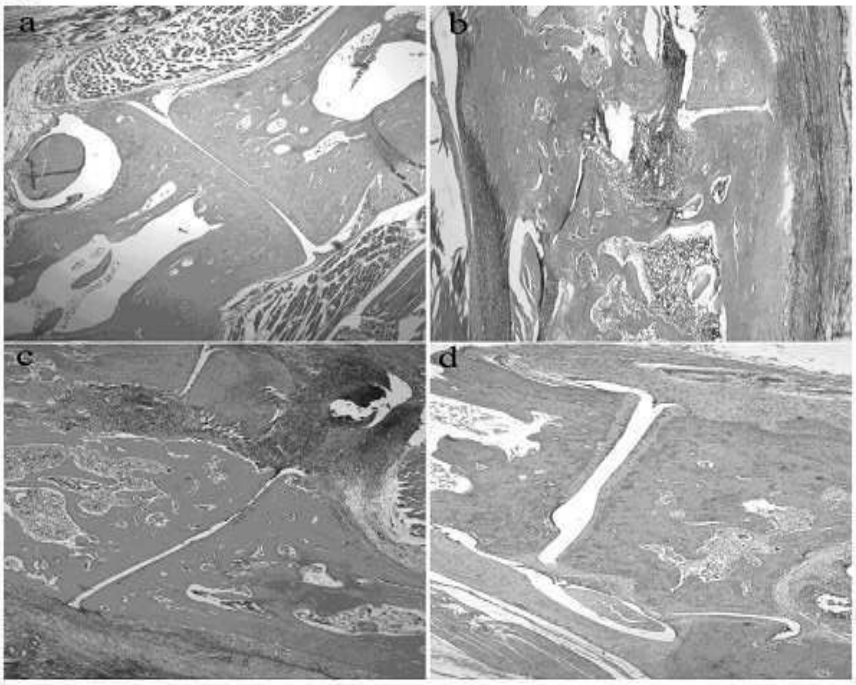

KDa
M
1
2
100
85
70
60
50
40
30
20
15

도면9

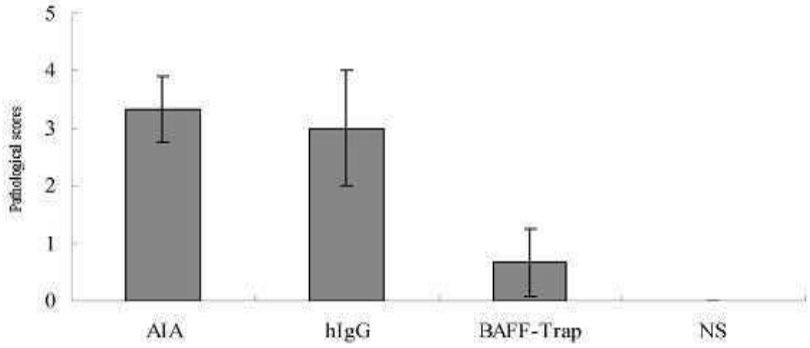
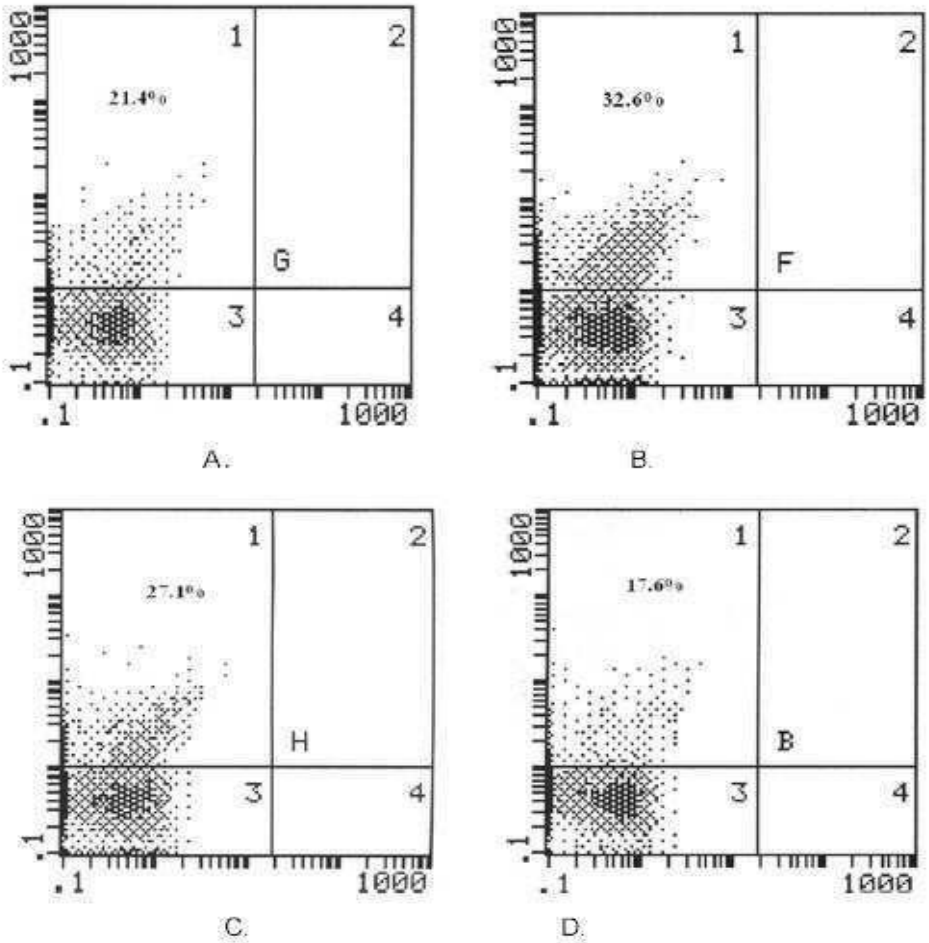

A
AIA
hIgG
BAFF-Trap
Body weight (g)
Days after immunization
B
AIA
hIgG
BAFF-Trap
Clinical scores
Days after immunization

도면10

A



B



도면11