



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년11월01일
 (11) 등록번호 10-0772800
 (24) 등록일자 2007년10월26일

(51) Int. Cl.

C12N 15/28(2006.01) *C07K 16/18*(2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-0080950

(22) 출원일자 2003년11월17일

심사청구일자 2005년12월28일

(65) 공개번호 10-2005-0047182

공개일자 2005년05월20일

(56) 선행기술조사문헌

US 6509105 B1

KR100231090 B1

(73) 특허권자

주식회사유한양행

서울 동작구 대방동 49-6

(72) 발명자

강희일

서울특별시양천구신정3동현대6차A107-2001

교인영

경기도안양시동안구호계동무궁화한양아파트110-1201

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김정희

(54) 인간 종양괴사인자 α 를 인식하는 단일클론항체의가변영역 및 이를 코딩하는 유전자

(57) 요약

본 발명은 인간 종양괴사인자 알파 (human tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체의 가변영역 및 이를 코딩하는 유전자, 이 유전자가 삽입된 재조합 벡터 및 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

(72) 발명자

송무영

경기도수원시팔달구매탄동1230원천1
단지주공아파트105-405

김창석

경기도수원시장안구화서동684-2꽃피버들마을신동아
아파트112-2103

박상구

경기도수원시팔달구원천동원천삼성1차아파트6-601

이재선

경기도수원시팔달구원천동원천삼성1차아파트6-1503

유태형

서울특별시노원구상계10동주공아파트905동1207호

나강인

경기도수원시권선구서둔동110-5번지2층201호

특허청구의 범위

청구항 1

상보성 결정부위 CDR1, CDR2 및 CDR3 가 각각 서열번호 9, 10 및 11의 아미노산 서열을 갖는 인간 종양괴사인자 α (human tumor necrosis factor- α , hTNF α)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체의 중쇄 가변영역.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역.

청구항 3

제2항의 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 5의 cDNA 유전자.

청구항 4

상보성 결정부위 CDR1, CDR2 및 CDR3 가 각각 서열번호 12, 13 및 14의 아미노산 서열을 갖는 인간 종양괴사인자 α (human tumor necrosis factor- α , hTNF α)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체의 경쇄 가변영역.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역.

청구항 6

제5항의 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 6의 cDNA 유전자.

청구항 7

제2항에 따른 중쇄 가변영역이 삽입된 재조합백터 pTSK11-Hv.

청구항 8

제5항에 따른 경쇄 가변영역이 삽입된 재조합백터 pTSK11-Lv.

청구항 9

재조합백터 pTSK11-Hv로 형질전환된 형질전환체 *E.coli* TOP10F / pTSK11-Hv (수탁번호 : KCTC 10514BP).

청구항 10

재조합백터 pTSK11-Lv로 형질전환된 형질전환체 *E.coli* TOP10F / pTSK11-Lv (수탁번호 : KCTC 10515BP).

청구항 11

상보성 결정부위 CDR1, CDR2 및 CDR3 가 각각 서열번호 9, 10 및 11의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역과 서열번호 12, 13 및 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 인간 종양괴사인자 α (human tumor necrosis factor- α , hTNF α)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체.

