



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0052796
(43) 공개일자 2016년05월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/22 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 1/22 (2013.01)
C12N 15/11 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7011183(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년08월13일
심사청구일자 2016년04월27일
- (62) 원출원 특허 10-2010-7003280
원출원일자(국제) 2008년08월13일
심사청구일자 2013년08월06일
- (85) 번역문제출일자 2016년04월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/FR2008/051495
- (87) 국제공개번호 WO 2009/024726
국제공개일자 2009년02월26일
- (30) 우선권주장
0757072 2007년08월14일 프랑스(FR)

- (71) 출원인
라보라토이레 프란카이즈 듀 프락티온네먼트 에트
데스 바이오테크놀로지스
프랑스, 레스 올리스 에프-91940, 자 데 퀴타보에
프, 에비뉴 데스 트로피퀘스 3
- (72) 발명자
시레, 로랑
프랑스, 에프-91700 빌리에 쉬르 오르쥬, 뤼 알베
르 휘일레 33
쉬뚜르, 아드사따
프랑스, 에프-78990 엘랑꾸르, 에비뉴 뒤 사또 20
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인세신

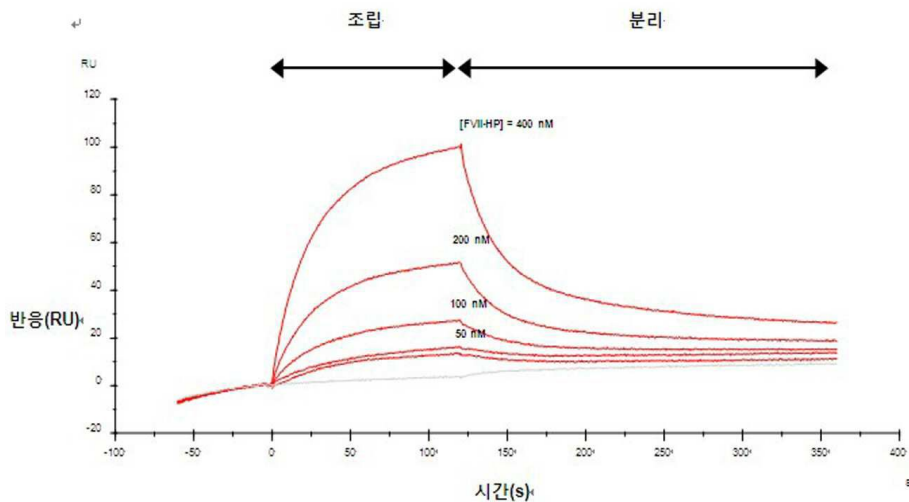
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 목적 단백질을 정제 또는 검출하는 방법

(57) 요약

본 발명은 용액에 존재하는 목적 단백질을 정제 또는 검출하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 사실상 검출 또는 정제 단계를 수행하기 전에, 상기 용액을 상기 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 아프타머에 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기에서 상기 아프타머는 상기 용액에 또한 존재할 수도 있는 상기 목적 단백질과 상동의 단백질과는 결합하지 않는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/6437 (2013.01)

C12Y 304/21021 (2013.01)

G01N 33/68 (2013.01)

G01N 2333/755 (2013.01)

G01N 2333/974 (2013.01)

(72) 발명자

다노, 프레데릭

프랑스, 에프-91870 브라씨 르 쉐, 르 로뜨와, 뒤
드 두르당 4

베레, 제랄

프랑스, 에프-94600 초이시 르 로이, 알레 알쥐 가
브리엘 4

명세서

청구범위

청구항 1

검출 또는 정제 단계를 수행하기 전에, 하기 단계를 수행하는 것을 포함하는, 용액에 존재하는 목적 단백질을 정제하거나 검출하는 방법:

상기 용액을 스페이스(spacer)를 통해 고정 지지체에 고정된 DNA 아프타머와 접촉하는 단계, 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질과 특이적으로 결합하지만, 상기 용액에 존재할 수도 있는 상기 목적 단백질과 상동의 어떤 단백질과도 결합하지 않는 것임.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 목적 단백질은 상기 상동 단백질과 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 더 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 목적 단백질은 상기 상동 단백질과 당화 상동성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 목적 단백질은 인자 VII (FVII), 인자 VIII (FVIII), 인자 X (FX), 인자 IX (Factor IX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 인자 XIII (FXIII), 인자 II (THROMBIN), 안티트롬빈 III (AT III), 헤파린 공인자 II(HCII), 단백질 C (PC), 트롬보모듈린 (TM), 단백질 S (PS), 인자 V (FV), 폰 빌리블란트 인자 (FvW) 및 조직 인자 경로 저해제 (TFPI)로부터 선택되는 응고 인자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 목적 단백질은 인간 인자 VII 또는 토끼 인자 VII인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 상동 단백질은 토끼 인자 VII 또는 인간 인자 VII인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5항 또는 제 6항에 있어서, 상기 아프타머는 서열번호 제 1과 적어도 80%의 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정 지지체는 칩, 친화성 크로마토그래피 컬럼, 자성 또는 파라-자성 비드 및 막으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스페이스는 비특이적인 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 타입의 서열로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액은 체액이며, 특히 젖, 젖-유래 산물, 혈액 또는 혈액

유래산물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 용액은 유전자 이식 포유동물의 젖 또는 유전자 이식 포유동물의 젖-유래 산물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

목적 단백질을 함유하며 상기 목적 단백질과 상동적인 단백질을 함유할 수도 있는 용액으로부터, 하기 단계를 포함하는, 상기 목적 단백질을 특이적으로 정제하는 방법:

- a) 스페이서를 통해 고행 지지체 상에 고정된 DNA 아프타머를 포함하는 고행 지지체를 제공하는 단계, 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질에 특이적으로 결합하지만 상기 목적 단백질과 상동의 단백질과는 결합하지 않는 것을 특징으로 함,
- b) 상기 고행 지지체를 상기 용액에 접촉시키는 단계, 및
- c) 상기 아프타머에 결합된 목적 단백질을 회수하는 단계.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 목적 단백질은 상기 상동 단백질과 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 더 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 12항 또는 제 13항에 있어서, 상기 목적 단백질은 인자 VII (FVII), 인자 VIII (FVIII), 인자 X (FX), 인자 IX (인자 IX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 인자 XIII (FXIII), 인자 II (THROMBIN), 항트롬빈 III (AT III), 헤파린 공인자 II (HCII), 단백질 C (PC), 트롬보모듈린 (TM), 단백질 S (PS), 인자 V (FV), 폰 빌리브란트 인자 (FvW) 및 조직 인자 경로 저해제 (TFPI)로부터 선택된 응고 인자, 바람직하게는 인간 인자 VII 또는 토끼 인자 VII인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 아프타머는 서열번호 제 1에 대해 적어도 80% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 12항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고행 지지체는 칩, 크로마토그래피 컬럼, 자성 또는 파라자성 비드 및 막으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 12항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스페이서는 비특이적인 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 타입의 서열로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 12항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액은 체액이며, 특히 젖, 젖-유래 산물, 혈액 또는 혈액 유래 산물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 젖은 유전자 이식 포유동물의 젖 또는 유전자 이식 포유동물의 젖-유래 산물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

목적 단백질을 함유하며 상기 목적 단백질과 상동의 단백질을 함유할 수도 있는 용액으로부터, 하기 단계를 포함하는, 상기 목적 단백질을 특이적으로 검출하는 방법:

- a) 상기 용액을 스페이서를 통해 고정 지지체 상에 고정된 DNA 아프타머와 접촉시키는 단계, 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질에 특이적으로 결합하지만 상기 목적 단백질과 상동의 단백질과는 결합하지 않는 것을 특징으로 함,
- b) 상기 아프타머와 상기 목적 단백질 간에 형성된 복합체를 검출하는 단계

