



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0126771
(43) 공개일자 2018년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/46 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/461 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0061578
(22) 출원일자 2017년05월18일
심사청구일자 2017년05월18일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
주식회사 이뮤셀
경기도 성남시 중원구 사기막골로 124 ,비즈센
터동비123호(상대원동,에스케이엔테크노파크)
(72) 발명자
정태성
경상남도 진주시 진양호로239번길 13, 203동 202
호 (평거동, 평거하우스토리아파트)
김경동
서울특별시 송파구 가락로 187, 3동 803호 (송파
동, 한양아파트)
(74) 대리인
최규환

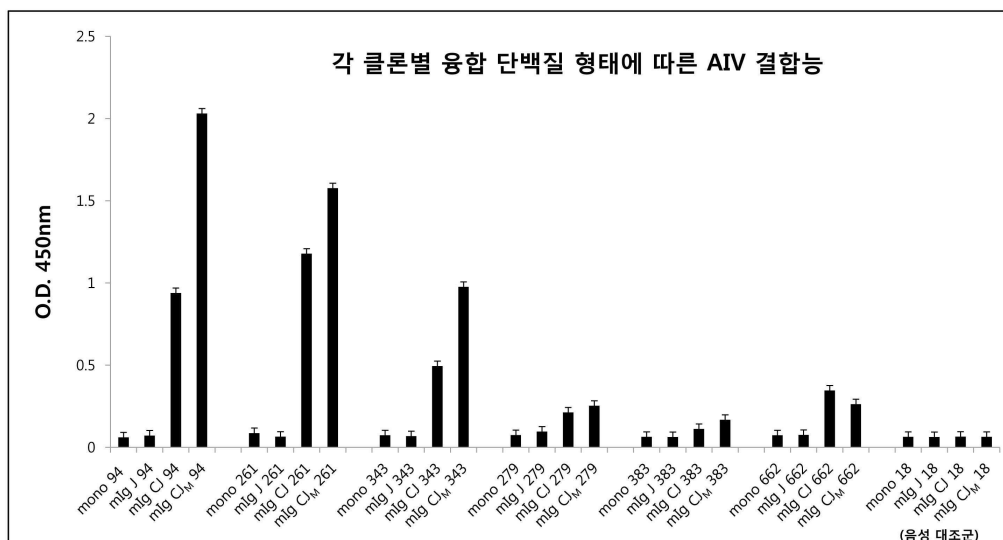
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질에 마우스 항체 유래 Fc 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질을 코딩하는 유전자의 3'-말단에 순차적으로 연결된, 면역글로불린 Fc 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 링커 서열; 및 면역글로불린 J 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터, 상기 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포, 상기 숙주 세포에 의해 생산된 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질; 면역글로불린 Fc 도메인; 링커; 및 면역글로불린 J 사슬이 순차적으로 연결된 융합 단백질 및 상기 융합 단백질이 2합체 또는 4합체의 다량체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다량 항체에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

G01N 33/53 (2018.05)

C07K 2317/35 (2013.01)

C07K 2318/00 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

이정석

부산광역시 사하구 감천항로 172, 3층

임세평

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

김영림

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

김재성

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교 501동
201호

명세서

청구범위

청구항 1

소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질을 코딩하는 유전자의 3'-말단에 순차적으로 연결된, 면역글로불린 Fc 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 링커 서열; 및 면역글로불린 J 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 링커 서열은 시스테인 암호화 서열인 것을 특징으로 하는 재조합 발현 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질은 N-말단에서 C-말단으로 신호 펩타이드(SP), LRRNT(N-terminal capped LRR), LRR(leucine-rich repeat), LRRVs(variable LRR modules), CP(connecting peptide), LRRCT(C-terminal capped LRR) 및 Stalk 도메인으로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 발현 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질은 신호 펩타이드(SP)가 뮤린(murine) 면역글로불린 κ 사슬 리더 서열인 것을 특징으로 하는 재조합 발현 벡터.

청구항 5

제1항의 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 6

제5항의 숙주 세포에 의해 생산된, 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질; 면역글로불린 Fc 도메인; 링커; 및 면역글로불린 J 사슬이 순차적으로 연결된 융합 단백질.

청구항 7

제6항의 융합 단백질이 자가조립에 의해 2합체 또는 4합체의 다량체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체.

청구항 8

- (a) 제1항의 재조합 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계의 배양한 숙주 세포 또는 이의 배양액으로부터 융합 단백질의 2합체 또는 4합체를 수득하는 단계를 포함하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체의 제조방법.

청구항 9

제8항의 방법에 의해 제조된 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가 항체.

청구항 10

제7항 또는 제9항의 다가 항체를 표적 항원 함유 의심 시료에 처리하여 표적 항원을 검출하는 방법.

청구항 11

제7항 또는 제9항의 다가 항체를 유효성분으로 함유하는 표적 항원 검출용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질에 마우스 항체 유래 Fc 부위가 연결된 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단클론 항체 제작 기술이 1970년대 도입된 이후, 포유동물 항체는 바이오마커 개발, 질병의 진단 및 치료 분야에서 전 세계적으로 엄청난 각광을 받으며 성장해 왔다. 최근에는 항체-약물 복합체(antibody-drug conjugate) 시장이 매우 빠르게 성장하고 있으며 시장 규모는, 2013년에는 3억 9600만 달러 정도였다. 하지만 새로운 항체 후보 발굴분야는 이미 몇몇 선진국에 의해 독점적으로 선점되어 왔으며 국내 기업들은 주로 신규 항체 발굴보다는 개량형 항체 개발이나 바이오시밀러 항체의약품 개발을 통한 원가 절감과 같은 노력이 최선책이었다. 주로 마우스에서 유래되어 사용되는 일반적인 항체는 결합부위(epitope)의 제한성, 결합면적의 한계, 비교적 큰 분자량 및 복잡한 생산 공정에 따른 비용과다 등과 같은 문제점들이 계속적으로 지적되어왔다. 이에 대처하기 위해 여러 가지 다른 형태의 항체 및 인공항체 개발에 대한 노력들이 이루어졌으나 경제적, 상업적으로 경쟁 가능한 후보물질은 아직 전무한 상태이므로 기존 항체를 대신할 만한 가격적, 효능적 측면에서 혁신적인 대체항체 개발이 시급한 실정이다.

