

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2016년 12월 15일 (15.12.2016)



(10) 국제공개번호  
WO 2016/200220 A1

- (51) 국제특허분류:  
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006215
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 10일 (10.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2015-0082132 2015년 6월 10일 (10.06.2015) KR  
PCT/KR2015/005917 2015년 6월 12일 (12.06.2015) KR
- (71) 출원인: 주식회사 이뮤네드 (IMMUNEMED INC.)  
[KR/KR]; 24232 강원도 춘천시 소양강로 32, 2-2, Gangwon-do (KR).
- (72) 발명자: 김윤원 (KIM, Yoon Won); 24414 강원도 춘천시 지석로 67, 206동 1301호, Gangwon-do (KR). 김영진 (KIM, Young Jin); 24336 강원도 춘천시 효자로 101-4, Gangwon-do (KR). 홍효정 (HONG, Hyo Jeong); 06078 서울특별시 강남구 영동대로 128길 5, 101동 405호, Seoul (KR). 박상진 (PARK, Sang Jin); 44218 울산광역시 북구 신천소공원로 15, 104동 1404호, Ulsan (KR). 김민우 (KIM, Min Woo); 24414 강원도 춘천시 지석로 67, 206동 1301호, Gangwon-do (KR). 박성만 (PARK,

Sung Man); 24290 강원도 춘천시 으뜸길 4번길 17, Gangwon-do (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

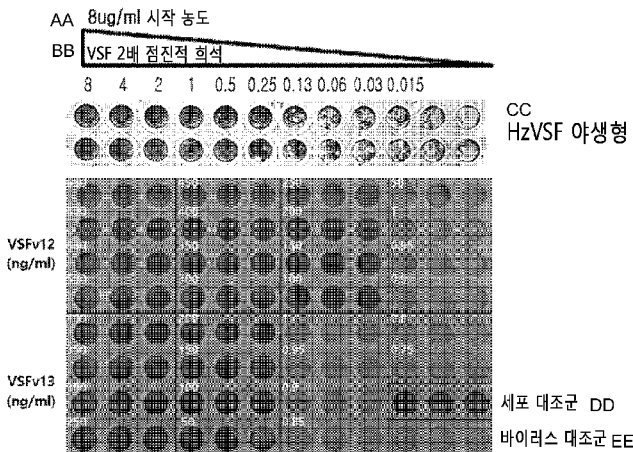
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTIBODY BINDING SPECIFICALLY TO ISOLATED VIMENTIN-DERIVED PEPTIDE, OR BINDING FRAGMENT OF THE PEPTIDE

(54) 발명의 명칭: 분리된 비멘틴 유래 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편



AA ... 8 μg/ml starting concentration  
 BB ... VSF 2-fold gradual dilution  
 CC ... HzVSV wild type  
 DD ... Cell control group  
 EE ... Virus control group

(57) Abstract: The present invention relates to an antibody binding specifically to a peptide of sequence number 1, and, more specifically, relates to: an antibody binding specifically to an isolated peptide of sequence number 1, or a binding fragment of the peptide; a polynucleotide coding for the antibody or the binding fragment of the peptide; a vector comprising the polynucleotide; cells into which the vector has been introduced; a production method for the antibody or the binding fragment of the peptide, using the cells; the antibody or binding fragment of the peptide produced by means of the production method; an antiviral composition comprising the antibody or binding fragment of the peptide; a composition for preventing or treating inflammatory disease, the composition comprising the antibody or the binding fragment of the peptide; and a treatment method for a viral infection, or a treatment method for inflammatory disease, using the composition.

(57) 요약서: 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것으로, 구체적으로는 서열번호 1의 분리된 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 상기 벡터가 도입된 세포, 상기 세포를 이용한 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편의 생산방법, 상기 생산방법에 의해 생산된 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는, 항바이러스 조성물, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 및 상기 조성물을 이용한 바이러스 감염성 질환의 치료 방법, 또는 염증성 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

법에 의해 생산된 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는, 항바이러스 조성물, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 및 상기 조성물을 이용한 바이러스 감염성 질환의 치료 방법, 또는 염증성 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

WO 2016/200220 A1

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: 분리된 비멘틴 유래 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것으로, 구체적으로는 서열번호 1의 분리된 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 상기 벡터가 도입된 세포, 상기 세포를 이용한 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편의 생산방법, 상기 생산방법에 의해 생산된 재조합 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는, 항바이러스용 조성물, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 및 상기 조성물을 이용한 바이러스 감염성 질환의 치료 방법, 또는 염증성 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 바이러스성 질환은 세균성 질환과 달리, 항생제가 잘 듣지 않아 치료가 어려우며, 항상 인간에서의 질환 및 사망의 주요 원인 중 하나로서 바이러스 질환이 대두되고 있다.
- [4] 또한, 바이러스 감염성 질환은 염증을 유발하여, 다양한 염증성 질환을 유발하기도 한다.
- [5]
- [6] 이와 같은 바이러스 감염성 질환 등의 치료를 위해 개발된 제제로는 화학 물질과 생체 유래 물질로 구분될 수 있는데, 화학 물질의 경우 대부분 특정 바이러스 질환에만 작용하도록 개발되었으며, 여러가지 부작용이 나타나며, 내성 바이러스가 쉽게 출현하는 등 많은 단점이 있다.
- [7] 한편, 생체 유래 물질로는 인터페론 (interferon, IFN)과 같은 사이토카인이 잘 알려져 있다. 이 중 인터페론은 바이러스에 감염된 세포에서 생산되는 사이토카인 중에 최초로 발견된 것으로서, 가장 뛰어난 항바이러스성을 갖는 사이토카인으로 알려져 있다. 인터페론은 다음과 같은 다양한 질환, 만성 B형, C형 간염이나 혈액암, 다발성 경화증 등의 다양한 질병 치료에 이용될 수 있음이 보고되었다. 최근에는 HIV (Human immunodeficiency virus) 환자에 대한 효능이 입증되고 있다. 이에, 수년 전부터 항바이러스 제제 및 면역증강제를 개발하기 위한 일환으로서 인터페론을 대량 생산하기 위하여 유전공학적 방법이나 생물공학적 방법의 연구가 이루어져 왔으며 최근에는 천연물이나 합성 화합물로부터 인터페론 활성을 유도하는 화합물을 탐색하기 위한 연구가

활발히 이루어져 왔다. (Alcaro S et al., Bioorg Med Chem. 2005, 13(10), 3371-3378). 이에, 3M Pharmaceuticals사에 의해 Imiquimod이라는 강력한 인터페론 유도제가 개발되었으나 임상시험에서 여러 부작용이 나타남으로써 개발이 중단된 바 있다.

- [8] 인터페론은 강력한 항바이러스제로 알려져 있으나, 면역세포의 침윤 등 염증 반응을 유도하며, 거의 모든 세포가 인터페론에 대한 수용체를 항시 발현하고 있어서 항세포 작용 등 다양한 부작용을 보이고 있으며, 임상에 사용시 많은 양이 필요하여 6개월 이상 사용할 수 없는 단점이 있다.
- [9] 이에, 정상 세포가 아닌, 바이러스 감염 세포에 대하여 선택적으로 작용하여 치료 시 소량으로 적용가능하고, 특정 바이러스가 아닌 다양한 바이러스에 적용 가능하며, 면역 세포 침윤을 억제하여 염증을 억제하는 항바이러스 활성 및 항염증 작용을 동시에 갖는 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[10]

### 발명의 상세한 설명 기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 바이러스 감염 세포에만 특이적으로 작용하며, 면역세포의 침윤을 억제하여 염증을 억제할 수 있는 항바이러스 활성 및 항염증 작용을 갖는 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, 신규한 인간화 항체인 hzVSF가 다양한 바이러스에 특이적으로 작용하며, 면역세포 침윤 억제 및 바이러스 억제능이 있을 뿐 아니라, 면역원성을 낮춘 인간화 항체로 인간에게 투여 시 부작용도 없는 안전한 제제임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[12]

### 과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 신규한 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 상기 벡터가 도입된 세포, 상기 세포를 이용한 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편의 생산방법, 상기 생산방법에 의해 생산된 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는 항바이러스용 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 항바이러스용 조성물을 이용한 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을

이용한 염증성 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

[19]

### 발명의 효과

[20] 본 발명의 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 펩타이드의 결합단편은 바이러스 감염 세포에 선택적으로 작용하여 치료 시 소량이 필요하고, 부작용이 없을 뿐 아니라, 면역세포의 침윤을 억제하여 염증을 억제하는, 우수한 항바이러스 및 항염증 작용을 나타내는 인간화 항체 신약으로 제공될 수 있다.

[21]

### 도면의 간단한 설명

[22] 도 1은 chimeric VSF의 제조를 위한 벡터의 모식도이다.

[23] 도 2는 chimeric VSF의 모식도이다.

[24] 도 3은 chimeric VSF의 발현을 확인한 도이다.

[25] 도 4는 VSF의 scFv의 DNA 서열을 나타낸 도이다.

[26] 도 5는 VSF의 scFv를 벡터에 클로닝한 모식도이다.

[27] 도 6은 VSF의 scFv를 정제하여 확인한 도이다.

[28] 도 7은 VSF, scFv 및 항-EMCD 바이러스 항체의 항바이러스 효능을 바이러스 감염에서 세포의 생존량으로 확인한 도이다.

[29] 도 8는 chimeric VSF의 항바이러스 효능을 확인한 도이다.

[30] 도 9는 인간화 항체인 hzVSF의 제조를 위한 벡터의 모식도이다.

[31] 도 10은 본 발명의 인간화 항체인 hzVSF의 모식도이다.

[32] 도 11은 인간화 항체인 hzVSF의 발현을 확인한 도이다.

[33] 도 12는 인간화 항체인 hzVSF의 항바이러스 효능을 확인한 도이다.

[34] 도 13은 인간화 항체인 hzVSF\_var13의 물성을 확인한 환원 및 비환원 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도이다.

[35] 도 14는 인간화 항체인 hzVSF\_var13의 물성을 확인한 LC/MS 결과를 나타낸 도이다.

[36] 도 15는 인간화 항체인 hzVSF\_var13의 물성을 확인한 SEC-HPLC 결과를 나타낸 도이다.

[37] 도 16은 인간화 항체인 hzVSF\_var13의 물성을 확인한 IF (Isoelectric focusing)를 나타낸 도이다.

[38] 도 17은 51명의 혈액 기증자 중 KLH, hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13에 반응하여 T 세포의 증식이 일어난 기증자의 수를 나타내는 도이다.

[39] 도 18은 인간화 항체인 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13에 대한 51명의 T 세포 증식 반응의 정도를 나타낸 도이다.

[40] 도 19는 KLH, hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13에 의해 유도된 T 세포 증식을 평균 SI 값으로 나타낸 도이다.

