



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.

C07K 16/42 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

(45) 공고일자

2007년06월07일

(11) 등록번호

10-0725314

(24) 등록일자

2007년05월29일

(21) 출원번호

10-2004-0092783

(65) 공개번호

10-2005-0047033

(22) 출원일자

2004년11월13일

(43) 공개일자

2005년05월19일

심사청구일자

2004년11월22일

(30) 우선권주장

1020030080299

2003년11월13일

대한민국(KR)

(73) 특허권자

한미약품 주식회사

경기 화성시 팔탄면 하저리 893-5

(72) 발명자

정성엽

경기 수원시 영통구 영통동 신나무실 미주 아파트 651-301

김진선

경기 광명시 하안동 702 하안 주공아파트 514동 601호

박영진

경기 수원시 영통구 망포동 조은빌라 203동 204호

최기두

서울시 강남구 개포2동 우성 아파트 801-702

권세창

서울 광진구 광장동 현대10차 아파트 1002동 2103호

이관순

서울 송파구 오금동 우창아파트 3동 404호

(74) 대리인

손민

(56) 선행기술조사문현

JP62201582 A

JP63245691 A

JP63290899 A

US20020037558 A1

심사관 : 김지윤

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 면역글로불린 불변영역의 대량 생산 방법

(57) 요약

대장균 유래 시그널 서열을 코딩하는 핵산 서열과 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 재조합 발현 벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 배양하여 형질전환체로부터 수용성 형태로 발현된 면역글로불린 불변영역을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도

도 5

특허청구의 범위

청구항 1.

열안정성 엔테로톡신 II 시그널 서열을 코딩하는 핵산 서열 및 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터를 원핵세포로 형질전환하는 단계; 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 세포질에서 수용성의 형태로 면역글로불린 불변 영역을 발현시키는 단계; 및 발효액을 제거한 형질전환체로부터 발현된 시그널 서열이 프로세싱된 면역글로불린 불변영역을 분리정제하는 단계를 포함하는 면역글로불린 불변영역의 대량 생산방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 면역글로불린 불변영역이 IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, 이들의 조합, 또는 이들의 하이브리드의 불변영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 3.

제2항에 있어서, IgG가 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 이들의 조합 또는 이들의 하이브리드의 불변영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 4.

제 3항에 있어서 면역글로불린 불변영역이 IgG4 불변영역인 방법.

청구항 5.

제 4항에 있어서 면역글로불린 불변영역이 인간 비당쇄화 IgG4 불변영역인 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 면역글로불린 불변영역이 CH1, CH2, CH3, CH4, CL 도메인으로 이루어진 군으로부터 1개 내지 4개 선택되는 도메인으로 이루어진 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, 힌지영역을 추가로 포함하는 면역글로불린 불변영역 대량 생산방법.

청구항 8.

제1항에 있어서, 재조합 발현벡터가 중쇄 불변영역을 코딩하는 핵산서열 및 경쇄 불변영역을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 방법.

청구항 9.

제1항에 있어서, 면역글로불린 불변영역이 서열번호 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 34, 35의 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 10.

삭제

청구항 11.

제1항에 있어서, 열안정성 엔테로톡신 II 시그널 웨타이드가 서열번호 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 또는 46의 아미노산 서열을 갖는 방법.

청구항 12.

제1항에 있어서, 재조합 발현벡터가 엔테로톡신 II 시그널 서열 및 서열번호 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 34, 및 35로 구성되는 군으로부터 선택되는 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 13.

제1항에 있어서, 형질전환체가 기탁번호 KCCM 10588, 10589, 10594, 10595, 10596, 10597, 10598, 10599 및 10600으로 구성되는 군에서 선택되는 형질전환체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제 1항에 있어서, 형질전환체가 원핵세포 대장균인 방법.

청구항 15.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 대장균 유래 시그널 서열을 코딩하는 핵산 서열과 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 재조합 발현 벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 배양하여 형질전환체로부터 수용성 형태로 발현된 면역글로불린 불변영역을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

유전공학 기술의 발전과 함께 많은 종류의 단백질 의약품이 제조되어 이용되어지고 있다. 그러나 단백질 의약품의 경우, 쉽게 변성되거나 생체내 프로테아제 등에 의해 쉽게 분해되어 생체내 농도 및 역가를 오랫동안 지속시킬 수 없다는 치명적인 단점을 가지고 있다. 그러므로 단백질의 안정성을 증가시켜, 단백질 의약품의 혈중, 생체내 농도를 적정 수준으로 유지시키는 것은 효과적인 치료뿐만 아니라 자주 주사등으로 단백질을 공급받아야 하는 환자의 불편 경감 및 경제적인 이유에도 매우 중요한 문제다.

따라서 단백질 의약품의 생체내 안정성을 증가시키기 위하여, 단백질의 제형을 변화시키거나, 다른 단백질을 융합시키거나, 혹은 단백질 표면에 적당한 고분자를 화학적 또는 생물학적 방법으로 부착시키는 등의 다양한 방법들이 오래전부터 시도되었다.

다른 단백질과의 융합으로 단백질의 안정성을 증가시키기 위한 시도중의 하나가, 면역글로불린 Fc와 단백질과의 융합이다.

Fc 영역은 면역글로불린의 고유 기능인 항원 결합능 외의 보체-의존적 독성(CDC, complement-dependent cytotoxicity), 항체-의존적 세포독성(ADCC, antibody-dependent cell cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effecter function)을 담당한다. 또한, Fc 영역에 존재하는 FcRn 서열은 신생아로의 IgG 수송 및 반감기를 증가시켜 혈청내 IgG의 수준을 조절하는 역할을 하고(Ghetie and Ward, *Immunology Today* 18: 592-598, 1997), 단백질 A 및 단백질 G와의 상호작용을 조절한다. 이러한 Fc 영역과 치료용 단백질과의 융합을 통하여 치료용 단백질의 안정성을 증가시키고자 하는 연구가 활발하게 진행되었다.

대한민국 특허 제249572호는 IgG1 중쇄 불변영역(Fc)의 아미노 말단에 IL4 수용체, IL7 수용체, G-CSF 수용체, EPO 수용체 등의 다양한 단백질의 카르복실 말단을 연결시킨 후 이를 포유동물 세포로부터 제조한 융합단백질을 개시하고 있다. 미국특허 제5,605,690호는 종양파시인자 수용체의 카르복실 말단에 인간 IgG1 Fc 유도체를 융합하여 동물세포로부터 제조한 융합단백질을 보고하고 있다. 또한, Tanox사는 미국특허 제5,723,125호 및 제5,908,626호에서 인간 인터페론 알파 및 베타 유전자의 카르복실 말단과 천연형 인간 IgG4 Fc 유전자를 웨타이드 링커를 이용하여 동물세포에서 제조함을 보고하였고, Lexigen사는 PCT 출원공개 제WO 00/69913호에서 천연형 IgG1 Fc 카르복실 말단과 인간 인터페론의 아미노 말단을 링커없이 유전자 재조합 방식으로 연결하여 동물세포에서 생산하였다. 미국특허 공개번호 제20030082679호에서는 인간 G-CSF 유전자의 카르복실 말단과 IgG1 Fc의 아미노 말단을 웨타이드 링커를 사용하여 연결한 후 동물세포에서 생산한 융합단백질이 증가된 혈중 반감기를 나타냄을 보고하였다. 미국특허 공개번호 제20010053539호, 제6,030,613호, PCT 출원공개 제WO 99/02709호, 제WO 01/03737호, 유럽특허 제EP 0464533B1호 등은 IgG1 Fc 유전자 혹은 Fc 유전자의 유도체를 그의 아미노 말단에 웨타이드 링커를 삽입하거나 혹은 웨타이드 링커없이 인간 EPO 유전자, TPO 유전자, 인간 성장 호르몬 유전자, 인간 인터페론 베타 유전자의 카르복실 말단에 연결시킨 후, 각각의 융합체를 동물세포를 이용하여 생산하였으며, 이러한 Fc 융합단백질의 혈중 반감기가 모두 천연형 단백질보다 상승하였음을 보고하였다.

그러나, 상기의 Fc와의 융합단백질은 목적 단백질의 혈중 반감기가 증가하지만, 동시에 Fc 영역이 갖고 있는 이펙터 기능이 발휘된다는 문제점이 있다(미국특허 제5,349,053). Fc 영역의 이펙터 기능에 의하여 보체를 고정시키거나 Fc γ Rs을 발현하는 세포에 결합하여 특정 세포를 파괴시키고 염증을 유발하는 여러 사이토카인의 생성 및 분비를 유도하여 원하지 않는 염증을 유발시킨다. 또한, 융합된 부위의 단백질 서열은 인체에 존재하지 않는 새로운 단백질 서열이므로 장기 투여시 면역반응 유발 가능성도 있는 등 여러 가지 단점을 가지고 있다.

이에 긴 혈중 반감기를 유지하지만 이펙터 기능이 결실된 면역글로불린 혹은 면역글로불린 단편을 이용하고자 하는 연구가 이루어져 왔다. Cole 등은 Fc 수용체에 대한 친화력이 감소된 Fc 유도체를 생산하기 위해 CH2 영역 중 Fc 수용체와의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 234, 235 및 237번째 잔기를 알라닌으로 치환하여 ADCC의 활성이 억제됨을 보고하였다(Cole et al., *J. Immunol.* 159: 3613-3621, 1997). 그러나, 이를 모두는 천연형 인간 Fc 영역과 다른 부적절한 아미노산의 존재로 인해 Fc는 더 큰 면역성 또는 항원성을 갖을 수 있으며 바람직한 Fc 기능들을 잃을 수도 있다.

면역글로불린의 높은 혈중 농도를 유지하면서 원하지 않는 이펙터 기능을 제거 혹은 감소시키기 위한 방법 중 하나로 면역글로불린의 당을 제거하는 방법이 연구되었다. 미국특허 제5,585,097호는 CD3 항체의 제조시 항체의 당쇄화 잔기인 CH2 도메인의 297번째 아스파라긴 잔기를 다른 아미노산으로 치환하여 비당쇄화된 항체 유도체를 제조하였고, 이 경우

유도체가 FcRn 수용체와의 결합력은 혈중 반감기의 변화없이 유지하면서 감소된 이펙터 기능을 나타냈다. 그러나, 이 방법 역시 비정상적인 서열을 갖는 새로운 재조합 구조물의 생성으로 면역계에서 외부물질로 인식되고 거부될 수 있다는 문제점이 있다. 미국특허 공개번호 제20030073164호에는 이펙터 기능이 결실된 치료용 항체를 제조하기 위해 당화 기능이 없는 대장균 세포를 이용하여 Fc 유도체를 생산하는 방법을 기술하고 있다.

