



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0017333

(43) 공개일자

2014년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

C40B 40/02 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0084182

(22) 출원일자

2012년07월31일

심사청구일자

2012년07월31일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

심현보

서울 강남구 압구정로29길 23, 210동 702호 (압구정동, 현대아파트)

서은애

충남 논산시 부적면 부인2길 38-13

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

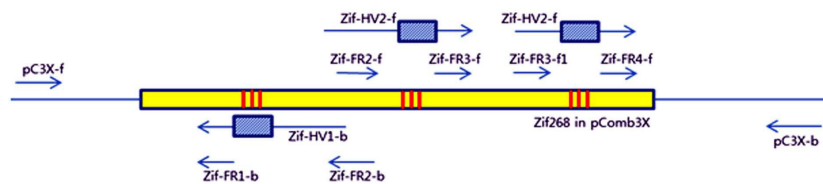
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 징크 핑거 단백질 라이브러리 및 이를 이용한 조작된 징크 핑거 단백질 스크리닝

(57) 요약

본 발명은 항체와 유사하게 비-핵산인 특정 단백질 또는 소분자 물질에 특이적으로 결합하는 징크 핑거 단백질을 도출할 수 있는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 설계, 구축 및 이를 이용하여 표적 분자에 대해 항체와 유사한 기능을 하는 비 항체 징크 핑거 단백질을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 징크 핑거 단백질의 DNA 결합 부위의 아미노산 잔기에 랜덤화를 도입하여 파지표면 제시 기술을 이용하여 징크 핑거 단백질 라이브러리를 제작하였으며, 이로부터 표적 분자인 단백질 혹은 소분자 물질에 대해 결합하는 징크 핑거 클론군을 선별하여 표적 분자에 대한 결합력을 확인하였으므로, 본 발명의 징크 핑거 단백질 라이브러리 제조 방법을 이용하여 제작한 라이브러리 및 이를 이용한 표적 분자에 대해 항체 기능을 하는 비 항체 징크 핑거 단백질의 스크리닝 방법은 징크 핑거 단백질을 기반으로 하는 유사항체 개발에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1b



(72) 발명자

김수연

경기 수원시 장안구 정자천로189번길 47, 418동
1402호 (정자동, 연꽃마을풍림아파트)

이보라

경기 포천시 소흘읍 봉솔로2길 15, 102동 702호 (
원일산호아파트)

김명신

경기 용인시 기흥구 사은로126번길 46, 306동 140
1호 (보라동, 현대모닝사이드1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110027185

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 유사 항체 파지 디스플레이 라이브러리의 개발

기 여 율 1.4/2

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110028391

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌프론티어사업

연구과제명 고효율 다기능 항암항체 설계기술

기 여 율 0.6/2

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 징크 핑거 단백질(zinc finger protein)의 징크 핑거 도메인의 알파-나선(α -helix) 부위 서열을 랜덤화하여 조작된 라이브러리를 제작하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 라이브러리를 파지미드(phagemid) 벡터에 도입하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)의 파지미드 벡터를 박테리아에 형질도입하는 단계; 및
- 4) 상기 단계 3)의 박테리아와 보조 파지(helper phage)를 함께 배양한 뒤 ZnF 라이브러리를 표면 제시(phage display)하는 파지 라이브러리를 수득하는 단계를 포함하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 징크 핑거 단백질은 서열번호 1의 Zif268인 것을 특징으로 하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 알파-나선(α -helix) 부위는 랜덤화 이전의 징크 핑거 단백질에서 DNA 결합 부위인 것을 특징으로 하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 랜덤화는 아미노산 서열에서 알라닌(Ala, A), 아스파르트산(Asp, D), 글루탐산(Glu, E), 페닐알라닌(Phe, F), 이소류신(Ile, I), 라이신(Lys, K), 류신(Leu, L), 메티오닌(Met, M), 아스파라긴(Asn, N), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 발린(Val, V), 또는 타이로신(Tyr, Y)의 13개의 아미노산으로의 랜덤화, 또는 글라이신(Gly, G), 프롤린(Pro, P), 시스테인(Cys, C) 및 히스티딘(His, H)을 포함하지 않는 랜덤화인 것을 특징으로 하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 1) 다음에 올리고뉴클레오티드 합성 과정 또는 PCR 과정 오류를 수정하는 단계를 추가로 포함하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 PCR 과정 오류의 수정은 항생제 선별에 의한 것을 특징으로 하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 파지미드 벡터는 pComb3X 파지미드 벡터인 것을 특징으로 하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 단계 3)의 박테리아는 대장균인 것을 특징으로 하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리 제조방법.

청구항 9

제 1항의 제조방법으로 제조된 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리.

청구항 10

제 9항의 징크 핑거 단백질 라이브러리를 포함하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 선별용 키트.

청구항 11

제 9항의 징크 핑거 단백질 라이브러리로부터 선별된 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질.

청구항 12

- 1) 제 9항의 징크 핑거 단백질 라이브러리를 패닝하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 패닝한 라이브러리에서 표적-결합 징크 핑거 단백질 생산 클론을 선별하는 단계를 포함하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 스크리닝 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 패닝은 2 내지 5번 수행하는 것을 특징으로 하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 스크리닝 방법.

청구항 14

제 12항에 있어서, 선별된 징크 핑거 단백질 라이브러리 클론의 표적 분자와의 결합력을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 스크리닝 방법.

청구항 15

제 12항에 있어서, 상기 비-핵산 표적 분자는 펩타이드, 단백질 또는 소분자 물질인 것을 특징으로 하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 스크리닝 방법.

청구항 16

제 12항에 있어서, 상기 표적 분자는 달걀 리소자임(hen egg lysozyme), 오브알부민(ovalbumin), 리툽시맵(rituximab), 쥐(murine) RANKL 또는 FITC인 것을 특징으로 하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 스크리닝 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 항체와 유사하게 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적으로 결합하는 징크 핑거 단백질 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리 및 이를 이용하여 표적 분자에 대해 항체와 유사하게 기능을 하는 비 항체 징크 핑거 단백질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파지 표면제시(phage display) 기법은 박테리아를 숙주로 하는 박테리오파지(bacteriophage)를 유전적으로 조작하여 유전형(유전자)과 표현형(단백질)이 하나의 파지 입자를 통해 연결되도록 만드는 기법이다. 이 경우 유전형으로서의 유전자는 파지 유전자의 일부로 삽입되며, 표현형으로서의 단백질은 그 단백질의 유전자가 들어있는 파지 입자의 표면에 제시된다. 이러한 유전형과 표현형의 물리적 결합은 단백질 공학에서 매우 중요한 개념이며, 표현형으로 나타나는 성질에 의해 선택된 단백질 클론의 유전자를 쉽게 획득하여 복제, 증폭, 분석 및 조작할 수 있도록 해 준다. 항체는 특별히 파지 표면제시 기법이 매우 유용하게 적용된 예이다. 매우 높은 다양성을 가지는 항체 라이브러리를 파지의 표면에 제시한 후 표면흡착된 항원과 결합시키면, 항원에 선택적으로 결합하는 항체 클론의 유전자를 획득할 수 있다. 이는 실험동물을 거치지 않고 항체를 얻는 매우 효과적인 방법이며, 특히 임의의 항원에 대한 인간항체를 얻을 수 있으므로 인체에서의 면역반응이 적은 치료용 항체 신약 등의 개발에 매우 높은 활용성을 가진다. 높은 결합친화도를 가지는 좋은 항체를 획득하기 위해서는 라이브러리의 품질이 중요하며, 특히 라이브러리의 크기와 기능적 다양성 및 클론의 품질이 중요하다.

[0003] 라이브러리의 크기는 그로부터 선택되는 항체의 품질을 결정하는 가장 중요한 요소 중 하나이다. 항체 라이브러리의 항원 결합부위는 이론적으로 어떤 특정 항원에도 경도되지 않은 무작위적 다양성을 가지며, 순전히 우연에 의해 특정 항원에 선택적으로 결합하는 항체가 무작위적 다양성 중에서 나타나게 된다. 따라서 라이브러리의 크기가 커질수록, 즉 라이브러리 내의 서로 다른 항체의 숫자가 증가할수록, 우연에 의해 높은 선택성 및 친화도를 가지는 항체가 발견될 확률이 높아지는 것이다. 일반적으로 최소 10^8 이상의 크기가 필요한 것으로 인식되고 있으며, 많은 수의 항체 라이브러리가 10^9 내지 10^{11} 정도의 크기를 가지고 있다. 라이브러리의 구축을 위해서는 라이브러리 서열의 설계가 선행되어야 한다. 비교적 높은 골격 다양성을 가지는 B세포 유래 항체 라이브러리 혹은 자연항체 라이브러리(natural antibody library)와 달리, 합성 항체라이브러리는 한 개 혹은 제한된 개수의 골격 서열을 기반으로 구축되나, 합성 항체라이브러리의 경우 화학적 합성과정의 오류로 인해 돌연변이 및 염기의 첨가/삭제가 빈번하게 발생하게 되며 따라서 기능적 다양성(전체 클론 중 정상적인 항체를 발현할 수 있는 클론의 비율)이 낮아지게 되므로 교정 과정이 필요하다.

[0004]

[0005] 징크 핑거(Zinc finger, ZnF) 도메인은 대표적인 DNA 결합단백질 구조로서, 주요한 DNA-결합 단백질 모티프를 형성한다. 또한, 징크 핑거의 알파-나선(α -helix)과 DNA의 주홈(major groove) 사이의 상호 작용이 DNA 서열의 인식을 강하고 특이적으로 가능하게 한다. 징크 핑거 단백질의 이(2)가 양이온 징크 이온의 시스테인 및/또는 히스티딘 잔기로의 4배위 결합은 ZnF 폴드(fold)의 안정화에 도움이 되며, 이것은 전형적인 ZnF에서는 알파-나선 및 베타 헤어핀으로 구성되어 있다(Gamsjaeger et al., 2007). DNA-ZnF 상호작용에서, ZnF 도메인의 알파 나선에 위치하는 상기 잔기들은 DNA 이중 나선의 주홈과 상호작용한다. DNA의 서열 특이적 인식에 필수적인 높은 서열 가변성(variability)을 가지는 징크 핑거 알파-나선은 4배위(tetrahedrally coordinated) 징크 이온의 존재에 의해 구조적으로 안정화되므로 DNA와 접촉하게 하는 알파 나선 잔기 변형을 통해 ZnF 도메인에 대한 새로운 DNA 서열 특이성을 조작하는 것을 가능하게 한다. 징크 핑거 단백질의 이와 같은 특성은 연구자들

에 의해 서열-특이적 DNA 결합자들을 분리할 수 있는 징크 핑거 라이브러리 디자인 및 제작에 활용되어왔다.

