

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020 년 8 월 20 일 (20.08.2020)



(10) 국제공개번호

WO 2020/166810 A2

(51) 국제특허분류:

G01N 33/68 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/018179

(22) 국제출원일:

2019 년 12 월 20 일 (20.12.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0017876 2019 년 2 월 15 일 (15.02.2019) KR

(71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 권명희 (KWON, Myung-Hee); 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR). 김민재 (KIM, Minjae); 16498 경기도 수원시 팔달구 중부대로 223번길 27 102-413, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울시 강남구 언주로 430, 16층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,

ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

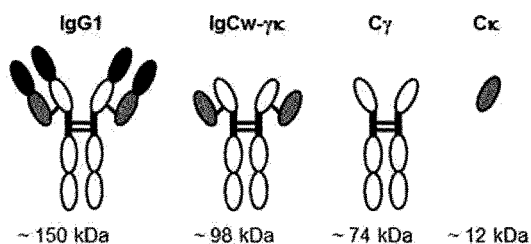
공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ANTIBODY FRAGMENT CONSISTING ONLY OF CONSTANT REGIONS OF ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 항체의 불변부위로만 구성된 항체 단편 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for evaluating antibody efficacy comprising an antibody fragment consisting only of the constant regions of an antibody and, more specifically, to a composition for evaluating antibody efficacy comprising a recombinant protein named IgCw consisting only of heavy chain (C_H) and light chain (C_L) constant regions and not the variable regions of an antibody, a method for evaluating antibody efficacy by using the composition, and a composition for producing a secondary antibody comprising an antibody fragment consisting only of the constant regions of an antibody. To evaluate the efficacy of antibodies in the development of new antibody drugs and the like, a control, i.e., a reference antibody is required, and existing reference antibodies cannot be completely free from non-specific binding, i.e., effects of a reaction to other antigens (off-target effects), and also have a low purification yield. Meanwhile, when the recombinant protein IgCw consisting only of the constant regions of an antibody according to the present invention is used, the recombinant protein IgCw can overcome the problems of existing reference antibodies and can be used as an antigen for producing secondary antibodies. Therefore, IgCw according to the present invention can have various applications in the biomedical science field.

(57) 요약서: 본 발명은 항체 불변부위(constant region)로만 구성된 항체 단편을 포함하는 항체 효능 평가용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항체의 가변부위(variable region)가 없는 오직 중쇄(C_H) 및 경쇄(C_L) 불변부위로만 이루어진 IgCw로 명명된 재조합 단백질을 포함하는 항체 효능 평가용 조성물, 상기 조성물을 이용하는 항체 효능 평가 방법 및 항체 불변부위로만 구성된 항체 단편을 포함하는 이차항체(secondary antibody) 제조용 조성물에 관한 것이다. 항체 신약 개발 등에 있어서 항체의 효능을 평가하기 위해서는 대조군 즉, 레퍼런스(reference) 항체가 필요하고, 기존의 레퍼런스 항체는 비특이적(non-specific) 결합 즉, 다른 항원과의 반응에 의한 효과(off-target effect)를 완전히 배제할 수 없으며, 정제 수율 또한 낮다. 반면 본 발명에 따른 항체 불변부위로만 이루어진 재조합 단백질인 IgCw를 이용하는 경우 기존의 레퍼런스 항체의 문제점들을 극복할 수 있으며, 이차항체 제조를 위한 항원으로서도 활용 가능하다. 따라서, 본 발명에 따른 IgCw는 의생명 과학 분야에서 다양하게 활용이 가능하다.

명세서

발명의 명칭: 항체의 불변부위로만 구성된 항체 단편 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 항체 불변부위(constant region)로만 구성된 항체 단편을 포함하는 항체 효능 평가용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항체의 가변부위(variable region)가 없는 오직 중쇄(C_H) 및 경쇄(C_L) 불변부위로만 이루어진 IgCw로 명명된 재조합 단백질을 포함하는 항체 효능 평가용 조성물, 상기 조성물을 이용하는 항체 효능 평가 방법 및 항체 불변부위로만 구성된 항체 단편을 포함하는 이차항체(secondary antibody) 제조용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 현재 재조합 항체와 그 단편(fragment)들은 안정성과 생산성이 우수하고, 항원(antigen)에 대한 높은 친화도(affinity)를 가진다는 장점이 있어, 의생명과학 및 임상적 활용 분야에서 상당한 가치가 있다.
- [4] 특히, 임상적으로 중요한 항원을 표적화하기 위해 강화된 IgG 아이소타입 항체는 동물 세포를 사용한 잘 확립된 제조 공정에 의해 높은 수율로 생산되고, 재조합 항체의 생산에서 다른 아이소타입들보다 훨씬 더 선호된다. 이것은 Fc-매개의 이펙터 기능(effector function) 외에도 IgG 아이소타입 항체의 Fc 부위가 IgG 항체를 신생아 Fc 수용체(FcRn, neonatal Fc receptor)에 결합시키게 하기 때문이다. FcRn은 혈관내피 세포에 발현되고 IgG의 재이용과 통과세포외배출을 매개하며 *in vivo*에서 IgG의 혈장 내 반감기를 증가시키는 역할을 수행한다.
- [5] 재조합 항체의 *in vitro*, *in vivo* 효능을 입증하기 위해 레퍼런스(reference) 항체, 즉 효능을 평가하기 위한 항체의 표적분자(항원)와 결합하지 않는 컨트롤 항체(control antibody)가 필요하다. 레퍼런스 항체는 다클론(polyclonal) 항체로부터 분리하거나 항체의 중쇄 및 경쇄 부위를 암호화한 발현 구성물을 트랜스펙션한 세포의 배양으로부터 생산될 수 있다.
- [6] 비록 레퍼런스 항체가 효능을 평가하기 위한 항체가 결합하는 표적분자와는 결합하지 않는다고 예상되더라도, 레퍼런스 항체도 어떠한 항원과의 결합에 관여하는 가변부위를 가지고 있기 때문에 잡음 양성신호(noise positive signal)가 발생하는 교차반응성(cross-reactivity)의 가능성, 특히 다른 항원과의 반응에 의한 효과(off-target effect)가 발생할 가능성을 완전히 배제할 수는 없다.
- [7]
- [8] 이에, 본 발명자들은 높은 생산 수율을 가지면서 어떠한 연구 조건에서도 항체 효능 평가를 위한 레퍼런스 분자가 될 수 있으며, 아이소타입-특이적 2차 항체를 얻기 위한 면역원으로 사용될 수 있는 분자를 개발하고자 예의 노력한 결과,

중쇄(C_H) 및 경쇄(C_L)의 불변부위로만 이루어진 IgCw로 명명된 면역글로불린 단편을 개발하였으며, 의생명 연구, 진단 시험, 항-아이소타입 항체 생성을 위한 면역원 준비에서, 무관한 전체 항체(full-size)의 대체물로 이용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[9]

[10] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[11]

[12] **발명의 요약**

[13] 본 발명의 목적은 항체의 가변부위가 없는 오직 중쇄(C_H) 및 경쇄(C_L) 불변부위로만 이루어진 재조합 단백질인 IgCw를 포함하는 항체 효능 평가용 조성물을 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용하는 것을 특징으로 하는 항체 효능 평가 방법을 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 항체 불변부위로만 이루어진 재조합 단백질인 IgCw를 포함하는 이차항체 제조용 조성물을 제공하는 데 있다.