미국의 암젠사는 미국특허 제6,660,843호, 미국특허 공개번호 제20040044188호 및 제20040053845호에서 치료용 단백질 혹은 치료용 단백질 웹타이드 미믹을 제조하고, 그의 아미노 말단 혹은 카르복실 말단에 인간 IgG1 Fc 헌지의 처음 5개 아미노산이 결실된 유도체를 융합시킨 후 대장균 숙주를 사용하여 생산하는 방법을 기술하였다. 그러나 신호시그널 없이 발현되는 융합 단백질은 발현되어 세포질 내에 응집체(inclusion body) 형태로 존재하기 때문에 분리 후 별도의 리풀딩 과정을 거쳐야 한다는 단점을 가진다. 리풀딩 과정을 거치면 단백질의 생산 수율은 저하되고, 상동 또는 이형의 이량체로 존재하는 단백질의 경우에는 이량체로 생성되는 수율이 현저하게 감소되는 문제점이 있다. 또한, 신호 시그널 없이 대장균에서 발현되는 단백질은 대장균의 단백질 발현 체계의 특성상 아미노 말단에 메티오닌 잔기가 부가된다. 언급한 암젠사의 발현 산물은 아미노 말단에 메티오닌 잔기가 부가되어 있으며, 이러한 메티오닌 잔기는 인체에 반복 혹은 과량 투여시 면역반응을 유발할 수 있다. 또한, 이들은 치료용 단백질을 코딩하는 유전자와 Fc를 코딩하는 유전자를 연결시켜 대장균에서 융합단백질 형태로 발현시키기 때문에, 대장균에서 발현되기 어렵거나, 대장균에서 발현시 활성에 문제가 있는 치료용 단백질과의 융합체는 생산하기 힘들다는 단점이 있다. 또한, 두 개 단백질의 융합부위는 생체내에는 존재하지 않는 비정상적인 서열이기 때문에 면역계에서 외부물질로 인식되어 면역반응을 일으킬 수도 있다.

이런 점을 개선하고자, 본 발명자는 종래의 재조합적인 방법에 의한 융합이 아니라, Fc 영역 및 단백질 의약품을 각 최상의 발현 시스템에서 개별의 폴리웹타이드로 제조한 후, 공유결합시켜 Fc를 약물의 캐리어로 사용한 바 있다. 이 경우, 당쇄화된 폴리웹타이드 약물과 비-당쇄화된 Fc의 결합체를 제조할 수 있으므로, 부적절한 면역반응은 제거되면서 생리학적 약물활성, 생체적 지속성과 안정성을 모두 충족시키게 된다.

상기의 경우 Fc는 비-당쇄화된 형태가 바람직하므로, 대장균 등의 원핵세포 발현 시스템을 이용하도록 한다. 대장균의 발현체계를 이용하는 생산방법은 기존의 동물세포를 이용한 방법에 비해 여러 가지 장점이 있는데, 대장균은 발현벡터의 제작이 용이하여 발현여부를 빨리 검증할 수 있고, 성장속도가 매우 빠르기 때문에 저렴한 비용으로 대량생산이 가능하고, 비교적 단순한 발효방법을 적용할 수 있어 상업적 이용 측면에서도 다른 숙주세포를 이용하는 것보다 유용하다.

그러나, 대장균에서 과발현시킬 경우 응집체로 발현되는 면역글로불린 불변영역을 대장균에서 산업적으로 이용 가능하게 대량으로 생산하는 유용한 방법은 아직까지 보고 된 바 없다.

이에, 본 발명자들은 당쇄가 제거되어 면역반응 유발의 위험이 없는 면역글로불린 Fc 영역 등의 면역글로불린 불변영역을 대량으로 생산하는 방법을 찾고자 노력하던 중, 면역글로불린 Fc 영역 등의 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 핵산 서열을 대장균 시그널 서열과 융합시켜서 대장균에서 발현시킬 경우, 대장균의 세포내에서 응집체가 아닌 수용성 형태로 발현됨을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 한 목적은 대장균 유래 시그널 서열을 코딩하는 핵산 서열 및 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 재조합 발현 벡터를 원핵세포로 형질전환하는 단계; 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 형질전환체로부터 수용성 형태로 발현된 면역글로불린 불변영역을 분리 정제하는 단계를 포함하는 면역글로불린 불변영역 대량 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 불변영역을 제공하는 것이다.

발명의 구성

하나의 양태로서, 본 발명은 대장균 유래 시그널 서열을 코딩하는 핵산 서열 및 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 재조합 발현 벡터를 원핵세포로 형질전환하는 단계; 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 형질전환체로부터 수용성 형태로 발현된 면역글로불린 불변영역을 분리 정제하는 단계를 포함하는 면역글로불린 불변영역을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

면역글로불린은 항체에서 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 유도(variation)을 보이는 가변 영역과 보체계를 활성화시키고 태반을 통과하는 능력을 부여하거나 각종 면역관련 세포가 가지는 수용체에 대한 리간드로 작용하는 등의 이펙터 기능을 가지면서 고정서열을 가지는 것을 특징으로 하는 불변영역으로 나뉜다.

본 발명은 단백질 의약품의 캐리어 등으로 유용하게 사용될 수 있는 면역글로불린의 불변영역을 대량으로 생산할 수 있는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 의해 생산될 수 있는 면역글로불린 불변영역은 인간, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랙트, 기니아 꿩 등의 동물의 생체내에서 분리한 천연형, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 바람직하게는 인간 유래의 IgG, IgA, IgM, IgE, IgD의 불변영역, 이들의 조합(combination) 또는 이들의 하이브리드(hybrid)일 수 있다. 본 발명의 “조합”이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미하고, “하이브리드”란 단쇄의 면역글로불린 불변영역내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 불변영역에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 면역글로불린으로 바람직하게는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 불변영역, 이들의 조합 또는 이들의 하이브리드일 수 있다. 구체적으로, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ), 앱실론(ϵ) 탑입, 보다 구체적으로는 서브클래스로 감마1(γ_1), 감마2(γ_2), 감마3(γ_3), 감마4(γ_4), 알파1(α_1) 및 알파2(α_2)의 불변영역을 가지고 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 탑입의 불변영역을 가진다. 본 발명에서 유용한 인간 면역글로불린 불변영역을 암호화하는 핵산 서열 및 이를 한정하는 아미노산 서열은 GenBank 및/또는 EMBL 데이터베이스에 개시된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 것들일 수 있다.

IgG, IgA, IgM, IgE의 중쇄 불변영역은 CH1, CH2 및 CH3으로 이루어지고 IgM은 추가로 CH4를 포함한다. 경쇄 불변영역은 CL을 가진다. 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 CH1, CH2, CH3, CH4, CL 도메인으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 도메인이다. 선택되는 도메인은 전체 또는 그의 단편(30개 이상의 아미노산 잔기가 제거된 형태)일 수 있다. 예를 들면, CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인; CH1 도메인 및 CH2 도메인; CH1 도메인 및 CH3 도메인; CH2 도메인 및 CH3 도메인이 선택될 수 있다. 그러나 선택된 도메인의 배열은 특별히 한정되지 않는다.

본 발명의 면역글로불린 불변영역은, 아미노산 서열 유도체를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 것을 의미하고 자연적으로 발생하거나 인위적으로 발생시킬 수 있다. 면역글로불린의 불변영역은 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 유도체를 포함한다. 삽입은 통상적으로 약 1개 내지 20개 아미노산의 연속 서열로 이루어지나, 보다 큰 삽입도 가능하다. 결실은 통상적으로 약 1개 내지 30개의 잔기로 이루어진다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

이런 유도체는 당해 분야에 공지된 화학적 펩티드 합성방법 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다(Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).

경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

그리고, 본 발명은 이량체의 형성을 가능케 하는 힌지 영역을 포함할 수 있다. 힌지 영역은 천연형 뿐만 아니라 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 유도체를 포함한다.

상기 면역글로불린 유도체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이나, 필요에 따라서는 이의 단백질의 특성을 변형시킨 유도체일 수 있다. 바람직하게는 면역글로불린 불변영역 유도체는 생성되는 유도체의 단백질 서열이 인간의 것과 상이하지 않아 면역반응을 유발하지 않는 범위내에서, 아미노산 서열상의 유도와 수식에 의해서 단백질의 열, pH등에 대한 구조적 안정성 또는 가용성이 증가하거나, 황화 결합 형성, 밸현 숙주와의 친화성, 보체와의 결합, Fc 수용체와의 결합, 항체 의존성 세포독성 등이 개선된 유도체일 수 있다. 이 때, 불변영역 유도체에서 변화시킨 부위가 인간의 것과 상이하여 인간에 투여시 면역반응을 유발해서는 안되며, 바람직한 유도체의 예는 다음과 같다.

(1) 힌지영역의 이황화 결합 형성 시스테인 잔기는 제거될 수 있다. 바람직하게는, IgG1의 힌지 영역의 15개의 아미노산 중 첫 번째 아미노산인 Glu에서부터 12번째 아미노산인 Pro 까지의 12개 잔기를 제거하여 2개의 시스테인 잔기를 제거할

수 있고, IgG4의 헌지 영역의 12개의 아미노산 중 첫 번째 아미노산인 Glu에서부터 9번째의 아미노산인 Pro까지의 9개 잔기를 제거하여 1개의 시스테인 잔기를 제거할 수 있다. 시스테인 잔기의 제거는 숙주세포내에 존재하는 시스테인을 포함하는 다른 단백질과의 결합을 피할 수 있어 발현 수율의 향상과 수용성 형태에서의 안정성 증가를 기대할 수 있다.

(2) 항체 의존성 세포독성을 유발하는 Fc 수용체에 대하여 감소된 결합력을 나타내도록 IgG1 불변영역의 특정 잔기를 유도시킬 수 있다. 상기 유도체는 IgG1 CH2 서열에 존재하는 234 번의 류신 잔기를 (numbering은 Kobat database의 서열을 참고) 결실 또는 다른 잔기로의 치환을 포함할 수 있는데, 가장 바람직한 유도는 IgG4에서 동일한 위치에 해당하는 아미노산 잔기인 페닐알라닌으로 치환하는 것이다. 이러한 유도체는 인간에게 생소한 서열이 아니기 때문에 인간에게 투여시 면역반응을 유발하지 않음을 예상할 수 있다.

