

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 10월 3일 (03.10.2019) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2019/190022 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 16/18* (2006.01) *C07K 14/31* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/014818
- (22) 국제출원일: 2018년 11월 28일 (28.11.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0037451 2018년 3월 30일 (30.03.2018) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (**KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이지오 (**LEE, Jie-Oh**); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 이혜림 (**LEE, Haerim**); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 김지원 (**KIM, Ji Won**); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 조근영 (**CHO, Geunyoung**); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (**LEE, Won Hee**); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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 국내 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:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: MEDIATING PEPTIDE FOR FORMING PROTEIN-PROTEIN COMPLEX AND METHOD FOR FORMING PROTEIN-PROTEIN COMPLEX USING SAME

(54) 발명의 명칭: 단백질-단백질 결합체를 형성 매개 펩타이드 및 이를 이용한 단백질-단백질 결합체 형성 방법

3LRH^{cys} 항체 AA 45 GRAPELLM□CDDLLAPG 61

#8188^{cys} 단백질 A BB 43 GEAKKLNK□QASLKSFG 59

조작된 에피토프 CC
(engineered epitope)

AA ... 3LRHcys Antibody
BB ... #8188cys Protein A
CC ... Engineered epitope

(57) Abstract: The present invention relates to a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 10, in which, specifically, a peptide consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 10, which is a human-derived protein, is used to form a complex of a first target protein and a second target protein, and a bond using the peptide consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 10 is specifically bonded with an antigen-antibody reaction and includes a disulfide bond to form a strong bond, thereby being useful for forming the complex of the first target protein and the second target protein.

(57) 요약서: 본 발명은 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것으로, 구체적으로 인간 유래의 단백질인 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 이용하여, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체를 형성할 수 있고, 상기 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 이용한 결합은 항원-항체 반응으로 결합하여 특이적이고, 이황화 결합을 포함하여 견고한 결합을 형성할 수 있으므로 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체를 형성하는 데에 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2019/190022 A1

명세서

발명의 명칭: 단백질-단백질 결합체를 형성 매개 펩타이드 및 이를 이용한 단백질-단백질 결합체 형성 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 단백질-단백질 결합체(conjugate) 형성 매개 펩타이드 및 이를 이용한 단백질-단백질 결합체 형성 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 바이오컨쥬게이션(bioconjugation)은 적어도 하나 이상의 생체물질을 포함한 두 분자를 결합시키는 기술로서, 효과적인 백신, 친화성 기질, 약물 전달 시스템 등의 개발에 중요한 역할을 한다.
- [3] 가장 대표적인 바이오 컨쥬게이트(conjugate)로는 치료제로 쓰이는 항체-약물 결합체(antibody-drug conjugate, ADC)가 있다. ADC는 항체의 장점을 최대한 활용하여 약물이 특정 세포만 타겟팅하는데 초점을 맞춘 기술로, 약물, 단클론 항체, 그리고 항체와 약물을 연결하는 링커(linker)를 포함한 세 가지 구성 요소로 구성되어 있다. ADC는 주로 암 세포의 표면에 발현된 특정 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 항암제를 종양세포에 전달하는 데 가장 많이 이용되고 있다.
- [4] 그 외에도 신약 개발을 위한 표적 단백질 발굴 방법으로, 단백질-단백질 결합(protein-protein conjugation)이 이용되고 있다. 생체 내에서 단백질은 다른 단백질과의 결합을 통해 기능을 나타낸다. 단백질의 발현 변화, 세포 내 위치의 변화, 번역 후 수식(post-translational modification)을 통한 구조의 변화는 단백질 결합의 변화를 유도하게 된다. 이러한 변화로 나타난 단백질 상호 작용의 이상은 질병과 연관되어 있기 때문에, 단백질-단백질 결합을 이용한 단백질 상호작용에 대한 규명 및 이를 기반으로 한 질병과 관련된 표적 단백질 발굴은 신약 개발에 중요한 과정이다.
- [5] 단백질 성분을 결합(conjugation)시키기 위한 방법들로, 마오(Mao) 등(문헌[Mao, H., et al., J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 2670-2671])은 C-말단 변형을 위한, 소르타제(sortase) 매개 단백질 라이게이션(ligation) 방법을 개발하였고, 사토(Sato)(문헌[Sato, H., Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002) 487-504])등은 키메라 단백질 내에 부위 특이적으로 폴리에틸렌 글리콜을 도입시키기 위해, 트랜스글루타미나제(transglutaminase, TGase)를 사용하는 시스템을 정립하였다. 트랜스글루타미나아제는 글루타민 잔기의 감마-카르복사미드 그룹과 라이신의 일차 암실론 아미노 그룹 간의 아실 트랜스퍼 반응을 촉매하는 효소이다. 또한, 스플릿 인테인(split inteins)은 생물체에서 자연적으로 일어나는 과정인 단백질 트랜스-스플라이싱(protein trans-splicing)을 수행하는데, 이는 펩타이드 결합의 절단 및 형성으로 이루어진

다단계 생화학 반응이다. 구체적으로 스플릿 인테인을 포함하는 두 개의 단백질 단편이 결합하여 효소를 형성한 다음, 인테인 스스로를 삭제(excision)하고 플랭킹 서열(flanking sequence)의 연결을 촉매하는 과정을 거친다. 인테인은 외인성(exogenous) 환경에서도 기능적이며 사실상 모든 폴리펩타이드 백본을 화학적으로 조작하는 데 사용할 수 있어, 치료제 개발 분야 뿐만 아니라 기본적인 생물학적 연구에 적용되고 있다(Shah, N.H. & Muir, T.W., Chem. Sci. 5, 446-461(2014)). 상기와 같은 반응을 통해 형성된 결합은 프로테아제에 대해 내성을 가지는 등 상당히 안정한 결합으로 알려져 있다.

