(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0067597
(43) 공개일자 2011년06월22일

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0124249
(22) 출원일자 2009년12월14일
심사청구일자 2009년12월14일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
전태훈
서울특별시 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트 236동 1802호
김상훈
경상북도 경주시 동천동 347-2번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 9 항

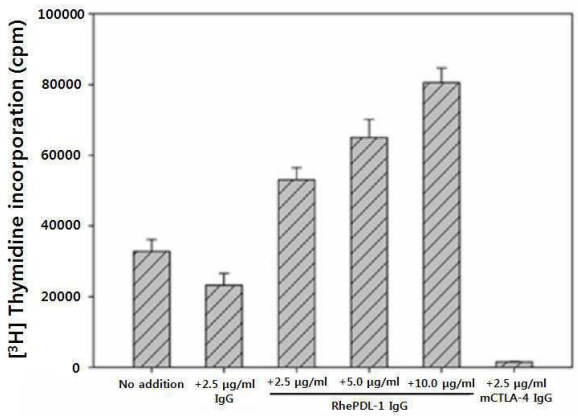
(54) 레서스 원숭이 ＰＤＬ-1 융합 이뮤노글로불린

(57) 요 약

본 발명은 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 19 ~ 238 번째 아미노산 서열을 갖는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1의 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 영역(Fc region)으로 이루어진 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 레서스 원숭이(Rhesus monkey)의 PDL-1을 이용하여 항체 재조합 단백질(융합 이뮤노글로불린)을 제조할 수 있으며, 상기 레러스 원숭이의 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 레서스 원숭이의 T 세포에 처리하는 경우, T 세포의 활성이 효과적으로 증가됨을 확인하였다. 따라서 본 발명의 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 이용하여 면역활성화를 유도할 수 있으며, 세포벽에서 발현되는 형태의 PDL-1을 가용성 형태(soluble form)로 제조하여 정제된 형태의 단백질을 사용하였으므로, 면역치료제재로서의 사용이 가능할 것으로 사료된다. 또한 인간과 유전적으로 가까운 레서스 원숭이를 이용한 동물실험이 가능하며, 인간에서의 면역반응의 활성을 기대할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

박정규

서울특별시 서초구 잠원동 대림아파트 1동 306호

김정식

경기도 과천시 중앙동 주공APT 119-303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A040004092310701 00

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료기술개발사업

연구과제명 돼지췌도 세포이식시 이종간의 면역관용 유도 기술 개발

기여율

주관기관 고려대학교 생명자원연구소

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 19 ~ 238 번째 아미노산 서열을 갖는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1의 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 영역(Fc region)으로 이루어진 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린.

청구항 3

서열번호 2의 19 ~ 238 번째 아미노산 서열을 코팅하는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1의 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자와 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 레서스 원숭이 PDL-1의 세포외 도메인 유전자는 서열번호 1의 55 ~ 714 번째 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 도 2의 (B)의 개열지도 RhePDL1IgG/pLNCX2를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제 3항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 숙주세포는 CHO 세포인 것을 특징으로 하는 형질전환된 숙주세포.

청구항 8

제 1항의 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 함유하는 면역세포 활성제.

청구항 9

시험관 내에서 면역세포에 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 처리하는 것을 포함하는 면역세포 증식 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 19 ~ 238 번째 아미노산 서열을 갖는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1의 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 영역(Fc region)으로 이루어진 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] T 세포의 비정상적인 활성화 또는 비활성화는 면역현상과 관련된 질병을 일으킨다. 장기이식, 자가면역질환과 같은 과도한 면역반응의 활성화에 의한 질병을 치료하기 위해서는 T 세포의 활성을 억제하는 방향으로 유도하는 반면, 외부 감염원에 의한 감염 또는 암의 발생을 치료하기 위해 T 세포의 활성을 유도하여 치료한다. T 세포의 활성을 조절하는 데에는 T 세포수용체(T cell receptor; TCR)에 의한 항원신호와 전문항원제시세포(professional antigen presenting cell)에서 발현되는 보조자극인자(co-stimulatory molecule)에 의한 신호가 필요하다 [Lenschow et al., 1996]. 이러한 면역반응을 조절하기 위한 T 세포의 활성에 관련되는 보조자극인자에 의한 신호를 조절하는 시도가 많이 이루어지고 있다 [Weaver et al., 2008].

[0003] T 림프구가 증식하고 분화하는데 있어서 APC(antigen presenting cell)에서 제공되는 여러 가지 신호전달이 중요하다고 알려져 있으며, 이러한 신호전달에 각종 보조자극인자가 중요한 역할을 담당한다.