(3) IgG1의 헌지영역의 유도체는 첫 번째 아미노산 서열인 프롤린 잔기의 치환을 포함할 수 있다. 프롤린 잔기는 다른 아미노산 잔기와 달리 환구조를 형성하고 있기 때문에 프롤린 잔기가 아미노 말단을 이루고 있으면 단백질 발현과 시그널 서열의 제거시 문제점을 야기할 수 있다. 따라서, 프롤린 잔기를 다른 아미노산 잔기로 치환할 수 있으며, 바람직하게는 IgG4의 헌지영역 중 동일한 위치에 해당하는 아미노산 잔기인 세린 잔기로 치환하는 것이다. 상기에서 언급한 바와 같이, 이러한 유도체는 인간에게 생소한 서열이 아니기 때문에 인간에게 투여시 면역반응을 유발하지 않음을 예상할 수 있다.

본 발명의 면역글로불린 불변영역은 중쇄 불변영역을 포함한다. 바람직하게는 IgG1 이량체를 형성하게 하도록 헌지 영역을 포함하는 중쇄 불변영역은 서열번호 25, 21, 22, 또는 23의 아미노산 서열을 가진다. IgG1 단량체를 형성하도록 헌지 영역을 포함하지 않는 중쇄 불변영역은 서열번호 27의 아미노산 서열을 가진다. 또한 IgG2 이량체를 형성하게 하도록 헌지 영역을 포함하는 중쇄 불변영역은 35의 아미노산 서열을 가진다. 면역글로불린은 IgG4 이량체를 형성하게 하도록 헌지 영역을 포함하는 중쇄 불변영역은 서열번호 29 또는 24의 아미노산 서열을 가진다. IgG4 단량체를 형성하도록 헌지 영역을 포함하지 않는 중쇄 불변영역은 서열번호 30의 아미노산 서열을 가진다.

또한, 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 경쇄 불변영역을 포함한다. 바람직하게는 면역글로불린 경쇄 불변영역은 34의 아미노산 서열을 가진다.

또한, 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 중쇄 및 경쇄를 모두 포함하는 불변영역이다. 바람직하게는 24의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 불변영역과 서열번호 34의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 불변영역을 가지는 이량체 또는 사량체이다.

비-당쇄화된 면역글로불린 중쇄영역의 형태를 얻기 위하여, 대장균 등의 원핵생물에서 과발현을 시킬 경우, 완전한 폴딩을 이루지 못하고 다양한 기작에 의하여 활성을 잃은 상태의 불용성 응집체(inclusion body)를 형성하게 된다. 이 응집체들은 단백질로서의 활성을 가지지 못하므로, 이로부터 생물학적 활성을 가지는 가용성 단백질을 얻기 위해서는 복잡하고 시간이 오래 걸리는 추가의 변성 및 리폴딩 공정을 필요로 한다. 따라서 응집체로 발현되는 면역글로불린 중쇄영역의 원핵세포에서의 유용한 대량 생산 시스템의 확립이 요구되고 있다.

대장균의 세포질 밖으로 수송되는 단백질은 일반적으로 세포막의 트란스 면(trans side)에서 펩티다제에 의해 잘려나가는 N-말단 서열(N-terminal sequence)를 가지고 있다. “시그널 서열(signal sequence)” 또는 “시그널 펩타이드(signal peptide)”라고 부르는 이 서열에 의하여 단백질은 세포질 외부로 수송되게 된다.

본 발명에서, “시그널 서열”은 단백질의 세포질 밖으로서 수송 및 분비를 가능하게 하는 특정 아미노산 서열을 의미하고, 본 발명의 시그널 서열은 대장균에서 분비되는 단백질이 가지는 대장균 유래 시그널 서열이다. 대장균 유래 시그널 서열은 18 내지 30개의 아미노산으로 구성되어 있고, 몇 가지 공통적인 특징을 가진다. 시스널 서열은 우선 N 말단에 쪽에 한개 또는 몇 개의 아주 짧은 양전화를 가지는 N-도메인이 존재하고, 이 도메인의 뒤에는 다소 긴 소수성 영역인 H-도메인이 존재한다. N 말단은 Lys, Arg 같은 극성의 양전하를 띤 아미노산이 많이 존재한다. H-도메인에는 Ala, Leu 같은 소수성 잔기가 주로 존재한다. H-도메인과 실제 분비하고자 하는 단백질의 사이에는 C-도메인이 존재하는데 이 부위는 시그널 펩티다제(signal peptidase)에 의해 인식되는 서열을 가지고 있다. 시그널 서열을 가지고 있는 단백질은 여러 단백질들과 상호작용을 하여 세포막에 도달한 후, 시그널 펩티다제에 의해 특정 부위가 잘린 후 성숙한 단백질(mature protein)이 되게 된다. 대장균 유래 시그널 서열에는 알카라인 포스파테이즈, 페니실리네이즈, Ipp, 열안정성 엔테로톡신Ⅱ, LamB, PhoE, PelB, OmpA 또는 말토스 결합 단백질 등이 있고, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 시그널 서열은 함께 발현되는 단백질의 세포질 밖으로의 분비를 가능하게 하는 한, 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 유도체를 포함한다. 특히, 융합 단백질의 분비 효율을 개선시키는 유도체는 바람직하다고 볼 수 있다.

시그널 서열은, 바람직하게는 열안정성 엔테로톡신Ⅱ이다. 서열번호 36의 아미노산 서열을 가지는 천연 엔테로톡신Ⅱ 뿐만 아니라 엔테로톡신Ⅱ 유도체를 포함한다. 대장균에서 다양한 이종 단백질의 분비 효율을 증대시키는 대장균 열안정성

엔테로톡신Ⅱ 시그널 서열 유도체에 대해서는 이미 보고된 바 있다(대한민국 특허등록 제0316347호). 엔테로톡신Ⅱ 유도체는 2번, 4번, 5번, 12번, 20번, 22번 위치에서 하나 이상의 아미노산 서열이 다른 아미노산 서열로 치환된 형태가 바람직 하며, 보다 바람직하게는 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 또는 46의 아미노산 서열을 가지는 치환체이다. 본 발명의 구체적 양태에서는, 서열번호 38의 아미노산 서열을 가지는 엔테로톡신Ⅱ를 사용하였으며, 서열번호 12의 염기서열에 의해 코딩된다.

천연의 엔테로톡신Ⅱ를 코딩하는 핵산은, 천연에서 분리하거나 유전자 합성법을 이용하여 합성할 수 있고 엔테로톡신Ⅱ 유도체는 천연에서 분리한 뒤 위치지정 돌연변이법등의 방법으로 제조하거나, 유전자 합성법을 이용하여 합성할 수도 있다.

본 발명에서 “융합 단백질”이란 상이한 2개 이상의 폴리펩타이드가 펩타이드 결합(peptide bond)을 통하여 한가닥의 폴리펩타이드로 결합되어 있는 것을 의미하며, 유전자 수준에서의 재조합으로 하나의 폴리펩타이드로 번역되게 하는 방법으로 용이하게 제작될 수 있다. 본 발명의 목적상 융합 단백질은, 대장균 유래 시그널 서열과 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 폴리펩타이드와의 융합을 의미한다. 시그널 서열과 면역글로불린 불변영역은 하나의 프로모터에서 인 프레임(in flame)으로 한 가닥 단백질로 번역되지만, 최종적으로 시그널 서열은 폴리펩타이드로부터 절단되어 제거된다. 융합 단백질의 제조법은 제한되지 않지만, 바람직하게는 유전자 재조합 기술에 기초하여, 시그널 서열을 코딩하는 핵산과 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 핵산서열을 일반적인 제한효소를 이용하여 절단하고 리가제 등의 효소로 결합시켜서 제조된다.

상기 융합단백질을 코딩하는 핵산서열은 재조합 발현 벡터에서 삽입되어 발현된다.

본 발명에서, “재조합 발현벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

본 발명에서 “작동가능하게 연결된 (operably linked)”는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 할 수 있다.

적합한 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 서열을 포함할 수 있다. 숙주가 대장균인 경우에는 trp 프로모터, lac 프로모터, recA 프로모터, λP L 프로모터, lpp 프로모터, T7 프로모터 등이, 숙주가 바실러스속 균인 경우에는 SPO1 프로모터, SPO2 프로모터, penP 프로모터 등을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

개시 코돈 및 종결 코돈은 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 발현벡터는 또한 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.

본 발명의 발현벡터는 대장균 시그널 서열을 필수적으로 포함하는 벡터로, 바람직하게는 대장균의 열안정성 엔테로톡신Ⅱ 시그널 서열을 포함한다. 그리고 엔테로톡신Ⅱ의 샤인 달가노 서열을 엔테로톡신Ⅱ 시그널서열과 함께 포함하는 벡터가, 목적 단백질의 발현량을 더 향상시킬 수 있기에 보다 바람직하다. 본 발명에서는 엔테로톡신Ⅱ 시그널 서열-면역글로불린 중쇄영역 융합 단백질을 발현시키기 위하여, 엔테로톡신Ⅱ의 샤인 달가노 서열 및 엔테로톡신Ⅱ 시그널 서열을 코딩하는 핵산서열과 면역글로불린 중쇄영역을 코딩하는 서열이 프로모터에서 인프레임으로 발현되도록 유전자 재조합적 방법으로 연결하여 제조하였다.

본 발명의 구체적인 실시 양태에서, 엔테로톡신Ⅱ 시그널 서열 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄영역을 발현하는 재조합 발현 벡터는 pSTⅡG1CH1_3이고, 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄영역을 발현하는 벡터는 pSTⅡdCG1Fc이고, 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄영역을 발현하는 벡터는 pSTⅡdCG1SFc이고, 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄영역을 발현하는 벡터는 pSTⅡdCG1SFFc이고, 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄영역을 발현하는 벡터는 pSTⅡG1Mo이고, 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄영역을 발현하는 벡터는 pSTⅡdCG2Fc이고, 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄영역을 발현하는 벡터는 pSTⅡdCG4Fc

이고, 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄영역을 발현하는 벡터는 pSTⅡG4CH1_3이고, 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄영역을 발현하는 벡터는 pSTⅡG4Mo이다.

본 발명의 구체적인 실시 양태에서, 본 발명의 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 불변 영역과 엔테로톡신Ⅱ 시그널 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 가지는 면역글로불린 경쇄영역을 발현하는 재조합 발현 벡터는 pSTⅡG4H_K이고, 각각의 프로모터에서 각각 발현된다.

상기 융합 단백질을 발현하는 재조합 발현벡터는 숙주세포로 형질전환 된다.