- [6] 그러나 이러한 단백질 성분을 결합시키기 위한 방법들은 인간 기원이 아닌 단백질이 적용하기 때문에, 면역 반응을 유발할 가능성이 있어 치료제로의 적용이 제한적이다.
- [7] 이에 본 발명자들은 바이오컨쥬게이션(bioconjugation)을 형성하는 데에 면역 반응을 유발할 수 있는 요인을 제거하기 위하여, 인간 유래의 단백질인 3LRH 인트라바디(intrabody)의 변이체와 3LRH 인트라바디의 변이체와 특이적인 결합을 형성하는 펩타이드를 제조하였고, 이들이 2개 이상 단백질의 특이적이고 견고한 결합을 매개할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질, 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 이용한 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate) 형성 방법 및 상기 형성 방법으로 형성된 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 1) 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 및 제1 목적 단백질을 포함하는 제1 융합 단백질 및, 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 및 제2 목적 단백질을 포함하는 제2 융합 단백질을 제조하는 단계; 및 2) 상기 제조된 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질을 혼합하여 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 간 결합을 형성시키는 단계를 포함하는, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate) 형성 방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체 형성 방법으로 형성된 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체를 제공한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명은 인간 유래의 단백질인 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 이용하여, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체를 형성할 수 있고, 상기 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 이용한 결합은 항원-항체 반응으로 결합하여 특이적이고, 이황화 결합을 포함하여 견고한 결합을 형성할 수 있으므로 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체를 형성하는 데에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 헤파틴 펩타이드-3LRH 항체 구조와 단백질 A를 분자 모델링 프로그램을 이용하여 도킹시킨 모습을 나타낸 것이다.
- [15] 도 2는 헤파틴 펩타이드와 단백질 A의 겹침 영역(overlapped regions)의 아미노산 서열과 #8188 단백질 A의 조작된 에피토프의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- [16] 도 3은 단백질 A와 헤파틴 펩타이드의 나선(helice)을 구조 정렬한 모습을 나타낸 것이다(붉은 색은 헤파틴 아미노산, 회색은 단백질 A 도메인의 아미노산을 나타낸다.).
- [17] 도 4는 3LRH^{cys} 항체와 #8188^{cys} 단백질 A 간의 이황화 다리 형성을 위해, 3LRH^{cys} 항체와 #8188 단백질 A에 시스테인이 도입된 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- [18] 도 5는 3LRH 항체와 #8188 단백질 A의 결정 구조를 나타낸 것이다.
- [19] 도 6은 도 5의 #8188 단백질 A의 조작된 에피토프 부분을 확대한 것이다(3LRH 항체와 상호작용하는 #8188 단백질 A와 헤파틴 펩타이드의 아미노산 잔기를 각각 회색 및 빨간색으로 표시).
- [20] 도 7은 천연 단백질 A(native protein A)와 조작된 단백질 A인 #8188 단백질 A의 구조를 비교한 것이다.
- [21] 도 8은 3LRH^{cys} 항체와 #8188^{cys} 단백질 A의 이황화 다리 형성 확인을 위한 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [22] 도 9는 3LRH^{cys} 항체에 결합된 #8188^{cys} 단백질 A의 결정 구조를 나타낸 것이다(이황화 다리는 노란색 선으로 표시, 이황화 다리 주변에 전자 밀도 지도는 회색 메쉬로 표시).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [23] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [24] 본 발명은 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 제공한다.
- [25] 상기 단백질은 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 N-말단, 내부 또는 C-말단에 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [26] 상기 단백질은 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열과

임의의 목적 단백질의 융합 단백질일 수 있다.

- [27] 상기 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 3LRH 항체의 변이체인 3LRH^{cys} 항체로서, 본 발명에서 3LRH 항체는 인간 헌팅틴(huntingtin) 단백질에 존재하는 짧은 알파 나선의 펩타이드에 결합하는, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 면역글로불린 경쇄를 의미한다. 상기 3LRH^{cys} 항체는 3LRH 항체의 53번째 아미노산인 티로신(tyrosine, Y)을 시스테인(cystein, C)으로 돌연변이 시킨 것이다.
- [28] 본 발명에서 #8188 단백질 A는 상기 3LRH 항체가 결합할 수 있는 나선형의 에피토프를 가진, 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 의미하고, #8188^{cys} 단백질 A는 상기 #8188 단백질 A의 변이체로, 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 의미한다. 구체적으로, 상기 #8188^{cys} 단백질 A는 상기 #8188 단백질 A의 51번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)을 시스테인(cystein, C)으로 돌연변이 시킨 것일 수 있다.
- [29] 상기 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드와 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 상기 펩타이드 간의 결합을 형성할 수 있다. 구체적으로, 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열 중, 46번째 아미노산부터 59번째 아미노산까지의 서열(서열번호 9) 영역이 3LRH^{cys} 항체와 결합을 형성하는 영역이고, 더 구체적으로는 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열 중, 2번째(K, 라이신), 6번째(C, 시스테인), 9번째(S, 세린), 10번째(L, 류신) 및 13번째(F, 페닐알라닌) 아미노산은 3LRH^{cys} 항체와의 결합 형성에 중요한 아미노산이다. 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열 중, 2번째(K, 라이신), 6번째(C, 시스테인), 9번째(S, 세린), 10번째(L, 류신) 및 13번째(F, 페닐알라닌) 아미노산만 보존된 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 3LRH^{cys} 항체와 결합을 형성할 수 있다. 단백질 내에서 항체와 결합하는 영역의 아미노산 서열 중, 항체를 향하여 항체와의 결합에 직접적으로 관여하는 특정 아미노산들을 보존한다면, 나머지 아미노산 서열을 다른 아미노산으로 치환하더라도 본래의 항원-항체 결합과 유사한 결합력으로 결합될 수 있다.
- [30] 상기 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열은 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열일 수 있다.
- [31]
- [32] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 경우, 상기 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 7의 염기서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드의 경우, 상기 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11의 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[33]

[34] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 본 발명자들은 단백질 A에 3LRH 항체가 결합할 수 있는 나선형의 에피토프가 도입된 #8188 단백질 A를 제작하였다. 구체적으로, 단백질 A 및 헌팅틴 펩타이드의 나선을 구조 정렬하여, 단백질 A에서 3LRH 항체를 향하고 항체와의 결합에 중요한 아미노산(K47(미도시), E50, S51, P54(미도시) 및 K55(미도시))을 확인하였고 (도 3 참조), 단백질 A의 상기 아미노산들을 헌팅틴 펩타이드의 상응하는 아미노산으로 치환하여, 조작된 에피토프(engineered epitope)를 가지는 #8188 단백질 A를 제작하였다 (도 2 및 표 2 참조).

[35] 또한, 본 발명자들은 #8188 단백질 A와 3LRH 항체가 복합체를 형성하고, 상기 복합체는 항원-항체 반응에 의해 결합하는 본래의 헌팅틴 펩타이드-3LRH 항체의 복합체의 구조와 실질적으로 동일함을 확인하였다 (도 5 내지 도 7 참조).

[36] 또한, 본 발명자들은 인간 헌팅틴(huntingtin) 단백질에 존재하는 짧은 알파 나선의 펩타이드에 결합하는 3LRH 항체의 53번째 아미노산인 티로신(tyrosine, Y)을 시스테인(cystein, C)으로 돌연변이 시킨 3LRH^{cys} 항체를 제작하고, 3LRH 항체가 결합할 수 있는 나선형의 에피토프를 가진 #8188 단백질 A의 51번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)을 시스테인(cystein, C)으로 돌연변이 시킨 #8188^{cys} 단백질 A를 제작하였다(표 3 및 표 4 참조).

[37] 또한, 본 발명자들은 3LRH^{cys} 항체와 #8188^{cys} 단백질 A를 이용하여 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 항원 단백질의 복합체(complex)를 제조하였다(도 4 참조).

[38] 또한, 본 발명자들은 SDS-PAGE 분석을 실시한 결과, 비환원성 겔에서 3LRH^{cys} 항체와 #8188^{cys} 단백질 A 사이의 이황화 다리가 형성되어 밴드가 이동됨을 확인하였으며, 결정화 구조를 분석한 결과, 전자 밀도 지도를 통해 이황화 다리가 형성됨을 확인하였다(도 8 및 도 9 참조).

[39] 따라서, 서열번호 6 또는 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 인간 유래로서 면역 반응 유도과 같은 부작용이 없고, 상기 펩타이드 간의 결합은 항원-항체 반응으로 결합하기 때문에 특이적으로 결합이 가능하며, 이황화 결합을 통해 견고한 결합을 형성할 수 있으므로, 이들 펩타이드를 각각 포함하는 융합 단백질 간의 바이오컨쥬게이션에 유용한 시스템으로 사용될 수 있다.