[0003] 최근의 연구에서 먹장어(hagfish)나 칠성장어(lamprey)의 획득면역 체계를 이용하여 마우스 항체보다 훨씬 높은 항원결합력을 보이는 새로운 항체개발에 대한 가능성이 제시되었다. 진화론적으로 볼 때, 최하위 척추동물인 무악류(Jawless vertebrate)는 먹장어와 칠성장어가 유일한 현존 생명체이다. 최근 이들의 선천면역(innate immunity)과 획득면역(adaptive immunity)은 유악 포유류(Jawed vertebrate)와 유사한 기작으로 이루어진다는 사실이 밝혀졌으며 림프구-유사 세포로부터 세가지 다른 형태의 VLR(variable lymphocyte receptor)가 발견되었으며, 포유동물의 T-림프구와 같은 역할을 하는 VLR-A 및 VLR-C 와 림프구-유사 세포로부터 분비되는 B-림프구 타입의 VLR-B로 구성되어 있다. 특히 포유류의 항체 역할을 주관하는 VLRB 단백질은 포유류의 면역글로불린(immunoglobulin, Ig)과 달리 훨씬 간단한 구조의 단일 폴리펩타이드로 발현되고, 그 다양성이 산술적으로 대략 10^{14} 이상이 가능하며 pH, 온도 등과 같은 주변 환경의 변화에 훨씬 안정적인 장점이 있다. 따라서, 먹장어의 획득면역 체계를 이용하면 원하는 특정 항원에 대한 맞춤형 항체를 보다 저렴하고, 쉽고, 빠르게 제작할 수 있으며, 기존의 다양한 항체 시장에 정면으로 맞설 수 있는 강력한 경쟁적 대체 항체 후보물질이 될 것으로 사료된다.

[0004] 항원-항체 결합을 기반으로 하는 단백질 검출 기술에 있어서 중요한 요소는 항체 단백질과 표적 항원과의 특이적 결합을 높은 결합력으로 안정성 있게 유지하는 것이다. 가장 빈번하게 사용되는 마우스 항체를 예로 보면, 항원과의 결합부위를 두 개 가지면서 Y-형태의 구조를 가진다. 반면 먹장어의 항체는 단일체의 경우 U-형태의 말발굽 구조를 가지며 단일체로는 항체로써 작용하지 않는다. 본 발명자들은 이전의 연구를 통해 먹장어의 VLRB 항체의 경우, 20~30개 정도의 단일체가 구 형태로 이루어진 특이한 형태의 구형 모양을 나타냄을 확인하였다. 하지만, 이 구형태의 먹장어 항체의 경우 인간 세포주인 293과 같은 인위적인 환경에서 발현시키고자 할 때 야생형 VLRB 단백질의 C-말단(C-terminus)에 위치한 높은 소수성 부분으로 인해 그 발현율이 현저히 감소하고, 또한 자연적으로 존재하는 먹장어 항체의 구 형태와는 달리 항원과의 결합 능력을 ELISA, immunoblotting 등으로 조사하기 난해한 단점이 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 먹장어 항체 VLRB 중에서 항원과 결합할 수 있는 부위는 그대로 유지하면서 3차원 구조를 결정하는 C-말단 부위의 유전자를 제거하고 2합체 및 4합체 형성이 가능한 마우스 항체의 Fc 펩타이드 도메인을 도입하여 보다 높은 발현량, 보다 높은 항원 결합력 그리고 보다 작은 분자량을 부여하고자 하였다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1632620호는 'Fc 도메인에 융합된 항-VEGF 단일 가변 도메인'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1660336호에는 'FGFR-Fc 융합단백질 및 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질에 마우스 항체 유래 Fc 부위가 연결된 융합 단백질 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질에 면역글로불린 Fc 도메인, 링커, 및 면역글로불린 J 사슬이 순차적으로 연결된 융합 단백질을 제조하였다. 상기 제조된 융합 단백질을 293-F 세포주에서 발현시킬 경우, 2합체 또는 4합체의 다량체 구조가 형성되는 것을 확인하였으며, 단일체 대비 현저히 증가된 표적 항원에 대한 결합력 증가를 확인할 수 있었다. 특히 상기 융합 단백질의 구성 중 링커가 포함되지 않은 구조에서는 2합체의 다량체가 형성되더라도 표적 항원에 대한 결합력이 증가되지 않는다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질을 코딩하는 유전자의 3'-말단에 순차적으로 연결된, 면역글로불린 Fc 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 링커 서열; 및 면역글로불린 J 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 숙주 세포에 의해 생산된, 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질; 면역글로불린 Fc 도메인; 링커; 및 면역글로불린 J 사슬이 순차적으로 연결된 융합 단백질을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질이 자가조립에 의해 2합체 또는 4합체의 다량체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환시켜 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가 항체를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 다가 항체를 표적 항원 함유 의심 시료에 처리하여 표적 항원을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 다가 항체를 유효성분으로 함유하는 표적 항원 검출용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 항체는 단순한 먹장어 항체가 아니라 항원과 결합부위를 2개 혹은 4개를 가짐으로써 항원-항체 결합력이 증대되고, 소수성 테일 도메인이 제거됨으로써 숙주 세포에서 발현율이 증가되며, 항체 자체의 안정성 또한 증가되었다. 또한, 기존 먹장어 항체는 ELISA나 immunoblotting을 시행할 때 VLRB 인식 항체를 처리하고 다시 2차 항체를 순차적으로 처리해야 하나, 본 발명의 융합항체는 마우스 Fc 부위를 인식할 수 있는 2차항체만 처리하여도 쉽게 검출이 가능한 장점이 있어, 본 발명의 먹장어 융합항체는 추후 바이오마커 개발 및 진단 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 먹장어 야생형 VLRB 단백질의 구조를 나타낸다. SP, 신호 펩타이드; LRRNT, N-terminal capped LRR; LRR, leucine-rich repeat; LRRVs, variable LRR modules; CP, connecting peptide; LRRCT, C-terminal capped LRR; HC, hydrophobic C-terminus.
- 도 2는 본 발명의 융합 단백질 생산을 위한 재조합 발현 벡터(pmlg vector)의 모식도이다.
- 도 3은 본 발명의 VLRB 융합 단백질의 모식도이다. Fc, 마우스 IgG의 Fc 도메인; J, 인간 IgM의 J 사슬; J_H, 마우스 IgM의 J 사슬; ▼, 시스테인 잔기.
- 도 4는 본 발명의 VLRB 융합 단백질의 발현 양상을 확인한 웨스턴 블롯팅 결과로, A는 비환원 조건, B는 환원 조건에서의 결과를 보여준다.