본 발명의 목적상, 숙주세포는 당쇄화가 일어나지 않는 원핵세포이다. 이러한 원핵세포에는 대장균 (*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*) 또는 스타필로코쿠스 (*Staphylococcus*)등이 있이나, 바람직하게는 대장균이다. 대장균은 대장균 XL-1 블루, 대장균 BL21(DE3), 대장균 JM109, 대장균 DH 시리즈, 대장균 TOP10 및 대장균 HB101이고, 보다 바람직하게는 대장균 BL21(DE3)이나, 이로 제한되는 것은 아니다. 대장균을 숙주세포로 이용하는 경우에는 대장균이 당쇄를 단백질에 연결하는 체계가 없기 때문에 천연형 면역글로불린의 CH2 도메인에 존재하는 당이 원천적으로 결실된 형태로 면역글로불린의 불변영역을 생산할 수 있다. 면역글로불린의 CH2 도메인의 당은 면역글로불린의 구조적 안정성에는 영향을 미치지 않지만, 면역글로불린이 Fc 수용체를 발현하는 세포와 결합하여 항체-의존적 세포독성을 일으키고, 면역세포들이 사이토카인들을 분비시켜 염증반응을 일으키도록 하며, 보체의 C1q 요소와 결합하여 보체 고정반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 비당쇄화된 면역글로불린의 불변영역을 생산하여 치료용 단백질과 결합시키면 바람직하지 않은 면역글로불린의 이펙터 기능은 유발하지 않으면서 치료용 단백질의 혈중 농도를 오래 유지시킬 수 있을 것이다.

재조합 발현벡터의 원핵세포로의 형질전환 방법은 핵산을 세포내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법 (electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 (CaPO₄) 침전, 염화칼슘(CaCl₂) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시 양태에서, pSTⅡG1CH1_3이 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡG1CH1_3 (HM10935)이고, pSTⅡdCG1Fc가 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡdCG1Fc(HM10927)고, pSTⅡdCG1SFc가 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡdCG1SFc(HM10928)고, pSTⅡdCG1SFFc가 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡdCG1SFFc(HM10929)고, pSTⅡG1Mo가 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡG1Mo(HM10930)이고, pSTⅡdCG2Fc가 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡdCG2Fc (HM10936)이고, pSTⅡdCG4Fc가 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡdCG4Fc(HM10932), pSTⅡG4CH1_3이 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡG4CH1_3(HM10931)이고, pSTⅡG4Mo이 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡG4Mo(HM10933)이고, pSTⅡG4H_K이 대장균으로 도입된 형질전환체는 BL21/pSTⅡG4H_K (HM10934)이다.

상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 형질전환체는 통상의 방법으로 배양된다.

이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 세포의 성장과 생존에 필수적인 모든 영양소를 함유해야 한다. 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 사용될 수 있는 탄소원의 예에는, 포도당, 자당, 유당, 과당(fructose), 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유와 같은 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤 및 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원의 예에는, 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액(CSL), 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원이 포함된다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서, 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그외에, 아미노산, 비타민, 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기상태를 유지하기 위하여, 배양물내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20 °C 내지 45 °C, 바람직하게는 25 °C 내지 40 °C이다.

소량의 배지에서 발현을 확인하면 좀 더 많은 시료의 확보를 위해 발효기를 이용할 수 있다. 발효기를 이용하여 단백질을 생산할 때는 숙주세포의 성장속도와 발현산물의 양 등 여러 인자를 고려해야 한다.

적절한 배양조건에서 IPTG 등을 투여하여 단백질의 발현을 유도할 수도 있다.

상기 방법으로 원핵세포에서 발현된 본 발명의 시그널 서열 융합된 면역글로불린 불변영역은 페리플라스미 공간으로 발현되지 않고, 놀랍게도 세포질내에서 수용성의 형태로 과발현되고 시그널 서열도 정확하게 프로세싱되었다. 구체적인 본 발명의 실시양태에서, 배지나 페리플라스미 공간으로 분비되는 융합단백질의 양은 무시할 정도였으며, 세포를 파쇄하여 웨스턴 블랏 해본 결과, 단백질은 수용성으로 세포질내로 과다 발현됨을 알 수 있었다. 그리고 세포질내에서 발현되는 면역글로불린 중쇄 영역의 N-말단 부위를 아미노산 서열 분석해 본 결과, 시그널 서열은 정확하게 프로세싱 되었음을 확인할 수 있었다.

이는 종래의 응집체로부터 활성 단백질로 분리하고자 한 방법은 물론이고, 응집체로 가는 단백질 등을 수용성 형태로 생산하기 위하여, 다양한 시그널 서열과 융합하여 목적 단백질을 페리플라스미 공간(periplasmic space)이나 배지로 분비하고자 하는 방법보다도 훨씬 효율적이다. 그 이유는 첫째, 과발현에 의해 응집된 리파제 단백질은, 적절한 용액에서 단백질을 용해 및 변성시켜서 요소, 구아닌дин, 아르기닌 등의 재폴딩제로 재폴딩(refolding)시키는 복잡한 추가의 공정을 거쳐야 한다는 데 있다(Kohno, Meth. Enzym., 185:187-195, 1990). 그리고 복잡한 공정에 비하여, 단백질의 리폴딩 효율은 매우 낮고 리폴딩 후 단백질의 활성도 가용성 단백질에 비해 낮아 산업성이 없다. 둘째, 페리플라스미 공간 또는 배지로 분비되는 정도, 분비 후 응집정도, 발현 효율 등은 재조합하고자 하는 단백질에 따라 매우 차이가 난다는 데 있다. 세포질에서 가용성으로 발현되는 형태보다 발현 효율이 매우 낮음은 공지의 사실이고, 경우에 페리페리플라스미 공간으로 분비된 단백질도 응집체로 존재할 수 있다.

따라서, 상기의 방법은 산업용의 면역글로불린 불변영역을 대량 발현가능하게 하는 유용한 신규 시스템을 제공한다.

본 발명의 방법으로 과다 발현되는 면역글로불린 불변영역은 통상의 방식으로 정제될 수 있다. 형질전환체로부터 생산된 면역글로불린 불변영역은 프렌치 프레스, 초음파 분쇄기 등의 방법을 이용하여 세포를 파쇄한 후, 면역글로불린 불변영역을 포함하는 수용성 분획을 염석 (예: 황산암모늄 침전, 인산나트륨 침전 등), 용매 침전(예: 아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전), 투석, 젤 여과, 이온 교환, 역상 칼럼 크로마토그래피와 같은 칼럼 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용시켜 본 발명의 면역글로불린 불변영역을 코딩하는 단백질을 얻을 수 있다 (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA (1990)).

또 다른 양태로서, 상기 방법으로 제조된 면역글로불린 불변영역에 관한 것이다.

상기 방법에 따라 대장균 등의 원핵세포에서 생산된 면역글로불린 불변영역의 산업적 적용은 특별히 제한되지 않는다. 한 가지 예시적 적용은 임의의 약물과 결합체 형성을 위한 케리어로 사용하는 것이다. 면역글로불린 불변영역과 약물이 결합된 결합체의 형태는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 면역글로불린 불변영역과 약물은 다양한 비율로 결합가능하고, 링커등에 의하여 결합이 매개될 수도 있다.

약물은 폴리펩타이드, 화합물, 추출물, 혼산 등을 포함하나, 바람직하게는, 폴리펩타이드(단백질과 동등한 용어로 사용) 약물이다. 링커는 웹타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커 모두를 포함하나, 바람직하게는 비펩타이드성 링커이며, 보다 바람직하게는 비펩타이드성 중합체이다. 면역글로불린 중쇄영역의 바람직한 예는 Fc이다.

본 발명의 방법으로 제조된 면역글로불린 불변영역과 결합되어 사용될 수 있는 생리활성 폴리펩타이드로는 혈중 반감기를 증가시킬 필요가 있는 것이면 어느 것이나 특별한 제한이 없이 사용할 수 있다. 예를 들어, 인간의 질병을 치료 또는 예방 할 목적으로 사용되는 싸이토카인, 인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원, 수용체 길항물질과 같은 다양한 생리활성 폴리펩타이드, 이들의 유도체 및 유사체들을 예시할 수 있다.

구체적으로, 생리활성 폴리펩타이드는 인간 성장호르몬, 성장호르몬 방출 호르몬, 성장호르몬 방출 웹타이드, 인터페론류와 인터페론 수용체류(예: 인터페론-알파, -베타 및 -감마, 수용성 타입 I 인터페론 수용체 등), 콜로니 자극인자, 인터루킨

류(예: 인터루킨-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30 등)와 인터루킨 수용체류(예: IL-1 수용체, IL-4 수용체 등), 효소류(예: 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase), 이두로네이트-2-설파타제(iduronate-2-sulfatase), 알파-갈락토시다제-A, 아갈시다제 알파(agalsidase alpha), 베타, 알파-L-이두로니다제(alpha-L-iduronidase), 뷰티릴콜린에스터라제(butyrylcholinesterase), 카티나제(chitinase), 글루타메이트 디카르복실라제(glutamate decarboxylase), 이미글루세라제(imiglucerase), 리파제(lipase), 유리케이즈(uricase), 혈소판-활성인자 아세틸하이드롤라제(platelet-activating factor acetylhydrolase), 중성 엔도펩티다제(neutral endopeptidase), 마이엘로페옥시다제(myeloperoxidase) 등), 인터루킨 및 사이토카인 결합 단백질류(예: IL-18bp, TNF-결합 단백질 등), 마크로파지 활성인자, 마크로파지 웹타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 알파-락트알부민(alpha-lactalbumin), 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오포이에틴류(angiopoietin), 헤모글로빈, 트롬빈(thrombin), 트롬빈 수용체 활성 웹타이드, 트롬보모듈린(thrombomodulin), 혈액인자 VII, 혈액인자 VIIa, 혈액인자 VIII, 혈액인자 IX, 혈액인자 XIII, 플라즈미노겐 활성인자, 피브린-결합 웹타이드, 유로키나제, 스트렙토카니제, 히루딘(hirudin), 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 렙틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴(angiotatin), 안지오텐신(angiotensin), 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌(elcatonin), 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제(tissue factor pathway inhibitor), 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자류(예: 신경 성장인자, 모양체 신경영양인자(ciliary neurotrophic factor), 악소제네시스 인자-1(axogenesis factor-1), 뇌-나트륨 이뇨 웹타이드(brain-natriuretic peptide), 신경교 유래 신경영양인자(glial derived neurotrophic factor), 네트린(neprin), 중성구 억제인자(neurophil inhibitor factor), 신경영양인자, 뉴트린(neutrin) 등), 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 시크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토카닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 웹타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토팩신(autotaxin), 락토페린(lactoferrin), 미오스타틴(myostatin), 수용체류(예: TNFR(P75), TNFR(P55), IL-1 수용체, VEGF 수용체, B 세포 활성인자 수용체 등), 수용체 길항물질(예: IL1-Ra 등), 세포표면항원(예: CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69 등), 단일클론 항체, 다중클론 항체, 항체 단편류(예: scFv, Fab, Fab', F(ab')2 및 Fd), 바이러스 유래 백신 항원 등을 예시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 적용가능한 생리활성 폴리펩타이드는 천연형이거나, 대장균과 같은 원핵세포나 효모세포, 곤충세포 또는 동물세포와 같은 진핵세포에서 유전자 재조합에 의해 생산된 것일 수 있으며, 또한 천연형과 동등한 활성을 가지고 하나 이상의 아미노산 위치에서 돌연변이가 일어난 유도체일 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시예에서는, 형질전환체 BL21/pSTIIdCG1SFFc(HM10929)로부터 생산된 면역글로불린 불변영역 단편을 수용성 중합체로서 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 인간 적혈구 생성 촉진인자(Erythropoietin; EPO)에 결합시켜 EPO-PEG-면역글로불린 불변영역 단백질 결합체를 제조하였고, 상기 단백질 결합체가 천연형 EPO 및 증가된 혈중 반감기를 나타내는 2세대 EPO로 알려진 아라네스프(Aranesp, Amgen사)보다 우수한 혈중 반감기를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따라 대장균 시그널 서열을 이용하여 수용성 형태로 생산된 면역글로불린의 불변영역은 생리활성 웹타이드에 결합되어 면역반응을 유발할 위험성 없이 생리활성 폴리펩타이드의 혈중 반감기를 증가시키고 생리활성을 개선시키는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 인간 면역글로불린 IgG1 불변영역 발현벡터의 제작