[40]

[41] 또한, 본 발명은 1) 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 및 제1 목적 단백질을 포함하는 제1 융합 단백질 및, 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 및 제2 목적 단백질을 포함하는 제2 융합 단백질을 제조하는 단계; 및 2) 상기 제조된 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질을 혼합하여 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 간 결합을 형성시키는 단계를 포함하는, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate) 형성 방법을 제공한다.

- [42] 본 발명에서 "목적 단백질"은 컨쥬게이션 시킬 단백질 또는 펩타이드를 의미하는 것으로서, 단백질 또는 펩타이드라면 종류나 크기의 제한없이 포함될 수 있다.
- [43] 본 발명에서 "융합 단백질"은 2개 이상의 단백질 또는 펩타이드가 서로 연결된 인위적으로 합성된 단백질로서, 구체적으로는 상기 목적 단백질 및 본 발명의 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 포함할 수 있다.
- [44] 본 발명에서 "제1 융합 단백질"은 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드(3LRH^{cys} 항체)와 제1 목적 단백질을 포함하는 융합 단백질을 의미하고, "제2 융합 단백질"은 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드와 제2 목적 단백질을 포함하는 융합 단백질을 의미한다.
- [45] 상기 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 상기 제1 목적 단백질 서열의 N-말단, 내부 또는 C-말단에 존재할 수 있다. 또한 상기 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 상기 제2 목적 단백질의 서열의 N-말단, 내부 또는 C-말단에 존재할 수 있다.
- [46] 본 발명에서 "제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate)"는 임의의 제1 목적 단백질과 제2 목적 단백질을 결합시키기 위하여, 상기 제1 융합 단백질 및 상기 제2 융합 단백질을 제조하고, 제조한 상기 제1 융합 단백질과 상기 제2 융합 단백질을 결합시킨 결합체를 의미한다. 구체적으로, 상기 결합체는 제1 융합 단백질에 포함된 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드(3LRH^{cys} 항체) 및 상기 제2 융합 단백질에 포함된 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 간의 결합으로 형성된 것이다.
- [47] 상기 단계 1)의 융합 단백질을 제조하는 단계에서 상기 융합 단백질은 당해 분야에 공지된 화학적 합성방법으로 제조하거나, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현벡터에 클로닝하여 발현시켜서 제조할 수 있다.
- [48] 상기 단계 2)의 결합은 상기 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드와 상기 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 간의 결합일 수 있다.
- [49] 상기 펩타이드 간의 결합은 항원-항체 반응으로 결합된 것일 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 간의 결합은 상기 항원-항체 반응으로 결합된 것에 이황화 결합(disulfide bond)을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [50] 상기 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열은 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열일 수 있다.
- [51]
- [52] 또한, 본 발명은 상기 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체 형성 방법으로 형성된 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate)를 제공한다.

- [53] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 본 발명자들은 3LRH^{cys} 항체 및 #8188^{cys} 단백질 A를 각각 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 벡터에 클로닝하고, 상기 벡터를 *E. coli*에 형질전환하여 3LRH^{cys} 항체 및 #8188^{cys} 단백질 A를 제조하였으며, 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 항원 단백질의 복합체 제조하였다(표 3, 표 4 및 도 4 참조). 따라서, 3LRH^{cys} 항체와 제1 목적 단백질의 융합 단백질과 #8188^{cys} 단백질 A와 제2 목적 단백질의 융합 단백질을 혼합하는 경우, 3LRH^{cys} 항체와 #8188^{cys} 단백질 A 간의 결합을 통해 목적 단백질 간의 결합체를 제조할 수 있다.

[54]

발명의 실시를 위한 형태

- [55] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [56] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [57] <실시예 1> 3LRH 항체의 제작
- [58] 3LRH 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 PDB 데이터베이스에 저장된 아미노산 서열 정보를 기반으로 합성하였다.

[59] [표1]

서열 번호	항체이 름	서열 종류	서열
1	3LRH	아미노 산 서열	MGSQPVLTQSPSVSAAPRQRTISVSGSNSNIGSNTV NWIQQLPGRAPELLMYDDDLLAPGVSDRFSGSRSGT SASLTISGLQSEDEADYYAATWDDSLNGWVFGGGT KVTVLSA
2	3LRH	염기서 열(5'→3)	ATGGGTAGTCAACCAGTACTTACACAAAGCCCGTC TGTGTCTGCCGCTCCACGTCAGAGAGTCACCATCT CAGTTAGTGGTTCTAATTCAAATATAGGATCGAAC ACAGTGAAGTGGATTGAGCAGTTGCCTGGCCGTGC CCCGGAGTTATTAATGTATGATGATGATTTATTAG CACCCGGAGTATCAGATCGCTTTTCAGGAAGCCGT AGTGGCACTAGTGCCTTAACCATAGCGGGTT ACAGTCTGAAGACGAAGCGGACTATTACGCAGCT ACGTGGGATGATAGTTTAAATGGCTGGGTTTTTGG TGGTGGTACTAAAGTTACGGTGCTGTCCGCA

- [60] 3LRH 항체를 암호화할 수 있는 폴리뉴클레오티드(서열번호 2)를 pET28a 벡터에 클로닝한 후, 단백질 생산을 위해, *E. coli* strain BL21(DE3)에 형질전환하였다. 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 50μg/mL의

카나마이신(kanamycin)이 첨가된 LB 배지에 접종하고 37°C에서 배양하였다. OD₆₀₀의 값이 0.7에 도달하였을 때, 0.5 mM IPTG(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 단백질 생산을 유도하고, 21°C에서 밤새 배양하였다. *E. coli*를 수득한 후, 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl 및 0.5 mM PMSF를 포함하는 용해 완충액(lysis buffer)에 수확한 세포 펠릿을 재현탁시키고, 마이크로플루이다이저(microfluidizer, Microfluidics)로 균질화시켰다. 원심분리를 통해 제거하고, 상등액을 Ni-NTA 금속 친화성 컬럼(metal affinity column)에 로딩한 후, 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl 및 500 mM 이미다졸(imidazole) pH 8.0를 포함하는 버퍼를 이용하여 6XHis-태그된 단백질을 용출시켰다.