- [41] 도 20은 대표적인 인간화 항체인 hzVSF의 변이체인 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도이다.
- [42] 도 21은 대표적인 인간화 항체인 hzVSF의 변이체인 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 물성을 확인한 HPLC 결과를 나타낸 도이다.
- [43] 도 22는 대표적인 인간화 항체인 hzVSF의 변이체인 hzVSF\_var13의 약동학을 나타낸 도이다.
- [44] 도 23은 인간화 항체인 hzVSF 및 인간화 항체인 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 바이러스 억제능을 확인한 도이다.
- [45] 도 24는 사람세포에서 인간화 항체인 hzVSF\_var13 및 hIFN- $\alpha$ 의 항세포 작용을 확인한 도이다.
- [46] 도 25는 바이러스성 당뇨병에서 인간화 항체인 hzVSF의 염증세포 침윤 억제를 확인한 도이다.
- [47] 도 26은 mVSF의 항-HBV 효과를 확인한 도이다.
- [48] 도 27은 HBV로 감염된 간조직에서 VSF 수용체의 발현양상을 확인한 도이다.
- [49] 도 28은 HCV로 감염된 간조직에서 VSF 수용체의 발현양상을 확인한 도이다.
- [50] 도 29는 인플루엔자 바이러스 감염세포에서 VSF 수용체의 발현을 확인한 도이다.
- [51] 도 30은 EMC-D 바이러스 감염세포에서 VSF 수용체의 발현을 확인한 도이다.
- [52] 도 31은 hzVSF\_var13의 B형 간염 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 cccDNA의 양을 Real-time quantitative PCR로 확인한 도이다.
- [53] 도 32는 hzVSF\_var13의 B형 간염 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 세포의 HBV DNA의 양을 Real-time quantitative PCR로 확인한 도이다.
- [54] 도 33은 hzVSF\_var13의 B형 간염 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 세포내 HBV DNA의 양을 Real-time quantitative PCR로 확인한 도이다.
- [55] 도 34는 hzVSF의 C형 간염 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 FACS로 확인한 도이다.
- [56] 도 35은 hzVSF의 C형 간염 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 Real-time quantitative PCR로 확인한 도이다.
- [57] 도 36은 hzVSF\_v13의 C형 간염 바이러스 유전자 1a형에 대한 항바이러스 효과를 Real-time quantitative PCR과 western blot으로 확인한 도이다.
- [58] 도 37은 hzVSF\_v13의 C형 간염 바이러스 유전자 1a형에 대한 장기간의 항바이러스 효과를 Real-time quantitative PCR로 확인한 도이다.
- [59] 도 38은 hzVSF\_v13의 C형 간염 바이러스 유전자 1b형에 대한 항바이러스 효과를 Real-time quantitative PCR과 western blot으로 확인한 도이다.
- [60] 도 39는 hzVSF\_v13의 C형 간염 바이러스 유전자 2a형에 대한 항바이러스 효과를 Real-time quantitative PCR과 western blot으로 확인한 도이다.
- [61] 도 40은 hzVSF\_v13의 C형 간염 바이러스 유전자 2a형에 대한 장기간의 항바이러스 효과를 Real-time quantitative PCR로 확인한 도이다.

- [62] 도 41은 인간화 항체인 hzVSF\_v13의 인플루엔자 바이러스 (H1N1)에 대한 바이러스 증식 억제효과를 마우스에서 확인한 도이다.
- [63] 도 42는 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스에 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13 투여 후 폐 조직의 치료 효과를 확인한 도이다.
- [64] 도 43은 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스에 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13에 의한 마우스 점막상피 세포 및 섬모의 보호 효과를 확인한 도이다.
- [65] 도 44는 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스에 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13 투여된 시기와 농도별로 폐렴 억제 효과를 확인한 도이다.
- [66] 도 45는 인플루엔자 바이러스에 감염(100,000 pfu)된 마우스에 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13 투여 후 CD4 면역세포 침윤 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [67] 도 46은 인플루엔자 바이러스에 감염(10,000,000 pfu)된 마우스에 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13 투여 후 CD4 면역세포 침윤 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [68] 도 47은 인플루엔자 바이러스에 감염(100,000 pfu)된 마우스에 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13 투여 후 대식세포 침윤 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [69] 도 48은 인플루엔자 바이러스에 감염(10,000,000 pfu)된 마우스에 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13 투여 후 대식세포 침윤 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [70] 도 49는 마우스에 바이러스 감염 후 hzVSF의 염증성 사이토카인 분비 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [71] 도 50은 VSF 수용체가 발현하지 않는 MCF-7 세포에 wild-type의 VR과 mutant-type의 VR을 과발현시킨 후, 바이러스를 감염시켜 hzVSF\_v13의 항바이러스능을 MVIT assay로 확인한 도이다.
- [72] 도 51은 VSF 수용체가 발현하지 않는 MCF-7 세포에 wild-type의 VR과 mutant-type의 VR을 과발현시킨 후, 바이러스를 감염시켜 hzVSF\_v13의 항바이러스능을 WST assay로 확인한 도이다.
- [73] 도 52는 VSF 수용체가 발현하지 않는 MCF-7 세포에 wild-type의 VR과 mutant-type의 VR을 과발현시킨 후, 바이러스를 감염시켜 hzVSF\_v13의 항바이러스능을 MVIT assay로 확인한 도이다.
- [74] 도 53은 VSF 수용체가 발현하지 않는 MCF-7 세포에 wild-type의 VR과 mutant-type의 VR을 과발현시킨 후, 바이러스를 감염시켜 VSF 수용체와 hzVSF\_v13의 결합을 면역형광염색법으로 확인한 도이다.
- [75] 도 54는 *E. coli*에서 과발현시켜 정제한 wild-type 및 mutant type의 VSF 수용체(비멘틴)과 hzVSF\_v13의 결합을 pull-down assay로 확인한 도이다.
- [76] 도 55는 HEK293T 세포에서 과발현시킨 wild-type 및 mutant type의 VSF

수용체(비멘틴)과 hzVSF\_v13의 결합을 immunoprecipitation으로 확인한 도이다.

[77] 도 56은 vimentin과 VSF의 결합 부위를 시뮬레이션한 도이다.

[78] 도 57은 vimentin과 VSF의 결합을 시뮬레이션한 도이다.

[79] 도 58은 vimentin과 hzVSF\_v13의 결합 부위를 시뮬레이션한 도이다.

[80]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[81] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 서열번호 1의 분리된 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 제공한다.

[82] 상기 항체는 이에 제한되지 않으나, 그 예로 마우스 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체일 수 있다.

[83] 본 발명의 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 항원과 직접적으로 결합하는 마우스의 단클론 또는 단일클론 항체의 가변 영역의 상보성 결정 부위를 인간 항체 골격에 이식하여, 본래의 마우스 항체의 친화도 및 특이성을 유지하면서 인체 내에서 HAMA (human anti-mouse antibody) 반응을 억제하는 우수성을 갖고 있다. 더욱이, de-immunization 방법을 이용해 면역원성을 낮춘 인간화 항체로서, 인간에게 투여 시 면역원성을 현저하게 낮추어 안전한 제제로 사용될 수 있다. 즉, 이는 서열번호 1의 펩타이드 부위가 외부로 노출된 세포에 반응하여 영향을 주면서도 인간 면역 체계와 보다 양호하게 상호작용하여, 예를 들어 바이러스 감염 세포와 반응하면서도 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 또는 항체-의존성 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)을 일어나지 않게 하여 목적 세포를 보다 효율적으로 치료할 수 있다. 아울러, 면역원성 감소에 의해 인간 면역 체계가 상기 항체를 외래의 것으로 인식하지 않는 이점이 있다. 또한, 더 적은 양, 보다 적은 빈도의 약물을 투여하였을 때에도 인간 순환계 내 반감기가 천연 발생 항체와 유사하다는 이점이 있다.

[84]

[85] 본 발명에서 상기 서열번호 1의 분리된 펩타이드에 특이적으로 결합하는 마우스 항체는 "mVSF(mouse Virus Suppressing Factor)"로 통칭될 수 있고, 키메라 항체는 "chVSF(chimeric Vrus Suppressing Factor)"로 통칭될 수 있으며, 인간화 항체는 "hzVSF (humainzed Virus Suppressing Factor)"로 통칭될 수 있다. 본 발명에서 용어, 인간화 항체 hzVSF 또는 이의 변이체는 서로 혼용될 수 있으며, hzVSF는 hzVSF 야생형 (hzVSF\_wt) 및 hzVSF의 변이체 (예를 들어, hzVSF\_var1, hzVSF\_v1 또는 hzVSF\_1 등으로 표기)와 혼용될 수 있다.

[86] 본 발명에서 서열번호 1의 분리된 펩타이드는 비멘틴 (vimentin)의 아미노산 142번 내지 294번의 위치에 해당하는 것으로, 본 발명의 항체 또는 이의 단편이

결합할 수 있는 한, 상기 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 특히 바람직하게는 97% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 서열번호 1의 분리된 펩타이드는 에피토프를 포함하는 항원 영역으로, 항체 또는 이의 단편과 결합되어 본 발명과 유사한 기능을 나타낼 수 있는 한, 비멘틴 아미노산의 142번 내지 211번 또는 211번 내지 294번일 수 있다. 또한, 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열도 본 발명의 범위 내에 포함되는 자명하다. 비멘틴은 *VIM* 유전자에 의해 코딩되는 단백질로, 세포 내 소기관 (organelle)을 지지하고 위치에 고정시키는 기능을 하는 것으로, 주로 세포의 골격, 단백질의 이동 및 세포신호전달에 관여함이 알려져 있으며, 암 마커로 사용됨이 알려져 있으나, 이에 결합할 수 있는 항체가 항바이러스 작용을 할 수 있음에 대해서는 알려진 바 없었다.

[87] 본 발명의 서열번호 1의 분리된 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 바이러스에 감염된 세포에 특이적으로 반응하는 것으로, 바이러스 감염 세포에서 VSF (Virus suppressing factor)의 수용체가 외부로 나타나, 이에 결합하는 것이다. 이와 같은 본 발명의 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 상기와 같이 바이러스 감염 세포 특이적인 결합에 의해 항바이러스 활성 및 항염증 활성을 나타내므로, 항바이러스용 조성물, 바이러스 감염성 질환, 염증성 질환의 예방 또는 치료 분야에 있어서도 유용하게 사용할 수 있다.

[88] 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은, 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드의 9 번째, 45 번째, 54 번째, 76 번째, 94 번째 또는 129 번째 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드의 9 번째, 45 번째, 54 번째, 76 번째, 94 번째 및 129 번째 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으나, 서열번호 1의 분리된 펩타이드에 특이적으로 결합하는 한, 이에 제한되지 않는다.

[89]

[90] 본 발명에서 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 리간드 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 항체 단편을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 이가(bivalent) 또는 이중특이성 분자(예를 들어, 이중특이성 항체), 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 포함한다. 상기 용어는 추가로 FcRn에 대한 결합 기능을 보유한 단쇄 항체, 스캐프, 항체 불변영역의 유도체 및 단백질 스캐폴드에 기초한 인공 항체를 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

여기에서 사용되는 용어 "단편," "펩타이드의 결합 단편" 및 "항체 단편"은 항체의 항원-결합 활성을 보유하는 본 발명의 항체의 임의의 단편을 지칭하는 것으로 호환적으로 사용된다. 예시적인 항체 단편은 단일 쇠 항체, Fd, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, dsFv 또는 scFv를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 Fd는 Fab 단편에 포함되어 있는 중쇄 부분을 의미한다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')<sub>2</sub> 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중디설파이드 Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고, 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

- [91] 본 발명에서 용어, "단일클론항체"는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.
- [92] 전형적으로, 면역글로불린은 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역(상기 부위는 도메인으로 또한 알려져 있음)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은, 상보성 결정 영역(complementarity-determining region, 이하 "CDR"이라 함)이라 불리는 3개의 다변 가능한 영역 및 4개의 구조 영역(framework region, 이하 "FR"이라 함)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.
- [93] 또한, 상기와 같은 본 발명의 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 불변 영역을 포함할 수 있다.
- [94] 본 발명에서 용어, "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 그 예로, IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 불변 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 불변 영역으로부터 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있다.
- [95] 본 발명에서 용어, "하이브리드(hybrid)"란 단쇄 면역 글로불린 중쇄 불변 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 해당하는

서열이 존재함을 의미하며, 그 예로 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하다.