[16] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항체 불변부위로만 이루어진 재조합 단백질인 IgCw를 포함하는 항체 효능 평가용 조성물을 제공한다.

[17] 본 발명은 또한, 상기 항체 효능 평가용 조성물을 대조군으로 이용하는 것을 특징으로 하는 항체 효능 평가 방법을 제공한다.

[18] 본 발명은 또한, 항체 불변부위로만 이루어진 재조합 단백질인 IgCw를 포함하는 이차항체 제조용 조성물을 제공한다.

[19]

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 HEK293F 세포 배양을 이용해 생산된 면역글로불린 유형을 도식화 한 것이다.

[21] 도 2는 IgCw- γ K 분자로부터 중쇄 불변부위(C_H)와 경쇄 불변부위(C_L)의 분리를 나타낸 도면으로, (A) 사슬 분리 단계, (B) 각 단계로부터 얻은 단백질의 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동, (C) 각 단계로부터 얻은 단백질의 웨스턴 블롯 결과이다.

[22] 도 3은 세포 표면에 발현되는 Fc γ 수용체에 대한 IgCw- γ K의 결합을 나타낸 도면이다.

[23] 도 3의 (A) 및 (B)는 유세포 분석 결과로, 4°C에서 30분 동안, 각각 Fc γ -HEK293T 세포와 Fc γ + THP-1 세포를 짝으로(A), Fc γ R- HeLa 세포와 Fc γ RIIB+ Raji 세포를 짝으로(B) 면역글로불린 단백질을 처리하였으며, 세포 표면-결합

면역글로불린을 검출하기 위한 일차 항체는 goat anti-human kappa chain 항체, 이차 항체는 FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG 항체를 사용했다. ‘No protein’은 오직 일차와 이차 항체만 처리한 세포를 가리킨다.

[24] 도 3의 (C) 및 (D)는 Fc γ R+ 세포에 결합한 것에 대한 Fc γ - 세포에 결합한 것의 상대적인 비율을 나타낸 것으로, 절대 평균 형광 강도 값으로부터 계산하여 (A)에 관한 것은 (C)에 나타냈으며, (B)에 관한 것은 (D)에 나타냈다.

[25] 도 4는 사람 IgG와 IgCw- γ K 각각을 이용해 만든 표준 곡선으로, 오른쪽 패널에 있는 효소면역분석법의 결과값은 로그 그래프를 그리는데 사용되었다. 농도를 알고 있는 사람 IgG와 IgCw- γ K는 포획(Capture) 항체로 goat anti-human IgG/Fc 항체를 웰(well)에 코팅하였고, 검출 항체로 AP-conjugated goat anti-human Ck 항체 F(ab')₂를 이용해 결합된 면역글로불린 분자를 검출하였으며, 결과값은 mean $\pm$ SD로 나타내었다(n=3).

[26]

[27] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[28] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[29]

[30] 제조항체와 그 부산물들은 연구시약과 치료제로서 많은 잠재력을 가지고 있으며, Fab(fragment antigen-binding), scFv(single-chain variable Ab fragment), sdAb(single domain Ab)와 같은 항원 결합 부위를 가지는 가변부위(V)가 포함된 항체 분절들이 개발되어 왔다. 가변부위가 포함된 항체 분절들에 진단, 치료적인 이점을 주기 위해서 약물과 같은 기능적인 부분을 융합시키거나, T 세포 수용체에 신호전달기를 융합시킨 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cells; CAR-T cells)를 개발하여 더 진화를 거치고 있다.

[31] 한편, 경첩(hinge)과 중쇄 불변부위 2번, 3번(hinge-C_H2-C_H3)으로 이루어진 IgG 항체의 Fc 분절은 *in vivo*에서 반감기를 증가시키기 위해 관심 단백질에 Fc 도메인(domain)이 연결된 Fc 융합 단백질의 생산에 이용되어 왔다.

[32]

[33] 본 발명에서는 이전에 다뤄지지 않은 항체 포맷으로써 항체의 가변부위가 없는 오직 중쇄(C_H) 불변부위 및/또는 경쇄(C_L) 불변부위로만 이루어진 항체 단편인 IgCw를 새로이 개발하고, 이러한 새로운 구조를 갖는 IgCw가 다양한 장점을 가지고 있어, 항체 효능평가 등의 임상분야에서 폭넓게 사용될 수 있음을 규명하였다.

[34] 본 명세서에서의 용어 “IgCw”는 항체의 구조에서 가변부위가 없이 오직 중쇄(C_H) 및 경쇄(C_L) 불변부위로만 이루어진 항체의 단편 또는 제조항 단백질을 의미한다. 상기 IgCw에서의 중쇄 및 경쇄 불변부위는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM

뿐만 아니라 IgY, IgW 및 IgNAR에서 유래된 것을 모두 포함하는 의미로 사용된다. IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

