



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0123808
(43) 공개일자 2024년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C40B 40/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/1034 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7021715
(22) 출원일자(국제) 2022년12월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월28일
(86) 국제출원번호 PCT/FI2022/050871
(87) 국제공개번호 WO 2023/118670
국제공개일자 2023년06월29일
(30) 우선권주장
20216346 2021년12월23일 핀란드(FI)

(71) 출원인
헬싱인 일리오피스토
핀란드 00014 헬싱인 일리오피스토 일리오피스톤 카투 3
(72) 발명자
파윌라이넨, 윌레
핀란드 00014 헬싱인 일리오피스토 일리오피스톤 카투 3 헬싱인 일리오피스토 내
켈로살로, 유호
핀란드 00014 헬싱인 일리오피스토 일리오피스톤 카투 3 헬싱인 일리오피스토 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인에이아이피

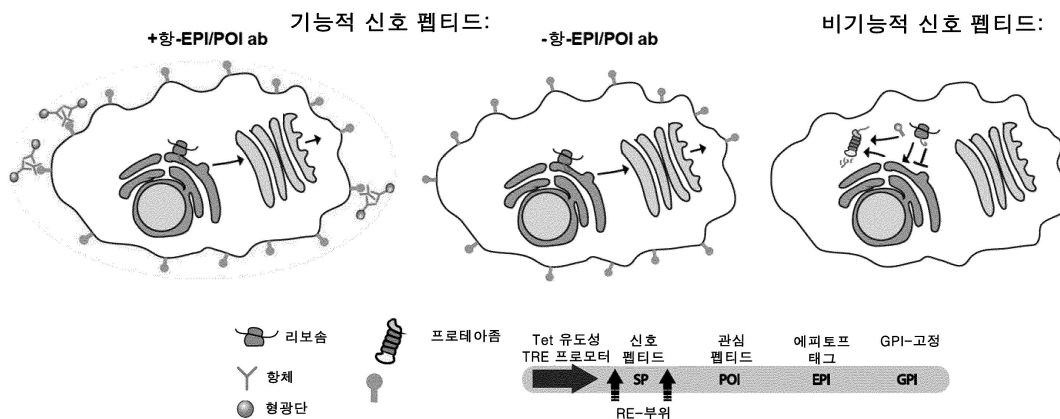
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 포유동물 세포에서 이중 폴리펩티드의 효율적인 발현 및 분비를 위한 신호 펩티드 스크리닝 방법

(57) 요약

본 개시내용은 포유동물 세포에서 이중 폴리펩티드의 효율적인 발현 및 분비를 위한 신호 펩티드를 스크리닝하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 다양한 후보 신호 펩티드들과 관심 폴리펩티드를 암호화하는 바이러스 발현 벡터 풀을 제공하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 풀의 각각의 바이러스 발현 벡터는 융합 단백질을 암호화하는
(뒷면에 계속)

대표도



폴리뉴클레오타이드를 적어도 포함하고, 상기 폴리뉴클레오타이드는 i) 프로모터, ii) 신호 펩티드를 암호화하는 서열, iii) 관심 폴리펩티드를 암호화하는 서열, iv) 임의로 에피토프 태그를 암호화하는 서열, 및 v) 글리코실포스파티딜이노시톨, GPI, 부착에 대한 C-말단 신호 펩티드를 암호화하는 서열 또는 막형단 도메인을 암호화하는 서열; 상기 바이러스 벡터 폴로 숙주 세포를 형질전환시켜, 각 숙주 세포가 바람직하게는 평균적으로 상기 폴로 부터 단 하나의 바이러스 벡터에 의해 형질전환 되도록 하는 단계; 숙주 세포 표면에 GPI 정박되거나 대안적으로 상기 융합 단백질의 막형단 도메인에 의해 숙주 세포 표면에 고정되는 융합 단백질을 생산하기 위해 상기 숙주 세포에서 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계; 상기 숙주 세포를 상기 관심 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 시약, 바람직하게는 항체와 접촉시키거나, 대안적으로 상기 에피토프 태그가 융합 단백질에 존재하는 경우, 상기 에피토프 태그에 특이적으로 결합하는 제1 결합 시약과 접촉시키는 단계로서, 상기 결합 시약은 임의로 형광 표지 또는 기타 검출 수단으로 표지되고; 형질전환된 숙주 세포를 각 숙주 세포의 형광 특성을 기준으로 2개 이상의 그룹으로 나누는 단계; 및 숙주 세포에서 관심 폴리펩티드에 대한 최적의 신호 펩티드를 식별하기 위해 가장 효율적인 융합 단백질 발현을 나타내는 숙주 세포 그룹에 대해 차세대 염기서열분석을 수행하는 단계를 포함한다. 본 개시내용은 또한 상기 방법에 사용되는 벡터, 숙주 세포 또는 DNA 라이브러리에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C40B 40/08 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C07K 2319/40 (2013.01)

C07K 2319/60 (2013.01)

C12N 2740/16043 (2013.01)

(72) 발명자

칼슨, 파울

핀란드 00014 헬싱인 일리오피스토 일리오피스톤카
투 3 헬싱인 일리오피스토 내

로스티, 케이티아

핀란드 00014 헬싱인 일리오피스토 일리오피스톤카
투 3 헬싱인 일리오피스토 내

그린, 마리나

핀란드 00014 헬싱인 일리오피스토 일리오피스톤카
투 3 헬싱인 일리오피스토 내

나네카, 라홀

핀란드 00014 헬싱인 일리오피스토 일리오피스톤카
투 3 헬싱인 일리오피스토 내

명세서

청구범위

청구항 1

포유동물 세포에서 이중 폴리펩티드의 효율적인 발현 및 분비를 위한 신호 펩티드를 스크리닝하는 방법으로서, 상기 방법은

- a) 다양한 후보 신호 펩티드들과 관심 폴리펩티드를 암호화하는 바이러스 발현 벡터의 풀을 제공하는 단계로서, 여기서 상기 풀의 각각의 바이러스 발현 벡터는 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 i) 프로모터, ii) 신호 펩티드를 암호화하는 서열, iii) 관심 폴리펩티드를 암호화하는 서열, iv) 임의로 에피토프 태그를 암호화하는 서열, 및 v) 글리코실포스파티딜이노시톨, GPI, 부착에 대한 C-말단 신호 펩티드를 암호화하는 서열 또는 막횡단 도메인을 암호화하는 서열을 포함하는 것인 단계;
- b) 각 숙주 세포가 바람직하게는 플로부터 평균적으로 단 하나의 바이러스 벡터에 의해 형질전환되도록, 상기 바이러스 벡터의 풀로 숙주 세포를 형질전환 하는 단계;
- c) 상기 숙주 세포 표면에 GPI 정박되거나 대안적으로 상기 융합 단백질의 막관통 도메인에 의해 상기 숙주 세포 표면에 정박되는 융합 단백질을 생산하기 위해 상기 숙주 세포에서 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계;
- d) 상기 관심 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 시약, 바람직하게는 항체와 상기 숙주 세포를 접촉시키거나, 대안적으로 상기 에피토프 태그가 융합 단백질에 존재하는 경우, 상기 에피토프 태그에 특이적으로 결합하는 제1 결합 시약과 상기 숙주 세포를 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 결합 시약은 임의로 형광 표지 또는 기타 검출 수단으로 표지되는 단계;
- e) 임의로 상기 제1 결합 시약이 표지된 결합 시약이 아닌 경우, 형광 표지로 표지된 제2 결합 시약, 바람직하게는 항체와 상기 숙주 세포를 접촉시키는 단계로서, 여기서, 상기 제2 결합 시약은 상기 제1 결합 시약에 특이적으로 결합하는 단계;
- f) 형질전환된 숙주 세포를 각 숙주 세포의 형광 특성을 기준으로 적어도 2개의 그룹으로 나누는 단계; 및
- g) 상기 숙주 세포에서 관심 폴리펩티드에 대한 최적의 신호 펩티드를 식별하기 위해 가장 효율적인 융합 단백질 발현을 나타내는 숙주 세포 그룹에 대해 차세대 염기서열분석을 수행하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 관심 폴리펩티드를 암호화하는 상기 바이러스 발현 벡터의 풀은,

- 다양한 신호 펩티드들 및 이의 상보적 서열을 암호화하는 올리고뉴클레오티드의 라이브러리를 합성하고, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 상기 라이브러리 내의 상보적 올리고뉴클레오티드에 결합될 때 상기 서열의 유리 말단 모두에서 제한 부위 오버행을 형성하고;
- 상기 라이브러리에 존재하는 상보적 올리고뉴클레오티드와 상기 라이브러리의 올리고뉴클레오티드를 어닐링하여 상기 제한 부위 오버행을 갖는 이중 가닥 DNA 단편을 생산하고; 및
- 상기 이중 가닥 DNA 단편을 적합한 클로닝 부위를 갖는 바이러스 벡터에 결합시켜, 신호 펩티드를 암호화하는 DNA 단편을, 관심 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 결합시켜, 다양한 후보 신호 펩티드들과, 관심 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 바이러스 발현 벡터의 풀을 생산하는 것에 의해 제조되는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 다양한 신호 펩티드들이 진핵생물, 바람직하게는 포유동물의 공지된 신호 펩티드들, 박테리아 단백질 또는 바이러스 단백질, 이들의 변형 및/또는 인공 서열로부터 선택된, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

h) 단계 g)에서 검출된 상기 최적의 신호 펩티드와 관심 폴리펩티드의 조합을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제2 발현 벡터에 클로닝하고, 숙주 세포를 상기 제2 벡터로 형질전환시키고, 상기 숙주 세포에서 상기 폴리펩티드를 생산하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 CHO 세포, HeLa 세포, HEK293 세포, BHK 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, NIH3T3 세포, MDCK 세포 및 WI38 세포로 이루어진 군으로부터 선택되며, 바람직하게는 CHO 세포이거나, 렌티바이러스로 형질도입될 수 있는 임의의 다른 세포 유형인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터이고, 바람직하게는 테트라사이클린 제어 프로모터이거나, 구성적 프로모터를 포함하는 기타 적합한 프로모터 서열인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에피토프 태그가 히스티딘 태그(His-태그), myc-태그, FLAG-태그, 작은 유비퀴틴 유사 변형자 태그(SUMO-태그), 단백질 C의 중쇄 태그(HPC), 칼모듈린 결합 펩티드 태그(CBP-태그) 및 헤마글루티닌 태그(HA-태그)로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 기타 에피토프 태그이거나 기타 표지 그룹인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 폴리펩티드가 치료적 또는 진단 단백질, 예컨대 치료적 또는 진단 항체인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 f)가 형광 활성화 세포 분류인 FACS를 사용하여 수행되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴의 바이러스 발현 벡터 각각이 형질도입 마커 단백질, 바람직하게는 적색 형광 단백질인 RFP 또는 기타 형광 단백질, 또는 유세포분석에 의해 검출될 수 있는 유전자 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 12