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 목적 단백질은 상기 상동 단백질과 50%이상, 바람직하게는 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 더 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 20항 또는 제21항에 있어서, 상기 목적 단백질은 인자 VII (FVII), 인자 VIII (FVIII), 인자 X (FX), 인자 IX (인자 IX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 인자 XIII (FXIII), 인자 II (트롬빈), 항트롬빈 III (AT III), 헤파린 공인자 II (HCII), 단백질 C (PC), 트롬보모듈린(TM), 단백질 S (PS), 인자 V (FV), 폰 빌리브란트 인자 (FvW) 및 조직 인자 경로 저해제 (TFPI)로부터 선택된 응고 인자, 바람직하게는 인간 인자 VII 또는 토끼 인자 VII인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 아프타머는 서열번호 제 1에 대해 적어도 80% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 20항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정 지지체는 칩, 크로마토그래피 컬럼, 자성 또는 파라자성 비드 및 막으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 20항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스페이서는 비특이적인 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 타입의 서열로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 20항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액은 체액이며, 특히 젖, 젖-유래 산물, 혈액 또는 혈액 유래 산물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 26항에 있어서, 상기 젖은 유전자 이식 포유동물의 젖 또는 유전자 이식 포유동물의 젖-유래 산물인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질들의 정제 및 검출 분야에 관한 것이다. 본 발명은 특히 배지에서, 특히, 용액에서 목적 단백질을 특이적으로 정제 또는 검출하기 위한 아프타머의 용도에 관한 것으로, 상기 용액은 또한 목적하는 단백질과 상동의 단백질을 포함할 수 있다.

배경 기술

[0002] 목적하는 단백질("목적 단백질"로 언급되기도 함)을 정제 및 검출하기 위한 방법은, 일반적으로 목적하는 단백질을 함유하는 테스트된 배지를, 상기 목적하는 단백질에 결합할 수 있는 화합물과 접촉시키는 단계를

포함한다. 목적 단백질에 결합할 수 있는 이러한 화합물들은 다양한 성질을 가질 것이다. 이들은 (i) 단백질에 결합하는 성질들을 가진 화학 그룹들(DEAE, 제 4가 암모늄, 알킬 사슬, 실라놀 등)을 포함하는 유기 화합물들, (ii) 또는 단백질들 (항체 등), 글리코사미노글리칸 (헤파린), 염색제 (시바크론 블루 F3GA) 또는 핵산들 (아프타머 등) 중의 어느 하나일 수 있다.

- [0003] 다른 화합물 중에서 목적 단백질을 정제 또는 검출하는 방법의 효능성은 목적 단백질에 결합하는 화합물의 친화성 및 특이성에 의존한다.
- [0004] 복합 조성을 갖는 일부 개시 배지-특히 다른 많은 단백질들을 포함하는 개시 용액에 대해, 목적하는 목적 단백질을 정제 및 검출하는 것은 어렵다. 특히 복합 개시 배지의 경우로, 여기에서 정제 또는 검출할 목적 단백질은 하나 또는 그 이상의 단백질들과 공존하며, 이들 단백질들은 다르지만 서로 매우 상동적인 것이었다. 실제로, 목적 단백질이 이 목적 단백질과 상동인 하나 또는 그 이상의 단백질과 함께 용액에 존재할 때는, 전통적인 정제 또는 검출방법에 의해 목적하는 목적 단백질과 원하지 않는 상동 단백질(들) 사이의 높은 구별 수준이 구축된 정제 튜 또는 검출 튜들을 개발하는 것이 어렵다. 심지어 목적 단백질들과 높은 특이성이 있다고 알려진 항체들은 때때로, 목적 단백질과 구조 상동성을 갖는 많은 단백질들과 교차 반응성을 일으킨다.
- [0005] 서로 상동의 단백질들을 특이적으로 정제 또는 검출하는 어려움은, 목적 단백질과 잠재적으로 상동인 어떤 기타 단백질에 상관없이 목적 단백질을 특이적으로 연구하는데 목표로 하는 대학 연구 분야에서 또는 예를 들어 새롭고 더 효과적인 정제 또는 검출 튜들을 개발하기 위한 산업 분야에서, 및 공지된 정제 및 검출 튜를 비교하여 조절 및 관리 요구에 향상된 호환성을 갖는 많은 응용 분야에서 결점이 된다.
- [0006] 서로 상동인 단백질들을 특이적으로 정제 또는 검출하는 어려움은, 단백질(여기에서 단백질은 유전자 이식 단백질을 의미함)이 유전자 이식 생물체 또는 유전자 이식 미생물에서 재조합 형태로 제조될 때 발생하며, 상기 유전자 이식 생물체 및 미생물체는 또한 상기 유전자 이식 단백질과 상동인 단백질을 자연적으로 발현한다. 특히 내재적으로 그의 게놈 내에, 유전자 이식에 의해 암호화된 재조합 단백질과 높은 상동의 단백질을 암호화하는 "이종상동성(orthologous)" 이라 불리는 유전자를 가지는 생물체들에서 획득된 재조합 단백질들을 포함하였다.
- [0007] 유전자 이식 동물에서 자연적으로 발현되는 내재성 단백질과 상동인 유전자 이식 동물에서 발현되는 인간 또는 동물의 유전자 이식 단백질이 일반적이다. 유전자 이식 단백질과 자연적이고 내재적인 상동 단백질의 공-추출 또는 공-검출이 회피되어야 할 상황에서 자연적 및 내재성의 단백질의 생산은 기술적으로 문제가 있다.
- [0008] 유전자 이식 재조합 단백질이 의약품의 제조에 사용되는 치료학적 목적의 단백질일 때, 정제된 재조합 단백질의 제조에 있어, 유전자 이식 단백질과 상동의 임의의 내재성 단백질의 존재는, 의학 치료의 효능성을 손상시키고 일부의 경우 심지어 환자의 건강에 강력한 해를 끼치는 자가면역반응을 일으키는 자연성 단백질의 오염에 의한 원치 않는 면역반응의 유도를 포함하는, 의약품이 투여되는 환자에게 원치 않는 부정적인 효과를 일으킬 수 있다. 유전자 이식 동물에서 생산된 치료학적 유전자 이식 단백질의 사용이 증가되기 때문에, 이러한 어려움들은 더욱더 빈번하게 발생한다. 활용가능한 높은 안전성의 치료학적 생산물을 제조하기 위해, 유전자 이식 단백질들은 결국 원치 않는 상동의 단백질이 극소량으로 존재하도록, 그리고 가능하다면 원치 않는 상동의 단백질이 완전히 없도록 특이적으로 정제되어야 한다. 실제로, 목적하는 목적 단백질을 검출하는 방법은 특이적이고, 민감하고 및 효과적이어야 한다.
- [0009] SELEX로 알려진 방법에 따라 선택된 RNA 타입의 단일 나선의 리보핵산분자의 아프타머들은, 목적하는 단백질과 특이적으로 결합할 수 있다. Liu 등의 문헌에서(Liu et. al., *RNA aptamers specific for bovine thrombin*, J. Mol. Recognit., 2003:16, 23-27), 저자는 소의 트롬빈과는 결합하지만 인간의 트롬빈과는 결합하지 않는 RNA 타입의 아프타머를 개시한다. 비록 분리되었긴 하지만, 이 문헌은, SELEX 방법을 통하여 용액내의 상동 단백질과 구별할 수 있는 높은 특이성의 RNA 아프타머들을 선별하는 것이 가능함을 개시한다.
- [0010] 그러나, 상동의 단백질들을 구별하는 높은 특이성의 아프타머들을 이용한 산업적인 처리방법은 현재까지 문헌에 개시되어 있지 않았다.
- [0011] 높은 특이성의 아프타머들을 이용하는 것은 많은 기술적 문제들을 야기한다. 우선, 아프타머들은 SELEX 방법을 통해 용액에서 선별되었다. 정제 또는 검출 방법에 적합하게 사용하기 위하여, 아프타머는 고정 지지체 상에 고정되어야 한다. 그러나, 많은 개시물들은 아프타머가 고정될 때 아프타머의 결합성(친화성, 특이성 등)들이 제 기능을 못하였다고 개시한다. 게다가, 종래 기술에서 기술되어 왔던 단지 매우 높은 특이성의 아프타머 타입인 RNA 타입의 아프타머들은 실온에서의 변성이 되는 매우 불안정한 분자였다. 따라서, RNA 아프타머들은 산업적인 정제 또는 검출 처리 과정과 호환되지 않았다. 화학적으로 변형된 RNA가 대체가능한 것으로 보이지만, 이러한

분자의 현재 합성 비용은 산업적인 스케일로 적용이 확실히 호환불가능하였다.

