



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월20일  
(11) 등록번호 10-2241520  
(24) 등록일자 2021년04월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/10 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 16/1009 (2013.01)  
G01N 33/56983 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0043781  
(22) 출원일자 2019년04월15일  
심사청구일자 2019년04월15일  
(65) 공개번호 10-2020-0121425  
(43) 공개일자 2020년10월26일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020190006154 A  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)  
경상북도 김천시 혁신8로 177 (울곡동)  
(주)바이오노트  
경기도 화성시 삼성1로4길 22 (석우동)  
(72) 발명자  
변재원  
경상북도 김천시 용전로 47, 109동 2202호(울곡동, 사랑으로 부영1단지 아파트)  
조영식  
경기도 용인시 기흥구 덕영대로1967번길 38-27, 18호(하갈동, 노블힐스)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 6 항

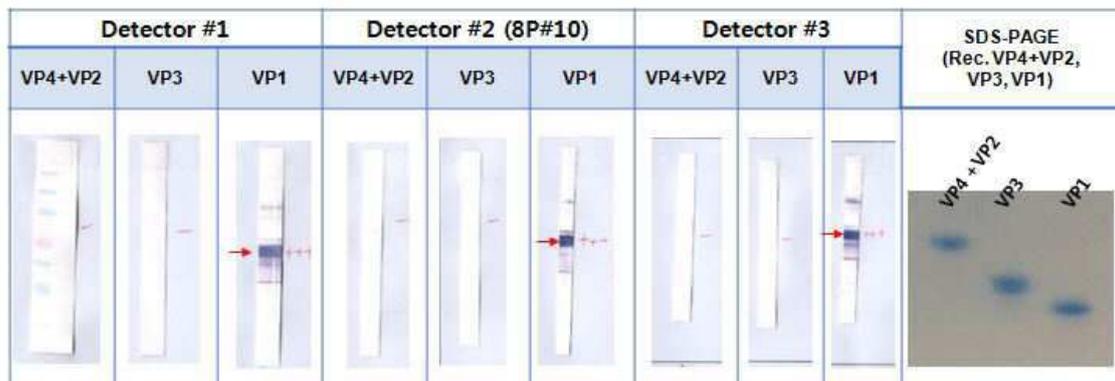
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **구제역 바이러스 0형에 면역반응성을 나타내는 항체 및 이를 포함하는 구제역 바이러스 검출용 조성물**

(57) 요약

구제역 바이러스 구조 단백질 VP1과 특이적으로 결합하는 구제역 바이러스 0형에 면역반응성을 나타내는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 이를 포함하는 구제역 바이러스 0형 검출용 조성물, 및 이를 포함하는 구제역 바이러스 0형 항체 검출용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도7



- (52) CPC특허분류  
G01N 2333/09 (2013.01)
- (72) 발명자  
**박미영**  
경상북도 김천시 혁신6로 57, 105동 801호(울곡동, 중흥S-클래스 프라디움)  
**위성환**  
경기도 군포시 오금로 34, 377동 1501호(금정동, 삼익소월아파트)  
**김선애**  
서울특별시 송파구 송이로12길 11, 102동 1407호(송파동, 송파성지아파트)  
**표현미**  
경상북도 김천시 혁신8로 66, 105동 302호(울곡동, 김천혁신도시 영무예다음1차아파트)  
**김정호**  
경기도 화성시 동탄대로시범길 276, 907동 2301호(청계동, 시범우남퍼스트빌아파트)  
**류지은**  
경기도 용인시 기흥구 농서동 4338-3, 301호
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020120132227 A  
KR1020150047833 A  
Virus Research, Vol. 155, pp. 291-299(2010.10.23.)\*  
HYBRIDOMA, Volume 31, Number 5, pp. 358-363(2012)  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545019545
과제번호	M-1543082-2017-19-0203
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림축산검역본부
연구사업명	농림축산검역검사기술개발(R&D)
연구과제명	구제역 백신 항체 예찰용 ELISA 진단법 개발
기여율	1/1
과제수행기관명	농림축산검역본부
연구기간	2017.02.03 ~ 2019.12.31

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열 번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 에피토프와 특이적으로 결합하는, 구제역 바이러스 0형에 면역반응성을 나타내는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 HCDR2, 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 LCDR1, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 LCDR2, 및 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 4**

청구항 1에 있어서, 구제역 바이러스 0형의 VP1부위에 대한 특이적인 면역반응성과 바이러스 중화능을 나타내는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 5**

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 수탁번호 KCLRF-BP-00465로 기탁된 하이브리도마 세포로부터 생산되는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 6**

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 단일 클론 항체인 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 7**

청구항 1 및 3 내지 6 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 구제역 바이러스 0형 항체 검출용 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

구제역 바이러스의 구조 단백질 VP1과 특이적으로 결합하는 구제역 바이러스 0형에 면역반응성을 나타내는 항체

[0001]

또는 이의 항원-결합 단편, 이를 포함하는 구제역 바이러스 0형 검출용 조성물, 및 이를 포함하는 구제역 바이러스 0형 항체 검출용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 구제역 바이러스(Foot-and-Mouth Disease Virus: FMDV)는 우제류의 동물에서 바이러스 감염으로 고열, 수포 등의 증상을 나타내며 어린 가축에서는 폐사를 일으키는 국내 제1종 법정 가축전염병이다. 국내에서는 2000년 이후로 9회 발생하였으며 2010-2011년 발생시에는 무려 약3조원의 직접적인 경제적 피해를 초래하기도 하였다.
- [0003] 구제역 바이러스는 4종의 구조 단백질 VP4, VP3, VP2 및 VP1과, 8종의 비구조 단백질 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C 및 3D로 구성되어 있다. VP1-2A 단백질 전구체는 3C 프로테아제에 의해 절단되고 접합이 일어나, 바이러스 조립이 이뤄지게 된다. 캡시드 단백질 중 VP4는 캡시드 내부에 존재하여 노출되어 있지 않으나, VP2, VP3 및 VP1은 캡시드 표면에 노출되어 있다. 특히 노출된 구조 단백질 중에서도 VP1에 포함된 G-H 루프는 중화항체의 생성을 유도하는 중요한 부위로 알려져 있다(한국등록특허 10-1814757).
- [0004] 이에, 구제역 바이러스의 구조 단백질을 표적으로 하여 백신이 제조되어 왔고, 백신 접종 시에 생성되는 항체는 구조 단백질에 대한 항체만을 발현시키므로 구조 단백질을 표적으로 하는 항체 검출 방법이 요구되어 왔다. 구체적으로, 빈 캡시드 입자(empty capsid particle: ECP) 항원은 비구조 단백질을 제외한 캡시드를 이루는 구조 단백질을 발현시켜 감염능력이나 복제능력은 없으나, 구제역 바이러스의 외형을 갖춰 항원성이 뛰어난 재조합 항원이다. 백신 개발을 위한 구제역 바이러스의 ECP 항원을 구현하려는 시도는 있었으나, 매우 낮은 수율로 인해 산업화에 어려움이 있다. 낮은 수율의 원인으로는 3C 프로테아제가 발현 숙주 세포 내에서 독성을 나타내기 때문에, 지속적인 배양을 어렵게 하는 것이다. 이에, 3C 프로테아제의 역할은 유지하되, 일부 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시켜 발현 숙주세포 내에서는 독성을 불활화시키고, 발현 수율을 높일 필요성이 있다.
- [0005] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 구조 단백질 VP1과 비구조 단백질 2A의 3C 프로테아제에 의한 자가조립(self-assembly)이 가능하면서도, 숙주 세포 성장에 영향을 미치는 3C 프로테아제 활성을 감소시킨 ECP 항원을 완성하였다. 또한, ECP 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 선별하고, 이를 이용한 구제역 바이러스 0형의 검출 성능을 검증하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0006] 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 에피토프와 특이적으로 결합하는 구제역 바이러스 0형에 면역 반응성을 나타내는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0007] 다른 양상은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 구제역 바이러스 0형에 대한 항체 검출용 조성물을 제공한다.
- [0008] 또 다른 양상은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 구제역 바이러스 0형 항원 검출용 조성물을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