청구항 12

제11항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 단일클론항체.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <1> 본 발명은 인간 종양괴사인자 α (human tumor necrosis factor-α, hTNF α)에 특이적으로 결합하는 단일클론항체의 가변영역 및 이를 코딩하는 유전자, 이 유전자가 삽입된 재조합 벡터, 및 이 재조합벡터로 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다.
- <2> hTNF α는 약 17 kDa 단백질 서브유닛 3개로 구성된 삼량체(Trimer)의 구조를 가지며(Eck MJ et al., JBC 267, 2119-2122, 1992, Smith RA et al., JBC 262, 6951-6954, 1987), 염증성 대식세포와 단핵구 등으로부터 분비되는 염증성 사이토카인(cytokine)으로서 급성염증 또는 세포의 괴사와 세포자멸 등의 세포 반응에 있어 신호 전달자로 작용한다(Beyaert R et al., FEBS Lett 340, 9-16, 1994). hTNF α의 염증성 작용에 의한 조직파괴로는 예를 들어 연골 및 뼈의 분해(Saklatvala, Nature 322: 547-549, 1986), 호중구 및 림프구의 접착 증가(Pober et al., K. Immunol. 138: 3319, 1987) 등을 초래한다. 또한 hTNF α는 감염과 종양에 대한 방어기전에도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Fiers W, FEBS Lett 285, 199-212, 1991).
- <3> hTNF α가 관여하는 질환으로는 염증성 질환, 자가면역질환, 박테리아 등의 감염, 암 및 퇴행성 질환 등이다. 이 중에서 류마티스성 관절염 및 크론병에서 특정 생리학적 치료의 유용한 타겟이 되고 있다.
- <4> 한편, hTNF α 억제제를 이용한 류마티스성 관절염 치료의 가능성이 1990년을 전후하여 시사된 바 있다. 초기 류마티스성 관절로부터 얻어진 활액세포로부터 hTNF α의 과발현을 관찰되었고(Buchan G et al., Clin Exp Immunol 73, 449-455, 1988), 위 조건의 세포에 항 hTNF α 단일클론 항체를 처리한 결과 류마티스성 관절염의 병변과 관련된 사이토카인의 감소가 관찰되었다(Butler DM et al., Eur Cytokine Netw 6, 225-230, 1995). 콜라겐으로 유도된 마우스의 관절염 질환 모델에서도 항 hTNF α 항체 또는 수용성 hTNF α 수용체가 관절의 염증과 손상을 억제하는 결과도 보고되었다(Wpiquet PF et al., Immunology 77, 510-514, 1992, Wooley PH et al., J Immunol 151, 6602-6607, 1993, Williams RO et al., Immunology 84, 433-439, 1995). 또한, hTNF α가 과발현되도록 형질전환된 마우스에서도 염증을 동반한 관절염이 유도되는 결과가 보고되었다(Keffer J et al., EMBO J 10, 4025-4031, 1991).
- <5> 이러한 결과들을 고찰하여 볼 때, hTNF α는 관절염에 있어서 염증성 사이토카인을 조절하는 직접적인 상위 조절자로서 혹은 간접적인 조절자로서 중요한 역할을 담당한다는 것을 알 수 있다. 따라서 hTNF α에 대한 높은 선택성과 반응성을 갖는 항체의 개발이 류마티스성 관절염의 치료 등을 위해 당업계에 요구된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <6> 본 발명은 상기 선행기술을 바탕으로 이루어진 것으로, 본 발명자들은 hTNF α를 특이적으로 인식할 수 있을 뿐 아니라 그 결합력도 매우 우수한 단일클론항체를 검색 및 선별함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- <7> 따라서, 본 발명은 hTNF α를 특이적으로 인식할 수 있는 단일클론항체의 가변영역(variable region)을 코딩하는 유전자를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <8> 또한, 본 발명은 상기 유전자가 삽입된 재조합벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <9> 또한, 본 발명은 상기 재조합벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <10> 또한, 본 발명은 상기 단일클론항체의 가변영역을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

- <11> 본 발명은 hTNF α를 특이적으로 인식하고 결합하는 단일클론항체의 가변영역을 코딩하는 유전자를 포함한다.
- <12> 본 발명자들은 재조합 hTNF α(Biosource PHC3011, 벨기에)를 마우스에 면역시키고, 이들로부터 분리한 비장세포를 혈구암세포(Sp2/0-Ag14, ATCC CRL1581)와 접합(fusion)시켜 다수의 혼성화 세포(hybridized cells)를 제조한 후, 이들을 배양하여 다수의 단일클론항체를 얻었다. 본 발명자들은 얻어진 단일클론항체들 중 hTNF α에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 선별하여, hTNF α에 특이적으로 결합할 뿐 아니라, 그 결합력이 매우 우수한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주(TSK11)를 얻었다.
- <13> 본 발명자들은 상기 하이브리도마 세포주로부터 RNA를 추출하여 중쇄 및 경쇄 유전자의 cDNA를 합성한 후, 이를 주형으로 하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하여 서열번호 5의 염기서열을 포함

하는 약 470bp의 중쇄 cDNA 유전자 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 450bp의 경쇄 cDNA 유전자를 분리하였다.