- [35] 상기 중쇄 불변부위(C_H)는 C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} 및 C_{H4} 로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [36] 바람직하게는 본 발명에 따른 IgCw에 있어서, 상기 중쇄 불변부위는 C_γ , C_μ , C_α , C_ϵ 및 C_δ 로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나를 포함하고, 상기 경쇄 불변부위는 C_κ 또는 C_λ 를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 본 발명의 일 실시예에서는 IgCw의 일 실시예로서 IgCw- $\gamma\kappa$ 를 사용하였으나, 중쇄와 경쇄의 다른 아이소타입을 가지는 형태, 예를 들면, C_γ 와 C_λ 로 이루어진 IgCw- $\gamma\lambda$, C_ϵ 와 C_κ 로 이루어진 IgCw- $\epsilon\kappa$ 또는 C_ϵ 와 C_λ 로 이루어진 IgCw- $\epsilon\lambda$ 등도 사용할 수 있다.
- [38] 본 발명에 따른 IgCw는 다음과 같은 장점을 가지고 있다.
- [39] (i) 가변부위의 아미노산 서열에 의존해서 생산 수율이 달라지는 full-size IgG와 다르게 일정한 생산 수율을 나타낸다.
- [40] (ii) full-size IgG 아이소타입 컨트롤을 대신해 어떤 연구 조건에서도 항체 활성에 대한 레퍼런스 분자가 될 수 있다.
- [41] (iii) 가변부위에 대한 항-이디오타입 항체가 원치 않게 생성될 가능성을 배제함으로써 아이소타입-특이적 항체를 효율적이고 대량으로 생산하기 위한 면역원으로 사용될 수 있다.
- [42]
- [43] 본 발명은 IgCw의 생산과 활용에 관한 것이다.
- [44] 본 발명의 일 실시예에서는 HEK293F 세포를 이용해 2개의 사람 감마 중쇄 불변부위(각 37kDa)와 2개의 사람 카파 경쇄 불변부위(각 12kDa)로 이루어진 사람 IgCw- $\gamma\kappa$ (98kDa)를 제조하였다. IgCw- $\gamma\kappa$ (~98kDa)의 전체 구조는 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L) 가변부위가 없다는 점만 제외하면 자연 항체 IgG1(~150kDa)과 비슷하다. IgCw- $\gamma\kappa$ 단백질의 정제 수율이 full-size IgG 항체와 비슷한 ~20mg/L였으며, IgCw- $\gamma\kappa$ 는 Fc γ 수용체가 있는 세포에 결합할 수 있음을 확인하였다. 또한, Fc γ 수용체가 없는 세포에서는 낮은 배경 신호(background signal)를 나타냄을 확인하여 면역글로불린(Ig) 농도 측정에 대한 레퍼런스(reference)로서 이용될 수 있음을 확인하였다. 나아가, 감마 중쇄 불변부위와 카파 경쇄 불변부위는 환원제가 있을 때 친화 크로마토그래피(affinity chromatography) 일회로 IgCw- $\gamma\kappa$ 로부터 간단하게 분리됨을 확인하였다. 이러한 결과들은 IgCw 분자가 무관한 아이소타입 컨트롤 IgG 항체(irrelevant isotype control IgG)의 대체물로 어떠한 *in vitro* 또는 *in vivo* 활용에서든 사용될 수 있고, 동물에 면역함으로써 아이소타입에 특이적인 항체를 얻기 위한 편리한 항원으로 사용될 수 있는 잠재력을 가진다는 것을 입증한다.

[45]

[46] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 항체 불변부위(constant region)로만 구성된 IgCw를 포함하는 항체 효능 평가용 조성물에 관한 것이다.

[47]

본 명세서에서의 “항체”는 다클론 항체(polyclonal antibody) 및 단클론 항체(단일클론 항체, monoclonal antibody)를 모두 포함하는 개념으로, 온전한 전체 항체(whole antibody) 형태는 항원과 반응하는 가변부위(variable region) 및 효과기능을 발현하는 불변영역(constant region)을 포함하는 구조이다. 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(heavy chain)를 가지며, 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 본 발명에 따른 항체는 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, IgY, IgW 형태를 모두 포함하는 개념이다.

[48]

본 발명에 있어서, 상기 IgCw는 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, IgY, IgW 또는 IgNar로부터 유래된 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[49]

본 발명에 있어서, 상기 불변부위는 중쇄 불변부위(heavy chain constant region; C_H) 및/또는 경쇄 불변부위(light chain constant region; C_L)를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[50]

상기 중쇄 불변부위(C_H)는 C_H1, C_H2, C_H3 및 C_H4로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[51]

바람직하게는 본 발명에 따른 IgCw에 있어서, 상기 중쇄 불변부위는 C_γ, C_μ, C_α, C_ε 및 C_δ로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나를 포함하고, 상기 경쇄 불변부위는 C_κ 또는 C_λ를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[52]

또한 본 발명에 따른 IgCw에 있어서, 상기 중쇄 불변부위와 경쇄 불변부위는 이황화결합(disulfide bond)에 의해 결합되거나 또는 펩티드 링커(linker)로 결합된 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[53]

[54]

제조항체 포맷은 유용성, 비용성에 영향을 줄 수 있는 낮은 정제 수율로 인해 빈번하게 어려움에 직면해왔다. 항체의 생산 수율은 중쇄 가변부위(V_H)와 경쇄 가변부위(V_L)의 특성(아미노산 서열)에 의존한다. 따라서, 제조항 IgG의 생산 수율은 잘 확립된 제조 공정에서도 가변 도메인(V domain)의 아미노산 서열에 의존해서 꽤 가변적일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 항체 불변부위로만 구성된 항체 단편이 높은 수율로 생산 가능함을 확인하였다.

[55]

HEK293F 세포 배양에서 자연 항체 IgG에 관찰되는 것처럼 IgGw에서도 이황화결합으로 연결된 2개의 중쇄와 2개의 경쇄를 가지고 효율적으로 생산이 가능하다. 가변부위가 없는 IgCw는 최적화된 숙주 세포를 통해 고정적인 생산 수율을 가질 수 있다.

[56]

본 발명의 일 실시예에서, 트랜스팩션 후 7일 뒤에 IgCw-γκ의 생산 수율(20mg/L)은 생산형 모델 IgG(6C407 항체)와 비슷하며, 이는 C_γ 또는 C_κ 단독

도메인보다 각각 30배, 5배 더 높은 수준임을 확인하였다(표 2). ER에 있는 ER-품질 관리법(endoplasmic reticulum-quality control system)은 오직 알맞게 조립(assembly)된 면역글로불린 분자들의 분비만을 허락하는데, 이것은 IgCw- γ K가 ER에서의 폴딩(folding)과 조립 과정 동안 구조적으로 안정화되어 있다는 것을 의미한다. 중쇄 불변부위 1(C_H1)의 생산적인 폴딩은 오직 폴딩된 경쇄 불변부위(C_L)와의 상호작용 이후에 일어난다(예를 들어, C_L 에 의해 유도된 C_H1 도메인의 폴딩). B 계통 세포에서 처음 확인된 이러한 품질 관리법은 항체 생산에 사용되는 CHO(Chinese hamster ovary) 세포에서 그 기능이 알려졌다. C γ 단독 단백질의 분비가 낮은 수준으로 나타나는 것을 보면 IgCw- γ K의 발현 동안에 HEK293F 세포에서 또한 ER-품질 관리법이 수행된다고 예상된다.