- [0009] 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 에피토프와 특이적으로 결합하는 구제역 바이러스 0형에 면역반응성을 나타내는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0010] 상기 구제역 바이러스는 피코르나바이러스과 아프타바이러스(Aphthovirus) 속에 속하며, 외피가 없이 4 종류의 구성 단백질로 구성된 캡시드(Capsid) 단백질이 5' 말단에 VPg 단백질이 공유 결합된 외가닥의 (+)RNA를 둘러싸고 있는 형태로 존재한다. 상기 바이러스는 7 종의 혈청형인 0, A, Asia1, C, SAT1, SAT2 및 SAT3으로 구성되며, 상기 혈청형간 상호 방어 면적이 형성되지 않는 것으로 알려져 있다. 국내 상시 백신주로 선정되어 있는 백신 중 러시아산 아리아백은 0형 프리모스키(primorsky) 주를 대상으로 하고 있으나, 아직까지 이에 대한 구조 단백질 전장 아미노산 서열 또는 게놈 유전자 서열은 국내에 알려진 바가 없다. 이에 따라, 상기 백신이 접종된 검체로부터 이에 따른 항체를 검출하기 위한 다양한 시도가 이루어지고 있으나, 아직은 미흡한 실정이다.
- [0011] 상기 에피토프(epitope)는 항원 특이성을 결정하는 특정한 입체분자구조 부위를 의미한다. 상기 에피토프는 서

열번호 1의 서열과 60% 이상, 예를 들면, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 에피토프는 서열번호 1의 서열에서 1개 이상의 아미노산, 2개 이상의 아미노산, 3개 이상의 아미노산, 4개 이상의 아미노산, 5개 이상의 아미노산, 6개 이상의 아미노산 또는 7개 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 갖는 에피토프일 수 있다. 본 명세서에서 상기 '에피토프'는 '항원결정기(antigenic determinant)'와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

- [0012] 상기 항체는 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 상기 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 조합을 의미한다. 상기 항체의 형태는 다중클론성 항체, 단일클론성 항체, 또는 재조합 항체, 예를 들어, ScFv 단편, 디아바디, 단쇄 항체 등을 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 완전한 형태 온전한 항체의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위 즉 결합 도메인을 가져 항원 결합 기능을 보유하고 있는, 항체 분자의 기능적 단편 또한 포함할 수 있다.
- [0013] 상기 중쇄(heavy chain)는  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$  5가지 종류가 있으며 중쇄가 항체의 종류를 결정지을 수 있다.  $\alpha$ 와  $\gamma$ 는 450개,  $\mu$ 와  $\epsilon$ 는 550개의 아미노산으로 구성되어 있다. 중쇄는 두 영역 즉 가변 영역과 불변 영역이 있다.
- [0014] 상기 경쇄(light chain)는  $\lambda$ ,  $\kappa$  2가지 종류가 있으며 대략 211 내지 217개의 아미노산으로 구성될 수 있다. 사람의 항체 각각에는 모두 동일하게 1가지의 쇄만이 존재한다. 경쇄는 불변 영역과 가변 영역이 연속적으로 이루어져 있다.
- [0015] 상기 항원-결합 단편(antigen-binding fragment)은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩티드의 일부를 말한다. 예를 들어, 항원-결합 단편은 scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fv, Fab, Fab', Fv F(ab')<sub>2</sub>, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0016] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 HCDR1, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 HCDR2, 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 LCDR1, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 LCDR2, 및 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [0018] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 구제역 바이러스 0형 구조 단백질 VP1 부위에 대한 특이적인 면역 반응성 또는 바이러스 중화능을 나타내는 것일 수 있다. 상기 면역 반응성은 항원성 자극에 따른 면역 반응이 나타나는 것을 의미할 수 있다. 상기 면역 반응은 항원에 대한 세포성 면역능 또는 체액성 면역능이 상승되는 것을 포함할 수 있다. 상기 바이러스 중화능은 바이러스 중화항체에 의해 바이러스의 감염력이 특이적으로 억제 또는 소실되는 것을 의미할 수 있다. 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 구제역 바이러스 진천주 0형의 구조 단백질 재조합 항원과 함께 제공될 경우, 구제역 바이러스 항체와의 경쟁적인 항원-항체 반응이 유발될 수 있다. 여기에서, 상기 항체는 0형 진천주에 대한 항체뿐만 아니라, 0형 프리모스키주에 대한 항체 역시 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 항체 또는 이의 항원 결합-단편은 구제역 바이러스 진천주 0형의 구조단백질 재조합 항원을 사용하여 제조된 것일 수 있다. 또한, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 수탁번호 KCLRF-BP-00465로 기탁된 하이브리도마 세포로부터 생산되는 것일 수 있다. 또한, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 단일클론성(monoclonal) 항체일 수 있다.
- [0021] 다른 양상은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 구제역 바이러스 0형에 대한 항체 검출용 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0023] 상기 항체는 바이러스나 독소, 효소 등의 생리활성 물질 등에 결합하여 이들의 병원성이나 생물학적 활성을 저해하는 항체를 의미한다. 특히, 어느 종류의 바이러스로 감염된 환자의 혈청 중에는 바이러스의 증식을 억제하는 항체인 중화항체가 존재하여, 이의 정량을 진단이나 역학 조사에 이용할 수 있다.
- [0024] 상기 구제역 바이러스 0형에 대한 항체는 개체 내 형성된 항체를 의미하며, 중화항체 또는 비중화항체를 포함할

수 있다.

- [0025] 일 실시예에 따른 항체 검출용 조성물에서, 형성된 항원-항체 복합체는 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 확인하는 것일 수 있다. 상기 효소면역흡착법에는 생물학적 시료에 존재하는 각종 질병 원인체에 대한 항체가 고체 지지체에 부착된 항원과 반응하여 표지된 항체의 항원과의 반응이 방해되는 원리를 이용하는 블로킹 ELISA; 표지항체와 생물학적 시료에 존재하는 질병원인체에 대한 항체가 고체지지체에 부착된 항원과 반응하기 위해 동시에 경쟁하는 원리를 이용하는 경쟁적 ELISA; 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA; 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차항체를 이용하는 간접적 ELISA; 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA; 및 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함할 수 있다. 또한, 상기 항체는 검출 표지와 결합 또는 접합되어 있을 수 있으며, 만일 상기 항체가 검출 표지와 결합되어 있지 않은 경우, 상기 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리함으로써, 형성된 항원-항체 복합체를 확인할 수 있다.
- [0026] 또한, 상기 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 또는 섬광계수법(scintillation counting method)으로 검출할 수 있다.
- [0027] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 구제역 바이러스 0형 구조 단백질에 대하여 구제역 바이러스 항체와 경쟁적으로 반응할 수 있으므로, 상기 구제역 바이러스 항체를 검출 또는 그 수준을 평가하는데 이용될 수 있다. 이를 위하여, 상기 항체 검출용 조성물은 전술한 항체 또는 이의 항원-결합 단편뿐만 아니라, 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 재조합 항원, 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 재조합 항원을 추가로 포함할 수 있다. 여기에서, 상기 재조합 항원은 서열번호 10의 서열과 60% 이상, 예를 들면, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 항원은 서열번호 10의 서열에서 1개 이상의 아미노산, 2개 이상의 아미노산, 3개 이상의 아미노산, 4개 이상의 아미노산, 5개 이상의 아미노산, 6개 이상의 아미노산 또는 7개 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 갖는 항원일 수 있다.
- [0028] 일 구체예에 있어서, 상기 항체 검출용 조성물은 키트 형태로 제공될 수 있다. 상기 키트는 경쟁적 ELISA법을 위한 것일 수 있으며, 구체적으로, 표면에 항원이 고정 또는 접합되어 있는 고체상 지지체를 포함하는 기질; 및 전술한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 시약을 포함하는 것일 수 있다. 여기에서, 상기 항원은 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 재조합 항원, 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 재조합 항원일 수 있고, 상기 항체는 검출 표지와 결합되어 있는 것일 수 있으나, 이는 검출 조건, 검출 방법, 검출 대상, 및 검출 목적 등에 따라 적의 변경 가능하다.
- [0029] 상기 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96-웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 상기 검출 표지는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 또는 방사성 동위원소를 포함할 수 있다. 검출 표지로서 사용되는 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제,  $\beta$ -D-갈락토시다제, 홀스래디쉬 퍼옥시다제 및  $\beta$ -라타마제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  킬레이트, 크립테이트, FITC, RITC 등을 포함하며, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르 및 이소루미놀 유도체 등을 포함하며, 미소입자로는 콜로이드 금 및 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는  $^{57}\text{Co}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  및  $^{125}\text{I}$ -볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함한다.
- [0031] 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여, 상기한 기질, 및 검출 표지와 결합된 항체뿐만 아니라, 적당량의 완충용액, 발색 기질 등을 추가로 포함할 수 있으며, 이 뿐만 아니라, 당업계 공지 기술이 비제한적으로 적용될 수 있다.
- [0032] 일 실시예에 따르면, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 구제역 바이러스 항체와 구제역 바이러스 구조 단백질에 대하여 경쟁 접촉하므로, 상기 항체 또는 항원-결합 단편의 결합에 의해 형성된 복합체의 농도가 높게 검출되는 경우, 항체가 낮은 것으로 판단할 수 있다. 또한, 상기 복합체의 농도가 낮게 검출되는 경우, 항체가 높은 것으로 판단할 수 있다.