- <14> 상기 단일클론항체의 중쇄 및 경쇄의 가변영역 중 항원을 인식하는 CDRs(complementarity determining regions) 잔기를 분석한 결과, 중쇄의 경우 31-35, 50-66, 및 99-106 위치로서 각각의 서열은 서열번호 9, 10, 및 11의 폴리펩타이드이였으며, 경쇄의 경우 24-35, 51-57, 및 90-98 위치로서 각각의 서열은 서열번호 12, 13, 및 14의 폴리펩타이드이었다.
- <15> 따라서, 본 발명은 hTNF α에 특이적으로 결합하는 단일클론항체의 중쇄 가변영역을 코딩하는 cDNA 유전자로서, 서열번호 9, 10 및 11의 폴리펩타이드를 포함하는 중쇄 가변영역을 코딩하는 cDNA 유전자를 포함한다. 또한, 본 발명은 서열번호 7의 중쇄 가변영역을 코딩하는 cDNA 유전자를 포함하여 특히, 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 cDNA 유전자를 포함한다.
- <16> 또한, 본 발명은 hTNF α에 특이적으로 결합하는 단일클론항체의 경쇄 가변영역을 코딩하는 cDNA 유전자로서, 서열번호 12, 13 및 14의 폴리펩타이드를 포함하는 경쇄 가변영역을 코딩하는 cDNA 유전자를 포함한다. 또한, 본 발명은 서열번호 8의 경쇄 가변영역을 코딩하는 cDNA 유전자를 포함하며 특히, 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 cDNA 유전자를 포함한다.
- <17> 상기 단일클론항체의 가변영역을 코딩하는 중쇄 또는 경쇄의 cDNA 유전자는 예를 들어, 플라스미드 벡터 pCR2.1-TOPO(인비트로젠사, 미국)등의 플라스미드 벡터에 삽입하여 재조합벡터를 제조할 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 중쇄의 가변영역을 코딩하는 cDNA 유전자가 삽입된 재조합벡터 pTSK11-Hv 및 상기 경쇄의 가변영역을 코딩하는 cDNA 유전자가 삽입된 재조합벡터 pTSK11-Lv를 포함한다.
- <18> 상기 재조합 벡터 pTSK11-Hv 또는 pTSK11-Lv는 예를들어, *E. coli* TOP10F 등의 대장균을 형질전환시켜 형질전환체를 제조할 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 pTSK11-Hv 또는 pTSK11-Lv로 각각 형질전환된 대장균 형질전환체 *E. coli* TOP10F / pTSK11-Hv(수탁번호 : KCTC 10514BP) 또는 *E. coli* TOP10F / pTSK11-Lv (수탁번호 : KCTC 10515BP)를 포함한다.
- <19> 상기 형질전환체로부터 재조합벡터의 회수는 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를들어 알칼리를 이용한 회수 방법(J. Sambrook et al., Molecular cloning, Vol. 1, 1.25-1.28)을 사용할 수 있다. 즉, 용액1 (50mM 글루코오스, 25mM 트리스·염산, 10mM .E.D.T.A)을 넣어 형질전환체의 세포막을 약화시킨 다음, 용액2 (0.2N NaOH, 1% SDS)를 넣어 세포막을 파괴하고 세포의 구성성분인 단백질 및 염색체를 변성시킨 후, 용액3 (5M 포타슘 아세테이트, 아세트산)을 넣어 재조합벡터를 제외한 다른 성분을 응집시킨 다음, 원심분리하여 재조합벡터층을 분리한 후, 에탄올을 가하여 재조합벡터만을 침전시킴으로써 재조합벡터를 회수할 수 있다.
- <20> 본 발명은 서열번호 9, 10, 및 11의 폴리펩타이드를 포함하는 중쇄 및 서열번호 12, 13, 및 14의 폴리펩타이드를 포함하는 경쇄로 이루어진 단일클론항체의 가변영역을 포함하며, 더욱 바람직하게는 상기 중쇄의 가변영역이 서열번호 7의 서열을 갖고, 경쇄의 가변영역의 서열번호 8의 서열을 갖는 단일클론항체의 가변영역을 포함한다.
- <21> 상기한 본 발명에 따른 단일클론항체의 가변영역을 코딩하는 cDNA 유전자로부터 hTNF α에 직접 결합하는 CDR 영역, 즉 중쇄의 경우 서열번호 9, 10, 및 11의 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자, 경쇄의 경우 서열번호 12, 13, 14의 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 인간의 항체 유전자에 융합시키거나, 본 발명에 따른 단일클론항체의 가변영역을 코딩하는 유전자를 인간 항체의 가변영역과 치환시킴으로서 면역반응 유발의 문제점이 없는 hTNF α에 대한 단일클론항체를 얻을 수 있다.
- <22> 상기한 바와 같이 본 발명에 따른 hTNF α에 대한 단일클론항체의 가변영역을 코딩하는 유전자는 hTNF α에 특이적으로 작용하므로, 효과적으로 hTNF α를 중화 및 제거할 수 있다.
- <23> 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이것이 본 발명을 제한하는 것은 아니다.
- <24> 실시예 1. hTNF α의 마우스 면역
- <25> hTNF α의 마우스 면역을 위하여 재조합 hTNF α (Biosource PHC3011, 벨기에) 30 μg 이 희석된 인산염 완충액 식염수(Phosphate buffered saline, 이하 PBS) 150 μl 와 동량의 완전 프론즈 어쥬번트(complete Freund's adjuvant, Sigma F5881, 미국)를 섞어 유회시킨 혼합액 300 μl를 6 주령의 웅성 Balb/c 마우스의 복강에 1차 주사하였다. 2주일 후, 30 μg 의 재조합 hTNF α를 동량의 불완전 프론즈 어쥬번트 (incomplete Freund's