도 5는 조류인플루엔자 바이러스(AIV)로 면역화시킨 먹장어 유래 VLRB 단백질을 포함하는 선별된 VLRB 융합 단백질 클론(#18 및 #94)의 표적 항원(AIV) 특이적 결합능을 확인한 ELISA 결과이다. AIV, 조류인플루엔자 바이러스; VHSV, 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스.

도 6은 선별된 융합 단백질(클론 # 94)의 AIV 농도에 따른 반응성을 닷 블롯팅(dot blotting)으로 확인한 결과이다.

도 7은 선별된 융합 단백질의 발현 형태별 AIV에 대한 결합능을 ELISA로 확인한 결과이다.

도 8은 AIV를 감염시킨 MDCK 세포에 대한 융합 단백질 클론별 항원 결합능을 면역세포화학법으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질을 코딩하는 유전자의 3'-말단에 순차적으로 연결된, 면역글로불린 Fc 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 링커 서열; 및 면역글로불린 J 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 발현 벡터에 있어서, 상기 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질은 N-말단(N-terminus)에서 C-말단(C-terminus)으로 신호 펩타이드(SP), LRRNT(N-terminal capped LRR), LRR(leucine-rich repeat), LRRVs(variable LRR modules), CP(connecting peptide), LRRCT(C-terminal capped LRR) 및 Stalk 도메인으로 이루어진 단백질일 수 있으며, 항원 인식 부위인 LRRVs와 LRRCT 도메인을 포함하고 있어 표적 항원에 대한 결합능이 있는 VLRB 단백질이다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 발현 벡터에 있어서, 상기 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질은 신호 펩타이드가 뮤린(murine) 면역글로불린 κ 사슬 리더 서열(leader sequence)인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 재조합 단백질의 세포 외 분비능을 보다 향상시킬 수 있는 신호 펩타이드 또는 서열이면 그 종류에 제한없이 사용가능하다.
- [0021] 본 발명의 상기 뮤린 면역글로불린 κ 사슬 리더 서열은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 발현 벡터에 있어서, 상기 상기 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질을 코딩하는 유전자는, 표적하는 항원에 대해 결합력이 가장 우수한 VLRB 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있으며, 표적 항원으로 면역화된 먹장어의 VLRB cDNA 라이브러리로부터 유래할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 재조합 발현 벡터에 있어서, 상기 링커 서열은 시스테인 암호화 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 재조합 발현 벡터에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 도메인은 마우스 IgG 유래일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 면역글로불린 J 사슬은 인간 또는 마우스 IgM 유래일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0026] 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.
- [0027] 본 발명의 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질을 코딩하는 유전자, 면역글로불린 Fc 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 링커 서열, 면역글로불린 J 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 적당한 전사/

번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

- [0028] 상기 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다.
- [0029] 본 발명은 또한, 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0030] 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 대장균(*Escherichia coli*) Rosetta, 대장균 JM109, 대장균 BL21, 대장균 RR1, 대장균 LE392, 대장균 B, 대장균 X 1776, 대장균 Da, 대장균 W3110, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 쉐린겐시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 및 동물세포(예컨대, HEK(Human embryonic kidney) 293, CHO(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.
- [0032] 본 발명은 또한, 상기 숙주 세포에 의해 생산된, 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질; 면역글로불린 Fc 도메인; 링커; 및 면역글로불린 J 사슬이 순차적으로 연결된 융합 단백질을 제공한다.
- [0033] 본 발명에 따른 융합 단백질은 먹장어 유래 VLRB 단백질의 stalk 도메인의 C-말단에 마우스 IgG 유래의 Fc 도메인, 인간 또는 마우스 IgM 유래의 J 사슬이 순차적으로 연결된 융합 단백질로, 상기 Fc 도메인과 J 사슬은 시스템인 링커에 의해 연결된 융합 단백질이다.
- [0034] 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질이 자가조립에 의해 2합체 또는 4합체의 다량체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체를 제공한다. 본 발명의 다가 항체는, 표적 항원에 대한 결합능은 유지하면서 C-말단의 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 VLRB 단백질에, 면역글로불린의 Fc 도메인과 면역글로불린 유래 J 사슬이 순차적으로 연결되어 재조합된 융합 단백질의 2합체 또는 4합체 형태를 갖는 것을 특징으로 한다. 특히, 본 발명의 상기 다가 항체는 융합 단백질의 Fc 도메인과 J 사슬을 연결한 시스템인 링커가 반드시 포함된 융합 단백질의 다량체 형태일 때 표적 항원에 대한 결합능을 가지게 된다.
- [0035] 본 발명의 다가 항체는 먹장어 항체인 VLRB 단백질을 2개 혹은 4개 포함하고 있어, VLRB 단일체 항체 대비 항원 결합능이 현저히 증가된 다가 항체이다.
- [0036] 본 발명은 또한,
- [0037] (a) 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;
- [0038] (b) 상기 (a) 단계의 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- [0039] (c) 상기 (b) 단계의 배양한 숙주 세포 또는 이의 배양액으로부터 융합 단백질의 2합체 또는 4합체의 다량체를 수득하는 단계를 포함하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체의 제조방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 상기 다가 항체의 제조방법은 구체적으로, 면역원 또는 항원을 먹장어에 주사하여 면역화시키고, 면역화된 먹장어의 혈액을 채취하여 림프구를 분리하고, 림프구의 총 RNA를 추출하여 이를 기반으로 성숙한 VLRBs의 mRNA를 확보한 후, 이를 주형으로 중합효소연쇄반응을 수행하여 카복시 말단의 소수성 부위를 제외한 VLRBs의 cDNA 풀(pool)을 준비하였다. 상기과 같이 준비된 cDNA의 각 클론들을 뮤린(murine) 면역글로불린 κ 사슬 리더 서열(leader sequence), 마우스 IgG의 Fc 도메인 및 IgM의 J 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 있는 pmlg 벡터(도 2)로 클로닝하여 각기 다른 항원 인식 서열을 가진 먹장어 VLRBs를 포함하는 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터를 제작하였다. 그 후, 각 재조합 발현 벡터로 293-F 세포를 형질도입(transfection)시키고, 형질도입된 293-F 세포를 배양한 후, 배양액을 수득하여 면역원 또는 항원과의 반응성을 ELISA 실험을 통해 확인하였다. 최종적으로 면역원 또는 항원과의 결합력이 우수한 클론들을 선별하고, 선별된