- [61] 6XHis 태그를 제거하기 위해, 용출된 항체 단백질에 트롬빈(Sigma, Cat#. T4648)을 함께 밤새 처리하였다. 이를 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl로 평형화된 Superdex 200 크기-배제 컬럼(size-exclusion column, GE Healthcare)에 로딩하여 절단된 3LRH 항체를 정제하였다.
- [62]
- [63] <실시에 2> 에피토프가 도입된 #8188 단백질 A의 제작
- [64] 단백질 A에 3LRH 항체가 결합할 수 있는 에피토프를 도입하고자 하였다. 3LRH 항체는 인간 헌팅틴 단백질내의 14개 아미노산으로 구성된 알파 나선형 스트레치(alpha helical stretch)에 결합한다.
- [65] 3LRH 항체에 결합된 헌팅틴 펩타이드 구조를 단백질 A의 C 말단 헬릭스에 오버랩(overlap)시켰다(도 1 참조). 도 2는 분자 모델링 프로그램으로 오버랩된 헌팅틴 펩타이드의 처음 10개의 아미노산과 단백질 A의 C 말단 헬릭스의 마지막 10개의 아미노산을 나타낸 것이다(도 2 참조).
- [66] 단백질 A에 에피토프를 설계하기 위해, 단백질 A와 헌팅틴 단백질의 나선을 구조 정렬(structural alignment)한 결과, 단백질 A에서 47번째 아미노산인 라이신(K47) (미도시), 50번째 아미노산인 글루타민(E50) 및 51번째 아미노산인 세린(S51)은 항체를 향하고 결합에 중요한 것으로 확인되었다(도 3 참조). 이외에도 단백질 A에서 54번째 아미노산인 프롤린(P54) (미도시), 및 55번째 아미노산인 라이산(K55) (미도시) 또한 항체를 향하고 결합에 중요한 것으로 확인되었다.
- [67] 이에 라이신을 제외한 단백질 A의 상기 아미노산들을 헌팅틴 펩타이드의 상응하는 아미노산으로 치환하여, 조작된 에피토프(engineered epitope)를 가지는 #8188 단백질 A를 제작하였다(도 2 및 표 2 참조). 라이신(K47)은 헌팅틴 펩타이드와 단백질 A 서열의 상응하는 위치에서 모두 발견되었기 때문에, 변경할 필요가 없었고, 단백질 A의 N말단 영역인 54번째 및 55번째 아미노산은 헌팅틴 펩타이드의 N말단 영역인 13 내지 18번째 아미노산 서열로 치환하였다.

[68] [표2]

서열 번호	단백질 이름	서열 종류	서열
3	단백질 A	아미노 산 서열	MFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDD PSQSTNVLGAEAKKLNESQAPK
4	#8188 단백질 A	아미노 산 서열	MFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDD PSQSTNVLGAEAKKLNKAQASLKSFQ
5	#8188 단백질 A	염기서 열(5'→3')	ATGTTCAACAAGGATCAGCAGAGCGCCTTCTAC GAGATCCTGAACATGCCGAACCTGAACGAGGCC CAGCGCAACGGCTTCATCCAGAGCCTGAAGGAT GATCCAGCCAGAGCACGAACGTGCTGGGTGAA GCTAAGAACTGAACAAAGCTCAGGCTTCTCTG AAATCTTTCCAG

[69] 구체적인 #8188 단백질 A의 제작 과정은 다음과 같다. #8188 단백질 A를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 5)는 합성 올리고뉴클레오티드를 이용한 PCR을 통해 수득하였다. 구체적인 PCR 과정은 다음과 같다. 단백질 A를 암호화하는 유전자를 템플릿으로 하고, 정방향 프라이머 (서열번호 12)과 역방향 프라이머 (서열번호 13)을 이용하여 변성(denaturation) 단계(95°C)에서 20초; 어닐링(annealing) 단계(56°C)에서 20초; 연장(extension step) 단계(72°C)에서 30초 조건에 따라 PCR(총 30 cycle)을 수행하였다. (정방향 프라이머 (서열번호 12): ACTACCATATGTTCAACAAGGATCAGCAGAGCGCC; 역방향 프라이머 (서열번호 13): ACTACGCGGCCGCTCACTGGAAAGATTTCAGAGAAGCCTGAGCTTTGTTCA GTTTCTTAGCTTCACCCAGCACGTTC)

[70] 증폭된 #8188의 폴리뉴클레오티드(서열번호 5)를 pET28a 벡터에 클로닝한 후, 단백질 생산을 위해, *E. coli* strain BL21(DE3)에 형질전환하였다. 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 50 µg/mL의 카나마이신(kanamycin)이 첨가된 LB 배지에 접종하고 37°C에서 배양하였다. OD₆₀₀의 값이 0.6에 도달했을 때, 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 37°C에서 4시간 동안 추가로 배양하였다. *E. coli*를 수득한 후, 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl 및 0.5 mM PMSF를 포함한 용해 완충액(lysis buffer)에 재현탁시키고, 마이크로플루이다이저(microfluidizer, Microfluidics)로 균질화시켰다. 원심분리를 통해 세포 부유물을 제거하고, 상등액을 Ni-NTA 크로마토그래피 컬럼에 로딩하였다. 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl 및 500 mM 이미다졸(imidazole) pH 8.0를 포함하는 버퍼를 이용하여 6XHis-태그된 단백질을 용출시키고, 이미다졸은 PD-10 탈염 컬럼(desalting column, GE Healthcare)을

이용하여 제거하여, 정제된 #8188 단백질 A를 수득하였다.

[71]

[72] <실시예 3> 3LRH^{cys} 항체 및 #8188^{cys} 단백질 A의 제작

[73] 3LRH 항체와 #8188 단백질 A 간의 항원-항체 결합 반응을 나노구조체의 제조 등에 적용하기 위하여 상기 두 폴리펩타이드 분자를 이황화 다리(disulfide bridge)로 연결하고자 하였다. Design 2.0 프로그램을 사용하여 3LRH의 경우 53번째 아미노산인 티로신, #8188 단백질 A의 경우 51번째 아미노산인 알라닌을 시스테인(Cys)을 도입할 위치(site)로 결정하였다.

[74] <실시예 3-1> 3LRH^{cys} 항체의 제작

[75] 3LRH의 53번째 아미노산인 티로신(tyrosine, Y)을 시스테인(cystein, C)으로 돌연변이시킨 3LRH^{cys} 항체(표 3)을 제작하기 위해, 오버랩 PCR을 수행하였다.

[76] 3LRH 항체를 암호화하는 유전자를 템플릿으로 하고, 정방향 프라이머 1(서열번호 14)과 역방향 프라이머 1(서열번호 15)을 이용하여 PCR을 수행하여 템플릿(template) 1을 얻었다. 그 다음, 정방향 프라이머 2(서열번호 16)와 역방향 프라이머 2(서열번호 17)를 이용하여 PCR을 하여 템플릿 2를 얻었다. 정방향 프라이머 1과 역방향 프라이머 2로 템플릿 1과 템플릿 2를 동시에 PCR을 수행하여 오버랩 PCR을 완성하였다.

[77] (정방향 프라이머 1(서열번호 14):

ACTACCATATGGGTTAGTCAACCAGTACTTACACAA;

[78] 역방향 프라이머 1(서열번호 15):

ATCATCATCACACATTAATAACTCCGGGGGCACGGC;

[79] 정방향 프라이머 2(서열번호 16):

TTATTAATGTGTGATGATGATTTATTAGCACCCG;

[80] 역방향 프라이머 2(서열번호 17):

ACTACGCGGCCGCTCATGCGGACAGCACCGTAACT)

[81] [표3]

서열 번호	항체이 름	서열 종류	서열
1	3LRH	아미노 산 서열	MGSQPVLTSQSPSVSAAPRQRVTISVSGSNSNIGSNTV NWIQQLPGRAPELLM <u>Y</u> DDDLLAPGVSDRFSGSRSGT SASLTISGLQSEDEADYYAATWDDSLNGWVFGGGT KVTVLSA
6	3LRH ^{cys}	아미노 산 서열	MGSQPVLTSQSPSVSAAPRQRVTISVSGSNSNIGSNTV NWIQQLPGRAPELLM <u>C</u> DDDLLAPGVSDRFSGSRSGT SASLTISGLQSEDEADYYAATWDDSLNGWVFGGGT KVTVLSA
7	3LRH ^{cys}	염기서 열(5'→3 ')	ATGGGTAGTCAACCAGTACTTACACAAAGCCCGTC TGTGTCTGCCGCTCCACGTCAGAGAGTCACCATCT CAGTTAGTGGTTCTAATTCAAATATAGGATCGAAC ACAGTGAACCTGGATTTCAGCAGTTGCCTGGCCGTGC CCCGGAGTTATTAATGTGTGATGATGATTTATTAG CACCCGGAGTATCAGATCGCTTTTCAGGAAGCCGT AGTGGCACTAGTGCGTCCTTAACCATTAGCGGGTT ACAGTCTGAAGACGAAGCGGACTATTACGCAGCT ACGTGGGATGATAGTTTAAATGGCTGGGTTTTTGG TGGTGGTACTAAAGTTACGGTGCTGTCCGCA

[82] 증폭된 3LRH^{cys} 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 7)를 pET28a 벡터에 클로닝한 후, 실시예 1에 기재된 방법으로 3LRH^{cys} 항체를 얻었다.