adjuvant, Sigma F5506, 미국)와 섞어 유화시킨 혼합액 300 μl 를 복강 내로 2차 주입하였다. 3차는 2차 주사 2주일 후, 30 μg 의 재조합 hTNF α 를 150 μl 의 PBS에 용해시켜 꼬리정맥을 통해 주사하였다. 4차는 3차 주사 10 일 후, hTNF α /PBS용액을 꼬리정맥을 통해 주사하였다.

<26> 실시에 2. hTNF α 로 면역된 마우스의 비장세포 융합

<27> 실시예 1에서 얻은 면역된 마우스를 탄산가스 질식사 시킨 다음, 비장을 획득하였다. 얻어진 마우스의 비장으로 부터 비장 세포들을 각각 분리한 뒤, Sp2/0 (ATCC CRL1581) 세포와 10:1의 비율로 섞어 융합시켰다. 세포의 융합은 미리 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 준비된 50% 폴리에틸렌글리콜 (Polyethylene glycol 1500, Roche 783641) 1 ml 을 비장세포 와 Sp2/0세포 혼합물에 첨가하였다. 융합시킨 세포는 배지[20% 소 태아혈청(FBS, JRH, 12-10678P), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 겐타마이신(Gentamicin, Gibco-BRL, 15750-060), 1x DMEM (JRH, 56499-10L), 1x HAT supplement(0.1mM Sodium hypoxanthine, 0.4uM Aminopterin, 16uM thymidin, Gibco-BRL, 31062-037)]에 희석한 뒤 1.1×10^5 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트(Nunc, 469949, 덴마크)에 분주하였다. 융합세포가 분주된 플레이트는 5% 이산화 탄소가 공급되는 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기(humidified CO₂ incubator)에서 2-3주 동안 배양하였다.

<28> 실시에 3. 항 hTNF α 항체를 생산하는 세포주 검색 및 클로닝

<29> 각 웰(well)에 분주된 융합 세포가 집락을 형성하는 것을 관찰한 뒤 집락이 형성된 웰의 상층액을 수집하였으며, 항체의 생성여부는 효소면역방법을 이용하여 확인하였다. 항체의 효소면역 측정을 위하여 플레이트 각 웰에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 재조합 hTNF α 를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 반응시켜 코팅한 다음 0.5% 카세인-PBS 용액 200 μl 를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 세포 상층액 100 μl 를 첨가하여 2시간동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시킨 다음, 서양 고추냉이 페옥시데이즈(horseradish peroxidase)가 표지된 산양 항 마우스 면역글로블린 지 (Goat anti-mouse IgG-HRP, Bio-rad, 170-6516)를 1,000배 희석하여 100 μl 씩 가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 각 웰에 서양 고추냉이 페옥시데이즈 기질 용액(Horseradish peroxidase substrate kit, Bio-rad, 172-1064)을 100 μl 씩 가하여 상온에서 3분 동안 발색시킨 다음, 엘리자 리더(ELISA reader, 다이나텍사, 미국)를 이용하여 410nm 의 파장에서 광학밀도(optical density, OD)를 측정하였다.