[0006] 파지 표면제시 기술은 새로운 DNA 서열 특이성을 가진 인위적인 ZnF 도메인 개발에 성공적으로 사용되어왔다. Zif268 및 TFIIIA와 같은 ZnF 도메인은 사상형 박테리오파지(filamentous bacteriophage) M13 표면에 제시될 수 있으며, 다중 돌연변이(multiple mutations)가 상기 도메인의 전체 접힘 구조의 붕괴 없이 도입될 수 있다(Choo and Klug, 1995; Wu et al., 1995). 새로운 특이성이 있는 조작된 ZnF 도메인은 DNA-접촉 알파-나선 잔기가 랜덤화되어있는 파지-표면제시된 ZnF 라이브러리(phage-displayed ZnF libraries)로부터 선택될 수 있다. ZnF 도메인이 신규한 DNA 서열 특이성을 갖도록 조작될 수 있음이 수차례 입증되어온 반면, ZnF 펩타이드/도메인이 비-핵산 표적 분자를 인식하도록 조작을 시도한 연구는 드물다(Bianchi et al., 1995). 자연에는, 비-핵산 표적, 특히 단백질에 결합하는 많은 ZnF 도메인의 예시가 존재한다(Gamsjaeger et al., 2007). 따라서, 본 발명자들은 파지-표면제시된 ZnF 라이브러리로부터 단백질 및 다른 비-핵산 표적에 대한 특이적 결합자들(binders)의 선별이 가능할 것임을 추론하였다. ZnF 모티프는 작은 크기이고(~10 kDa), 다양하고 고유한 결합자(binder)들을 많이 산출하며, 숙주 *E.coli*의 세포질로부터 과발현될 수 있다. 상기 이점들은 다양한 응용에서 항체 및 잘-수립된 다른 결합제들을 보완하는 대안 스캐폴드로서의 조작된 ZnF 단백질의 용도 발견에 도움이 될 것이다.

[0007] 많은 징크 핑거 단백질들은 징크 핑거 도메인이 3개가 연결된 형태이며, 각 징크 핑거 도메인의 알파-나선이 DNA의 주홈(major groove)과 상호작용하여 3개의 염기를 인식함으로써 총 9개의 연속된 염기쌍으로 이루어진 DNA의 특정서열과 결합한다. 이러한 징크 핑거 도메인의 DNA 결합 모듈로서의 특성을 이용하여, 징크 핑거 단백질 내의 단일 징크 핑거 도메인만을 랜덤화한 라이브러리로부터 3개의 염기를 인식하는 징크 핑거 도메인을 선별하는 연구가 보고된 바 있다. 이러한 징크 핑거 도메인들을 조합하여 더 긴 DNA 염기쌍의 서열을 인식하는 인공 징크 핑거 단백질을 만드는 것이 가능하다. 그러나, 비-핵산 표적분자에 결합하도록 조작된 징크 핑거 단백질에 대한 연구 보고는 매우 드물고, 이에 대한 유일한 연구(Bianchi et al., 1995)는 단일 징크 핑거 도메인으로 이루어진 짧은 펩타이드를 이용한 것으로, 복수(multiple)의 징크 핑거 도메인에 동시에 랜덤화를 도입한 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제작 및 그로부터 비-핵산 표적분자에 결합하는 징크 핑거 단백질을 도출하는 연구는 보고된 바가 없다.

[0008] 이에 본 발명자들은 핵산에만 결합하던 기존의 단일 징크 핑거 도메인을 랜덤화 시킨 라이브러리와 달리, Zif268 징크 핑거 단백질의 3개의 징크 핑거 도메인을 모두 랜덤화시킴으로써 작용 면적이 넓어진 징크 핑거 라이브러리를 제작하여, 비-핵산 표적 분자에도 표적-특이적으로 강하게 결합하는 징크 핑거 단백질을 파지 표면제시(phage display) 기술을 통해 라이브러리로부터 분리하였으므로 본 발명의 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론들을 포함하는 징크 핑거 라이브러리 제작방법 및 이를 이용하여 제작된 라이브러리가 비-핵산 표적 분자에 특이적으로 강하게 결합하는 징크 핑거 단백질 스크리닝에 이용될 수 있음을 제시함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Bhakta, M. S., and Segal, D. J. (2010). The generation of zinc finger proteins by modular assembly. *Methods Mol Biol* 649, 3-30.
- (비특허문헌 0002) Bianchi, E., Folgori, A., Wallace, A., Nicotra, M., Acali, S., Phalipon, A., Barbato, G., Bazzo, R., Cortese, R., Felici, F., and et al. (1995). A conformationally homogeneous combinatorial peptide library. *J Mol Biol* 247, 154-160.
- (비특허문헌 0003) Binz, H. K., Amstutz, P., and Pluckthun, A. (2005). Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 23, 1257-1268.
- (비특허문헌 0004) Birtalan, S., Zhang, Y., Fellouse, F. A., Shao, L., Schaefer, G., and Sidhu, S. S. (2008). The intrinsic contributions of tyrosine, serine, glycine and arginine to the affinity and

specificity of antibodies. J Mol Biol 377, 1518-1528.

(비특허문헌 0005) Choo, Y., and Klug, A. (1995). Designing DNA-binding proteins on the surface of filamentous phage. Curr Opin Biotechnol 6, 431-436.

(비특허문헌 0006) Gamsjaeger, R., Liew, C. K., Loughlin, F. E., Crossley, M., and Mackay, J. P. (2007). Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. Trends Biochem Sci 32, 63-70.

(비특허문헌 0007) Jamieson, A. C., Kim, S. H., and Wells, J. A. (1994). In vitro selection of zinc fingers with altered DNA-binding specificity. Biochemistry 33, 5689-5695.

(비특허문헌 0008) Pavletich, N. P., and Pabo, C. O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. Science 252, 809-817.

(비특허문헌 0009) Rader, C., Steinberger, P., and Barbas, C. F., III (2001). Selection from Antibody Libraries. In Phage Display: A Laboratory Manual, C. F. Barbas, III, D. R. Burton, J. K. Scott, and G. J. Silverman, eds. (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 10.11-10.20.

(비특허문헌 0010) Scott, J. K., and Barbas, C. F., III (2001). Phage Display Vectors. In Phage Display: A Laboratory Manual, C. F. Barbas, III, D. R. Burton, J. K. Scott, and G. J. Silverman, eds. (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 2.1-2.19.

(비특허문헌 0011) Wu, H., Yang, W. P., and Barbas, C. F., 3rd (1995). Building zinc fingers by selection: toward a therapeutic application. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 344-348.

(비특허문헌 0012) Yang, H. Y., Kang, K. J., Chung, J. E., and Shim, H. (2009). Construction of a large synthetic human scFv library with six diversified CDRs and high functional diversity. Mol Cells 27, 225-235.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리를 제공하는 것이다.
- [0012] 또한, 본 발명의 목적은 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 선별용 키트를 제공하는 것이다.
- [0013] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질을 제공하는 것이다.
- [0014] 아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 따른 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리를 제공한다.
- [0017] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 따른 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 선별용 키트를 제공한다.

- [0018] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 따른 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질을 제공한다.
- [0019] 아울러, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 징크 핑거 단백질의 유전자들을 조작하여 징크 핑거 도메인의 알파-나선 모두가 랜덤화된 파지 표면 제시 라이브러리를 제작하였으며, 상기 징크 핑거 라이브러리에서 핵산 분자 외에 단백질 및 소분자 물질과 같은 비-핵산 표적 분자와 특이적으로 결합하는 징크 핑거 단백질을 선별하여 그 결합 여부를 확인하였으므로, 본 발명의 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법을 이용하여 제작한 라이브러리를 스크리닝하여 선별한 징크 핑거 단백질은 핵산에만 특이적으로 결합하는 기존의 징크 핑거 단백질과 달리 비-핵산 표적 분자에 특이적으로 강한 결합을 형성하므로 이를 항체 대용으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1a는 Zif268 단백질의 DNA 결합부위 서열이다.
- 도 1b는 조작된 징크 핑거 라이브러리의 구축을 위해 사용된 프라이머 및 Zif268 유전자에 각 프라이머가 결합하는 위치 및 방향을 나타내는 도이다.
- 도 2는 Zif268의 오목한(concave) 표면에 위치한 13개의 아미노산 알파-나선 잔기를 표시한 구조 모형이다.
- 도 3은 무작위적으로 징크 핑거 라이브러리 클론들을 선택하여 서열 분석으로 설계 위치에 다양성이 도입된 것을 확인한 도이다.
- 도 4는 표적 분자에 대해 선별한 클론들의 서열을 확인한 도이다.
- 도 5는 선별한 표적-결합 징크 핑거 단백질 클론이 주어진 목표분자에 특이적으로 결합함을 확인한 도로서, 도 5의 위 그림은 표적분자 FITC-BSA에 대한 징크 핑거 클론 D8의 특이적 결합을 보여주며, 아래 그림은 표적분자 Rituximab에 대한 다수의 징크 핑거 단백질들의 특이적 결합을 보여준다;
- A450: 450 nm 파장에서의 흡광도;
- dilution fold: 희석 배수; 및
- ZnF clones: 징크 핑거 단백질 라이브러리 클론.
- 도 6은 선별한 징크 핑거 단백질 클론들을 *E.coli*로부터 정제하여 쿠마시 스테이닝(coomassie stainng)으로 확인한 사진이다.
- 도 7은 D8 클론에서 정제한 징크 핑거 단백질과 FITC-결합된 BSA와의 결합, B11 클론에서 정제한 징크 핑거 단백질과 달걀 리소자임(hen egg lysozyme)과의 결합 및 B7 클론에서 정제한 징크 핑거 단백질과 RANKL과의 결합을 ELISA를 통해 확인한 그래프이다.
- 도 8은 D8 클론의 FITC-BSA와의 특이적 결합을 경쟁 ELISA를 통해 확인한 그래프이다.
- 도 9는 D8 클론의 비랜덤화 지역의 염기성 아미노산을 돌연변이 시킨 후 ELISA로 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0023] "패닝(panning)"은 파지의 외벽(coat)에 펩타이드 또는 단백질을 제시(display)하는 파지 라이브러리로부터, 표적 분자(항체, 효소, 세포표면 리셉터 등 단백질 또는 소분자 물질)와 결합하는 성질을 지닌 펩타이드 또는 단백질을 표면에 발현하고 있는 파지만을 선택해 내는 과정을 일컫는다.