- [0033] 예를 들어, 상기 개체로부터 분리된 시료에 구제역 바이러스 0형 항체가 부재하거나 거의 없는 경우에는, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 시료에 존재하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프에 높은 비율로 결합한다. 반대로, 상기 시료에 구제역 바이러스 0형 항체가 존재하는 경우에는, 상기 에피토프에 대한 결합 경쟁이 일어나므로 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 낮은 비율로 결합한다. 따라서, 상기 신호 정도가 약하게 나타나는 경우, 상기 개체를 구제역 바이러스 0형 항체 양성으로 판단할 수 있고, 상기 신호 정도가 강하게 나타나는 경우, 상기 개체를 구제역 바이러스 0형 항체 음성으로 판단할 수 있다.
- [0035] 또 다른 양상은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 구제역 바이러스 0형 항원 검출용 조성물을 제공한다.
- [0036] 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0037] 상기 검출용 조성물은 구제역 바이러스 0형 항원 구조 단백질 VP1에 특이적으로 결합할 수 있으므로 상기 구제역 바이러스 감염 여부를 진단할 수 있다. 또한, 상기 검출용 조성물은 구제역 백신접종 이후에 백신에 대한 접종 여부를 확인할 수 있다.
- [0038] 상기 검출용 조성물은 구제역 바이러스의 감염이 의심되는 개체로부터 분리된 시료로부터 구제역 바이러스의 감염을 진단할 수 있다.
- [0039] 상기 시료는 생물학적 시료일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 세포, 기관, 세포 용해물, 전혈, 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 세포 외액, 체액, 소변, 분변, 조직, 골수, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 이들의 조합일 수 있다. 구체적으로, 상기 시료는 체액, 혈장, 혈청, 혈액, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0040] 상기 개체는 구제역 바이러스에 감염될 수 있는 모든 생물체를 의미하며, 소, 돼지, 면양, 염소, 사슴, 낙타 등을 포함한 우제류 동물일 수 있다.

**발명의 효과**

- [0041] 일 양상에 따른 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 에피토프와 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 기존의 재조합 항원에 비해 향상된 발현 수율을 나타낸다.
- [0042] 다른 양상에 따른 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 구제역 바이러스 검출용 조성물은 기존의 ELISA 구제역 바이러스의 진단 방법에 비해 개선된 진단 감도 성능을 나타낸다.

**도면의 간단한 설명**

- [0043] 도 1은 FMDV 구조 단백질 항원 개발 전략을 나타낸 도면이다.
- 도 2는 FMDV 0형 진천주 P1(VP4231) 항원의 정량하여 농도를 확인한 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 정제된 FMDV 0형 진천주 ECP 항원의 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 FMDV 0형 진천주 P1(VP4231) 배칼로 항원의 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 5는 항체 개발 프로세스를 나타낸 도면이다.
- 도 6은 배칼로 FMDV ECP(마우스 #1) 또는 P1(마우스 #2) 항원으로 면역화된 마우스의 항혈청에 대한 역가 검정 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 7은 FMDV 구조 단백질 VP1에 특이적으로 결합하는 선별된 항체의 에피토프를 확인한 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 8은 FMDV 0형 진천주 ECP 항원 및 선별 항체를 이용한 FMDV 0형 항체 경쟁적(competitive) ELISA의 모식도를 나타낸 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0044] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 실시예 1: FMDV ECP 항원 및 FMDV 구조단백질 P1 항원 개발

[0047] 1-1. FMDV ECP 유전자 합성 및 클로닝

[0048] 현재 구제역 바이러스(Foot-and-Mouth Disease Virus: FMDV)의 국내 상시 백신주로 선정되어 있는 백신 중 러시아산 아리아백은 0형 프리모스키(primorsky) 주를 대상으로 포함하고 있다. 한편, 0형 프리모스키주와 관련하여, 아직까지 구조 단백질 전장 아미노산 서열 또는 게놈 유전자 서열이 알려진 바 없으며, 구조 단백질의 일부 분인 VP1의 서열만이 공개되어 있는 상황이다. 이러한 기술적 배경 하에서, 본 실시예에서는 국내에서 분리된 바 있는 진천주 구제역 바이러스, 구체적으로 0형 진천주 구제역 바이러스의 구조 단백질을 대상으로 재조합 항원을 제조하였다.

[0049] FMDV 0형 진천주에 대한 재조합 ECP(empty capsid particle) 항원의 제작을 위해, 공지된 유전자 정보인 NCBI Accession No. KX1625590를 참고하여, 구조 단백질에 관여하는 P1-2A-FS3C(C142T)를 DNA 주형(template)으로 합성을 진행하였다. 유전자 합성시, 배큘로바이러스(baculovirus)의 발현 숙주세포인 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)에 코돈-최적화를 진행하여 이중 단백질의 고효율 생산을 시도하였다.

[0051] 1-2. FMDV 구조단백질 P1 유전자 합성 및 클로닝

[0052] 상기 제작한 상기 ECP 항원은 구조 단백질을 형성하는 P1-2A 및 3C 프로테아제를 같이 발현시킨 것으로, 3C 프로테아제의 142번째 아미노산인 시스테인(C)을 트레오닌(T)으로 치환시키고 치환된 3C 프로테아제 앞에 HIV-1 리보솜 프레임 시프트(ribosomal frameshift: FS)을 위치시킴으로써, 세포 내 독성으로 인한 낮은 발현율 문제를 해결하고자 하였다. 다만, 정제 과정에서 많은 시간이 소요되는 문제점이 여전히 존재한다. 또한, 온전한 P1-2A를 동물 세포(mammalian cell)에 발현시킨 경우의 FMDV 항원 ELISA 분석을 통해 효과적인 항원성을 나타내며 특히, FMDV의 주요 수용체인 인테그린  $\alpha\beta 6$ 에 효과적으로 결합하는 것이 보고된 바 있다. 이에, 도 1에 나타낸 바와 같이, 발현 수율이 향상된 ECP 항원 외에도, 효과적인 항원성을 나타내는 FMDV 구조 단백질 P1 항원을 개발하고자 하였다.