[83] <실시예 3-2> #8188^{cys} 단백질 A의 제작

[84] #8188 단백질 A의 51번째 아미노산인 알라닌(alanine, A)을 시스테인(cystein, C)으로 돌연변이시키기 위해, #8188 단백질 A를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 주형으로 PCR을 수행하여 #8188^{cys} 단백질 A를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제작하였다.

[85] [표4]

서열 번호	단백질 이름	서열 종류	서열
4	#8188 단백질 A	아미노 산 서열	MFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDD PSQSTNVLGEAKKLNK <u>A</u> QASLKSFQ
8	#8188 ^{cys} 단 백질 A	아미노 산 서열	MFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDD PSQSTNVLGEAKKLNK <u>C</u> QASLKSFQ
9	#8188 ^{cys} 단 백질 A 내 결합펩타 이드	아미노 산 서열	KKLNKCQASLKSFQ
10	#8188 ^{cys} 단 백질 A 내 결합펩타 이드	아미노 산 서열	xKxxxCxxSLxxFx
11	#8188 ^{cys} 단 백질 A	염기서 열(5'→3')	ATGTTCAACAAGGATCAGCAGAGCGCCTTCTAC GAGATCCTGAACATGCCGAACCTGAACGAGGCC CAGCGCAACGGCTTCATCCAGAGCCTGAAGGAT GATCCGAGCCAGAGCACGAACGTGCTGGGTGAA GCTAAGAAACTGAACAAATGTCAGGCTTCTCTG AAATCTTTCCAG

[86] 구체적으로 돌연변이는 합성 올리고뉴클레오티드를 이용한 PCR을 통해
수득하였다. 구체적인 PCR 과정은 다음과 같다. #8188 단백질 A를 암호화하는
유전자를 템플릿으로 하고, 정방향 프라이머 (서열번호 18)과 역방향 프라이머
(서열번호 19)을 이용하여 변성(denaturation) 단계(95°C)에서 20초;
어닐링(annealing) 단계(56°C)에서 20초; 연장(extension step) 단계(72°C)에서 30초
조건에 따라 PCR(총 30 cycle)을 수행하였다. (정방향 프라이머 (서열번호 18):
ACTACCATATGTTCAACAAGGATCAGCAGAGCGCC; 역방향 프라이머
(서열번호 19):
ACTACGCGGCCGCTCACTGGAAAGATTTTCAGAGAAGCCTGACATTTGTTCA
GTTTCTTAGCTTCACC)

[87]

[88] 증폭된 #8188^{cys} 단백질 A를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 11)를
pET28a 벡터에 클로닝한 후, 단백질 생산을 위해, *E. coli* strain BL21(DE3)에
형질전환하였다. 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 50μg/mL의

카나마이신(kanamycin)이 첨가된 LB 배지에 접종하고 37°C에서 배양하였다. OD₆₀₀의 값이 0.6에 도달했을 때, 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 37°C에서 4시간 동안 추가로 배양하였다. *E. coli*를 수득한 후, 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl 및 0.5 mM PMSF를 포함한 용해 완충액(lysis buffer)에 재현탁시키고, 마이크로플루이다이어저(microfluidizer, Microfluidics)로 균질화시켰다. 원심분리를 통해 세포 부유물을 제거하고, 상등액을 Ni-NTA 크로마토그래피 컬럼에 로딩하였다. 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl 및 500 mM 이미다졸(imidazole) pH 8.0를 포함하는 버퍼를 이용하여 6XHis-태그된 단백질을 용출시키고, 이미다졸은 PD-10 탈염 컬럼(desalting column, GE Healthcare)를 이용하여 제거하여, 정제된 #8188^{cys} 단백질 A를 수득하였다.

[89]

[90] <실시예 4> 3LRH 항체-#8188 단백질 A의 복합체(complex) 제작

[91] 3LRH 항체-#8188 단백질 A의 복합체를 제작하기 위해, 실시예 1에서 제작한 3LRH 항체와 실시예 2에서 제작한 #8188 단백질 A를 1:1 몰비(molar ratio)로 4°C에서 1시간 동안 혼합하였다.

[92] Superdex 200 겔-여과 크로마토그래피(gel-filtration chromatography)를 이용하여 3LRH 항체-#8188 단백질 A의 복합체만을 정제하였다.

[93]

[94] <실시예 5> 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 항원 단백질의 복합체(complex) 제작[95] 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 단백질 A의 복합체를 제작하기 위해, 실시예 3에서 제작한 3LRH^{cys} 항체와 #8188^{cys} 단백질 A를 비환원 환경(non-reducing conditions) 하에서 1:1 몰비(molar ratio)로 4°C에서 밤새 혼합하였다.[96] Superdex 200 겔-여과 크로마토그래피(gel-filtration chromatography)를 이용하여 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 항원 펩타이드의 복합체만을 정제하였다.

[97]

[98] <실험예 1> 3LRH 항체-#8188 단백질 A의 복합체의 결정 구조 확인

[99] 35% PEG 4000, 0.1 M MOPS pH 6.5를 포함하는 결정화 용액(crystallization solution)과 동결보호제인 30% 글리세롤을 이용하여 실시예 4에서 제작한 3LRH 항체-#8188 단백질 A의 복합체를 결정화시켰다. 결정체(crystal)는 -170°C의 액체 질소에서 급속 동결시켰다.

[100] 회절 데이터는 포항가속기연구소(Pohang Accelerator Laboratory)의 7A와 5C 빔 라인에서 수집하였고, 회절 데이터의 처리에는 패키지 HKL2000를 사용하였다(HKL research).

[101] 구조의 확인과 개선(refinement)의 초기 단계는 PHASER 프로그램을 이용한 분자 대체 기법(molecular replacement technique)으로 계산되었다. 원자 모델은 프로그램 COOT 및 PHENIX를 이용, 반복적인 모델링과 개선(refinement)에 의해 구축되었다.

[102] 결정 구조에서, #8188 단백질 A의 변형된 C 말단 나선은 예상대로 3LRH

항체와 상호 작용하였다(도 5 참조). 에피토프 생성을 위해 변이된 아미노산 잔기는 빨간색으로 표시되어 있다.