[0012] 목적하는 단백질들에 대한 그들의 강한 친화성과 상대적으로 높은 그들의 특이성 때문에, 항체들은 단백질 정제 및 검출 방법에 폭넓게 사용되었다.

[0013] 그러나, 항체들을 사용하는 것이 목적 단백질의 정제나 검출에 항상 적합한 것은 아니다. 실제로, 항체들이 독소원들을 통한 오염 위험을, 또는 조작된 항체들을 정제하는 문제점을 포함하는, 모두 내재적인 단점을 갖는 생물학적인 시스템에서 제조되었다. 게다가, 항체들은 대개 면역원성이었으며, 환자에게 투여되었을 때 강한 면역 반응을 유도할 수 있다. 따라서, 항체가 치료학적 단백질의 정제용으로 사용되었을 때, 치료학적 단백질-항체 용액에 항체들 또는 항체 단편들이 남아있는 위험이 있게 되며, 따라서 이러한 용액이 환자에 투여되었을 때 원치 않는 반응을 야기한다. 정제 방법에서 항체를 사용하는 것이 왜 일부 투여 조건- 특히 농산물식량 산업 (agri-food) 및 의약학적 산업들에 있어서의 투여 조건-과 호환하기 어려운지에 대한 이유이다. 게다가 그들의 민감한 단백질 성질 때문에, 특히, (i) 변성 조건들(예를 들어 우레아, DMSO 등의 존재에서) 하에서, (ii) 높은 산성 또는 염기성의 pH 값으로, (iii) 일부 유해한 유기용매로 또는 (iv) 높은 온도 하로 살균 수단이 한정된 조건에서 항체들을 첨가하여야 한다. 마지막으로, 여기에서, 항체를 선별하는 것은 장기간이 소요되는 과정(약 6 개월)이며, 정제된 항체를 획득하는 것은 상대적으로 높은 선별 및 제조 비용을 포함하는 복잡한 일임을 깨닫는다.

[0014] 따라서, 종래의 방법과 비교하여, 목적하는 단백질들에 대하여 효과적이고, 쉽게 시행가능하고 더 믿을만한 새로운 정제 툴 또는 검출 툴을 개발할 필요성이 있다. 이러한 향상된 방법들은, 용액내에 목적 단백질과 상동의 단백질도 함유될 때 상기 용액에 존재하는 목적 단백질을 선택적으로 정제 또는 검출가능하여야 할 것이다. 더 구체적으로는, 유전자 이식 생물체에서 유래된 치료학적 유전자 이식 단백질들의 생산에서 비롯된 산물들에 대하여 인간의 안전성 및 보장 조건을 향상시킬수 있는 새로운 정제 툴 또는 검출 툴을 개발하는 것이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] <발명의요약>

[0016] 본 발명의 목적은 용액에 존재하는 목적 단백질을 정제하거나 검출하기 위한 방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은, 검출 또는 정제 단계를 수행하기 전에, 스페이서를 통해 고정된 DNA 아프타머를 상기 용액에 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질에 특이적으로 결합하지만, 상기 용액에 또한 존재하는 상기 목적 단백질과 상동인 단백질과는 전혀 결합하지 않는다.

과제의 해결 수단

[0017] 따라서, 본 발명은 또한 용액에 존재하는 목적 단백질을 정제하거나 또는 검출하기 위하여, 스페이서를 통해 고정된 지지체 상에 고정된, 상기 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 DNA 아프타머의 용도에 관한 것으로, 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질과 상동인 단백질과 결합하지 않으며, 상기 용액은 상기 목적 단백질과 상동인 적어도 하나의 단백질을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명은 또한, 목적 단백질을 포함하며 상기 목적 단백질과 상동의 단백질을 포함할 수도 있는 용액으로부터, 하기 단계를 포함하는, 상기 목적 단백질을 특이적으로 정제하기 위한 방법에 관한 것이다:(i) 스페이서를 통해 상기 고정된 지지체 상에 고정된 DNA 아프타머를 포함하는 고정 지지체를 준비하는 단계, 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질과 특이적으로 결합하지만 상기 목적 단백질과 상동의 단백질과는 결합하지 않는 것을 특징으로 함, (ii) 상기 고정 지지체를 상기 용액과 접촉시키는 단계, 및 (iii) 상기 아프타머에 결합된 목적 단백질을 회수하는 단계.

[0019] 본 발명은 또한, 상기 목적 단백질을 포함하며 상기 목적 단백질과 상동인 단백질을 포함할 수도 있는 용액으로부터, 하기 단계를 포함하는, 목적 단백질을 특이적으로 검출하기 위한 방법에 관한 것이다:(i) 상기 용액을, 스페이서를 통해 고정지지체 상에 고정된 DNA 아프타머와 접촉시키는 단계, 여기에서 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질과 특이적으로 결합하지만, 상기 목적 단백질과 상동인 단백질과는 결합하지 않는 것임, 및 (ii) 상기 아프타머 및 상기 목적 단백질 간에 형성된 복합체를 검출하는 단계.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 인간 인자 VII에 특이적으로 결합하는 아프타머와 인간 혈장-유래의 FVII (HP FVII) 사이의 결합을 보여준다. 도 1은 50 내지 400 nM의 HP FVII 농도 범위에서, 인간 항-FVII 아프타머 및 HP FVII 사이의 결합을 시간에 대비하여 도해하는 그래프를 나타낸다.

도 2는 칩 상에 고정된 아프타머와 HP FVII 사이의 상호작용의 특이성을 보여준다. 도 2는 다중클론의 항-FVII 항체의 존재 또는 그의 부재하에서, 칩 상에 고정된 인간 인자 VII에 특이적으로 결합하는 아프타머와, HP FVII 사이의 결합을 시간에 대비하여 도해하는 그래프를 나타낸다.

도 3은 인간 인자 VII에 특이적으로 결합하는 아프타머와 토끼 혈장-유래의 FVII 사이의 결합 부채를 보여준다. 도 3은 50 내지 400 nM 범위의 토끼 인자 VII의 농도에서, 인간 인자 VII에 특이적으로 결합하는 아프타머와 토끼 혈장-유래의 인자 VII 사이의 결합을 시간에 대비하여 도해하는 그래프를 나타낸다.

도 4는 인간 인자 VII에 특이적으로 결합하는 아프타머와, HP FVII, 토끼 인자 VII 또는 유전자 이식 인간 인자 VII의 친화성의 차이를 나타낸다. 도 4는 각각 400 nM 범위의 FVII의 농도에서, 인간 인자 VII에 특이적으로 결합하는 아프타머와 HP FVII, 토끼 혈장-유래의 인자 VII 또는 유전자 이식 인간 인자 VII 사이의 결합을 시간에 대비하여 도해하는 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 용액에 존재하는 목적 단백질을 정제하거나 검출하기 위한 방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은, 검출 또는 정제 단계를 수행하기 전에, 스페이서를 통해 고형 지지체 상에 고정된 DNA 아프타머를 상기 용액에 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질에 특이적으로 결합하지만, 상기 용액에 또한 존재할 수도 있는 상기 목적 단백질과 상동인 단백질과는 전혀 결합하지 않는다.