[0004] 특히, APC 표면에 발현되는 단백질 중 PDL-1(programmed death ligand 1)은 B7 family에 속하는 표면 단백질로서, B7-H1 이라고도 불린다. PDL-1은 기존의 B7-1 또는 B7-2 등의 다른 B7 family와 달리 T 림프구 표면의 CD28 또는 CTLA-4 등과는 결합하지 않으며, PD-1(programmed death receptor 1) 이라는 특정 receptor와 결합한다. PDL-1과 PD-1이 결합함으로써 TCR을 통한 신호전달체계를 억제하여 T 림프구의 증식이나 사이토카인 분비력을 억제한다고 보고되고 있다 [Okazaki T, Honjo T, Trends Immunol 2006;27:195-201].

[0005] PD-1과 결합하는 PDL-2의 경우에는 단백질의 발현이 전문항원제시세포에 국한되어 있는 반면, PDL-1은 보다 다양한 세포들에게서 발현된다 [Riley, 2009]. PDL-1은 활성화된 T 세포에서도 발현이 되며 면역관용에 관여된 Treg 세포에서도 발현된다 [Wang et al., 2006]. 또한 PD-1과 PDL-1간의 상호작용은 말초관용을 유지하는 데에 중요하다고 알려져 있으며, 예컨대 이들 두 단백질에 의한 상호작용이 제한된 동물모델에서는 사구체염과 진행성 관절염과 같은 자가면역증상이 관찰되었다 [Nishimura et al., 1999; Cheng et al., 2007].

[0006] 한편, 이러한 PD-1과 PDL-1에 의한 신호는 보조자극인자의 신호를 억제하여 면역반응을 감소시킨다고 알려져 있다. 따라서 면역억제를 유도하기 위한 연구에 주로 사용되며 현재까지 실시된 PD-1이나 PDL-1을 제어하여 실시된 연구들은 대부분 바이러스를 이용한 유전자 도입법을 사용하고 있을 뿐 아니라, 동물모델로 설치류를 사용한다 [Dudler et al., 2006; Zhang et al., 2008]. 이에 따라, 면역활성을 유도하는 연구는 거의 진행되지 않았을 뿐 아니라, 인간에게 적용 가능한 면역활성제를 개발하기 위한 생체실험은 윤리적인 제약이 가해진다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 레서스 원숭이(Rhesus monkey)의 PDL-1을 이용하여 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 제조하였으며, 상기 융합 이뮤노글로불린을 레서스 원숭이 T 세포에 적용하는 경우, 레서스 원숭이 T 세포의 활성을 효과적으로 증가시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 레서스 원숭이 T 세포의 활성을 효과적으로 증가시키는 장점을 갖는 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 이용한 면역세포 활성제를 제공하는데

있다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1의 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 영역(Fc region)으로 이루어진 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 제공한다.

[0011] 본 발명의 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린에 있어서, 상기 레서스 원숭이 PDL-1(진뱅크 허가번호 NM_001083889.1)의 세포외 도메인은 PD-1에 결합할 수 있는 어떠한 레서스 원숭이 PDL-1의 세포외 도메인도 될 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2의 19 ~ 238 번째 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0012] 또한 상기 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역은 인간 이뮤노글로불린 중 항원이 결합하는 Fab 영역(fragment antigen binding region) 이외의 영역으로서 백혈구나 마크로파지(macrophage) 등과 결합할 수 있는 어떠한 영역도 될 수 있으며, 구체적으로 그 서열은 NCBI의 AAA02914에서 얻을 수 있다.

[0013] 상기 레서스 원숭이 PDL-1의 세포외 도메인과 인간 이뮤노글로불린 Fc 영역사이에는 flexible region인 힌지(hinge)서열이 포함될 수 있으며, 본 발명에서 상기 힌지 서열은 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 연결된 것을 그대로 사용하였다.

[0014] 또한 상기 세포외 도메인은 세포막에 결합하게 하는 소수성 도메인을 제거하여 사용한 것으로서, 상기 세포외 도메인과 상기 인간 이뮤노글로불린과 융합시킴으로써, 가용성 형태(soluble form)의 융합 이뮤노글로불린 단백질을 제조하였다.

[0015] 본 발명의 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린에 있어서, 상기 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다. 또한 상기 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린은 서열번호 3의 염기서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있다.