[0053] FMDV 0형 진천주에 대한 재조합 구조단백질을 포함하는 P1(VP4, VP2, VP3, VP1) 전장을 배큘로바이러스 발현 벡터에 클로닝하기 위해, FMDV 0형 구조 단백질 P1을 설계한 후, 유전자를 합성하고자 하였다. 합성된 유전자를 주형으로 PCR을 수행하여, FMDV 0형 진천주(KX162590) P1의 증폭된 DNA를 획득하였다. PCR을 수행하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

약자	프라이머 서열(5'-3')	방향
Jincheon P1 F	5'-GGA TCC gga gcc ggg caa tcc-3'	정방향
Jincheon P1 R	5'-GTC GAC caa gga ctg ctt tac-3'	역방향

[0055] 1-3. FMDV ECP 및 FMDV P1의 발현벡터의 제조

[0056] FMDV ECP 항원 및 P1 전장 단백질을 배큘로바이러스 발현 시스템을 이용한 클로닝, 배양 및 정제를 진행하고자 하였다. 재조합 FMDV 구조 단백질을 포함하는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 P1-2A-FS3C(C142T), 및 P1(VP4231) 항원을 각각 발현시키기 위하여, 상기 합성된 각각의 유전자를 배큘로바이러스 발현 벡터에 클로닝하였다. 이를 통해, 발현 및 정제된 항원 후보들은 반응성 여부를 확인하여, ELISA 플레이트의 코팅 원료 및 항체 개발시 면역원으로 활용하였다.

[0057] FMDV 0형 진천주 P1-2A-FS3C(C142T) 및 P1(VP4231) 항원 발현을 위하여, 각각 다음의 과정을 수행하였다. 발현 벡터인 pFastbac 벡터 (Invitrogen, Cat No.10360-014, USA)를 준비하고, FMDV 0형 진천주 P1-2A-FS3C(C142T) 또는 P1(VP4231)의 프라이머 연결 부위(primer linker site)를 BamHI(NEB, Cat No. #R0136S, USA) 및 SalI(NEB, Cat No.#R0138S, USA)으로 절단하여, 아가로스 겔에 전기 영동하였다. 이를 유전자 클린 키트(Gene Clean Kit, MP biochemical, Cat No.#1101-400, France)를 이용하여 FMDV 0형 진천주 P1-2A-FS3C(C142T) 또는 P1(VP4231)을 추출 하였다. BamHI 및 SalI로 처리된 FMDV 0형 진천주 P1-2A-FS3C(C142T) 또는 P1(VP4231) 삽입용 벡터와 BamHI 및 SalI로 처리된 pFastbac 벡터를 섞어준 후, T4 DNA 리가아제(Roche, 10481220001, Germany)를 이용하여 16°C에서 하룻밤 동안 접합시킨 후, 수용성 세포 Top10F'에 형질전환 시켰다.

[0058] 형질전환은 열-충격법(Heat-shock)으로, -70°C에 보관된 수용성 세포를 꺼내어 얼음 위에서 해동시킨 후, 라이게이트(ligate)를 5uL 넣어 3초 간 혼합한 후, 얼음에서 30분 간 정치시켰다. 반응물이 혼합된 수용성 세포가 들어있는 튜브를 42°C의 항온 수조에 90초 간 정치시킨 후, 즉시 얼음에 넣어 주었다. 튜브에 LB 액체 배지를

1mL 넣고, 37°C에서 1시간 반응 시킨 후, 선별 마커로서 암피실린이 포함된 LB 아가 플레이트에 100uL의 균액을 도말하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. LB 아가 플레이트에 자란 콜로니를 액체 LB 배지에 접종하였다. 세포가 자랐을 때, Wizard Plus SV Minipreps Kit (Promega, Cat No.#A1460, USA)를 이용해서 DNA를 추출하고, 추출한 DNA를 시퀀싱을 통해 확인 하였다.

[0060] 1-4. FMDV ECP 및 FMDV P1의 재조합 Bacmid의 선별

[0061] pFastbac FMDV 0형 진천주 P1-2A-FS3C(C142T) 및 pFastbac FMDV 0형 진천주 P1(VP4231)을 각각 만들기 위해, DH10bac 수용성 세포에 FMDV 0형 진천주 P1-2A-FS3C(C142T) 또는 P1(VP4231) 플라스미드 DNA를 적당량 혼합하여, 10분 간 얼음에 정치시킨다. 42°C 수조에서 90초 간 열-충격시킨 후, 얼음에 5분 간 다시 정치하였다. 1mL의 LB 브로스(Broth)를 첨가 후 37°C에서 4시간 동안 진탕 배양(shaking incubation)하였다. 항생제가 첨가된 LB 아가 플레이트에 도말한 후, 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 흰색의 콜로니만을 선별하여 배양한 후, 플라스미드를 소량 추출(mini-prep)하였다. M13 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR을 실행하여, 재조합 bacmid를 확인하였다.

[0063] 1-5. FMDV ECP 및 FMDV P1(VP4231) 의 형질주입 및 배양

[0064] FMDV 0형 진천주 P1-2A-FS3C(C142T) 및 FMDV 0형 진천주 P1(VP4231) 각각의 배양로 항원의 제조는 세포 펙틴(pectin) 시약(Invitrogen, Cat No. 10362-100, USA)을 이용하여 형질주입하였다.  $2 \times 10^6$ 의 sf9 세포를 6-웰 배양 플레이트에 분주하고, 1시간 동안 정치한 후, 항생제가 들어있지 않은 배지로 2회 세척하였다. 10 uL의 bacmid를 항생제가 포함되지 않은 배지 100 uL와 혼합하고, 약 8 uL의 세포 펙틴 시약을 항생제가 포함되지 않은 배지 100 uL와 혼합하였다. bacmid가 혼합된 배지와, 세포 펙틴 시약이 포함된 배지를 혼합하여, 실온에서 25분 간 정치한 후, 항생제가 들어있지 않은 배지 800uL를 첨가하였다. 혼합한 재조합 bacmid 복합체를 상기의 sf9 세포 플레이트에 점적하였다. 27°C에서 5시간 배양한 후, 상청을 제거하고, 2% FBS가 첨가된 배지에서 4일 동안 배양하였다. 바이러스 증식의 지표인 세포 병변(Cytopathic effect: CPE)을 확인한 후, 계대 배양하여 사용하였다.

[0066] 1-6. FMDV ECP 및 FMDV P1(VP4231) 항원의 정제

[0067] 상기 배양된 형질주입된 세포로부터 유전자 재조합 항원을 정제하기 위해, FMDV 0형 진천주 P1-2A-FS3C(C142T)의 경우 FMDV 0형 진천주 P1-2A-FS3C(C142T) 배양로 배양액을 수득하여 원심분리(3000rpm, 10분)를 통해 회수한 펠렛을 PBS와 혼합하여 풀어준 후, 동결-해동 과정을 통해 세포를 용해시켰다. 이후, 원심분리(12,000rpm, 10분)를 통해 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액은 30% 수크로스(PBS 내 w/v) 기울기 분리(gradient fractionation)하여 100,000xg로 16시간 원심분리한 후, 최상층부분만을 취하였다. 회수된 정제 항원을 BCA 정량법을 통해 정량하여 농도를 확인하였다.