[0022] 또한, 본 발명은 용액에 존재하는 목적 단백질을 정제하거나 또는 검출하기 위하여, 스페이서를 통해 고형 지지체 상에 고정된, 상기 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 DNA 아프타머의 용도에 관한 것으로, 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질과 상동인 단백질과 결합하지 않으며, 상기 용액은 상기 목적 단백질과 상동인 적어도 하나의 단백질을 포함할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0023] 목적하는 목적 단백질을 정제하는 방법에 있어서, 목적 단백질이 개시 배지-일반적으로, 개시 용액에 함유되어 있을 때, 복합체는 (i) 해당 목적 단백질을 특이적으로 인식하는 상기 아프타머와 (ii)목적 단백질 간에 선택적으로 형성된다. 그 후에, 상기 아프타머와 사전에 형성된 복합체를 분리하여 정제되어야 할 목적 단백질을 회수한다.

[0024] 목적하는 목적 단백질의 검출 방법에 있어서, 목적 단백질이 개시 배지-일반적으로, 개시 용액에 함유되어 있을 때, 복합체는 (i) 해당 목적 단백질을 특이적으로 인식하는 상기 아프타머와 (ii) 목적 단백질 간에 선택적으로 형성된다. 그 후에, 특히 (i)상기 아프타머와 상기 목적 단백질 간에 형성된 복합체, 또는 (ii) 상기 아프타머와 복합되어 있거나 또는 사전에 형성된 복합체에서 분리한 자유형의, 목적하는 목적 단백질을 검출한다.

[0025] 본 발명의 다른 목적은, 목적 단백질을 포함하며 상기 목적 단백질과 상동의 단백질을 포함할 수도 있는 용액으로부터, 하기 단계를 포함하는, 상기 목적 단백질을 특이적으로 정제하기 위한 방법을 제공하는 것이다:

[0026] a) 스페이서를 통해 고형 지지체 상에 고정된 DNA 아프타머를 포함하는 고형 지지체를 준비하는 단계, 상기 고정된 아프타머는 상기 목적 단백질과 특이적으로 결합하지만 상기 목적 단백질과 상동의 단백질과는 결합하지 않는 특징으로 함,

[0027] b) 상기 용액과 상기 고형 지지체를 접촉시키는 단계, 및

[0028] c) 상기 아프타머에 결합된 목적 단백질을 회수하는 단계.

[0029] 본 발명은 또한, 목적 단백질을 포함하며 상기 목적 단백질과 상동인 단백질을 포함할 수도 있는 용액으로부터, 하기 단계를 포함하는, 상기 목적 단백질을 특이적으로 검출하기 위한 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다:

[0030] a) 상기 용액을, 스페이서를 통해 고형지지체 상에 고정된 DNA 아프타머와 접촉시키는 단계, 여기에서 상기 고정된 아프타머는 목적 단백질과 특이적으로 결합하지만, 상기 목적 단백질과 상동인 단백질과는 결합하지 않는 것임, 및

[0031] b) 상기 아프타머와 상기 목적 단백질 사이에 형성된 복합체를 검출하는 단계.

[0032] 이 명세서에 사용된 "아프타머"는 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단일-나선의 핵산 분자를 의미한다. 아

프타머들은 대개 5 내지 120 뉴클레오타이드로 구성되며, SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)로 알려진 공지의 방법에 따라서 시험관에서 선별될 수 있다. 아프타머들은 많은 이점을 가진다. 그들의 올리고뉴클레오타이드 성질에 기인하여, 아프타머들은 낮은 면역원성을 가지며, 친화성 리간드로 사용될 때, 다양한 살균 계획을 수행하도록 하는 가혹한 물리-화학적 조건(우레아의 존재시, DMSO의 존재시, 강산성 또는 강염기성의 pH 값, 유기용매 사용 또는 높은 온도)에 대한 높은 저항성이 있다. 게다가, 아프타머들은 매우 선택적이다. 마지막으로, 아프타머들을 생산하는 것은 상대적으로 중간 정도의 비용이 소요된다.

[0033] 이 명세서에 사용된 "DNA 아프타머"는, 리보뉴클레오타이드로 구성된 RNA 아프타머와는 대조적으로, 데옥시리보뉴클레오타이드로 구성된 아프타머를 의미한다. DNA 아프타머들은 용액내에서 유리하게도 안정적이며, 따라서 목적 단백질들의 정제 또는 검출하여 산업적인 적용을 발견할 수 있다.

[0034] 이 명세서에서 사용된, "단백질"은, 아미노산 폴리머를 의미한다. 이들은 단백질들, 단백질 단편들, 유전적으로 변형된 단백질들, 올리고펩타이드들 및 그의 유사체들을 포함한다. 상기 단백질은 항체, 항-바이러스성 단백질, 호르몬, 성장 인자, 및 인자 VII (FVII), 인자 VIII (FVIII), 인자 X (FX), 인자 IX (Factor IX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 인자 XIII (FXIII), 인자 II (thrombin), 항-트롬빈 III (AT III), 헤파린 공인자 II (HCII), 단백질 C (PC), 트롬보모듈린 (TM), 단백질 S (PS), 인자 V (FV) 및 폰 빌리브란트 인자 (FvW), 및 조직 인자 경로 저해제 (TFPI) 등의 응고 인자일 수도 있다. 바람직하게는, 상기 단백질은 자연의 또는 변형된 인자 VII, 또는 그의 단편이다.

[0035] 상기에서 설명한, "스페이서를 통해 고정 지지체상에 고정된 DNA 아프타머 "(이하, "아프타머"로도 언급됨)는, 본 발명의 방법에서 사용되며, 해당 목적 단백질에 선택적으로 결합할 수 있으며, 상기 아프타머는 상기 해당 목적 단백질에 대해 "상동"인 단백질들과 결합하는 능력이 감소되거나 또는 결합하는 능력이 없다. 본 발명에 따르면, 이것은 목적하는 목적 단백질과, 상기 목적 단백질의 구조에 가깝지만 상기 목적 단백질과는 차이가 있는 단백질들 간의 뚜렷한 구별 능력을 갖는 아프타머들을 독점적으로 사용하게 한다는 것을 의미한다.

[0036] 본 발명의 일부 실시예들에 따르면, 목적 단백질과 "상동"인 단백질들로부터 목적 단백질을 구별하기 위해 사용된 아프타머의 능력은, 상기 아프타머가 몰 농도로 표현되는 해리 상수 (dissociation constant value;Kd)에 의해 정의되는, 목적하는 목적 단백질에 대한 친화성을 가진다는 것이며, 이는 가장 가까운 것으로 알려진 "상동" 단백질에 대해 상기 아프타머의 해리 상수와 비교하여 적어도 한 자릿수 낮다.

[0037] 본 발명의 일부 다른 실시예들에 따르면, 아프타머는 목적하는 목적 단백질에 "상동"인 단백질과 결합하지 않는다. 본 발명에 따르면, 아프타머와 상동의 단백질의 결합이 예를 들어, Biacore[®] 타입의 검출 및 결합측정 기술들을 따르는 전통적인 측정 수단을 이용하여 검출할 수 없을 때는, 상기 아프타머는 상동의 단백질과 결합하지 않는다. 기술한 바에 따르면, 예시들에서, 인간 인자 VII에 선택적으로 결합하는 서열번호 제 1의 아프타머는 Biacore[®]. 결합 측정 시스템을 이용하여 토끼 인자 VII을 검출하는 방식에서는 결합하지 않는다는 것을 보여 준다.

[0038] 아프타머가 선택적으로 결합하는 "목적 단백질"은, 모든 종류의 단백질이 될 수 있다. 목적 단백질은 특히 치료학적 목적의 단백질일 수도 있다.

[0039] "상동 단백질" 또는 "목적 단백질과 상동의 단백질"은, 목적 단백질과 강한 구조적 상동 관계를 가지는 단백질을 의미한다.