[0016] 또한 상기 융합 이뮤노글로불린은 레서스 원숭이 CTLA-4 세포외 도메인의 N' 말단에 리더 펩타이드(leader peptide)를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 상기 용어 “리더 펩타이드(leader peptide)”는 분비성 단백질 전구체의 N-말단에 존재하고, 또한 천연 성숙 단백질에는 존재하지 않는 서열을 나타내며, 리더 펩타이드는 단백질 전구체로부터 절단되는 펩타이드를 나타낸다. 일반적으로 리더 서열은 세포 외로의 분비에 따라 프로테아제(또는 시그날 펩타이드)에 의해 절단된다. 이러한 리더 펩타이드는 생물종을 초월하여 일정한 공통된 서열상의 특징을 갖지만 어떤 생물종으로 분비기능을 나타내는 리더 펩타이드가 다른 생물종에서도 반드시 분비기능을 발휘한다는 것은 아니다. 프리프로 단백질 또는 프리 단백질에서, 당해 리더 펩타이드는 상이한 단백질 유래일 수 있거나, 목적 단백질에 천연으로 존재하는 리더 펩타이드일 수 있고, 사용하는 숙주의 분비형 단백질 유래가 바람직하다. 또는 사용하는 숙주의 코돈 사용 빈도에 따라 최적인 코돈을 갖도록 변형할 수 있다. 또한 본 발명의 목적에 사용할 수 있는 리더 펩타이드는 이로부터 유래하는 천연 성숙 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 일부 함유할 수 있다. 본 발명에서는 구체적으로 “METDTLLLWVLLLWVPGSTGD”의 아미노산 서열을 갖는 리더 펩타이드를 사용하였다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 19 ~ 238 번째 아미노산 서열을 코팅하는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자와 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0019] 본 발명의 재조합 발현벡터에 있어서, 상기 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자는 서열번호 1의 55 ~ 714 번째 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 상기 재조합 발현벡터는 상기 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 발현시킬 수 있는 복제가능한 어떠한 발현벡터도 사용할 수 있으나, 바람직하게는 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 벡터를 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예 에서는, 도 2에 나타낸 것과 같이 포유류의 발현벡터 pLNCX2 벡터(Clontech)(도 2의 (A))에 삽입하여 RhePDL1IgG/pLNCX2(도 2의 (B))를 제작하였다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 볼 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0022] 본 발명의 숙주세포는 상기 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 발현하여 분비할 수 있는 어떠한 동물 세포도 가능하나, 바람직하게는 CHO(chinese hamster ovary) 세포, COS-7(Monkey, African green) 세포, NIH/3T3(Mouse fibroblast) 세포, BHK-21(Baby Hamster kidney, Syrian golden) 세포, Hela(Human Carcinoma) 세포, Vero(Monkey kidney, African green) 세포, 및 C127(Mouse) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 세포를 사용하는 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 CHO 세포를 사용하는 것이 높은 형질전환율로 인하여 좋다. 본 발명의 실시예에서는 Tetracycline off system의 293GPG 세포와 포유동물 유래 세포주인 CHO 세포를 이용하여 형질전환 시켰다. 상기 293GPG 세포를 거쳐 형질전환하면 더욱 안정적으로 발현이 유지되고, 타겟 세포에 독성을 거의 주지 않는 장점이 있기 때문에 293GPG 세포를 거쳐 CHO 세포로 형질전환 시켰다.

[0023] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 상기 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 포함하는 면역세포 활성제를 제공한다.

[0024] 본 발명의 실시예 에서는 본 발명의 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 레서스 원숭이의 T 세포에 처리하여 활성을 측정해본 경우, 본 발명의 융합 이뮤노글로불린이 T 세포의 활성을 효과적으로 증가시킴을 확인하였다(실시예 4). 이에 따라, 인간과 유전적으로 가까운 레서스 원숭이를 이용한 동물시험이 가능할 수 있으며, 인간에서의 면역반응의 활성을 기대할 수 있다.

[0025] 본 발명의 면역세포 활성제는 치료용 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들들은 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내, 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.