<30> 실시에 4. 항 hTNF α 항체를 생산하는 세포주 선별

<31> 실시예 3을 통하여 재조합 hTNF α 에 대해 광학밀도 값이 대조양성혈액(hTNF α 로 면역시킨 마우스 혈액) 보다 높은 9종의 세포주를 얻었고, 이 중에서 가장 광학밀도가 높은 TSK11을 최종 항체 생산 세포주로 선정하였다.

<32> 실시에 5. 하이브리도마 세포주(TSK11)로부터 얻어진 단일클론항체의 아이소타이핑

<33> 실시예 4에서 선정된 TSK11 유래 항체에 대한 아이소타입(Isotype)은 상기 효소면역 측정법과 유사한 방법을 통해 결정되었다. 이를 위해 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 TSK11 유래 항체를 마이크로 플레이트 각 웰에 100 μl 씩 반응시켜 코팅한 다음, 각 웰에 마우스 모노항체 아이디 키트 (Mouse MonoAb ID kit HRP, Zymed, 90-6550) 용액 100 μl 를 가하여 상온에서 3분 동안 발색시킨 다음, 엘리자 리더(ELISA reader, 다이나텍사, 미국)를 이용하여 410nm의 파장에서 광학밀도(optical density, OD)를 측정하였다.

<34> 상기 측정된 흡광도로부터 TSK11 유래 항체 중쇄는 IgG1 타입이며 경쇄는 카파타입으로 결정되었다.

<35> 실시에 6. 하이브리도마 세포주(TSK11)로부터 얻어진 단일클론항체의 결합친화도

<36> hTNF α 에 대한 TSK11 유래 항체의 결합력은 효소 면역 측정법(ELISA assay)을 사용하여 결정하였다. 이를 위해 마이크로 플레이트 각 웰에 재조합 hTNF α 를 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 100 μl 씩 넣어 코팅하였다. 다음으로 마이크로 튜브(AXYGEN 사, 미국)에 재조합 hTNF α 농도가 5×10^{-9} M 에서 1×10^{-10} M 이 되도록 0.02% 소 혈청 알부민이 첨가된 PBS 용액을 이용하여 희석한 다음 TSK11 유래 항체 30 ng을 튜브에 넣고 2시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응 시켰다. 그 후, 반응액을 hTNF α 가 코팅된 플레이트에 넣어 2시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시켰다. 그 후, 각 웰에 서양

고추냉이 페옥시데이즈 기질 용액(Horseradish peroxidase substrate kit, Bio-rad, 172-1064)을 100 μ l씩 가하여 상온에서 3분 동안 발색시킨 다음, 엘리자 리더(ELISA reader, 다이나텍사, 미국)를 이용하여 410nm 의 파장에서 광학밀도(optical density, OD)를 측정하였다.

<37> 상기와 같이 측정된 흡광도로부터 항원에 결합한 항체와 결합하지 않은 항체의 농도를 환산하여 항체의 항원에 대한 친화도를 측정하였으며(Friguet B. et al., J of Immunological Method 77, 305-319, 1985), 그 결과 TSK11유래의 항체는 1.95×10^{-9} M의 결합 친화도를 가진 것으로 측정되었다.

<38> 실시에 7. 세포주(TSK11)로부터 RNA의 분리 및 그의 cDNA의 합성

<39> 1×10^8 개의 세포주(TSK11)를 알엔이지 키트(RNeasy kit, QIAGEN, 미국)을 이용하여 전체 핵산으로부터 RNA 만을 순수 정제하였다. 전체 cDNA 합성은 써모트랜스크립트 키트(Termotranscript Kit, GibcoBRL, 미국)를 사용하였다. 우선, 추출한 RNA 5 μ g을 주형으로 하여, 0.5ng의 올리고 디티(Oligo d(T)) 1 μ l 를 멸균 증류수에 섞어 전체 부피가 10 μ l 되게 한다. 65 $^{\circ}$ C에서 약 5분간 방치하여 RNA를 변성(denaturation)시키고, 상온까지 반응온도를 떨어뜨려 프라이머 어닐링(primer annealing)이 가능하도록 하였다. cDNA 합성은 역전사 효소(reverse transcriptase, 1unit/ μ l) 1 μ l, 디티티(DTT, 0.1M) 2.5 μ l, 디엔티피(dNTP, 10mM) 2.5 μ l, RNA 분해효소 억제제(RNase inhibitor, 1unit/ μ l) 1 μ l, 및 멸균 증류수를 넣어 전체 부피가 25 μ l 가 되도록 한 다음 50 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 불활성화 시켰다.