[0040] 이 명세서에 사용된, "상동 관계"는, 두 타입의 상동 관계는, 실질적으로, 각각 (i) 목적 단백질과 상동 단백질 간의 아미노산 서열이 차이가 있는데서 기인된 상동 관계 및 (ii) 오시딕(osidic) 사슬 내에서의 차이를 포함하며, 아미노산 결사슬 상에 공유 결합된 추가적인 화학 그룹들 내의 차이에 의해 기인된 상동 관계를 의미한다. 목적하는 목적 단백질과 "상동" 단백질은 아미노산 서열의 차이 뿐만 아니라 오시딕 사슬 내의 차이에 대해 모두 각각 서로 다르다는 것은 당업계의 기술자라면 명확히 알 수 있을 것이다. 설명한 바대로, 두 가지 타입의 구조적 차이점은 아미노산 서열의 차이가 목적 단백질 또는 상동 단백질의 당화 자리를 구성하는 아미노산에서 발생할 때 생길 것이다.

[0041] 본 발명에 따르면, 해당 목적 단백질과 대응하는 상동 단백질은 서로 적어도 50%의 아미노산 동일성을 가지는 서열을 포함한다. 본 발명에 따르면, 두 아미노산 서열간의 동일성 퍼센트 또는 두 뉴클레오타이드 서열간의 동일성 퍼센트는 간극_벌점(Gap_penalty): 10.0 및 연장_벌점(Extend_penalty): 0.5에 대한 디폴트 매개변수를 갖춘 Emboss matcher인 EBLOSUM62를 이용하여 계산될 것이다.

- [0042] 바람직하게는, 목적 단백질과 상동 단백질 간의 아미노산 동일성은 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다.
- [0043] 이미 지적하였다시피, 목적하는 목적 단백질과 상동 단백질간의 차이는 두 단백질 간의 당화 차이에 의해 기인된다. 당화에서의 차이는 동일한 아미노산 서열을 갖거나, 유사한 아미노산 서열을 갖지만, 글리칸 구조가 다른 두 단백질에 관련이 있다. 글리칸 구조는 단백질상의 아미노산 일치 사슬에 부착된(이하, '접목된'으로 언급되기도 함) 당(sugar) 사슬들이다. 당화 차이는 N- 또는 O-당화 뿐만 아니라 N- 또는 O-당화 상에 생기는 글리코사이드 가지화에 관련이 있을 수도 있다. 당화에서의 차이는 이러한 사슬들이나 가지화가 있거나 없는 것뿐만 아니라, 푸코스, 만노스, 글루코사민 또는 갈락토사민 잔기 등의 일부 당이 있거나 또는 없는 것과도 관련이 있을 수도 있다. 단백질 당화는 여러 가지 방법으로 분석될 수 있다. 당화 분석 방법은 하나 또는 그 이상의 효소(PNGaseF, N-글리코시다아제)를 사용하거나 화학적인 방법(히드라진가수분해(hydrazinolysis), β -소거)을 통하여 단백질을 탈당하는 방법 및, 그런 다음, 겔, 모세 전기영동 또는 HPLC (자외선, 형광성 또는 MS 검출을 이용하여)에서 얻은 글리칸을 직접 분석하는 방법 또는 상기 글리칸의 서열을 위해서 효소-매개 탈중합화(뉴라미니다아제 및 β -갈락토시다아제) 또는 화학적으로 유도된 탈중합화(히드라진가수분해, β -소거) 후에 분석하는 방법으로 구성된다. 다른 분석 방법은 전체 단백질을 질량 분광광도계를 이용하는 것으로 구성되며, 이 기술들은 MALDI (매질-지원 레이저 탈착 이온화(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)), MALDI-TOF (Time Of Flight), ESI (전자 분무 이온화(Electrospray Ionization))로 알려져 있다.
- [0044] 본 발명의 일부 실시예들에 따르면, 본 발명의 아프타머들은 인자 VII (FVII), 인자 VIII (FVIII), 인자 X (FX), 인자 IX (Factor IX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 인자 XIII (FXIII), 인자 II (THROMBIN), 항트롬빈 III (AT III), 헤파린 공인자 II (HCII), 단백질 C (PC), 트롬보모듈린 (TM), 단백질 S (PS), 인자 V (FV), 폰 빌리브란트 인자 (FvW) 및 조직 인자 경로 저해제 (TFPI)로부터 선택된 응고 인자에 특이적으로 결합하는 아프타머로 구성된다. 유리하게는, 아프타머는 FVII에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, 본 발명의 한 아프타머는 인간 인자 VII에는 결합하지만 토끼 인자 VII에는 결합하지 않는다. 역으로, 본 발명의 한 아프타머는 토끼 인자 VII에는 결합하지만 인간 인자 VII에는 결합하지 않는다.
- [0045] 인간 인자 VII에 특이적으로 결합하지만 토끼 인자 VII에 결합하지 않는 아프타머는, 서열번호 제 1과 적어도 80% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 아프타머 일 것이다.
- [0046] 유리하게는, 본 발명의 아프타머는 1 pM 내지 10 μ M 범위의, 바람직하게는 10 nM 내지 10 μ M 범위의 해리 상수 값으로 특징되는 친화성을 갖는 목적 단백질과 결합한다. 유리하게는, 목적 단백질에 대한 아프타머의 친화성은 상동 단백질에 대한 아프타머의 친화성보다 1000 내지 10,000 배 높다.
- [0047] 본 발명에 따르는 정제 또는 검출 방법에 있어서, DNA 아프타머는 스페이서를 통해 고형 지지체 상에 고정되어 있다. 고형 지지체 상에 고정된 아프타머는 특히 용액에 존재하는 목적 단백질의 검출이나 정제에 잘 적용된다.
- [0048] 이 명세서에 사용된, "스페이서"는 아프타머와 고형 지지체간에 삽입된 분자를 의미한다. 유리하게는, 스페이서는 아프타머의 한 쪽 말단과 고형 지지체에 모두 결합된다. 유리하게는, 이러한 스페이서를 포함하는 구조는 고형 지지체 상에 아프타머를 직접 고정시키지 않는다. 스페이서의 성질은 당업계의 기술자의 지식에 따라 선택될 수 있으며; 바람직하게는 스페이서는 비특이적인 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)이다. 이 스페이서가 비특이적인 올리고뉴클레오타이드 서열일 때, 상기 서열은 바람직하게는 적어도 5개의 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 5 내지 15 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0049] 스페이서 상에 아프타머를 고정하기 위해서, 아프타머는 티올, 아민, 또는 지지체 위에 존재하는 화학 그룹들과 반응할 수 있는 다른 기타 그룹 등의 아프타머를 공유적으로 고정시킬 수 있는 그룹, 또는 아프타머를 비공유적으로 고정할 수 있는 그룹, 예컨대, 바이오틴-스트렙타비딘 등의 다양한 화학 그룹으로 화학적으로 변형될 수 있다.
- [0050] 스페이서를 통해 고형 지지체상에 고정화되면, 아프타머는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드(2'오메틸 또는 2'플루오로피리딘, 2'리보푸린, 포스포라미디트 등), 역상 뉴클레오타이드 또는 화학 그룹(PEG, 폴리양이온들, 콜레스테롤) 때문에 그의 자유 말단(즉, 스페이서에 결합하지 않은 말단)에 유리하게 변형되나, 이에 한정되지 않는다.
- [0051] 고형 지지체는 아가로스, 또는 셀룰로스, 또는 아크릴아마이드, 메타크릴레이트 또는 폴리스티렌 유도체 등의 합성 겔로부터 유래된 겔; 표면 플라즈몬 공명에 적합한 칩 등의 칩; 폴리아마이드, 폴리아크릴로니트릴 또는 폴리에스터 막 등의 막; 또는, 자성 또는 파라자성의 비드를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼 일 수도 있

다.