[0026] 본 발명의 치료제는 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 “치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적적히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 시험관 내에서 면역세포에 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 처리하는 것을 포함하는 면역세포 증식 방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0029] **< 실시예 1. RT-PCR 방법에 의한 유전자의 클로닝 >**

[0030] 레서스 원숭이(Rhesus monkey)의 말초혈액단핵구세포(Pheriperal Blood Mononuclear Cell; PBMC)를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μl의 클로로포름(Chloroform, Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리한 후, 추출한 2 μg의 mRNA를 주형으로 역전자 연쇄중합반응(RT-PCR)을 수행하여 cDNA를 복제하였다. 상기 cDNA를 주형으로하여 유전자 database에서 얻은 염기서열에 따라 하기 표 1의 (A)와 같이 프라이머를 제작한 후, 연쇄중합반응을 통해 레서스 원숭이 PDL-1 유전자를 획득하였다. 획득한 레서스 원숭이 PDL-1 유전자 전체 중 세포외 도메인(extracellular domain)을 포함하는 염기서열만을 얻기 위해 하기 표 1의 (B)와 같이 프라이머를 제작하여 다시 연쇄중합반응을 실시하였다. 이때, 역전사 효소는 Superscript Ⅲ(Invitrogen)를 사용하였으며, 중합효소는 Tag polymerase(gene craft)를 사용하였다.

[0031] [표 1. 프라이머]

[0032]

	프라이머	
(A)	정방향	5'- GCA GGG CAT TCC AGA AAG ATG AG -3'
	역방향	5'- CCC TGC TTG AAG ATC AGA AGT TCC -3'
(B)	정방향	5'- GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC TTT ACT GTC ACG GTT -3'
	역방향	5'- CGC GGA TCC CCT TTC ATT TGG AGG AAG -3'

[0033] **< 실시예 2. 단백질 발현 플라스미드 제조 및 형질전환세포주 제작 >**

[0034] 레서스 원숭이(Rhesus monkey) PDL-1 유전자로부터 단백질을 발현시키기 위해, 레서스 원숭이 PDL-1 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자를 포유류의 발현벡터인 pLNCX2(도 2, CLONTECH)에 클로닝하였다.

[0035] 먼저, 5′ 말단에 제한효소 Xho I 의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들고, 3′ 말단 또한 제한효소 BamH I 의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들었다. 그 후, 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc region의 cDNA를 레서스 원숭이 PDL-1 세포외 도메인 유전자의 3′ 말단 쪽에 융합(fusion)시켰다. 상기 cDNA는 human peripheral lymphocyte로부터 mRNA를 추출한 후, 역전사를 통해 얻어낸 cDNA이다. 융합시 사용된 제한효소 부위는 5′ 말단에 제한효소 BamH I , 3′ 말단에 제한효소 Not I 을 사용하였다. 상기 제한효소 절단부위의 염기서열은 하기와 같다.

[0036] Xho I : CCG CTC GAG

[0037] BamH I : CGC GGA TCC

[0038] Not I : GCG GCC GCC ACC

[0039] 그 결과, 도 1의 구조로 된 레서스 원숭이 PDL-1 세포외 도메인 융합 이뮤노글로불린을 발현하는 재조합 벡터 RhePDL1IgG/pLNCX2(도 2의 (B))를 완성하였다.

[0040] 이후, 각각 Tetracycline off system의 293GPG 세포와 포유동물 유래 세포주인 CHO(Chinese Hamster Ovary) 세포를 사용하여 형질전환 시켰다. 먼저, 293GPG 세포를 6 well 조직 배양 플레이트에 well당 1×10^5 세포가 되도록 접종한 후, 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양 24 시간 후, 세포가 well 표면의 70 ~ 80% 정도를 덮을 정도로 자라면, 혈청이 무첨가된 DMEM 배지에서 1 ~ 2 μg의 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 발현 벡터 DNA를 6 ~ 8 μg의 Lipofectamine plus(Invitrogen)를 사용하여 293GPG 세포에 도입시켰다. 그 후, 상기 발현 벡터가 도입된 293GPG 세포를 24 시간 동안 배양하여 바이러스(레트로바이러스)를 포함하는 배양 상층액을 이용하여 숙주세포(CHO cell)를 4 ~ 5 시간 동안 배양한 후, 혈청이 10% 함유된 배지로 바꿔서 24 시간 배양하였으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 상기 CHO 세포는 형질도입된 세포를 얻기 위해 G418 항생제 1.5 mg/ml을 처리하여 유전자가 발현되는 세포를 얻었다.

