



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월04일
(11) 등록번호 10-2198342
(24) 등록일자 2020년12월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6854 (2013.01)
G01N 33/53 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2019-0059783
- (22) 출원일자 2019년05월22일
심사청구일자 2019년05월22일
- (65) 공개번호 10-2020-0134400
- (43) 공개일자 2020년12월02일
- (56) 선행기술조사문헌

- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
변재철
서울특별시 서초구 잠원로 46-38, 101동 301호(잠원동, 브라운스톤잠원)
- (74) 대리인
김권석

Ji-Hong Bong et al., 'Fluorescence immunoassay of E. coli using anti-lipopolysaccharide antibodies isolated from human serum', Biosensors and Bioelectronics, (2018.11.), Vol. 126, pp 518-528. 1부.*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 차명훈

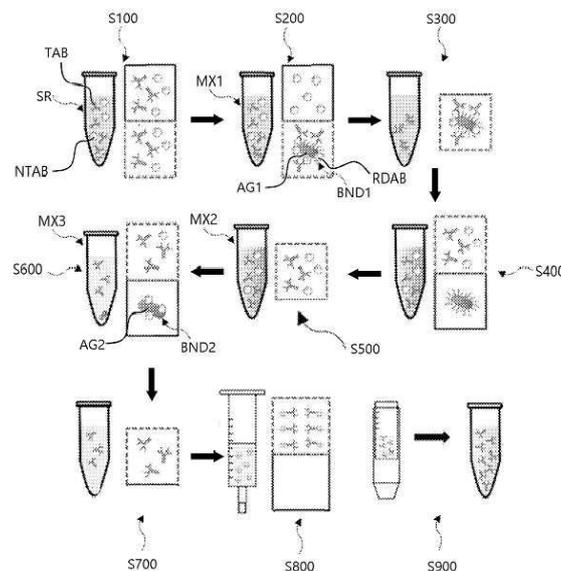
(54) 발명의 명칭 항체 선별 방법 및 이를 이용한 항체 선별 시스템

(57) 요약

본 발명에 따른 항체 선별 방법은 대상 체로부터 타겟 항체와 비타겟 항체를 갖는 혈청을 준비하는 단계, 상기 혈청에 상기 타겟 항체와 특이적 결합하는 제 1 항원을 제공하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 1 항원의 제 1 결합체와 비타겟 항체를 포함하는 제 1 혼합물을 얻는 단계, 상기 제 1 혼합물에서 상기 제 1 결합체와 상기 비타겟

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



항체를 분리하여 상기 제 1 결합체를 선택적으로 얻는 단계, 상기 제 1 결합체와 상기 제 1 결합체에 흡착된 리던던트 비타겟 항체를 상기 제 1 항원, 상기 타겟 항체 및 상기 리던던트 비타겟 항체로 해리시키는 단계, 상기 제 1 항원을 제거하여 상기 타겟 항체와 상기 리던던트 비타겟 항체의 제 2 혼합물을 얻는 단계, 상기 제 2 혼합물에 상기 리던던트 비타겟 항체와 특이적으로 결합하는 제 2 항원을 제공하여, 상기 리던던트 비타겟 항체와 상기 제 2 항원의 제 2 결합체를 형성하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 2 결합체를 포함하는 제 3 혼합물을 얻는 단계 및 상기 제 3 혼합물에서 상기 제 2 결합체와 상기 타겟 항체를 분리하여 타겟 항체를 선택적으로 얻는 단계를 포함할 수 있다.

(52) CPC특허분류

G01N 2400/50 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140113937 A

JP2011145301 A

KR1020140137353 A

KR1019897000832 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B4004077

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 대장균 표면발현 항체-라이브러리를 이용한 의료진단용 모노클로날 항체개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

대상 세포부터 타겟 항체와 비타겟 항체를 갖는 혈청을 준비하는 단계;

상기 혈청에 상기 타겟 항체와 특이적 결합하는 제 1 항원을 제공하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 1 항원의 제 1 결합체와 비타겟 항체를 포함하는 제 1 혼합물을 얻는 단계;

상기 제 1 혼합물에서 상기 제 1 결합체와 상기 비타겟 항체를 분리하여 상기 제 1 결합체를 선택적으로 얻는 단계;

상기 제 1 결합체와 상기 제 1 결합체에 흡착된 리던던트 비타겟 항체를 상기 제 1 항원, 상기 타겟 항체 및 상기 리던던트 비타겟 항체로 해리시키는 단계;

상기 제 1 항원을 제거하여 상기 타겟 항체와 상기 리던던트 비타겟 항체의 제 2 혼합물을 얻는 단계;

상기 제 2 혼합물에 상기 리던던트 비타겟 항체와 특이적으로 결합하는 제 2 항원을 제공하여, 상기 리던던트 비타겟 항체와 상기 제 2 항원의 제 2 결합체를 형성하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 2 결합체를 포함하는 제 3 혼합물을 얻는 단계; 및

상기 제 3 혼합물에서 상기 제 2 결합체와 상기 타겟 항체를 분리하여 타겟 항체를 선택적으로 얻는 단계를 포함하는 항체 선별 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제 1 혼합물을 얻는 단계에서,

상기 제 1 항원의 농도는 10^6 cells/ml 내지 10^8 cells/ml의 범위 내인 항체 선별 방법.

청구항 3

제 1 항에서,

상기 제 3 혼합물을 얻는 단계에서,

상기 제 2 항원의 농도는 10^6 cells/ml 내지 10^8 cells/ml의 범위 내인 항체 선별 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 제 1 항원은 적어도 어느 일부에 LTA(lipoteichoic acid)를 포함하는 LTA 항원인 경우, 상기 제 2 항원은 적어도 어느 일부에 LPS(lipopolysaccharide)를 포함하는 LPS 항원이며,

상기 제 1 항원은 적어도 어느 일부에 LPS를 포함하는 LPS 항원인 경우, 상기 제 2 항원은 적어도 어느 일부에 LTA를 포함하는 LTA 항원인 항체 선별 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 LTA 항원은, 그람 양성균을 포함하는 항체 선별 방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 LPS 항원은, 그람 음성균을 포함하는 항체 선별 방법.

청구항 7

제 4 항에 있어서,

상기 LTA 항원은, 포도상구균(staphylococcus), 연쇄상구균(streptococcus), 폐렴균(pneumococcus), 나병균(M. leprae), 디프테리아균(C. diphtheriae), 파상풍균(C. tetani), 탄저균(B. anthracis), 방선균(actinobacteria) 또는 고초균(B. subtilis) 중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 항체 선별 방법.

청구항 8

제 4 항에 있어서,

상기 LPS 항원은, 폐렴막대균(Klebsiella penumoniae), 아시네토박터(Acinetobacter baumannii), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa), 엔테로박터(Enterobacter spp.), 살모넬라균(salmonella), 이질균(shigella), 리케차(R. rickettsii), 대장균(E. coli), 콜레라균(V. cholerae), 페스트균(Y. pestis), 임질구균(N. gonorrhoeae), 수막염균(N. meningitidis) 또는 나선상균(spirochaeta)중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 항체 선별 방법.

청구항 9

제 1 항에서,

상기 제 1 혼합물을 얻는 단계는,

상기 혈청의 제 1 항원에 의한 면역 반응을 위한 환경을 제공하여 상기 타겟 항체 및 비타겟 항체를 생성하는 단계를 더 포함하는 항체 선별 방법.

청구항 10

제 1 항에서,

상기 제 1 결합체는, 산성 용액이 제공되는 경우 상기 제 1 항원과 상기 타겟 항체로 해리되는 항체 선별 방법.

청구항 11

제 1 항에서,

상기 항체 선별 방법은, 상기 제 3 혼합물을 얻는 단계 및 상기 타겟 항체를 선택적으로 얻는 단계를 적어도 2 회 이상 반복하는 항체 선별 방법.

청구항 12

제 1 항에서,

상기 항체 선별 방법은,

상기 제 2 결합체와 분리된 상기 타겟 항체를 포함하는 혼합 용액으로부터 상기 타겟 항체를 추출하는 단계를 더 포함하는 항체 선별 방법.

청구항 13

제 12 항에서,

상기 타겟 항체를 추출하는 단계는, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피(HIC), 단백질-G 크로마토그래피 또는 단백질-A 크로마토그래피 중 적어도 어느 하나 이상을 이용하는 항체 선별 방법.

청구항 14

대상 체로부터 타겟 항체와 비타겟 항체를 갖는 혈청을 준비하고, 상기 혈청에 상기 타겟 항체와 특이적 결합하는 제 1 항원을 제공하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 1 항원의 제 1 결합체와 비타겟 항체를 포함하는 제 1 혼합물을 얻는 제 1 용기;

상기 제 1 혼합물에서 상기 제 1 결합체와 상기 비타겟 항체를 분리하여 상기 제 1 결합체를 선택적으로 얻는 제 1 분리기;

상기 제 1 결합체와 상기 제 1 결합체에 흡착된 리던던트 비타겟 항체를 상기 제 1 항원, 상기 타겟 항체 및 상기 리던던트 비타겟 항체로 해리시키는 제 2 용기;

상기 제 1 항원을 제거하여 상기 타겟 항체와 상기 리던던트 비타겟 항체의 제 2 혼합물을 얻는 제 2 분리기;

상기 제 1 혼합물에 상기 리던던트 비타겟 항체와 특이적으로 결합하는 제 2 항원을 제공하여, 상기 리던던트 비타겟 항체와 상기 제 2 항원의 제 2 결합체를 형성하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 2 결합체를 포함하는 제 3 혼합물을 얻는 제 3 용기; 및

상기 제 3 혼합물에서 상기 제 2 결합체와 상기 타겟 항체를 분리하여 타겟 항체를 선택적으로 얻는 제 3 분리기를 포함하는 항체 선별 시스템.