- [0024] "파지표면제시 (phage display)"는 M13 박테리오파지의 유전자를 조작하여 그 표면 단백질 중 하나의 유전자에 외부단백질의 유전자를 융합하면, 그 유전자로부터 생산된 파지의 표면 단백질에 외부단백질이 융합되어 파지의 표면에 제시되는 기법이다. 단백질을 표면 제시하는 경우 흔히 gIII 유전자의 5' 쪽에 외부유전자를 융합한다.
- [0025] "항체라이브러리"는 서로 다른 서열을 가지는 다양한 항체 유전자들의 집합이다. 항체라이브러리로부터 임의의 항원에 대해 특이적 항체를 분리하기 위해서는 매우 높은 다양성이 요구되며, 일반적으로 10^9 내지 10^{11} 개의 서로 다른 항체 클론들로 이루어진 라이브러리가 구축되어 사용된다. 이러한 항체라이브러리를 이루는 항체 유전자는 파지미드(phagemid) 벡터에 클로닝되어 대장균에 트랜스폼 된다.
- [0026] "파지미드(phagemid)" 벡터는 파지복제시작점(phage origin of replication)을 가지는 플라스미드 DNA이다. 통상적으로 항생제내성유전자를 선택 마커(selection marker)로 가지고 있다. 파지표면제시에 사용되는 파지미드 벡터의 경우 M13 파지의 gIII 유전자 혹은 그 일부가 포함되어 있으며, 라이브러리 유전자는 gIII 유전자의 5' 말단에 라이게이션(ligation)되어 대장균에서 융합단백질로서 발현된다. 본 발명에서 사용된 pComb3X 벡터는 파지미드 벡터의 예이다.
- [0027] "보조파지(helper phage)"는 파지미드가 파지 입자로 조립되도록 필요한 유전정보를 제공하는 파지이다. 파지미드에는 파지 유전자 중 gIII 혹은 그 일부만이 존재하므로 파지미드로 트랜스폼된 대장균을 보조파지로 감염시켜 나머지 파지 유전자를 공급하게 된다. M13K07 혹은 VCSM13 등의 종류가 있으며 대부분 카나마이신(kanamycin) 등 항생제 내성 유전자를 포함하여 보조파지에 감염된 대장균을 선택할 수 있도록 하고 있다. 또한 조립신호(packaging signal)에 결합이 있으므로 보조파지 유전자보다 파지미드 유전자가 선별적으로 파지입자 속으로 조립된다.
- [0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0029] 본 발명은
- [0030] 1) 징크 핑거 단백질(zinc finger protein)의 징크 핑거 도메인의 알파-나선(α -helix) 부위 서열을 랜덤화하여 조작된 라이브러리를 제작하는 단계;
- [0031] 2) 상기 단계 1)의 라이브러리를 파지미드(phagemid) 벡터에 도입하는 단계;
- [0032] 3) 상기 단계 2)의 파지미드 벡터를 박테리아에 형질도입하는 단계; 및
- [0033] 4) 상기 단계 3)의 박테리아와 보조 파지(helper phage)를 함께 배양한 뒤 ZnF 라이브러리를 표면 제시(phage display)하는 파지 라이브러리를 수득하는 단계를 포함하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법을 제공한다.
- [0034] 상기 징크 핑거 도메인은 2개 이상인 것이 바람직하며, 3개인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 상기 징크 핑거 단백질의 징크 핑거 도메인에 존재하는 알파-나선은 DNA의 주홈과 상호작용하여 각각 3개의 염기를 인식하는 부위이며, 본 발명에서는 상기 3개의 도메인 모두를 동시에 랜덤화하여 비-핵산 표적 분자에 강하게 특이적으로 결합할 수 있는 라이브러리를 제조하였다.
- [0036] 상기 징크 핑거 단백질은 서열번호 1의 Zif268인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 상기 알파-나선(α -helix) 부위는 DNA 결합 부위인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 상기 랜덤화는 중첩(degenerate) 코돈인 DHK 코돈을 사용한 알라닌(Ala, A), 아스파르트산(Asp, D), 글루탐산(Glu, E), 페닐알라닌(Phe, F), 이소류신(Ile, I), 라이신(Lys, K), 류신(Leu, L), 메티오닌(Met, M), 아스파라긴(Asn, N), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 발린(Val, V) 또는 타이로신(Tyr, Y)의 13개의 아미노산으로

의 랜덤화가 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. DHK 코돈의 D는 아데닌(Adenine, A), 구아닌(Guanine, G) 및 티민(Thymine, T)의 중첩을, H는 아데닌(Adenine, A), 시토신(Cytosine, C) 및 티민(Thymine, T)의 중첩을, K는 구아닌(Guanine, G) 및 티민(Thymine, T)의 중첩을 의미한다.

[0039] 상기 랜덤화는 글라이신(Gly, G), 프롤린 (Pro, P), 시스테인(Cys, C) 및 히스티딘(His, H)을 포함하지 않는 랜덤화일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0040] 상기 단계 1) 다음에 올리고뉴클레오타이드 합성 과정 및 PCR 과정의 오류를 수정하는 단계를 추가로 포함하는 것이 바람직하며, 상기 오류의 수정은 항생제 선별에 의한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 상기 파지미드 벡터는 pComb3X 파지미드 벡터인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0042] 상기 박테리아는 대장균인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법으로 제조된 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리를 제공한다.

[0044] 고전적 징크 핑거 도메인(classical zinc finger domain)은 두 개의 역평행 베타-스트랜드(antiparallel beta-strand)와 하나의 알파-나선(α -helix)이 2가 징크 이온의 배위결합을 통하여 안정화되어있는 구조이며, Zif268 단백질을 포함하는 많은 징크 핑거 단백질은 도 2에서 보는 것처럼 이러한 징크 핑거 도메인이 3개가 연결된 형태이다. 징크 핑거 단백질은 각 징크 핑거 도메인의 알파-나선이 DNA의 주홈(major groove)과 상호작용하여 3개의 염기를 인식함으로써 DNA의 특정서열과 결합하게 되므로 3개의 징크 핑거 도메인을 가지는 Zif268와 같은 징크 핑거 단백질은 9개의 염기로 이루어진 특정 DNA 서열을 인식할 수 있다. 이와 같이 각 징크 핑거 도메인은 3개의 염기를 인식하는 독립적인 모듈로 작용할 수 있기 때문에, 기존의 징크 핑거 라이브러리를 제작시에는 보통 하나의 징크 핑거 도메인만을 랜덤화시킨 라이브러리로부터 특정 3개 염기서열을 인식하는 도메인을 획득하고 이들 도메인을 연결하여 보다 긴 염기서열을 인식할 수 있는 징크 핑거 단백질을 제작하는 방식을 사용하였으나, 일반적으로 분자 간의 강한 결합을 위해서는 넓은 작용면적이 필요하므로, 하나의 도메인만을 랜덤화하는 방식으로는 DNA 등의 핵산이 아닌 단백질, 소분자 물질 등의 비-핵산 표적분자에 강하게 결합하는 징크 핑거 단백질은 제작하기 어려웠다. 징크 핑거 라이브러리를 비-핵산 표적분자에 적용한 경우에도 단일 징크 핑거 도메인을 사용하였을 뿐(Bianchi et al., 1995), 현재까지 복수(multiple)의 징크 핑거 도메인에 동시에 랜덤화를 도입한 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제작 및 그로부터 비-핵산 표적분자에 결합하는 징크 핑거 단백질을 도출하는 연구는 보고된 바 없었다.

[0045] 이에, 본 발명자들은 본 발명의 구체적인 실시예에서, 핵산과 결합하는 기존의 징크 핑거 단백질 라이브러리와 달리, 비-핵산 표적분자와 강하게 결합하는 징크 핑거 단백질을 제작하기 위하여, 3개의 징크 핑거 도메인으로 이루어져 9개의 염기서열을 인식하는 Zif268 징크 핑거 단백질의 DNA 결합 부위에 위치하는 알파-나선(α -helix)의 DNA 결합 부위 아미노산(도 1a 음영부분 참조)을 표적으로 하여 DHK 코돈을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머들을 이용해 PCR로 랜덤화를 도입하여 라이브러리를 제작하였다(표 1 및 도 1b 참조). 상기 라이브러리를 pComb3X 파지미드 벡터에 클로닝한 뒤 대장균에 형질도입하여 조작된 징크 핑거 라이브러리를 제작하였으며, 제작된 징크 핑거 라이브러리의 올리고뉴클레오타이드 합성 과정 및 PCR 과정 오류를 항생제-선별을 통해 교정하였다. 그 결과, 1×10^{10} 의 크기로 이루어진 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리가 구축되었다(도 3 참조).

[0046] 따라서, 본 발명의 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제조방법을 통해 제조된 징크 핑거 단백질 라이브러리는 3개의 징크 핑거 도메인의 알파-나선이 모두 랜덤화되어 넓은 작용면적을 가지므로 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리의 제작에 유용하게 이용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 발현벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 발현벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그

널 서열에는 숙주가 에셰리키아속(*Escherichia* sp.)균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus* sp.)균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 발현백터는 백터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현백터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0048] 본 발명에 따른 상기 발현백터를 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 대장균 또는 효모 세포 등에 형질전환시킨 후, 형질전환된 숙주세포를 배양함으로써 본 발명에 따른 징크 핑거 단백질을 대량 생산할 수 있다. 숙주세포의 종류에 따른 적절한 배양 방법 및 배지 조건 등은 당해 분야의 통상의 기술자에게 알려진 공지 기술로부터 당업자가 용이하게 선택할 수 있다. 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 원핵 생물일 수 있다. 또한, 사카로마이세스 세르비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모, 곤충 세포, 식물 세포, 동물 세포로부터 유래한 진핵 세포일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 동물 세포는 자가 또는 동종 이계 동물 세포일 수 있다. 자가 또는 동종 이계 동물 세포에 도입하여 제조된 형질전환체는 개체에 투여되어 암을 치료하는 세포치료 등에 이용될 수도 있다. 상기 숙주세포로의 발현백터 도입방법은 당업자에게 공지된 어느 방법을 사용해도 무방하다.