<1-1> 이량체 IgG1 불변영역 발현벡터의 제작

IgG1의 CH1과 힌지영역을 포함한 중쇄 및 경쇄의 불변영역을 클로닝하기 위해 인간의 혈액에서 수득한 혈구 세포의 RNA를 주형으로 하여 다음과 같이 RT-PCR을 수행하였다. 먼저, Qiamp RNA 혈액 키트(Qiagen사)를 사용하여 약 6 ml의 혈액에서 전체 RNA를 분리한 후, 이 RNA를 주형으로 하고 One-Step RT-PCR 키트(Qiagen사)를 사용하여 유전자를 증폭하였다. 이때, 중쇄 유전자 증폭을 위해서는 서열번호 1 및 2로 기재되는 프라이머 쌍을 사용하였고, 경쇄 카파 쇄의 불변영역 유전자를 증폭하기 위해서는 서열번호 3 및 4로 기재되는 프라이머 쌍을 이용하였다. 이 후의 클로닝 과정을 용이하게 하기 위해 서열번호 1 및 3의 5'-프라이머에는 HindIII 제한효소 인식부위를, 서열번호 2 및 4의 3'-프라이머에는 종결 코돈을 포함하는 BamHI 제한효소 인식부위를 삽입하였다. 이로부터 증폭된 중쇄 및 경쇄 불변영역 산물을 각각 HindIII와 BamHI으로 절단한 후 동일한 제한효소로 처리된 플라스미드 pBluscript SK(-)(Stratagen사)에 삽입하여 플라스미드 pBG1CH1-3과 pBK를 제조하였다. 염기서열 분석 결과, 각 플라스미드에 클로닝된 IgG1 중쇄 CH1-힌지-CH2-CH3 유전자와 경쇄 불변영역 유전자는 각각 서열번호 5 및 6의 염기서열을 갖는 것으로 확인되었다.

IgG1 불변영역을 발현하는 벡터를 제작하기 위하여, 상기에서 제작한 플라스미드를 주형으로 PCR을 수행하여 하기의 불변영역 단편들을 유전자들을 증폭하였다. 서열번호 7 및 2의 프라이머 쌍은 IgG1의 CH1, 힌지영역, CH2 및 CH3을 증폭하기 위해 제작되었으며, 힌지영역에서 이황화 결합에 참여하지 않은 시스테인을 제거한 Fc 영역은 서열번호 8 및 2의 프라이머 쌍, 서열번호 9 및 2의 프라이머 쌍, 및 서열번호 10 및 2의 프라이머 쌍을 이용하여 증폭하였다. 서열번호 7 및 2의 프라이머 쌍으로 플라스미드 pBG1CH1-3을 주형으로 증폭된 유전자는 IgG1의 CH1-hinge-CH2-CH3 을 포함하고 서열번호 25으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩한다. 서열번호 8은 15개 아미노산 서열(Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro; 서열번호 26)로 구성된 힌지영역 단백질 서열중 13번째 아미노산 서열인 프롤린으로부터 시작되는 서열로서, 서열번호 8 및 2의 프라이머 쌍으로 플라스미드 pBG1CH1-3 을 주형으로 증폭된 유전자는 전체 IgG1 불변영역 중 힌지영역의 프롤린-시스테인-프롤린으로 시작되는 아미노 말단과 CH2, CH3 도메인의 아미노산 서열로 구성된 단백질을 코딩한다(서열번호 21). 서열번호 9는 힌지영역의 13번째 아미노산인 프롤린을 세린으로 치환시킨 것이고, 서열번호 10은 힌지영역의 13번째 아미노산인 프롤린을 세린으로, CH2의 4번째 아미노산인 루이신을 페닐알라닌으로 치환시킨 것이다. 따라서, 서열번호 9 및 2의 프라이머 쌍, 및 서열번호 10 및 2의 프라이머 쌍으로 플라스미드 pBG1CH1-3 을 주형으로 증폭된 유전자는 각각 숙주세포에서 발현시 힌지영역의 시스테인 잔기에 의해 이황화 결합에 의한 이량체를 형성할 수 있다(서열번호 22 및 23).

상기에서 증폭된 IgG1 불변영역 단편들을 각각 대장균 시그널 서열을 이용한 발현벡터에 클로닝하기 위해, 본 발명자들에 의해 개발된 발현벡터인 pT14S1SH-4T20V22Q(대한민국 특허 제38061호)를 출발벡터로 사용하였다. 상기 발현벡터는 서열번호 12로 기재되는 염기서열을 갖는 대장균 열안정성 엔테로톡신 시그널 서열 유도체를 포함한다. 클로닝을 용이하게 하기 위해, pT14S1SH-4T20V22Q 플라스미드의 대장균 열안정성 엔테로톡신 시그널 서열 유도체에 서열번호 13 및 14의 프라이머 쌍을 사용한 특정 부위 치환 돌연변이법(site-directed mutagenesis)을 수행하여 시그널 서열 마지막 아미노산을 coding하는 유전자 서열을 mutagenesis하여 StuI 제한효소 인식부위를 삽입하였으며, 염기서열 분석법을 통해 정확히 StuI 제한효소 인식부위가 생성되었음을 확인하였다. pT14S1SH-4T20V22Q 플라스미드에 StuI 제한효소 인식부위가 생성된 플라스미드를 pmST II로 명명하였다. 상기와 같이 제작된 플라스미드 pmST II를 StuI/BamHI 제한효소로 처리한 후 아가로즈 겔에 전기영동을 수행하여 대장균 열안정성 엔테로톡신 시그널 서열 유도체를 포함하는 큰 단편(4.7 kb)을 회수하였다. 상기에서 증폭된 유전자들을 BamHI 제한효소로 처리한 후 상기에서 회수된 발현벡터 단편에 삽입하여 pSTIIG1CH1_3(서열번호 7 및 2의 PCR 산물), 및 pSTIIdCG1Fc(서열번호 8 및 2의 PCR 산물), pSTIIdCG1SFc(서열번호 9 및 2의 PCR 산물), pSTIIdCG1SFFc(서열번호 10 및 2의 PCR 산물)를 제작하였다. 각기 제작된 발현벡터를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/pSTIIG1CH1_3(HM10935), BL21/pSTIIdCG1Fc(HM10927), BL21/pSTIIdCG1SFc (HM10928) 및 BL21/pSTIIdCG1SFFc(HM10929)을 제조하였고, 이들을 한국미생물보존센타(KCCM)에 2004년 9월 15일자로 국제기탁기관인 서울 서대문구 홍제1동 361-221 유림빌딩 2층 소재의 한국미생물보존센터(KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms)에 각각 기탁번호: KCCM-10600, 10588, 10589, 10594로 기탁하였다.

<1-2> 단량체 IgG1 불변영역 발현벡터의 제작

단량체 형태로 발현되는 IgG1 불변영역을 제조하기 위해 서열번호 11 및 2의 프라이머 쌍을 사용하여 실시예 <1-1>에서 사용한 동일한 주형으로 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자 조각을 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 발현벡터 pmSTII에 삽입하여 pSTIIG1Mo(서열번호 11 및 2의 PCR 산물)를 제작하였으며, 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/pSTIIG1Mo(HM10930)을 제조하였고, 이를 한국미생물보존센타(KCCM)에 2004년 9월 15일자로 기탁번호 KCCM-10595로 기탁하였다. 상기 발현벡터에 의해 발현되는 단백질은 이량체 형성을 가능케 하는 시스테인 잔기를 함유하는 힌지영역이 제거되었기 때문에 CH2 도메인부터 발현되어 단량체로 존재하게 되고, 서열번호 27 으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는다.

<실시예 2> 인간 면역글로불린 IgG2 Fc 발현벡터의 제작

IgG2의 Fc 유전자를 클로닝하기 위해 상기 실시예<1-1>에서 수행한 방법과 동일하게 인간의 혈액에서 수득한 혈구 세포의 RNA를 주형으로 하여 One-Step RT-PCR 키트(Qiagen사)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 이때 상기 유전자 서열을 수득하기 위해 서열번호 31과 서열번호 32로 기재되는 프라이머 쌍을 사용하였다. 서열번호 31은 12개 아미노산 서열(Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro; 서열번호 33)로 구성된 힌지영역 단백질 서열중 10번째 아미노산 서열인 프롤린으로부터 시작되는 서열로서, 서열번호: 31 및 32의 프라이머 쌍으로 증폭된 유전자는 전체 IgG2 Fc 유전자 서열 중 힌지영역의 프롤린-시스테인-프롤린으로 시작되는 아미노 말단과 CH2, CH3 도메인으로 구성되며 서열번호 35의 유전자 서열을 갖는다. 상기에서 증폭된 IgG2 Fc 유전자 서열을 대장균 시그널 서열을 이용한 발현벡터에 클로닝하기 위해, 앞서 기술한 pmSTII 벡터를 사용하였다. 상기 실시예 <1-1>에서 수행한 클로닝 과정과 유사한 방법으로, 플라

스미드 pmST II를 StuI/BamHI 제한효소로 처리한 후 아가로즈 겔에 전기영동을 수행하여 대장균 열안정성 엔테로톡신 시그널 서열 유도체를 포함하는 큰 단편(4.7 kb)을 회수하였다. 상기에서 증폭된 IgG2 Fc 유전자를 BamHI 제한효소로 처리한 후 상기에서 회수된 발현벡터 단편에 삽입하여 pSTIIdCG2Fc를 제작하였다. 이렇게 제작된 발현벡터를 통해 발현되는 산물은 숙주세포에서 발현시 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖으며, 힌지영역의 시스테인 잔기에 의해 이황화 결합에 의한 이량체를 형성할 수 있다. 각기 제작된 발현벡터를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/pSTIIdCG2Fc(HM10936)을 제조하였다.