- [0052] 유리하게는, 목적 단백질을 포함하며 상기 목적 단백질과 상동인 단백질을 포함할 수도 있는 용액은, 체액, 세포, 세포 균질화물, 조직, 조직 균질화물, 기관 또는 전체 생물체 등의 생물학적인 용액이다. 바람직하게, 용액은, 혈액, 혈액-유래 산물, 포유동물의 젖 또는 젖-유래 산물 등의 동물에서 획득된 액체 생물학적 용액이다. 이 용액은 혈장, 혈장 냉동 침전물, 정제된 젖 또는 그의 유도체가 될 수 있다. 본 발명에 따른 동물은, 다세포성 생물, 진핵생물, 클로로플라스트를 제외한 생물체 및 비인간이다. 더 바람직한 구현예에 따르면, 용액은 유전자 이식 동물에서 획득된다. 유리하게는, 용액은 포유동물의 젖 또는 유전자 이식 포유동물의 젖-유래 산물이다. 본 발명에 따르면, 유전자 이식 동물은 젖소, 염소, 암토끼, 돼지, 원숭이, 쥐, 생쥐 또는 새 또는 모기, 파리 또는 누에 등의 곤충이다. 구체적인 예시에 따르면, 유전자 이식 동물은 유전자 이식 포유동물이며, 바람직하게는 유전자 이식 암토끼이다. 유리하게는, 유전자 이식 포유동물은 유전자 이식 포유동물의 젖에서 유전자 이식 단백질을 발현가능하도록 하는 특이적인 프로모터의 조절하에서 상기 유전자 이식 포유동물의 유전에서 상기 유전자 이식 단백질이 생산된다.
- [0053] 유전자 이식 동물의 젖에서 유전자 이식 단백질을 생산하기 위한 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다: 유전자 이식 단백질이 암호화되어 있는 유전자를 포함하는 DNA 분자를 비인간 포유동물의 배아에 삽입하며, 상기 유전자는 젖에서 자연적으로 분비되는 단백질을 암호화하는 유전자의 프로모터(카제인 프로모터, 락트알부민 프로모터, 베타-카제인 프로모터, 베타-락토글로불린 또는 유장 산성 단백질 프로모터(WAP) 등)의 조절 하에 있다. 그런 다음, 배아를 동일한 종의 포유동물 암컷에 삽입한다. 배아-유래 포유동물이 충분히 발달되면, 포유동물에서 젖 분비가 유도되며, 그 후에 젖을 모은다. 그런 다음의 젖은 상기 유전자 이식 단백질을 포함한다.
- [0054] EP 0 527 063는 인간의 것이 아닌 기타의 포유동물의 암컷의 젖에서 단백질을 생산하는 방법의 예시를 제시하는 것으로, 이 문헌은 본 발명의 단백질을 제조하기 위해 재생산될 수 있음을 교시한다. WAP 프로모터-함유 플라스미드는 WAP 유전자 프로모터를 함유하는 서열을 도입하여 획득되며, 이 플라스미드는 WAP 유전자 프로모터의 조절하에 놓여있는 외래 유전자를 수용하기 위해 제조된 것이다. 유전자 이식 암컷 토끼들을 획득하기 위해, 암컷 토끼의 배아에 수컷의 전핵을 미세주사하는 방식으로, 프로모터-함유 플라스미드 및 본 발명의 단백질을 암호화하는 유전자를 사용한다. 그런 다음 배아들을 호르몬 처리된 암컷의 난관으로 옮겼다. 이식유전자의 존재는 태어난 어린 유전자 이식 토끼에서 추출한 DNA에 기반한 서던 블랏으로 밝힌다. 포유동물의 젖의 농도는 특이적인 방사성 면역 테스트를 이용하여 결정하였다.
- [0055] 기타 문헌들은 인간의 것이 아닌 기타의 포유동물의 암컷의 젖에서 단백질을 획득하기 위한 방법을 기술한다. 언급하자면, US 7,045,676 (유전자 이식 생쥐) 및 EP 1739170 (유전자 이식 포유동물에서 폰 빌리브란트 인자 생산)이 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 따라서, 또한, 본 발명의 목적은 유전자 이식 암컷 토끼의 젖에 존재하는 인간 인자 VII의 정제 또는 검출을 위하여, 스페이서를 통하여 고정 지지체 상에 고정된, 상기 인간 인자 VII에 특이적으로 결합하는 DNA 아프타머의 용도를 제공하는 것으로, 상기 고정된 아프타머는 토끼 인자 VII에는 결합하지 않으며, 상기 유전자 이식 암컷 토끼 젖은 토끼 인자 VII를 함유하는 것을 특징으로 한다.
- [0057] 본 발명의 추가 목적은 유전자 이식 암컷 토끼의 젖에 존재할 수 있는 토끼 인자 VII의 정제 및 검출을 위하여, 스페이서를 통하여 고정 지지체 상에 고정된, 상기 토끼 인자 VII에 특이적으로 결합하는 DNA 아프타머의 용도를 제공하는 것으로, 상기 고정된 아프타머는 인간 인자 VII에는 결합하지 않으며, 상기 유전자 이식 암컷 토끼 젖은 인간 인자 VII를 함유하는 것을 특징으로 한다.
- [0058] 인간 인자 VII 및 토끼 인자 VII는 (BLAST에 의해 결정된 바에 따르면) 약 75%의 아미노산 서열 상동성을 갖는다.
- [0059] 본 발명의 추가 목적은, 하기 단계를 포함하는, 목적 단백질과 특이적으로 결합하지만 상기 목적 단백질과 상동인 단백질과는 결합하지 않는 아프타머를 선별하는 방법을 제공하는 것이다:
- [0060] a) 결합하기 좋은 조건하에서, 아프타머 혼합물을 상기 목적 단백질과 상동의 단백질과 접촉시키는 단계 및 상동 단백질과 결합하지 않는 아들 아프타머들을 회수하는 단계,
- [0061] b) 결합하기 좋은 조건하에서, 단계 a)에서 획득한 아프타머 혼합물을 상기 목적 단백질과 접촉시키는 단계,
- [0062] c) 상기 목적 단백질과 결합된 것들로부터 결합하지 않은 아프타머를 분리하는 단계,