클론들의 배양액을 비환원 및 환원 조건에서 웨스턴 블롯팅하여 융합단백질이 다량체로 형성된 것을 확인하였다. 상기 면역원 또는 항원은 이에 한정하지 않으나, 바이러스, 미생물 등일 수 있다.

[0041] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가 항체를 제공한다.

[0042] 본 발명의 상기 다가 항체는 먹장어 VLRB 단백질에서 표적 항원에 대한 결합능은 유지하면서 소수성 테일 도메인이 제거되고, 제거된 소수성 테일 도메인 위치에 마우스 IgG 유래의 Fc 도메인, 인간 또는 마우스 IgM 유래의 J 사슬이 순차적으로 연결된 융합 단백질이 2합체 또는 4합체의 다량체 형태로 이루어진 것으로, 표적 항원과 결합할 수 있는 먹장어 VLRB 단백질을 2개 또는 4개 포함하고 있어, 단일체에 비해 항원 결합능이 현저히 증가된 다가 항체이다.

[0043] 본 발명은 또한, 상기 다가 항체를 표적 항원 함유 의심 시료에 처리하여 표적 항원을 검출하는 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 표적 항원 검출 방법에서, 상기 항원은 이에 한정되지 않으나, 바이러스 또는 미생물일 수 있다.

[0045] 본 발명의 표적 항원 검출 방법에서, 상기 시료는 음식물, 물, 특정 또는 불특정 미생물을 포함하는 용액, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명의 표적 항원 검출 방법은 항원-항체 반응 방식으로 실시될 수 있다. 이 경우, 검출하고자 하는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 본 발명의 다가 항체를 이용하여 실시될 수 있다. 본 발명은 통상적인 면역분석 방법에 따라 실시하여 표적 항원 존재 여부를 검출하는데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 방법에 따라 실시할 수 있다.

[0047] 본 발명의 다가 항체와 표적 항원과의 결합체 검출은 간접(indirect) ELISA(direct enzyme linked immunosorbent assay) 또는 샌드위치(sandwich) ELISA 방법을 통해 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 간접 ELISA 방법 및 샌드위치-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 본 발명의 다가 항체의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다.

[0048] 또한, 본 발명은 상기 다가 항체를 유효성분으로 함유하는 표적 항원 검출용 조성물 및 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 표적 항원 검출용 키트를 제공한다.

[0049] 본 발명의 표적 항원 검출용 조성물은 표적 항원에 대한 결합능은 유지하면서 소수성 테일 도메인이 제거되고, 제거된 소수성 테일 도메인 위치에 마우스 IgG 유래의 Fc 도메인, 인간 또는 마우스 IgM 유래의 J 사슬이 순차적으로 연결된 융합 단백질이 다량체 형태로 이루어진 다가 항체를 유효성분으로 포함하고 있으며, 상기 검출용 조성물을 포함하는 본 발명의 키트는 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는 면역분석용 키트이며, 상기 면역분석용 키트는 직접-ELISA, 간접-ELISA, 샌드위치-ELISA, 단백질 마이크로어레이, 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay) 등일 수 있다.

[0050] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] **실시예 1. 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 VLRB의 융합 단백질 제조를 위한 재조합 발현 벡터 제작**

[0052] 먹장어의 야생형 VLRB 단백질은 C-말단에 강한 소수성 부위(HC)를 포함하고 있어(도 1) 인간 세포주 293을 통해 발현시키고자 할 때 발현율과 세포 외부로의 분비율이 현저히 감소한다. 이에 본 발명에서는 상기 소수성 부위(HC)를 결실시키고 마우스 항체의 Fc 부위(fragment crystallizable region)를 연결하여 VLRB의 다량체 융합 단백질화를 진행하였다.