<40> 합성된 cDNA 2 μ g을 주형으로 하여, 중쇄의 경우 서열번호 1 및 2의 DNA 올리고머를 각각 프라이머로 사용하고, 경쇄의 경우 서열번호 3 및 4의 DNA 올리고머를 각각 프라이머로 사용하였고, PCR(polymerase chain reaction)은 앰플리타 골드 중합효소(AmpliTaq Gold polymerase, 퍼킨엘머 바이오 시스템사, 미국, 5unit/ μ l) 0.5 μ l, 디엔티피(dNTP, 10mM) 1 μ l, 마그네슘 클로라이드(MgCl₂, 25mM) 5 μ l 및 멸균증류수를 넣어 전체 부피가 50 μ l 가 되도록 한 다음 첫번째 단계에서는 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 1회 수행하였고, 두번째 단계에서는 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분의 반응조건으로 30회를 수행하였으며, 세번째 단계에서는 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 10분의 조건으로 1회 실행하였다.

<41> 증폭된 PCR 산물에 대하여 1.5% 아가로스 젤 전기영동을 수행하였으며, 0.5 μ g/ml 농도의 에티듐 브로마이드(ethidium bromide) 용액 100 ml 에서 20분간 염색한 다음, 100bp 표준 DNA(라이프테크놀로지사, 미국)를 기준으로 중쇄의 경우 470bp, 경쇄의 경우 450bp의 위치에 증폭된 유전자 단편의 존재를 확인하였다.

<42> 실시에 8. cDNA 유전자의 클로닝

<43> 실시에 7에서 470bp의 중쇄 유전자 단편을 포함한 아가로스 젤 부위를 절단하고 퀴아릭 젤 추출키트(QIAquick Gel Extraction kit, QIAGEN, 미국)을 이용하여 470bp 유전자 단편을 회수하였다. 정제된 유전자 단편을 pCR2.1-TOPO 벡터(인비트로젠사, 미국)에 서브클로닝한 후, 대장균 TOP10F (인비트로젠, 미국)를 형질전환시킴(Cohen, S. N. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2110, 1972) 형질전환체를 얻었다. 얻은 형질전환체를 100 μ g/ml의 앰피실린이 함유된 LB 배지에서 하룻밤 배양한 뒤 플라스미드를 회수한 다음, 제한효소 EcoR I (바이오랩사, 미국)으로 절단하여 상기 470bp 크기의 유전자 단편이 삽입된 클론 TSK11-Hv를 얻었다.

<44> 실시에 7에서 얻어진 450bp 경쇄 유전자 단편에 대하여도 상기와 동일한 과정을 수행하여 재조합벡터를 얻었으며, 재조합벡터로 대장균 TOP10F (인비트로젠, 미국)를 형질전환시킴 형질전환체를 얻었다. 얻은 형질전환체를 100 μ g/ml의 앰피실린이 함유된 LB 배지에서 하룻밤 배양한 뒤 플라스미드를 회수한 다음, 제한효소 EcoR I (바이오랩사, 미국)으로 절단하여 상기 450bp 크기의 유전자 단편이 삽입된 클론 TSK11-Lv를 얻었다.

<45> 실시에 9. cDNA의 염기 서열 분석

<46> 상기 각 클론의 염기서열 분석은 각 클론의 플라스미드를 위저드 플러스 DNA 정제시스템(Wizard plus SV Minipreps DNA Purification System, 프로메가, 미국)을 이용하여 순수 정제한 후, 바이오넥스(한국) 및 바이오니아(한국)등 두 곳의 염기서열 분석 회사에 의뢰하여 분석하였다.