청구항 15

제 14 항에서,

상기 제 1 용기는,

상기 혈청의 제 1 항원에 의한 면역 반응을 위한 환경을 제공하여 상기 타겟 항체 및 비타겟 항체를 생성하는 항체 선별 시스템.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

상기 항체 선별 시스템은,

상기 제 2 결합체가 제거된 혼합 용액으로부터 상기 타겟 항체를 정제하는 정제부를 더 포함하는 항체 선별 시스템.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

상기 정제부는, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피(HIC), 단백질-G 크로마토그래피 또는 단백질-A 크로마토그래피 중 적어도 어느 하나 이상을 이용하는 항체 선별 시스템.

청구항 18

제 14 항에서,

상기 제 1 결합체는, 산성 용액이 제공되는 경우 상기 제 1 항원과 상기 타겟 항체로 해리되는 항체 선별 시스템.

청구항 19

제 14 항에 있어서,

상기 제 1 항원은 적어도 어느 일부에 LTA(lipoteichoic acid)를 포함하는 LTA 항원인 경우,

상기 제 2 항원은 적어도 어느 일부에 LPS((lipopolysaccharide)를 포함하는 LPS 항원이며,

상기 제 1 항원은 적어도 어느 일부에 LPS를 포함하는 LPS 항원인 경우,

상기 제 2 항원은 적어도 어느 일부에 LTA를 포함하는 LTA 항원인 항체 선별 시스템.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 LTA 항원은 그람 양성균을 포함하는 항체 선별 시스템.

청구항 21

제 19 항에 있어서,
상기 LPS 항원은 그람 음성균을 포함하는 항체 선별 시스템.

청구항 22

제 19 항에 있어서,
상기 LTA 항원은 포도상구균(staphylococcus), 연쇄상구균(streptococcus), 폐렴균(pneumococcus), 나병균(M. leprae), 디프테리아균(C. diphtheriae), 과상풍균(C. tetani), 탄저균(B. anthracis), 방선균(actinobacteria) 또는 고초균(B. subtilis) 중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 항체 선별 시스템.

청구항 23

제 19 항에 있어서,
상기 LPS 항원은, 폐렴막대균(Klebsiella penumoniae), 아시네토박터(Acinetobacter baumannii), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa), 엔테로박터(Enterobacter spp.), 살모넬라균(salmonella), 이질균(shigella), 리케차(R. rickettsii), 대장균(E. coli), 콜레라균(V. cholerae), 페스트균(Y. pestis), 임질구균(N. gonorrhoeae), 수막염균(N. meningitidis) 또는 나선상균(spirochaeta)중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 항체 선별 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오 물질 검출 기술에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는, 항체 선별 방법 및 이를 이용한 항체 선별 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역계는 인체를 바이러스, 박테리아 또는 오염에 의한 염증으로부터 보호하고 질병의 원인을 제거하기 위하여 항체를 생산한다. 상기 항체는 타겟이 되는 항원과 특이적으로 결합하는 항원-항체 반응을 통해 상기 항원을 무력화하거나 제거함으로써 면역계의 방어 기능을 수행할 수 있다. 최근에는 상기 항원-항체 반응을 이용하여 독소, 단백질, 바이러스, 기생충 또는 세포들을 제거하는 치료 방법들이 개발되고 있으며, 이를 수동적 면역 요법 또는 수동적 혈청 요법이라고 한다.

[0003] 종래의 수동적 혈청 요법에서는 상기 항체의 생산을 위하여 동물의 면역계에 타겟 항원을 주사하여 체액성 면역계를 활성화하고 상기 면역계의 B 세포가 항체를 생산하도록 하였다. 그런데 상기 항원이 동물의 체내에 주사됨으로써 동물의 생리 활성 또는 면역계의 활성화에 부적합한 영향을 미치는 경우에는 면역계의 활동이 저하되어 항체의 생산이 어렵다. 또한, 최근 수많은 질병의 원인의 등장으로 인하여 상기 질병들에 특이적인 항체를 생산하기 위한 비용과 시간이 상당하여 효율적이고 경제적인 항체의 생산 방법 개발이 시급하다.

[0004] 또한, 동물의 면역계를 이용하여 항체를 생산하는 경우에 타겟 질병에 선택적으로 반응하는 항체를 선별하는 과정이 중요하다. 상기 체액성 면역계에서 항원은 항원제시세포(antigen presenting cell)에 의하여 여러 조각의 에피토프(epitope)로 분화되고 상기 여러 종류의 에피토프들에 의하여 B 세포가 분화되면 각각의 에피토프에 특이적으로 반응하는 항체를 생산한다. 하나의 에피토프에 반응하는 항체를 단클론 항체(monoclonal antibody; Mab)라고 하고, 여러 종류의 에피토프에 반응하는 여러 종류의 항체들이 섞여 있는 것을 다클론 항체라고 한다. 따라서, 상기 혈청 요법에서는 상기 여러 종류의 항체들 중 타겟 항원에 선택적으로 반응하는 항체의 선별 과정이 필요할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는, 대상 동물이나 인체의 면역계에 직접 항원을 주사하지 않는 방법에 의하여 생체 외부에서 항체를 생산하고 선별함으로써 상기 동물이나 인체의 생리 활성 또는 면역계의 변화를 수반하지 않으면서 유효량의 항체를 생산할 수 있는 항체 선별 방법을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명이 이루고자 하는 다른 기술적 과제는, 낮은 비용과 시간으로 타겟 질병에 특이적인 항체를 생산 및 선별하는 항체 선별 시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기의 과제를 해결하기 위한 일 실시예에 따른 항체 선별 방법은, 대상 체로부터 타겟 항체와 비타겟 항체를 갖는 혈청을 준비하는 단계, 상기 혈청에 상기 타겟 항체와 특이적 결합하는 제 1 항원을 제공하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 1 항원의 제 1 결합체와 비타겟 항체를 포함하는 제 1 혼합물을 얻는 단계, 상기 제 1 혼합물에서 상기 제 1 결합체와 상기 비타겟 항체를 분리하여 상기 제 1 결합체를 선택적으로 얻는 단계, 상기 제 1 결합체와 상기 제 1 결합체에 흡착된 리던던트 비타겟 항체를 상기 제 1 항원, 상기 타겟 항체 및 상기 리던던트 비타겟 항체로 해리시키는 단계, 상기 제 1 항원을 제거하여 상기 타겟 항체와 상기 리던던트 비타겟 항체의 제 2 혼합물을 얻는 단계, 상기 제 2 혼합물에 상기 리던던트 비타겟 항체와 특이적으로 결합하는 제 2 항원을 제공하여, 상기 리던던트 비타겟 항체와 상기 제 2 항원의 제 2 결합체를 형성하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 2 결합체를 포함하는 제 3 혼합물을 얻는 단계 및 상기 제 3 혼합물에서 상기 제 2 결합체와 상기 타겟 항체를 분리하여 타겟 항체를 선택적으로 얻는 단계를 포함할 수 있고, 다른 실시예에서는, 상기 제 1 혼합물을 얻는 단계에서 상기 제 1 항원의 농도는 10^6 cells/ml 내지 10^8 cells/ml의 범위 내일 수 있으며, 또 다른 실시예에서는, 상기 제 3 혼합물을 얻는 단계에서 상기 제 2 항원의 농도는 10^6 cells/ml 내지 10^8 cells/ml의 범위 내일 수 있다.

[0008] 일 실시예에서, 상기 제 1 항원은 적어도 어느 일부에 LTA(lipoteichoic acid)를 포함하는 LTA 항원인 경우, 상기 제 2 항원은 적어도 어느 일부에 LPS((lipopolysaccharide)를 포함하는 LPS 항원이며, 상기 제 1 항원은 적어도 어느 일부에 LPS를 포함하는 LPS 항원인 경우, 상기 제 2 항원은 적어도 어느 일부에 LTA를 포함하는 LTA 항원일 수 있고, 다른 실시예에서, 상기 LTA 항원은 그람 양성균을 포함할 수 있으며, 또 다른 실시예에서, 상기 LPS 항원은 그람 음성균을 포함할 수 있다.

[0009] 일 실시예에서, 상기 LTA 항원은, 포도상구균(staphylococcus), 연쇄상구균(streptococcus), 폐렴균(pneumococcus), 나병균(M. leprae), 디프테리아균(C. diphtheriae), 파상풍균(C. tetani), 탄저균(B. anthracis), 방선균(actinobacteria) 또는 고초균(B. subtilis) 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있고, 다른 실시예에서, 상기 LPS 항원은, 폐렴막대균(Klebsiella pneumoniae), 아시네토박터(Acinetobacter baumannii), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa), 엔테로박터(Enterobacter spp.), 살모넬라균(salmonella), 이질균(shigella), 리케차(R. rickettsii), 대장균(E. coli), 콜레라균(V. cholerae), 페스트균(Y. pestis), 임질구균(N. gonorrhoeae), 수막염균(N. meningitidis) 또는 나선상균(spirochaeta)중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0010] 일 실시예에서, 상기 제 1 혼합물을 얻는 단계는 상기 혈청의 제 1 항원에 의한 면역 반응을 위한 환경을 제공하여 상기 타겟 항체 및 비타겟 항체를 생성하는 단계를 더 포함할 수 있고, 다른 실시예에서, 상기 제 1 결합체는 산성 용액이 제공되는 경우 상기 제 1 항원과 상기 타겟 항체로 해리될 수 있으며, 또 다른 실시예에서, 상기 항체 선별 방법은, 상기 제 3 혼합물을 얻는 단계 및 상기 타겟 항체를 선택적으로 얻는 단계를 적어도 2 회 이상 반복할 수 있다.