[0068] FMDV 0형 진천주 P1(VP4231)의 경우, 유전자 재조합 항원에 포함된 히스티딘-태그를 이용한 친화성 크로마토그래피를 수행하였다. 항원 배양액을 초음파 파쇄기로 파쇄하고, 원심분리를 통해 상청을 회수하였다. 회수된 상청을 Ni-NTA가 결합된 레진 컬럼을 통과시켜, 레진에 표적 항원이 결합되도록 한 후, 이미다졸 용액의 농도별 기울기 용리(gradient elution)를 수행하였다. 용출된 농도 부분별로, 용출액을 SDS-PAGE를 통해 표적 단백질이 함유된 분획 튜브(fraction tube)를 선별하고 회수하였다. 회수된 정제 항원을 BCA 정량법을 통해 정량하여 농도를 확인하였다. 그 결과, P1-2A-FS3C(C142T) 유전자 재조합 항원의 경우, VP1, VP2, VP3 및 VP4인 4개의 항원 단편이 조합된 빈 캡시드 입자 형태이므로 SDS-PAGE 결과, 뚜렷한 하나의 항원 밴드를 확인할 수 없었다. 이와 달리, 도 2에 나타낸 바와 같이, FMDV 0형 진천주 P1(VP4231) 재조합 항원은 SDS-PAGE 결과에서 뚜렷한 하나의 밴드가 확인되어, 정제됨을 확인하였다.

[0070] 1-7. FMDV ECP 항원의 발현 확인

[0071] 상기 실시예 1-6에서 정제된 FMDV 0형 진천주 ECP 항원의 발현 유무를 확인하기 위하여 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 도 3은 정제된 FMDV 0형 진천주 ECP 항원의 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 것이다. 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, VP1 특이적인 항체를 이용하여 VP1 크기에 해당하는 약 24 kDa에서 반응성 밴드가 나타났으므로, 이를 통해 ECP 항원의 발현을 확인할 수 있다. 특히, 3C 프로테아제 야생형(WT)으로 발현시킨 ECP 항원에서는 VP1항체와의 반응하는 밴드 신호가 미미하였으나, 3C(C142T)로 발현시킨 ECP 항원에서는 VP1 크기의 밴드가 확실한 신호로 나타났다. 이는 3C 프로테아제의 변이를 통해 발현 수율이 향상되었음을 의미한다.

[0073] 1-8. FMDV P1(VP4231) 항원의 발현 확인

[0074] 상기 정제된 FMDV 0형 진천주 P1(VP4231) 항원의 발현 유무를 확인하기 위해 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 도 4는 FMDV 0형 진천주 P1(VP4231) 배클로 항원의 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 도면이다. 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 구조단백질 P1에 특이적인 항체를 이용하여 P1 크기에 해당하는 약 150 kDa에서 반응성 밴드가 나타났으므로, 이를 통해 FMDV 0형 진천주 P1(VP4231) 배클로 항원의 발현을 확인할 수 있다.

[0076] **실시예 2: FMDV ECP 및 FMDV P1(VP4231) 항원의 성능 확인**

[0077] 상기 정제된 항원을 마이크로플레이트에 코팅한 후, FMDV 0형 항체에 대한 음성 혈청과 양성 혈청을 검체로 한 인다이렉트(indirect) ELISA를 이용하여 항원성을 검증하고자 하였다.

[0078] 플레이트에 1/10배로 희석한 검체를 주입한 후, 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척을 통해 반응하지 않은 검체를 제거하고, 2차 항체-HRP를 주입한 후, 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이때, 소 혈청에는 항-Bovine IgG-HRP, 돼지 혈청에는 항-Pig IgG-HRP를 반응시켰다. 세척을 통해 반응하지 않은 잔여 HRP 접합체를 제거한 후, TMB 기질을 상온에서 15분 동안 반응시킨 후, 반응을 정지시키고 흡광도를 측정하여 결과를 표 2에 나타내었다. 그 결과, 표 2에 나타낸 바와 같이, 소 혈청 및 돼지 혈청의 음성과 양성 반응 신호의 차이를 확인하였고, 그 신호 차이의 수준은 Prionics사의 플레이트와 동등하거나 그 이상의 신호를 나타내었다. 이러한 결과를 통해, 실시예 1에서 제작한 ECP 및 P1(VP4231) 항원의 항원성을 확인할 수 있다.

**표 2**

2차 항체-HRP	검체		플레이트		
			JC ECP	JC P1	Prionics
항-Bovine IgG-HRP	음성 혈청	음성 소혈청	0.0580	0.0580	0.0590
	manisa 백신접종 소혈청	양성 소혈청 1	1.6350	1.5220	0.8000
		양성 소혈청 51	1.3240	1.2060	0.8360
		양성 소혈청 58	0.1980	0.1170	0.1540
항-Pig IgG-HRP	음성혈청	음성 돼지혈청	0.0930	0.1060	0.0810
		음성 돼지혈청 (5A-5)	0.0630	0.0650	0.0570
	Primorsky 백신접종 돼지혈청	2-125	0.3240	0.3840	0.4960
		3-213	0.3080	0.2720	0.4840
		4-225	0.4560	0.3830	0.4630
	FMDvirus 공격접종 돼지혈청	DPE-4	0.2460	0.2930	0.4940
		DPE 11	0.3540	0.4180	0.3570
		DPE 23	0.4620	0.4100	0.3470
		DPE 27	0.5640	0.4730	0.3910

[0080] 상기 실시예 1에서 제작한 2종의 항원 중에서, FMDV 0형 진천주 P1(VP4231) 항원에 비하여 ECP 항원의 발현 및 정제 수율이 더 높았으므로, ELISA 키트의 플레이트 코팅 원료로 FMDV 0형 진천주 ECP 항원을 선정하였다.

[0081] **실시예 3: FMDV 재조합 항체의 개발**

[0082] **3-1. 항체 개발 프로세스**

[0083] 도 5는 항체 개발 프로세스를 나타낸 도면이다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 하이브리도마 세포주의 개발에 필요한 면역화된 마우스를 얻기 위하여, 면역원 및 완전 프로인트 항원 보강제(complete Freund's adjuvant)를 1:1로 혼합하여 자성의 6주령 Balb/c 마우스의 복강 내에 주사하였다. 동일한 방법으로 일주일 간격으로 3회 추가 면역을 수행하였다. 마지막 4차 면역 일주일 후에, 면역원으로 사용하였던 동일한 항원을 상기 마우스의 꼬리정맥에 1일 간격으로 3회 주사하여 부스팅(boosting)하였다. 세포융합을 수행하기 전에 면역화된 마우스의 꼬리에서 채혈하여 혈청을 확보한 후, ELISA 방법을 통해 면역원에 대한 항체 역가가 증가함을 확인함으로써 면역 여부를 확인하였다. 항체 역가를 확인하여 항체의 양이 충분하게 얻어지는 마우스를 선별하여 세포융합 과정을 수행하였다. 면역화된 마우스의 비장을 적출하여 세포를 분리하고, 비장세포 1개와 골수중세포 5개를 확보하여 하이브리도마 세포를 제조하고, 이를 배양하였다.

[0084] 하이브리도마 세포군 중에서도 FMDV에만 특이적으로 반응하는 세포를 선별하기 위해, 항원을 코팅한 마이크로플레이트를 이용하여 ELISA를 수행하였다. ELISA를 수행한 결과, 항원과 특이적으로 높은 결합력을 갖는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주들을 선별하였다.