<47> 분석 결과, 얻어진 중쇄 가변영역의 염기서열 및 아미노산 서열은 서열번호 5 및 7과 같았다. 중쇄의 3가지 클

론들(TSK11Hv1, TSK11Hv2 및 TSK11Hv3)의 염기서열이 모두 같았으며, 이 클론에서 분리한 플라스미드 벡터를 pTSK11-Hv라 명명하였다. 또한 이 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 형질전환체를 *E.coli* TOP10F/ pTSK11-Hv라 명명하였으며, 2003년 8월 26일 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행에 기탁을 완료하였다.(기탁번호 : KCTC 10514BP)

<48> 경쇄도 동일한 방법으로 염기서열을 분석한 결과, 얻어진 경쇄 가변영역의 염기서열 및 아미노산 서열은 서열번호 6 및 8과 같았다. 2가지 클론들 (TSK11Lv1, TSK11Lv2)의 염기 서열이 모두 같았으며, 이 클론에서 분리한 플라스미드 벡터를 pTSK11-Lv라 명명하였고, 이 재조합벡터로 형질전환된 대장균 형질전환체를 *E.coli* TOP10F/ pTSK11-Lv라 명명하였으며, 2003년 8월 26일 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행에 기탁을 완료하였다 (기탁번호 : KCTC 10515BP).

<49> 세포주(TSK11)로부터 얻은 단일클론항체의 가변영역에 대한 아미노산 서열분석(Harris. L. et al., Protein Sci. 4, 306-310, 1995. ; Kabat. E. A. et al., Sequence of proteins of immunological interest. 5th Ed., 1991. ; Williams A.F.et al., Annu. Rev. Immunol. 6, 381-406, 1988) 결과, 경쇄의 경우 카파 6 계열($\kappa 6$)서브그룹에 속하였고, 중쇄의 경우 Kabat이 정의한 11 그룹 이외의 기타 그룹(miscellaneous group) 으로 밝혀졌다.

<50> 가변영역 중에서 항원을 인식하는 CDR 잔기로는 중쇄의 경우 CDR1은 31-35(서열번호 9), CDR2는 50-66(서열번호 10), CDR3는 99-106(서열번호 11)에 해당하였으며, 경쇄의 경우 CDR1은 24-35(서열번호 12), CDR2은 51-57(서열번호 13), CDR3는 90-98(서열번호 14)에 해당하였다.

발명의 효과

<51> 본 발명에 따른 hTNF α 에 대한 단일클론항체의 가변영역을 코딩하는 유전자는 높은 결합력으로 hTNF α 를 특이적으로 인식할 수 있는 키메라 또는 인간화 항체를 제조하는데 사용될 수 있다.

서열 목록

<110> YUHAN CORPORATION

<120> A VARIABLE REGION OF THE MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST A HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA AND A GENE ENCODING THE SAME

<160> 14

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 1

actagtcgac atggccttggg tgtggaactt gccattcct

39

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2
 cccaagcttc caggggccag gggatagacg ggtgg 35

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3
 actagtcgac atggatttac aagtgcagat tttcagctt 39

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4
 cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga 30

<210> 5

<211> 351

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5
 caggtccagt tggatgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg ctcttgata taccttcaca cactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120
 ccaggagagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacca aacttgaga gccaagatat 180
 gatgaagagt tcaagggacg gtttgcttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240
 ttacagatca acaacctcag acgtgaggac acggctacat atttctgtgc aagatatgat 300
 tccaggggat ttgactgctg gggccaaggc accactctca cagtctctc a 351

<210> 6

<211> 327

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 6

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga acgggtcacc 60
 atgacctgca ctgccagctc aagtataagt tacaattact ttcactggta tcagcagagg 120
 ccaggatcct cccccaaact ctggatttat agctcatcca atctggcttc tggagtccca 180
 cctcgcatca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 240
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccac cagtatgagc gttccccgtg gacgttcggt 300
 ggaggcacca agctggaaat caaacgg 327

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Arg Tyr Asp Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Arg Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Ser Arg Gly Phe Asp Cys Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 8

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Asn
 20 25 30

Tyr Phe His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Ile Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Glu Arg Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 9

His Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 10

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Arg Tyr Asp Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 11

Tyr Asp Ser Arg Gly Phe Asp Cys
 1 5

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 12

Thr Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Asn Tyr Phe His
1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 13

Ser Ser Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 14

His Gln Tyr Glu Arg Ser Pro Trp Thr
1 5