[57]

[58] 본 명세서에서는, 본 발명에 따른 IgCw를 코딩하는 핵산을 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 핵산은 세포, 세포 용해물(lysate) 중에 존재하거나, 또는 부분적으로 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수도 있다. 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴드화(banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기 영동 및 해당 기술분야에 잘 알려진 기타의 것을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 기타 오염 물질, 예를 들어 다른 세포의 핵산 또는 단백질로부터 정제되어 나올 경우 "단리"되거나 "실질적으로 순수하게 된" 것이다. 본 발명의 핵산은 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 인트론 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[59]

[60] 본 명세서에서는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명에 따른 IgCw의 발현을 위하여, 경쇄 불변부위 및 중쇄 불변부위를 코딩하는 DNA를 표준 분자 생물학 기술(예를 들어 PCR 증폭 또는 목적 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용한 cDNA 클로닝)로 수득할 수 있으며, DNA가 전사 및 번역 제어 서열에 "작동되도록 결합"되어 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[61]

본 명세서에서 사용되는 용어 "작동되도록 결합"은 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 의도된 기능을 하도록 항체 단편을 코딩하는 유전자가 벡터 내로 라이게이션된다는 것을 의미할 수 있다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용되는 발현용 숙주세포와 상용성 있도록 선택된다. 항체의 경쇄 유전자 및 항체의 중쇄 유전자는 별개의 벡터 내로 삽입되거나, 두 유전자 모두 동일한 발현 벡터 내로 삽입된다. 항체 단편은 표준 방법(예를 들어 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보성 제한 효소 부위의 라이게이션, 또는 제한 효소 부위가 전혀 존재하지 않을 경우 블런트(blunt) 말단 라이게이션)으로 발현 벡터 내로 삽입된다. 경우에 따라서, 상기 재조합 발현 벡터는 숙주세포로부터의 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 신호 펩티드가 프레임에 맞게 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 결합되도록 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는

면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드(즉, 면역글로불린 외 단백질 유래의 신호 펩티드)일 수 있다. 또한, 상기 제조합 발현 벡터는 숙주세포에서 항체 사슬 유전자의 발현을 제어하는 조절서열을 지닌다. "조절서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소(예를 들어 폴리아데닐화 신호)를 포함할 수 있다. 통상의 기술자는 형질전환시킬 숙주세포의 선택, 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 조절 서열을 달리 선택하여, 발현 벡터의 디자인이 달라질 수 있음을 인식할 수 있다.

[62]

[63] 본 명세서에서는, 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다. 본 발명에 따른 숙주 세포는 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균 및 곤충세포로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[64]

구체적으로는 본 발명에 따른 숙주세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces sp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas sp.*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus sp.*)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스페르길러스 속(*Aspergillus sp.*)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces sp.*) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다.

[65]

또한 식물이나 포유동물로부터 유래할 수 있다. 바람직하게는, 원숭이 신장 세포7(COS7: monkey kidney cells)세포, NSO 세포, SP2/0, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO: chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney)세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포 등이 이용 가능하지만 이에 한정되지 않는다. 특히 바람직하게는 CHO 세포가 사용될 수 있다.

[66]

상기 핵산 또는 상기 벡터는 숙주세포에 형질주입 또는 트랜스펙션(transfection)된다. "형질주입" 또는 "트랜스펙션시키기 위해 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산(DNA 또는 RNA)을 도입하는 데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술, 예를 들어 전기 영동법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션(lipofection) 등을 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 항체 불변부위로만 구성된 항체 단편을 발현시키기 위해 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현 벡터로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adenovirus), 시토크로마 바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열이 포함된다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC 벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 대장균(*Escherichia coli*)에서

얻어지는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ gt10과 λ gt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2°C 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL941이다.

[67]

[68] 또한, 본 명세서에서는, 숙주세포를 배양하여 본 발명에 따른 IgCw를 발현시키는 단계를 포함하는 항체 불변부위로만 구성된 항체 단편의 제조방법을 제공한다.

[69] 상기 본 발명에 따른 IgCw를 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터가 포유류 숙주세포 내로 도입될 경우 항체는 숙주세포에서 항체 단편이 발현되게 하기에 충분한 기간 동안, 또는 더 바람직하게는 숙주세포가 배양되는 배양 배지 내로 항체 단편이 분비되게 하기에 충분한 기간 동안 숙주세포를 배양함으로써 제조될 수 있다.

[70] 경우에 따라서, 발현된 IgCw는 숙주세포로부터 분리하여 균일하도록 정제할 수 있다. 상기 IgCw의 분리 또는 정제는 통상의 단백질에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법, 예를 들어 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다. 상기 크로마토그래피는 예를 들어, 프로틴 A 컬럼, 프로틴 G 컬럼을 포함하는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 또는 소수성 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 상기 크로마토그래피 이외에, 추가로 여과, 초여과, 염석, 투석 등을 조합함으로써 항체를 분리, 정제할 수 있다.

[71]

[72] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 효능 평가용 조성물을 대조군으로 이용하는 것을 특징으로 하는 항체 효능 평가 방법에 관한 것이다.

[73] 항원-특이적 항체에 의한 어떠한 영향을 입증하는 실험에서는 항원-특이적 항체 신호로부터 비특이적인 배경 신호를 구별하기 위해 레퍼런스(또는 무관한 아이소타입 컨트롤) 항체가 음성 대조군으로써 일반적으로 사용된다. 그러나, 기존의 레퍼런스 항체는 아직 잘 알려지지 않은 교차반응성 때문에 여전히 원치 않는 잡음 신호를 줄 수 있다.

[74] 본 발명에 따른 IgCw는 항원 결합 능력이 없고 예상할 수 없는 교차반응성의 가능성을 배제할 수 있으므로, 무관한 IgG 컨트롤과 비교해 많은 실험적인 환경과 상황에서 더 나은 레퍼런스 항체가 될 수 있다.

[75] 본 발명의 일 실시예에서, 세포 표면의 여러 Fc γ 수용체 결합에 대한 배경 신호가 기존의 레퍼런스 IgG보다 IgCw- γ k가 더 낮은 것을 확인하였다(도 3). 나아가 IgCw- γ k는 생물학적 표본에서 면역글로불린 농도 측정을 위한 레퍼런스로서 사용될 수 있다(도 4).

[76]

[77] 본 발명은 또 다른 관점에서, 항체 불변부위로만 구성된 IgCw를 포함하는

이차항체(secondary antibody) 제조용 조성물에 관한 것이다.

- [78] 본 발명에 있어서, 상기 이차항체는 표적(target)에 대하여 특이적 결합을 하는 일차항체의 불변부위와 결합할 수 있는 것이라면 특별한 제한 없이 포함되는 의미로 해석되며, anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-IgE, anti-IgD, anti-IgY 또는 anti-IgW 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-IgE, anti-IgD anti-IgY 또는 anti-IgW는 일차항체의 기원에 따라 선택적으로 인식하여 결합한다.