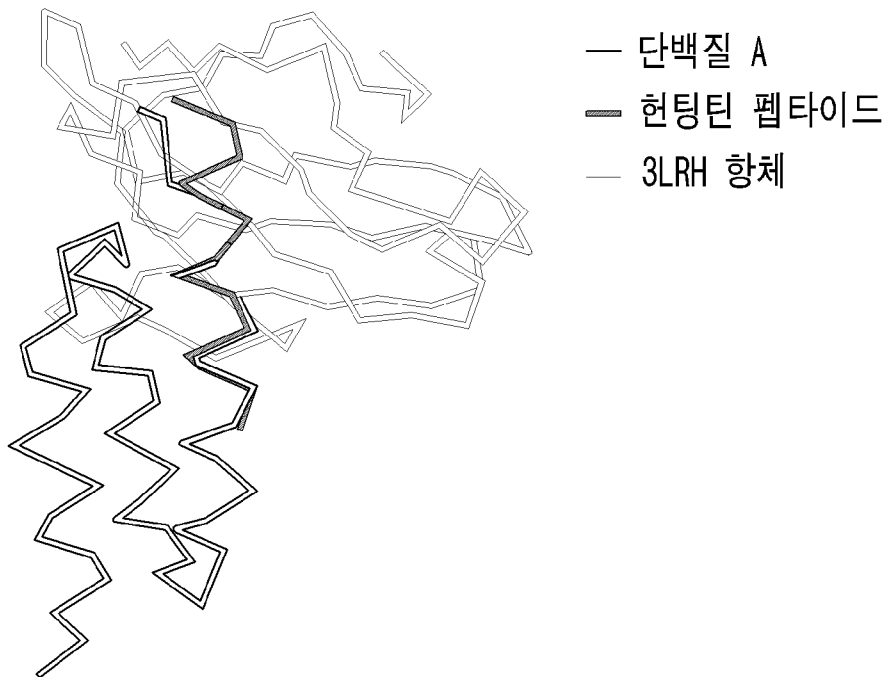
- [103] 3LRH 항체와 상호 작용하는 아미노산의 구조는 본래의 헛팅틴 펩타이드-3LRH 항체의 복합체의 구조와 실질적으로 동일하고, #8188 단백질 A 및 천연 단백질 A의 전체 구조는 0.408 Å의 Cα r.m.s.d로 겹쳐질 수 있다(도 6 및 도 7).
- [104]
- [105] <실험예 2> SDS-PAGE를 이용한 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 단백질 A 간의 이황화 다리(disulfide bridge)의 형성 확인
- [106] 실시예 5에 기재된 바와 같이, 3LRH^{cys} 항체와 #8188^{cys} 단백질 A를 혼합하였을 때, 이황화 다리가 제대로 형성되는지를 환원성 및 비환원성 조건에서 SDS-PAGE를 수행하여 모니터링하였다.
- [107] 도 8을 참고하면, 비환원성 겔에서 3LRH^{cys} 항체와 #8188^{cys} 단백질 A 사이의 이황화 다리가 형성되어 밴드가 이동됨을 확인하였으며, 밤새 배양 후(16 hr) 거의 100% 효율로 이황화 다리가 형성되는 것을 확인되었다. 결합할 항체 없이, #8188^{cys} 단백질 A만 있는 경우, 비환원성 조건에서 동형이량체(homodimer)를 형성하였다.
- [108] 시스테인 돌연변이는 복합체의 안정성을 증가시킬 수 있다. 뿐만 아니라 이황화 다리는 두 개의 시스테인이 서로 충분히 가까울 때만 형성될 수 있기 때문에, 에피토프의 성공적인 설계와 복합체의 형성을 확인할 수 있는 편리한 도구가 될 수 있다. 따라서 3LRH^{cys} 항체에 대한 #8188^{cys} 단백질 A의 결합은 정제 없이도 단백질 최소량만 사용하여, 비환원성 SDS-PAGE에 의해 빠르게 모니터링될 수 있다.
- [109]
- [110] <실험예 3> 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 항원 단백질의 복합체의 결정화(crystallization) 구조 확인
- [111] 45% PEG 4000, 0.1 M HEPES pH 7.5를 포함하는 결정화 용액(crystallization solution)과 동결보호제인 30% 글리세롤을 이용하여 실시예 5에서 제작한 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 단백질 A의 복합체를 결정화시켰다. 결정체(crystal)는 -170°C의 액체 질소에서 급속 동결시켰다.
- [112] 회절 데이터는 포항가속기연구소(Pohang Accelerator Laboratory)의 7A와 5C 빔 라인에서 수집하였고, 회절 데이터의 처리에는 패키지 HKL2000를 사용하였다(HKL research).
- [113] 구조의 확인과 개선(refinement)의 초기 단계는 PHASER 프로그램을 이용한 분자 대체 기법(molecular replacement technique)으로 계산되었다. 원자 모델은 프로그램 COOT 및 PHENIX를 이용, 반복적인 모델링과 개선(refinement)에 의해 구축되었다.
- [114]

- [115] 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 단백질 A의 복합체의 구조에서, 전자 밀도 지도(electron density map)는 이황화 다리를 분명하게 나타낸다 (도 9). 이황화 다리는 도 9에 노란색 선으로 표시하였고, 이황화 다리 주변에 전자 밀도 지도는 회색 메쉬로 표시하였다. 또한 이 이황화 다리 자체는 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 단백질 A 사이의 상호작용을 방해하지 않음을 보여준다.
- [116]
- [117] 이황화 다리로 안정화된 3LRH^{cys} 항체-#8188^{cys} 단백질 A의 복합체 시스템은 바이오컨쥬게이션에 유용한 도구가 될 수 있다. 3LRH와 #8188 단백질 A는 인간 단백질로부터 유래된 것이기 때문에, 기존에 면역학적 합병증과 같은 부작용으로 치료제로서 적용이 제한되어 온 종래의 바이오컨쥬게이션 방법의 한계점을 해결할 수 있다. 또한 3LRH^{cys} 항체 또는 #8188^{cys} 단백질 A는 사이즈가 작으므로, *E. coli*에서 퓨전 태그(fusion tag)로 쉽게 다량 생산할 수 있다는 장점이 있다.
- [118]

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 6 또는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질.
- [청구항 2] 제1항의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열은 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열인, 단백질.
- [청구항 4] 1) 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 및 제1 목적 단백질을 포함하는 제1 융합 단백질 및, 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 및 제2 목적 단백질을 포함하는 제2 융합 단백질을 제조하는 단계; 및
2) 상기 제조된 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질을 혼합하여 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 간 결합을 형성시키는 단계를 포함하는, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate) 형성 방법.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서,
상기 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 상기 제1 목적 단백질 서열의 N-말단, 내부 또는 C-말단에 존재하며,
상기 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 상기 제2 목적 단백질의 서열의 N-말단, 내부 또는 C-말단에 존재하는 것인, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate) 형성 방법.
- [청구항 6] 청구항 4에 있어서,
상기 단계 2)의 결합은 상기 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드와 상기 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 간의 결합인, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate) 형성 방법.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서,
상기 펩타이드 간의 결합은 항원-항체 반응으로 결합된 것인, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate) 형성 방법.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서,
상기 펩타이드 간의 결합은 이황화 결합(disulfide bond)을 더 포함하는 것인, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate) 형성 방법.
- [청구항 9] 청구항 4 내지 청구항 8에 있어서, 상기 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열은 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열인, 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate) 형성 방법.
- [청구항 10] 청구항 4의 방법으로 형성된 제1 목적 단백질 및 제2 목적 단백질의 결합체(conjugate).