[0053] 먼저, 다량체의 재조합 VLRB 단백질을 생산하기 위해 먹장어 유래 VLRB 유전자의 항원 결합부위로 알려진 LRRNT 부위부터 LRRCT 부위, 및 stalk 부분까지를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 증폭하여 인간 세포 발현용 벡터에 클로닝하여 pMono 벡터를 제작하였다. 그 후, 2합체의 재조합 VLRB 단백질을 생산하기 위해, 마우스 유래 IgG 항체의 Fc 부위와 인간 유래 IgM 항체의 J 사슬 부위를 PCR로 증폭하여 서로 연결하고, 연결된 유전자를 먹장어 VLRB 유전자의 3'-말단 부위에 연결되도록 인간 세포 발현용 벡터에 클로닝하여 벡터 pmIg J를 제작하였다. 또한 항체 Fc 부위 유래 2합체의 형성에 관여하는 이황화 결합을 보다 견고히 하기 위해 Fc 부위와 J 사슬 부위의 사이에 시스테인(Cys)을 첨가하여 제작된 벡터 pmIg CJ를 완성하였다. 4합체의 재조합 VLRB 단백질을 생산하기 위하여 마우스 유래 IgG 항체에서 Fc 부위와 IgM 항체에서 J 사슬 부위를 PCR로

증폭하고 이황화 결합을 보다 견고히 하기 위해 Fc 부위와 J 사슬 사이에 시스테인을 첨가한 후, 먹장어 VLRB 유전자의 3'-말단 부위에 연결되도록 인간 세포 발현용 벡터에 클로닝을 진행하여 4합체 생산을 위한 벡터 pmIg CJ_M을 제작하였다.

[0054] 제작된 벡터들은 각각 숙주세포로 형질도입(transfection) 되었으며 숙주세포로부터 생산된 다양한 종류의 재조합 VLRB 단백질의 세포 외부로의 분리를 위해 뮤린(murine) Ig κ 사슬을 신호 펩타이드로 사용하였고, 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP)을 리포터 유전자로 사용하였다.

[0055] 실시예 2. 재조합 융합 단백질의 발현 양상 분석

[0056] 발현벡터 pMono로부터 발현되는 단량체 재조합 단백질은 먹장어 유래 VLRB의 항원 결합부위로 알려진 LRRNT 부터 LRRCT 부위 및 stalk 부분까지를 포함하는 형태이다(도 3). 발현벡터 pmIg J로부터 발현되는 2합체 재조합 단백질인 mIg J는 먹장어 유래 VLRB의 LRRNT부터 stalk 부분을 포함하며, stalk의 C-말단 부위에 마우스 유래 IgG 항체의 Fc 부위와 인간 유래 IgM 항체의 J사슬 부위가 순차적으로 연결된 형태이다. 발현벡터 pmIg CJ로부터 발현되는 2합체 재조합 단백질인 mIg CJ는 같은 2합체 단백질인 mIg J에서 Fc 부위와 J사슬 부위 사이에 시스테인(Cys)이 첨가된 형태의 더욱 강력한 이황화결합을 형성하는 2합체 형태이다. 발현벡터 pmIg CJ_M으로부터 발현되는 4합체 재조합 단백질인 mIg CJ_M은 VLRB의 LRRNT 부터 stalk 부분을 포함하며, stalk의 C-말단 부위에 마우스 유래 IgG 항체의 Fc 부위와 마우스 유래 IgM의 J사슬, 그리고 Fc 부위와 J사슬 부위의 사이에 시스테인이 첨가된 형태의 융합 단백질로 발현된다(도 3).

[0057] 상기 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로 형질도입된 293-F 세포주의 배양상층액을 회수하여, 비환원(β-Mercaptoethanol 무처리) 또는 환원(β-Mercaptoethanol 처리) 조건에서 단백질 발현 형태를 확인하였다. 그 결과, 도 4에서 확인되는 것처럼, 비환원 조건(without β-ME)에서 Fc 부위와 J 사슬이 연결된 VLRB 융합 단백질들은 2합체 또는 4합체의 다량체 형태로 확인되었다. 단량체 형태의 재조합 단백질인 mono는 비환원 및 환원 조건 모두에서 40~43kDa 크기의 단량체로 확인되었으며, mIg J는 환원 조건(with β-ME)에서는 예상 분자량인 75~80kDa 크기의 밴드가 확인되었고, 비환원 조건에서는 예상 분자량인 150~160kDa보다는 큰 약 200kDa 크기의 밴드가 확인되었다. 이는 2합체 형성을 위한 이황화 결합 과정에서 진행된 재조합 단백질의 당화(glycosylation)으로 인한 분자량 상승으로 예상되었다. 이러한 현상은 mIg CJ 및 mIg CJ_M에서도 동일하게 확인되었다.

[0058] 실시예 3. 재조합 융합 단백질의 항원 결합능 분석

[0059] 본 발명자들의 이전 연구를 통해 검증된 조류인플루엔자 바이러스(AIV) 특이적 먹장어 VLRB 클론인 #94과 음성 대조군 클론인 #18의 서열을 이용하여, 마우스 항체 유래 Fc 부위 및 인간 또는 마우스 항체 유래 J 사슬이 연결된 본 발명의 VLRB 융합 단백질화를 진행하였다. 상기 두 가지 VLRB 클론을 이용하여 mono, mIg J, mIgCJ 및 mIg CJ_M의 4가지 융합 단백질을 생산하였고, AIV와의 반응성을 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)를 통해 측정하였다.

[0060] 간단하게, 표적 항원인 AIV와 음성 대조군으로 사용한 항원인 VHSV(바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스)를 96-웰 플레이트에 각각 코팅한 후 재조합 VLRB 융합 단백질을 처리하여 반응시켰다. 그 후 HRP가 컨쥬게이션 된 항-마우스 항체를 이용하여 발색시키고, 450nm에서 흡광도를 측정하여 융합 단백질의 항원에 대한 결합능 및 반응성을 특정하였다.

[0061] 그 결과, 음성 대조군 클론으로 사용된 #18의 VLRB 융합 단백질에서는 4가지 형태 모두에서 AIV 또는 VHSV에 대한 특이적인 반응이 전혀 확인되지 않았다. 반면 AIV 특이적 VLRB 클론인 #94를 이용한 융합 단백질의 경우 단량체 형태인 mono 94와 2합체 형태의 mIg J 94에서는 특이적 반응성을 나타내지 않았지만, 다른 2합체 형태인 mIg CJ 94와 2합체/4합체 형태의 mIg CJ_M 94에서는 표적 항원인 AIV에 대해 강한 반응성을 나타냈다(도 5). 특히 2합체/4합체 형태인 mIg CJ_M 94에서는 단량체나 2합체 형태에 비해 훨씬 높은 항원 결합능을 보여주었다.