[0086] 3-2. 항체 개발에 사용한 면역원

[0087] 항체 개발에 사용한 면역원으로는 상기 실시예 1에서 제작한 제조합 ECP 항원 및 P1 항원의 배클로 항원 외에도, 정제 바이러스(purified virus), 백신 및 펩타이드 총 4가지 유형의 면역원을 사용하여 항체 개발을 시도하였다. 면역원에 대한 자세한 정보는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

표적	면역원 유형	세포주	출처
ECP	배클로	진천	바이오노트
P1	배클로	진천	바이오노트
Native	정제 바이러스 (BEI 불활성화)	보은	검역본부
0형 구조 단백질	백신	캄포스(Campos)	Biogenesis Bago
0형 구조 단백질	백신	프리모스키	FGBI ARRIAH
VP1 G-H 루프	펩타이드	프리모스키	웹트론

[0089] 3-3. 면역화된 마우스의 역가 검정

[0090] 일정 기간 동안 면역화된 마우스의 안구에서 소량 채혈하여 얻은 항혈청은 면역원이 코팅된 마이크로플레이트를 이용하여 인다이렉트 ELISA 검사 방법으로 역가 검정을 실시하여 면역 여부를 확인 하였다. 도 6은 배클로 FMDV ECP(마우스 #1) 또는 P1(마우스 #2) 항원으로 면역화된 마우스의 항혈청에 대한 역가(antibody titer) 검정 결과를 나타낸 도면이다. 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 배클로 ECP 항원 또는 P1 항원으로 면역화된 마우스는 면역화가 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있다. 이에, 상기 마우스의 비장을 적출하여 골수종 세포와 융합함으로써, FMDV 0형에 면역반응성을 나타내는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주를 제조하였다.

[0092] 3-4. 하이브리도마 세포주 선별

[0093] 상기 제조된 하이브리도마 세포주를 일정기간 동안 배양한 후, 인다이렉트 ELISA 방법을 이용하여 항원과 특이적으로 높은 결합력을 갖는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주들을 선별하고자 하였다. 하기 표 4에 나타낸 바와 같이, 현재까지 개발된 항체는 총 375 클론이고, 이 중 349개의 항체를 정제 완료하여 ELISA 진단법 적용에 적합한 항체 원료의 선별 시험을 진행하였다. 하이브리도마 세포주의 배양액 상청을 이용한 ELISA를 실행한 결과, 다른 유형의 면역원을 사용하여 개발된 항체에 비해, 배클로 ECP 항원 또는 P1 항원을 면역원으로 사용한 경우, 총 200 클론의 하이브리도마 세포주의 배양 상청액에서 높은 결합력을 보이고 있으므로, 이를 선별하여 항체를 생산하였다.

표 4

면역원				항체개발
표적	면역원 유형	균주	제조사	클론
ECP 또는 P1	배클로	진천	바이오노트	200
Native	정제 바이러스 (BEI 불활성화)	보은	검역본부	135
0형 구조 단백질	백신	캄포스	Biogenesis Bago	14
0형 구조 단백질	백신	프리모스키	FGBI ARRIAH	13
VP1 G-H 루프	펩타이드	프리모스키	웹트론	13

[0095] 3-5. FMDV 0형에 면역반응성을 나타내는 항체의 선별

[0096] 상기 표 4에 나타낸 바와 같은 349개의 개발된 항체 중 검출자(Detector)로 사용 가능한 항체를 선별하기 위하여, 후보 항체 원료를 모두 홀스래디쉬 퍼옥시다아제(Horseradish peroxidase: HRP)와 결합시켰다. 이후, 상기 실시예 1에서 개발한 JC ECP 또는 P1 항원이 코팅된 플레이트에 소 및 돼지의 음성 및 양성 혈청을 검체로 사용하여 검출자와 함께 반응시켰다. 음성 및 양성 검체에 대한 변별력이 있는 클론을 선별한 결과, 클론 8P#10 항체 검출자(Detector #2) 원료를 ELISA에 적용하기로 결정하였다.

[0098] 3-6. 선별된 항체의 에피토프 확인

[0099] 상기 선별된 검출자 클론 8P#10 항체에 대한 에피토프(epitope)를 확인하기 위해, VP0(VP4+VP2), VP3 및 VP1 재조합 단백질로 발현시키고, 클론 8P#10 항체와 각 단백질과의 반응성을 확인하기 위해 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 도 7은 FMDV 구조 단백질 VP1에 특이적으로 결합하는 선별된 항체의 에피토프를 확인한 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 도면이다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 클론 8P#10 항체는 VP1 재조합 단백질에서 반응성을 나타냄을 확인하였다.

[0101] 실시예 4: FMDV O형 항체를 이용한 경쟁적 ELISA의 개발

[0102] 4-1. FMDV O형 항체를 이용한 경쟁적 ELISA의 개발 프로세스

[0103] 도 8에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제작한 FMDV O형 진천주 ECP 항원 및 상기 실시예 3에서 선별한 항체를 이용한, FMDV O형 항체 경쟁적(competitive) ELISA를 개발하였다. 구체적으로, FMDV O형 항체로서 수탁 번호 KCLRf-BP-00465로 기탁된 하이브리도마 세포로부터 생산된 항체를 이용하였다.

[0104] FMDV O형 진천주 ECP 항원이 코팅된 마이크로플레이트에 검체 25uL와 검출자 효소 컨주게이트로서 항체 항-FMDV O형-HRP 컨주게이트 혼합물 100uL를 동시에 주입하여, 37°C에서 90분 간 반응시킨다. 음성 검체의 경우, 플레이트 표면에 있는 항원과 반응할 항-FMDV 항체가 없기 때문에, 함께 주입된 검출자가 모두 항원과 결합된다. 양성 검체의 경우 함께 주입된 검출자와의 경쟁 반응이 유도되게 되어, 플레이트의 항원과 결합하는 검출자가 상대적으로 적게 된다. 따라서 양성 검체의 경우, TMB 발색 및 반응 정지 후의 발색이 약하게 된다. 반면에, 음성 검체의 경우에는 발색이 진하게 이루어진다. 이러한 발색 정도의 차이에 따라, 검체의 FMDV O형 항체에 대해 음성과 양성을 구분 지을 수 있다.

[0106] 4-2. FMDV O형 항체를 이용한 경쟁적 ELISA의 검증: 기존 ELISA 키트와의 성능 비교

[0107] 매니사(manisa) 세포주 기반의 항원 및 항체를 이용한 기존에 개발된 ELISA에서 낮은 검출능이 확인되었던 검체를, 본 발명에서 개발된 진천주 기반의 ELISA 검사법으로 검사하여 그 성능을 비교하였으며, 그 결과는 하기 표 5에 나타내었다. 그 결과, 표 5에 나타난 바와 같이, 기존의 매니사 기반의 ELISA 키트에 비해, 실시예 3의 항체를 이용한 진천주 기반의 경쟁적 ELISA는 양성 개체에 대한 우수한 감도를 보여주었으며, 특히 프리모스키 백신을 접종한 검체에 대한 감도는 현저한 것이었다. 또한, 소 공격접종 초기 DPI-6 검체의 PI 값 역시 유의적으로 향상되었다.

표 5

[0108]

		Prionics		기존 ELISA (manisa 기반)		진천주 기반 ELISA	
		PI	결과	PI	결과	PI	결과
소 필드 혈청	소혈청 4	95.0	Pos.	99.8	Pos.	99.0	Pos.
소 필드 혈청	소혈청 47	67.6	Pos.	69.9	Pos.	62.3	Pos.
소 공격접종 혈청	2910 DPI-6	59.8	Pos.	19.1	-	38.9	-
프리모스키 백신 필드검체	2-125	63.4	Pos.	41.3	-	67.3	Pos.
돼지 공격접종 혈청	DPE 23	77.0	Pos.	46.4	-	52.9	Pos.
프리모스키 백신 접종 돼지 혈청	돼지 pooling 1X	52.4	Pos.	54.1	Pos.	65.6	Pos.
	돼지 pooling 2X	37.5	-	40.0	-	54.9	Pos.
특이도	돼지 5A-5	19.0	-	-43.9	-	21.7	-
	뉴질랜드 소 4-83	14.4	-	10.1	-	28.3	-

[0109] 4-3. FMDV O형 항체를 이용한 경쟁적 ELISA의 검증: Prionics사의 ELISA 키트와의 성능 비교

[0110] 국내 농장에서 확보한 백신 접종 돼지혈청 150개 검체와 백신접종 소혈청 150개 검체에 대한 검사를 통해, FMDV O형 항체를 이용한 경쟁적 ELISA의 민감도 성능을 확인하고자 하였다. 검체에 대한 음성 및 양성 판정 성적은 기존 필드에서 백신접종 항체 가를 검사하는 Prionics 사의 Priocheck FMDV O형 항체 ELISA 키트를 동시에 검사하여 그 판정 결과를 기준으로 하였다. 그 결과, 표 6에 나타난 바와 같이, Prionics사 ELISA 검사 결과를 기준으로 백신접종 돼지혈청에 대한 민감도는 97.3%(144/145), 판정일치율은 96.7%(145/150)이었다. 백신접종 소혈청에 대한 민감도는 100%(139/139), 판정 일치율은 98.0%(147/150)이었다.