융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 포함하는 바이러스 발현 벡터로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 i) 프로모터, ii) 신호 펩티드를 암호화하는 서열, iii) 관심 폴리펩티드를 암호화하는 서열, iv) 임의의 에피토프 태그를 암호화하는 서열, 및 v) 글리코실포스파티딜이노시톨, GPI, 부착에 대한 C-말단 신호 펩티드를 암호화하는 서열 또는 막횡단 도메인을 암호화하는 서열을 포함하는, 바이러스 발현 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 유도성 프로모터는 테트라사이클린 제어 프로모터이거나, 구성적 프로모터를 포함하는 기타 적합한 프로모터 서열인, 벡터.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 에피토프 태그는 히스티딘 태그(His-태그), myc-태그, FLAG-태그, 작은 유비퀴틴 유사 변형자 태그(SUMO-태그), 단백질 C의 중쇄 태그(HPC), 칼모듈린 결합 펩티드 태그(CBP-태그) 및 헤마글루티닌 태그(HA-태그)로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 기타 에피토프 태그 또는 기타 표지 그룹인,

백터.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 폴리펩티드는 치료적 단백질, 예컨대 치료적 항체인, 백터.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 백터는 렌티바이러스 백터인, 백터.

청구항 17

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 형질도입 마커 단백질, 바람직하게는 적색 형광 단백질인 RFP를 암호화하는 서열을 추가로 포함하는, 백터.

청구항 18

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 바이러스 백터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 19

제18항에 있어서, 숙주 세포의 세포막 표면에 융합 단백질을 제시하고, 상기 융합 단백질은 GPI 부착에 의해 또는 막관통 도메인을 통해 상기 세포막에 부착되는, 숙주 세포.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 숙주 세포는 CHO 세포, HeLa 세포, HEK293 세포, BHK 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, NIH3T3 세포, MDCK 세포 및 WI38 세포로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 CHO 세포이거나 렌티바이러스로 형질도입될 수 있는 임의의 기타 세포 유형인, 숙주 세포.

청구항 21

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 다수의 바이러스 백터들을 포함하는 DNA 라이브러리로서, 상기 백터들은 관심 폴리펩티드에 대한 다양한 후보 신호 펩티드들을 암호화하는 것인, DNA 라이브러리.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 재조합 단백질 생산 분야에 관한 것이다. 특히, 본 개시내용은 다양한 신호 펩티드로부터 관심 단백질을 숙주 세포 밖으로 효율적으로 분비하는 특정 신호 펩티드를 선택하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 전위는 모든 세포 단백질의 약 30%가 원형질막을 가로질러 그 안으로 이동하는 것을 기반으로 하는 동적 메커니즘이다(Gemmer, Forster 2020). 이 과정은 소포체(ER) 막에 위치한 다수의 하위 단위 단백질 복합체인 트랜스로콘에 의해 촉진된다. 보편적으로 보존된 이중삼량체 단백질 채널 Sec61은 트랜스로콘의 코어를 형성한다.

[0003] 리보솜이 진행 세포의 세포질에서 분비 단백질 합성을 시작할 때, 초기 폴리펩티드 사슬의 아미노 말단에 위치한 ER 신호 펩티드(SP) 서열이 리보솜을 ER 막으로 향하게 한다. 초기 단백질의 SP 서열은 신호 인식 입자(SRP)에 의해 인식되고, 성장하는 폴리펩티드는 ER 막을 가로질러 전위된다. 따라서 SP는 단백질 분비 경로와 단백질 표적 위치를 표시하는 우편 번호로서 기능한다 (Blobel, Dobberstein 1975). 컴퓨터를 이용한 연구 및 실험적 연구를 기반으로, SP 서열은 다음 3개의 특징적인 영역으로 나뉜다: 친수성 N-말단 영역을 함유하는 양전하를 띤 아미노산, 소수성 코어 영역, 및 일반적으로 극성 아미노산 잔기를 함유하는 신호 펩티다제에 대한 절단 부위가 있는 C-말단 영역(von Heijne 1985).

[0004] ER의 내강으로의 분비 단백질의 신호 펩티드 매개 전위는 분비 경로 내의 병목 현상으로 식별되었으며, 따라서

제조합 단백질의 강력한 생산을 달성하기 위해 해결해야 할 핵심적인 문제를 나타낸다. 신호 펩티드는 극도로 이종성이며, 많은 신호 펩티드는 상이한 종 간에서 또한 기능적으로 상호교환이 가능한 것으로 나타났다(Tan, Ho 등 2002). 반면에, 상이한 신호 펩티드는 단백질 분비와 생산된 단백질의 기능에 근본적으로 상이한 효과를 발휘할 수 있다 (Kober 등 2013). 따라서, 단백질 분비 효율은 신호 펩티드 서열에 의해 크게 영향을 받을 수 있다. 이러한 관찰은 포유동물 계에서 최대량의 제조합 단백질을 생산하는 것을 목표로 할 경우 신호 펩티드 최적화의 중요성을 크게 나타낸다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 현재의 신호 펩티드 최적화 방법은 개별적인 신호 펩티드에 대한 힘든 테스트에 의존하고 있으며(Kober 등 2013), 이는 테스트될 수 있는 서열 수를 제한하므로 최적의 신호 펩티드를 발견할 가능성을 낮추거나 엄청나게 오랜 시간이 걸린다.

과제의 해결 수단

[0006] 요약

[0007] 이 특허 출원에서, 본 발명자들은 포유동물 세포에서 치료적으로 관련된 단백질의 높은 수준의 생산을 가능하게 하는 최적의 신호 펩티드를 찾기 위해 수천 개의 신호 펩티드들을 신속하고 효율적인 고처리량으로 스크리닝할 수 있는 스크리닝 플랫폼을 제시한다(도 1 및 6). 본 개시내용은 2개의 모델 단백질인, 슈퍼 폴더 GFP, 및 인자 VII 또는 인자 IX 결핍에 의해 유발되는 혈우병 유사 출혈 장애를 치료하는데 활용되는 치료적 단백질인, 응고 인자 VII(FVII)의 신호 펩티드 최적화를 위한 플랫폼의 상세한 용도를 포함한다.

[0008] 물리적 신호 펩티드 스크리닝 플랫폼에 더하여, 생명공학적으로 중요한 다양한 단백질 생산에 최적인 신호 펩티드를 예측하는 인공지능 방법도 설계했다. 이는 본 기술 분야에서 관심 분야인 것으로 보이므로 이 접근법은 본 개시내용의 중요한 부분을 형성할 것으로 보인다.

[0009] 본 개시내용의 양태에서, 본 발명자들은 포유동물 세포에서 이중 폴리펩티드의 효율적인 발현 및 분비를 위한 신호 펩티드를 스크리닝하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:

[0010] a) 다양한 후보 신호 펩티드들과 관심 폴리펩티드를 암호화하는 바이러스 발현 벡터의 풀을 제공하는 단계로서, 여기서 상기 풀의 각각의 바이러스 발현 벡터는 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 포함하고, 상기 폴리뉴클레오타이드는 i) 프로모터, ii) 신호 펩티드를 암호화하는 서열, iii) 관심 폴리펩티드를 암호화하는 서열, iv) 임의로 에피토프 태그를 암호화하는 서열, 및 v) 글리코실포스파티딜이노시톨, GPI, 부착에 대한 C-말단 신호 펩티드를 암호화하는 서열 또는 막횡단 도메인을 암호화하는 서열을 포함하는, 단계;

[0011] b) 각 숙주 세포가 바람직하게는 폴로부터 평균적으로 단 하나의 바이러스 벡터에 의해 형질전환되도록, 상기 바이러스 벡터의 풀로 숙주 세포를 형질전환 하는 단계;

[0012] c) 상기 숙주 세포 표면에 GPI 정박(anchored)되거나 대안적으로 상기 융합 단백질의 막관통 도메인에 의해 숙주 세포 표면에 정박된, 융합 단백질들을 생산하기 위해 상기 숙주 세포에서 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계;

[0013] d) 상기 관심 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 시약, 바람직하게는 항체와 상기 숙주 세포를 접촉시키는 단계로, 대안적으로 상기 에피토프 태그가, 당해 에피토프 태그에 특이적으로 결합하는 제1 결합 시약과 함께 융합 단백질에 존재하는 경우, 여기서 상기 결합 시약은 임의로, 형광 표지 또는 기타 검출 수단으로 표지된, 단계;

[0014] e) 상기 제1 결합 시약이, 표지된 결합 시약이 아닌 경우 형광 표지로 표지된 제2 결합 시약, 바람직하게는 항체와 상기 숙주 세포를 임의로 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 제2 결합 시약은 상기 제1 결합 시약에 특이적으로 결합하는, 단계;

[0015] f) 상기 형질전환된 숙주 세포들을 각 숙주 세포의 형광 특성을 기준으로 적어도 2개의 그룹으로 나누는 단계; 및

[0016] g) 상기 숙주 세포에서 관심 폴리펩티드에 대한 최적의 신호 펩티드를 식별하기 위해 가장 효율적인 융합 단백

질 발현을 나타내는 숙주 세포 그룹에 대해 차세대 염기서열분석을 수행하는 단계.

[0017] 본 개시내용의 또 다른 양태에서, 본 발명자들은 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 포함하는 바이러스 발현 벡터를 제공하며, 상기 폴리뉴클레오타이드는 i) 프로모터, ii) 신호 펩티드를 암호화하는 서열, iii) 관심 폴리펩티드를 암호화하는 서열, iv) 임의로 에피토프 태그를 암호화하는 서열, 및 v) 글리코실 포스파티딜이노시톨, GPI, 부착에 대한 C-말단 신호 펩티드를 암호화하는 서열을 포함한다.