- [0063] d) 아프타머-목적 단백질 쌍을 해리시키는 단계,
- [0064] e) 해리된 아프타머를 증폭시켜, 목적 단백질과는 결합하지만 목적 단백질과 상동인 단백질과는 결합하지 않는 아프타머-풍부 혼합물을 획득하는 단계, 및
- [0065] f) 목적 분자에 특이적으로 결합하지만 상기 목적 단백질과 상동인 단백질과는 결합하지 않는 이 아프타머(들)가 획득될 때 까지, 필요한 만큼 다수의 주기로 단계 a), b), c), d) 및 e)를 반복하는 단계.
- [0066] 본 발명의 아프타머를 선별하는 방법에는 종래 기술에서 기술된 SELEX 방법에 의한 다수의 일반적인 방법이 포함되지만, 소위 "감법"단계(단계 a)가 추가로 포함된다. 그러므로, 본 발명의 방법은 "감법의 SELEX"라 불린다.
- [0067] 아프타머 선별 SELEX 방법은, 단백질을 DNA 또는 RNA 핵산 결합 라이브러리(대개 10^{15} 분자들)과 접촉시키는 단계, 목적 (단백질)에 결합하지 않는 핵산들은 제거하는 단계 및 목적 (단백질)에 결합하는 핵산들은 분리하여 증폭시키는 단계로 구성된다. 상기 방법은 목적하는 단백질에 대해 좋은 친화성을 갖는 핵산이 용액에 충분히 풍부하게 될 때 까지 반복한다(Tuerk and Gold, a "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase" (1990) Science, 249(4968):505-10 and Ellington and Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", (1990) Nature Aug 30;346(6287):818-22). EP 0 786 469, EP 668 931, EP 1 695 978, EP 1 493 825는 SELEX 방법의 다른 예시를 제공하는 것으로, 이 문헌들은 본 발명의 아프타머 선별 방법을 수행하기 위하여 재사용될 수도 있음을 교시하고 있다.
- [0068] 분리 단계(단계 c)는 목적 단백질에 결합되지 않는 아프타머들로부터 목적 단백질과 결합된 아프타머들, 소위, 아프타머-목적 단백질 쌍들의 분리를 가능케하는 모든 방법에 의해 수행될 수 있다. 분리는 당업계에 알려진 다양한 방법으로 수행될 수 있다. 따라서, 아프타머-목적 단백질 쌍들을 니트로셀룰로스 필터 상에 잔류시킬 수 있으며, 반면 자유 아프타머는 잔류시킬 수 없다. 아프타머-목적 단백질 쌍들을 특이적으로 잔류시키는 컬럼들은 또한 분리 단계에서도 사용될 수 있다. 기타 방법들로 액체-액체 추출법, 겔 이동 분석법 또는 밀도 구배 원심분리법이 사용될 수도 있다. 분리 방법의 선택은 목적 단백질의 성질 및 아프타머-목적 단백질 쌍에 의존하며, 결정은 당업계의 기술자라면 알 수 있는 원리에 기초하여 수행될 수 있다.
- [0069] 해리(분리) 단계(단계 d)는 화학종의 해리(분리)를 가능케 하는 모든 방법을 통하여 수행될 수 있다. 유리하게는, 해리는 이온 강도 증가 또는 pH 값의 변화를 통해 수행될 수 있다.
- [0070] 증폭 단계(단계 e)는 아프타머의 복제 량 또는 수를 증가시킬 수 있는 모든 방법을 통하여 수행될 수 있다. 유리하게는, 아프타머의 증폭은 PCR (폴리머라아제 중합 사슬 반응)에 의해 수행된다. 유리하게는, 증폭은 DNA에 대해서는 PCR을 통하여, 또는 RNA에 대해서는 RT-PCR을 통하여 수행된다.
- [0071] "감법의 SELEX"방법은 목적 단백질과 상동의 단백질에 결합하는 아프타머를 제거하도록 "감법"을 수행하는 단계(단계 a)로 특징된다. 단계 a), b), c), d) 및 e)을 포함하는 주기를 수행한 후에, 뒤이은 주기로 새로운 단계 a), b), c), d) 및 e)를 또 포함하거나 또는 이전 주기의 단계 e)에서 증폭된 아프타머의 풀(pool)을 단계 b)로 바로 시작하게 할 수 있다. 따라서, 목적 단백질과 특이적으로 결합하지만 목적 단백질과 상동의 단백질과는 결합하지 않는 아프타머를 획득할 때까지 감법 단계 a)가 각각 새로운 주기의 시작으로 수행되거나, 그에 대체하여, 그 후에는 적어도 한 주기에서 단계 a)가 없이 실행된다. 유리하게는 각 단계 a)는 2회 주기 마다 또는 3회 주기 마다 수행된다.
- [0072] 하기의 예시들은 본 발명을 자세히 기술하나 그의 범위를 한정하지 않는다.
- [0074] <실시예>
- [0075] **실시예 1: 아프타머(서열번호 제 1)의 인간 인자 VII에 대한 결합**
- [0076] 서열번호 제 1을 함유하는 아프타머는 Sigma-Proligo사에 의해 합성되었다.
- [0078] 서열번호 제 1:

[0079] 5' PGGGAGAGAGGAAGAGGGGAUGGGAGCCUAUGUAAACAGAUGCAGAUCCCUAGUCGUCCCAACACCAUAAC-3'-**바이오틴**

[0081] 상기 아프타머는 그의 3' 말단에 바이오틴이 부착되어 변형되었다. 진한 글씨체의 뉴클레오타이드 염기(서열번호 제 1의)는 2'0-메틸화되었으며, 핵산 분해효소에 더 저항적으로 만들어 아프타머를 안정하게 한다. 그런 다음, 아프타머를 아비딘-함유 SA 칩 (Biacore GE)상에 고정하였다. 따라서, 아프타머는 그의 3'-말단에 2700 RU의 면역화 율(상기 1 RU는 약 mm²당 1 pg의 면역화 산물에 해당한다.)로 연결되어 고정되었다.

[0082] 일부의 정제된 인간 혈장-유래 인자 VII (HP FVII, 정제도: 99%)를 전개 완충 용액(Hepes 20mM pH=8, NaCl 50mM, CaCl₂ 2mM 및 BSA 0.01%)으로 희석하여, 50, 100, 200 및 400 nM의 농도의 인간 혈장-유래 인자 VII를 갖는 네 개의 시료를 준비하였다. 각 시료들을 바이오틴-스트렙타아비딘 상호작용을 통하여 고정된 아프타머-함유의 동일한 칩 내로 순차적으로 주입하였다. 개시 완충용액 만을 포함하는 블랭크를 주입하여 대조군들을 준비하였다. 모든 주입은, 칩 내로 240 초 동안 20 µl/min의 속도(흐름율)로 전개 완충 용액을 주입한 후에, 120 초당 20 µl/min의 동일한 속도(흐름율)로 수행하였다. 그런 다음, 아프타머들로 부터 인간 혈장-유래의 인자 VII를 분리하기 위하여 일부 용출 완충 용액(NaCl, 5M)을 30 µl/min 속도로 60초 동안 주입하였다. 각 주입은 두 번씩 시행하였다(시료와 블랭크). 칩은 인간 혈장-유래 인자 VII와 표면 플라즈몬 공명(RPS)을 통하여 고정된 아프타머 간의 상호작용의 생성 및 붕괴의 실측 시간을 관찰할 수 있도록 하였다. 고정된 아프타머의 결합에 의해 장치에 의해 기록된 공명 단위(RU)로 표시된 신호가 증가된다(도 1). 이 측정은 RPS Biacore T100 기구(GE)에 의해 수행되었다. 기록된 상호작용의 모델화는 Biaevaluation 소프트웨어(GE)를 이용하여 수행하였다. 단백질의 입체결합 모델화에 기초하여, 아프타머와 HP FVII 간의 결합에 대한 Kd 값은 1.4 µM로 추정되었다.

[0083] 고정된 아프타머에 결합하는 산물이 실제로 인자 VII인지 확인하기 위하여, (i) 인간 혈장-유래 인자 VII 200nM 및 (ii) 항-FVII 다중클론 항체 100nM (Abcam)를 포함하는 서열을 동일한 칩에 주입하였다. 주입과 분석 조건들은 상기에서 기술한 것과 동일하였다. 만약, 아프타머가 실제로 FVII를 잔류시킨다면, 항-FVII 다중클론 항체 주입은 FVII에 대한 항체의 결합에 따라, 아프타머에 결합된 FVII 자체에 의해 신호가 증가(RU)된다. 대조군으로서 항체만을 주입하였다. RU의 신호 증가는 아프타머가 FVII를 인식한다는 것을 명확히 보여준다(도 2).

[0084] 이 예시는, 아프타머가 고정되면, 상기 아프타머는 인간 혈장-유래 인자 VII에 대해 상당한 친화성을 갖고 특이적으로 결합한다는 것을 보여준다.

[0086] **실시예 2: 아프타머(서열번호 제 1)의 토끼 인자 VII에 대한 결합**

[0087] 토끼 혈장-유래 인자 VII (American Diagnostica)를 실시예 1에서와 같이 50, 100, 200 및 400 nM의 농도로, 동일한 완충 용액으로 희석한 다음, 실시예 1과 같이 동일한 조건 하에서, 고정된 아프타머를 함유하는 동일한 칩 내로 주입하였다.

[0088] 도 3에서 보여지는 바와 같이, 기록된 RU 신호들은 토끼 혈장-유래 FVII과 인간 혈장-유래 FVII 간의 강한 아미노산 서열 상동성(약 75%의 아미노산 서열 상동성)에도 불구하고, 토끼 혈장-유래 FVII에 대해 아프타머의 결합이 전혀 없는 것을 묘사하였다.