[79]

- [80] 이차항체 생성에 있어, IgCw는 가변부위까지 포함하는 전체 항체를 이용하는 경우에 비해 유리한 항원으로써 사용될 수 있다. 동물에 면역함으로써 다른 종으로부터 항체의 불변부위(C_H 및 C_L)에 대해 생성되는 항-아이소타입 항체의 생산에 있어, 가변부위까지 포함하는 전체 항체를 이용하는 경우 생길 수 있는 원치 않은 항-이디오타입 항체의 생성을 IgCw는 허락하지 않기 때문이다. 전체 항체로 면역하게 되면 원하는 항-아이소타입 항체뿐만 아니라 원하지 않는 항-이디오타입 항체 또한 생성된다. IgG로 면역하게 되어 생성된 항체는 주로 친화도에 의한 정제와, 가변부위에 대한 교차반응성을 가지는 항체를 제거하기 위한 교차흡착화(cross-adsorbed)가 필요하다. IgCw를 이용하여 가변부위에 대한 항체를 만들 기회를 없앴으로써 고품질의 항-아이소타입 항체가 생산될 수 있다. 나아가 IgCw로부터 중쇄 불변부위와 경쇄 불변부위를 쉽게 얻는 것(도 2)은 항-C_H 항체와 항-C_L 항체의 생산을 위한 항원 준비의 간소화를 의미한다.

[81]

- [82] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[83]

- [84] 실시예 1: 시료의 준비

- [85] 실시예 1-1: 플라스미드 벡터

- [86] KV10-C γ 벡터를 만들기 위해 *MluI*-bacterial ccdB-*NheI*-human C γ -*BamHI*와 *DraIII*-LacZ α -*BstWI* human C κ -*EcoRI*에 대한 유전자가 암호화 되어 있는 KV10-HL 발현 벡터의 *MluI*, *BamHI* 제한부위 사이에 사람 중쇄 감마 불변부위(C γ 1-C γ 2-C γ 3)가 암호화된 DNA 단편을 클로닝 한다.

- [87] CMV 프로모터(promoter) 2개가 각각 유전자를 조절해 선도 서열(leader sequence)을 가지는 human C γ 1-3와 human C κ 를 동시에 발현하는 KV10-IgCw- $\gamma\kappa$ 벡터를 만들기 위해, KV10-C γ 벡터의 *DraIII*와 *EcoRI* 제한부위 사이에 사람 경쇄 카파 불변부위(C κ)가 암호화된 DNA 단편을 클로닝 한다.

- [88] 키메릭 IgG(6C407, 3D8) 발현을 위한 플라스미드 벡터를 만들기 위해, KV10-HL 벡터의 *MluI*, *NheI* 제한부위 사이와 *DraIII*와 *BstWI* 제한부위 사이에

각각 V_H 와 V_K 도메인(Domain)이 암호화된 DNA 단편을 클로닝 한다.

[89]

[90] [표1]

대상	서열	번호
Human C γ 1-3	MASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	1
Human C κ	MRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRG EC	2
6C407 IgG		
Heavy chain	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYI HWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATI TADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCARGYGSRSA MDYWGQGTSTVTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHCTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	3

[91]

Light chain	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSY MLWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGS GTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSRELPWTFGGGT KLEIKRARTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	4
3D8 IgG		
Heavy chain	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMH WVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGKAT LTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGAYKRG YAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	5
Light chain	DLVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLFNSRTRK NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPRFTGS GSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCKQSYHYMYTFGS GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	6

[92]

[93] 실시예 1-2: HEK293F 세포를 이용한 면역글로불린 단백질의 준비

[94] 혈청이 없는 조건에서 부유 배양으로 자랄 수 있도록 적응된 FreeStyle™ 293-F 세포주(Thermo Fisher Scientific)를 항체 생산을 위해 사용한다.

[95] 트랜스팩션할 때 2×10^6 cells/ml의 세포 밀도를 가질 수 있도록, 트랜스팩션하기 24시간 전에 500ml 플라스크(Corning Cat# 431145)에 FreeStyle HEK293F 세포를 1×10^6 cells/ml로 100ml 넣어서 배양한다. FreeStyle 293-F 세포는 혈청이 없는 FreeStyle 293 배지(Invitrogen Cat# 12338)에서 8% CO₂, 37°C 배양기에서 130

rpm으로 진탕(shaking)배양한다. 6C407 IgG1, IgCw- γ K, C γ , C κ 단백질을 발현시키기 위해 각 유전자가 암호화된 KV10 플라스미드 200 μ g와 폴리에틸렌이민(polyethylenimine; PEI) 시약(Polyscience Cat# 23966-2) 400 μ g를 FreeStyle 293 배지 5ml에 각각 넣고 실온에서 10분간 거치한다. 그리고 DNA가 포함된 배지 5ml을 0.22 μ m의 주사기 여과기(Syringe filter, Millipore Cat# SLGV033RB)로 거른 후 폴리에틸렌이민이 포함된 배지 5ml과 섞고 실온에서 10분간 거치한다. 최종적으로 폴리에틸렌이민의 농도가 4 μ g/ml이 될 수 있도록 Freestyle 293-F 세포의 100ml에 일과성 트랜스팩션을 수행한다. 7일 이후에 배양액을 4°C에서 400g로 20분간 원심분리하여 상청액을 얻고 0.45 μ m 셀룰로즈 아세테이트 여과기(cellulose acetate filter, Sartorius Cat# 11106-47-N)로 거른 뒤에 단백질 A(Protein A, GE Healthcare Cat# 17-1279-02) 컬럼(Column)에 통과시킨다. C κ 와 일부 IgCw- γ K의 정제는 CaptureSelect™ KappaXL(Thermo Fisher Scientific; Cat# 194321005) 컬럼을 사용했다. 컬럼을 PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)로 세척한 후, 0.1M 글라이신용액(glycine-HCl, pH 3.0)으로 단백질을 용출시킨다. 용출된 단백질은 Vivaspin 20(molecular cut-off 50,000, Sartorius Cat# VS2032)을 이용하여 농축한다(4°C, 1500g).

[96] 정제된 단백질의 농도는 280nm에서의 흡광도(absorbance)와 흡광계수(extinction coefficient)를 이용해 결정한다. 280nm에서 몰 흡광계수는 각 6C407 IgG1는 1.43, IgCw- γ K는 1.19, C γ 는 1.27, C κ 는 0.97이며, 각 아미노산 서열로부터 <http://web.expasy.org/protparam/> 웹페이지를 통해 계산한다.