[0018] 본 개시내용의 추가 양태에서, 본 발명자들은 1) 본 개시내용에 따른 바이러스 벡터를 포함하는 숙주 세포, 및 2) 본 개시내용에 따른 다수의 바이러스 벡터를 포함하는 DNA 라이브러리를 제공하며, 여기서 벡터는 관심 폴리펩티드에 대한 다양한 후보 신호 펩티드를 암호화한다.

도면의 간단한 설명

[0019] **도 1.** 본 발명의 신호 펩티드(SP) 스크리닝 플랫폼의 그래픽 표현. a) 기능적 및 비기능적 신호 펩티드를 갖는 GPI 정박, 에피토프 태그된 관심 단백질(POI-EPI-GPI)의 운명에 대한 개략도. 기능적 신호 펩티드는 단백질이 접히고 성숙되는 ER에 대한 관심 단백질을 표적으로 한다. 올바르게 접히고 가공된 POI-EPI-GPI는 세포질 표면으로 이동되며, 여기서 단백질은 에피토프 태그 또는 접힌 POI 결합 항체로 표지될 수 있다. 신호 펩티드가 POI의 ER 표적화 또는 그 성숙 또는 접힘을 촉진하지 않는 경우(즉, 기능적이지 않음), 세포질에 머무르거나(잘못된 표적화) POI는 ER 관련 분해 경로에 의해 세포질로 향하게 되고(잘못된 접힘/성숙) 세포질 프로테아좀에 의해 분해된다. b) 신호 펩티드 스크리닝 처리의 작업흐름. DNA 올리고 풀을 암호화하는 신호 펩티드는 합성되고 바람직하게는 POI-EPI-GPI 암호화 렌티바이러스 전달 플라스미드 내로 배치로(in batch) 클로닝될 것이다. 인간 또는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포는 MOI가 낮은 SP-POI-EPI-GPI 암호화 작제물로 형질도입되므로 평균적으로 하나의 형질도입된 세포는 하나의 SP-POI-EPI-GPI 암호화 작제물만을 함유한다. SP-POI-EPI-GPI 외에 iRFP 단백질을 형질도입 마커로 바람직하게 발현하는 형질도입 세포를 에피토프 태그 인식 항체(항-EPI)로 염색된 후, 항-EPI 신호를 기반으로 분류될 것이다. 대안적으로, 접힌 단백질 인식 항체를 세포 염색에 사용할 수도 있다. 게놈 통합 렌티바이러스 작제물의 SP 삽입 코딩 영역은 증폭된 후 차세대 염기서열분석으로 식별될 것이다. 강력하고 약한 항-EPI/항-접힌 단백질 신호를 나타내는 세포 집단에서 SP의 염기서열분석 관독을 비교하면 최고 수준의 POI 생산을 촉진하는 SP를 식별할 수 있다. 차세대 염기서열분석 이전의 농축 제어로서, 분류된 풀에 있는 신호 펩티드의 특정 농축이 qPCR로 평가된다.

도 2. (a) 렌티바이러스 발현 카세트. 신호 펩티드(SP) 라이브러리와 관심 단백질(POI)이 클로닝되는 가변 영역 1 및 2. (b) 발현 숙주 외부로 분비되어 GPI/TM 앵커를 통해 원형질막에 표시되는 번역된 단백질 폴리펩티드의 도식적 표현. LTR: 긴 말단 반복, 프로모터: 유도성 프로모터, SP: 신호 펩티드, POI: 관심 단백질, GPI:글리코 포스파티딜이노시톨, TM: 막횡단 도메인, IRES: 내부 리보솜 진입 부위, 형질도입 마커: 형광 단백질, N: 아미노 말단, C: 카복시 말단. (c) 본 발명의 실험에서, 작제물은 POI로서의 응고 인자 VII(FVII)를 포함하고, 에피토프 태그는 3xFLAG-태그이다.

도 3. qPCR/RT-PCR를 이용한 농축된 SP 식별. 단계 1에서, CHO 세포를 발현하는 GFP는 GFP 발현 수준에 따라 두 개의 별개의 튜브로 분류된다; Hi-GFP(Q2) 및 Low-GFP(Q3). 단계 2 및 단계3에서, 분류된 세포의 게놈 DNA를 추출하여 qPCR/RTPCR의 주형으로 사용한다. 부위 특이적 프라이머는 qPCR에 의해 신호 펩티드 영역을 증폭하는 데 사용된다. 낮은 GFP 세포는 아주로시딘 전단백질(preprotein) SP를 함유한다. GFP: 녹색 형광 단백질, RFP: 적색 형광 단백질, gDNA: 게놈 DNA, Hi-GFP: 높은 수준의 GFP 발현 세포, Low-GFP: 낮은 수준의 GFP 발현 세포, qPCR: 정량적 중합효소 연쇄 반응, RT-PCR: 역전사 PCR.

도 4. 특정 SP는 응고 인자 VII(FVII) 발현 수준에 영향을 미친다. (a) 작제물 1: ORI SP FVII 및 작제물 2: IgK SP FVII로 형질도입된 항 FLAG 항체 염색된 HEK293T 세포의 웨스턴 블롯(예상 단백질 크기는 50 kDa). (b) 50 kDa 밴드의 평균 강도를 기준으로 상대적인 발현 수준 정량화.

도 5. GPI 정박 FVII의 항체 염색을 통해 차별적으로 염색된 세포를 분류할 수 있다. (a) 음성 대조군의 FACS 플롯: 독시사이클린으로 유도되고 1차(항-FLAG) 및 2차(AlexaFluor 647) 항체 둘 모두로 염색된 HEK293T 세포. (b) 음성 대조군의 FACS 플롯: 독시사이클린으로 유도되고 2차(AlexaFluor 647) 항체로만 염색된 SP 라이브러리 FVII 형질도입 HEK293T 세포. (c) 독시사이클린으로 유도되고 1차(항-FLAG) 및 2차(AlexaFluor 647) 항체 둘 모두로 염색된 SP 라이브러리 FVII 형질도입 HEK293T 세포의 FACS 플롯으로서, 1.2%의 세포는 형질도입 마커(tRFP)와 2차 항체 신호를 모두 제공한다(Q2 내에서 점선 상자로 강조 표시됨).

도 6은 본 개시내용의 신호 펩티드 스크리닝 플랫폼에 사용되는 단계별 작업흐름을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 실시양태
- [0021] 본원에서 용어 "신호 펩티드"는 세포 외부로 분비되어 세포막을 통과하는 분비 단백질의 N-말단의 일부인 펩티드를 의미한다. 신호 펩티드는 보통 대략 10 내지 30개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이후 세포막에 특이적인 프로테아제에 의해 절단되어 제거되고 분비성 단백질만 세포 외부로 전달된다. 신호 펩티드는 표적 신호 역할을 하여 세포 수송 머신이 단백질을 특정 세포내 또는 세포외 위치로 보낼 수 있도록 한다. 현재까지 진행 세포에 존재하는 4000개 초과 신호 펩티드가 공지되어 있다. 신호 펩티드를 암호화하는 DNA 라이브러리는 예를 들어 WO2021045541A1 및 KR20210028116A에 개시되어 있다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 "관심 단백질" 또는 "POI"는 적합한 숙주 세포를 사용하여 높은 효율로 생산하고자 하는 단백질을 의미한다. POI는 바람직하게는 항체와 같은 치료학적 또는 진단학적으로 유의한 단백질이다.
- [0023] 본원에서 용어 "에피토프 태그" 또는 EP는 유전 공학의 수단에 의해 단백질의 동일한 오픈 리딩 프레임 내에 에피토프를 암호화하는 서열을 배치함으로써 태그(전형적으로 6 내지 30개의 아미노산)가 재조합 단백질에 융합되는 기술을 지칭한다. 항체를 사용할 수 있는 에피토프 태그를 선택함으로써, 이 기술을 사용하면 항체를 사용할 수 없는 태그된 단백질을 검출할 수 있다. 적절한 에피토프 태그 및 항체 쌍을 선택하면 웨스턴 블롯 분석, 면역침전, 면역화학, 친화성 정제 등과 같은 원하는 실험 적용에 적합한 특성과의 조합을 찾는 것이 가능하다. 바람직한 에피토프 태그는 예를 들어 히스티딘 태그(His-태그), myc-태그, FLAG-태그, 작은 유비퀴틴 유사 변형자 태그(SUMO-태그), 단백질 C의 중쇄 태그(HPC), 칼모둘린 결합 펩티드 태그(CBP-태그) 및 헤마글루티닌 태그(HA-태그)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0024] 본원에서 용어 "GPI 정박"은 진행 세포의 외부 표면에서 발견되는 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 정박 단백질을 지칭한다. 이들 분비된 단백질은 단백질의 C-말단에 공유적으로 부착된 GPI 모이어티와 함께 원형질 막에 정박된다. GPI 모이어티는 보존된 코어 글리칸, 포스파티딜이노시톨 및 글리칸 측쇄로 이루어진다. 코어 글리칸의 구조는 EtNP-6Man α 2-Man α 6-(EtNP)2Man α 4-G1N α 6-myoIno-P-지질(EtNP, 에탄올아민 인산염; Man, 만노스; GlcN, 글루코사민; Ino, 이노시톨)이다. 본 개시내용에서, C-말단 신호 펩티드는 단백질을 GPI 부착으로 지시하며, 예를 들어, EP3389682를 참조한다.
- [0025] 본원에서 용어 "막관통 도메인"은 숙주 세포막을 통과하는 소수성 알파 나선 구조를 지칭한다. 막관통 도메인은 본 발명의 벡터에 의해 암호화된 융합 단백질의 C-말단 부분에 직접 융합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 막관통 도메인은 내재 막 단백질(예를 들어, 수용체, 분화 클러스터(CD) 분자, 효소, 수송체, 세포 부착 분자 등)로부터 유래된다. 바람직한 실시양태에서, 막관통 도메인은 인간 VCAM-1 단백질(혈관 세포 부착 분자 1)로 예시되는 유형 1 막관통 단백질로부터 유래된다. 유형 I 막관통 단백질은 정지-전달 정박 서열을 사용하여 지질막에 정박되며 성숙한 형태의 단백질이 세포막에 위치할 때 세포외 공간을 표적으로 하는 N-말단 도메인을 갖는다. 본 개시내용에 따른 막관통 도메인의 추가 예는 Tim1, Tim2 및 Tim3 막관통 도메인, FcR 막관통 도메인 및 CD8a 막관통 도메인을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 추가 막관통 도메인은 EP3389682에 개시되어 있다.
- [0026] 본원에서 용어 "벡터"는 또 다른 핵산 분자의 세포 내로의 진입, 예를 들어 전달, 수송을 매개할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 데 사용된다. 전달된 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 연결, 예를 들어 벡터 핵산 분자 내로 삽입된다. 벡터는 자가 복제(autonomous replication)를 지시하는 서열을 포함할 수 있거나, 숙주 세포 DNA로의 통합을 허용하기에 충분한 서열을 포함할 수 있다. 유용한 벡터에는 예를 들어 플라스미드, 코스미드 및 바이러스 벡터가 포함된다. 유용한 바이러스 벡터에는 예를 들어 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스 및 렌티바이러스가 포함된다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 바이러스 벡터는 전달된 핵산의 진입을 매개하는 핵산(들) 이외에 다양한 바이러스 구성요소를 포함할 수 있다. 따라서, 용어 바이러스 벡터는 핵산을 세포 내로 전달할 수 있는 바이러스 또는 바이러스 입자 또는 전달된 핵산 자체를 지칭할 수 있다.
- [0027] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 포유동물 세포에서 이중 폴리펩티드의 효율적인 발현 및 분비를 위한 신호 펩티드를 스크리닝하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0028] a) 다양한 후보 신호 펩티드들과 관심 폴리펩티드를 암호화하는 바이러스 발현 벡터의 풀을 제공하는 단계로서, 여기서 상기 풀의 각각의 바이러스 발현 벡터는 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도