[96] 본 발명의 인간화 항체는 이에 제한되지는 않으나, 인간 면역글로불린  $\gamma 4$ 를 기반으로 인간화될 수 있으며, 보체 결합성이 없어 CDC를 일으키지 않는 장점이 있을 수 있다.

[97]

[98] 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 3 또는 서열번호 14 (서열번호 3의 9번째 아미노산인 쓰레오닌이 아스파르트산으로 치환)로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 4 또는 서열번호 15 (서열번호 4의 4번째 아미노산인 쓰레오닌이 아르파라긴으로 치환)로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 5로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 6, 서열번호 16 (서열번호 6의 3번째 아미노산인 쓰레오닌이 아스파르트산으로 치환), 서열번호 17 (서열번호 6의 3번째 아미노산인 쓰레오닌이 아스파르트산으로, 6번째 아미노산인 알라닌이 글리신으로 치환), 또는 서열번호 18 (서열번호 6의 3번째 아미노산인 쓰레오닌이 아스파르트산으로, 5번째 아미노산인 류신이 아르기닌으로, 6번째 아미노산인 알라닌이 글리신으로 치환)로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 7 또는 서열번호 19 (서열번호 7의 6번째 아미노산인 세린이 쓰레오닌으로 치환)로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편일 수 있다.

[99] 또한, 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 인간의 FR (framework region)을 포함하며, 이에 제한되지는 않으나, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31로 기재된 인간 면역글로불린 감마일 수 있으며, 또는 서열번호 20으로 기재된 중쇄 FR1 (Framework region 1); 서열번호 21로 기재된 중쇄 FR2; 서열번호 22 또는 서열번호 28 (서열번호 22의 8번째 아미노산인 라이신이 쓰레오닌으로, 10번째 아미노산인 이소류신이 알라닌으로 치환)로 기재된 중쇄 FR3; 및 서열번호 23으로 기재된 중쇄 FR4를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 FR1; 서열번호 25로 기재된 경쇄 FR2; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 FR3; 및 서열번호 27로 기재된 경쇄 FR4를 포함하는, 경쇄 가변 영역일 수 있다.

[100] 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 구체적으로, (a) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 6, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3; (b) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 16, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3; (c) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및



25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; (m) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 15로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 28, 및 서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 19로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; 또는 (n) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 16, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3를 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편일 수 있다.

- [101] 상기 (a) 항체는 hzVSF\_WT, (b) 항체는 hzVSF\_var1, (c) 항체는 hzVSF\_var2. (d) 항체는 hzVSF\_var3, (e) 항체는 hzVSF\_var4, (f) 항체는 hzVSF\_var5, (g) 항체는 hzVSF\_var6, (h) 항체는 hzVSF\_var7, (i) 항체는 hzVSF\_var8, (j) 항체는 hzVSF\_var9, (k) 항체는 hzVSF\_var10, (l) 항체는 hzVSF\_var11, (m) 항체는 hzVSF\_var12, (n) 항체는 hzVSF\_var13을 각각 포함할 수 있다.
- [102] 상기 인간화 항체 및 상기 펩타이드의 결합 단편은 이에 제한되지 않으나, 각각 서열번호 10 및 서열번호 12; 서열번호 32 및 서열번호 34; 서열번호 36 및 서열번호 38; 서열번호 40 및 서열번호 42; 서열번호 44 및 서열번호 46; 서열번호 48 및 서열번호 50; 서열번호 52 및 서열번호 54; 서열번호 56 및 서열번호 58; 서열번호 60 및 서열번호 62; 서열번호 64 및 서열번호 66; 서열번호 68 및 서열번호 70; 서열번호 72 및 서열번호 74; 서열번호 76 및 서열번호 78; 또는 서열번호 80 및 서열번호 82로 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편일 수 있다.
- [103] 상기 마우스 항체는 구체적으로, 서열번호 137로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 138로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 139로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 134로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 135로 기재된 경쇄 CDR2; 서열번호 136으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로, 서열번호 9로 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8로 기재된 경쇄 가변 영역을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [104] 상기 키메라 항체는 구체적으로 서열번호 141 또는 서열번호 142로 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 140으로 기재된 경쇄 가변 영역을 포함하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로, 서열번호 146 또는 서열번호 148로 기재된 중쇄 및 서열번호 144로 기재된 경쇄를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [105] 상기 scFv는 이에 제한되는 것은 아니나, mVSF를 안전성을 위해 제조한 scFv 역시 포함될 수 있다. 그 예로, 도 4에 기재된 서열에 의해 제조된 scFv일 수 있다. 또한, 서열번호 131로 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 133으로 기재된 경쇄

가변 영역이 링커로 연결된 형태일 수 있다. 또한, 서열번호 130의 염기 서열로 코딩되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 132의 염기 서열로 코딩되는 경쇄 가변 영역이 링커로 연결된 형태일 수 있다. 이와 같은 scFv는 *E. coli* 발현 벡터내에 서열번호 150의 염기서열로 클로닝될 수 있다.

[106]

[107] 구체적 실시예에 따르면, 본 발명자들은 hzVSF\_wt, 3개의 얼터너티브(alternative) 및 이의 13개의 변이체인 인간화 항체를 제조한 후, 항바이러스 효능을 확인하였다 (실시예 6). 아울러, FDA 승인을 받아 시판 중인 의약품과 면역원성을 비교한 결과, 면역원성이 가장 낮은 인간 항체인 Humira와 유사한 수준의 면역원성을 나타내는 것을 확인하여 (표 7), 항바이러스제 또는 항염증제로 사용시 야기될 수 있는 부작용 없이 안전한 항바이러스 또는 의약품으로 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, hzVSF\_wt 변이체를 이용하여 T 세포 분석을 통해 T 세포의 증식에 크게 영향을 주지 않는 것을 확인하여(표 8), 임상에 사용할 때 면역원으로 작용하여 부작용을 일으킬 가능성이 낮다는 것을 확인하였다. 아울러, 약동학 분석을 통해 생체 내 반감기가 임상적 이용에 사용할 수 있을 정도로 높음을 확인하였다 (실시예 8). 아울러, 인터페론과 비교 시 4 nM 이상의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인하여, 인터페론과 달리 부작용이 적음을 확인하였다 (실시예 11). 또한 본 발명의 hzVSF(야생형 및 변이체)가 마우스에서 EMC-D 바이러스 감염에 대한 항바이러스 효능 및 면역세포의 침윤억제와 이로 인한 랑게르한스섬의 파괴를 현저하게 저해하며, 바이러스 감염에 의한 당뇨병을 탁월하게 치료할 수 있음을 확인하였다 (실시예 12). 간염 바이러스 역시 현저하게 저해할 수 있음을 확인하였다 (실시예 13 내지 16). 인플루엔자 바이러스 감염에 대해서도 면역세포 침윤 없이, 항바이러스 효과 및 항염증 효과를 확인하였으며 (실시예 17), 다양한 바이러스에 대하여 항바이러스 효과가 있음을 확인하여 (표 15), 범용적인 항바이러스제로 사용할 수 있음을 확인하였다. 아울러, 마우스 모델에서 바이러스 감염시 염증성 사이토카인의 분비를 억제함을 확인하여 (실시예 19), 다양한 염증성 질환의 치료제로 사용할 수 있음을 확인하였다.

[108]

[109] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 상기 벡터가 도입된 세포, 상기 세포를 이용한 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 제공한다.

[110] 상기 항체 및 상기 펩타이드의 결합 단편은 상기에서 설명한 바와 같다.

[111] 본 발명에서 제공하는 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는

박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 바람직하게는 숙주세포에서 상기 뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동 가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있다. 그 예로 파아지, 플라스미드, 코스미드, 미니-염색체, 바이러스 또는 레트로바이러스벡터 등에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 형태가 될 수 있다.

[112] 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 포함하는 발현벡터 또는 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하는 발현벡터일 수 있다.

[113] 본 발명에서 제공하는 상기 발현 벡터가 도입된 세포 (형질전환체)는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현벡터가 도입되어 형질 전환된 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO(중국 햄스터 난소 세포, chinese hamster ovary cells), SP2/0(마우스 골수종), 인간 림프아구(human lymphoblastoid), COS, NSO(마우스 골수종), 293T, 보우 멜라노마 세포, HT-1080, BHK(베이비 햄스터 신장세포, baby hamster kidney cells), HEK(인간 배아신장 세포, human embryonic kidney cells), PERC.6(인간망막세포) 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.

[114] 본 발명에서 용어, "도입"은 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포에 전달하는 방법을 의미한다. 이와 같은 도입은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 트랜스펙션법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포솜 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당 분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 형질도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 입자를 사용하여 목적물을 세포 내로 전달시키는 것을 의미한다. 아울러, 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 본 발명에서 도입은 형질전환과 혼용되어 사용될 수 있다.

[115]

[116] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는, 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[117] 상기 항체 및 상기 펩타이드의 결합 단편은 상기에서 설명한 바와 같다.

[118] 본 발명에서 "항바이러스"는 병원성 바이러스의 증식 또는 복제를 억제하여 바이러스 감염을 감소, 억제 또는 예방하는 효과를 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 항바이러스 활성에 의해 바이러스의 증식 또는 복제가 억제되는 "병원성 바이러스"는 이에 제한되지 않으나, 바이러스 감염에 의해 숙주 세포의 비멘틴의 일부가 숙주 세포막 외부로 노출되는 것을 특징으로 한다. 이의 예로는 동물 또는 사람에서 질병을 일으키는 바이러스로, 병원성 바이러스의 예로는

오소믹소비리데(Orthomyxoviridae) 속 바이러스, 피코르나비리데(Picornaviridae) 속 바이러스, 레트로비리데(Retroviridae) 속 바이러스, 헤르페스(Herpes) 속 바이러스, 필로비리데(Filoviridae) 속 바이러스, 코로나비리데(Coronaviridae) 속 바이러스, 헤파드나비리데(Hepadnaviridae) 속 바이러스, 플라비비리데(Flaviviridae) 속 바이러스, 부나비리데(Bunyaviridae) 속 바이러스 등을 포함할 수 있다. 병원성 바이러스는 예를 들어 인플루엔자 바이러스, B형 및 C형 간염 바이러스, 뇌심근염 바이러스, 멩고 바이러스 (Mengovirus), 에볼라바이러스(Ebolavirus), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus; SARS), 중동호흡기증후군 코로나바이러스(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS), 레오바이러스 (Reovirus), HIV (human immunodeficiency virus), HCMV (human cytomegalovirus), 또는 한탄 바이러스 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 특히, 본 발명에 따른 hzVSF는 피코르나비리데(Picornaviridae)에 속하는 Mengo 바이러스뿐 만 아니라, 피코르나비리데에 속하는 EMC 바이러스와는 유전체 구조와 생활사가 전혀 다른 오소믹소비리데(Orthomyxoviridae)에 속하는 인플루엔자 바이러스에서도 항바이러스 효과를 나타내었으며, 또한 레트로비리데(Retroviridae)에 속하는 HIV의 증식도 효과적으로 저해하는 등 범용적인 바이러스에 효과를 나타낸다 (표 15).

- [119] 상기 조성물은 약학적 조성물, 의약외품 조성물, 건강식품용 조성물의 형태일 수 있다.
- [120] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [121] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [122] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이

해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[123] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[124] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[125] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 상기 다른 치료제는 인터페론일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[126]

[127] 상기 조성물은 항바이러스 작용에 의한 바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료를 수행하는 조성물일 수 있다.