<실시예 3> 인간 면역글로불린 IgG4 불변영역 발현벡터의 제작

<3-1> 이량체 IgG4 불변영역 발현벡터의 제작

인간 면역글로불린 IgG4의 중쇄 불변영역을 클로닝하기 위해, IgG1 중쇄 불변영역이 삽입되어 있는 실시예 <1-1>의 플라스미드 pBG1CH1-3을 주형으로 특정 부위 치환 돌연변이법을 수행하여 IgG4의 CH1-힌지-CH2-CH3 유전자가 삽입된 플라스미드 pBG4CH1-3을 제작하였다. 염기서열 분석 결과, 돌연변이를 일으킨 DNA 서열은 IgG1의 불변영역이 IgG4의 불변영역으로 치환되어 있고, 서열번호 15로 기재되는 염기서열을 가짐을 확인하였다. 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 PCR 증폭을 위한 프라이머 서열만을 달리하여 플라스미드 pBG4CH1-3을 주형으로 유전자를 증폭하였다. IgG4 불변영역의 5'-말단에서 이황화 결합에 참여하지 않은 시스테인을 제거하기 위해 플라스미드 pBG4CH1-3을 주형으로 하고 서열번호 16 및 17의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 서열번호 16은 IgG4 힌지영역의 12개(Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro, 서열번호 28, 아미노산 서열중 10번째 아미노산 서열인 세린으로부터 시작되는 서열이고, 서열번호 17은 종결코돈을 포함하는 BamHI 제한효소 인식부위를 삽입한 것이다. 상기 프라이머 쌍으로 증폭된 유전자는 전체 IgG4 불변영역 중 힌지영역에서 세린-시스테인-프롤린으로 시작되는 아미노 말단과 CH2 및 CH3 도메인으로 구성된다. 상기에서 증폭된 유전자를 BamHI 제한효소로 처리한 후 플라스미드 pmST II를 StuI/BamHI 제한효소로 처리하여 얻은 큰 단편에 삽입하여 pSTIIdCG4Fc를 제작하였다. 이 벡터에 의해 발현되는 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 가지며 힌지영역의 시스테인 잔기에 의해 이황화 결합에 의해 이량체로 존재하게 된다. 또한, CH1 도메인(CH1-힌지-CH2-CH3)을 포함하는 불변영역 발현벡터를 제작하기 위해 서열번호 19 및 17을 사용하여 pBG4CH1-3을 주형으로 PCR을 수행한 후 동일한 방법으로 클로닝하여 플라스미드 pSTIIG4CH1_3을 제작하였다. 이 벡터에 의해 발현되는 단백질은 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는다.

또한, 면역글로불린 중쇄 불변영역과 경쇄 불변영역을 동시에 발현하는 벡터는 다음과 같이 제작되었다. 먼저, 실시예<1-1>에서 제작된 플라스미드 pBK를 주형으로 서열번호 20 및 4을 사용하여 유전자를 증폭한 후 대장균 열안정성 엔테로톡신 시그널 서열 유도체를 포함하는 벡터 pmST II에 클로닝하여 플라스미드 pSTIIK를 제작하였다. 플라스미드 pSTIIK는 경쇄 카파 쇄의 불변영역이 대장균 열안정성 엔테로톡신 시그널 서열 유도체와 연결되어 있는 유전자 절편을 포함한다. 플라스미드 pSTIIK를 제한효소 HindIII와 SalI으로 절단하여 프로모터와 시그널 서열 등 단백질 발현에 필요한 유전자 서열이 삽입된 약 1.2 kb의 유전자 절편을 수득한 후, 상기에서 제작된 pSTIIG4CH1_3 벡터의 NruI 제한효소 자리에 삽입하여 pSTIIG4H_K 벡터를 제작하였다. 상기 발현벡터는 각각 다른 프로모터에 의해 중쇄 불변영역과 경쇄 불변영역을 발현시키며 발현된 산물은 각 쇄에 존재하는 자유 시스테인에 의해 이량체 혹은 사량체를 형성한다. 상기에서 제작된 발현벡터 각각을 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/pSTIIG4CH1_3(HM10931), BL21/pSTIIdCG4Fc (HM10932) 및 BL21/pSTIIG4H_K(HM10934)를 제조하였고, 9월 15일자로 기탁하였다. (기탁번호: KCCM-10596, 10597, 10599)

<3-2> 단량체 IgG4 불변영역 발현벡터의 제작

단량체로 발현되는 IgG4 불변영역을 클로닝하기 위해, 서열번호 18 및 17을 사용하여 상기 <3-1>과 동일한 방법으로 IgG4 CH2-3 유전자를 증폭 후, 동일한 발현벡터 pmSTII?에 클로닝하여 플라스미드 pSTIIG4Mo를 제작하였다. 상기 발현벡터를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/pSTIIG4Mo(HM10933)를 제조하였고, 이를 한국 미생물보존센타(KCCM)에 2004년 9월 15일자로 기탁번호: KCCM-10598로 기탁하였다. 상기 발현벡터에 의해 발현되는 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 가지며 힌지영역이 없기 때문에 CH2 도메인부터 발현되어 단량체로 존재하게 된다.

본 발명의 바람직한 실시예에서 대장균 열안정성 엔테로톡신 II 시그널 서열 유도체를 이용하여 면역글로불린 불변영역을 대장균에서 수용성 형태로 발현할 수 있는 재조합 발현벡터 및 상기 발현벡터가 형질전환된 미생물을 정리하면 하기 표 1과 같다.

[표 1]

발현벡터	형질전환체	발현 단백질의 구성
pSTIIIdCG1Fc	BL21/pSTIIIdCG1Fc(HM10927)	G1 Fc(서열번호 26의 힌지영역 12개 아미노산 결실)
pSTIIIdCG1SFC	BL21/pSTIIIdCG1SFC(HM10928)	G1 Fc(서열번호 26의 힌지영역 12개 아미노산 결실-첫번째 아미노산 ser ine으로 치환)
pSTIIIdCG1SFFC	BL21/pSTIIIdCG1SFFC(HM10929)	G1 Fc(서열번호 26의 힌지영역 12개 아미노산 결실-첫번째 , 234 아미노산 ser , phe으로 치환)
pSTIIG1Mo	BL21/pSTIIG1Mo(HM10930)	G1 Fc(서열번호 26의 힌지영역 15개 아미노산 결실)
pSTIIIdCG2Fc	BL21/pSTIIIdCG2Fc(HM10936)	G2 Fc(서열번호 33의 힌지영역 9개 아미노산 결실)
pSTIIG4CH1_3	BL21/pSTIIG4CH1_3(HM10931)	G4 CH1-hinge-CH2-CH3
pSTIIIdCG4Fc	BL21/pSTIIIdCG4Fc(HM10932)	G4 Fc(서열번호 28의 힌지영역 9개 아미노산 결실)
pSTIIG4Mo	BL21/pSTIIG4Mo(HM10933)	G4 Fc(서열번호 28의 힌지영역 12개 아미노산 결실)
pSTIIG4H_K	BL21/pSTIIG4H_K(HM10934)	G4 CH1-hinge(서열번호 28-CH2-CH3와 경쇄 불변영역
pSTIIG1CH1_3	BL21/pSTIIG1CH1_3(HM10935)	G1 CH1-hinge(서열번호 26)-CH2-CH3

<실시예 4> 면역글로불린 불변영역의 발현 및 정제

<4-1> 발현 및 정제

상기 실시예 1, 2 및 3에서 수득한 미생물 형질전환체들을 발효기(Marubishi사)에 접종하여 발효시킨 후 면역글로불린 불변영역 단편의 발현유무를 확인하였다.

먼저, LB 배지 100 mL에 상기 형질전환체들을 각각 밤새 진탕 배양한 후 발효기에 접종하여 본 배양을 진행하였다. 발효기의 온도는 35°C 혹은 30°C를 유지하였으며, 혼기성 상태로 가는 것을 방지하기 위해 공기를 20 vvm으로 투입하면서 500 rpm으로 교반하였다. 발효가 진행됨에 따라 미생물의 성장을 위해 부족한 에너지원은 포도당(glucose)과 효모 추출액(yeast extract)을 미생물의 발효 상태에 따라 투여하였고, 흡광도 600 nm에서 OD값이 80이 되는 시기에 유도물질(inducer)인 IPTG를 투여하여 발현을 유도하였다. 이를 40 내지 45시간 동안 배양하여 흡광도 600 nm에서 OD값이 100 내지 120이 되도록 고농도로 배양하였다.

상기에서 대장균 형질전환체로부터 면역글로불린 Fc의 발현 유무, 발현 장소, 수용성 여부 및 이량체 형성 유무를 확인하기 위하여 아래와 같은 시험을 실시하였다. 발현 산물이 상기 발현벡터에 융합되어 있는 시그널 서열에 의해 발효액이나 폐리플라스틱 공간으로 발현되는지를 확인하기 위해 발효액을 원심분리하여 세포를 제거한 발효액 용액과 원심분리하여 회수된 세포를 삼투압 충격법(osmotic shock)에 의해 얻어진 폐리플라스틱 공간 용액을 웨스턴 블라팅을 통해 발현 여부를 확인하였으나 그 양은 아주 적었다. 상기 발효액을 울트라-소니케이션 (Misonix사)을 사용하여 파쇄하여 세포 용해액(cell lysate)를 얻고, 그 세포 용해액을 원심분리하여 수용성 물질과 불용성 물질을 분리한 후 수용성 물질을 다음과 같은 방법으로 웨스턴 블라팅을 수행하였다. 상기 수용성 물질을 DTT나 베타-메캅토에탄올과 같은 환원제를 제거한 단백질 점적 베페와 섞은 후 15% SDS-PAGE (Criterion Gel, Bio-Rad)에 전기 영동하였다. 전기 영동이 끝난 젤을 nitro-cellulose 막에 이동시킨 후 HRP가 결합된 항-사람 Fc 항체(sigma)를 이용하여 detect를 수행하였다. 도1에서 보다시피 세포내에서 수용성 상태로 과량이 발현됨을 알 수 있으며, 또한 힌지 영역의 일부가 삽입된 형질전환체로부터 발현된 산물은 이량체를 형성함을 알 수 있다. 도1의 레인 1, 2, 3는 각각 형질전환체 HM10927, HM10932, HM10936에서 발현된 산물이며 레인 4는 동물세포에서 생산된 면역글로불린을 파파인 처리하여 생성된 Fc로써 당이 존재하여 대장균에서 생성된 것보다 크기가 약간 크게 전개되는 것을 알 수 있다.