[0041] **< 실시예 3. 단백질 발현 및 정제 >**

[0042] 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 단백질이 포유류 세포에서 과발현 됨을 확인하기 위해, Cell lysis buffer(20 mM Tris pH7.4, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)를 사용하여 형질전환된 CHO 세포에서 세포용해물을 얻었다. 10 % polyacrylamide gel에서 전기영동을 한 후, Membrane(Amersham Hybond-p, GE Healthcare)으로 단백질을 이동시킨 후, 일차항체(primary antibody)로 염소 항-인간이뮤노글로불린 항체를 결합시키고, 이차항체(secondary antibody)로 HRP가 결합된 항-염소이뮤노글로불린 항체를 결합시킨 후, Chemiluminescent Substrate(Thermo, 34080)로 발색하여 Kodak 필름(KODAK BioMax Light Film, 8689358)에 노광시켰다. 음성비교군으로 벡터만을 도입한 CHO 세포를 사용하였다(도 3(A)). 이와 더불어 형질전환된 세포를 배양한 상층액에 발현되어 분비된 단백질을 확인하기 위해 ELISA 키트(R&D system)를 통하여 확인하였다.

[0043] 상기의 방법으로 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 단백질의 발현을 확인 한 후, 확인된 형질전환 세포를 배양하여 얻은 배양상층액으로부터 발현 단백질을 정제하기 위하여 Protein A Agarose kit(553-50-00, KP

L)를 사용하였다. 먼저, Protein A Agarose column에 wash/binding buffer(0.1M sodium phosphate, 0.15M NaCl, pH 7.4)를 통과시킨 후, 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 단백질을 함유한 배양상청액을 통과시켜 Protein A와 이뮤노글로불린(IgG)과의 결합력을 이용하여 column에 흡착시켰다. 흡착된 단백질들은 Elution buffer(0.2M Glycine, pH 3±1.85)를 이용하여 다시 용출시켜 정제 하였다. 용출된 시료는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 실시한 후, 쿠마지블루(coomassie blue)로 염색하여 발현된 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 단백질을 확인하였다. 상기 단백질 정제 결과는 도 3에 나타내었다.

[0044] 도 3의 (A)는 발현벡터를 도입한 CHO cell에서 본 발명의 단백질인 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 단백질이 제대로 발현되는지를 확인한 결과이다. 단백질을 정제하기전, 유전자가 도입된 세포에서 전체단백질을 추출하여 인간 이뮤노글로불린(human Ig)에 대한 항체로 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였다. 단백질을 삽입하지 않은 대조군 Mock의 경우 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린이 발현되지 않음을 볼 수 있다.

[0045] 도 3의 (B)는 유전자가 도입된 세포를 배양한 후, 세포배양액으로부터 분비된 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 정제한 후, SDS-PAGE를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다. 그 결과, 단백질의 크기는 아미노산의 수만을 이용하여 계산한 결과 약 51.4 KDa 이었다. 상기 확인된 단백질들은 PBS에 투석하여 평형에 이르게 한 후, -70 ℃에 보관하였다가 면역억제 실험에 사용하였다.

[0046] **< 실시예 4. 레서스 원숭이 T 세포의 활성 측정 >**

[0047] 레서스 원숭이 T 세포의 활성 효과를 측정하기 위해, MLR(Mixed lymphocyte Reaction) 방법을 이용하여 레서스 원숭이의 면역세포 기능을 확인하였다. 본 발명에서는 MHC haplotype이 다른 effector cell과 target cell과의 반응을 수행하여 면역반응이 나타나게 하였다. 즉 장기이식의 경우 장기거부반응이 나타나게 되는 것과 같다. 면역반응이 나타나게 되면 T 세포가 증식하게 되고, T 세포의 증식동안 배양액에 포함된 방사선동위원소 ^{3}H가 T 세포 내에 축적되게 된다. 반응 후, 세포에 축적된 ^{3}H를 측정함으로써 면역활성을 비교할 수 있다. 상기 과정을 하기에 구체적으로 설명하였다.

[0048] 먼저, 레서스 원숭이의 PBMC에서 분리한 T 림프구 1×10^{5} 세포를 effector로 사용하였다. 또한 이와 다른 MHC haplotype을 갖는 다른 레서스 원숭이의 PBMC 1×10^{5} 세포를 irradiation시켜 세포를 비활성화 시킨 후 target 세포로 상기 effector 세포와 함께 배양하였다. 72 시간 동안 배양한 후, T 세포의 활성을 측정하였다. 이 때, 방사성 동위원소가 표시된 ^{3}H를 12 시간 전에 effector 세포에 처리하고 분열한 세포에서 uptake한 방사성 동위원소의 양을 측정하였다. 측정 결과는 도 4에 나타내었다.