[0011] 일 실시예에서, 상기 항체 선별 방법은 상기 제 2 결합체와 분리된 상기 타겟 항체를 포함하는 혼합 용액으로부터 상기 타겟 항체를 추출하는 단계를 더 포함할 수 있고, 다른 실시예에서, 상기 타겟 항체를 추출하는 단계는, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피(HIC), 단백질-G 크로마토그래피 또는 단백질-A 크로마토그래피 중 적어도 어느 하나 이상을 이용할 수 있다.

[0012] 상기의 과제를 해결하기 위한 일 실시예에 따른 항체 선별 시스템은, 상 체로부터 타겟 항체와 비타겟 항체를 갖는 혈청을 준비하고, 상기 혈청에 상기 타겟 항체와 특이적 결합하는 제 1 항원을 제공하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 1 항원의 제 1 결합체와 비타겟 항체를 포함하는 제 1 혼합물을 얻는 제 1 용기, 제 1 혼합물에서 상기 제 1 결합체와 상기 비타겟 항체를 분리하여 상기 제 1 결합체를 선택적으로 얻는 제 1 분리기, 제 1 결합체와 상기 제 1 결합체에 흡착된 리던던트 비타겟 항체를 상기 제 1 항원, 상기 타겟 항체 및 상기 리던던트

비타겟 항체로 해리시키는 제 2 용기, 제 1 항원을 제거하여 상기 타겟 항체와 상기 리던던트 비타겟 항체의 제 2 혼합물을 얻는 제 2 분리기, 제 1 혼합물에 상기 리던던트 비타겟 항체와 특이적으로 결합하는 제 2 항원을 제공하여, 상기 리던던트 비타겟 항체와 상기 제 2 항원의 제 2 결합체를 형성하여, 상기 타겟 항체와 상기 제 2 결합체를 포함하는 제 3 혼합물을 얻는 제 3 용기 및 상기 제 3 혼합물에서 상기 제 2 결합체와 상기 타겟 항체를 분리하여 타겟 항체를 선택적으로 얻는 제 3 분리기를 포함할 수 있고, 다른 실시예에서, 상기 제 1 용기는 상기 혈청의 제 1 항원에 의한 면역 반응을 위한 환경을 제공하여 상기 타겟 항체 및 비타겟 항체를 생성할 수 있으며, 또 다른 실시예에서, 상기 항체 선별 시스템은 상기 제 2 결합체가 제거된 혼합 용액으로부터 상기 타겟 항체를 정제하는 정제부를 더 포함할 수 있다.

[0013] 일 실시예에서, 상기 정제부는 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피(HIC), 단백질-G 크로마토그래피 또는 단백질-A 크로마토그래피 중 적어도 어느 하나 이상을 이용할 수 있고, 다른 실시예에서, 상기 제 1 결합체는 산성 용액이 제공되는 경우 상기 제 1 항원과 상기 타겟 항체로 해리될 수 있으며, 또 다른 실시예에서, 상기 제 1 항원은 적어도 어느 일부에 LTA(lipoteichoic acid)를 포함하는 LTA 항원인 경우, 상기 제 2 항원은 적어도 어느 일부에 LPS(lipopolysaccharide)를 포함하는 LPS 항원이며, 상기 제 1 항원은 적어도 어느 일부에 LPS를 포함하는 LPS 항원인 경우, 상기 제 2 항원은 적어도 어느 일부에 LTA를 포함하는 LTA 항원일 수 있다.

[0014] 일 실시예에서, 상기 LTA 항원은 그람 양성균을 포함할 수 있고, 다른 실시예에서, 상기 LPS 항원은 그람 음성균을 포함할 수 있으며, 또 다른 실시예에서, 상기 LTA 항원은 포도상구균(staphylococcus), 연쇄상구균(streptococcus), 폐렴균(pneumococcus), 나병균(M. leprae), 디프테리아균(C. diphtheriae), 파상풍균(C. tetani), 탄저균(B. anthracis), 방선균(actinobacteria) 또는 고초균(B. subtilis) 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 LPS 항원은, 폐렴막대균(Klebsiella pneumoniae), 아시네토박터(Acinetobacter baumannii), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa), 엔테로박터(Enterobacter spp.), 살모넬라균(salmonella), 이질균(shigella), 리케차(R. rickettsii), 대장균(E. coli), 콜레라균(V. cholerae), 페스트균(Y. pestis), 임질구균(N. gonorrhoeae), 수막염균(N. meningitidis) 또는 나선상균(spirochaeta) 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 그람 양성균의 세포벽을 구성하는 물질인 리소포스파티드산(lysophosphatidic acide; LTA) 및 그람 음성균의 세포벽의 구성 물질인 리포 다당류(lipopolysaccharide; LPS)에 특이적으로 결합하는 항체를 선별하기 위하여 상기 그람 양성균 및 그람 음성균을 사용함으로써 상기 리소포스파티드산 또는 상기 리포 다당류를 동물에 직접 주사하는 경우와 달리 생리 활성의 변화를 수반하지 않고 항체를 생산할 수 있는 항체 선별 키트를 제공할 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 그람 양성균 및 상기 그람 음성균에 의한 항원-항체 반응을 이용함으로써 복잡하지 않고 저비용으로 수행될 수 있는 항체 선별 방법 및 상기 방법을 수행하는 항체 선별 시스템을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 항체 선별 방법의 순서도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 항체 선별 시스템의 구성을 나타내는 구성도이다.

도 3a는 일 실시예에 따라 선별된 LTA 항체와 그람 양성균의 결합의 형광 유세포 분석(fluorescence-activated cell sorting; FACS) 결과이며, 도 3b는 일 실시예에 따라 선별된 LPS 항체와 그람 음성균의 결합의 FACS 결과이다.

도 4a는 일 실시예에 따라 선별된 LTA 항체를 그람 양성균 및 그람 음성균과 반응시키고 형광 현미경으로 촬영한 이미지이며, 도 4b는 일 실시예에 따라 선별된 LPS 항체를 그람 양성균 및 그람 음성균과 반응시키고 형광 현미경으로 촬영한 이미지이다.

도 5a는 일 실시예에 따라 선별된 LTA 항체의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 결과이며, 도 5b는 다른 실시예에 따라 선별된 LPS 항체의 SDS-PAGE 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0019] 본 발명의 실시예들은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위하여 제공되는 것이며, 하기 실시예는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 오히려, 이들 실시예는 본 개시를 더욱 충실하고 완전하게 하고, 당업자에게 본 발명의 사상을 완전하게 전달하기 위하여 제공되는 것이다.
- [0020] 도면에서 동일 부호는 동일한 요소를 지칭한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 해당 열거된 항목 중 어느 하나 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.
- [0021] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 또한, 본 명세서에서 단수로 기재되어 있다 하더라도, 문맥상 단수를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprise)" 및/또는 "포함하는(comprising)"이란 용어는 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.
- [0022] 본 명세서에서 기관 또는 다른 층 "상에(on)" 형성된 층에 대한 언급은 상기 기관 또는 다른 층의 바로 위에 형성된 층을 지칭하거나, 상기 기관 또는 다른 층 상에 형성된 중간 층 또는 중간 층들 상에 형성된 층을 지칭할 수도 있다. 또한, 당해 기술 분야에서 숙련된 자들에게 있어서, 다른 형상에 "인접하여(adjacent)" 배치된 구조 또는 형상은 상기 인접하는 형상에 중첩되거나 하부에 배치되는 부분을 가질 수도 있다.
- [0023] 본 명세서에서, "아래로(below)", "위로(above)", "상부의(upper)", "하부의(lower)", "수평의(horizontal)" 또는 "수직의(vertical)"와 같은 상대적 용어들은, 도면들 상에 도시된 바와 같이, 일 구성 부재, 층 또는 영역들이 다른 구성 부재, 층 또는 영역과 갖는 관계를 기술하기 위하여 사용될 수 있다. 이들 용어들은 도면들에 표시된 방향뿐만 아니라 소자의 다른 방향들도 포괄하는 것임을 이해하여야 한다.
- [0024] 이하에서, 본 발명의 실시예들은 본 발명의 이상적인 실시예들(및 중간 구조들)을 개략적으로 도시하는 단면도들을 참조하여 설명될 것이다. 이들 도면들에 있어서, 예를 들면, 부재들의 크기와 형상은 설명의 편의와 명확성을 위하여 과장될 수 있으며, 실제 구현시, 도시된 형상의 변형들이 예상될 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시예는 본 명세서에 도시된 영역의 특정 형상에 제한된 것으로 해석되어서는 아니 된다. 또한, 도면의 부재들의 참조 부호는 도면 전체에 걸쳐 동일한 부재를 지칭한다.
- [0025] 용어 "항체"에는 항체, 항체 유도체 또는 이의 단편이 포함될 수 있고, 항체에 관한 상세한 설명은 본 발명의 항체 선별 방법에도 적용된다. 항체는 상기 단편들 중 폴리펩타이드와 같은 항체의 등가물 또는 항체 동족체들은 Fc 영역, 면역글로불린 결합 도메인, 결합 도메인을 모방하는 펩타이드, Fc 영역에 상동성인 영역 또는 적어도 이의 일부를 포함한다. 또한, 항체는 다른 폴리펩타이드에 융합된 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 키메라 분자 또는 그의 등가물을 포함할 수 있다. 상기 항체들은 온전한(intact) 면역글로불린 분자일 수 있고, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc 및 F(v) 및 N-글리칸 구조 및 파라토프와 같은 상기 항체의 구성 부분들 및 상기 구성 부분들 중 적어도 일부를 포함할 수도 있다.
- [0026] 상기 항체는 혈청의 기본 구성요소이며, 상기 항체들, 면역글로불린분자들 또는 이의 단편들의 집합체일 수 있고, 항체 또는 면역글로불린의 단일 분자일 수 있다. 상기 항체 분자는 항원 또는 상기 항원의 에피토프와 같은 특이적인 항원 결정기에 결합되거나 상기 항원 결정기와 반응함으로써 면역학적 이펙터 메카니즘을 유도할 수 있다. 상기 항체는 단일특이(monospecific)적일 수 있으며, 상기 항체들의 조성물은 동일한 항체들로 구성되어 모노클로날일 수 있고, 동일한 항원의 다른 에피토프들 또는 다른 항원들의 에피토프들과 반응하는 다른 종류의 항체들을 포함하여 폴리클로날일 수 있다. 각 항체는 상기 항체의 대응하는 항원에 대한 특이적인 결합을 가능케 해주는 독특한 구조를 가지며 모든 천연 항체 분자들은 2개의 동일한 경쇄와 2개의 동일한 중쇄라는 전체적으로 동일한 기본 구조를 가질 수 있다.
- [0027] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 항체 선별 방법의 순서도이다. 설명의 편의를 위해, 상기 항체 선별 방법에 포함된 각 단계를 수행하는 주체는 그 기재가 생략될 수 있다.
- [0028] 도 1을 참조하면, 일 실시예에서, 대상 체로부터 타겟 항체(TAB)와 비타겟 항체(NTAB)를 갖는 혈청(SR)을 준비한다(S100). 상기 대상 체는 토끼, 염소, 돼지와 같은 포유류의 체일 수 있고, 인체일 수도 있다. 다른 실시예에서, 상기 대상 체는 동물의 생체 또는 대상 항원에 의한 질병으로 죽은 동물의 사체일 수 있다. 예시적으