[97]

[98] 실시예 1-3: 세포 배양

[99] 사람 상피 경부암 세포로부터 유래된 HeLa(ATCC® number: CCL-2™) 세포주와 사람 배아 신장 293 세포주 HEK293T(ATCC® number: CRL-3216™)는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Welgene Inc.) 배지에서 배양한다. 사람 단핵구 세포주 THP-1(ATCC® number: TIB-202)과 사람 버킷럼프종 세포주 Raji(ATCC® number: CCL-86™)는 RPMI 1640 배지(Welgene Inc.)에서 배양한다. DMEM과 RPMI 1640 배지에 10% 소 태아혈청(fetal bovine serum, Sigma Inc.)과 100U/ml 페니실린(penicillin, Welgene Inc.), 100 μ g/ml 스트렙토마이신(streptomycin, Welgene Inc.)을 첨가해서 사용한다. 모든 세포는 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양한다.

[100]

[101] 실시예 1-4: IgCw- γ K 단백질로부터 중쇄 불변부위(C_H)와 경쇄 불변부위(C_L)의 분리

[102] 20mM의 최종 농도로 환원제 DTT(dithiothreitol)를 IgCw- γ K 단백질에 첨가한다. 단백질 용액은 중쇄 감마 불변부위(C γ)를 잡는 단백질 A(Protein A) 컬럼에 통과시킨다. 경쇄 카파 불변부위(C κ)를 포함하는 통과액(Flow-through)을 따로 모으고, 단백질 용출 단계에서 함께 정제될 수도 있는 C κ 를 제거하기 위해 1mM

DTT가 포함된 PBS로 컬럼을 4번 세척한다. C γ 단백질은 단백질 A 컬럼으로부터 0.1M 글라이신용액(glycine-HCl, pH 3.0)으로 용출시킨다, 용출된 단백질은 Vivaspin 6(Molecular cut-off 3,000, Sartorius Cat# VS0691)을 이용하여 버퍼를 PBS(pH 7.4)로 교체한다(4°C, 1500g). 분리한 단백질은 SDS(sodium dodecyl)-폴리아크릴아마이드 겔에 환원 또는 비환원 조건에서 전기영동한 후에 한 세트를 쿠마시블루(Coomassie blue)로 염색하고, 다른 세트는 면역블롯(immunoblot)을 수행한다.

[103]

[104] 실시예 2: 분석방법

[105] 실시예 2-1: 유세포 분석법(Flow cytometry)

[106] 세포 표면에 발현되는 Fc γ 수용체에 IgCw- γ κ가 결합하는지 확인하기 위해서, Fc γ R- HEK293T, Fc γ R- HeLa, Fc γ Rs+ THP-1, and Fc γ RIIB+ Raji 세포(1×10^6 cells)에 면역글로불린 단백질을 최종 농도 3 μ M로 4°C에서 30분간 처리했다. 차가운 PBS로 세포를 세척한 후, PBS에 희석한 4% 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)를 실온에서 10분간 세포에 처리해 고정시킨다. HEK293T와 THP-1 세포는 일차 항체로 Goat anti-human kappa chain Ab(Thermo Fisher Scientific; Cat# 31129), 이차 항체로 FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG Ab(Thermo Fisher Scientific; Cat# 31533)를 버퍼 S(PBS에 희석한 0.5% BSA, 2mM EDTA, pH 8.5)에 희석해서 사용하고, HeLa와 Raji 세포는 일차 항체로 Rabbit anti-human kappa chain Ab(Abcam; Cat# 134083), 이차 항체로 FITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG-FITC(Millipore; Cat# AP182F)를 버퍼 S에 희석해서 사용한다. 그리고 각 거치 단계(4°C, 1시간)마다 차가운 PBS를 이용해 세 번씩 세척한다. 각 시료는 FACS CantoII 분석기(BD Biosciences)를 통해 분석한다.

[107]

[108] 실시예 2-2: IgG 농도를 측정하기 위한 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

[109] 농도를 알고 있는 Full-size IgG(Sigma-Aldrich; Cat# I8640)와 IgCw- γ κ를 각각 사용해 표준 곡선(standard curve)을 만들기 위해 효소면역분석법을 수행한다. 96-웰 폴리스틸렌 플레이트(96-well polystyrene plate)의 웰에 Goat anti-human IgG/Fc 항체(Abcam; cat# ab97221)를 처리해 실온에서 1시간 동안 코팅한다. 이후 매 거치 단계(실온, 1시간)마다 0.05% Tween-20이 포함되어 있는 TBS(TRIS-buffered saline; 50mM TRIS-Cl, 50mM NaCl, pH 7.4)를 이용해 세 번씩 세척한다. 비특이적인 항체의 결합을 차단(blocking)하기 위해서 3% BSA(bovine serum albumin)를 실온에서 1시간 처리한다. 사람 다클론 IgG와 IgCw- γ κ를 각각 250ng/ml의 시작 농도에서 2배씩 계단 희석하여 웰에 실온에서 1시간 처리하고, 검출 항체로써 AP(alkaline phosphatase)-conjugated goat anti-human Cκ 항체 F(ab')₂ (Rockland; cat# 709-1510)를 실온에서 1시간 처리한다. 끝으로 1mg/ml

p-NPP(p-nitrophenyl phosphate; Sigma-Aldrich; cat# N2765) 용액(1mM ZnCl₂, and 1mM MgCl₂, pH 10.3)을 각 웰에 첨가하고, 405nm에서 마이크로플레이트 판독기(microplate reader; Molecular Devices Inc.)를 이용해 흡광도를 측정한다.

- [110] 농도를 모르는 항체의 농도를 측정하기 위해, 96-웰 폴리스틸렌 플레이트의 웰에 Goat anti-human IgG/Fc 항체를 코팅하고, 단클론 6C407 IgG1 또는 3D8 IgG1을 처리 후, AP-conjugated goat anti-human Cκ 항체 F(ab')₂를 처리한다(모두 실온에서 1시간 처리). 농도를 알고 있는 사람 IgG와 IgCw-γκ를 각각 이용해 만든 2가지의 다른 표준 곡선에서 Y축 값의 보간법(interpolation)을 통해 IgG 시료의 농도를 결정한다.

[111]

- [112] 실시예 3: IgCw-γκ의 정제 수율 확인

- [113] KV10-IgCw-γκ, KV10-6C407, KV10-Cγ, KV10-Cκ 플라스미드를 각각 HEK293F 세포에 일과성으로 트랜스펙션한 부유 배양에 의해 생산된 면역글로불린 분자들의 수율을 비교했다. 발현된 단백질의 예상되는 구조를 도 1에 나타내었다. IgCw-γκ, 6C407 IgG, Cγ 단백질은 트랜스펙션 후 7일 뒤에 IgG의 Fc 부위에 결합하는 단백질 A-세파로즈(Protein A-Sepharose)를 이용해 배양 배지로부터 정제했고, Cκ 단백질은 사람 카파 불변부위에 결합하는 카파 XL-아가로즈(Kappa XL-Agarose)를 이용해 정제했다. IgCw-γκ의 평균 수율은 컨트롤 6C407 IgG와 동일한 ~20mg/L이다. 대조적으로, Cγ는 ~0.6mg/L, Cκ는 ~4mg/L의 낮은 정제 수율을 가진다(표 2). 이는 정제 수율면에서 Cγ 단백질이나 Cκ 단백질 단독보다 IgCw-γκ가 효율적임을 의미한다.