[128] 본 발명에서 바이러스 감염성 질환은 이에 제한되지 않으나, 상기 바이러스 감염에 의해 숙주 세포의 비멘틴의 일부가 숙주 세포막 외부로 노출되는 질환을 포함할 수 있으며, 그 예로, 간염, 에이즈, 폐렴, 당뇨병뿐 아니라, 오소믹소비리데(Orthomyxoviridae) 속 바이러스, 피코르나비리데(Picornaviridae) 속 바이러스, 레트로비리데(Retroviridae) 속 바이러스, 필로비리데(Filoviridae) 속 바이러스, 코로나비리데(Coronaviridae) 속 바이러스, 헤파드나비리데(Hepadnaviridae) 속 바이러스, 플라비비리데(Flaviviridae) 속 바이러스, 부냐비리데(Bunyaviridae) 속 바이러스 헤르페스(Herpes) 속 바이러스에 의해 감염되어 발생할 수 있는 모든 질환을 포함할 수 있다.

[129] 본 발명에서 용어, "예방"이란 상기 조성물의 투여에 의해 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있으며, 상기 "치료"란 상기 조성물의 투여에 의해 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를

의미할 수 있다.

[130] 상기 조성물은 바이러스 감염 세포 특이적으로 작용하는 조성물일 수 있다.

[131] 상기 조성물은 면역세포 침윤을 억제하는 것일 수 있으며, 염증반응을 억제하는 것일 수 있다(도 45 내지 도 48). 본 발명의 조성물은 염증 유발 사이토카인인 IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL2 (MCP-1)을 현저하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (도 49).

[132]

[133] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 항바이러스용 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 바이러스 감염 질환 치료 방법일 수 있다.

[134] 상기 항바이러스용 조성물 및 바이러스 감염 질환은 상기에서 설명한 바와 같다.

[135] 상기 바이러스 감염 질환을 치료하는 방법은 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 바이러스 감염 질환이 발병되거나 발병 의심이 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 바이러스 감염 질환을 치료하는 방법일 수 있으며, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 상기에서 설명한 바와 동일하다. 상기 바이러스 감염 질환을 치료하는 방법은 바람직하게는 항체를 포함하는 조성물을 바이러스 감염 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 바이러스 감염 질환을 치료하는 방법일 수 있다.

[136] 상기 개체는 소, 돼지, 양, 닭, 개, 인간 등을 포함하는 포유동물, 조류 등을 포함하며, 본 발명의 상기 조성물의 투여에 의해 바이러스 감염 질환이 치료되는 개체는 제한 없이 포함한다.

[137] 이때, 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 조성물은 액제, 산제, 에어로졸, 캡슐제, 장용피 정제 또는 캡슐제 또는 좌제의 형태로 투여할 수 있다. 투여 경로는 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 내 투여, 내피 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[138]

[139] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[140] 상기 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적 조성물, 의약품 조성물, 건강기능 식품 조성물의 형태일 수 있다.

[141] 상기 염증성 질환은 바이러스 감염에 의한 것일 수 있다.

[142]

[143] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환의 치료 방법을

제공한다.

[144]

[145] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편의 항바이러스 용도를 제공한다.

[146]

### 발명의 실시를 위한 형태

[147] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[148]

[149] 실시예 1: 신규한 인간화 항체인 VSF의 제조

[150]

[151] 실시예 1-1: chVSF (chimeric VSF)의 제조

[152] 마우스 VSF(mVSF)의 주요 기능적 부분이 단세포군 항체인 것으로 가정하고, 이와 인간면역글로불린을 유전자조작법으로 교잡 (chimerization)하여 마우스/인간 교잡 항체 (chAb)를 만들었다.

[153] 구체적으로, 교잡 항체를 만들기 위하여, 마우스 VSF의 경쇄 및 중쇄의 불변 영역 (constant region)을 인간면역항체 ( $\kappa$ ,  $\gamma 2$  또는  $\gamma 4$ )의 불변 영역으로 대체하였다. chVSF는 pCAGGS 벡터를 주형으로 하여 발현벡터를 만들었다 (도 1). mVSF의 가변 중쇄 (mVH)(서열번호 9)는 SacI과 KpnI 제한효소 부위를 포함하여 PCR로 증폭하였다. 가변 경쇄 (mVL)(서열번호 8)는 ClaI과 XhoI 제한효소 부위를 포함하여 PCR법으로 증폭하였다. PCR에 사용된 프라이머는 표 1에 기재된 프라이머를 이용하였으며, PCR 조건은 94 °C에서 45초, 60 °C에서 45초, 72 °C에서 45초로 35 사이클을 수행하고, 72 °C에서 10분간 진행하였다.

[154]

[155] [표1]

프라이머	서열	서열번호
mVH F	cgagctcatggatggagctggatc	124
mVH R	cggtaacctgaggagacgggtgactg	125
KpnI_delR	gggcccttggtggaagctgaggagacgggtgactgagg	126
mVL F	catcgatatgagtgtgccactcag	127
mVL R	cctcgagtttgattccagcttgg	128
Xho_modR	agatggtgcagccaccgtgcgtttgattccagcttgggtgcc	129

[156]

[157] 사람의 중쇄(서열번호 11)는 KpnI과 SphI 제한효소 부위를 이용하였으며,

경쇄(서열번호 13)는 *XhoI*과 *BglII*제한효소를 이용하여 클로닝을 하였다. 경쇄와 중쇄를 동시에 발현시키기 위하여 IRES (internal ribosome entry site)를 *SphI*과 *ClaI* 제한효소 부위를 이용하여 경쇄와 중쇄 사이에 클로닝하였다. 선별마커는 *SallI* 제한효소 부위에 삽입하였다. 이와 같은 방식으로 도 2의 모식도에 개시된 바와 같은 chVSF 들을 제조하였다.

[158]

[159] 실시예 1-2: two vector 발현 시스템을 이용한 chVSF 발현

[160] 1 mg/ml의 PEI (Polyethyleneimine)를 이용하여 15  $\mu$ g의 pCAGGS-GFP를 HEK 293T 세포에 트랜스펙션하여, 트랜스펙션 정도 및 발현 수준을 확인하였다. 동일한 방법으로 상기 실시예 1-1의 chVSF를 HEK 293T 세포에 트랜스펙션한 후 6시간 후에 배지를 2% FBS를 포함하는 배지로 교체하였다. 3일 마다 세포 배양액을 모아서 0.45  $\mu$ m의 필터를 이용하여 불순물을 제거하였다. 단백질 A 세파로우즈 비드 (nProtein A sepharose bead)를 이용하여 chVSF를 정제하였다. chVSF는 0.2 M 글라이신/염산 버퍼 (Glycine/HCl) (pH 2.5)로 용출하며, 중화 버퍼로는 1 M 트리스-Cl (Tris-Cl)버퍼 (pH 9.0)를 사용하였다. 구체적으로, 1M Tris-Cl 버퍼 (pH 8.0)를 레진 볼륨의 10배로 사용하여 레진이 균질화되게 한 후, VSF 배양액을 컬럼에 통과시켰다. 0.1 M Tris-Cl 버퍼 (pH 8.0)를 컬럼 볼륨의 5배 이상을 흘려주며 세척하였다. 용출은 0.2 M Glycine/HCl 버퍼 (pH 2.5)를 레진 볼륨의 5배로 흘려주며, 중화버퍼를 미리 넣어둔 튜브에 정제된 VSF를 수득하였다. 이 후에 정제된 VSF를 SDS-PAGE로 확인하였다.

[161]

[162] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, chVSF는 면역글로블린의 특성을 지닌 50 kDa의 중쇄와 25 kDa의 경쇄로 이루어져 있는 구조임을 확인할 수 있었다.

[163]

[164] 실시예 2: scFv(single-chain variable fragment)의 제조 및 항바이러스 효과 확인

[165]

[166] VSF의 가변 영역을 이용하여 scFv를 제조하였다. scFv는 서열번호 150의 DNA 서열을 가지며, 상기 DNA를 *E. coli* 발현벡터인 pET-22b(+)에 클로닝하여 scFv를 제조하였다(도 4 및 도 5).

[167]

구체적으로 mVSF의 VH와 VL을 링커로 연결하여 scFv를 제작하고, 박테리아 발현 벡터인 pET22b(+)에 삽입한 후, IPTG를 첨가하여 발현을 유도한 뒤, Ni-NTA 컬럼을 이용하여 정제하였다(도 6).

[168]

[169] 그 다음 상기 정제된 scFv를 이용하여 항바이러스능을 확인하였다. 구체적으로 EMC-D 바이러스를 감염시킨 L929세포를 scFv, VSF 또는 항-EMCD 바이러스 항체와 함께 37 °C에서 30시간 동안 배양하였다. 그 다음 상층액을 제거하고 CellTiter96 AQueous One Solution을 첨가한 뒤, OD<sub>450</sub>으로 측정하였다. 그 결과 VSF(5 내지 500ng), scFv(5 내지 10  $\mu$ g) 및 항-EMCD 바이러스 항원(1:20 희석)을

처리한 균 모두에서 항바이러스 효과가 있는 것을 확인하였다(도 7).

[170]

[171] 실시예 3: chVSF의 항바이러스능 확인

[172]

[173] 상기 실시예 1에서 제조한 chVSF의 항바이러스능을 확인하기 위하여 MVIT 분석을 실시하였다.

[174]

구체적으로, 2%의 FBS (Fetal Bovine Serum)가 들어있는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 이용하여  $2 \times 10^4$ 의 수로 96 웰 플레이트에 깔려있는 생쥐의 성상세포인 L929에 100 pfu의 EMC-D 바이러스를 1시간 동안 감염시킨 후,  $4 \mu\text{g/ml}$ 의 VSF를 2 배수씩 희석하여 처리하였다. 48시간 후, 10%의 포르말린으로 10분간 세포를 고정시킨 후, 1%의 크리스탈 바이올렛으로 10분간 염색시켰다. 염색된 세포를 PBS로 세척한 후, 세포의 생존능을 염색정도로 평가하였다. 바이러스의 증식이 억제되었다면, 모든 세포가 살아서 균등한 층을 이루고 크리스탈 바이올렛 염색도 균일한 층으로 염색된다. 반대로 세포가 바이러스 감염에 의해 용해되면 세포들이 떨어져서 염색층이 거의 존재하지 않는다.

[175]

[176] 그 결과, 도 8에서 나타낸 바와 같이 본 발명의 chVSF는 EMC-D 바이러스에 대한 항바이러스 효능을 나타내었다. 이와 같은 결과는 기존의 마우스 VSF 뿐 아니라, 마우스 VSF를 단세포균향체로 가정하여 이를 인간 면역항체의 불변 영역과 교잡한 본원발명의 chVSF 역시 항바이러스 용도로 사용될 수 있음을 뒷받침하는 것이다.

[177]

[178] 실시예 4: 인간화 항체인 VSF의 제조

[179]

[180] 상기 실시예 1 및 3을 바탕으로 chVSF를 이용하여 인간화 항체인 hzVSF (Humanized VSF)를 제조하였다.

[181]

[182] 진핵 세포를 사용하여 두 가지 종류의 재조합 단백질을 발현시키고자 할 때 사용하는 발현 시스템 중 하나인 two gene expression vector에 해당하는 pdCMV-dhfr-vector (도 9)를 이용하였다. 상기 벡터는 두 가지 종류의 유전자를 하나의 벡터 내에서 서로 다른 transcription unit으로 구성하여 각각 자체의 프로모터와 polyA signal을 사용하여 발현하는 것으로, 강력한 포유류 발현 프로모터인 CMV (cytomegalovirus) 프로모터를 이용하는 벡터 시스템이다. 이를 이용하여, 도 10의 모식도와 같은 hzVSF를 제조하였다.