포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 i) 프로모터, ii) 신호 펩티드를 암호화하는 서열, iii) 관심 폴리펩티드를 암호화하는 서열, iv) 임의로 에피토프 태그를 암호화하는 서열, 및 v) 글리코실포스파티딜이노시톨, GPI, 부착에 대한 C-말단 신호 펩티드를 암호화하는 서열 또는 막횡단 도메인을 암호화하는 서열을 포함하는 것인 단계;

[0029] b) 각 숙주 세포가 바람직하게는 폴로부터 평균적으로 단 하나의 바이러스 벡터에 의해 형질전환되도록, 상기 바이러스 벡터의 폴로 숙주 세포를 형질전환 하는 단계;

[0030] c) 상기 숙주 세포 표면에 GPI 정박되거나 대안적으로 상기 융합 단백질의 막관통 도메인에 의해 상기 숙주 세포 표면에 정박된, 융합 단백질을 생산하기 위해 상기 숙주 세포에서 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계;

[0031] d) 상기 관심 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 시약, 바람직하게는 항체와 상기 숙주 세포를 접촉시키는 단계로, 대안적으로 상기 에피토프 태그가, 당해 에피토프 태그에 특이적으로 결합하는 제1 결합 시약과 함께 융합 단백질에 존재하는 경우, 여기서 상기 결합 시약은 임의로, 형광 표지 또는 기타 검출 수단으로 표지된, 단계;

[0032] e) 상기 제1 결합 시약이 표지된 결합 시약이 아닌 경우, 형광 표지로 표지된 제2 결합 시약, 바람직하게는 항체와 상기 숙주 세포를 임의로 접촉시키는 단계로서, 여기서, 상기 제2 결합 시약은 상기 제1 결합 시약에 특이적으로 결합하는, 단계;

[0033] f) 상기 형질전환된 숙주 세포들을 각 숙주 세포의 형광 특성을 기준으로 적어도 2개의 그룹으로 나누는 단계; 및

[0034] g) 상기 숙주 세포에서 관심 폴리펩티드에 대한 최적의 신호 펩티드를 식별하기 위해, 가장 효율적인 융합 단백질 발현을 나타내는 숙주 세포 그룹에 대해 차세대 염기서열분석을 수행하는 단계.

[0035] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 방법의 단계 a)에서 관심 폴리펩티드를 암호화하는 상기 바이러스 발현 벡터의 풀은

[0036] - 다양한 신호 펩티드들 및 이들의 상보적 서열을 암호화하는 올리고뉴클레오티드의 라이브러리를 합성하고, 여기서, 상기 올리고뉴클레오티드는, 라이브러리 내의 상보적 올리고뉴클레오티드에 결합될 때 서열의 유리 말단 모두에서 제한 부위 오버행을 형성하고;

[0037] - 상기 라이브러리에 존재하는 상보적 올리고뉴클레오티드와 라이브러리의 올리고뉴클레오티드를 어닐링하여 상기 제한 부위 오버행을 갖는 이중 가닥 DNA 단편을 생산하고; 및

[0038] - 상기 이중 가닥 DNA 단편을 적합한 클로닝 부위를 갖는 바이러스 벡터에 결합시켜 신호 펩티드를 암호화하는 DNA 단편을 관심 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 결합시켜, 다양한 후보 신호 펩티드들과, 관심 폴리펩티드를 암호화하는 바이러스 발현 벡터 풀을 생산하는 것에 의해 제조된다.

[0039] 바람직한 실시양태에서, 다양한 신호 펩티드들을 암호화하는 올리고뉴클레오티드의 라이브러리는 진핵생물, 바람직하게는 포유동물, 박테리아 또는 바이러스 단백질의 공지된 신호 펩티드들, 이의 변형 및/또는 인공 서열을 포함한다.

[0040] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은

[0041] h) 단계 g)에서 검출된 상기 최적 신호 펩티드와 관심 폴리펩티드의 조합을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제2 발현 벡터에 클로닝하고, 숙주 세포를 상기 제2 벡터로 형질전환시키고, 상기 숙주 세포에서 상기 폴리펩티드를 생산하는 단계를 추가로 포함한다.

[0042] 바람직한 실시양태에서, 벡터의 상기 프로모터는 유도성 프로모터, 바람직하게는 테트라사이클린 제어 프로모터이다.

[0043] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 포함하는 바이러스 발현 벡터에 관한 것이며, 상기 폴리뉴클레오티드는 i) 프로모터, ii) 신호 펩티드를 암호화하는 서열, iii) 관심 폴리펩티드를 암호화하는 서열, iv) 임의로 에피토프 태그를 암호화하는 서열, 및 v) 글리코실포스파티딜이노시톨, GPI, 부착에 대한 C-말단 신호 펩티드를 암호화하는 서열을 포함한다.

[0044] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 1) 본 개시내용에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포 또는 2) 본 개시내용에 따른 다수의 바이러스 벡터를 포함하는 DNA 라이브러리에 관한 것이며, 여기서 벡터는 관심 폴리펩티드에 대한 다양한 후보 신호 펩티드를 암호화한다.

- [0045] 하기의 실시예는 하나 이상의 특정 응용 분야에서 본 발명의 원리를 예시하지만, 형태, 사용법 및 구현의 세부 사항에 대한 수많은 변형이 창의적인 능력을 발휘하지 않고, 그리고 본 개시내용의 원리와 개념에서 벗어나지 않고 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명은 하기에 제시된 청구범위에 의한 것을 제외하고, 제한되도록 의도되지 않는다.
- [0046] 본 문서에서 동사 "포함하다(to comprise)"와 "포함하다(to include)"는 언급되지 않은 특징의 존재를 배제하거나 요구하지 않는 개방 한정(open limitations)으로 사용된다. 종속항에 인용된 특징은 달리 명시적으로 언급되지 않는 한 상호 자유롭게 결합 가능하다. 또한, 본 문서 전반에 걸쳐 "a" 또는 "an", 즉 단수형을 사용한다고 해서 복수형이 배제되는 것은 아니라는 점을 이해해야 한다.
- [0047] 본 명세서 전반에 걸쳐 한 실시양태 또는 일 실시양태에 대한 언급은 해당 실시양태와 관련하여 설명된 특정한 특징, 구조 또는 특성이 본 개시내용의 적어도 하나의 실시양태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐 다양한 위치에서 "한 실시양태에서", "일 실시양태에서" 또는 "바람직한 실시양태에서"라는 문구의 등장은 반드시 모두 동일한 실시양태를 언급하는 것은 아니다. 예를 들어 약 또는 실질적으로와 같은 용어를 사용하여 수치를 언급하는 경우, 정확한 수치도 개시된다.
- [0048] 실험 섹션
- [0049] **pINDUCER 기반 포유동물 발현 플라스미드 작제**
- [0050] 혈장-막 정박 형태로 관심 단백질(POI)을 발현시키는 렌티바이러스 전달 플라스미드는 본 발명의 신호 펩티드 스크리닝 플랫폼의 코어를 형성한다(도 1). 발현 작제물의 렌티바이러스 형질도입을 통해 POI의 높은 발현 수준을 나타내는 단일 신호 펩티드-POI 조합 운반 세포를 분리할 수 있다(도 1). 신호 펩티드의 고처리량 스크리닝은 본 발명의 렌티바이러스 작제물을 신호 펩티드 라이브러리의 대규모 유전자 합성과 결합하고, 풀링되고 유세포 분석으로 분류된 세포 샘플에서 최적의 신호 펩티드를 식별하기 위한 차세대 염기서열분석을 사용하여 달성할 수 있다(도 1). 이 대규모 병렬 신호 펩티드 스크리닝 플랫폼을 사용하면 신호 펩티드의 개별 테스트에 의존하는 현재의 신호 펩티드 최적화 방법보다 더 빠르고 포괄적인 방식으로 단백질 생산을 위한 최적의 신호 서열을 식별할 수 있다.
- [0051] 테스트된 신호-펩티드-관심 단백질 작제물의 게놈 통합을 위해 본 발명에서 사용한 렌티바이러스 전달 플라스미드(도 2)는 pINDUCER11 플라스미드(Meerbrey, Hu 등 2011)를 기반으로 하며, 기존의 형질도입 마커(GFP)는 오버랩 확장 PCR로 IRES-tRFP 또는 IRES-iRFP670 삽입물을 증폭시킨 다음 AscI 및 AscI 및 PacI 제한 효소(NEB) 분해 및 T4 리가제(NEB)와의 후속 결합에 의해 iRFP670 (Shcherbakova, Verkhusha 2013) 또는 tRFP (Strack, Strongin 등 2008)으로 변화된다.
- [0052] 슈퍼폴더-GFP의 신호 펩티드 스크리닝을 위해, SP-유비퀴틴 G76V(Ub(G76V))-sfGFP-GPI-정박 작제물이 별도의 Ub(G76V) (Dantuma, Lindsten 등 2000), sfGFP (Costantini, Balaban 등 2015) 및 GPI-정박 (Rhee, Pirity 등 2006) 삽입물로부터 오버랩 확장 PCR을 사용하여 조립되었다. 조립된 융합 단백질 삽입물은 기존 pINDUCER11 플라스미드의 tRFP-shRNA 삽입물 대신 클로닝되었다.
- [0053] FVII의 신호 펩티드 스크리닝을 위해, 햄스터 코돈 최적화된 비활성 FVII(D302N)-돌연변이를 함유하는 DNA 작제물을 Twist Biosciences에서 SP-3xFLAG-태그-FVII-GPI 또는 SP-HA-태그-FVII-GPI 융합 단백질 유전자 단편으로 주문했다. 이러한 융합 단백질 암호화 DNA 작제물은 기존의 pINDUCER11 플라스미드의 tRFP-shRNA 삽입물 대신 클로닝되었다.
- [0054] 변형된 pINDUCER11 플라스미드의 기능적 구성 요소:
- [0055] · CMV 프로모터: 관심 유전자의 발현을 유도하는 독시사이클린 유도성 프로모터
- [0056] · 향상된 녹색 형광 단백질(eGFP): 본 발명의 개념 증명 실험에서 관심 유전자로 사용됨.
- [0057] · 내부 리보솜 진입 부위(IRES): 캡 독립적 방식으로 번역 개시를 가능하게 한다.
- [0058] · 트랜스액티베이터 3 (rtTA3): 구성적 프로모터 hUBC 하에서 CMV 프로모터의 독시사이클린 유도를 제어한다.
- [0059] · 인간 유비퀴틴 C 프로모터(hUBC): 이소성 iRFP670 또는 tRFP 발현을 유도하는 구성적 프로모터.
- [0060] · iRFP670: 구성적 프로모터 hUBC 하의 형질도입 리포터 단백질.