<4-2> N-말단 서열 확인

상기 실시예에서 세포질 내에서 수용성 이량체 형태로 발현되는 Fc는 시그널 서열이 융합되어 있기 때문에 분비되지 않고 세포질 내에 존재시 시그널 서열의 프라세싱 없이 융합된 채 존재하는지를 확인하기 위해 N-말단 아미노산 서열을 기초과학 지원연구소 서울 분소에 상기 단백질의 N-말단 서열 분석을 의뢰하였으며, 분석할 시료는 하기와 같이 준비하였다.

먼저, PVDF 막 (Bio Rad사)을 메탄올에 약 2-3초간 담구어 활성화시킨 후 차단 완충용액 (170 mM 글리신, 25 mM Tris?HCl (pH 8), 20% 메탄올)에 충분히 적셔주었다. 실시예 <4-1>에서 전개된 비-환원조건의 SDS-PAGE 젤을 상기와

같이 준비된 PVDF 막에 블릿팅 키트 (Hoefer Semi-Dry Transfer unit, Amersham)를 이용하여 1시간 가량 블릿팅을 수행하였다. PVDF 막으로 이동된 단백질을 단백질 염색약인 쿠마시블루 R-250 (Amresco사)으로 잠깐 (3-4 초간) 염색한 후 탈색용액 (물 : 아세트 산 : 메탄올이 5 : 1 : 4)으로 세척하였다. 세척이 끝난 막에서 단백질이 포함되어 있는 부위를 가위로 절단하여 N-말단 서열 분석을 의뢰하였다.

IgG1 Fc 단백질의 서열은 Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly이며 IgG4 Fc 단백질 서열은 Ser-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Phe-Leu-Gly-Gly이다. 또한 IgG2 Fc 단백질 서열은 Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Pro-Val-Ala-Gly-Pro으로 확인되었다. 이상과 같은 아미노산 서열 분석 결과, 본 발명의 대장균 형질전환체로부터 발현되는 Fc 단편들은 정확한 N-말단 서열을 갖는 것으로 확인되었으며, 시그널 서열을 융합시켜 발현시 세포외막이나 폐리플라스틱으로 분비되지 않고 세포질내에 과발현되어도 시그널 서열이 정확히 프라세싱되어 수용성 형태로 존재한다는 새로운 사실을 확인시켜 주었다.

상기에서 대장균 형질전환체로부터 발현된 면역글로불린 불변영역을 확인하기 위하여 면역글로불린 불변영역에 강한 친화성이 있다고 알려진 단백질-A 컬럼(protein-A affinity column)을 사용하여 하기와 같은 방법으로 정제하였다.

원심분리에 의해 발효액으로부터 회수된 대장균 세포를 파쇄하여 세포 용해액(cell lysate)를 얻고, 세포질내에 존재하는 재조합 면역글로불린 불변영역을 2단계 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 정제하였다. 단백질-A 친화 컬럼(Pharmacia사) 5 mL을 PBS로 평형화시킨 후, 세포 용해액을 5 mL/분의 유속으로 부하하였다. 결합하지 않은 분획은 PBS로 세척한 후, 100 mM 시트레이트 용액(pH 3.0)으로 용출하였다. 용출된 분획을 탈염 컬럼(desalting column HiPrep 26/10, Pharmacia사)을 사용하여 10 mM Tris 완충액(pH 8.0)으로 교환하였다. Q HP 26/10 컬럼(Pharmacia사) 50 mL을 사용하여 2차 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피를 실시하였는데, 1차 정제된 재조합 면역글로불린 불변영역 분획을 결합시킨 후 10 mM Tris 완충액(pH 8.0) 조건에서 직선 농도구배(염화나트륨 농도 0 M→0.2 M) 방법으로 흘려 고순도의 분획을 얻을 수 있었다. 각 산물을 단백질-A 컬럼을 통해 부분 정제한 후의 발현양을 하기 표 2에 나타내었다.

[표 2]

플라스미드	형질전환체	단백질-A 정제 후의 발현율(mg/ℓ)
pST11dCG1Fc	HM10927	400
pST11dCG1SFC	HM10928	100
pST11dCG1SFFc	HM10929	600
pST11G1Mo	HM10930	500
pST11dCG2Fc	HM10936	100
pST11G4CH1_3	HM10931	80
pST11dCG4Fc	HM10932	400
pST11G4H_K	HM10934	50
pST11G4Mo	HM10933	600
pST11G1CH1_3	HM10935	80

<4-3> 발현단백질의 확인

상기와 같이 수득된 면역글로불린 불변영역은 중쇄의 이량체 혹은 단량체 형태이기 때문에 환원조건의 SDS-PAGE와 비-환원조건의 SDS-PAGE에서 단백질의 이동양상이 다르게 나타난다. 발현된 산물을 정제한 후 순도를 확인하기 위해 실시한 SDS-PAGE 결과를 도 2 및 3에 나타내었다.

도 2 및 3은 상기와 같이 정제된 이량체 형태와 단량체 형태의 면역글로불린 불변영역 단백질들을 15% 크라이테리온 겔(criterion gel, Bio-Rad사)을 사용하여 비-환원조건의 SDS-PAGE 겔과 환원조건의 SDS-PAGE 겔에 전개시켜 그 이동양상을 비교한 것이다. 도 2의 A는 비-환원조건에서 SDS-PAGE 겔에 전개한 것이고, B는 환원조건에서 SDS-PAGE 겔에 전개한 것이다. 레인 M은 미리 염색된 저-범위 표준 단백질 마커(prestained low-range standard marker, Bio-Rad사)이고, 레인 1 내지 4는 각각 형질전환체 HM10927, HM10928, HM10929 및 HM10932로부터 생산된 면역글로불린 불

변영역 시료이다. 도 2에 나타난 바와 같이, 환원조건의 SDS-PAGE에서는 힌지영역의 시스테인 잔기에 의한 이황화 결합이 환원되어 이들이 각각 단량체로 존재하기 때문에 단량체의 크기만큼 이동한 반면, 비-환원조건의 SDS-PAGE에서는 각각의 단량체가 이황화 결합으로 연결된 이량체 형태로 존재하여 약 42 kDa의 이동거리를 가짐을 확인하였다.

도 3의 A는 비-환원조건에서 SDS-PAGE 겔에 전개한 것이고, B는 환원조건에서 SDS-PAGE 겔에 전개한 것이다. 레인 M은 상기의 표준 단백질 마커이며, 레인 1 및 2는 형질전환체 HM10930 및 HM10934로부터 생산된 면역글로불린 불변영역 시료이다. 도 2에 나타난 바와 같이, 환원과 비-환원조건에서 이동거리는 크게 차이가 없으며 내부 이황화 결합의 환원 유무에 따라 이동거리에 약간의 차이가 있음을 확인하였다.

<실시예 5> 활성효소 면역측정에 의한 C1q 결합능 확인

상기 실시예 4에서 대장균 형질전환체로부터 발현되어 정제된 면역글로불린 불변영역 단백질들이 인간 C1q와 결합하는지 여부를 확인하기 위해, 하기와 같이 활성효소 면역측정 분석법(ELISA)을 수행하였다. 형질전환체 HM10929, HM10930, HM10932 및 HM10933으로부터 생산된 면역글로불린 불변영역 시료와 비교군으로 당이 결합되어 있는 면역글로불린(IVIGG-글로불린 에스, 녹십자 PBM)을 10 mM 카보네이트 완충액(pH 9.6)에 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 준비하였다. 준비된 시료를 96-웰 플레이트(Nunc)에 웰당 200 ng의 양으로 분주한 후 4°C에서 밤새 코팅한 다음, 웰 플레이트를 PBS-T 용액(137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.05% 트윈 20)으로 3번 세척하였다. 소 혈청 알부민을 1%의 농도로 PBS-T 용액에 용해시켜 준비한 차단(blocking) 완충액 250 μl 를 각 웰에 첨가한 후, 상온에서 1시간 동안 방치하고 동일한 PBS-T 용액으로 3번 세척하였다. 표준액과 시료를 적당한 농도로 PBS-T 용액으로 희석한 후 항체가 코팅된 웰에 접적하여 상온에서 1시간 동안 방치시켜 반응시킨 후 다시 PBS-T 용액으로 3번 세척하였다. 차단반응이 완료된 플레이트에 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C1q(R&D systems사)를 첨가한 후 2시간 동안 상온에서 반응시켰으며, 반응이 완료된 플레이트를 상기 PBS-T 용액으로 6번 세척하였다. 인간의 항-인간 C1q 항체-퍼옥시다제 컨쥬게이트(Biogenesis사, 미국)를 차단 완충용액에 1000:1로 희석하여 각 웰에 200 μl 씩 접적한 후 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 각 웰을 PBS-T 용액으로 3번 세척한 후 발색용액 A와 B(칼라-A-안정화 퍼옥시다제 [Color A-Stabilized peroxide] 용액 및 칼라 B-안정화 크로모겐 [Color B-stabilized chromogen] 용액, DY 999, R&D Systems사)를 동량으로 혼합하여 각 웰에 200 μl 씩 첨가하고 30분간 방치하였다. 그 후에 반응 정지용액인 2 M 황산을 50 μl 씩 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 완료된 웰 플레이트는 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device사)를 이용하여 450 nm 파장에서 표준액과 검액의 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따라 대장균에서 생산된 면역글로불린 불변영역 단백질들은 당이 있는 것에 비해 현저히 저하된 C1q에 대한 결합능을 나타내기 때문에, 생리활성 폴리펩타이드와의 결합단백질 형성시 캐리어로 사용되어 인체에 투여되는 경우에도 세포독성, 염증 등의 면역반응을 유발할 위험성이 매우 낮음을 알 수 있다.

<실시예 6> 인간 적혈구 생성 촉진인자 결합체 제조 및 약물동력학

<6-1> 인간 적혈구 생성 촉진인자의 제조

인간 적혈구 생성 촉진인자(Erythropoietin; EPO)의 결합체를 제조하기 위해, 우선 EPO 유전자를 혈액으로부터 RT-PCR로 얻은 후, pBluescript II(Stratagen사) 벡터에 클로닝하여 pBlueEP 벡터를 제작하였다. EPO 유전자를 동물세포 발현 벡터인 pCMV/dhfr-로 옮기기 위해 상기 벡터 pBlueEP를 HindIII와 BamHI 제한효소로 절단하여 EPO 유전자를 포함하는 절편을 얻은 후 동일한 제한효소로 처리된 상기 동물세포 발현벡터에 삽입하여 pcmvEP를 제작하였다. EPO 유전자가 삽입된 발현벡터를 리포펙타민(Lipofectamine, Gibco사)을 이용하여 단백질 발현 세포주인 CHO 세포주에 형질감염시키고, 발현 양을 증가시키기 위해 MTX의 농도를 120 nM까지 단계적으로 올려 1당 100 mg 이상의 EPO 발현을 확인하였다.