[183]

이에, 상기 hzVSF의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 서열번호 10으로, 중쇄 영역을 서열번호 11로, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 서열번호 12로, 경쇄 영역을 서열번호 13으로 표시하였다.

[184]

[185] 1 mg/ml의 PEI (Polyethyleneimine)를 이용하여 15  $\mu$ g의 pCAGGS-GFP를 HEK 293T 세포에 트랜스펙션하여, 트랜스펙션 정도 및 발현 수준을 확인하였다. 동일한 방법으로 상기 chVSF 및 hzVSF를 HEK 293T 세포에 트랜스펙션한 후 6시간 후에 배지를 2% FBS를 포함하는 배지로 교체하였다. 3일 마다 세포 배양액을 모아서 0.45  $\mu$ m의 필터를 이용하여 불순물을 제거하였다. 단백질을 A 세파로우즈 비드 (nProtein A sepharose bead)를 이용하여 chVSF 및 hzVSF를 정제하였다. chVSF 및 hzVSF는 0.2 M 글라이신/염산 버퍼 (Glycine/HCl) (pH 2.5)로 용출하며, 중화 버퍼로는 1 M 트리스-Cl (Tris-Cl)버퍼 (pH 9.0)를 사용하였다. 구체적으로, 1 M Tris-Cl 버퍼 (pH 8.0)를 레진 볼륨의 10배로 사용하여 레진이 균질화되게 한 후, VSF 배양액을 컬럼에 통과시켰다. 0.1 M Tris-Cl 버퍼 (pH 8.0)을 컬럼 볼륨의 5배 이상을 흘려주며 세척하였다. 용출은 0.2 M Glycine/HCl 버퍼 (pH 2.5)를 레진 볼륨의 5배로 흘려주며, 중화버퍼를 미리 넣어둔 튜브에 정제된 VSF를 수득하였다. 이 후에 정제된 VSF를 SDS-PAGE로 확인하였으며, 활성은 MVIT assay를 통해 확인하였다.

[186]

[187] 실험에 사용된 VSF를 표시하면 다음 표 2와 같다.

[188]

[189] [표2]

VSF 종류	발현 세포	mg/l (harvested sup.)
mVSF	마우스 하이브리도마	4.14
*rmVSF	HEK293T	5.71
chVSF $\gamma$ 2	HEK293T	5.15
chVSF $\gamma$ 4	HEK293T	7.32
hzVSF $\gamma$ 2	HEK293T	5.01
hzVSF $\gamma$ 4	HEK293T	9.38

[190] \*rmVSF: recombinant of mouse VSF

[191]

[192] 그 결과, 도 11에서 확인할 수 있듯이, chVSF $\gamma$ 2 및 chVSF $\gamma$ 4, hzVSF $\gamma$ 2 및 hzVSF $\gamma$ 4는 면역글로불린의 특성을 지닌 50 kDa의 중쇄와 25 kDa의 경쇄로 이루어져 있는 것을 확인하였다.

[193]

[194] 또한, 도 12에서 확인할 수 있듯이, hzVSF 역시 항바이러스 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 인간화 항체인 hzVSF 역시 VSF와 유사하게 항바이러스 효과가 있음을 시사하는 것이다.

[195]

[196] 실시예 5: 인간화 항체인 VSF의 물성 확인

[197]

[198] 상기 실시예 4에서 제조한 hzVSF의 물성을 다음과 같이 확인하였다.

[199]

[200] 실시예 5-1: 기본적인 분자량 패턴 및 순도 확인

[201] 환원 및 비환원 SDS-PAGE를 이용하여 분자량 패턴 및 순도를 확인하고자 하였다. 구체적으로, hzVSF\_v13을 SDS-PAGE로 분자량에 따라 코마시 염색법 (Coomassie Staining)으로 염색하여 hzVSF\_v13의 분자량 및 순도를 확인하였다.

[202]

[203] 그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, 1 레인은 비환원 젤로서, IgG 항체 (150 kDa)에서 예상되는 위치에 주요 밴드가 관찰되었고, 2 레인은 환원 젤로 IgG 항체의 중쇄 (약 50 kDa)와 경쇄 (약 25 kDa)에서 해당되는 위치에 밴드가 관찰하여, hzVSF\_v13가 일반적인 IgG 항체 패턴을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[204]

[205] 실시예 5-2: 분자량, 당 패턴 및 크기 변이 등 확인

[206] hzVSF\_v13의 분자량, 당 패턴, 크기 변이 등을 확인하기 위하여 액체크로마토그래피/질량분석 (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)을 수행하였다. 소량의 hzVSF\_v13을 HPLC에 주입하여, 피크를 관찰하였다.

[207]

[208] 그 결과, hzVSF\_v13는 면역글로불린 G (IgG)의 특성을 나타내는 것을 확인하였다(도 14). Intact Mass에서는 전체 분자량 (약 140 kDa)이 관찰되었고, G0/G0, G0F/G1, G1/G1 등 일반적인 당화된 IgG에서 해당하는 피크의 패턴이 관찰되었다. 또한, 당 제거 후의 중쇄 (약 49 kDa) 및 경쇄 (약 23 kDa)이 관찰되었다. PNGase F 처리로 당쇄가 제거된 중쇄와 PNGase F를 처리하지 않은 중쇄의 분자량을 종합할 때 일반적인 IgG의 glycan 패턴을 확인할 수 있었다 (G0F, G1F, G2F).

[209]

[210] 실시예 5-3: 순도 및 응집도 확인

[211] hzVSF\_v13의 순도와 응집도를 확인하기 위하여 SEC-HPLC를 이용하였다.

[212] SEC-HPLC 조건은 다음과 같다.

[213] - HPLC system: Dionex Ultimate 3000

[214] - Column: Tosoh TSKgel G3000 SWxl

[215] - Mobile phase: phosphate buffer, 0.5 ml/min

[216] - Injection Volume: 10  $\mu$ l

[217]

[218] 그 결과, 전형적인 IgG 항체의 단량체에 해당하는 위치 (정체시간 약 16분에서)

92.44%의 주요 피크가 관찰되었고, 이량체 위치 (정체시간 약 13분)에서 약 6.84%의 피크가 관찰되었다(도 15).

[219]

[220] 실시예 5-4: pI 및 charge heterogeneity 확인

[221] hzVSF\_v13의 등전하점을 알아보기 위하여, pH 3에서 pH 10까지 구배를 나타내는 젤에서 러닝을 하였다.

[222]

[223] 그 결과, 도 16에서 나타낸 바와 같이, hzVS\_v13F의 pI는 7.7로 분석되었고, 주요 밴드 외에 산성 및 염기성 isoform (acidic/basic isoform)도 관찰되었다. 이는 IgG 항체에서 일반적으로 관찰되는 이성체 [isomer (예를 들어, C-말단 영역의 deamination)]에 해당된다.

[224]

[225] 상기와 같은 결과들은, 본 발명의 인간화 항체인 hzVSF\_v13 들이 IgG 항체와 유사한 물성을 나타내는 것을 뒷받침하는 것이다.

[226]

[227] 실시예 6: 바이러스 억제 효능은 유지 또는 증가되면서 면역원성이 감소된 인간화 항체인 hzVSF의 변이체 제조

[228]

[229] 실시예 6-1: hzVSF alternative의 제조

[230] 상기 실시예 4에서 제조한 hzVSF를 기반으로, 세 개의 alternative를 제조하였다. 각 alternative의 활성은 wild-type의 활성과 비슷하거나 떨어졌다 ( $0.5 \leq 1 \text{ U} < 1 \text{ mg/ml}$ )(표 3 및 표 4). 각각의 alternative의 CDR 1 내지 3의 아미노산 서열을 표 3에 각각의 변이체의 FR1 내지 FR4의 아미노산 서열을 표 4에 기재하였다.

[231]

[232] [표3]

항체		CDR1	CDR2	CDR3
hzVSF_WT	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGSTTYA QKFQG(서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNL A(서열번호 5)	VATNLAD(서열 번호 6)	QHFYGPRT( 서열번호 7)
hzVSF_a1	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGSTTYA QKFQG(서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNL A(서열번호 5)	VATNLAD(서열 번호 6)	QHFYGPRT( 서열번호 7)
hzVSF_a2	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGSTTYA QKFQG(서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNL A(서열번호 5)	VATNLAD(서열 번호 6)	QHFYGPRT( 서열번호 7)
hzVSF_a3	중쇄	GYNMN(서열 번호 2)	NIDPYYGSTTYA QKFQG(서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNL A(서열번호 5)	VATNLAD(서열 번호 6)	QHFYGPRT( 서열번호 7)

[233]

[234] [표4]

항체		FR1	FR2	FR3	FR4
hzVSF_WT	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_a1	중쇄	서열번호 151	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_a2	중쇄	서열번호 20	서열번호 152	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_a3	중쇄	서열번호 151	서열번호 152	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27

[235]

[236] 실시예 6-2: hzVSF 변이체의 제조

[237] 상기 실시예 4에서 제조한 hzVSF를 기반으로, 실제 생체 내에서 활용하기 위한 면역원성 감소 및 affinity maturation을 통한 hzVSF 변이체를 제조하였다. 그 결과, 13개의 변이체를 제조하였다 (표 5 및 표 6). 각각의 변이체의 CDR 1 내지 3의 아미노산 서열을 표 5에 각각의 변이체의 FR1 내지 FR4의 아미노산 서열을 표 6에 기재하였다.

[238]

[239] [표5]

항체		CDR1	CDR2	CDR3
hzVSF_W T	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGSTTY <u>A</u> QKFQ <u>G</u> (서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VATNLAD(서열번호 6)	QHFYGSPT (서열번호 7)
hzVSF_var 1	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGSTTYAQKFQG (서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VAD <u>N</u> LAD(서열번호 16)	QHFYGSPT (서열번호 7)
hzVSF_var 2	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGSTTYAQKFQG (서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VAD <u>N</u> L <u>G</u> D(서열번호 17)	QHFYGSPT (서열번호 7)
hzVSF_var 3	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGSTTYAQKFQG (서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VAD <u>N</u> R <u>G</u> D(서열번호 18)	QHFYGSPT (서열번호 7)
hzVSF_var 4	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGSTTYAQKFQG (서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VAD <u>N</u> R <u>G</u> D(서열번호 18)	QHFYGT <u>P</u> RT (서열번호 19)
hzVSF_var 5	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQG (서열번호 14)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VATNLAD(서열번호 6)	QHFYGSPT (서열번호 7)
hzVSF_var 6	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGSTTYAQKFQG (서열번호 3)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VATNLAD(서열번호 6)	QHFYGSPT (서열번호 7)
hzVSF_var 7	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQG (서열번호 14)	ETGTRAMDY (서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA (서열번호 5)	VATNLAD(서열번호 6)	QHFYGSPT (서열번호 7)

hzVSF_var 8	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQG(서열번호 14)	ETG <u>N</u> RAMD(서열번호 15)
	경쇄	RASENIYSNLA(서열번호 5)	VATNLAD(서열번호 6)	QHFYGPRT(서열번호 7)
hzVSF_var 9	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQG(서열번호 14)	ETGTRAMDY(서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA(서열번호 5)	VAD <u>N</u> RGD(서열번호 18)	QHFYGPRT(서열번호 7)
hzVSF_var 10	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQG(서열번호 14)	ETG <u>N</u> RAMDY(서열번호 15)
	경쇄	RASENIYSNLA(서열번호 5)	VAD <u>N</u> RGD(서열번호 18)	QHFYGPRT(서열번호 7)
hzVSF_var 11	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQG(서열번호 14)	ETGTRAMDY(서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA(서열번호 5)	VAD <u>N</u> RGD(서열번호 18)	QHFYGT <u>P</u> RT(서열번호 19)
hzVSF_var 12	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQG(서열번호 14)	ETG <u>N</u> RAMDY(서열번호 15)
	경쇄	RASENIYSNLA(서열번호 5)	VAD <u>N</u> RGD(서열번호 18)	QHFYGT <u>P</u> RT(서열번호 19)
hzVSF_var 13	중쇄	GYNMN(서열번호 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKFQG(서열번호 14)	ETGTRAMDY(서열번호 4)
	경쇄	RASENIYSNLA(서열번호 5)	VAD <u>N</u> LAD(서열번호 16)	QHFYGPRT(서열번호 7)