로, 타겟 항체(TAB)가 인간의 질병 치료 수단으로 이용되는 경우, 인체와의 적합성을 고려하여 인체로부터 추출된 혈청(SR)을 이용하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 대상 체로부터 추출된 혈청(SR)을 이용하여 상기 타겟 항체(TAB)의 생산이 체외에서 이루어짐으로써 체내에서 생산되는 경우와 달리 대상체의 면역 체계 또는 생리 활성의 변화를 수반하지 않는 항체의 생산 및 선별이 가능하다.

[0029] 일 실시예에서, 혈청(SR)은 셀 펠렛(cell pellet)에 제공될 수 있다. 다른 실시예에서는, 유리, 플라스틱, 고분자와 같은 재료를 포함하는 복수의 웰(well), 셀(cell), 기관 또는 플레이트와 같은 모든 종류의 용기를 포함할 수 있다. 다만, 이는 예시적이며 항체, 항원 또는 혈청(SR)의 반응 영역을 제공할 수 있는 용기는 모두 해당될 수 있고 특정 예에 제한되지 않는다.

[0030] 이후, 혈청(SR)에 타겟 항체(TAB)와 특이적으로 결합하는 제 1 항원(AG1)을 제공하여, 타겟 항체(TAB)와 제 1 항원(AG1)의 제 1 결합체(BND1)와 비타겟 항체(NTAB)를 포함하는 제 1 혼합물(MX1)을 얻을 수 있다(S200). 일 실시예에서, 제 1 항체는 적어도 어느 일부에 LTA를 포함하는 LTA 항원이고, 타겟 항체(TAB)는 LTA 항체일 수 있고, 다른 실시예에서, 제 1 항체는 적어도 어느 일부에 LPS를 포함하는 LPS 항원이고, 타겟 항체(TAB)는 LPS 항체일 수 있다.

[0031] 제 1 항원(AG1)이 타겟 항체(TAB)와 특이적인 반응성을 가짐으로써 제 1 결합체(BND1)는 제 1 항원(AG1)과 결합된 타겟 항체(TAB)로 구성되며, 미량의 비타겟 항체(NTAB)가 화학적으로, 전기적으로 또는 물리적으로 제 1 항원(AG1)에 흡착됨으로써 제 1 결합체(BND1)에는 리던던트 비타겟 항체(RDAB)가 불순물로서 개입될 수 있다. 리던던트 비타겟 항체(RDAB)의 양은 제 1 항원(AG1), 타겟 항체(TAB) 또는 비타겟 항체(NTAB)의 종류 및 구성 물질, 전술한 물질들의 농도 또는 용매와의 반응성에 의하여 달라질 수 있으며, 리던던트 비타겟 항체(RDAB)의 양은 제 1 항원(AG1)에 특이적으로 결합된 타겟 항체(TAB)의 양보다는 작을 수 있다. 본 명세서에서, 제 1 항원(AG1)이 제공되었다는 것은 제 1 항원(AG1) 및 혈청(SR)이 혼합된 것을 의미하며, 혼합되는 방식은 특정 방식에 한정되지 않는다.

[0032] 다른 실시예에서, 상기 제 1 혼합물(MX1)을 얻는 단계(S200)에서 제 1 항원(AG1)의 농도는 수득하려고 하는 타겟 항체(TAB)의 양을 고려하여 결정될 수 있다. 제 1 항원(AG1)의 농도가 타겟 항체(TAB)의 양에 비해 낮은 경우, 혈청(SR) 내의 타겟 항체(TAB)와 제 1 항원(AG1)이 결합된 제 1 결합체(BND1)의 양이 충분하지 않아 항체 선별의 수득률이 저하될 수 있다. 반대로, 제 1 항원(AG1)의 농도가 타겟 항체(TAB)의 양에 비해 높은 경우, 불필요하게 많은 제 1 항원(AG1)이 사용되어야 하며, 리던던트 비타겟 항체(RDAB)의 양이 증가하여 이후 리던던트 비타겟 항체(RDAB)를 제거하기 위한 단계(S600, S700)를 더 많이 수행해야 한다. 일 실시예에서, 제 1 결합체(BND1)를 효율적으로 형성하기 위해서, 제 1 항원(AG1)의 농도는 10^6 cells/ml 내지 10^8 cells/ml의 범위 내일 수 있으며, 바람직하게는, 혼합 전의 제 1 항원(AG1)의 농도는 10^7 cells/ml이고 제 1 항원(AG1)과 항체는 1:1의 부피비로 혼합될 수 있다.

[0033] 다른 실시예에서, 제 1 혼합물(MX1)을 얻는 단계(S200)는 혈청(SR)의 제 1 항원(AG1)에 의한 면역 반응을 위한 환경을 제공하여 타겟 항체(TAB) 및 비타겟 항체(NTAB)를 생성하는 단계를 더 포함할 수 있다. 동물의 체액성 면역계는 B 세포를 이용하여 항체를 생산할 수 있으며, 상기 B 세포는 10^9 개 내지 10^{11} 개의 클론을 가질 수 있다. 또한 상기 B 세포는 박테리아 외막의 구성 물질과 같은 다양한 종류의 항원들에 대한 항체를 생산할 수 있다. 상기 박테리아의 외막 구성 물질로는 예를 들어 lipopolysaccharide(LPS) 또는 lipoteichoic acid(LTA)가 존재할 수 있고, 이에 관한 상세한 설명은 후술하기로 한다. 이에 따라, 일 실시예에서, 혈청(SR)에 제 1 항원(AG1)을 제공하여 면역 반응을 일으키는 경우 B 세포가 타겟 항체(TAB) 및 비타겟 항체(NTAB)로 분화할 수 있다. 예를 들면, 제 1 항원(AG1)과 혈청(SR)이 포함된 혼합 용액을 1 시간동안 25 °C에서 인큐베이션할 수 있다.

[0034] 이후, 제 1 혼합물(MX1)에서 제 1 결합체(BND1)와 비타겟 항체(NTAB)를 분리하여 제 1 결합체(BND1)를 선택적으로 얻을 수 있다(S300). 일 실시예에서는, 제 1 혼합물(MX1)을 원심분리하여 제 1 결합체(BND1)를 침전시켜, 비타겟 항체(NTAB)로부터 제 1 결합체(BND1)를 분리할 수 있다. 예시적으로는, 제 1 혼합물(MX1)을 방치하여 제 1 결합체(BND1)가 중력에 의하여 침전될 수도 있다. 침전된 제 1 결합체(BND1)를 분리하기 위하여 제 1 결합체(BND1) 상부에 잔류하는 혼합 용액을 제거할 수 있고, 침전된 제 1 결합체(BND1)를 추출할 수도 있다. 다른 실시예에서는, 거름, 증류, 밀도차이를 이용하는 공정, 원심 분리(centrifuge), 스피닝 밴드 추출(spining band extraction), Pulsating Sieve Tray or Packed Columns Extraction Systems 또는 액체 혼합-침강(mixer-settler) 방식이 이용될 수 있다. 또는, 단백질 크로마토그래피를 이용하여 상부의 비타겟 항체(NTAB)를 제거

할 수 있다. 전술한 원심분리 또는 크로마토그래피는 예시적이며, 제 1 혼합물(MX1)에서 제 1 결합체(BND1)와 비타겟 항체(NTAB)를 분리하는 자기력, 전기력 또는 용해도를 이용한 다양한 다른 공지의 기술이 사용될 수 있다.