<6-2> 인간 적혈구 생성인자-PEG 연결체의 제조

양쪽 말단에 알데히드 반응기를 가진 분자량 3.4 kDa의 폴리에틸렌 글리콜인 ALD-PEG-ALD(Shearwater사)를 상기에서 생산된 EPO가 5 mg/mL 농도로 용해된 100 mM 인산염 완충액에 EPO:PEG의 몰비가 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 및 1:20이 되도록 첨가하였다. 여기에 환원제인 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH3, Sigma사)를 최종 농도 20 mM이 되도록 첨가하고, 4°C에서 천천히 교반하면서 2시간 동안 반응시켰다. EPO의 아미노 말단부위에 선택적으로 PEG가 연결되고, PEG와 인터페론 알파가 1:1로 결합된 연결체를 얻기 위하여 상기 반응 혼합물을 가지고 슈퍼덱스(SuperdexR, Pharmacia사) 크기 배제(size exclusion) 크로마토그래피를 실시하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충액

(pH 6.0)을 사용하여 EPO-PEG 연결체를 정제하였고, PEG와 결합하지 않은 EPO, 미반응 PEG 및 2개의 EPO가 PEG와 연결된 이량체 부산물을 제거하였다. 정제된 EPO-PEG 연결체를 5 mg/ml 농도로 농축하였다. 이로부터 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 EPO:PEG의 최적 반응 몰비는 1:2.5 내지 1:5임을 확인하였다.

<6-3> 인간 적혈구 생성인자-PEG 연결체와 재조합 면역글로불린 불변영역의 결합체 제조

상기 실시예 <6-2>에서 제조한 EPO-PEG 연결체와 실시예 <4-3>에서 HM10929 형질전환체에서 생산한 면역글로불린 불변영역을 결합시켰다. 구체적으로, 실시예<4-3>에서 준비된 면역글로불린 불변영역 단편(약 53 kDa)을 10 mM 인산염 완충액에 용해시킨 후, EPO-PEG 연결체:불변영역 단편의 몰비가 각각 1:1, 1:2, 1:4 및 1:8이 되도록 EPO-PEG 연결체와 혼합하여 반응시켰다. 반응액을 100 mM 인산염 완충액 상태로 만들었고, 환원제로서 NaCNBH3를 최종 농도가 20 mM이 되도록 첨가한 후 4°C에서 20시간 동안 천천히 교반하면서 반응시켰다. 이로부터 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 EPO-PEG 연결체:불변영역 단편의 최적 반응 몰비는 1:2임을 확인하였다.

결합반응 후 미반응 물질 및 부산물을 제거하고 생성된 EPO-PEG-면역글로불린 불변영역 단백질 결합체를 정제하기 위하여, 고압 액체 크로마토그래피를 실시하였다. 커플링 반응액을 탈염 컬럼 HiPrep 26/10(Pharmacia사)을 사용하여 10 mM Tris 완충액(pH 8.0)으로 교환한 다음 Q HP 26/10 컬럼(Pharmacia사) 50 ml에 8 ml/분의 유속으로 부하하여 결합시킨 후, 직선 농도구배(염화나트륨 농도 0 M→0.2 M) 방법으로 원하는 분획을 얻었다. 용출된 분획을 10 mM 아세트산 완충액(pH 5.2)으로 평형화된 polyCAT 21.5×250 컬럼(polyLC사)에 15 ml/분의 유속으로 다시 결합시킨 후 직선 농도구배(염화나트륨 농도 0.1 M→0.3 M) 방법으로 용출하여 고순도의 분획을 얻을 수 있었다.

<6-4> 약물동력학

각 군당 5마리의 SD 랫(Rat)에 상기 실시예 <5-1>에서 얻은 천연형 EPO와 시알리산 양을 늘려 반감기를 증가시킨 아라네스프(Aranesp, Amgen사), 그리고 상기 실시예 <5-3>에서 제조한 EPO-PEG-Fc 결합체(시험군)를 100 µg/kg이 되도록 피하주사하였다. 대조군은 주사 후 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 및 48시간 후에 채혈하였고, 시험군은 주사 후 1, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240, 288, 336 및 384시간 후에 채혈하였다. 혈액시료는 1.5 ml 튜브에 모아서 응고시킨 후 에펜도르프 고속 마이크로 원심분리기에서 10분간 원심분리하여 혈구 세포를 제거하였다. 혈청 내 단백질의 양은 EPO에 대한 항체를 이용한 ELISA 방법으로 측정하였다.

표 3 및 도 5는 각 천연형 단백질과 결합단백질의 혈중 반감기를 나타낸 것으로, 본 발명에 따라 생산된 면역글로불린 불변영역을 캐리어로 사용하여 제조된 결합단백질 EPO-PEG-Fc(E.coli) 결합체가 EPO(천연형 EPO)에 비해 월등하게 증가된 혈중 반감기를 나타내었고, 이는 증가된 혈중 반감기를 나타내는 고당쇄화 EPO(Hyperglycosylated EPO, 아라네스프) 보다도 우수한 것으로 확인되었다.

[표 3]

시료	EPO	EPO-PEG-Fc 결합체	고당쇄화 EPO
Cmax1(ng/ml)	103.9	411.6	305.0
Tmax2(hr)	12.0	48.0	12.0
T1/2(3 hr)	6.1	66.7	11.6
AUC4(ng.hr/ml)	2310.5	65203	12117
MRT5(hr)	14.5	118.2	30.3

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 방법에 따라 대장균 시그널 서열을 이용하여 수용성 형태로 면역글로불린 불변영역을 대량으로 생산할 수 있으며, 생산된 면역글로불린 불변영역은 생리활성 펩타이드에 결합되어 면역반응을 유발할 위험성 없이 생리활성 폴리펩타이드의 혈중 반감기를 증가시키고 생리활성을 개선시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 대장균 형질전환체로부터 발현된 면역글로불린 Fc 영역들을 웨스턴 블라팅으로 분석한 결과이다.

도 2는 대장균 형질전환체로부터 발현된 이량체 면역글로불린 Fc 영역들을 비-환원조건과 환원조건의 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

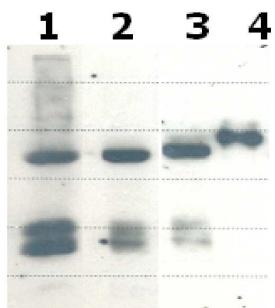
도 3은 대장균 형질전환체로부터 발현된 단량체 면역글로불린 Fc 영역들을 비-환원조건과 환원조건의 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도 4는 대장균 형질전환체로부터 발현된 면역글로불린 Fc 영역들과 천연형 면역글로불린의 활성 효소 면역측정에 의한 C1q 결합능을 분석한 결과이다.

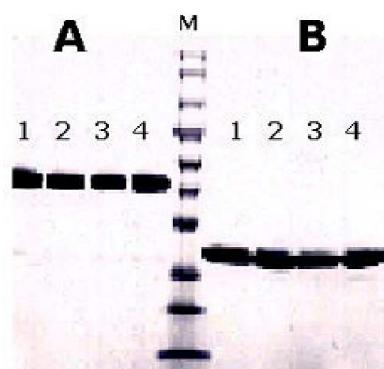
도5는 천연형 EPO, Aranesp, EPO-PEG-대장균 유래 Fc 결합체의 약물동력학을 분석한 그래프이다.

도면

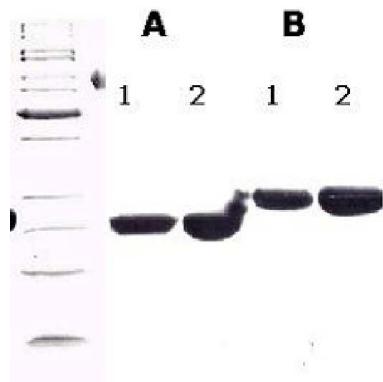
도면1



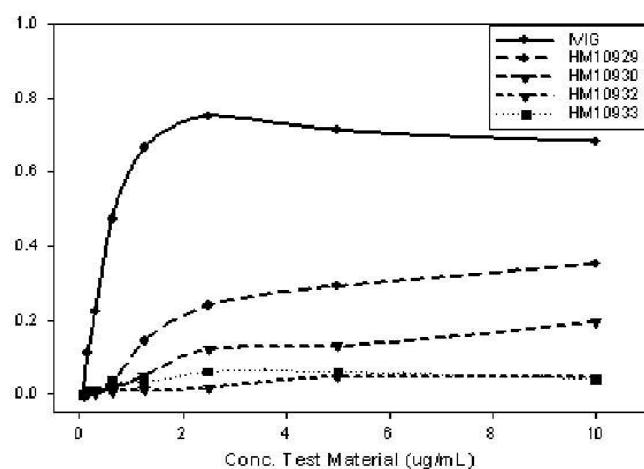
도면2



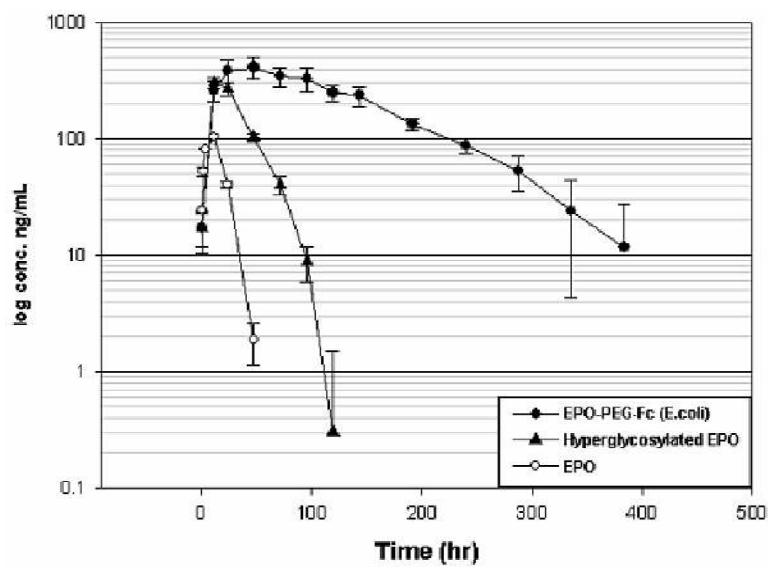
도면3



도면4



도면5



서열목록

서열목록 전자파일 첨부