[240]

[241] [표6]

항체		FR1	FR2	FR3	FR4
hzVSF_W T	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r1	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r2	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r3	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r4	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r5	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r6	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_va r7	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27

hzVSF_var8	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var9	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var10	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var11	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var12	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 28(K74T, I76A)	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
hzVSF_var13	중쇄	서열번호 20	서열번호 21	서열번호 22	서열번호 23
	경쇄	서열번호 24	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27

[242]

[243] 상기에서 제조한 13개의 변이체는 모두 항바이러스능 및 항염증능이 유지 또는 증가되면서, 야생형에 비해 면역원성이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[244] 상기 변이체 중 면역원성이 가장 낮은 hzVSF\_var12는 hzVSF 야생형과 동일하게 1 unit이 500 ng에서 항바이러스 활성을 나타냈으며, 항바이러스능이 높으면서도 면역원성이 상대적으로 낮은 hzVSF\_var13의 경우에는, 250 ng/unit의 항바이러스 활성을 나타냈다.

[245]

[246] 실시예 6-3: hzVSF 야생형 및 이의 변이체의 epitope count 확인

[247] hzVSF 야생형과 이의 면역원성을 감소시킨 상기 변이체 중 대표적인 변이체인 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 epitope count와 현재 항체의약품으로

제약시장에서 블록버스터 의약품인 4종의 epitope count를 비교한 결과, 표 7에 나타낸 바와 같이, 각 HLA class II에서 상대적인 면역원성 가능성을 확인할 수 있었다.

[248]

[249] [표7]

단백질 종류	DRB1	DRB 3/4/5	DQ	DP	Total
hzVSF w	31	17	1	3	52
hzVSF_var1	30	18	1	3	52
hzVSF_var2	30	17	0	3	50
hzVSF_var3	30	16	0	3	49
hzVSF_var4	28	16	0	3	47
hzVSF_var5	30	16	1	3	50
hzVSF_var6	29	16	1	3	49
hzVSF_var7	28	15	1	3	47
hzVSF_var8	27	14	1	3	45
hzVSF_var9	27	14	0	3	44
hzVSF_var10	26	13	0	3	42
hzVSF_var11	25	14	0	3	42
hzVSF_var12	24	13	0	3	40
hzVSF_var13	29	17	0	3	49
Humira (human)	25	12	4	1	42
Remicade (chimeric)	74	37	3	1	115
Rituxan (chimeric)	65	33	9	3	110
Herceptin (humanized)	40	20	3	1	64

[250]

[251] 상기 표 7에서 total 값이 높을수록 세계전체인구에서 HLA class II에 의한 부작용의 가능성이 높음을 의미한다. 상기 결과를 통해 면역원성이 감소된 본 발명의 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 epitope count가 전 세계적으로 시판되고 있는 4종의 의약품 중 면역원성이 가장 낮은 Humira와 비슷한 것을 확인할 수 있으며, 이와 같은 결과는 본 발명의 인간화 항체들이 항바이러스제로 사용 시 야기될 수 있는 중대한 부작용이 매우 낮을 것임을 시사하는 것으로, 안전한 항바이러스 또는 염증용 의약품으로서의 안정성을 뒷받침하는 것이다.

- [252] 또한, 각 변이체의 활성은 var1부터 var12까지는 wild-type과 유사한 활성(0.5 mg/U)을 보였으며, var13은 wild-type보다 높은 활성을 보였다.
- [253]
- [254] 실시예 6-4: hzVSF 변이체의 T 세포 분석 확인
- [255] hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 면역원성을 평가하기 위하여 51명의 건강한 기증자의 혈액을 이용하여, Lonza의 in vitro T 세포 분석으로 본 물질이 T 세포의 증식에 영향을 미치는지를 확인하였다. 각 기증자의 전체 말초혈액 단핵구(Peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMC)에 hzVSF\_var12, hzVSF\_var13 또는 KLH(Keyhole limpet hemocyanin)를 처리한 후, 7일간 배양하였다. KLH는 산소를 운반하는 기능을 하는 메탈로단백질(metalloprotein)로서 항체 생산시 캐리어 단백질로 이용되며, 효과적으로 면역반응을 일으키기 때문에 양성 대조군으로 사용하였다. 이후 CD3+CD4+Edu+로 염색되는 T 세포의 비율(%)을 측정하였다. 그 결과, KLH는 45 명의 혈액 기증자에서 T 세포의 증식이 일어나 88 %가 반응하였으나, hzVSF\_var12 또는 hzVSF\_var13에 반응하여 T 세포의 증식을 유도한 개체는 각각 3개체로, 5.8%만이 본 물질에 반응하였다(도 17).
- [256] 한편, 대조군으로 7일간 배양한 PBMC를 이용하여 KLH, hzVSF\_v12 또는 hzVSF\_v13에 의해 유도된 T 세포 증식의 자극지수(stimulation index; SI)를 계산하였다. SI값이 2보다 크면 사람에게 적용하였을 때 면역원성이 클 것으로 예상되고, SI 값이 0.5보다 작으면 오히려 T 세포의 증식을 억제하는 것으로 예상된다. 그 결과 hzVSF\_v12 및 hzVSF\_v13은 1.12 및 1.03의 낮은 값의 SI 값으로, 대부분의 개체에서 0.6 이상 2 이하의 SI 값을 나타내는 것을 확인하였다. 반면에 양성 대조군으로 사용된 KLH는 3.91의 높은 SI 값을 보였다(도 18, 도 19, 및 표 8).

[257]

[258] [표8]

Product(Antigen)	Mean SI	p-value
hzVSF_var12	1.12	0.008
hzVSF_var13	1.05	0.3229
KLH	3.91	<0.0001

[259]

- [260] 이러한 결과로 hzVSF\_v12 및 hzVSF\_v13은 실제로 바이러스 질환에 걸린 환자에게 투여 시 면역원성이 적을 것으로 보이며, 이에 따른 부작용이 낮을 것으로 예상된다.

[261]

[262] 실시예 7: hzVSF 및 이의 변이체의 결합 에피토프 확인

[263]

[264] 상기 실시예에서 제조한 hzVSF 및 이의 변이체들이 결합하는 펩타이드를 동정하고자 하였다.

[265]

[266] 그 결과, 비멘틴 (vimentin)의 아미노산 142번 내지 294번의 분리된 서열번호 1의 펩타이드에 결합하는 것을 확인하였다 (도 54 내지 도 58).

[267]

[268] 실시예 8: hzVSF 변이체들의 물성 및 약동학 확인

[269]

[270] 상기 실시예 6에서 제조한 hzVSF 변이체들의 물성 및 약동학을 확인하기 위하여, 대표적인 변이체인 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13을 대상으로 실험을 수행하였다.

[271]

[272] 실시예 8-1: hzVSF 변이체의 분자량 패턴 및 순도 확인

[273] hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 분자량 패턴 및 순도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 이용하였다. 환원된 샘플은 NuPage 4X LDS 샘플 버퍼 (Invitrogen, NP0007)와 NuPage 10X 샘플 환원제 (Invitrogen, NP0009)를 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13와 혼합한 후, 70 °C에서 10분간 가열하여 준비하였다. 비환원 샘플은 환원제 첨가 및 가열과정을 생략하여 준비하였다. 각각 10  $\mu$ l의 1 mg/ml의 대조군 항체, hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13을 4-12%의 SDS-PAGE에서 전기영동한 후, 젤을 InstantBlue (TripleRed, ISB01L)으로 염색하여, hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 순도를 확인하였다.

[274]

[275] 그 결과, 도 20에 나타낸 바와 같이, 비환원 샘플인 레인 2 및 4에서는 IgG 항체 (약 150 kDa)에서 예상이 되는 위치에 주요 밴드가 관찰되었고, 환원 샘플인 레인 3 및 5는 IgG 항체의 중쇄 (약 50 kDa)와 경쇄 (약 25 kDa)에서 해당되는 위치에 밴드가 관찰됨으로, hzVSF의 변이체들 역시 hzVSF와 같이 일반적인 IgG 항체 패턴을 보임을 확인하였다. 또한 대조군으로 IgG4를 사용하였을 때 비환원 샘플인 레인 6 및 환원 샘플인 레인 7에서 확인되는 패턴과 동일하였다. 또한 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13 모두 좋은 순도를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[276]

[277] 또한, hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 순도와 응집도를 확인하기 위하여, hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13를 Zorbax GF-250  $\mu$ m 9.2 mm ID X 25 cm 컬럼 (Agilent)을 이용하여, Agilent 1200 시리즈의 HPLC(High-performance liquid chromatography)를 이용하여 SE (Size Exclusion)-HPLC로 분석하였다. HPLC에 주입하기 전에 1 mg/ml 농도의 샘플을 0.2  $\mu$ m 필터로 여과하여 불순물을 제거하였다. 각각 100  $\mu$ l의 샘플을 주입하여 15분간 1 ml/min으로 HPLC를 작동하였다. Chemstation 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[278]

- [279] 그 결과, 전형적인 IgG 항체의 단량체에 해당하는 위치 (정체시간 약 8.65분)에서 주요 피크를 확인하였으며, hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13의 순도가 95% 이상임을 확인하였다(도 21). 이량체 위치 (정체 시간 약 7.89-7.93분)에서 약 3.72%와 4.43%의 피크가 관찰되어, SDS-PAGE 결과와 동일하게 IgG 항체와 동일한 형태를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [280]
- [281] 실시예 8-2: hzVSF 변이체의 약동학 (pharmacokinetics) 분석
- [282] 마우스에 hzVSF\_var13 투약 후에 약물의 생체 내 이행, 즉 혈중 농도, 소실 반감기, 대사 속도 등을 정량적으로 예측함으로써 hzVSF\_var13의 체내 적정 투여량, 투여간격 및 투여 제형을 결정함으로써 임상시험 시 참고 할 객관적 지표를 얻고자 다음의 실험을 수행하였다.
- [283]
- [284] 대조군으로는 6.25  $\mu\text{g}$  (0.31 mg/kg)의 사람 면역글로불린 G (Human IgG, polyclonal)을, 실험군으로는 6.25  $\mu\text{g}$  (25 U; 0.31 mg/kg), 62.5  $\mu\text{g}$  (250 U; 3.10 mg/kg), 및 625  $\mu\text{g}$  (2500 U; 31.0 mg/kg)의 hzVSF\_var13을 마우스 꼬리 정맥에 주입하였다. 주입 후, 1, 2, 4, 8, 14, 21, 28, 35일에 마우스로부터 채혈 후 혈청 (serum)을 분리한 후 ELISA법을 이용하여 hzVSF\_var13의 혈중농도를 측정하였다.
- [285]
- [286] ELISA는 플레이트 상에 사람의 감마 특이 면역글로불린 (anti-human IgG ( $\gamma$  specific))으로 37 °C에서 2시간이나 4 °C에서 하룻밤 배양으로 고정시킨 후, 3% BSA(Bovine Serum Albumin)으로 코팅이 되지 않은 부분을 차단하기 위해서 37 °C에서 2시간 인큐베이션시켰다. 마우스로부터 채혈한 혈청을 37 °C에서 1시간 반응시킨 후 HRP (Hoseradish peroxidase)가 붙어있는 사람의 카파 특이 면역글로불린 (anti-human IgG ( $\kappa$  specific))으로 37 °C에서 30분 반응시켰다. 기질로 TMB 용액을 이용하여 암실에서 실내온도 9분 30초간 배양한 후, 450 nm의 파장에서 OD 값을 측정하여 hzVSF\_var13의 혈중량을 측정하였다. 마우스에 투여한 hzVSF\_var13의 각 농도별로 단회 투여했을 때 PK 파라미터를 표 9 및 도 22의 그래프에 표시하였다.
- [287]