[0049] 또한, 본 발명은 본 발명의 징크 핑거 단백질 라이브러리를 포함하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 선별용 키트를 제공한다.

[0050] 또한, 본 발명은 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질을 제공한다.

[0051] 아울러, 본 발명은

[0052] 1) 징크 핑거 단백질 라이브러리를 패닝하는 단계; 및

[0053] 2) 단계 1)의 패닝한 라이브러리에서 표적-결합 징크 핑거 단백질 생산 클론을 선별하는 단계를 포함하는 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0054] 상기 패닝은 2 내지 5번 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0055] 상기 단계 2) 이후에 선별된 징크 핑거 단백질 라이브러리 클론의 표적 분자와의 결합력을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0056] 상기 패닝에 이용된 표적 분자는 DNA, RNA, 펩타이드, 단백질 또는 소분자 물질인 것이 바람직하며, 단백질 또는 소분자 물질인 것이 더욱 바람직하고, 달걀 리소자임(hen egg lysozyme), 오브알부민(ovalbumin), 리툽시맵(rituximab), 쥐(murine) RANKL 또는 FITC인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0057] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 징크 핑거 단백질 라이브러리 제조방법을 통해 제작한 라이브러리를 표적 분자인 4 종의 단백질(달걀 리소자임(hen egg lysozyme), 오브알부민(ovalbumin), 리툽시맵(rituximab) [CD20에 대한 마우스-인간 키메라 항체], 쥐(murine) RANKL) 및 소분자 물질(FITC-BSA)과 함께 패닝하였다. 패닝한 징크 핑거 라이브러리를 파지 표면 제시하는 클론을 선별하여 표적 분자에 특이적으로 결합하는 징크 핑거 단백질을 스크리닝하였으며(표 3 및 도 4 참조), ELISA 분석을 통해 결합 특이성을 확인하였다(도 5 참조). 상기 선별된 징크 핑거 라이브러리 클론을 이용하여 표적 분자에 특이적인 징크 핑거 단백질을 정제하여 표적 분자와 특이적으로 결합함을 ELISA를 통해 확인하였다(도 7 및 도 8 참조).

[0058] 따라서, 본 발명의 핵산 또는 비-핵산 표적 분자에 특이적인 클론들을 포함하는 징크 핑거 단백질 라이브러리로부터 단백질 및 소분자와 같은 표적 분자에 특이적으로 결합하는 징크 핑거 단백질을 스크리닝할 수 있으며, 이를 표적 특이적 징크 핑거 단백질 선별용 키트에 유용하게 이용할 수 있음을 밝혔다.

[0059] 본 발명의 표적 특이적 징크 핑거 단백질 선별용 키트는 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체

(Conjugate); 상기 표지체와 발색반응 할 발색기질 용액, 세척액 또는 효소반응 정지 용액으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 표적 특이적 징크 핑거 단백질 선별용 키트는 징크 핑거 단백질-표적 분자 간의 결합을 분석함으로써 질병을 진단할 수 있으며, 상기 결합반응은 통상의 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA(Radioimmunoassay), 샌드위치 측정법(Sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯(Western Blot), 면역블롯 분석(Immunoblot assay) 및 면역조직화학염색 방법(Immunohistochemical staining)으로 이루어지는 군에서 선택되는 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.

[0061] 상기 2차 항체는 발색반응을 하는 통상의 발색제로 표지되는 것이 바람직하며, HRP(Horseradish peroxidase), 알칼리성 인산분해효소(Alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(Coloid gold), FITC(Poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(Rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(Fluorescein) 및 색소(Dye)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 표지체가 사용될 수 있다.

[0062] 발색을 유도하는 기질은 발색반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 및 OPD(ophenylenediamine)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 세척액은 인산염 완충용액, NaCl 및 트윈 20(Tween 20)을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05% 트윈 20(Tween 20)으로 구성된 완충용액(PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지용액은 황산 용액(1M H2SO4)이 바람직하게 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하여 선별한 징크 핑거 단백질은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성구산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 또한, 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 갈화 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성 용제, 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하여 선별한 징크 핑거 단백질은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0067] 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하여 선별한 징크 핑거 단백질의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 단백질의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 수개월에 한번 또는 1일 1 내지 6 회까지 투여될 수 있다.

- [0068] 본 발명이 적용 가능한 개체는 미생물, 무척추동물, 식물, 세포주 또는 척추동물이다.
- [0069] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0070] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0071] <실시예 1> ZnF 라이브러리 설계 및 제작
- [0072] <1-1> 징크 핑거 라이브러리를 설계
- [0073] 본 발명자들은 Zif268 징크 핑거 도메인을 ZnF 라이브러리(ZiFi) 제작을 위한 스캐폴드로서 사용하여 징크 핑거 라이브러리를 설계하였다.
- [0074] 구체적으로, Zif268(PDB ID: 1A1L)의 결정 구조로부터, Zif268의 오목한(concave) 표면에 위치한 13개의 아미노산 알파-나선 잔기를 랜덤화의 표적으로 하였다(도 2). 상기 위치는 DHK 코돈(D = A, G, 또는 T; H = A, C, 또는 T; K = G 또는 T)에 의해 13개의 아미노산과 정지 코돈(TAG)으로 랜덤화되었다. 랜덤화되는 부위는 알파-나선 부위이므로 낮은 나선성(helical propensity) 아미노산인 글라이신(glycine)과 프롤린(proline)을 배제하였으며, 시스테인(cysteine)과 히스티딘(histidine)의 결사슬을 사용하여 Zn^{2+} 와 배위결합을 하고 이것이 ZnF의 구조적 안정성을 유지해 주는 Zif268에서는 정확한 배위결합의 형성이 매우 중요하므로, 랜덤화 부위에서 시스테인(cysteine)과 히스티딘(histidine)을 배제함으로써 원치 않는 배위결합이 생기는 것을 최소화하도록 설계하였다. 상기 DHK 코돈을 사용하면 상기의 4개의 아미노산과 2개의 정지 코돈이 배제되며, 아르기닌, 글루타민 및 트립토판 또한 디자인된 표적-결합 자리에서 배제되나, 이들은 다른 아미노산으로 대체 가능하다(예를 들어, 아르기닌은 라이신으로, 글루타민은 아스파라긴으로, 트립토판은 페닐알라닌으로). 따라서, Gly, Pro, His, Cys, Arg, Gln 및 Trp의 7가지 아미노산이 DHK 랜덤화 코돈에 포함되지 않았다.
- [0075] <1-2> Zif268 유전자 클로닝
- [0076] 본 발명자들은 ZnF 라이브러리(ZiFi) 제작을 위한 스캐폴드로서 필요한 Zif268 유전자를 클로닝하였다.
- [0077] 구체적으로, 마우스의 폐 및 고환(testis) 유래 cDNA로부터 프라이머 Zif-f (5'-aattagggccaggcgccgaacgcccatatgcttgc-3) (서열번호 2) 및 Zif-b (5'-tatatggcggcctggcgcgtcttctgtcttaaatgg-3) (서열번호 3)를 이용하여 Zif268 유전자를 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭하였다. 상기 PCR 산물은 제한효소 SfiI로 절단되었으며, pComb3X 파지미드(phagemid) 벡터로 클로닝하였다. 상기 벡터를 전기천공법(electroporation)을 이용하여 ER2537 *E.coli* 균주로 형질도입하였고, 이를 ompseq 프라이머 (5'-gaagacagctatcgcgattgca-3) (서열번호 4)를 이용하여 DNA 시퀀싱하여 Zif268 유전자의 클로닝을 확인하였다. Zif268 단백질의 DNA 결합부위 서열을 확인하여 다양성을 도입할 ZnF의 오목한 표면쪽의 아미노산을 결정하였다(도 1a).
- [0078] <1-3> ZnF 유전자 라이브러리 구축
- [0079] 본 발명자들은 상기 실시예 <1-1>에서 설계한 Zif268 단백질의 13 자리의 아미노산 잔기에 DHK 랜덤화를 포함하는 징크 핑거(ZnF) 유전자 라이브러리를 제작하기 위해, Zif268-pComb3X를 주형으로 사용하여 일련의 PCR을 수행하였다.
- [0080] 구체적으로, 도 1a에 회색표시된 ZnF의 오목한 표면쪽의 아미노산들 각각의 위치에 상기 실시예 <1-1>에 기재된 DHK 코돈(D = A, G, T; H = A, C, T; K = G, T)이 도입된 중첩된 올리고뉴클레오타이드 프라이머들(표 1)을 이용하여 여러 단계의 PCR(표 2)에 따라 랜덤화된 라이브러리가 생성되어, 이로부터 20개의 아미노산 중 13개, 3개의 정지 코돈 중 1개(TAG)가 각 자리에 들어갈 수 있는 유전자 라이브러리가 제작되었다(표 1 및 2, 및 도 1b).
- [0081] 상기 랜덤화된 징크 핑거 단백질 라이브러리는 올리고뉴클레오타이드 합성 과정 또는 PCR 과정의 오류(조기 정지

코돈(premature stop codons) 또는 프레임쉬프트(frameshifts))를 수정하기 위해 pFDV 벡터로 라이게이션되어 (Yang et al., 2009) TOP10F' *E.coli* 균주에 형질도입되어 LB-앰피실린 아가 플레이트(LB-ampicillin agar plates)에서 성장되었다. 상기 항생제-선별된 플라스미드의 교정된 ZnF 유전자가 증폭되었으며 PCR에 의해 교정된 라이브러리로부터 재구성되었다(표 1 및 2, 및 도 1b). 상기 교정된 징크 핑거 라이브러리 및 pComb3X 벡터는 제한효소인 SfiI로 절단되었으며, SfiI-절단된 pComb3X 벡터 10 µg 및 SfiI-절단된 ZnF 라이브러리 유전자 3.2 µg이 하룻밤 동안 라이게이션 되었다. 에탄올 침전으로 상기 라이게이션 혼합물의 염분이 제거되었고, 라이게이션된 DNA가 전기천공법에 의해 *E.coli* ER2537 균주로 형질도입되었다. 형질도입된 균주는 6 mL SOC 배지에서 한 시간 동안 37 °C에서 배양되었으며, 100 µg/mL 앰피실린 및 2% 글루코오스가 보충된 Super broth (SB) 1 L가 첨가되었고, 37 °C에서 하룻밤 동안 배양되었다. 세포들이 그 다음날 아침에 원심분리에 의해 수득되었으며 SB 배지 20 mL에 재부유되었다. 50%의 살균된 글리세롤 (v/v)이 반 첨가되었고 완전히 혼합되었으며, 상기 글리세롤 스탁은 1 mL씩 분주되었고 액체질소에 보관되었다.