[0061] · tRFP: 구성적 프로모터 hUBC 하의 형질도입 리포터 단백질

[0062] · SV40 유전자: 플라스미드 복제 영역

[0063] 신호 펩티드를 발현 플라스미드로 클로닝

[0064] 방향성 클로닝을 위해, 올리고뉴클레오타이드와 원형 pINDUCER 벡터를 어닐링하여 생성된 SP 삽입물을 2개의 RE, MluI 및 NotI로 이중 분해했다. 추가적으로, 이중 분해된 pINDUCER 벡터는 벡터의 자가 결찰을 피하기 위해 5' 말단의 탈인산화를 비특이적으로 촉매하는 쉬림프 알칼리성 포스파타제(rSAP)로 처리되었다. 그러나 DNA 단편의 결찰에는 포스포디에스테르 결합을 형성하기 위해 5' 포스페이트 기가 필요하며, 이중 분해된 올리고뉴클레오타이드는 ATP 존재 하에 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제(NEB)를 사용하여 열 순환기에서 인산화되었다. 따라서, 생성된 SP 삽입물과 선형 pINDUCER 벡터를 T4DNA 리가제(NEB)를 사용하여 함께 공유적으로 결찰시켰다. 전체 결찰 혼합물을 stable3 (Thermo Fisher) 화학적 수용성(competent) 대장균 세포로 형질전환하고 압피실린 항생제(100 μg/ml)가 함유된 LB 한천 플레이트에서 성장시켰다. 생성된 콜로니는 생어 염기서열분석에 의해 올바른 SP 삽입에 대해 스크리닝되었다.

[0065] 표준 조건 하의 세포주 및 이들의 배양

[0066] 인간 배아 신장 293 세포(HEK293T)(Thermo-Fisher Scientific)를 10% 소 태아 혈청(FBS) 및 0.5% L-글루타민을 함유하는 DMEM에서 부착성 단층으로 배양했다. FreeStyle 중국 햄스터 난소 (CHO) 현탁액 적응(CHO-S) 세포(Thermo-Fisher Scientific)를 FreeStyle™ CHO 배지(Thermo-Fisher Scientific)에서 현탁액 배양물로 성장시켰다. 두 세포주 모두 37℃, 5% CO₂의 표준 조건에서 배양되었다.

[0067] 실시예 1. 개념 증명 실험

[0068] 모델 단백질 1: 녹색 형광 단백질(GFP)

[0069] sfGFP를 사용한 개념 증명 실험을 위해 다음 신호 펩티드가 선택되었다: SP1(인터루킨 4), SP2(혈청 알부민), SP3 fPrP(mut 17-21) SP4(아주로시딘 전단백질), SP5(셀룰라제), SP6(PrP), SP7(Vcam), SP8(FCRL-1).

[0070] 전술한 SP는 변형된 pINDUCER11(2 참조) 내로 클로닝되었다. MluI(NEB) 및 NotI(NEB) 에 대한 RE 부위가 활용되었다. 자세한 복제 전략은 본원에 설명되어 있다.

[0071] 각각의 신호 펩티드에 대해, 신호 펩티드를 코딩하는 각각의 서열을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다(Integrated Data Technologies로부터). 모든 올리고뉴클레오타이드의 측면에는 각각 5' 및 3' 말단에 MluI 및 NotI 제한 효소 부위가 있었다. 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 열 순환기(Bio-Rad)에서 어닐링하여 dsDNA 삽입물을 생성했다.

[0072] 모델 단백질 2: 응고 인자 FVII(FVII)

[0073] 관심 유전자를 함유하는 3세대 렌티바이러스 전달 플라스미드 pINDUCER11을 상기 개시된 바와 같이 설계하였다. FVII 발현 PMID에 대한 차등 효과를 기준으로 선택된 2개의 상이한 신호 펩티드(표 1) (Peng, Yu 등 2016)를 3xFLAG-태그-FVII-GPI 및 HA-태그-FVII-GPI 융합 작제물의 N-말단 내로 클로닝했다.

표 1. FVII와 사용되는 개별 천연 신호 펩티드

신호 펩티드	아미노산 서열	햄스터 코돈 최적화된 DNA 서열
IgK	METDTLLWVLLWVPGS TG (서열번호 1)	ATGGAGACCGACACCTGCTGCTGTGGTGTGCTGCTGTGG GTGCCCGGCTCCACCGGC (서열번호 2)
ORI	MVSQALRLCLLLGLQGC LA (서열번호 3)	ATGGTGTCCAGGCCCTGAGGCTGCTGTGCCCTGCTGCTGGC CTGCAGGGCTGCCTGGCC (서열번호 4)

[0074] a) 포유동물 세포에서 관심 단백질을 발현하는 렌티바이러스의 생산

[0076] 관심 유전자를 함유하는 3세대 렌티바이러스 전달 플라스미드 pINDUCER11을 상기 개시된 바와 같이 설계하였다. 다른 렌티바이러스 패키징 플라스미드 pVP157, pVP158, pVP159 및 pVP160은 Martin Kampmann/Jonathan Weissmann (Bassik, Kampmann 등 2013)으로부터 선물로 받았다.

- [0077] 렌티바이러스 생산은 다른 곳에서 기술된 바와 같이 폴리에틸렌이민(PEI) 매개 형질감염 프로토콜을 기반으로 했다(PMID: (Lobato-Pascual, Saether 등 2013, Bassik, Kampmann 등 2013). 간단히 말하면, Transporter 5® Transfection 시약(Polysciences, Germany)을 함유하는 양이온성 중합체 PEI를 사용하여 벡터를 HEK293T 세포에 전달하고 패키징했다. 총 800-1000 μg의 전달 플라스미드를 패키징 플라스미드와 혼합하였다. 전달 시약은 PBS에 희석하고 패키징 플라스미드와 혼합하였다. 이 혼합물을 실온에서 25분간 인큐베이션했다. 이 혼합물을 부착성 HEK293T 세포 배양물에 적가하여 균일하게 분포하도록 하였다. 세포를 형질감염 후 3일(72시간) 동안 인큐베이션하였다. 렌티바이러스를 함유하는 상청액을 수집하였다. 상청액 용액을 0.45 μ 여과 어셈블리를 사용하여 여과했다. 여과된 렌티바이러스를 분취량으로 수집하고 4℃에서 보관했다.
- [0078] **b) HEK293T 및 CHO 세포에서 바이러스 역가 측정**
- [0079] 렌티바이러스 적정을 위한 프로토콜은 (Tiscornia, Singer 등 2006)에서 채택되었다.
- [0080] **1일차:** 500 μl 세포가 포함된 시드 24웰 플레이트(각 웰에 100,000개 세포)
- [0081] **3일차:** 렌티바이러스 스톱의 4배 연속 희석이 배지에서 제조되었다.
- [0082] 바이러스 희석: 희석되지 않음, 1:4, 1:16, 1:64
- [0083] 24웰 플레이트의 웰로부터 배지를 제거하고 250 μL의 새로운 배지를 보충했다. 바이러스 희석액(20 μL)을 세포에 적가한 방식으로 첨가하고 부드럽게 혼합한 후 세포를 37℃에서 인큐베이션했다. 2-3시간 후 추가로 250 μL의 배지를 웰에 첨가했다. 세포를 48시간 동안 성장시켰다.
- [0084] **5일차:** 배지를 웰로부터 폐기했다. 세포를 150 μl의 PBS로 1회 세척했다. 30 μl의 트립신(0.5%)을 사용하여 세포를 제거한 다음 500 μl의 새로운 배지와 혼합했다. 다른 플레이트에는 400 μl의 새로운 배지를 3일차의 100 μl 세포와 함께 첨가했다. 그런 다음 세포를 37℃에서 3일 동안 인큐베이션했다.
- [0085] 이 단계를 추가로 3회 반복했다. 전체적으로 세포를 세척하고 일주일 동안 나누었다. 이러한 광범위한 세척 단계는 바이러스 입자를 제거하는 데 중요했다.
- [0086] **14일차:** 하기의 유세포 분석 섹션에 설명된 대로 FACS 분석을 위해 세포를 준비했다. FACS 분석을 수행하여 형광 리포터(GFP 및 mRFP) 양성 세포의 비율을 측정하였다.
- [0087] 바이러스 역가(VT = TU/mL, 형질도입 단위)는 다음 공식에 따라 계산되었다: $\text{형질도입 단위 (TU/ml)} = (N \times P) / (V \times D)$
- [0088] 식 중; N = 2일차 감염에 사용된 각 웰의 세포 수; P = GFP/RFP 양성 세포의 백분율(10%~20%여야 함); V = 각 웰의 감염에 사용된 바이러스 부피; 이 프로토콜에서는 $V(\text{ml}) = 20(\mu\text{l}) \times 10^{-3}$ 이다. D = 희석 배수; TU = 형질도입 단위.
- [0089] **c) 세포 표면 항체 염색 및 유세포 분석**
- [0090] HEK293T 및 CHO 세포는 FVII 융합 단백질 또는 렌티바이러스를 암호화하는 sfGFP 융합 단백질을 보유하는 3X-FLAG 또는 HA-태그로 형질도입되었다. 형질도입된 세포를 2회 분할하였다. 수확 24시간 전에, 세포를 1 μg/ml 독시사이클린으로 유도했다. 세포를 10 mM EDTA로 수확하였다. 실온에서 5분 동안 2400rpm으로 원심분리하여 세포를 펠렛화한 후 실온 FACS 완충액(1xPBS, 4% FBS, 10 mM EDTA)에 재현탁시켰다. FACS 분석을 위해 샘플 분취량을 보관하고 나머지는 실온에서 2400rpm으로 2분간 원심분리하여 펠렛화한 후 1 mL FACS 완충액에 재현탁했다. 원심분리를 반복한 후 배지를 제거했다(1회 세척). 세포 펠렛을 500 μl의 1차 항체 용액(표 2 참조)에 재현탁하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 다음 1 mL FACS 완충액으로 2회 세척했다. 그 후, 세포를 500 μl의 2차 항체 용액(표 2 참조)에 재현탁시키고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하고, 1 mL의 FACS 완충액으로 2회 세척한 후 최종적으로 FACS 완충액에 재현탁시켰다. FACS 측정 직전에 세포를 FACS 튜브에 2회 걸러낸 다음 BD LSRFortessa 유세포 분석기로 분석하거나 BD FACSAria II 유세포 분석기를 사용하여 모집단을 보여주는 낮은 항체 신호 및 높은 항체 신호로 분류했다(도 1 참조). 유세포 분석 데이터는 FlowJo 소프트웨어(Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA)를 사용하여 분석되었다.