[114]

- [115] [표2]

HEK293F 세포 배양의 상청액으로부터 정제된 면역글로불린 분자들의 수율

발현 벡터	정제 방법	수율(mg/L)
KV10-6C407 IgG	Protein A	~ 20
KV10-IgCw-γκ	Protein A	~ 20
KV10-Cγ	Protein A	~ 0.6
KV10-Cκ	Kappa XL	~ 4

[116]

- [117] 실시예 4: IgCw-γκ로부터 감마 중쇄 불변부위(Cγ)와 카파 경쇄 불변부위(Cκ)의 분리

- [118] SDS-폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylAmide Gel) 전기영동에서 환원 조건일 때 ~37kDa과 ~12kDa, 비환원 조건일 때 ~98kDa로 예상되는 IgCw-γκ의 크기는 full-size IgG처럼 IgCw-γκ가 이합체 형태를 가진다는 것을 의미한다. 이를 통해 Cγ와 Cκ가 아이소타입-특이적 항체(항-Cγ 항체와 항-Cκ 항체)를 얻기 위한 유리한 면역원이 될 수 있음을 알 수 있다. 따라서, 정제된 IgCw-γκ 분자로부터

감마와 카파 사슬을 각각 만들기 위한 과정을 확립했다.

- [119] IgCw- γ K의 이황화결합(disulfide bond)을 환원시키기 위해 20mM DTT를 처리하고, 감마 사슬을 잡기 위한 단백질 A 친화크로마토그래피를 통해 각 C γ 와 C κ 사슬을 단지 2단계로 분리해서 얻었다(도 2A). 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 뒤에 각 단계 단백질의 한 세트를 쿠마시 블루(Coomassie blue)로 염색하고(도 2B), 다른 세트는 면역블롯(immunoblot)을 수행했다(도 2C). IgCw- γ K는 완전히 분리되어 C κ 사슬은 통과액(flow-through) 부분에서만 검출되고, C γ 사슬은 용출액(eluate)에서만 검출됐다(도 2B 및 C). 그러므로 IgCw- γ K는 한가지 단백질 발현만으로도 중쇄 불변부위(C γ)와 경쇄 불변부위(C κ)를 동시에 쉽게 얻는데 사용될 수 있다.
- [120]
- [121] 실시예 5: IgCw- γ K의 Fc γ 수용체에 대한 결합 확인 및 배경 신호(background signal) 확인
- [122] 사람 면역 세포의 표면에 발현하는 Fc γ 수용체들에 IgCw- γ K가 결합하는지 알아보기 위해 유세포 분석을 수행했다.
- [123] IgCw- γ K는 full-size IgG처럼 면역 세포인 THP-1과 Raji에 결합하지만, 어떠한 Fc γ 수용체도 발현하지 않는 HEK293T와 HeLa 세포에는 결합하지 않는다(도 3A 내지 D). 사람 단핵구(monocytes), 대식세포(macrophages)는 Fc γ RI를 발현하고 매우 낮은 비율로 Fc γ RIIA 또는 FcRn을 발현하며, 사람 B 세포는 오직 Fc γ RIIB를 발현한다. 이는 IgCw- γ K가 full-size IgG처럼 다양한 Fc γ 수용체를 인식할 수 있다는 것을 의미한다.
- [124] 나아가, Fc γ R+ THP-1 세포에 대한 Fc γ R- HEK293T 세포의 상대적인 배경 신호는 IgCw- γ K가 6C407 IgG1 단클론 항체, Human IgG 다클론 항체와 같은 full-size IgG보다 더 낮은 것을 확인했다(도 3C 및 D). 낮은 배경 신호는 IgCw- γ K 구조에서 항원 결합의 역할을 하는 가변부위(V)가 없기 때문일 것으로 추측할 수 있다.
- [125]
- [126] 실시예 6: IgG 농도 정량을 위한 레퍼런스로서 IgCw- γ K의 사용
- [127] IgG 농도를 결정하기 위해 사용되는 레퍼런스인 full-size IgG에 대한 대체물로 IgCw- γ K가 사용될 수 있을지 확인하였다.
- [128] 두 가지의 로그 표준 곡선은 각각 사람 다클론 IgG(도 4A)와 IgCw- γ K(도 4B)의 알려진 농도 값을 이용한 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)에 의해 만들었다. 농도를 모르는 두 가지의 단클론 IgG 표본(6C407과 3D8)을 이용해 같은 실험을 수행했다. IgG 농도는 각각의 커브에서 보간법(interpolation)에 의해 결정되며(표 3), 사용한 선형 보간법 식(<https://formulas.tutorvista.com/math/interpolation-formula.html>)은 $x = x_1 + (x_2 - x_1) \times (y - y_1) / (y_2 - y_1)$ 이다.

[129]

[130] [표3]

두 가지의 표준 곡선을 이용해 결정된 IgG 농도

농도를 모르는 시료	405nm에서 의 흡광도	각 레퍼런스를 이용한 표준 곡선에 보간법을 통해 결정된 농도(ng/ml)		
		사람 IgG	IgCw-γκ	
			원 자료	표준화(×1.5) *
6C407 IgG	0.323	29.7	20.4	30.6
3D8 IgG	0.288	25.0	16.9	25.3

[131] * IgCw-γκ의 표준 곡선에 의해 결정된 IgG 농도는 그 값을 정규화하기 위해 분자량의 비율을 곱했다[IgG(~150 kDa):IgCw-γκ(~100 kDa)의 분자비=3:2].정규화된 6C407 IgG와 3D8 IgG의 농도는 각각 30.6ng/ml과 25.3ng/ml이며, 이는 사람 다클론 항체를 이용한 표준곡선에 의해 결정된 농도(6C407 IgG: 29.6ng/ml, 3D8 IgG: 25.0ng/ml)와 매우 유사하다. 이는 IgCw-γκ가 사람 IgG 농도를 결정하기 위한 레퍼런스 분자로 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[132]

산업상 이용가능성

[133] 항체 신약 개발 등에 있어서 항체의 효능을 평가하기 위해서는 대조군 즉, 레퍼런스(reference) 항체가 필요하고, 기존의 레퍼런스 항체는 비특이적(non-specific) 결합 즉, 다른 항원과의 반응에 의한 효과(off-target effect)를 완전히 배제할 수 없으며, 정제 수율 또한 낮다.