표 1

프라이머 명칭	서열번호	서열
Zif-HV1-b	5	gattcgacactggaagggtcttctggcctgtgtggatgcggatgmdhggtaagmdhmdhcgamdhagaaaagcggcgatcgag
Zif-HV2-f	6	cccttccagtgtcgaatctgcatacgtaacttcagtdhkagtdhkdhkcttaccdhkcacatccgcacccacacag
Zif-HV3-f	7	tgtgggaggaagtttgccdhkagtdhkdhkcgcdhkdhkcataccaaaatccatttaagac
Zif-FR1-b	8	agaaaagcggcgatcgag
Zif-FR2-f	9	cgaatctgcatgcgtaac
Zif-FR3-f	10	cacatccgcacccacacag
Zif-FR3-b	11	ggcaaaacttcctcccaca
Zif-FR4-f	12	catacaaaatccatttaagac
Zif-FR2-b	13	gttacgcatgcagattcg
Zif-FR3-f1	14	tgtgggaggaagtttgcc
pC3X-f	15	gcacgacaggtttcccgac
pC3X-b	16	aaccatcgatagcagcaccg
pET-bla-f	17	aatgtgcgcggaacccc
pET-bla-b	18	cccactcgtgcacccaac

표 2

주형	정방향 프라이머	역방향 프라이머	산물
Zif286-pComb3X	pC3X-f	Zif-FR1-b	1
Zif268-pComb3X	Zif-FR2-f	pC3X-b	2
Zif268-pComb3X	Zif-FR4-f	pC3X-b	3
1	pC3X-f	Zif-HV1-b	A
2	Zif-FR3-f	pC3X-b	b'
3	Zif-HV3-f	pC3X-b	E
b'	Zif-HV2-f	pC3X-b	B
A+B	pC3X-f	Zif-FR3-b	D
D+E	pC3X-f	pC3X-b	F
F-pFDV ^a	pET-bla-f	Zif-FR2-b	G
F-pFDV ^a	Zif-FR2-f	pET-bla-b	H
F-pFDV ^a	Zif-FR3-f1	pET-bla-b	I
G+H	pET-bla-f	Zif-FR3-b	J
I+J	pET-bla-f	pET-bla-b	ZiFi

[0084] ^a상기 PCR 산물 F는 pFDV 벡터로 도입되었고 앰피실린-선택되었다.

[0085] <1-4> ZnF 유전자 라이브러리 레스큐(rescue)

[0086] 본 발명자들은 ZnF 라이브러리를 표면 제시하는 파지 라이브러리를 레스큐 하기 위하여 보조 파지를 이용하였다.

[0087] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에서 동결된 라이브러리 *E. coli* 스타크 (1 mL)을 녹여 앰피실린 100 µg/mL 및 2% 글루코오스를 포함한 SB 배지 400 mL에 첨가하였다. 녹은 상기 세포들은 600 nm에서의 흡광도(OD)가 ~0.7이 될 때까지 37 °C에서 진탕 배양되었다. 진탕 배양 후 배양액은 원심분리되었으며, 그 결과 생긴 세포 펠렛은 100 µg/mL 앰피실린, 100 µM ZnSO₄ 및 10¹² 플라크 형성 단위(plaque forming units, pfu)의 VCSM13 보조 파지(helper phage)를 포함한 새로운 SB 배지 400 mL에 재부유되었다. 재부유된 혼합물을 37 °C에서 1시간 동안 느리게 (80 rpm) 진탕 배양한 뒤, 배양액에 카나마이신 70 µg/mL을 첨가하고 다시 하룻밤 동안 220rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리한 뒤, 상등액에 PEG8000 16 g 및 NaCl 12 g을 첨가하여 (각각 최종 농도 4% 및 3% [w/v]) 완전히 용해시켰다. 상기 혼합물은 얼음에서 30분 동안 인큐베이션되었으며, 침전된 파지들을 30 분 동안 원심분리(10,000 g)하여 수득하였다. 침전된 파지들은 100 µM ZnSO₄를 포함하는 20 mL PBS에 재부유되었고, 5× 파지 침전 버퍼 (20% [w/v] PEG8000, 15% [w/v] NaCl) 5 mL이 추가되었으며, 상기 혼합물은 완전히 혼합되어 얼음에서 30분 동안 인큐베이션되었다. 원심분리 후에, 상기 파지는 100 µM ZnSO₄가 포함되어 있는 PBS 2 mL에 재부유되었고 원심분리가 10,000 g로 30분 동안 수행되었다. 50% 글리세롤이 파지-포함한 상등액에 0.5 부피로 첨가되었으며, 10⁻⁷, 10⁻⁸ 및 10⁻⁹ 희석액 1 µL가 50 µL의 중간-대수기의 ER2537 균주를 감염 시키는데 사용되었고, 파지 역가를 추산하기 위해 LB-앰피실린 아가 플레이트에 도말되었다. 파지 용액은 10¹³ 집락 형성 단위(colony forming units, cfu)로 분주되었고, 액체질소로 동결되었으며 -80 °C로 유지되었다.

[0088] 그 결과, 1 × 10¹⁰의 크기의 ZnF 라이브러리를 표면 제시(display)하는 파지 라이브러리가 얻어졌다.

[0089] <1-5> 다양성 도입 검증

[0090] 본 발명자들은 무작위적으로 선택된 클론들의 서열 분석을 통해 설계 위치에 다양성이 도입되었음을 확인하였다.

[0091] 구체적으로, 38개의 무작위적으로 선택된 라이브러리 클론들을 pC3X-f 및 pC3X-b 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였으며, 이를 ompseq 프라이머를 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다(도 3). 그 결과 도 1a에 제시된 위치에 설계한 바와 같은 다양성이 도입되었음을 알 수 있었으며, 13개의 아미노산의 상대적 비율 역시 전체적으로 보았을 때에는 DHK 중첩 코돈의 사용에서 예상되는 비율에서 크게 벗어나지 않음이 확인되었다. 다만, 위치별로 특정 아미노산이 과다 포함되는 경우들이 있으며, 가령 19번 위치는 아스파라긴이, 38번 위치는 발린이 과다 포함되는 등 개별위치에서의 아미노산 분포는 라이브러리 설계로부터 예상되는 분포와 다른 면이 있음을 확인하였다. 이는 아마도 pFDV 벡터를 이용한 항생제-선택 과정에서 보다 생존에 유리한 아미노산 서열이 우선적으로 선택되었거나, 형질전환된 대장균이 배양되는 과정에서 개별 위치에 특정 아미노산을 가지는 클론들의 성장이 상대적으로 빨랐을 가능성 등에 기인한 것일 수 있으나, 전체적인 라이브러리의 서열적 다양성은 매우 높은 것으로 판단되며, 따라서 상술한 편향성에도 불구하고 패닝을 통하여 표적 특이적 징크핑거 단백질을 성공적으로 스크리닝할 수 있었다.

[0092] <실시예 2> 파지 패닝 및 스크리닝

[0093] <2-1> 파지 패닝

[0094] 본 발명자들은 목표 분자에 특이적으로 결합하는 징크 핑거 단백질 클론을 도출하기 위해 패닝(panning)을 수행하였다.

[0095] 구체적으로, 항원으로 목표 분자인 단백질 달걀 리소자임(hen egg lysozyme), 오브알부민(ovalbumin), 리톡시맷

(rituximab) [CD20에 대한 마우스-인간 키메라 항체], 쥐(murine) RANKL 및 우혈청 알부민(BSA)에 연결된 소분자인 FITC-BSA를 PBS에 1 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 녹여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 면역 튜브 표면에 코팅하였다. 상기 튜브는 블로킹 시약(3% BSA-PBS)으로 1시간 동안 상온에서 블로킹되었다. 동시에, 10^{13} cfu의 파지 라이브러리를 해동하여 100 μM ZnSO_4 가 녹아있는 3% BSA-PBST 1 mL를 첨가하여 블로킹하였다. 블로킹 용액을 버린 뒤, 상기 블로킹된 라이브러리를 블로킹해둔 면역 튜브에 첨가하여 상온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 1시간 동안 결합한 후에, 상기 튜브는 PBST로 1 내지 3회 세척되었으며, 결합된 파지는 100 mM 트리에틸아민(triethylamine) 1 mL로 용출되었다. 용출된 파지 용액은 1 M Tris (pH 7.4) 0.5 mL로 중화되었으며, 상기 파지 용액에 중간-대수기의 ER2537 *E.coli* 세포들 8.5 mL이 첨가되었다. 파지 감염이 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 120 rpm에서 수행되었고, 생산 역가(Output titer)는 LB-엠포실린 아가 플레이트상에 감염된 *E.coli*를 0.1 및 0.01 μL 도말하여 추산하였다. 감염된 세포들은 원심분리에 의해 수득되었으며, 적은 양의 SB 배지로 재부유되었고, 15-cm LB-엠포실린-글루코오스 (2%) 아가 플레이트에 도말되었다. 상기 플레이트는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 배양되었다. 배양된 세포들은 15-cm 플레이트에 5 mL SB 배지를 첨가하여 약하게 긁어내어 회수하였으며, 0.5 부피의 50% 글리세롤이 첨가되었다. 이를 1 mL씩 분주하여 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 동결하였으며, 50 내지 100 μL 의 글리세롤 *E.coli* 스타키 100 $\mu\text{g/mL}$ 엠포실린 및 100 μM ZnSO_4 가 보충된 SB 배지 20 mL에 첨가되었다. 상기 스타키는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 OD_{600} 값이 0.7가 될 때까지 진탕배양되었다. 그 뒤에, VCSM13 보조 파지 10^{11} pfu가 첨가되었으며, 상기 세포들은 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 120 rpm로 진탕배양되었다. 카나마이신 70 $\mu\text{g/mL}$ 이 첨가되었고 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 220 rpm로 진탕배양되었다. 배양된 파지들은 상기에서 기재된 PEG 침전에 의해 배양 상등액으로부터 수득되었으며, 100 μM ZnSO_4 가 녹아있는 3% BSA-PBST 1 mL로 재부유되어 다음 단계의 패닝에 사용되었다.