표 2. 세포 염색에 사용되는 1차 및 2차 항체

GFP 태그에 대한 항체 용액:	FLAG 태그에 대한 항체 용액:	HA 태그에 대한 항체 용액:
1차 항체 래빗 pAb 항-GFP (PABG1)	1차 항체 마우스 항-FLAG M2	1차 항체 항-HA ab(ab9110)
2차 항체 염소 항-래빗 Alexa Fluor 546	2차 항체 염소 항-마우스 IgG H&L Alexa 647	2차 항체 항-래빗 680 RD

BD LSRFortessa 분석에 사용된 레이저 및 필터 파라미터는 다음과 같다:

1. iRFP 신호용 APC-A 및 항체: 염소 항-마우스 Alexa 647, 염소 항-래빗 Alexa Fluor 546
2. tRFP 신호용 PE-A
3. GFP 신호용 AlexaFluor488 및 항체: PGT145 Alexa 488
4. HA 신호용 AlexaFluor700 및 항체: 항-래빗 680 RD

qPCR에 의한 개별 신호 펩티드 식별

qPCR을 사용하여 혼합 풀 SP-POI 렌티바이러스 작제물로 형질도입된 세포로부터 관심 단백질(POI) 내로 융합된 개별 신호 펩티드를 식별했다. 이를 위해 유세포 분석기로 분류된 세포의 gDNA를 Nucleospin Blood Quickpure 또는 L 키트(Macherey Nagel)를 사용하여 단리했다. 특정 분류된 세포 집단(도 1 참조)에서 특정 신호 펩티드 함유 작제물의 농축은 신호-펩티드 특이적 프라이머를 사용하여 qPCR을 통해 표시되었다(표 3). qPCR은 75 ng gDNA, 1 μ M 정방향 및 역방향 프라이머 및 추가적인 1 mM $MgCl_2$ 를 함유하는 5 μ l 반응 혼합물에서 수행되었다. PCR 조건은 다음과 같다: 단계 1. 95 $^{\circ}$ C 10분, 단계 2. 95 $^{\circ}$ C 15초, 단계 3. 66 $^{\circ}$ C 5초, 단계 4. 72 $^{\circ}$ C 10초, 단계 2-4를 45회 사이클로 수행하고, 단계 5. 72 $^{\circ}$ C 5분.

표 3. SP-GFP 샘플의 qPCR 분석에 사용되는 정방향 및 역방향 프라이머

명칭	유형	서열
fAzurocidinP_SP	정방향 프라이머	GACCAGACTCACAGTGC 서열번호:5
fCellulaseP_SP	정방향 프라이머	GTTCCAGAGCACTCTTTG 서열번호:6
fFCRL1P_SP	정방향 프라이머	GTTGCTGTTGATCTGTGC 서열번호:7
fIL4P_SP	정방향 프라이머	CTGACCAGTCAACTCCTG 서열번호:8
f μ L_Ub_GF_SP	정방향 프라이머	GCTGGTGGTGTCAAATCTAC 서열번호:9
fSerumAlbuminPreprotein_S P	정방향 프라이머	GGTCACTTTCATTTCCTTGC 서열번호:10
reverse_primer_SP1-7	역방향 프라이머	CGTGAAGACTCTGACTGG 서열번호:11

차세대 염기서열분석에 의한 대규모 풀에서 신호 펩티드 식별

차세대 염기서열분석(NGS)을 활용하여 최고의 POI 발현으로 농축된 모든 신호 펩티드를 식별했으며, 이는 높은 항체 신호 유세포 분석으로 분류된 세포 집단을 보여준다(도 1 참조). 이를 위해 먼저 Nucleospin Blood Quickpure 또는 L 키트(Macherey Nagel)를 사용하여 유세포 분석기로 분류된 세포의 gDNA를 단리했다. 이배체 CHO 세포 계능의 대략 360,000개의 카피에 해당하는 2 μ g의 gDNA를 Q5 완충액(NEB), 0.2 mM dNTP, 0.5 mM 정방향 및 역방향 프라이머(표 4 참조), 4% DMSO, 1U Q5 핫 스타트 폴리머라제(NEB) 및 추가적인 2 mM $MgCl_2$ 가 함유

된 50 μ l PCR 반응 혼합물에 첨가했다. 그런 다음 PCR을 다음 파라미터로 수행했다. 단계 1. 98°C 3분, 단계 2. 98°C 30초, 단계 3. 61°C 15초, 단계 4. 72°C 15초, 단계 2-4를 25회 사이클로 수행하고, 단계 5. 72°C 5분.

[0102] 증폭된 SP 암호화 앰플리콘은 AMPure XP 비드(Beckman Coulter)를 사용하여 크기를 선택하고 최종적으로 MiSeq 염기서열분석(Illumina)으로 염기서열분석했다. 신호 펩티드를 부여하는 가장 높은 발현 수준은 형질도입되고 분류된 세포의 가장 높은 발현 1%와 나머지 99% 사이의 관독 농축을 비교함으로써 식별되었다.

표 4. SP-GFP 샘플에서 NGS 앰플리콘 제조에 사용되는 정방향 및 역방향 프라이머

명칭	유형	서열 1,2
fIllumSSlibgen	정방향 프라이머	<u>AATGATACGGCGACCCGAGATCTACACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAGAAGACACCGGGAACG</u> 서열번호:12
rIllumSSlibgen2	역방향 프라이머	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATCGCCGTGTGACTGGA</u> <u>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAGTCAGAGTCTTC</u> ACGAAG 서열번호:13
rIllumSSlibgen3	역방향 프라이머	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATGAAAGTGTGACTGGA</u> <u>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAGTCAGAGTCTTC</u> ACGAAG 서열번호:14
rIllumSSlibgen4	역방향 프라이머	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGATAGTTGTGACTGGA</u> <u>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAGTCAGAGTCTTC</u> ACGAAG 서열번호:15
rIllumSSlibgen5	역방향 프라이머	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGGTTGCCGTGACTGGA</u> <u>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAGTCAGAGTCTTC</u> ACGAAG 서열번호:16
rIllumSSlibgen6	역방향 프라이머	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGAAATGTCGTGACTGGA</u> <u>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAGTCAGAGTCTTC</u> ACGAAG 서열번호:17
rIllumSSlibgen7	역방향 프라이머	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTCCACCAGTGTGACTGGA</u> <u>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAGTCAGAGTCTTC</u> ACGAAG 서열번호:18

¹ = 각 프라이머의 일루미나 어댑터 서열은 밑줄로 표시된다.

² = 역방향 프라이머의 일루미나 어댑터에 있는 바코드 인덱스가 굵게 표시된다.

서로 다른 분류된 집단이 동일한 칩에서 염기서열분석된 경우, 각 개별 집단에서 앰플리콘을 제조하기 위한 역방향 프라이머를 함유하는 서로 다른 인덱스가 사용되었다.

[0103]

[0104]

일시적인 형질감염을 통한 단백질 생산 테스트

[0105]

Elisa 검정을 사용하여 본 발명의 SP 스크리닝 결과가 바이오제약 산업의 높은 수준의 단백질 생산을 모방하는 단백질 생산 조건으로 전환될 수 있음을 보여주었다. 본원에서 검정은 FVII와 sfGFP 둘 모두에 대한 신호 펩티드를 부여하는 최고 발현 수준을 식별한 후 수행되었다. 단백질을 함유하는 전술한 SP를 분비된 형태로 발현시키기 위해, 단백질 암호화 발현 플라스미드를 HEK293T 또는 CHO 세포, 또는 다른 적합한 포유동물 발현 숙주 세포에 일시적으로 형질감염시켰다.

[0106]

관심 표적에 따라, 분비된 단백질을 함유한 배지는 통상적으로 형질감염 후 3 내지 5일 후에 수확되었다. 발현 테스트 샘플을 원뿔형 튜브에 수집하고 세포를 펠렛화하기 위해 실온에서 5분 동안 500xg로 원심분리(Eppendorf)했다. 투명한(cleared) 상층액을 새로운 튜브에 넣고 분비된 sfGFP 또는 FVII의 양을 샌드위치 ELISA 검정을 사용하여 관심 표적에 대해 정량화했다.