[134] 반면 본 발명에 따른 항체 불변부위로만 이루어진 재조합 단백질인 IgCw를 이용하는 경우 기존의 레퍼런스 항체의 문제점들을 극복할 수 있으며, 이차항체 제조를 위한 항원으로서도 활용 가능하다. 따라서, 본 발명에 따른 IgCw는 의생명 과학 분야에서 다양하게 활용이 가능하다.

[135]

[136] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[137]

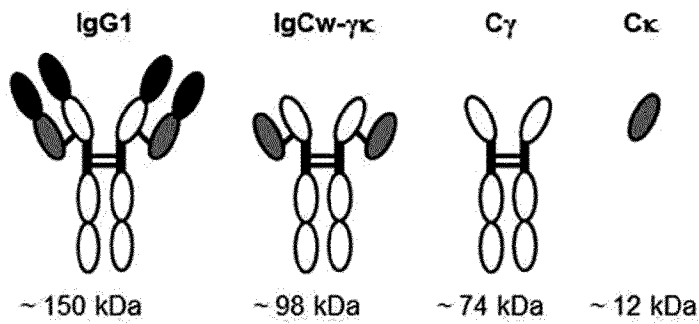
서열목록 Free Text

[138] 전자파일 첨부하였음.

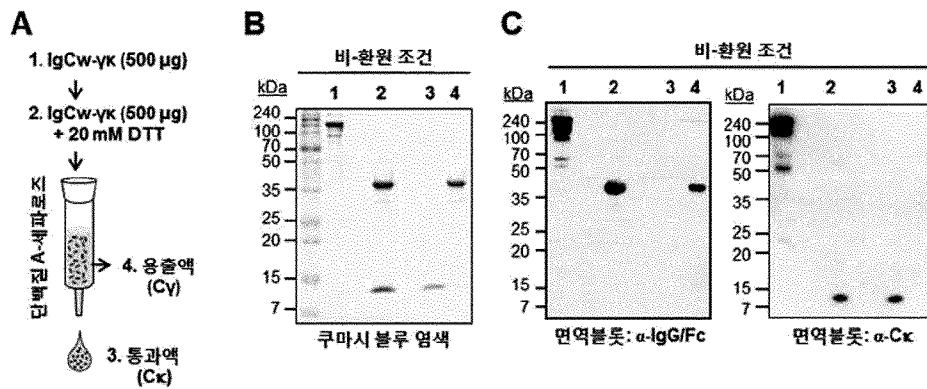
청구범위

- [청구항 1] 항체 불변부위(constant region)로만 구성된 IgCw를 포함하는 항체 효능 평가용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 IgCw는 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, IgY, IgW 또는 IgNar로부터 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 불변부위는 중쇄 불변부위(heavy chain constant region; CH) 및/또는 경쇄 불변부위(light chain constant region; CL)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 중쇄 불변부위는 C_H1, C_H2, C_H3 및 C_H4로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 중쇄 불변부위는 C_γ, C_μ, C_α, C_ε 및 C_δ로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나를 포함하고, 상기 경쇄 불변부위는 C_κ 또는 C_λ를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 중쇄 불변부위와 경쇄 불변부위는 이황화결합(disulfide bond)에 의해 결합되거나 펩티드 링커(linker)로 결합된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제1항의 항체 효능 평가용 조성물을 대조군으로 이용하는 것을 특징으로 하는 항체 효능 평가 방법.
- [청구항 8] 항체 불변부위(constant region)로만 구성된 IgCw를 포함하는 이차항체(secondary antibody) 제조용 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 이차항체는 anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-IgE, anti-Ig D, anti-IgY 및 anti-IgW로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

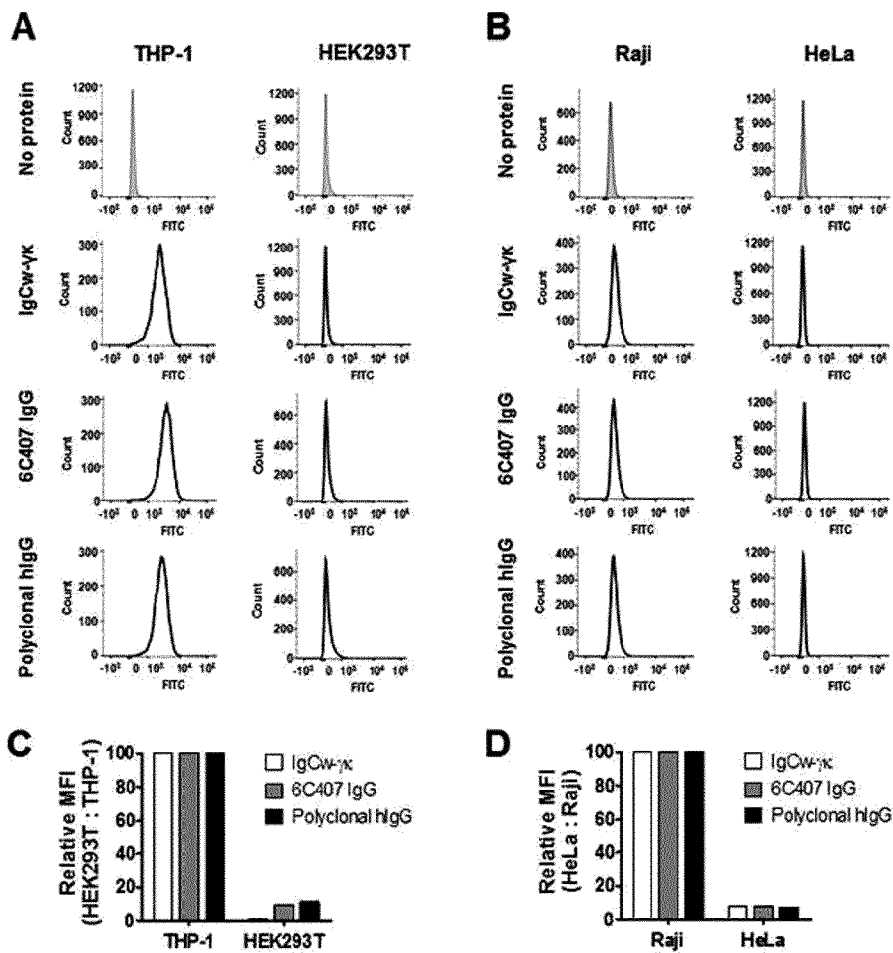
[도1]



[도2]



[도3]



[도4]