표 6

백신접종 돼지혈청		Prionics		
		양성	음성	합계
FMDV 0형 항체	양성	144	1	145
	음성	4	1	5
	합계	148	2	150
백신접종 소혈청		Prionics		
		양성	음성	합계
FMDV 0형 항체	양7성	139	3	142
	음성	0	8	8
	합계	139	11	150

[0111]

[0112]

또한, 구제역 청정국가인 뉴질랜드에서 입수한 43개의 소 음성 검체, 및 48개의 돼지 음성 검체를 대상으로 검사하여, FMDV 0형 항체를 이용한 경쟁적 ELISA의 특이도 성능을 확인하고자 하였다. 그 결과, 소 특이도 100% (43/43), 돼지 특이도 100% (48/48)의 성능을 확인하였다. 해당 검체에 대한 판정 결과는 100% 모두 Prionics사의 ELISA 결과와 일치하였다.

표 7

소 음성 검체		Prionics		
		양성	음성	합계
FMDV 0형 항체	양성	0	0	0
	음성	0	43	43
	합계	0	43	43
돼지 음성 검체		Prionics		
		양성	음성	합계
FMDV 0형 항체	양성	0	0	0
	음성	0	48	48
	합계	0	48	48

[0113]

[0114]

4-4. FMDV 0형 항체를 이용한 경쟁적 ELISA의 검증: 중화시험법과의 성능 비교

[0115]

백신 접종 8주 후에 채혈한 돼지혈청을 검사하여, 상기 개발한 경쟁적 ELISA 방법, Prionics사 ELISA 방법, 및 중화시험법 판정 결과의 비교를 통해, FMDV 0형 항체를 이용한 경쟁적 ELISA 진단법의 민감도 성능을 확인하고자 하였다.

[0116]

그 결과, 하기 표 8에 나타낸 바와 같이, 상기 3종의 키트의 3종의 백신 매니사, 캄포스, 프리모스키 FMDV에 대한 양성 판정률은, 기존의 VNT사의 중화시험법 결과를 100%로 보았을 때, 본 발명의 방법은 매니사 147% (28/28), 캄포스 104% (28/28), 및 프리모스키 158% (30/30)의 민감도 성능을 나타내었다. 반면에, Prionics사의 ELISA 방법은 매니사 132% (25/28), 캄포스 104%(28/28), 및 프리모스키 116%(22/30)의 민감도 성능을 나타내어, 본 발명의 양성률과 비교하여 동등하거나 유사한 민감도 성능을 나타내었다.

표 8

검체 group	검체 수	VNT		바이오노트		Prionics	
		양성판정 수	양성률 (기준)	양성판정 수	양성률	양성판정 수	양성률
O manisa	28	19	100%	28	147%	25	132%
O campos	28	27	100%	28	104%	28	104%
O primorsky	30	19	100%	30	158%	22	116%

[0117]

[0118]

상기와 같은 결과는 기존의 구제역 바이러스의 진단 방법에 비해, ECP 항원 P1-2A-FS3C(C142T)과 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 경쟁적 ELISA 방법은 높은 민감도로 구제역 바이러스를 진단할 수 있음을 보여주는 것이

다.

수탁번호

[0120]

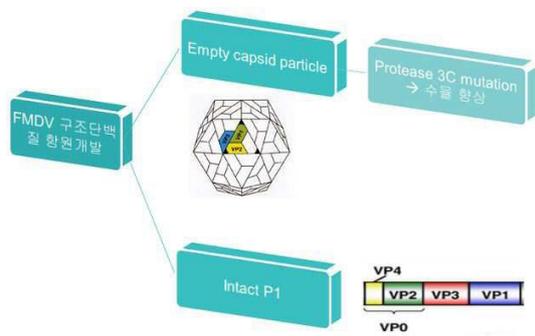
기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00465

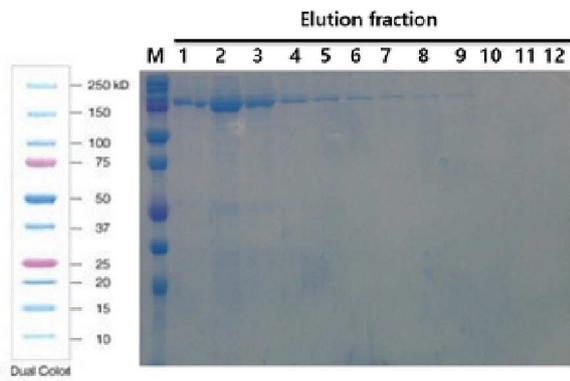
수탁일자 : 20190123

도면

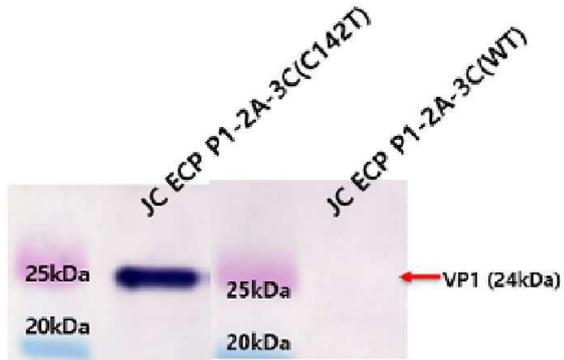
도면1



도면2



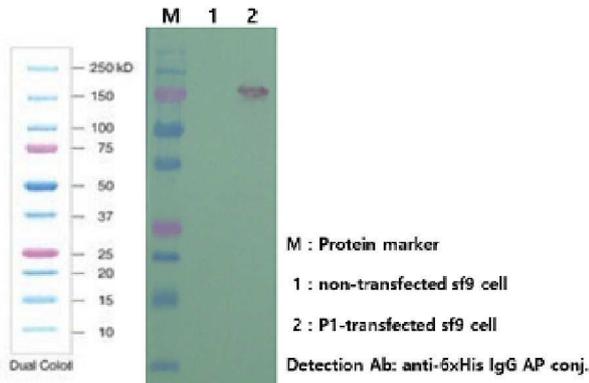
도면3



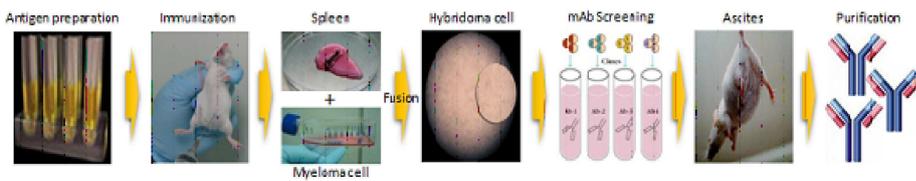
Detection 1<sup>st</sup> Ab: anti-VP1 mouse IgG

Detection 2<sup>nd</sup> Ab: anti-mouse IgG AP conj.