[0107]

즉, POI 또는 그 에피토프 태그 결합 단백질을 96웰 ELISA 플레이트에 사전 코팅하였다. 그 다음, 수확된 투명한 발현 배지를 사전 코팅된 플레이트에 적용했다. 또한, 별개의 양성 및 음성 대조군(상업적, 정제된 POI 및 모의 형질감염된 세포로부터 수확된 배지 각각)을 사용하여 검정의 기능성을 검증하였으며; 이는 가능한 위양성

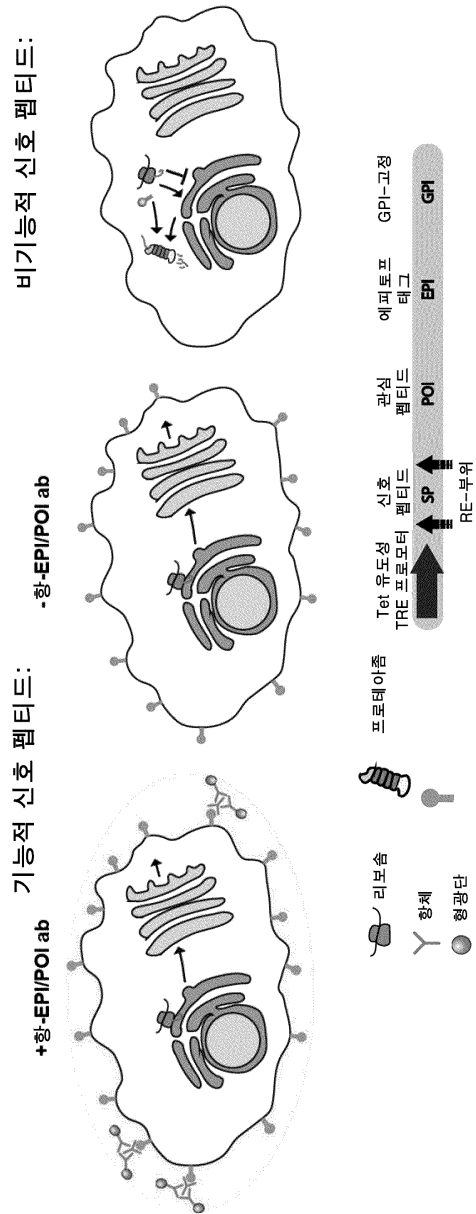
을 배제하고 표적에 대한 친화성을 기반으로 POI 발현 수준 및 기능성을 추정하기 위한 것이었다.

- [0108] 통상적으로 Elisa 테스트는 제조업체(예컨대 Thermo-Fisher Scientific)에서 권장하는 표준 절차에 따라 수행되었다. 포획 표적은 통상적으로 4℃에서 밤새 플레이트에 코팅되었다. 결합되지 않은 단백질을 검정 완충액으로 씻어내고; 세척을 3회 반복한 후 플레이트를 가볍게 두드려 건조시켰다. 상업용 차단 완충액(예를 들어 Thermo-Fisher Scientific 제품)을 모든 웰에 넣고 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 차단 완충액을 제거하고 투명한 발현 배지와 대조군을 웰에 추가했다. 이전에 설명한 대로 세척 단계를 반복하고 웰을 적합한 표지 항체(Thermo-Fisher Scientific)로 처리했다. 단백질-표적 복합체 신호를 검출하기 위해 플레이트를 종이 타월에 대고 가볍게 두드려 공기 건조시킨 후 차단 완충액 내 표지된 2차 검출 항체 50 μ l를 웰에 첨가했다. 과량의 검출 항체를 씻어내고 적합한 검정 완충액을 첨가했다. 신호는 ELISA 플레이트 판독기(Thermo-Fisher Scientific)를 사용하여 측정되었다.
- [0109] 필요한 경우 HRP 검출이 사용되었다. 이 경우 최종 단계에서 검정 완충액 대신 HRP 접합체와 HRP 기질을 첨가한 후 플레이트 판독기를 이용하여 검출하였다.
- [0110] 상기 방법의 결과는 도 3-5에 나와 있다.
- [0111] 참고문헌
- [0112] BASSIK, M.C., KAMPMANN, M., LEBBINK, R.J., WANG, S., HEIN, M.Y., POSER, I., WEIBEZAHN, J., HORLBECK, M.A., CHEN, S., MANN, M., HYMAN, A.A., LEPROUST, E.M., MCMANUS, M.T. and WEISSMAN, J.S., 2013. A systematic mammalian genetic interaction map reveals pathways underlying ricin susceptibility. *Cell*, **152**(4), pp. 909-922.
- [0113] BLOBEL, G. and DOBBERSTEIN, B., 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *The Journal of cell biology*, **67**(3), pp. 835-851.
- [0114] COSTANTINI, L.M., BALOBAN, M., MARKWARDT, M.L., RIZZO, M., GUO, F., VERKHUSHA, V.V. and SNAPP, E.L., 2015. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. *Nature communications*, **6**, pp. 7670.
- [0115] DANTUMA, N.P., LINDSTEN, K., GLAS, R., JELLNE, M. and MASUCCI, M.G., 2000. Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nature biotechnology*, **18**(5), pp. 538-543.
- [0116] GEMMER, M. and FORSTER, F., 2020. A clearer picture of the ER translocon complex. *Journal of cell science*, **133**(3), pp. 10.1242/jcs.231340.
- [0117] KOBER, L., ZEHE, C. and BODE, J., 2013. Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines. *Biotechnology and bioengineering*, **110**(4), pp. 1164-1173.
- [0118] LOBATO-PASCUAL, A., SAETHER, P.C., FOSSUM, S., DISSEN, E. and DAWS, M.R., 2013. Mincle, the receptor for mycobacterial cord factor, forms a functional receptor complex with MCL and Fc ϵ s1RI-gamma. *European journal of immunology*, **43**(12), pp. 3167-3174.
- [0119] MEERBREY, K.L., HU, G., KESSLER, J.D., ROARTY, K., LI, M.Z., FANG, J.E., HERSCHKOWITZ, J.I., BURROWS, A.E., CICCIA, A., SUN, T., SCHMITT, E.M., BERNARDI, R.J., FU, X., BLAND, C.S., COOPER, T.A., SCHIFF, R., ROSEN, J.M., WESTBROOK, T.F. and ELLEDGE, S.J., 2011. The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(9), pp. 3665-3670.
- [0120] PENG, L., YU, X., LI, C., CAI, Y., CHEN, Y., HE, Y., YANG, J., JIN, J. and LI, H., 2016. Enhanced recombinant factor VII expression in Chinese hamster ovary cells by optimizing signal peptides and fed-batch medium. *Bioengineered*, **7**(3), pp. 189-197.
- [0121] RHEE, J.M., PIRITY, M.K., LACKAN, C.S., LONG, J.Z., KONDOH, G., TAKEDA, J. and HADJANTONAKIS, A.K., 2006. In vivo imaging and differential localization of lipid-modified GFP-variant fusions in embryonic stem cells and mice. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, **44**(4), pp. 202-218.

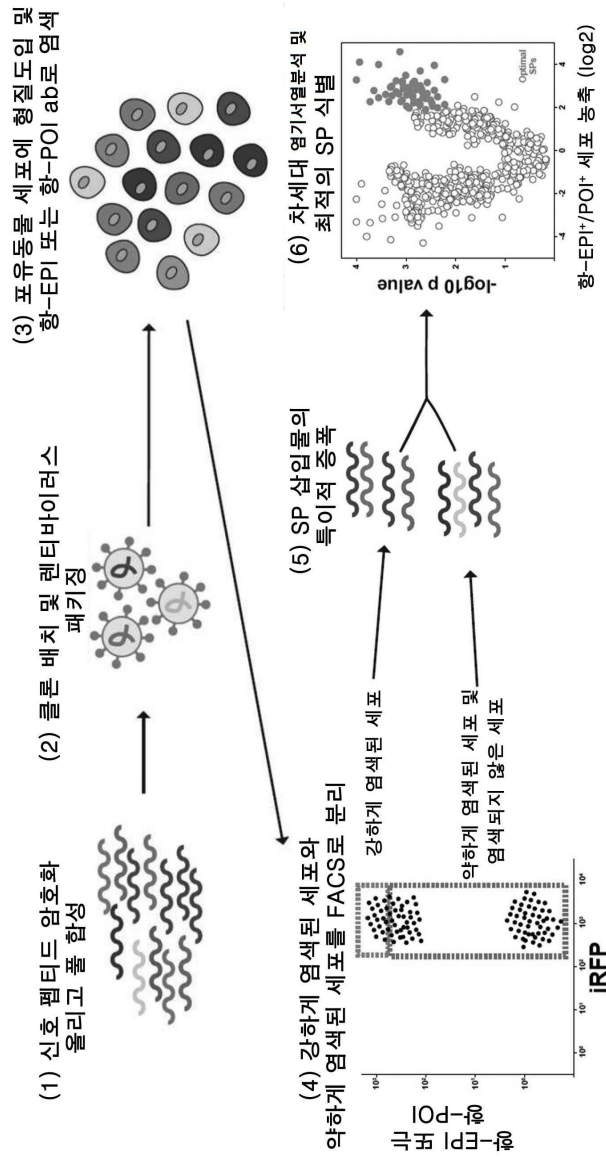
- [0122] SHCHERBAKOVA, D.M. and VERKHUSHA, V.V., 2013. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nature methods*, **10**(8), pp. 751-754.
- [0123] STRACK, R.L., STRONGIN, D.E., BHATTACHARYYA, D., TAO, W., BERMAN, A., BROXMEYER, H.E., KEENAN, R.J. and GLICK, B.S., 2008. A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nature methods*, **5**(11), pp. 955-957.
- [0124] TAN, N.S., HO, B. and DING, J.L., 2002. Engineering a novel secretion signal for cross-host recombinant protein expression. *Protein engineering*, **15**(4), pp. 337-345.
- [0125] TISCORNIA, G., SINGER, O. and VERMA, I.M., 2006. Production and purification of lentiviral vectors. *Nature protocols*, **1**(1), pp. 241-245.
- [0126] VON HEIJNE, G., 1985. Signal sequences. The limits of variation. *Journal of Molecular Biology*, **184**(1), pp. 99-105.