[0062] AIV 특이적 VLRB 클론 #94 기반한 다량체 융합 단백질들의 반응성을 좀더 세밀하게 분석하기 위하여, AIV 항원의 다양한 농도를 코팅한 PVDF 멤브레인에 VLRB 융합 단백질을 처리하고, 이차 항체를 반응시켜 닷 블롯팅을 실시하였다. 상기 ELISA 결과와 마찬가지로 단량체 형태인 mono 94와 2합체 형태의 mIg J 94에서는 항원 특이적 반응성이 나타나지 않았지만 다른 2합체 형태인 mIg CJ 94와 2합체/4합체 형태의 mIg CJ_M 94는 100ng과 500ng의 AIV 항원에 대해 강한 반응성을 보여주었다. 특히 2합체/4합체 형태의 mIg CJ_M 94는 다른 형태의 VLRB 융합 단

백질에 비해 100ng의 항원에 대한 반응에서 강하게 확인되었다(도 6).

[0063]

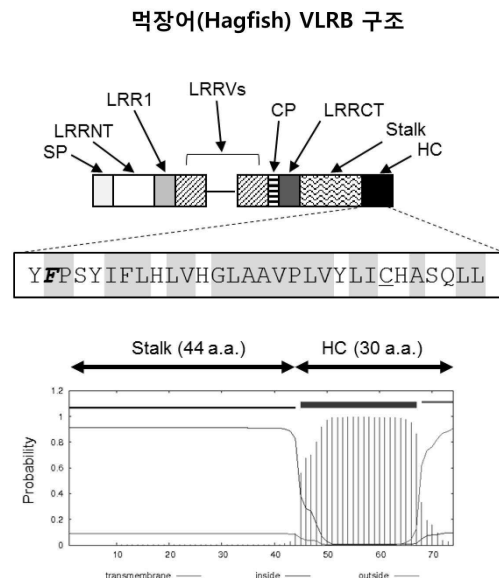
AIV 특이적 VLRB 클론인 #94을 포함하여 본 발명자들의 이전 연구를 통해 검증된 다른 AIV 특이적 VLRB 클론들을 이용하여 추가로 본 발명의 융합 단백질을 제조하였다. 도 7에서는 #94 클론을 포함하여 #261, #343, #279, #383 및 #662의 총 6개의 클론을 4가지 형태(mono, mIg J, mIgCJ, mIg CJ_M)의 융합 단백질로 생산하고 항원인 AIV와의 반응성을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 그 결과, #94, #261, #343 VLRB 클론을 이용한 경우 단량체 형태인 mono와 2합체 형태의 mIg J에서는 특이적 반응성을 나타내지 않았지만, 다른 2합체 형태인 mIg CJ와 2합체/4합체 형태의 mIg CJ_M에서는 강한 반응성을 나타내었으며, 특히 2합체/4합체 형태인 mIg CJ_M에서 가장 강력한 반응성을 나타내었다. 그 외, #279, #383 및 #662의 VLRB 클론을 이용한 융합 단백질의 경우 단량체 형태인 mono와 2합체 형태의 mIg J에서는 상기와 같이 특이적 반응성을 나타내지 않았지만 다른 2합체 형태인 mIg CJ와 2합체/4합체 형태의 mIg CJ_M에서는 #94, #261, #343 VLRB 클론 보다는 약하지만, AIV 항원에 대한 반응성을 약하게 보여주었다.

[0064]

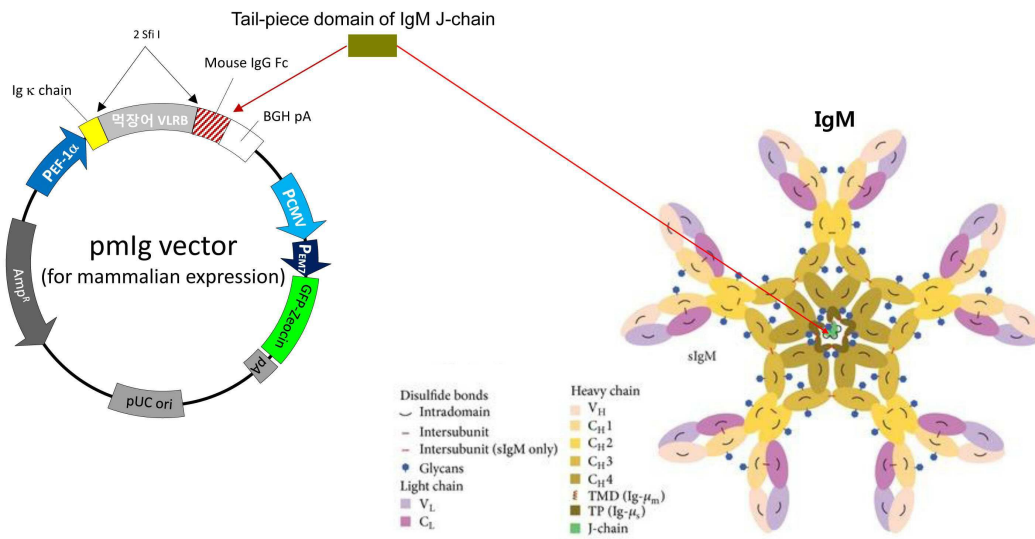
본 발명자들은 또한, 상기 ELISA 결과를 통하여 AIV에 대한 강력한 반응성을 나타낸 mIg CJ_M 94, mIg CJ_M 261, mIg CJ_M 343 단백질과, AIV에 대한 반응성이 거의 없는 mIg CJ_M 18 단백질(음성 대조군)을 이용하여 면역세포화학을 진행하여, 항원에 대한 결합능을 분석하였다. MDCK(Madin-Darby canine kidney) 세포에 AIV를 감염시키고, mIg CJ_M 형태의 VLRB 2합체/4합체 융합 단백질을 반응시킨 후, FITC(Fluorescein isothiocyanate)가 연결된 마우스 Fc 결합 항체를 반응시켜 형광 염색을 진행하였다. DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 이용한 핵 염색을 통하여 전반적인 세포 분포를 확인하였다. 음성 대조군으로 사용된 mIg CJ_M 18은 AIV에 감염된 MDCK 세포에 대하여 어떠한 반응성도 나타내지 않았지만, mIg CJ_M 94, mIg CJ_M 261 및 mIg CJ_M 343을 처리한 실험군에서는 모두 강력한 형광이 확인되었다(도 8). 상기의 결과를 통해 AIV 특이적 클론인 #94, #261 및 #343 VLRB를 이용한 mIg CJ_M 94, mIg CJ_M 261 및 mIg CJ_M 343의 2합체/4합체 융합 단백질은 표적 항원에 대한 높은 결합능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