[0035] 이후, 제 1 결합체(BND1)와 제 1 결합체(BND1)에 흡착된 리던던트 비타겟 항체(RDAB)를 제 1 항원(AG1), 타겟 항체(TAB) 및 리던던트 비타겟 항체(RDAB)로 해리시킬 수 있다(S400). 일 실시예에서는, 제 1 결합체(BND1)와 리던던트 비타겟 항체(RDAB)에 산 용액을 처리할 수 있다. 예를 들면, 글라이신-염산 버퍼(glycine-HCl buffer pH 2.7, 0.1M)을 이용할 수 있다. 다른 실시예에서는, 염화나트륨(NaCl) 또는 염화마그네슘(MgCl₂), 요소, 또는 구아니딘 염(guanidinium salt)과 같은 화합물을 이용할 수 있다. 전술한 물질들의 pH 및 농도는 항원-항체의 종류, 결합성, 반응 조건과 같은 요인들에 따라 적절히 조절될 수 있다.

[0036] 이후, 제 1 항원(AG1)을 제거하여 타겟 항체(TAB)와 리던던트 비타겟 항체(RDAB)의 제 2 혼합물(MX2)을 얻을 수 있다(S500). 해리된 제 1 결합체(BND1)와 리던던트 비타겟 항체(RDAB)가 포함되어 있는 혼합 영역을 10,000 rpm 내지 15,000 rpm, 바람직하게는 11,000 rpm의 회전 속도로 원심 분리하여 제 1 항원(AG1)을 침전시킬 수 있다. 이후, 침전된 제 1 항원(AG1)을 제거하여 침전되지 않고 상부에 잔류하는 타겟 항체(TAB)와 리던던트 비타겟 항체(RDAB)를 포함하는 제 2 혼합물(MX2)을 얻을 수 있다. 다른 실시예에서는 상부에 잔류하는 제 2 혼합물(MX2)을 피펫, 스포이드와 같은 추출이 가능한 실험 도구들을 이용하여 추출할 수도 있다.

[0037] 이후, 제 2 혼합물(MX2)에 리던던트 비타겟 항체(RDAB)와 특이적으로 결합하는 제 2 항원(AG2)을 제공하여, 리던던트 비타겟 항체(RDAB)와 제 2 항원(AG2)의 제 2 결합체(BND2)를 형성하여, 타겟 항체(TAB)와 제 2 결합체(BND2)를 포함하는 제 3 혼합물(MX3)을 얻을 수 있다(S600). 이는 제 1 항원(AG1)을 이용하여 비타겟 항체(NTAB)를 걸러내는 과정(S100 내지 S500)에서 비타겟 항체(NTAB)의 일부가 제 1 항체에 흡착되어 혼합 용액에 잔류하는 리던던트 비타겟 항체(RDAB)를 완벽하게 제거하기 위한 과정이다. 제 2 항원(AG2)은 비타겟 항체(NTAB)와 항원-항체 반응을 함으로써 제 2 결합체(BND2)를 형성할 수 있다. 일 실시예에서, 제 1 항원(AG1)이 LTA 항원인 경우, 제 2 항원(AG2)은 LPS 항원이고, 비타겟 항체(NTAB)는 LPS항원일 수 있고, 반대로, 다른 실시예에서, 제 1 항원(AG1)이 LPS 항원인 경우, 제 2 항원(AG2)은 LTA 항원이고, 비타겟 항체(NTAB)는 LTA 항원일 수 있다.

[0038] 일 실시예에서, 제 2 항원(AG2)과 비타겟 항체(NTAB)의 반응을 촉진하기 위하여 전술한 것과 같이 인큐베이션을 수행할 수 있다. 상기 인큐베이션은, 예를 들면 25 °C에서 약 1 시간 동안 수행될 수 있다.

[0039] 이후, 제 3 혼합물(MX3)에서 제 2 결합체(BND2)와 타겟 항체(TAB)를 분리하여 타겟 항체(TAB)를 선택적으로 얻을 수 있다(S700). 타겟 항체(TAB)를 얻기 위해서 제 2 결합체(BND2)를 혼합 용액에서 제거하거나 혼합 용액에서 타겟 항체(TAB)를 포함하는 부분을 선택적으로 선별할 수 있다. 제 2 결합체(BND2)와 타겟 항체(TAB)를 분리하는 방법으로는 제 1 결합체(BND1)와 비타겟 항체(NTAB)를 분리하여 제 1 결합체(BND1)를 선택적으로 얻는 단계(S300)의 개시 사항을 참조할 수 있다.

[0040] 일 실시예에서, 리던던트 비타겟 항체(RDAB)를 제거하기 위하여 제 2 항원(AG2)의 농도는 높은 선별을 및 수득율을 얻기 위하여 적절히 조절될 수 있으며, 이는 타겟 항체(TAB), 비타겟 항체(NTAB), 제 2 항원(AG2)의 종류, 반응성 및 실험 조건들에 따라 달라질 수 있다. 제 2 항원(AG2)의 농도가 상기 항체들의 농도에 비하여 낮은 경우에는 리던던트 비타겟 항체(RDAB)가 모두 제거되지 않고 잔류하여 제 2 항원(AG2)을 제공하여 제 2 결합체(BND2)를 형성하고(S600), 제 2 결합체(BND2)를 분리하여 타겟 항체(TAB)를 선택적으로 얻는 단계(S700)의 반복 실시가 요구되어 추가 공정이 수행되어야 한다. 또한, 제 2 항원(AG2)의 농도가 상기 항체들의 농도에 비하여 높은 경우에는 제 2 항원(AG2)에 타겟 항체(TAB)가 일부 흡착되어 항체 선별의 수득률이 저하될 수 있다. 다른 실시예에서, 10⁶ cells/ml 내지 10⁸ cells/ml의 범위 내일 수 있고, 바람직하게는, 10⁷ cells/ml일 수 있고, 제 3 혼합물(MX3)과 제 2 항원(AG2)을 포함하는 용액의 부피비는 1:1일 수 있다. 다양한 실시예에서, 제 2 항원(AG2)의 농도 및 제 2 항원(AG2)을 포함하는 용액과 제 3 혼합물(MX3)의 부피비는 제 2 항원(AG2)의 종류, 비타겟 항체(NTAB)의 종류, 타겟 항체(TAB)의 종류 및 전술한 물질들의 상호 반응성의 크기에 따라 적절히 조절될 수 있다.

[0041] 일 실시예에서, 상기 항체 선별 방법은 제 3 혼합물(MX3)을 얻는 단계(S600) 및 타겟 항체(TAB)를 선택적으로 얻는 단계(S700)를 적어도 2 회 이상 반복할 수 있다. 상기 단계들(S600, S700)을 반복 실시함으로써 타겟 항체(TAB)와 혼합되어 있는 리던던트 비타겟 항체(RDAB)를 제거하여 비타겟 항체(NTAB)가 잔류하지 않는 높은 수득률의 타겟 항체(TAB)를 선택적으로 얻을 수 있다. 일 실시예에서, 상기 단계들(S600, S700)은 2 회 반복될

수 있으며, 타겟 항체(TAB)의 수득률을 높이기 위하여 더 많은 횟수가 반복될 수도 있다.

[0042] 다른 실시예에서, 상기 항체 선별 방법은 제 2 결합체(BND2)가 제거된 혼합 용액으로부터 상기 제 1 항체를 정제하는 단계(S800)를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피(HIC), 단백질-G 크로마토그래피 또는 단백질-A 크로마토그래피 중 적어도 어느 하나 이상을 이용할 수 있다. 단백질 A는 스태필로코쿠스 오레우스(*Staphylococcus aureus*)에서 발견되는 세포 표면 단백질이다. 이는 포유동물 항체, 특히 IgG 클래스(class) 항체의 Fc 영역에 결합하는 성질을 가진다. 다른 실시예에서, 단백질-A 크로마토그래피를 이용하여 분리한 이후, 용매에 용리(elution)시킨 후 농축시키는 단계를 더 포함할 수 있다 (S900). 항체, 특히 단일클론 IgG의 정제에의 이의 사용은, 공지기술에 상세하게 기재되어 있다. 예를 들면, Langone 등, 상기; Hjelm 등 공저의 1972년판 FEBS Lett. 28권의 73-76 쪽을 참조할 수 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조에 의해 그 전체가 포함된다.