도면

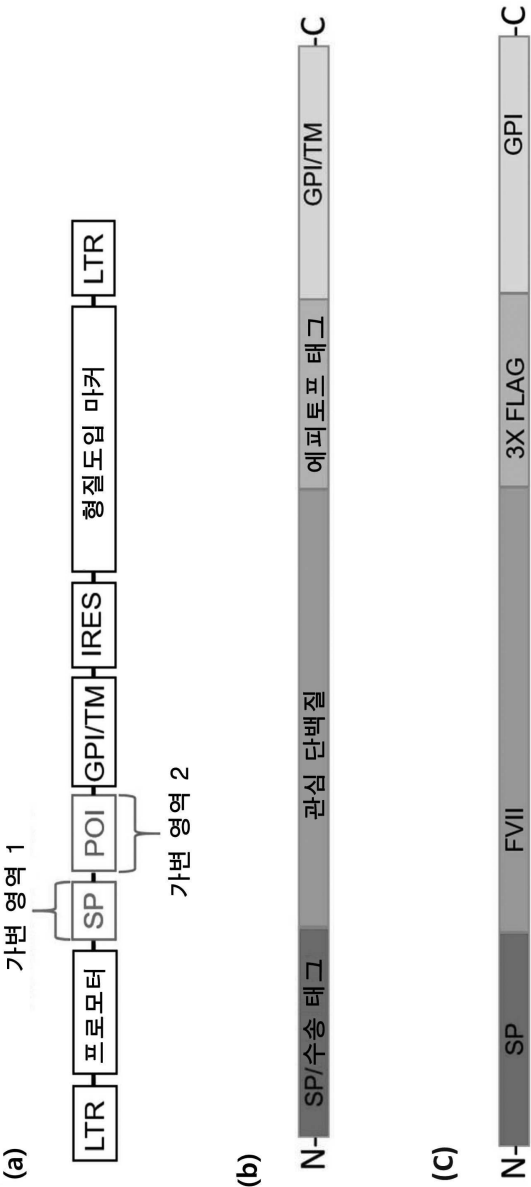
도면 1a



도면1b

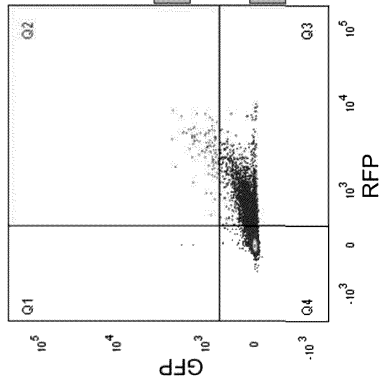


도면2

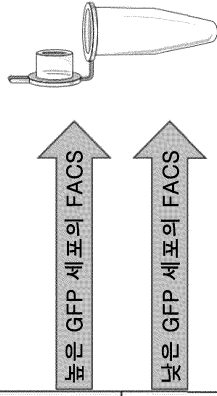


도면3

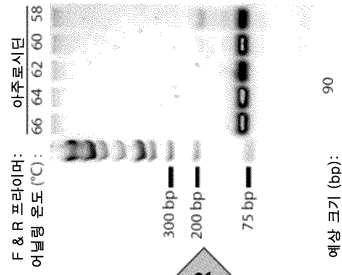
단계 1. FACS



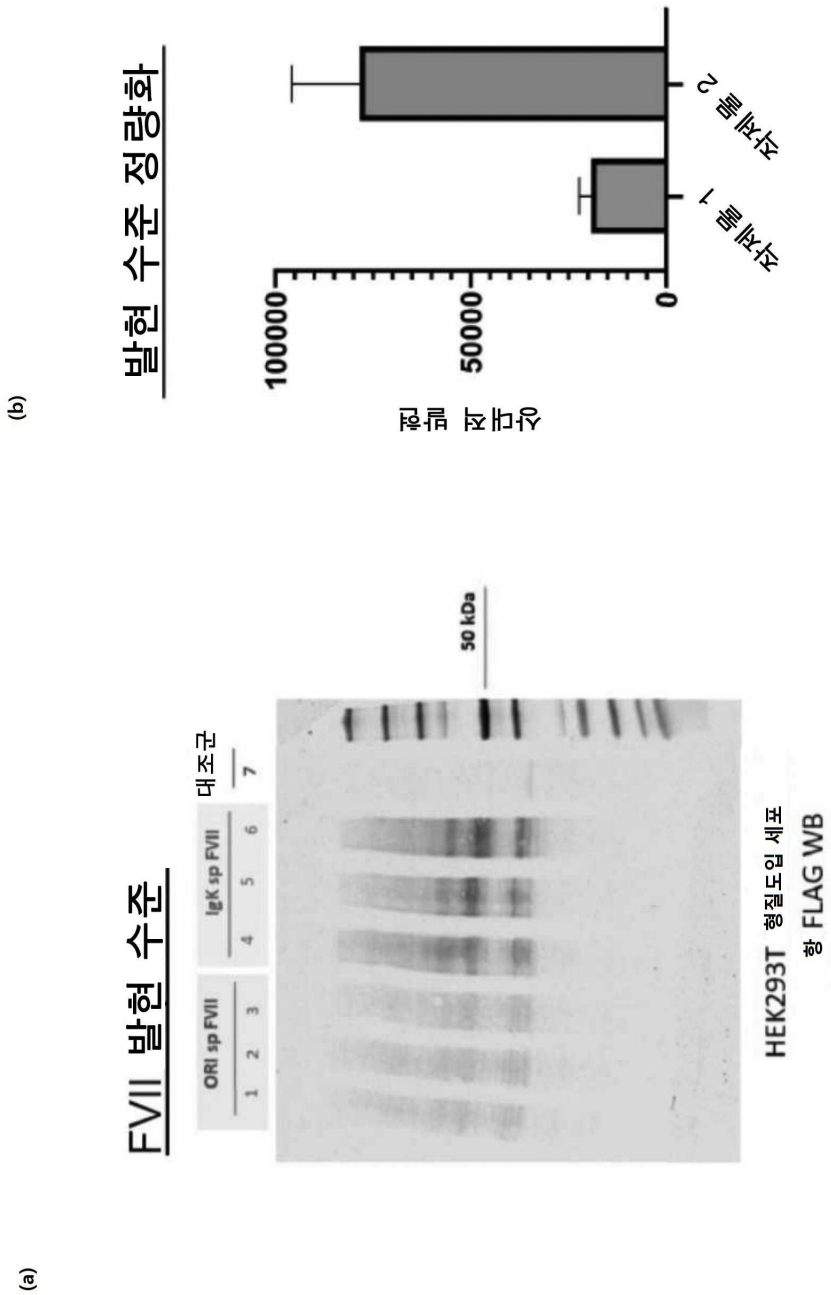
단계 2. gDNA 추출



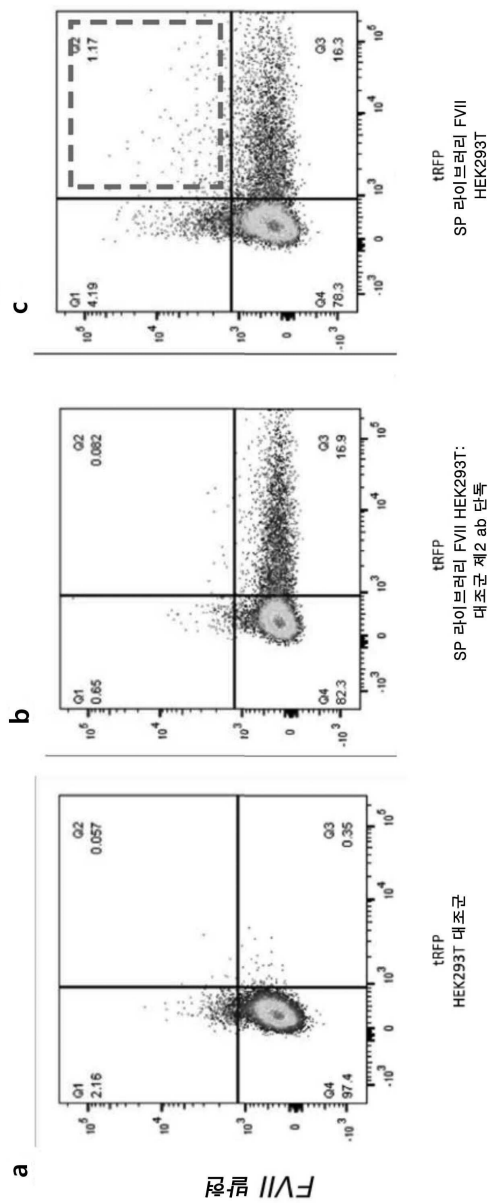
단계 3. qPCR/RT-PCR



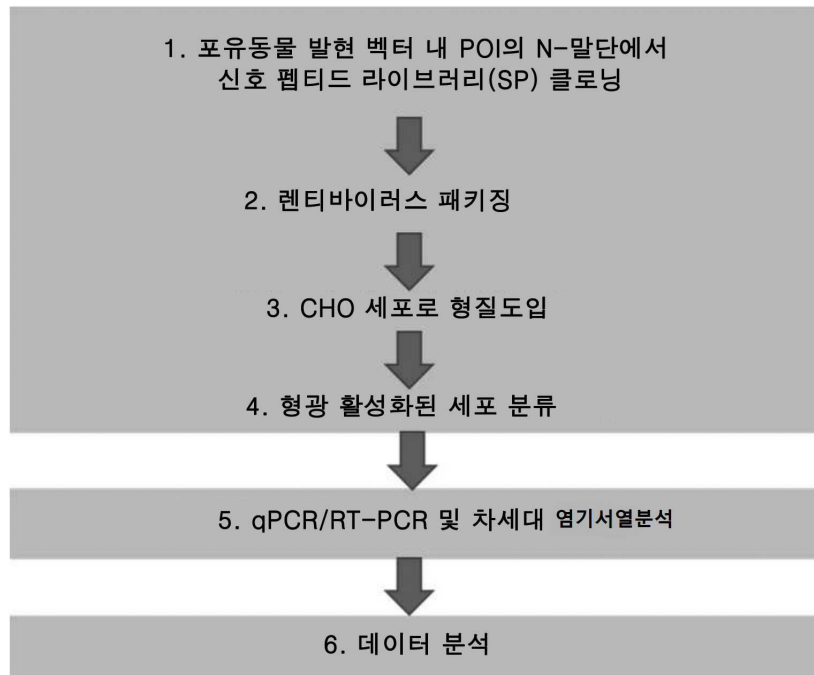
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.