[도1]



[도2]

단백질 A
 (protein A)

46 KKLNESQAPK 55

헌팅틴
 (huntingtin)

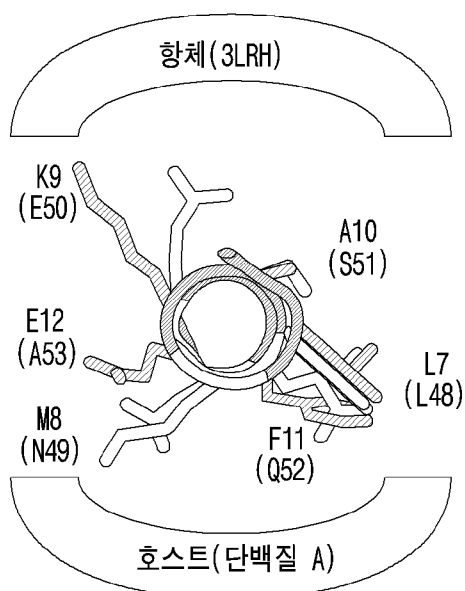
5 EKLMKAFESLKSFSQ 18

조작된 에피토프
 (engineered Epitope)

46 KKLNKAQASLKSFSQ 59

오버랩

[도3]



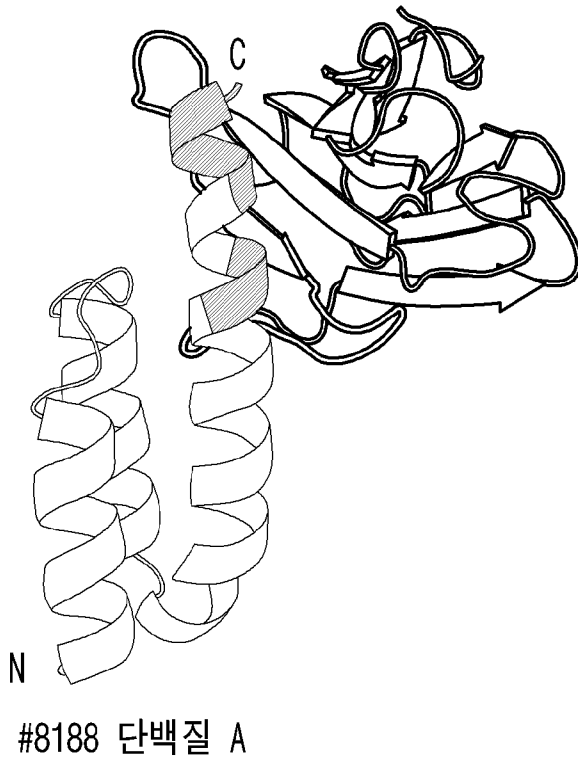
[도4]

3LRH^{cys} 항체 45 GRAPELLMCDDLLAPG 61#8188^{cys}
단백질 A 43 GEAKKLNKCQASLKSFQ 59

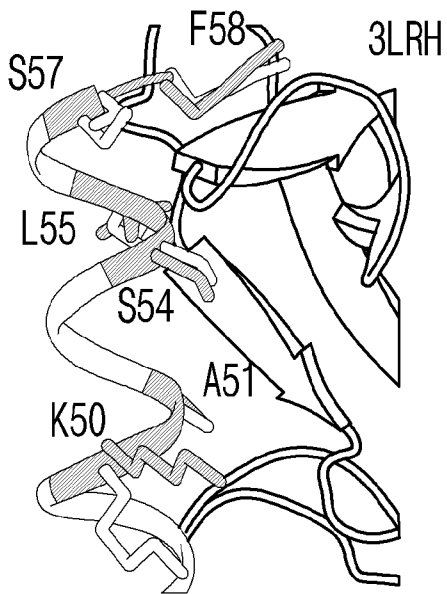
조작된 에피토프
(engineered epitope)

[도5]

3LRH 항체

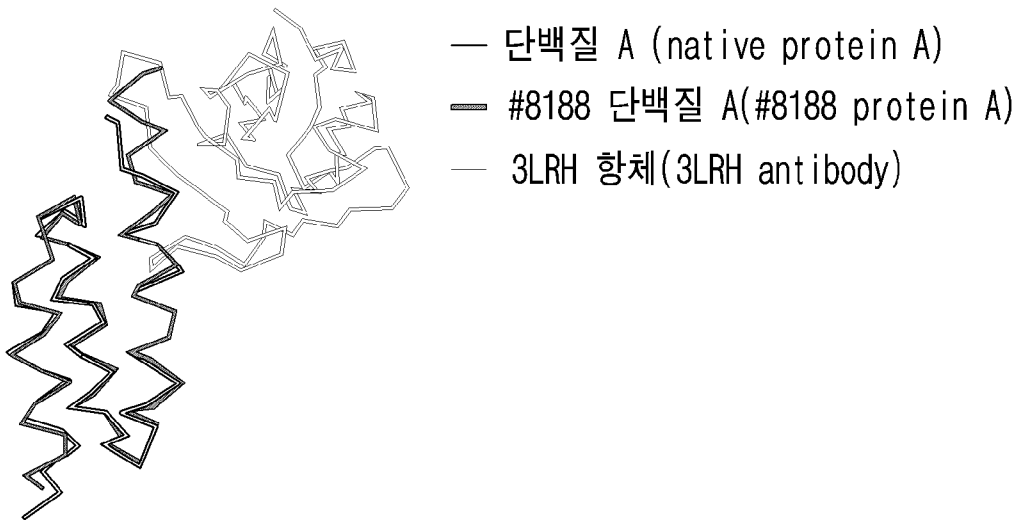


[도6]