[0096] 그 결과, 상기에 기재된 프로토콜에 따라 각각의 항원에 대해 총 3 내지 4회의 패닝이 수행되었다.

[0097] <2-2> 선별된 파지 클론의 스크리닝

[0098] 본 발명자들은 상기 실시예 <2-1>에서 패닝한 클론들을 파지 ELISA 스크리닝을 통해 표적-결합 징크 핑거 단백질을 생산하는 클론을 스크리닝하였다.

[0099] 구체적으로, 3 또는 4회의 패닝에서 생산된 각각의 ER2537 클론은 96-웰 플레이트의 각 웰에서 200 μL 의 SB-엠포실린 (100 $\mu\text{g/mL}$)- ZnSO_4 (100 μM)에 접종되었으며 배양액이 탁하게 될 때까지 3 내지 4시간 동안 배양되었다. VCSM13 보조 파지 (10^9 cfu/well)가 각각의 웰에 첨가되었고, 상기 플레이트는 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 플레이트 셰이커(Lab-Line 4625, Thermo Scientific)에서 1시간 동안 약하게 진탕 배양되었다. 카나마이신 (70 $\mu\text{g/mL}$)이 각각의 웰에 첨가되었으며, 상기 플레이트는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 350 rpm로 진탕 배양되었다. 그 다음 날 아침, 면역플레이트(immunoplate) (Costar 3690)가 표적분자 (PBS에 녹아있는 1 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 단백질 항원; 25 μL /웰)로 1시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 코팅되었으며, 그 뒤에 블로킹 시약(3% BSA-PBS)으로 블로킹되었다. 상기 배양액의 파지를 포함하는 상등액은 항원-코팅된 면역플레이트에 25 μL /웰로 첨가되었으며 상온에서 1시간 동안 인큐베이션되었다. 상기 플레이트는 PBST로 세번 세척되었고, 홀스레디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase, HRP)-가 결합된 항-M13 항체 (블로킹 시약에 1/3000 희석)가 각 웰에 25 μL /웰로 첨가되었다. 1시간 인큐베이션 뒤에, 상기 플레이트는 PBST로 세 번 세척되었고, ZnF의 표적분자와의 결합이 TMB 발색 기질(colorigenic substrate)을 이용하여 검출되었다.

[0100] 그 결과, 표적-결합 징크 핑거 단백질을 산출하였다(표 3).

표 3

[0101] 클론 라이브러리 개요 확인

표적t	패닝 차수	ELISA (+)*/screened	Unique/sequenced
Hen egg lysozyme	4	19/94	2/2
Ovalbumin	4	1/94	1/1
Rituximab	4	95/95	10/10
mRANKL	4	50/94	7/7

FITC-BSA	4	65/95	9/9
----------	---	-------	-----

- [0102] * 배경신호의 두 배 이상 신호(450 nm에서의 흡광도)
- [0103] <2-3> 선별한 클론 라이브러리의 서열 확인
- [0104] 본 발명자들은 상기 실시예 <2-2>에서 스크리닝한 ZiFi 클론들의 서열을 검증하였다.
- [0105] 구체적으로, 목표 분자에 특이적으로 결합하는 클론들의 ZiFi 유전자를 pC3X 및 pC3X-b 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하였으며, PCR 결과물을 ompseq 프라이머 (5'-AAGACAGCTATCGCGATTGCAG-3) (서열번호 19)를 이용한 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다. 패닝 및 스크리닝을 통해 확인된 표적 특이적 징크 핑거 단백질들 중 FITC에 대한 ZnF 단백질 클론들의 아미노산 서열의 의도한 부위들에 설계한 대로의 다양성이 도입되었는지 확인하였다.
- [0106] 그 결과, 선별한 클론들의 서열이 설계한 ZnF의 서열에 부합하며 도출된 클론들의 서열적 다양성이 높음을 확인할 수 있었다(도 4).
- [0107] <2-4> 선별한 클론 라이브러리의 목표 분자 특이성 확인
- [0108] 본 발명자들은 선별한 개별 표적-결합 징크 핑거 단백질 라이브러리 클론이 주어진 목표분자에 특이적으로 결합함을 실시예 <2-2>와 같은 방법으로 ELISA로 확인하였다.
- [0109] 그 결과, 선별한 ZnF 클론들이 리톡시마에 특이적으로 결합하였으며(도 5 아래), D8 클론이 표적 분자인 FITC-BSA에 농도 의존적으로 특이적 결합을 보였다(도 5 위)
- [0110] <실시예 3> 조작된 징크 핑거 단백질 정제 및 결합력 확인
- [0111] <3-1> 조작된 징크 핑거 단백질 정제
- [0112] 본 발명자들은, 상기 <실시예 2>에서 선별한 징크 핑거 단백질 클론들을 *E. coli*로부터 정제하였다.
- [0113] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 선별된 pComb3X 파지마드 벡터에 있는 선별된 ZiFi 클론들은 EcoRI/SalI 또는 EcoRI/HindIII 제한 자리를 이용하여 pMAL-c2x 발현 벡터 (New England Biolabs)로 클로닝되었고, 발현 컨스트럭트는 BL21(DE3) *E. coli* 균주로 형질도입되었다. 형질전환된 박테리아는 100 μ M ZnSO₄ 및 0.2% 글루코오스가 보충된 SB-엠펜실린 배지 400 mL에서 배양되었으며, 배양액이 OD₆₀₀=0.5에 도달하였을 때 IPTG (0.3 mM)를 첨가하였다. 37 °C에서 2시간 배양한 후, 세포들은 원심분리에 의해 수득되었고, 정제 버퍼(20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 100 μ M ZnSO₄, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride[PMSF]) 20 mL로 재부유되었으며, 초음파분해(sonication)에 의해 파쇄되었다. 대장균에서 MBP의 C-말단에 융합되어 발현되는 MBP-징크 핑거 융합 단백질은 아밀로오스 레진(amylose resin) (New England Biolabs)을 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의해 파쇄물로부터 정제되었다. 아밀로오스 레진(2 mL)이 Polyprep 컬럼 (Bio-Rad)에 추가되었고, 상기 레진은 정제 버퍼 16 mL로 세척되었다. 파쇄물은 컬럼으로 흘려져 통과되었다. 상기 컬럼은 정제 버퍼 10 mL로 세 번 세척되었고(총 30 mL), MBP-징크 핑거 단백질은 용출 버퍼(20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 100 μ M ZnSO₄, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM maltose) 0.5 mL 분획으로 따로 용출되었으며, 이를 쿠마시 스테이닝으로 단백질을 확인하였다.
- [0114] 그 결과, MBP-징크 핑거 융합 단백질이 배양액 ~20 mL로부터 mg 단위로 얻어질 수 있었다(도 6).
- [0115] <3-2> 조작된 징크 핑거 단백질의 결합력 검증
- [0116] 본 발명자들은, 상기 <실시예 3-1>에서 정제한 MBP 융합된 항-FITC ZiFi 클론들의 결합을 ELISA를 통해 확인하였다.

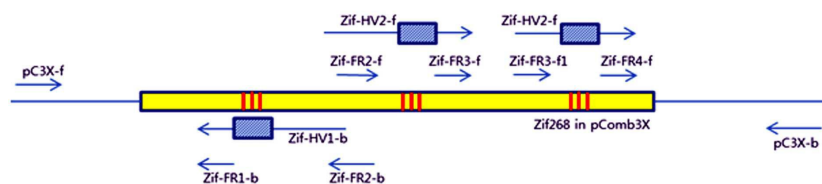
- [0117] 구체적으로, 실시예 <2-2>와 유사한 ELISA 분석 방법을 통해 ZiFi 클론 D8의 표적인 FITC에 대한 결합력, ZiFi 클론 B7의 RANKL에 대한 결합력, ZiFi 클론 B11의 달걀 리소자임에 대한 결합을 확인하였다. 아울러, MBP-ZiFi 단백질의 결합을 검출하는 2차 항체로는 항-MBP 항체 또는 항 HIS-tag 항체 또는 항-HA(hemagglutinin) tag 항체를 사용하였다.
- [0118] 그 결과, 상기 ZiFi 클론들이 각각의 표적 분자에 대해 특이적으로 결합함을 알 수 있었다(도 7).
- [0119] 또한, 표적 분자에 대한 특이적 결합을 재확인하기 위해, FITC에 결합하는 ZiFi 클론 D8을 이용하여 경쟁 ELISA (competition ELISA) 실험을 수행하였다. 정제된 D8 클론 (10 µg/mL)을 0 내지 200 µg/mL의 FITC-BSA와 혼합하여 4 °C에서 밤새 인큐베이션 하였다. 이 혼합액을 이용하여 위와 같은 방법으로 ELISA 분석한 결과, 혼합액 내의 FITC-BSA의 농도에 비례하여 ELISA 결합신호가 감소하는 것을 관찰함으로써 D8 ZiFi 클론의 FITC 표적에 대한 특이적 결합을 확인하였다. (도 8)
- [0120] <실시예 4> 징크 핑거 단백질의 돌연변이 유도 및 결합력 확인
- [0121] ZiFi의 비-랜덤화 지역 중 15개의 아미노산이 염기성 잔기(라이신 6, 아르기닌 15)이고, 산성 아미노산 잔기가 6개이며, 여기에 더하여 3개의 징크 2가 양이온이 결합되어 있으므로, ZiFi 클론들은 양전하로 하전되어 있고 높은 pI 값을 가진다. 이와 같은 양전하 하전으로 인해 높은 백그라운드 신호 및 비특이적 결합이 야기될 수 있다는 보고가 있다 (Birtalan et al., 2008). 이에, 본 발명자들은 상기 <실시예 3-2>에서 표적 분자에 대해 강한 결합을 보인 D8클론의 비랜덤화 지역의 염기성 아미노산을 아스파르트산(aspartate) 또는 세린(serine)으로 각각 돌연변이시킨 후 이의 표적 분자에 대한 결합 정도를 ELISA를 통해 확인하였다.
- [0122] 구체적으로, FITC-BSA에 대한 ZiFi 클론 D8의 비랜덤화 지역의 염기성 잔기 7개를 중복 신장(overlap extension PCR)에 의해 아스파르트산(aspartate) 또는 세린으로 각각 돌연변이시켰다. 돌연변이가 유도된 각각의 클론들은 pComb3NH(His-택이 없는 pComb3X 파지미드의 변형)로 클로닝되었으며, MBP 융합 단백질로서 발현 및 정제된 뒤, 표적 분자인 FITC-BSA에 대한 결합 특성을 실시예 <2-2>에 기재된 파지 ELISA를 통해 분석하였다.
- [0123] 그 결과, 신호/배경비는 이전과 유사한 범위로 유지되는 동안 비특이적 결합인 대조군인 BSA와의 백그라운드 결합이 매우 감소하였으나 표적 결합력 또한 감소함을 알 수 있었다(도 9).