도면

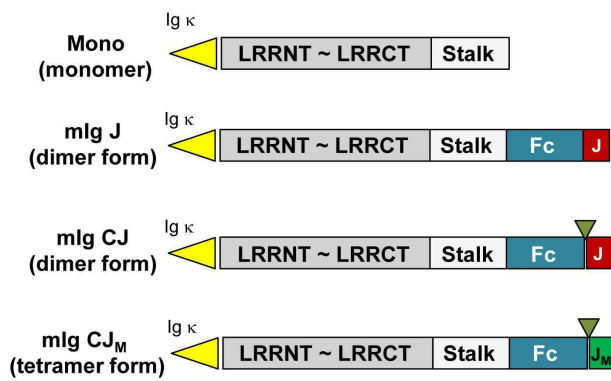
도면1



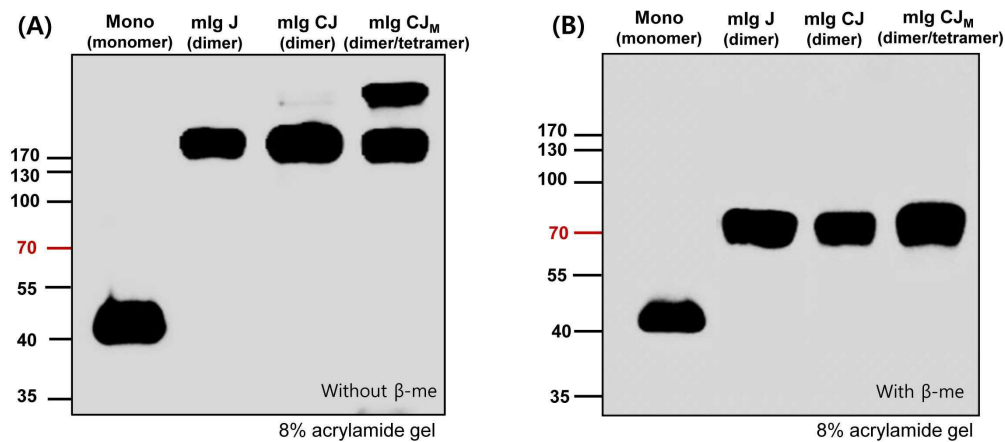
도면2



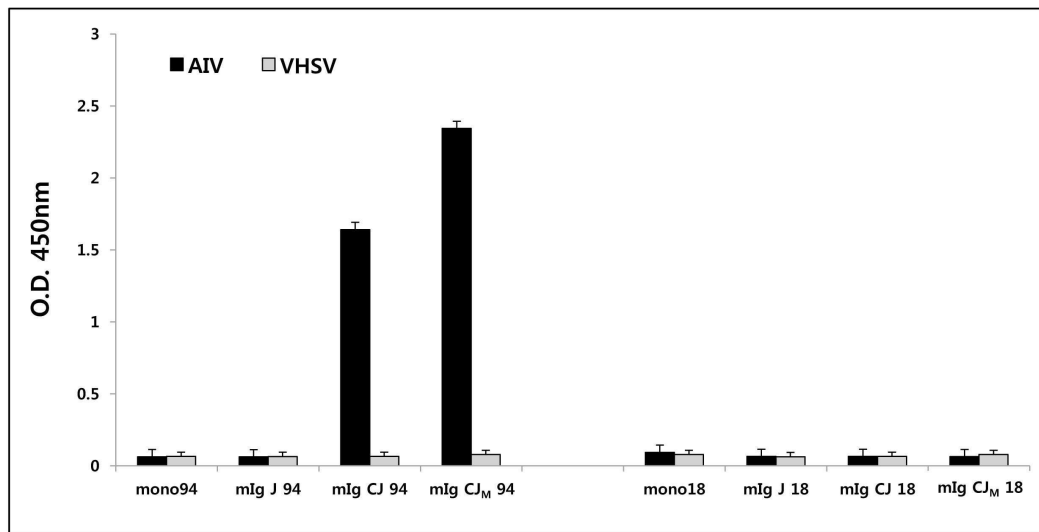
도면3



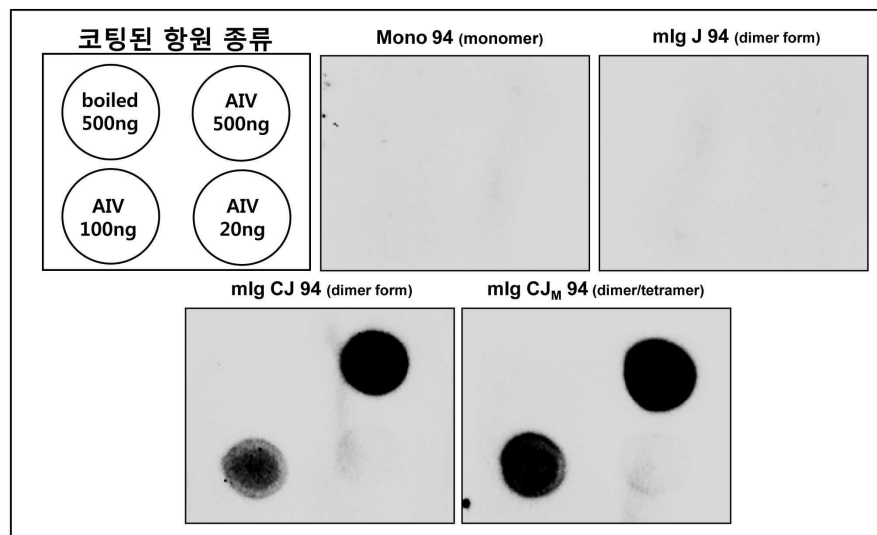
도면4



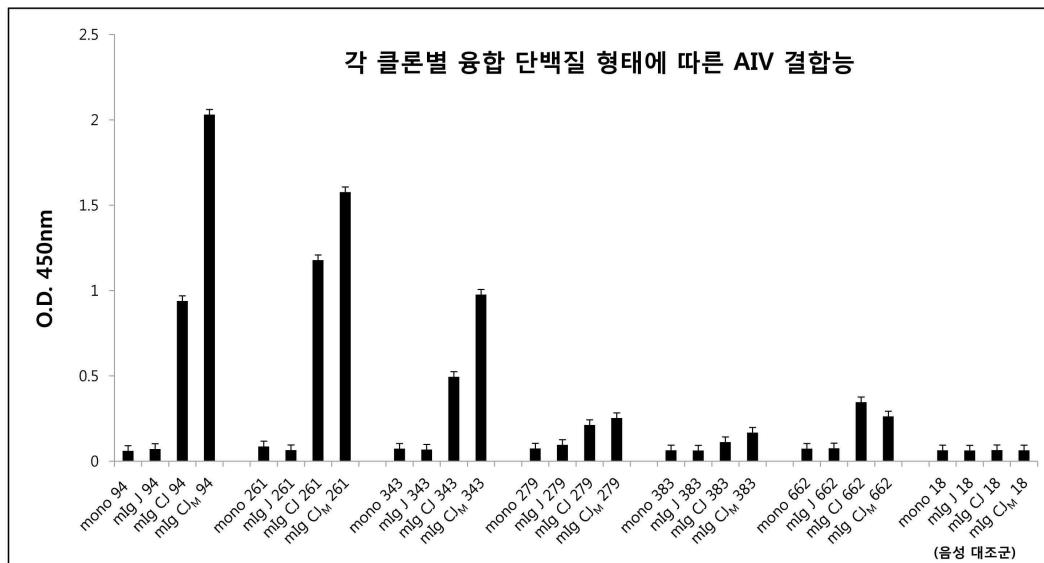
도면5



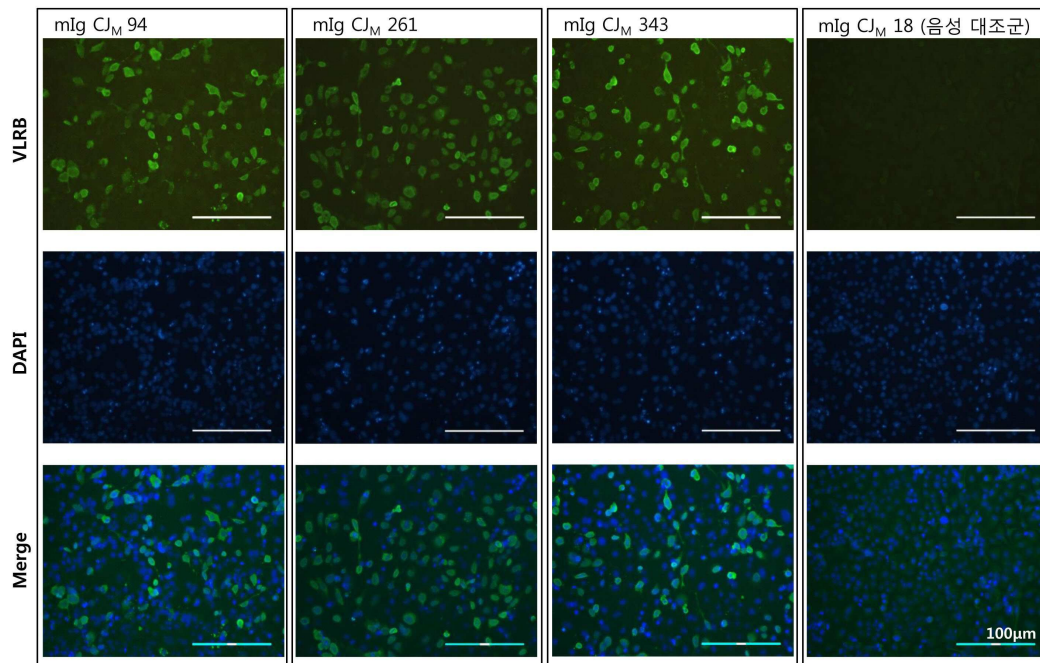
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
IMMUCELL CO., LTD.
- <120> Fusion protein comprising Fc domain from mouse antibody linked to hagfish VLRB protein with deleted hydrophobic tail domain and uses thereof
- <130> PN17037

<160> 4
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 1
 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gac 63

<210> 2
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 1 5 10 15
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 20 25 30
 Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 35 40 45
 Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 50 55 60
 Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 65 70 75 80
 Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 85 90 95
 Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110
 Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 115 120 125
 Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 130 135 140

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 145 150 155 160
 Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
 165 170 175
 Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
 180 185 190
 Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His

 195 200 205
 Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Thr Ser Pro Pro Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Tyr
 20

<210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4

Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Ile Met Ser Asp Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Cys Tyr