[0049] 도 4의 No addition군은 첨가물 없이 effector cell과 target cell 만을 배양한 군으로서 상기 군보다 수치가 높으면 면역반응이 활성화되었음을 의미하며, 이와 반대로 상기 군보다 수치가 낮으면 면역반응이 억제되었음을 의미한다. Ig control군은 PDL이 아닌 Ig 자체로인한 면역반응에 차이를 나타낼 수 있기 때문에 첨가한 군이다. 또한 mCTLA-4 Ig는 면역반응을 억제한다고 알려져 있는 단백질로서 면역억제의 control군으로 이용하였다.

[0050] 측정 결과, 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린의 경우, No addition군 보다 높은 수치가 관찰되므로 면역활성을 증가시킴을 알 수 있으며, 그 반응은 농도의존적으로 나타남을 확인할 수 있다. 따라서 본 발명의 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 단백질은 레서스 원숭이 T 세포의 활성을 효과적으로 증가시킴을 확인할 수 있다.

산업이용 가능성

[0051] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 레서스 원숭이(Rhesus monkey)의 PDL-1을 이용하여 항체 재조합 단백질(융합 이뮤노글로불린)을 제조할 수 있다.

[0052] 본 발명의 실시예를 통해 살펴본 바와같이, 본 발명의 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 레서스 원숭이 T 세포에 처리하는 경우 T 세포의 활성을 효과적으로 증가시킴을 확인하였다. 따라서 본 발명의 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린을 이용하여 면역활성화를 유도할 수 있으며, 세포벽에서 발현되는 형태의 PDL-1을 가용성 형태(soluble form)로 제조하여 정제된 형태의 단백질을 사용하였으므로, 면역치료제재로서의 사용이 가능할 것으로 사료된다. 또한 인간과 유전적으로 가까운 레서스 원숭이를 이용한 동물실험이 가능하며, 인

간에서의 면역반응의 활성을 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 레서스 원숭이 PDL-1 이뮤노글로불린의 발현을 위한 유전자 구축 모식도를 나타낸다.

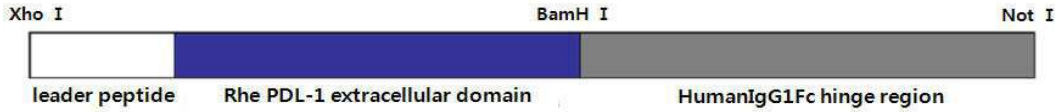
[0054] 도 2의 (A)는 발현벡터 pLNCX2의 개열지도를 나타내며, (B)는 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 벡터RhePDL1IgG/pLNCX2의 개열지도를 나타낸다.

[0055] 도 3은 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 단백질 정제 결과를 나타낸다.

[0056] 도 4는 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린 단백질의 레서스 원숭이 T 세포의 활성 측정 결과를 나타낸다.

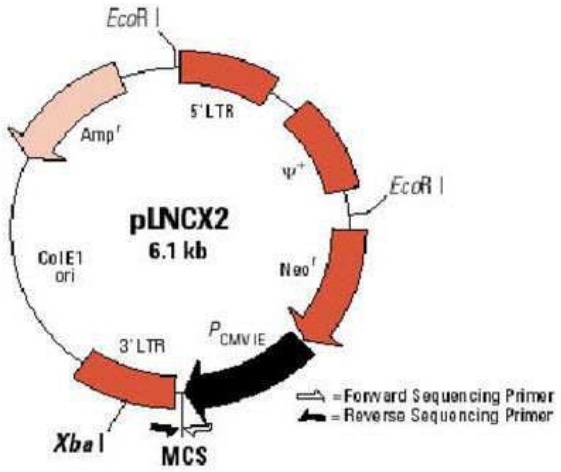
도면

도면1



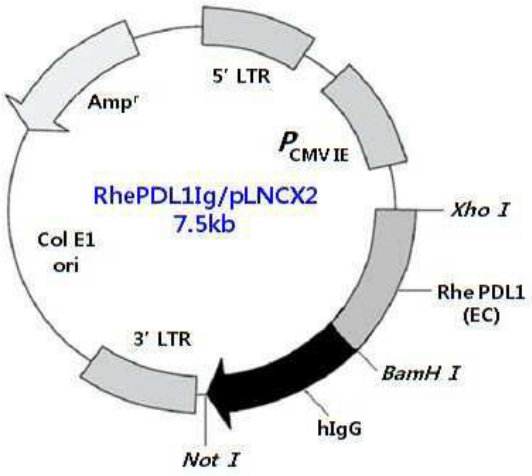
도면2

(A)