[288] [표9]

	Sham control(IgG 0.31 mg/kg)	hzVSF_var13(0. 31 mg/kg)	hzVSF_var13(3. 10 mg/kg)	hzVSF_var13(3 1.0 mg/kg)
Female				
N	6	6	6	6
C <sub>max</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )	5.5 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 0.2	57.2 $\pm$ 1.0	607.2 $\pm$ 22.2
AUC( $\mu\text{g}\cdot\text{da}$ $\text{y}/\text{m}\ell$ )	178.1 $\pm$ 53.9	113.0 $\pm$ 17.8	948.3 $\pm$ 296.7	8686.9 $\pm$ 2958.8
t <sub>1/2</sub> (days)	20.1 $\pm$ 2.9	13.4 $\pm$ 2.4	10.8 $\pm$ 3.8	10.2 $\pm$ 3.0
CL( $\text{m}\ell/\text{day}/$ $\text{kg}$ )	1.8 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 1.1	4.0 $\pm$ 1.5
Male				
N	5	5	5	5
C <sub>max</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )	5.5 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.3	54.6 $\pm$ 1.4	563.0 $\pm$ 8.2
AUC( $\mu\text{g}\cdot\text{da}$ $\text{y}/\text{m}\ell$ )	121.8 $\pm$ 15.3	78.8 $\pm$ 20.8	798.1 $\pm$ 274.5	6939.9 $\pm$ 2311.8
t <sub>1/2</sub> (days)	16.6 $\pm$ 2.4	10.1 $\pm$ 3.1	9.0 $\pm$ 4.0	8.9 $\pm$ 3.7
CL( $\text{m}\ell/\text{day}/$ $\text{kg}$ )	2.6 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 1.2

[289]

[290]

그 결과, hzVSF\_var13의 25 U 용량으로 단일 투여한 경우, 동일용량을 투여한 Sham control (IgG)과 비교해서 혈중 농도 추이가 동일하게 감소하는 것으로 나타났다. 최고 농도 (Cmax) 및 혈중 시간 농도 곡선하 면적 (area under the concentration curve; AUC)는 투여량이 증가함에 따라 상승하여 용량비례성을 확인할 수 있었다. hzVSF\_var13의 25 U의 생체내 반감기 (t<sub>1/2</sub>)는 수컷 10일, 암컷 13일로 sham control (수컷 16일, 암컷 20일)에 비해 다소 낮게 나타났으며 투여용량이 증가함에 따라 생체 반감기는 다소 감소하는 경향이 있음을 확인할 수 있었다. 수컷에 비교해서 암컷에서 Cmax, AUC, 생체내 반감기 (t<sub>1/2</sub>), 생체내 전신 클리어런스값 (CLt)이 각 투여 농도에서 모두 높게 나타났다. 투여 35일 후 모든 마우스는 부검을 실시하여 장기중량측정, 조직병리검사, 면역독성실험, 중화능 실험을 수행하여, hzVSF\_var13이 체내 미치는 독성 여부를 조사하였으며, 어떤 부작용도 발견되지 않았다.

[291]

[292] 상기와 같은 결과는 본 발명의 hzVSF 및 이의 변이체 등이 생체 내 반감기가 다른 인간화 항체와 유사하며 임상적 이용에 문제가 없다는 것을 뒷받침하는 것이다.

[293]

[294] 실시예 9: hzVSF 및 변이체의 바이러스 억제능 확인

[295]

[296] 마우스세포인 L929세포에 EMC-D 바이러스를 감염시키고, hzVSF 야생형 및 hzVSF 변이체의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var12 및 hzVSF\_var13을 처리하여, 실시예 2의 MVIT 법으로 바이러스 억제능 확인하였다.

[297]

[298] 그 결과, 도 23에서 나타낸 바와 같이, hzVSF 야생형은 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 100% 항바이러스 효과를 나타냈으며, hzVSF\_var12는 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , hzVSF\_var13은 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 100% 항바이러스 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[299]

이에 따라 L929 세포에 EMC-D 바이러스를 감염시키고 동시에 VSF를 처리하였을 때 100% 항바이러스 효과를 나타내는 VSF의 ml내에 들어 있는 최소량을 생물학적 활성(biological activity) 1 unit으로 하였다.

[300]

[301] 이에 각 VSF들의 생물학적 활성을 표 10에 나타냈다.

[302]

[303] [표10]

VSF 종류	Biological activity (1 unit)	MW (kDa)
mVSF	0.09 $\mu\text{g}$	163
hzVSF_wt	0.5 $\mu\text{g}$	147
hzVSF_var12	0.2 $\mu\text{g}$	147
hzVSF_var13	0.1 $\mu\text{g}$	147

[304]

[305] 상기와 같은 결과들은 인간단세포균항체화, 면역원성 감소 및 affinity maturation을 수행하여 새롭게 제조한 hzVSF 변이체들 역시 mVSF보다는 역가가 떨어지나 hzVSF\_wt 보다 우수한 효과로 부작용이 거의 없게 항바이러스 효과 및 항염증 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

[306]

[307] 실시예 10: hzVSF의 친화력 확인

[308]

[309] hzVSF의 수용체에 대한 친화력(Affinity)은 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

[310]

L929 세포를  $6 \times 10^5$ 으로 플레이트한 후, 2 MOI의 EMC-D 바이러스를 0, 2, 6,

10시간 동안 감염시켰다. 4 unit의 리간드 (mVSF, hzVSF\_wt 및 hzVSF v13)를 첨가한 후, 1 시간 동안 배양하고 나서 배양액을 모아서 Ka 값을 구했다. 첨가한 리간드의 양과 반응 후 회수된 리간드 양 사이의 차이가 수용체와 결합한 양이고, 이를 통하여 친화도 Ka (affinity Ka) 및 해리상수 Kd (dissociation constant)를 구하였다 (표 11).

[311]

[312] [표11]

VSF 종류	Affinity constant (Ka)	Dissociation constant (Kd)
mVSF	2.1 x 10 <sup>10</sup> L/mol	4.7 x 10 <sup>-11</sup> M
hzVSF wt	8.2 x 10 <sup>9</sup> L/mol	1.2 x 10 <sup>-10</sup> M
hzVSF v13	1.7 x 10 <sup>10</sup> L/mol	5.9 x 10 <sup>-11</sup> M

[313]

[314] 그 결과, 바이오 제제의 후보물질에 상응하는 Ka 값 (1 X 10<sup>9</sup>) 이상을 나타내는 것을 확인하여, 바이오 제제로서 hzVSF 및 이의 변이체들 역시 수용체에 대한 결합력이 높음을 확인하였다.

[315]

[316] 실시예 11: 인간세포에서 hIFN- $\alpha$  및 hzVSF wt의 항세포 작용 확인

[317]

[318] 사람의 섬유모세포인 WI-38 세포에 EMC-D를 감염시킨 후, 서로 다른 농도의 사람의 인터페론과 hzVSF\_wt를 처리하여, 각각의 항바이러스능과 세포 생존력을 MTS 방법으로 측정하였다.

[319] 자세히는 세포를 96웰 평판에 넣은 후 24시간 동안 바닥에 붙도록 배양하였다. 100 pfu의 EMC-D 바이러스를 감염시킨 후, 인터페론 또는 hzVSF를 처리하였다. 48시간을 배양한 후에 MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]를 처리하였다. 다시 2 내지 3시간을 배양한 후에 490 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존력을 확인하였다. 도 24에서 보이는 것과 같이, 사람의 인터페론을 처리한 세포에서는 hzVSF\_wt 처리세포에 비하여 적은 양으로도 90% 정도의 생존율을 보이지만, 오히려 4 nM 이상의 고농도를 처리하면 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 반면에 hzVSF\_wt은 약 4 nM에서 100%의 생존율을 나타냈으며, 4 nM 이상의 농도에서도 세포 독성을 보이지 않았다.

[320]

[321] 상기 결과로부터, hzVSF는 인터페론과는 달리 부작용이 적을 것으로 예측할 수 있다.

[322]

[323] 실시예 12: 바이러스성 당뇨병에서 hzVSF wt의 염증세포 침윤 억제 및 항염증

확인

[324]

[325] 마우스에서 hzVSF 약물 농도 별 당뇨병에 대한 효능을 조사하기 위하여, 5 주령의 수컷 DBA/2N 마우스에 100 pfu의 EMC-D 바이러스를 복강주사로 감염시켰다. 이 후에, 2, 4, 16 unit의 hzVSF\_wt를 꼬리 정맥으로 주사한 후, 3일째부터 혈당과 뇨중 당의 정도를 조사하였다. 또한, 감염 후 3일째와 7일째 마우스를 희생시켜 채장을 적출하여 조직학적인 조사를 실시하였다.

[326]

[327] 그 결과, 도 25에 나타낸 바와 같이, 마우스에 EMC-D 바이러스를 감염시킨 후 채장을 적출하여 Hematotoxilyn & Eosin 염색한 경우, 바이러스만 감염시킨 군 (virus control)에서는 염증세포가 침윤되었거나 islet이 파괴되어 크기가 작아진 반면에, hzVSF\_wt를 4 unit 이상 투여한 군 (virus + hzVSF)에서는 염증세포의 침윤이 보이지 않고, islet도 정상이었다. 따라서 hzVSF\_wt가 EMC-D의 증식을 억제하고 염증세포의 침윤을 막아 islet이 파괴되지 않은 것으로 사료 된다.

[328]

또한 혈당을 검출한 결과, hzVSF\_wt를 4 unit 이상 투여한 군에서는 당뇨병이 발병하지 않았고, 혈당수준은 200 mg/dL 미만으로 정상 마우스의 범위에 해당되었다. 뇨에서도 8 unit 이상 투여한 군에서는 urine glucose가 전혀 검출되지 않았다 (표 12 내지 표 14).

[329]

바이러스성 당뇨병에서 hzVSF\_wt 약물 농도별 당뇨병 발병률을 표 12에, hzVSF\_wt 약물 농도별 혈액 내 글루코스 수준을 표 13에 hzVSF\_wt 약물 농도별 urine 글루코스 수준을 표 14에 나타냈다.