[0043] 일 실시예에서, 제 1 항원(AG1)은 적어도 어느 일부에 LTA(lipoteichoic acid)를 포함하는 LTA 항원인 경우, 제 2 항원(AG2)은 적어도 어느 일부에 LPS((lipopolysaccharide)를 포함하는 LPS 항원이며, 제 1 항원(AG1)은 적어도 어느 일부에 LPS를 포함하는 LPS 항원인 경우, 제 2 항원(AG2)은 적어도 어느 일부에 LTA를 포함하는 LTA 항원일 수 있다. 예를 들면, 타겟 항체(TAB)가 LTA 항체인 경우에는 비타겟 항체(NTAB)가 LPS항체가 되는 것이며, 반대로, 타겟 항체(TAB)가 LPS항체인 경우 비타겟 항체(NTAB)가 LTA항체가 될 수 있다. 상기 LTA 및 상기 LPS는 박테리아의 세포벽에 존재하는 당사슬이다. 상기 LTA 및 상기 LPS를 포함하는 박테리아가 체내에 유입되어 감염을 일으키는 경우, 상기 LTA 및 상기 LPS에 의하여 발열이 일어나 사망까지 이르기기도 한다. 종래에는 상기 LTA에 대한 항체와 상기 LPS에 대한 항원을 분리하기 위하여 상기 LTA 항원 또는 상기 LPS 항원을 고정된 친화성 크로마토그래피가 이용되었으나 낮은 효율로 상용화에 어려움이 있다. 본 발명은 상기 LTA 항원 및 LPS 항원을 고정하지 않고 혈청(SR) 내에 직접 주입하여 항원-항체 반응을 일으키는 용액 공정을 제공함으로써 효율 높은 상기 LTA 항체 및 LPS 항체의 선별이 가능하다.

[0044] 다른 실시예에서, 상기 LTA 항원은 그람 양성균을 포함할 수 있고, 예를 들면, 포도상구균(*staphylococcus*), 연쇄상구균(*streptococcus*), 폐렴균(*pneumococcus*), 나병균(*M. leprae*), 디프테리아균(*C. diphtheriae*), 파상풍균(*C. tetani*), 탄저균(*B. anthracis*), 방선균(*actinobacteria*) 또는 고초균(*B. subtilis*) 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 LPS 항원은 그람 음성균을 포함할 수 있고, 예를 들면, 폐렴막대균(*Klebsiella pneumoniae*), 아시네토박터(*Acinetobacter baumannii*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 엔테로박터(*Enterobacter spp.*), 살모넬라균(*salmonella*), 이질균(*shigella*), 리케차(*R. rickettsii*), 대장균(*E. coli*), 콜레라균(*V. cholerae*), 페스트균(*Y. pestis*), 임질구균(*N. gonorrhoeae*), 수막염균(*N. meningitidis*) 또는 나선상균(*spirochaeta*)일 수 있으며, 바람직하게는, BL21(DE3)일 수 있다. 박테리아는 세포벽의 구성 성분을 기준으로 하여 그람 양성균과 그람 음성균으로 분류된다. 상기 그람 양성균은 펩티도글리칸(peptidoglycan)과 (LTA)를 가지며, 그람 음성균은 LPS를 세포벽에 포함하고 세포벽과 세포막 사이에 펩티도글리칸을 포함한다. 따라서, 상기 LTA 항원은 LTA를 포함하는 모든 항원, 박테리아, 셀(cell), 단백질, 유기 화합물 또는 무기 화합물을 포함할 수 있고, 상기 LPS 항원은 LTA를 포함하는 모든 항원, 박테리아, 셀(cell), 단백질, 유기 화합물 또는 무기 화합물을 포함할 수 있으며, 전술한 예시들에 한정되지 않는다.

[0045] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 항체 선별 시스템(100)의 구성을 나타내는 구성도이다.

[0046] 도 2를 참조하면, 일 실시예에 따른 항체 선별 시스템(100)은 제 1 용기(110), 제 1 분리기(120), 제 2 용기(130), 제 2 분리기(140), 제 3 용기(150) 및 제 3 분리기(160)를 포함할 수 있고, 다른 실시예에 따른 항체 선별 시스템(100)은 정제부(170)를 더 포함할 수 있다. 항체 선별 시스템(100)의 상기 구성 요소들은 연속 공정(continuous process)을 위해 물질 전달을 위한 유로들로 상호 연결될 수 있으며, 이들 유로들에는 유량 제어를 위한 밸브들이 결합될 수 있다. 상기 구성 요소들은 전체가 자동화된 시스템일 수 있고, 적어도 어느 일부가 수동으로 구동되는 장비의 조합, 제어 장치 또는 실험 단계들일 수 있다. 화살표들은 대상 혼합물 또는 용액들이 처리되는 순서를 나타내는 것일 수 있다. 여러 실시예들에서, 상기 구성 요소들은 개별화된 시스템일 수 있고, 적어도 어느 일부의 구성 요소들이 병합될 수 있으며, 상기 구성 요소의 일부가 생략될 수도 있다. 또한, 항체 선별 시스템(100)의 각 구성 요소들에 대한 설명은 중복을 피하기 위하여 모순되지 않는 범위 내에서 도 1에서 전술한 개시 사항들을 참조하도록 한다.

[0047] 일 실시예에서, 상기 용기들은 반응 영역이 제공되는 적어도 하나 이상의 웰(well), 셀(cell), 기관, 셀 펠렛(cell pellet) 또는 플레이트일 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 용기들은 용액의 제공, 첨가 또는 용액 처리와 같은 용액 공정을 위한 실험 도구, 실험 장비를 포함할 수 있으며, 상기 용액 공정은 항체 선별 시스템(100)

0)에 의하여 자동으로 수행될 수 있고, 사람에 의해 수행될 수 있다.

- [0048] 일 실시예에서, 상기 분리기들은 거름, 증류, 밀도차이를 이용하는 공정, 원심 분리(centrifuge), 스피닝 밴드 추출(spinning band extraction), Pulsating Sieve Tray or Packed Columns Extraction Systems 또는 액체 혼합-침강(mixer-settler)을 이용할 수 있다. 다만, 이는 예시적이며, 액체-액체, 액체-고체 또는 고체-고체의 분리가 가능한 방법들은 모두 해당될 수 있으며, 특정 방법으로 제한되지 않는다. 또 다른 실시예에서는, 분리 대상이 되는 용액의 용매를 제거한 후, 분리 대상 물질들을 용매가 없는 고체 상태로 얻은 후, 분리할 수도 있다.
- [0049] 일 실시예에서, 제 1 용기(110)는 대상 체로부터 타겟 항체(TAB)와 비타겟 항체(NTAB)를 갖는 혈청(SR)을 준비하고, 혈청(SR)에 타겟 항체(TAB)와 특이적 결합하는 제 1 항원(AG1)을 제공하여, 타겟 항체(TAB)와 제 1 항원(AG1)의 제 1 결합체(BND1)와 비타겟 항체(NTAB)를 포함하는 제 1 혼합물(MX1)을 얻을 수 있다. 혈청(SR)은 대상 체로부터 추출되어 항체 선별 시스템(100)에 제공될 수 있으며, 항체 선별 시스템(100)이 대상 체로부터 혈청(SR)을 채취할 수도 있다. 다른 실시예에서, 제 1 용기(110)는 혈청(SR)의 제 1 항원(AG1)에 의한 면역 반응을 위한 환경을 제공하여 타겟 항체(TAB) 및 비타겟 항체(NTAB)를 생성할 수 있다.
- [0050] 다른 실시예에서, 제 1 용기(110)는 제 1 항원(AG1)의 주입량을 0 ml에서 시작하여 증가시키면서 제 1 혼합물(MX1) 내부의 타겟 항체(TAB), 비타겟 항체(NTAB) 또는 제 1 결합체(BND1)의 양을 감지하여 최적의 양을 자동으로 조절할 수 있다. 예를 들면, 상기 제 1 혼합물(MX1) 내부의 물질들을 광학적, 전기적 또는 화학적 반응을 이용하여 감지하도록 라벨링을 하고, 타겟 항체(TAB)가 모두 제 1 결합체(BND1)를 형성하는 최적의 주입량까지 제 1 항원(AG1)을 주입할 수 있다.
- [0051] 일 실시예에서, 제 1 분리기(120)는 제 1 혼합물(MX1)에서 제 1 결합체(BND1)와 비타겟 항체(NTAB)를 분리하여 제 1 결합체(BND1)를 선택적으로 얻을 수 있고, 제 2 용기(130)는 제 1 결합체(BND1)와 상기 제 1 결합체(BND1)에 흡착된 리던던트 비타겟 항체(RDAB)를 제 1 항원(AG1), 타겟 항체(TAB) 및 리던던트 비타겟 항체(RDAB)로 해리시킬 수 있고, 제 2 분리기(140)는 제 1 항원(AG1)을 제거하여 타겟 항체(TAB)와 리던던트 비타겟 항체(RDAB)의 제 2 혼합물(MX2)을 얻을 수 있다. 또한, 제 3 용기(150)는 제 1 혼합물(MX1)에 리던던트 비타겟 항체(RDAB)와 특이적으로 결합하는 제 2 항원(AG2)을 제공하여, 리던던트 비타겟 항체(RDAB)와 제 2 항원(AG2)의 제 2 결합체(BND2)를 형성하여, 타겟 항체(TAB)와 제 2 결합체(BND2)를 포함하는 제 3 혼합물(MX3)을 얻을 수 있다. 다른 실시예에서 제 2 항원(AG2)의 주입량이 자동으로 조절될 수 있으며, 이에 관해서는 제 1 용기(110)에서 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다.
- [0052] 일 실시예에서, 제 3 분리기(160)는 제 3 혼합물(MX3)에서 상기 제 2 결합체(BND2)와 상기 타겟 항체(TAB)를 분리하여 타겟 항체(TAB)를 선택적으로 얻을 수 있다. 다른 실시예에서, 항체 선별 시스템(100)은 제 2 결합체(BND2)가 제거된 혼합 용액으로부터 상기 타겟 항체(TAB)를 정제하는 정제부(170)를 더 포함할 수 있고, 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피(HIC), 단백질-G 크로마토그래피 또는 단백질-A 크로마토그래피 중 적어도 어느 하나 이상을 이용할 수 있다.
- [0053] 도 3a는 일 실시예에 따라 선별된 LTA 항체와 그람 양성균의 결합의 형광 유세포 분석(fluorescence-activated cell sorting; FACS) 결과이며, 도 3b는 일 실시예에 따라 선별된 LPS 항체와 그람 음성균의 결합의 FACS 결과이다.
- [0054] 일 실시예에서, 그람 양성균은 *B. subtilis*이고, 그람 음성균은 BL21일 수 있다. 그래프 x축의 FITC intensity는 FACS로 측정된 형광의 세기를 나타내며, 상기 형광의 세기가 클수록 결합이 강한 것을 의미한다. 다만, 일 실시예의 물질들은 예시에 불과하며, 모든 종류의 그람 양성균 또는 그람 음성균에 동일하게 적용될 수 있다. 도 3a를 참조하면, LTA 항체의 경우 BL21의 형광 세기가 37.5로 가장 크게 나타나는 것을 볼 수 있고, 이는, 그람 음성균인 BL21의 세포벽에 LTA가 포함되어 있기 때문이다. 도 3b를 참조하면, LPS 항체의 경우 *B. subtilis*의 형광 세기가 117로 가장 큰 것을 볼 수 있고, 이는 그람 음성균인 *B. subtilis*의 세포벽에 LPS가 포함되어 있기 때문이다.
- [0055] 도 4a는 일 실시예에 따라 선별된 LTA 항체를 그람 양성균 및 그람 음성균과 반응시키고 형광 현미경으로 촬영한 이미지이며, 도 4b는 일 실시예에 따라 선별된 LPS 항체를 그람 양성균 및 그람 음성균과 반응시키고 형광 현미경으로 촬영한 이미지이다.
- [0056] 전술한 것과 같이 그람 양성균은 *B. subtilis*이고, 그람 음성균은 BL21일 수 있으나, 이는 예시적인 것으로 본 발명을 한정하지 않는다. 도 3a를 참조하면, 일 실시예에 따라 선별된 LTA 항체는 *B. subtilis*와 강하게 결합