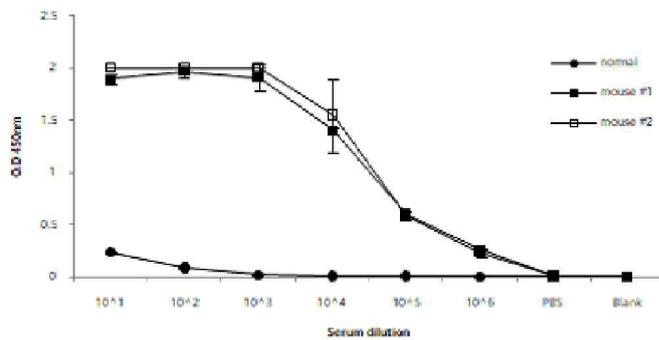
도면4



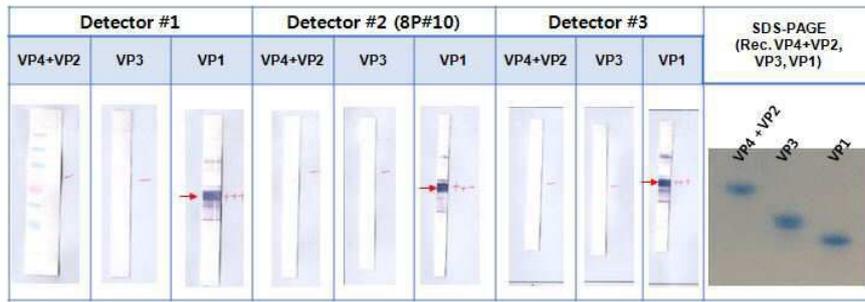
도면5



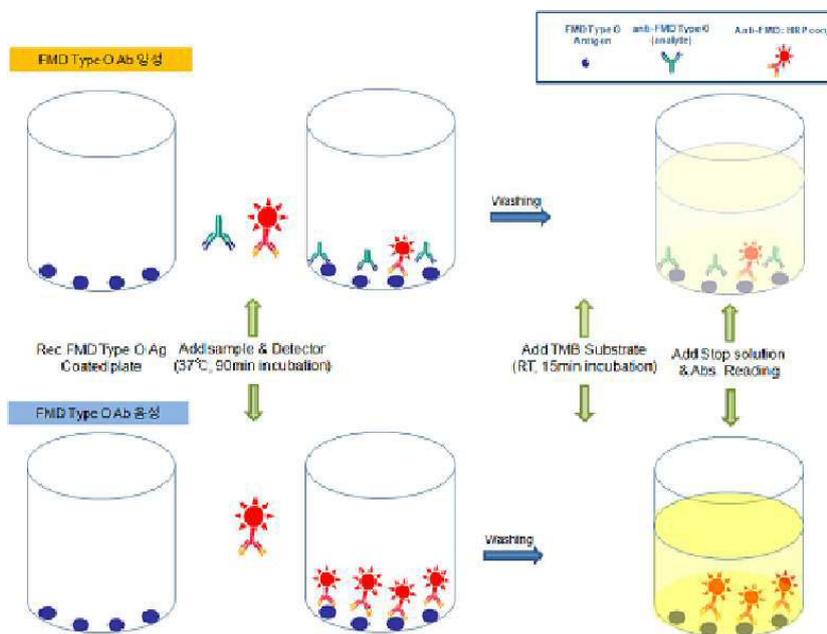
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> REPUBLIC OF KOREA(Animal and Plant Quarantine Agency)  
BIONOTE, INC.
- <120> An antibody having immune reactivity to Foot-and-Mouth Disease  
Virus type 0 and composition for detecting FMDV type 0 comprising  
the same
- <130> PN125521
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 737
- <212> PRT

<213> Foot-and-mouth disease virus

<400> 1

Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser  
 1 5 10 15

Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln  
 20 25 30

Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser  
 35 40 45

Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln  
 50 55 60

Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu  
 65 70 75 80

Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu  
 85 90 95

Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr  
 100 105 110

Gln Ser Ser Val Gly Ile Thr His Gly Tyr Ala Thr Ala Glu Asp Phe  
 115 120 125

Val Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Ile Gln Ala  
 130 135 140

Glu Arg Phe Phe Lys Thr His Leu Phe Asp Trp Val Thr Ser Asp Pro  
 145 150 155 160

Phe Gly Arg Cys Tyr Leu Leu Glu Leu Pro Thr Asp His Lys Gly Val  
 165 170 175

Tyr Gly Ser Leu Thr Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp  
 180 185 190

Val Glu Val Thr Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu  
 195 200 205

Val Ala Met Val Pro Glu Leu Cys Ser Ile Gly Gln Arg Glu Leu Phe  
 210 215 220

Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Met





Leu

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8P#10 antibody HCDR1

<400> 2

Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Ala

1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8P#10 antibody HCDR2

<400> 3

Met Leu Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8P#10 antibody HCDR3

<400> 4

Glu Thr Thr Ile Ile Gly Thr Arg Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8P#10 antibody LCDR1

<400> 5

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
 1                    5                    10                    15

Thr

<210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> 8P#10 antibody LCDR2  
 <400> 6

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1                    5

<210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> 8P#10 antibody LCDR3  
 <400> 7

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr  
 1                    5

<210> 8  
 <211> 122  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> 8P#10 antibody VH  
 <400> 8

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
                   20                    25                    30

Leu Ile Ala Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45

Gly Met Leu Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe



<211> 985  
 <212> PRT  
 <213> Foot-and-mouth disease virus  
 <400> 10  
 Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln Asn  
 20 25 30  
 Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser Asn  
 35 40 45  
 Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln Asn  
 50 55 60  
 Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu  
 85 90 95  
 Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln  
 100 105 110  
 Ser Ser Val Gly Ile Thr His Gly Tyr Ala Thr Ala Glu Asp Phe Val  
 115 120 125  
 Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Ile Gln Ala Glu  
 130 135 140  
 Arg Phe Phe Lys Thr His Leu Phe Asp Trp Val Thr Ser Asp Pro Phe  
 145 150 155 160  
 Gly Arg Cys Tyr Leu Leu Glu Leu Pro Thr Asp His Lys Gly Val Tyr  
 165 170 175  
 Gly Ser Leu Thr Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Val  
 180 185 190  
 Glu Val Thr Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val  
 195 200 205  
 Ala Met Val Pro Glu Leu Cys Ser Ile Gly Gln Arg Glu Leu Phe Gln  
 210 215 220



465                      470                      475                      480  
 Thr Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Leu Phe Gln Ile Thr His Gly Lys  
    485                      490                      495  
 Ala Glu Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Ala Ser Ala Gly Lys Asp Phe  
    500                      505                      510  
 Glu Leu Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Gln Gln Thr Thr Ser Thr Gly  
    515                      520                      525  
  
 Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Ala Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu  
    530                      535                      540  
 Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His Thr Asp Val Ser Phe Ile Leu Asp  
 545                      550                      555                      560  
 Arg Phe Val Lys Val Thr Pro Lys Asp Ser Thr Asn Val Leu Asp Leu  
    565                      570                      575  
 Met Gln Thr Pro Pro His Thr Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Ala Ala  
    580                      585                      590  
 Thr Tyr Tyr Phe Ala Asp Leu Glu Val Ala Val Lys His Glu Gly Asp  
  
    595                      600                      605  
 Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ala Ala Leu Asp Asn Thr  
    610                      615                      620  
 Thr Asn Pro Thr Ala Tyr His Lys Ala Pro Leu Thr Arg Leu Ala Leu  
 625                      630                      635                      640  
 Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly Asn  
    645                      650                      655  
 Cys Lys Tyr Thr Gly Gly Ser Leu Pro Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln  
    660                      665                      670  
  
 Val Leu Ala Pro Lys Ala Ala Arg Pro Leu Pro Thr Ser Phe Asn Tyr  
    675                      680                      685  
 Gly Ala Ile Lys Ala Thr Arg Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys  
    690                      695                      700  
 Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Val His Pro Ser  
 705                      710                      715                      720  
 Ala Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Ser Leu



His Ile Asp Pro Glu Pro His His Glu

980

985