도면

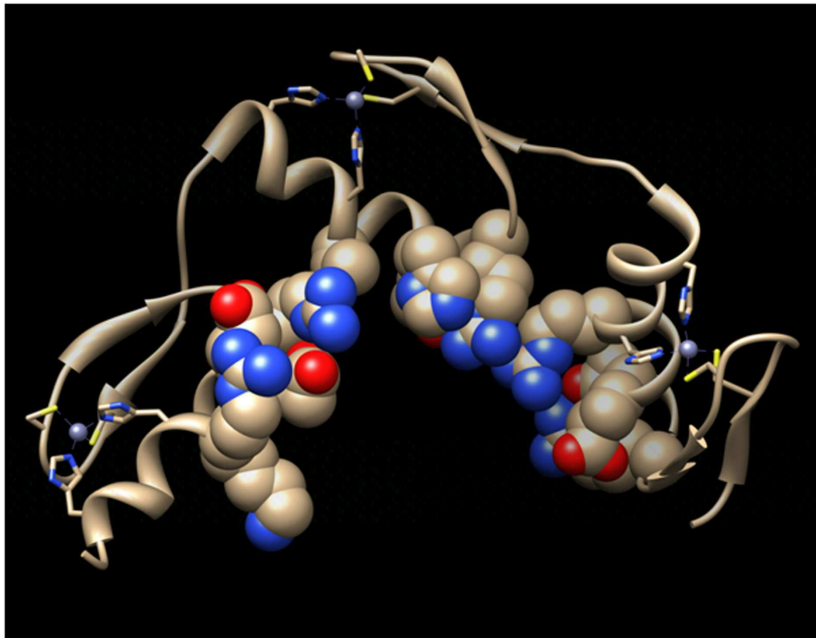
도면1a

ERPYACPVESCDRRFRSRSD~~EL~~TRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTHIRTHITGEKPF
ACDICGRKFARSDERKRHTKIHLRQKD

도면1b



도면2



도면3

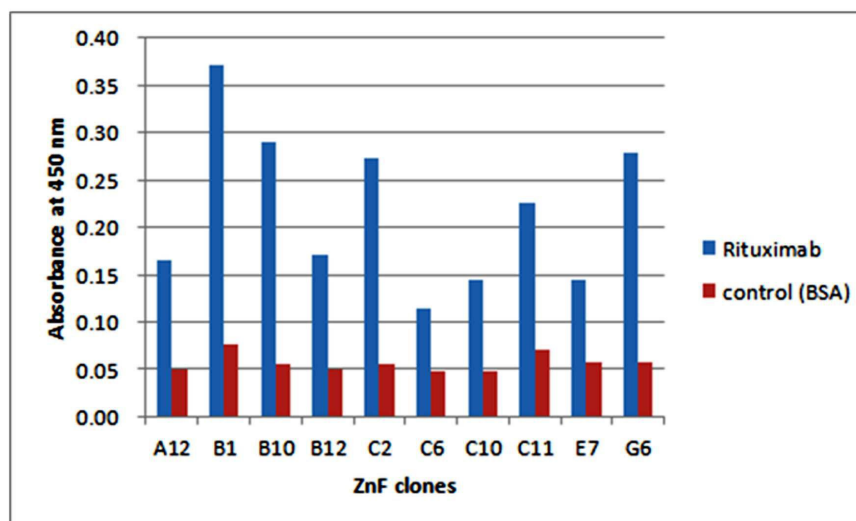
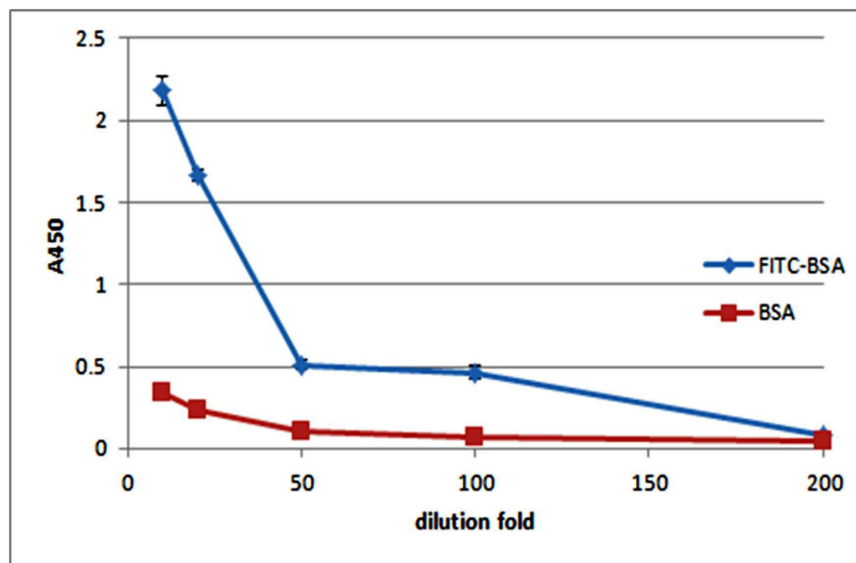
	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	89
1	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSSSELT	YHIRHTGQKPFQCRICMRNFS	MSVVLTLHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAMSYLR	TAHTKIHLRQKD				
23	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSSSYLT	YHIRHTGQKPFQCRICMRNFS	LSVVLTLHIRTHTGKPFACD	ICGRKFATSFERL	THTKIHLRQKD				
E11	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSSSTALT	YHIRHTGQKPFQCRICMRNFS	LSVLTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAMSYARV	IHTKIHLRQKD				
32	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSKSEALD	HIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	YFVLTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAMSF	FRSMHTKIHLRQKD				
11	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSDSYLT	TMHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	LSLLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAESVFCV	MHTKIHLRQKD				
B9	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSDSYLT	TMHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	LSLLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAESVFCV	MHTKIHLRQKD				
15	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSKSKELT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SL-LTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISSFRL	MHTKIHLRQKD				
14	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSKSKELT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SL-LTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISSFRL	MHTKIHLRQKD				
17	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSVSMKLT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	ESLTMHIRTHTGKPFACD	ICGRKFATSVFRL	THTKIHLRQKD				
46	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSTSTNL	TKHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	MSKLLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFANSMRL	LHHTKIHLRQKD				
H8	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSTSTNL	TKHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	MSKLLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFANSMRL	LHHTKIHLRQKD				
48	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSNTMLT	THIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	YSMLTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFATSVDR	LSWTKIHLRQKD				
8	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSNNLT	THIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	YSMLTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFATSVDR	LSWTKIHLRQKD				
27	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSTSKLT	YHIRHTGQKPFQCRICMRNFS	YSVLTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFATSFARME	HTKIHLRQKD				
22	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSASKELT	EHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	FSVLTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFATSFARME	HTKIHLRQKD				
24	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSKSKNLT	VHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	RSDLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFATSVLR	NHTKIHLRQKD				
D10	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSKSKNLT	VHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	RSDLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFATSVLR	NHTKIHLRQKD				
7	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSNSATL	NHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	RSDLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAKSAAR	SLHTKIHLRQKD				
20	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSKSKDLT	THIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	DSALTYHIRTHTGKPFACD	ICGRKFATSVLR	FVHTKIHLRQKD				
35	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSMSLT	THIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	YSALTYHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISSFRV	HTKIHLRQKD				
G12	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSASDLT	THIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	RSDLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISSFRV	HTKIHLRQKD				
38	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSNSNLT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSVLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISYTRY	AHTKIHLRQKD				
44	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSYSDSL	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVMLTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAFASRN	VHTKIHLRQKD				
A5	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSMSNLT	THIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSVLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISILRY	MHTKIHLRQKD				
H12	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSESKNLT	DHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSVLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAESLVR	LEHTKIHLRQKD				
42	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSMSNLT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSVLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAESLVR	LEHTKIHLRQKD				
F7	(1)	ERPYPACPVESCDRRVSNLT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SNLTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAESLVR	LEHTKIHLRQKD				
9	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSTSNLT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSVLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISDIR	VHTKIHLRQKD				
H4	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSTSNLT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSVLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISDIR	VHTKIHLRQKD				
16	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSSSKNLT	NHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSLLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFARSDER	KRHTKIHLRQKD				
C6	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSSSKNLT	NHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSLLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFARSDER	KRHTKIHLRQKD				
5	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSKSNLT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SSSALTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFARSDER	KRHTKIHLRQKD				
A9	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSKSNLT	AHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SSSALTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFARSDER	KRHTKIHLRQKD				
C10	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSASKELT	EHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	VSALLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAMSDVRL	HTKIHLRQKD				
19	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSMSLT	THIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSLLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISVALL	HTKIHLRQKD				
29	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSASMTL	NHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	SVSLEFTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISFVR	HTKIHLRQKD				
47	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSTSEL	THIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	YSLLTHIRTHTGKPFACD	ICGRKFALS	VRAYHTKIHLRQKD				
A1	(1)	ERPYPACPVESCDRRFSNLT	EHIRTHTGQKPFQCRICMRNFS	KSLSLTSHIRTHTGKPFACD	ICGRKFAISSFR	SLHTKIHLRQKD				