하여 높은 형광 세기를 나타내며, 이는 *B. subtilis*가 세포벽에 LTA를 가진 그람 양성균이기 때문이다. 도 3b를 참조하면 일 실시예에 따라 선별된 LPS 항체는 BL21와 강하게 결합하여 높은 형광 세기를 나타내며, 이는 *B. subtilis*가 세포벽에 LPS를 가진 그람 음성균이기 때문이다. 또한, 도 4a 및 도 4b를 참조하면, LTA 항체는 LPS를 가지는 그람 음성균과 일부 반응하며, 반대의 경우도 마찬가지임을 볼 수 있다. 이는 LPS 항원 또는 LTS 항원 중 한 종류의 항원에 의한 항체 선별로는 높은 선별율을 가지는 LPS 항체 또는 LTA 항체를 얻기 어려움을 의미한다. 본 발명에 의한 항체 선별 방법은 LPS 항원 및 LTA 항원에 의한 2-track을 이용한 항체 선별을 수행함으로써 높은 품질의 항체를 얻을 수 있다.

[0057] 도 5a는 일 실시예에 따라 선별된 LTA 항체의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 결과이며, 도 5b는 다른 실시예에 따라 선별된 LPS 항체의 SDS-PAGE 결과이다.

[0058] 도 5a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에서, 타겟 항체(TAB)는 LTA 항체이고, 비타겟 항체(NTAB)는 LPS 항체이고, 제 1 항원(AG1)은 LTA 항원이고, 제 2 항원(AG2)은 LPS항원일 수 있으며, 도 5b를 참조하면, 다른 실시예에서는, 타겟 항체(TAB)는 LPS 항체이고, 비타겟 항체(NTAB)는 LTA 항체이고, 제 1 항원(AG1)은 LPS 항원이고, 제 2 항원(AG2)은 LTA 항원일 수 있다. 또 다른 실시예에서, 제 1 결합체(BND1)를 해리시키는 단계(S400)에서, 제 1 결합체(BND1)는 산성 용액이 제공되는 경우 해리될 수 있고, 상기 산성 용액은 Glycine-HCl buffer pH 2.7, 0.1M일 수 있다. 다양한 실시예에서, 상기 산성 용액은 10초, 1분, 3분간 처리될 수 있으며, 상기 산성 용액의 처리 시간은 예시적인 것이며 전술한 수치들에 한정되지 않는다. 도 5a 및 도 5b의 y 축은 SDS-PAGE에 의하여 분리된 단백질 분자들의 분자량(kDa)을 의미하며, 상부의 숫자들은 상기 산성 용액의 처리 시간을 의미한다.

[0059] 본 발명의 SDS-PAGE 결과에서, VH는 분자량 55 kDa의 긴 단백질 체인을 의미하며, VL은 26 kDa의 짧은 단백질 체인을 의미한다. 이에 따라, 일 실시예에서, 상기 항체 선별 방법 또는 항체 선별 시스템(100)에 의하여 선별된 타겟 항체(TAB)는 긴 단백질 체인 또는 짧은 단백질 체인의 두 종류의 타겟 항체(TAB)가 선별되는 것을 알 수 있다. 다른 실시예에서, 타겟 항체(TAB)의 단백질 체인은 3 종류 이상일 수 있다.

[0060] 다른 실시예에서, 상기 항체 선별 방법은 선별된 타겟 항체(TAB)를 상기 단백질 체인의 길이 또는 분자량에 따라 분류하는 단계를 더 포함할 수 있고, 항체 선별 시스템(100)은 상기 단백질 체인을 분류하는 항체 분류부를 더 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 타겟 항체(TAB)는 이동계면 전기영동법(moving boundary electrophoresis), 락 전기영동법(zone electrophoresis), 불연속성 전기영동법(disc electrophoresis, SDS-PAGE, 등전 초점화 전기영동법(isoelectric focusing) 또는 등속전기영동법(isotachopheresis, ITP) 중 적어도 하나 이상을 이용하여 분류될 수 있다. 단백질을 분자량에 따라 분류할 수 있는 방법들은 모두 사용될 수 있으며, 전술한 예시들로 한정되지 않는다. 타겟 항체(TAB)를 상기 단백질 체인의 종류별로 분류함으로써 고품질의 항체 생산이 가능할 수 있다.

[0061] 또 다른 실시예에서, 제 1 결합체(BND1)를 해리시키는 단계(S400)에서 산성 용액의 처리 시간은 30 초 내지 1분의 범위 내로 설정될 수 있다. SDS-PAGE 결과에서 산성 용액의 처리 시간이 10 초(sec)인 경우의 타겟 항체(TAB)의 양보다 산성 용액의 처리 시간이 1 분(min) 이상인 경우의 타겟 항체(TAB)의 양이 많은 것을 알 수 있으며, 상기 산성 용액의 처리 시간이 1 분(min) 이상인 경우에는 상기 처리 시간이 더 길어지더라도 타겟 항체(TAB)의 양이 일정한 것을 알 수 있다. 상기 처리 시간이 30 초 미만인 경우에는 제 1 결합체(BND1)를 해리시키는 단계(S400) 충분히 해리되지 않아 제 1 항원(AG1)을 제거하여 제 2 혼합물(MX2)을 얻는 단계(S500)에서 제 1 항원(AG1)에 결합된 타겟 항체(TAB)의 일부가 제 1 항원(AG1)과 함께 제거됨으로써 항체 선별의 수득률이 저하될 수 있다. 또한, 상기 처리 시간을 1 분 이내로 설정함으로써 항체 선별의 높은 수득율을 유지하면서 항체 선별에 소요되는 시간을 단축할 수 있다.

[0062] 일 실시예에서는 상기 항체 선별 방법 및 항체 선별 시스템(100)에 의하여 선별된 타겟 항체(TAB)를 정량하는 분석이 추가로 수행될 수 있다. 예를 들어 단백질 정량 분석(bicinchoninate; BCA), EIA 검사, RIA검사, 형광 항체법 또는 웨스턴 블로팅(western blotting)에 의해 정량될 수 있다. 타겟 항체(TAB)의 정량 분석을 추가로 수행하여, 다양한 실시예에서 선별된 타겟 항체(TAB)의 수득률 및 선별율을 측정함으로써 다양한 종류의 항체 또는 항원들을 이용한 선별 과정에 상용화하기 위한 용액의 부피비, 농도, 실험 조건들이 설정될 수 있다.