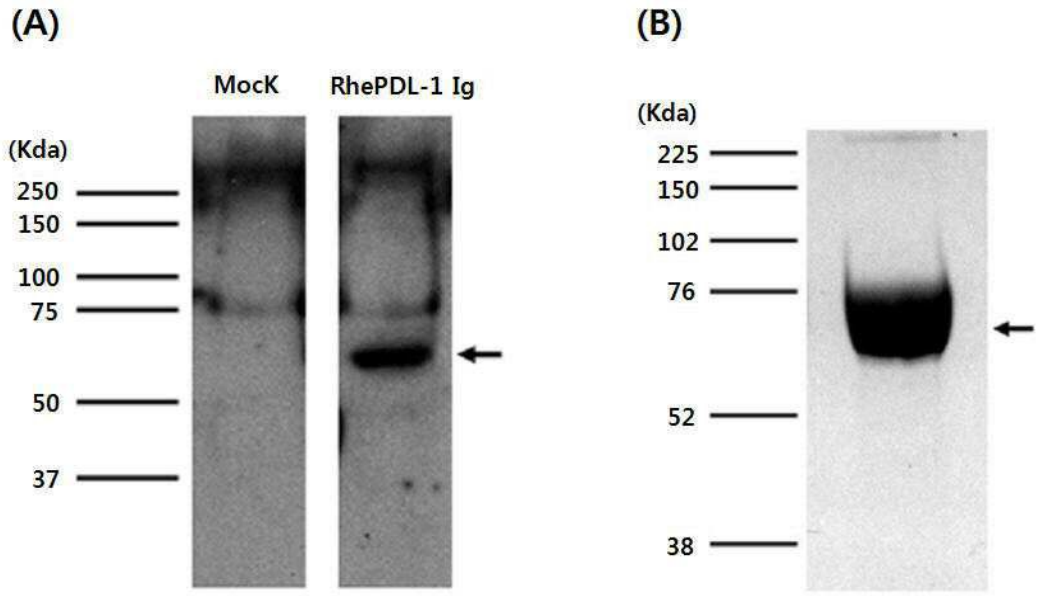


MCS (multi cloning site)의 제한효소 부위

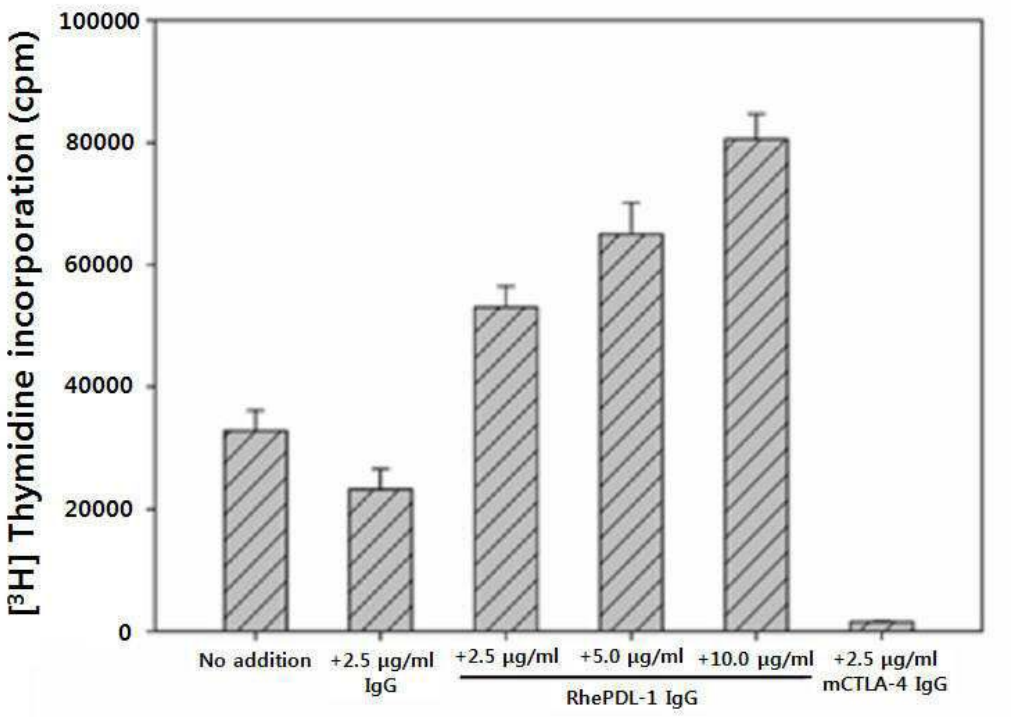
(B)