도면4

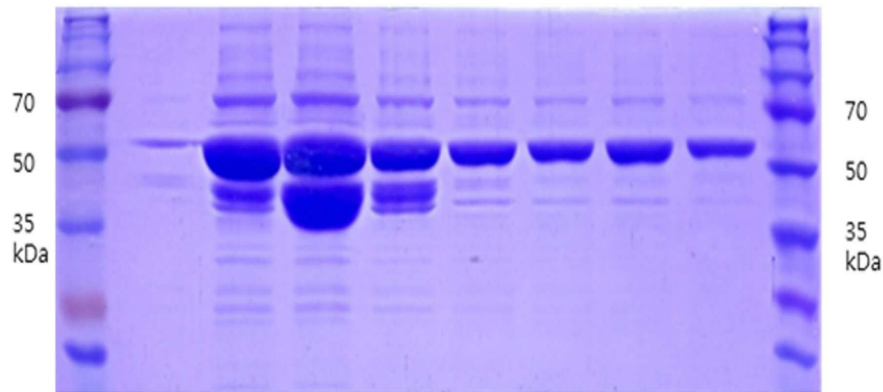
(1) 1 10 20 30 40 50 60 70 89
Translation of FITC_ZIF_A3 (1) ERPYACPVESCDRRFSSVKLNIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of FITC_ZIF_D3 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSRDDHLTHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of FITC_ZIF_D7 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSNLFTHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of FITC_ZIF_D8 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSTSAVLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of FITC_ZIF_E10 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of FITC_ZIF_E2 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of FITC_ZIF_E5 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of FITC_ZIF_H6 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of FITC_ZIF_H8 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Consensus (1) ERPYACPVESCDRRFSS LT HIRHTIGQKPPQCRICMRNFS S LTHIRHTIGKPPACDICGRKFA S LR MHTKIHLRQK

(1) 1 10 20 30 40 50 60 70 88
Translation of Rituxan_ZIF_A12 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of Rituxan_ZIF_B12 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of Rituxan_ZIF_B10 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of Rituxan_ZIF_C2 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of Rituxan_ZIF_C6 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of Rituxan_ZIF_E7 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of Rituxan_ZIF_B1 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of Rituxan_ZIF_C10 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of Rituxan_ZIF_C11 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Translation of Rituxan_ZIF_G6 (1) ERPYACPVESCDRRFSSNKLINIRHIRTGQKPPQCRICMRNFSSEYLLSHIRHTIGKPPACDICGRKFAISVSSTHTKIHRLRQK
Consensus (1) ERPYACPVESCDRRFSS S LTHIRHTIGQKPPQCRICMRNFSRDDHLTHIRHTIGKPPACDICGRKFA S ERLHTKIHLRQK

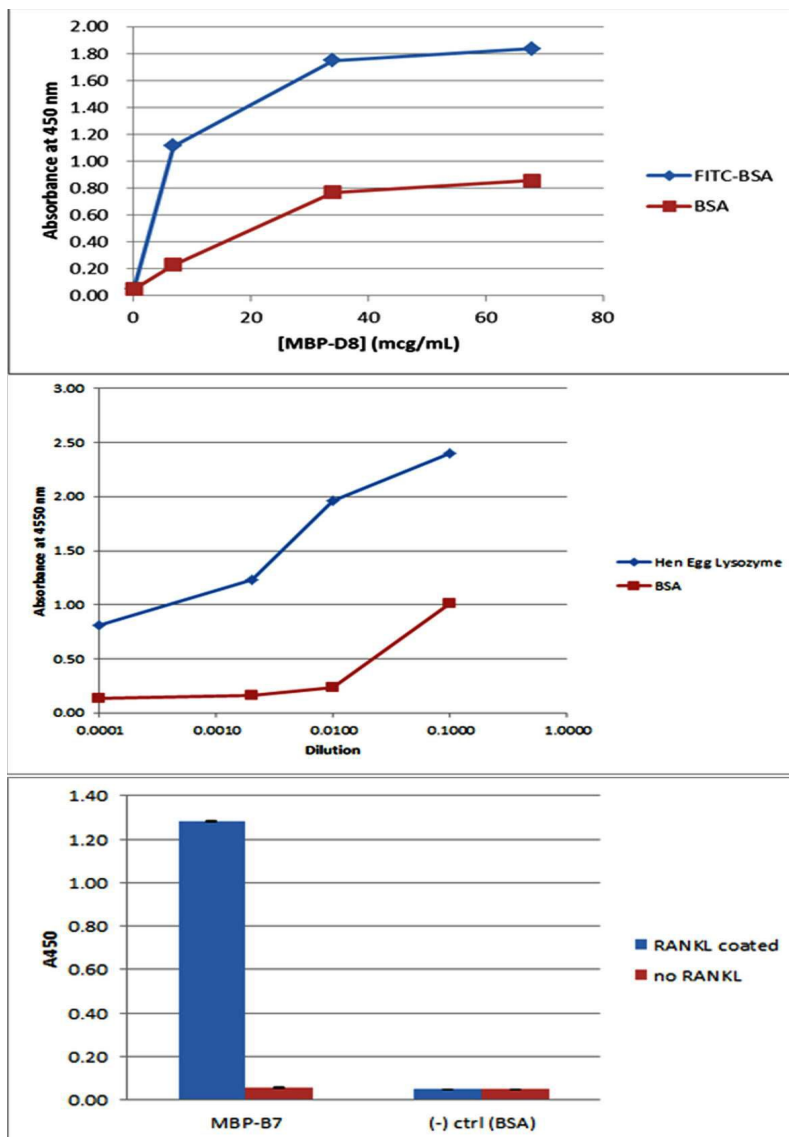
도면5



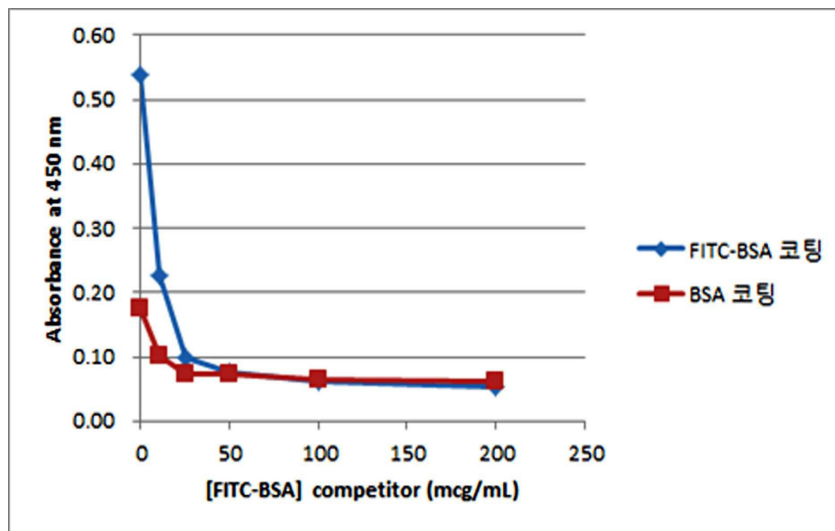
도면6



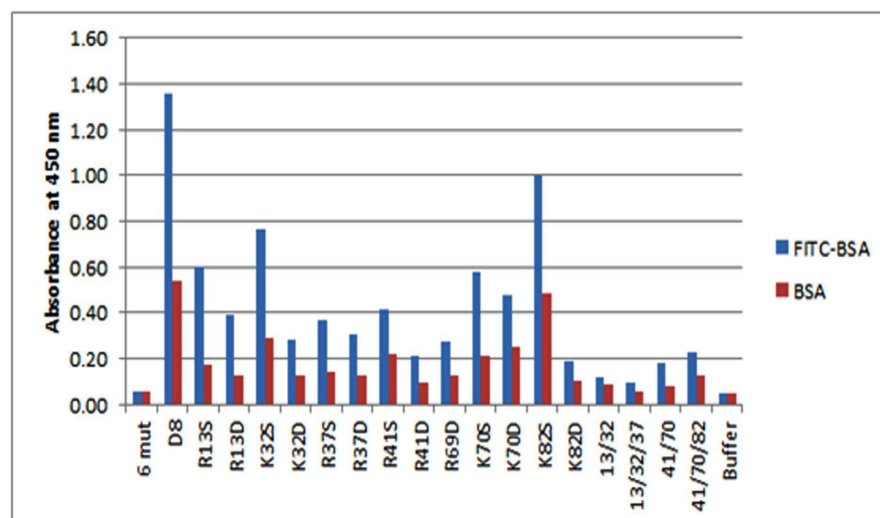
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Zinc finger library and engineered zinc finger protein screening using the same
- <130> 11p-09-006
- <160> 19
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 89
- <212> PRT
- <213> zif268
- <400> 1

Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser
 1 5 10 15
 Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys
 20 25 30
 Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His
 35 40 45
 Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys
 50 55 60
 Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg His
 65 70 75 80
 Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys Asp
 85

<210> 2
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Zif-f primer

<400> 2
 aattaggccc agcgggccga acgcccataat gcttgc 36

<210> 3
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Zif-b primer

<400> 3
 tatatggccg gcctggccgt ccttctgtct taaatgg 37

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> ompseq primer

<400> 4
 gaagacagct atcgcgattg ca 22

<210>
 > 5
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Zif-HV1-b primer
 <400> 5
 gattcgacac tggaaagggt tctggcctgt gtggatgcgg atatgmdhgg taagmdhmdh 60
 cgamdhagaa aagcggcgat cgcag 85
 <210> 6
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Zif-HV2-f primer
 <400> 6
 cccttcagtg gtcgaatctg catgcgtaac ttcagtdhka gtdhkdhkct taccdhkac 60
 atccgcaccc acacag 76
 <210> 7
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Zif-HV3-f primer
 <400> 7
 tgtgggagga agtttgccdh kagtdhkdhk cgdhkdhkc ataccaaagt ccatttaaga 60
 c 61
 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Zif-FR1-b primer
 <400> 8
 agaaaagcgg cgatcgag 19
 <210> 9
 <211> 18

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Zif-FR2-f primer	
<400>	9	
	cgaatctgca tgcgtaac	18
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Zif-FR3-f primer	
<400>	10	
	cacatccgca cccacacag	19
<210>	11	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Zif-FR3-b primer	
<400>	11	
	ggcaaacttc ctcccaca	18
<210>	12	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Zif-FR4-f primer	
<400>	12	
	cataacaaaa tccatttaag ac	22
<210>	13	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Zif-FR2-b primer	
<400>	13	
	gttacgcatg cagattcg	18

<210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Zif-FR3-f1 primer
 <400>
 14
 tgtgggagga agtttgcc 18
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pC3X-f primer
 <400> 15
 gcacgacagg tttcccgac 19
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pC3X-b primer
 <400> 16
 aaccatcgat agcagcacccg 20
 <210> 17
 <211> 18
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pET-bla-f primer
 <400> 17
 aaatgtgcgc ggaacccc 18
 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pET-bla-b primer

<400>	18	
cccactcgtg cacccaac		18
<210>	19	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ompseq primer	
<400>	19	
aagacagcta tcgcgattgc ag		22