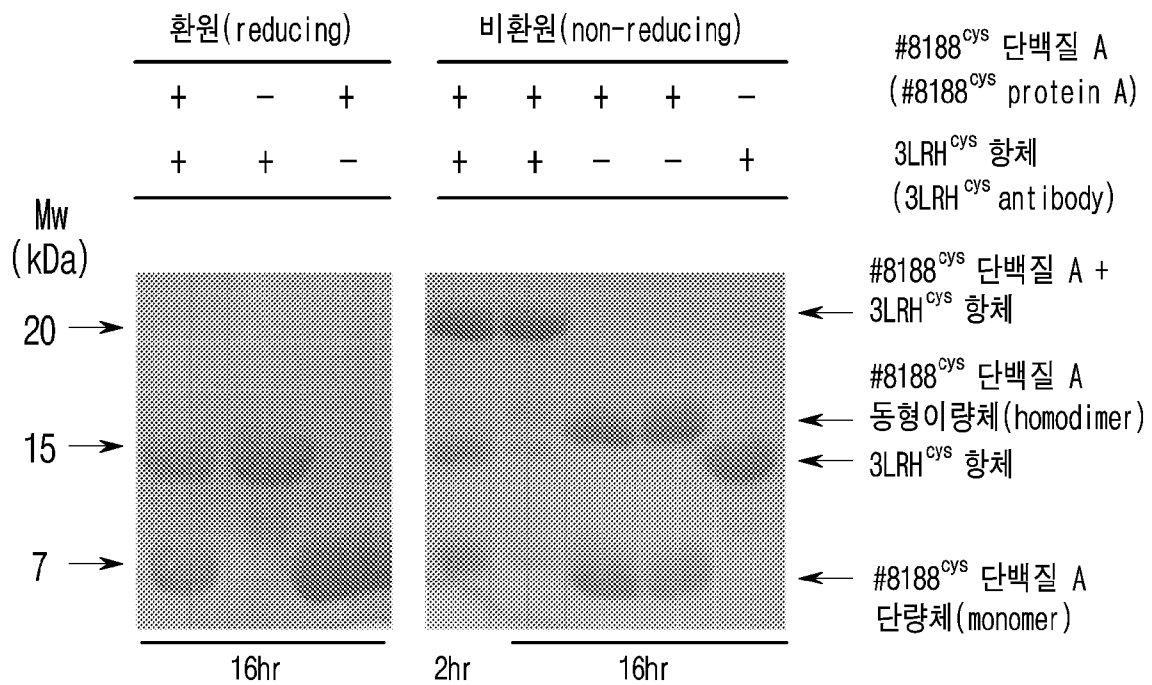


#8188 단백질 A

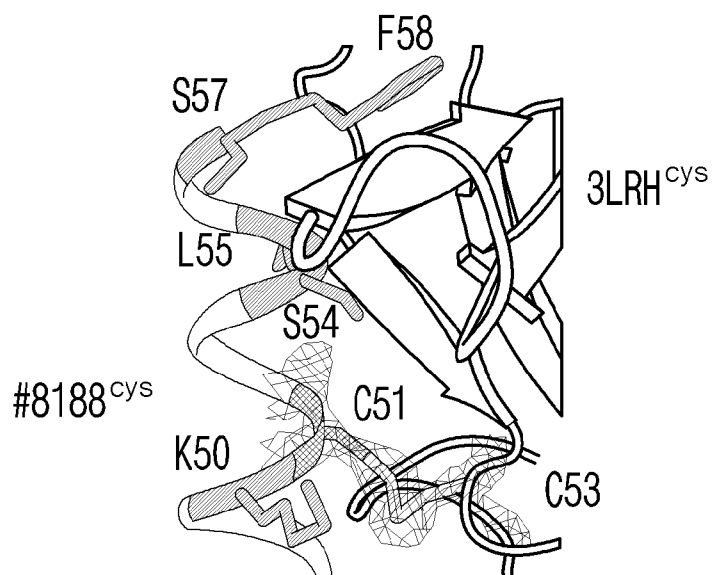
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/014818

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 9
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/014818**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 16/18(2006.01)i, C07K 14/31(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/18; A61K 39/395; A61K 47/48; C12N 1/20; C12P 21/06; C07K 14/31

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: 3LRH, protein A, conjugate, fusion, target protein, antigen, antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCBI, GenBank accession no. 3LRH_A (10 October 2012) See all sequences.	1,2
A		3-8,10
X	SCHIEFNER, A. et al. A disulfide-free single-domain VL intrabody with blocking activity towards huntingtin reveals a novel mode of epitope recognition. Journal of Molecular Biology. 2011, vol. 414, pages 337-355 See abstract; figure 2.	1,2
A	US 2010-0233180 A1 (KHOSHMAN, Ali et al.) 16 September 2010 See claim 1; paragraph [0099].	1-8,10
A	US 7691608 B2 (PEYSER, James Ronald) 06 April 2010 See the entire document.	1-8,10
A	KR 10-1281208 B1 (PHILOGEN S.P.A.) 26 July 2013 See the entire document.	1-8,10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 MARCH 2019 (08.03.2019)

Date of mailing of the international search report

11 MARCH 2019 (11.03.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/014818

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0233180 A1	16/09/2010	US 2003-0232052 A1 US 2008-0107657 A1 US 7375194 B2	18/12/2003 08/05/2008 20/05/2008
US 769 1608 B2	06/04/2010	CA 2666053 A1 CA 2666053 C EP 2099932 A2 US 2009-0093017 A1 US 2011-0124045 A1 WO 2008-127457 A2 WO 2008-127457 A3	06/06/2008 29/03/2011 16/09/2009 09/04/2009 26/05/2011 23/10/2008 23/04/2009
KR 10-1281208 B1	26/07/2013	AT 459648 T AU 2006-246061 A1 BR P10609100 A2 CA 2607954 A1 CN 101258162 A EA 011992 B1 EA 200702460 A1 EP 1891102 A2 EP 1891102 B1 ES 2341126 T3 HK 1113579 A1 JP 2008-543278 A MX 2007013875 A US 2009-0035255 A1 US 8455625 B2 WO 2006-119897 A2 WO 2006-119897 A3	15/03/2010 16/11/2006 17/02/2010 16/11/2006 03/09/2008 30/06/2009 30/06/2008 27/02/2008 03/03/2010 15/06/2010 30/04/2010 04/12/2008 28/01/2008 05/02/2009 04/06/2013 16/11/2006 15/03/2007

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/014818

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/18(2006.01)i, C07K 14/31(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/18; A61K 39/395; A61K 47/48; C12N 1/20; C12P 21/06; C07K 14/31

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 3LRH, protein A, 콘주게이트, 융합, 목적 단백질, 항원, 항체

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	NCBI, GenBank accession no. 3LRH_A (2012.10.10) 전체 서열 참조.	1,2
A		3-8,10
X	SCHIEFNER, A. 등, 'A disulfide-free single-domain VL intrabody with blocking activity towards huntingtin reveals a novel mode of epitope recognition', Journal of Molecular Biology, 2011, 제414권, 페이지 337-355 초록; 도면 2 참조.	1,2
A	US 2010-0233180 A1 (KHOSHAN, ALI 등) 2010.09.16 청구항 1; 단락 [0099] 참조.	1-8,10
A	US 7691608 B2 (PEYSER, JAMES RONALD) 2010.04.06 전체 문헌 참조.	1-8,10
A	KR 10-1281208 B1 (필로젠 에스.피.에이.) 2013.07.26 전체 문헌 참조.	1-8,10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 03월 08일 (08.03.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 03월 11일 (11.03.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



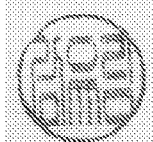
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: 9
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2010-0233180 A1	2010/09/16	US 2003-0232052 A1 US 2008-0107657 A1 US 7375194 B2	2003/12/18 2008/05/08 2008/05/20
US 7691608 B2	2010/04/06	CA 2666053 A1 CA 2666053 C EP 2099932 A2 US 2009-0093017 A1 US 2011-0124045 A1 WO 2008-127457 A2 WO 2008-127457 A3	2008/06/06 2011/03/29 2009/09/16 2009/04/09 2011/05/26 2008/10/23 2009/04/23
KR 10-1281208 B1	2013/07/26	AT 459648 T AU 2006-246061 A1 BR PI0609100 A2 CA 2607954 A1 CN 101258162 A EA 011992 B1 EA 200702460 A1 EP 1891102 A2 EP 1891102 B1 ES 2341126 T3 HK 1113579 A1 JP 2008-543278 A MX 2007013875 A US 2009-0035255 A1 US 8455625 B2 WO 2006-119897 A2 WO 2006-119897 A3	2010/03/15 2006/11/16 2010/02/17 2006/11/16 2008/09/03 2009/06/30 2008/06/30 2008/02/27 2010/03/03 2010/06/15 2010/04/30 2008/12/04 2008/01/28 2009/02/05 2013/06/04 2006/11/16 2007/03/15