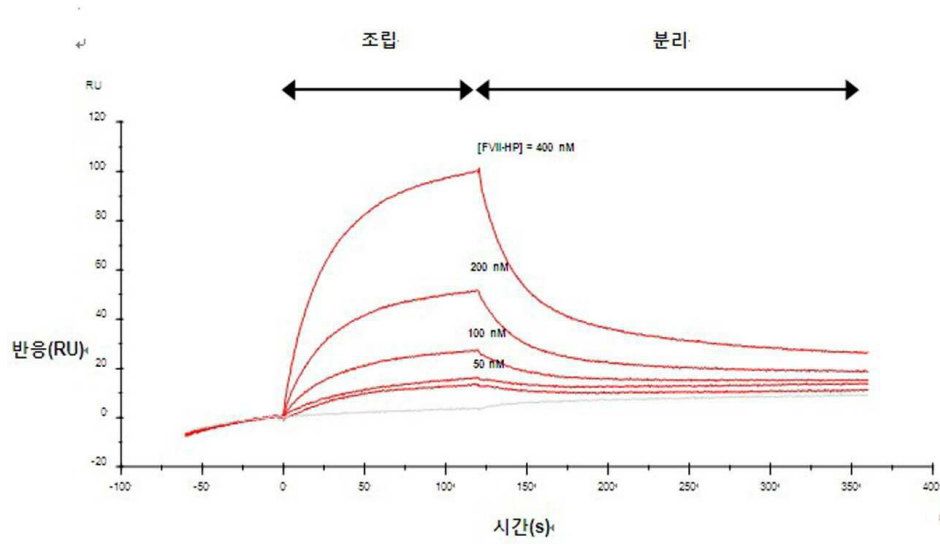
[0089] 이 예시는 아프타머가 인간 혈장-유래 FVII와 특이적으로 결합하지만 토끼 인자 VII와는 결합하지 않는다는 것을 보여준다.

[0091] **실시예 3: 인간 혈장-유래 인자 VII, 유전자 이식 인자 VII 및 토끼 혈장-유래 인자 VII 간의 아프타머 (서열번호 제 1)에 대한 친화성 차이**

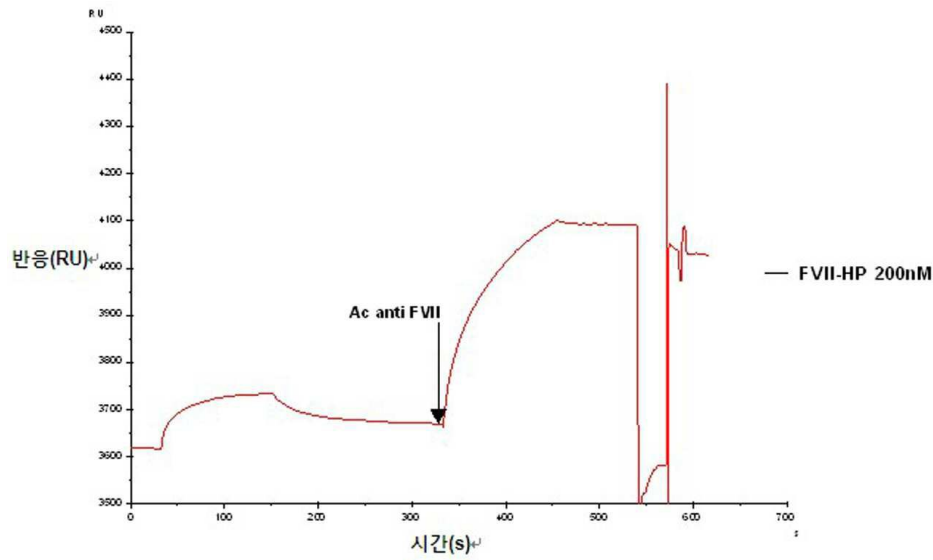
[0092] 인간 혈장-유래 인자 VII, 토끼 혈장-유래 인자 VII 및 인간 유전자 이식 인자 VII을 실시예 1과 같이 동일한 조건하에 동일한 칩 내로 연속적으로 주입하였다. 획득된 데이터(도 4)는 여전히 강하지만 다른 친화성을 갖는 HP FVII 및 유전자 이식 FVII에는 결합하지만, 토끼 인자 VII에는 결합하지 않는 아프타머를 보여준다.

도면

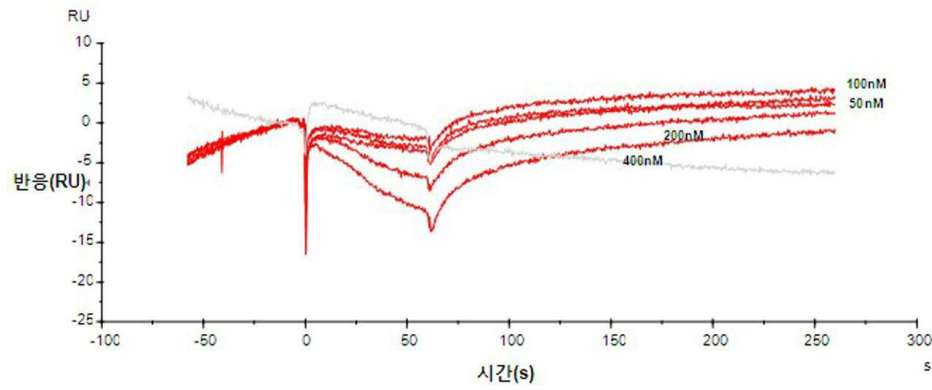
도면1



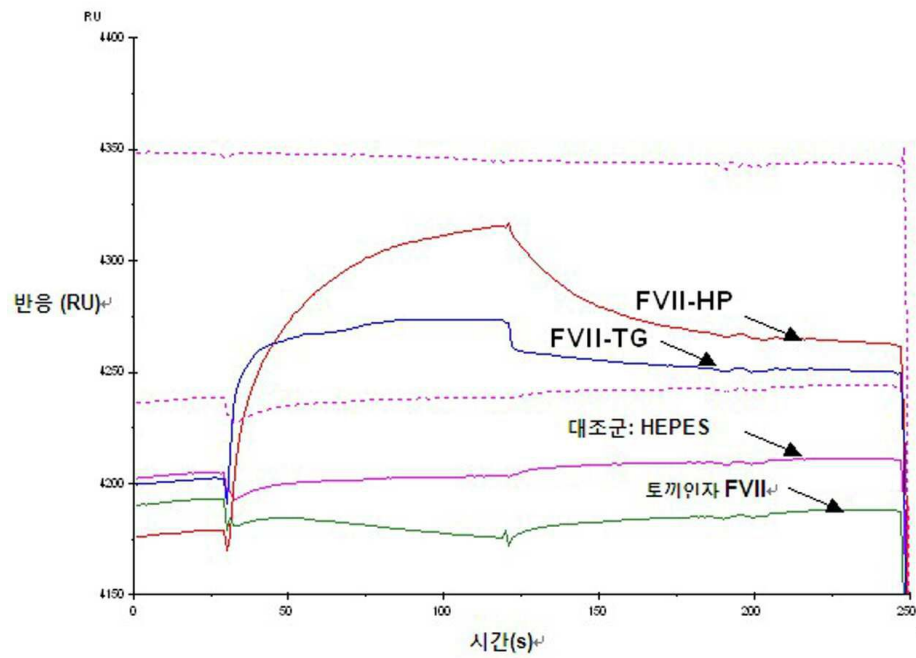
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> LFB BIOTECHNOLOGIES
- <120> Method for purifying or detecting a target protein
- <130> ip-2016-0024
- <150> FR0757072
- <151> 2007-08-14
- <150> PCT/FR2008/051495
- <151> 2008-08-13
- <160> 1
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1

<211> 68

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 1

gggagagagg aagagggaug ggagccuau uaacagauc agaucccuag ucguccaac 60

accuaaac 68