[0063] 이상에서 설명한 본 발명이 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

부호의 설명

[0064]

SR: 혈청

TAB: 타겟 항체

NTAB: 비타겟 항체

AG1: 제 1 항원

AG2: 제 2 항원

BND1: 제 1 결합체

BND2: 제 2 결합체

MX1: 제 1 혼합물

MX2: 제 2 혼합물

MX3: 제 3 혼합물

RDAB: 리던던트 비타겟 항체

100: 항체 선별 시스템

110: 제 1 용기

120: 제 1 분리기

130: 제 2 용기

140: 제 2 분리기

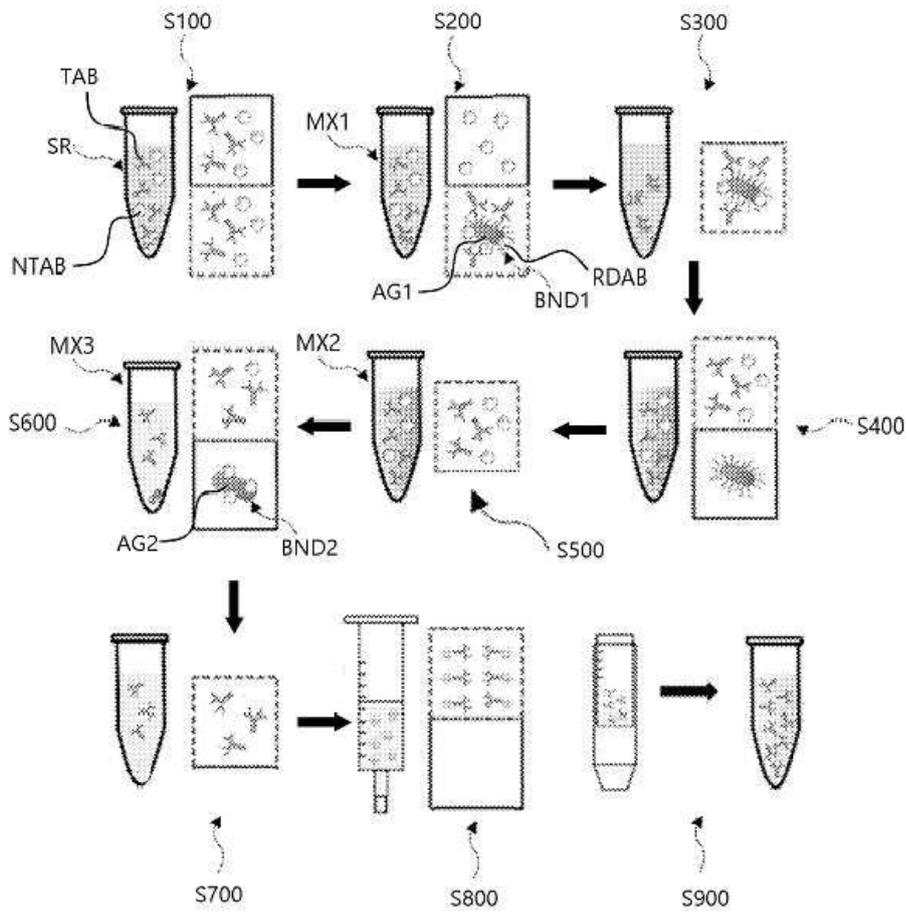
150: 제 3 용기

160: 제 3 분리기

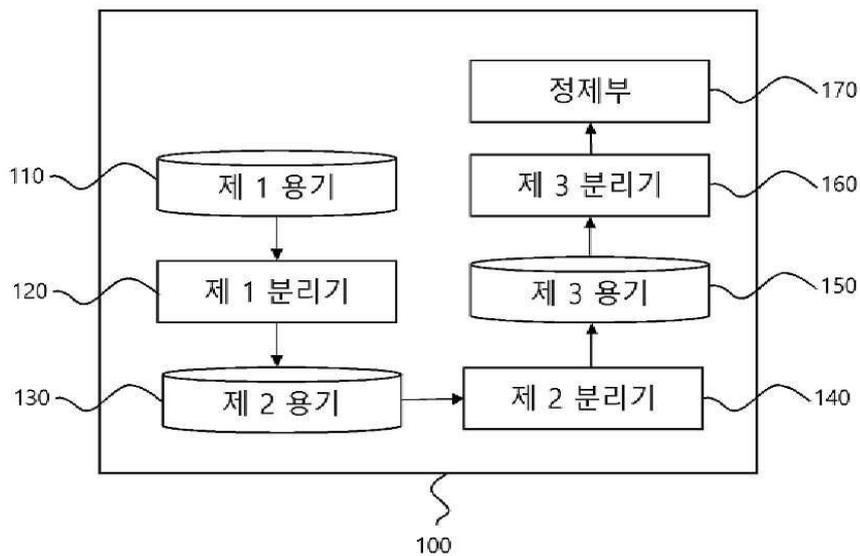
170: 정제부

도면

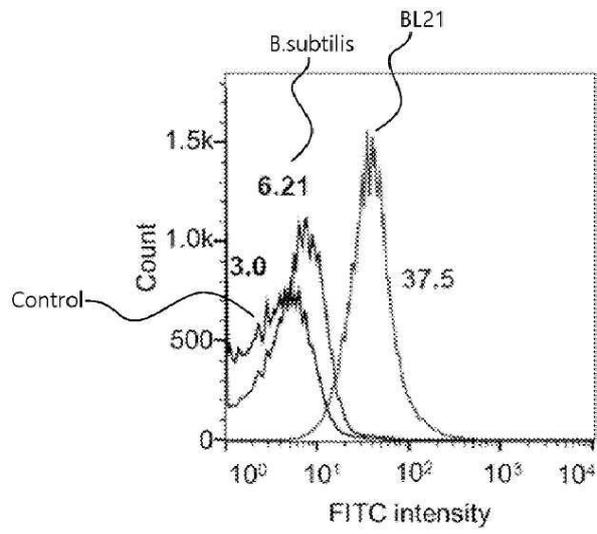
도면1



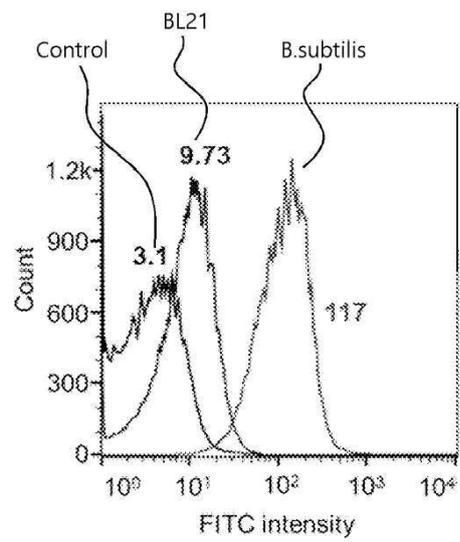
도면2



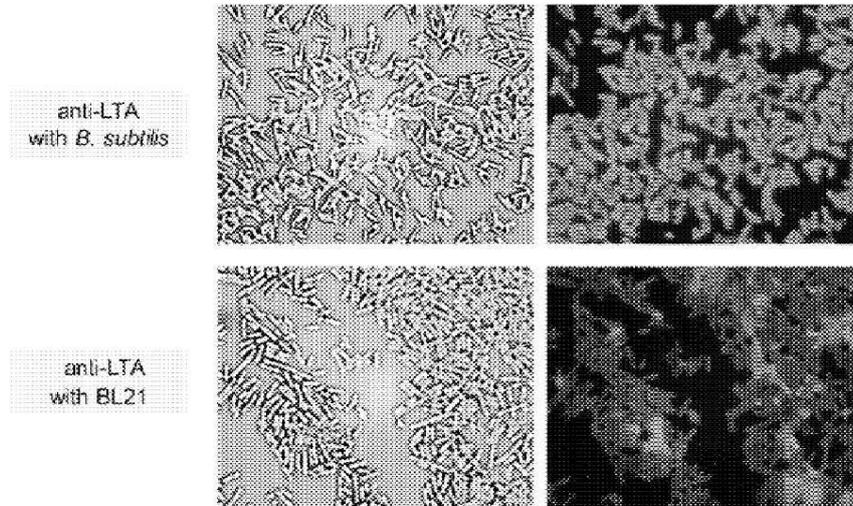
도면3a



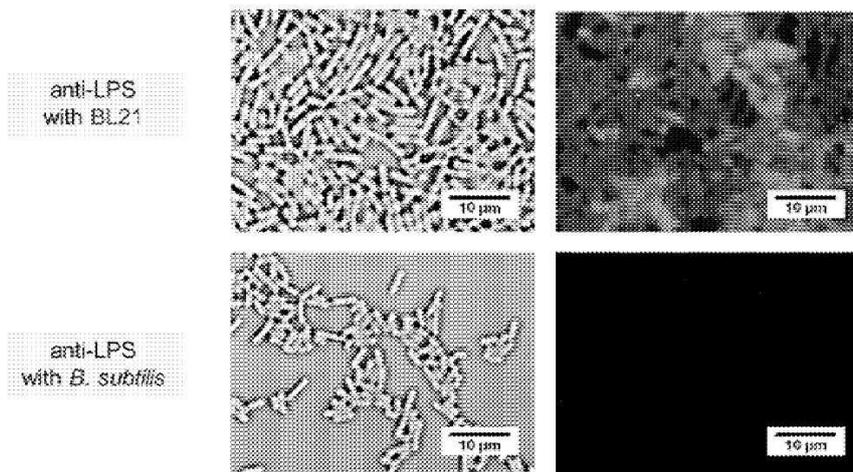
도면3b



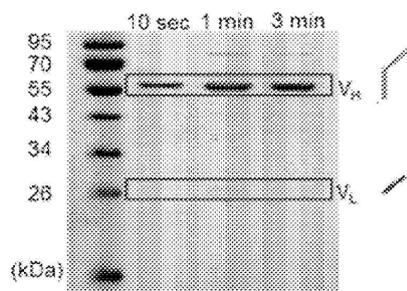
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