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> Rhesus monkey PDL-1 fusion Ig

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 873
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA sequence for Rhesus monkey PDL-1

<400> 1
atgaggatat ttgctgtctt tatattcacg atctactggc atttgctgaa tgcatttact 60

gtcacggttc ccaaggacct atatgtggta gagtatggca gcaatatgac aattgaatgc 120

agattcccag tagaaaaaca attaggcctg acttcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180

gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaaggttca gcatagtaac 240

tatagacaga gggcccagct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcgg 300

atcacagatg tgaaattgca ggatgcaggg gtttaccgct gcatgatcag ctatggtggt 360

gccgactaca agcggattac cgtgaaagtc aatgctccat acaacaaaat caaccaaaga 420

attttggttg tcgatccagt cacctctgaa catgaactaa catgtcaggc tgagggctac 480

cccaaggccg aagtcatttg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540

accaccaatt ccaagagaga ggagaagctt ttaaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600

acaacagcta atgagatttt ctactgcatt tttaggagat taggtcctga ggaaaaccat 660

acagctgaat tggtcatccc agaactacct ctggcgcttc ctccaaatga aaggactcac 720

ttggtaattc tgggagccat ctttttactc cttggtgtag cactgacatt catcttctat 780

ttaagaaaag ggagaatgat ggatatgaaa aaaagtggca ttcgagttac aaactcaaag 840

aagcaacgtg atacacaatt ggaggagacg taa 873

<210> 2
<211> 290
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence for Rhesus monkey PDL-1

<400> 2
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Thr Ile Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Gly Leu Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

```
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
                165                 170                 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn
            180                 185                 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr
        195                 200                 205

Cys Ile Phe Arg Arg Leu Gly Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225                 230                 235                 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Phe Leu Leu Leu Gly Val Ala Leu Thr
                245                 250                 255

Phe Ile Phe Tyr Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Met Lys Lys Ser
            260                 265                 270

Gly Ile Arg Val Thr Asn Ser Lys Lys Gln Arg Asp Thr Gln Leu Glu
        275                 280                 285

Glu Thr
    290
```

<210> 3
<211> 1431
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA sequence for Rhesus monkey PDL-1 fusion immunoglobulin

<400> 3

```
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt        60

gactttactg tcacggttcc caaggaccta tatgtggtag agtatggcag caatatgaca       120
```

attgaatgca gattcccagt agaaaaacaa ttaggcctga cttcactaat tgtctattgg 180

gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag 240

catagtaact atagacagag ggcccagctg ttgaaggacc agctctccct gggaaatgct 300

gcacttcgga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tttaccgctg catgatcagc 360

tatggtggtg ccgactacaa gcggattacc gtgaaagtca atgctccata caacaaaatc 420

aaccaaagaa ttttggttgt cgatccagtc acctctgaac atgaactaac atgtcaggct 480

gagggctacc ccaaggccga agtcatttgg acaagcagtg accatcaagt cctgagtggt 540

aagaccacca ccaccaattc caagagagag gagaagcttt taaatgtgac cagcacactg 600

agaatcaaca caacagctaa tgagattttc tactgcattt ttaggagatt aggtcctgag 660

gaaaaccata cagctgaatt ggtcatccca gaactacctc tggcgcttcc tccaaatgaa 720

aggcgcggat ccgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 780

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 840

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 900

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 960

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1020

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1080

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1140

cccccatcac gagatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1200

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1260

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1320

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1380

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaatg a 1431

<210> 4
<211> 476
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence for Rhesus monkey PDL-1 fusion immunoglobulin

<400> 4
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val
20 25 30

Val Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu
35 40 45

Lys Gln Leu Gly Leu Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp
50 55 60

Lys Asn Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln
65 70 75 80

His Ser Asn Tyr Arg Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser
85 90 95

Leu Gly Asn Ala Ala Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala
100 105 110

Gly Val Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg
115 120 125

Ile Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile
130 135 140

```
Leu Val Val Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala
145                 150                 155                 160

Glu Gly Tyr Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln
                165                 170                 175

Val Leu Ser Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys
            180                 185                 190

Leu Leu Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu
        195                 200                 205

Ile Phe Tyr Cys Ile Phe Arg Arg Leu Gly Pro Glu Glu Asn His Thr
    210                 215                 220

Ala Glu Leu Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu
225                 230                 235                 240

Arg Arg Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380
```

```
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```