[330]

[표12]

Group	post-infection					당뇨병 발병률
	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	
virus control	-	4/4	4/4	4/4	4/4	100 %
2 unit/mouse	-	-	-	4/4	4/4	100 %
4 unit/mouse	-	-	-	-	-	0 %
8 unit/mouse	-	-	-	-	-	0 %
16 unit/mouse	-	-	-	-	-	0 %

[332]

※ 혈당 300 mg/dL 이상, urine glucose가 + 이상이면 당뇨병으로 간주함

[333]

[334] [표13]

Group	post-infection				
	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day
virus control	157 ± 25	541 ± 84	540 ± 84	526 ± 91	529 ± 100
2 unit/mouse	162 ± 24	157 ± 23	186 ± 53	484 ± 21	505 ± 26
4 unit/mouse	149 ± 42	148 ± 6	135 ± 11	145 ± 8	122 ± 16
8 unit/mouse	171 ± 42	148 ± 6	135 ± 11	145 ± 8	122 ± 16
16 unit/mouse	163 ± 21	160 ± 4	144 ± 9	139 ± 8	157 ± 22

[335] ※ 혈당 300 mg/dL 이상일 때 당뇨병 발병 마우스로 간주함

[336]

[337] [표14]

Group	post-infection				
	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day
virus control	-	++++	++++	++++	++++
2 unit/mouse	-	-	-	+++	+++
4 unit/mouse	-	-	-	-	-
8 unit/mouse	-	-	-	-	-
16 unit/mouse	-	-	-	-	-

[338]

[339] 상기 결과들은 본 발명의 hzVSF 및 이의 다양한 변이체들은 마우스에서 EMC-D 바이러스감염에 대한 항바이러스 효능 및 면역세포의 침윤 억제와 이로 인한 랑게르한스섬 (islet)의 파괴를 현저하게 저해하였으며, 바이러스의 감염에 의해 유발되는 당뇨병을 현저하게 치료할 수 있는 것을 알 수 있었다. 즉, 면역세포의 침윤을 유도하지 않고 항바이러스 효과를 나타낼 뿐 아니라, 바이러스성 당뇨병에 대한 치료 가능성으로 인해 다양한 염증성 질환의 치료제로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[340]

[341] 실시예 13: mVSF의 항-HBV 효과 확인

[342]

[343] mVSF의 사람 B형 간염바이러스 (Hepatitis B virus; HBV)에 대한 항바이러스 효과를 확인하기 위하여, HBV를 발현하는 사람의 간암 세포인 HepG2.2.15 세포를 이용하였다.

[344] HepG 2.2.15 세포를 플레이트에 붙인 후에 mVSF를 처리하고, 3일 마다

세포에서 배양액으로 증식되어져 나오는 HBV의 표면항원 (HBsAg) 양을 ELISA로 정량하였다. 이를 세포당 바이러스 양으로 환산하였다. 이와 동시에 세포의 수를 세어, 상대적인 세포당 바이러스의 양을 측정하였다.

[345]

[346] 그 결과, mVSF의 처리는 HBsAg의 양을 확연하게 감소시키며, 이러한 결과로 mVSF가 항-HBV 효과가 있다는 것을 알 수 있었다 (도 26). 이와 같은 결과는 본 발명의 hzVSF 및 이의 변이체들이 HBV 바이러스와 같은 간염 바이러스 역시 효과적으로 억제하는 것으로 다양한 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 나타내는 것을 뒷받침 하는 것이며, 또한 9일 동안 mVSF를 처리한 경우 바이러스가 세포당 80% 이상 감소하여 실제 사람에서는 추가적으로 염증을 억제할 것이므로 임상증상의 치료에 특별히 효과가 있을 것을 시사한다.

[347]

[348] 실시예 14: 바이러스 감염 세포에서 VSF 수용체의 발현 양상 확인

[349]

[350] 먼저, 바이러스 감염 세포에서 VSF 수용체가 발현되는지를 확인하기 위하여, B형 간염에 걸린 환자의 간조직(B형 간염에 의해 간암으로 진행되었으나 암이 없는 부분)과 C형 간염에 걸린 환자의 간조직(C형 간염에 의해 간암으로 진행되었으나 암이 없는 부분)을 mVSF 항체로 염색하였다. 대조군으로는 바이러스에 감염되지 않은 간조직(암이 없는 부분)을 사용하였다. 그 결과 HBV와 HCV가 감염된 환자로부터 얻은 간조직에서는 VSF 수용체가 발현되었지만, 대조 조직에서는 발현이 되지 않았으며, 이는 바이러스 감염 특이적으로 VSF의 수용체가 발현되는 것을 의미한다. 이와 같은 결과는 다른 환자로부터 유래된 간 조직에서 반복 실험을 한 경우에도 동일한 양상을 보였다(도 27 및 도 28).

[351] 다음으로 바이러스 감염에 따른 VSF 수용체의 발현 시기를 확인하기 위하여, H1N1 인플루엔자 바이러스를 MDCK 세포주에 감염시킨 후, 바이러스 복제와 VSF 수용체의 발현을 형광 염색을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, 인플루엔자 바이러스 감염 후 시간에 따라 바이러스의 복제가 일어나며, 이에 따라 VSF 수용체의 발현도 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 29). 이러한 결과로 VSF 수용체는 바이러스 감염에 의하여 유도되어 짐을 알 수 있었다.

[352] 또한, 사람의 WI-38 섬유아세포에 EMC-D 바이러스를 감염시킨 후 VSF 수용체의 발현과 VSF의 항바이러스 효능을 확인하였다(도 30). 도 30의 좌측은 EMC-D 감염에 따른 VSF 수용체의 발현을 확인한 것이며, 우측은 hzVSF\_wt 처리에 따른 항-EMC-D 효과 및 VSF 수용체의 발현을 나타낸 것이다. 상기 결과를 통하여 VSF가 EMC-D 바이러스 감염에 대해서도 항바이러스 효과 및 감염 특이적으로 수용체를 발현시키는 것을 확인할 수 있었다.

[353] 결론적으로 바이러스가 감염된 세포는 세포에 따라 시간의 차이는 있으나 VSF 수용체를 발현하며, VSF의 처리는 수용체의 발현에는 영향을 미치지 않지만

항바이러스 효과를 보이는 것을 알 수 있었다.

[354]

[355] 실시예 15: B형 간염 바이러스에 대한 hzVSF의 항바이러스 효과 확인

[356]

[357] 사람 B형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus; HBV)에 대한 hzVSF의 효능을 조사하기 위해, 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13으로 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[358]

[359] 실시예 15-1: cccDNA (covalently closed circular DNA) 분석

[360] HBV가 감염된 HepG2.2.15 세포주에 hzVSF\_var13 및 HBV 약물 (lamivudine; Lami)을 각 용량에 따라 처리하고, 일주일마다 세포 수를 세어 같은 양의 세포를 수득하였다.

[361] 상기 세포에서 HBV의 cccDNA를 얻기 위해, HepG2.2.15 세포를 회수한 후 용해 완충액 (25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 % SDS, 0.1 mg/ml proteinase K)으로 세포를 재현탁한 뒤, 55 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. MEGA quick-spin total fragment DNA purification kit (intron)로 전체 HBV DNA를 정제한 후, plasmid-safe ATP-dependent DNase로 37 °C에서 1시간 반응시키고, 70 °C에서 30분 동안 효소를 비활성시켰다. 그 다음 HBV rcDNA (relaxed circular DNA)를 제거하고 HBV cccDNA만 수득하였다. 이후 Accupower 2x greenstar qPCR Master mix (Bioneer)를 사용하여 qPCR로 HBV cccDNA의 정량분석을 진행하였다.

[362] PCR 프라이머는 forward 5'-TGAATCCYGCGGACGACC-3' (서열번호 153), reverse 5'-CAGCTTGGAGGCTTGAACAG-3' (서열번호 154)(nucleotides 1862-1881)(Y=C/T)를 사용하였다.

[363] 그 결과, hzVSF\_var13을 처리한 경우 HBV 감염 세포의 cccDNA 함량은 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 10 µg/ml을 처리한 경우 cccDNA 함량이 거의 없는 것을 확인하였다 (도 31).

[364] 이에, hzVSF의 투여는 세포내의 cccDNA의 양을 현저하게 감소시키므로, HBV 치료제로서 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다.

[365]

[366] 실시예 15-2: HBV DNA 억제 확인

[367] 다음으로, HBV가 감염된 HepG2.2.15 세포주에 hzVSF\_var13과 HBV 약물 (lamivudine; Lami)을 각 용량에 따라 처리하고, 일주일마다 세포 수를 세어 같은 양의 세포를 수득하였다.

[368] Intracellular HBV DNA의 경우 다음과 같이 수득하였다. 상기 수득한 HepG2.2.15 세포를 용해 완충액 (25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 % SDS, 0.1 mg/ml proteinase K)으로 재현탁시켰다. 이후 55 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 다음 MEGA quick-spin total fragment DNA purification kit

(intron)로 Intracellular HBV DNA를 얻었다. Extracellular HBV DNA의 경우 세포를 배양한 배양액을 일정량 얻어 배양액에 용해 완충액을 처리하여 추출하였다. 이후 Accupower 2x greenstar qPCR Master mix (bioneer)를 사용하여 qPCR로 HBV 전체 DNA의 정량분석을 진행하였다.

[369] PCR 프라이머는 forward 5'-CCTCTTCATCCTGCTGCT-3' (서열번호 155), reverse 5'-AACTGAAAGCCAAACAGTG-3' (서열번호 156)을 사용하였다.

[370] 그 결과, Extracellular HBV DNA의 경우 매우 낮은 농도 (0.1  $\mu\text{g/ml}$ )의 hzVSF\_var13을 처리한 경우에도 대조군인 Lami 처리군에 비해 HBV DNA 양을 현저히 감소시켰다 (도 32). Intracellular HBV DNA의 경우 hzVSF\_var13의 농도의존적으로 HBV DNA를 억제하는 것을 확인하였고, 대조군인 Lami 처리군에 비해 현저히 우수한 효과를 보이는 것을 확인하였다 (도 33).

[371] 결론적으로, hzVSF의 투여는 세포 내 및 세포 외의 HBV DNA의 양을 현저하게 감소시키므로, HBV의 치료제로서 우수한 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[372]

[373] 실시예 16: C형 간염 바이러스에 대한 hzVSF의 항바이러스 효과 확인

[374]

[375] 실시예 16-1: C형 간염 바이러스에 대한 hzVSF\_wt의 항바이러스 효과 확인

[376] 사람 C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus; HCV)에 대한 hzVSF\_wt의 효능을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[377] C형 간염 바이러스 JFH-1 바이러스주 (strain)를 0.1 MOI (multiplicity of infection)으로 사람 간세포인 Huh7.5 세포에 감염시킨 후, 3일째 3 ng/ml의 인터페론 $\beta$ 와 500, 1000, 2000 unit의 hzVSF\_wt를 처리한 후, 4일째 세포배양액과 세포를 수집하였다. 세포는 FACS를 이용하여 HCV NS5A를 항-HCV NS5A 항체염색을 이용하여 측정하였으며, 세포배양액은 실시간 정량 PCR (real-time quantitative PCR)을 이용하여 HCV RNA 역가 (titer)를 측정하였다.

[378]

[379] 그 결과, 1000 U/ml의 처리는 FACS에서 인터페론- $\beta$ 와 유사하게 항-HCV 효과를 나타냈다 (도 34). 또한 실시간 정량 PCR로 바이러스 역가를 측정한 결과, 1000 U/ml에서 hzVSF\_wt는 약 50%의 항-HCV 효과가 있으나 인터페론- $\beta$  보다는 약한 것을 확인할 수 있었다 (도 35).

[380] 하지만 실제 *in vivo*에서 인터페론은 부작용이 있는데 비해, hzVSF는 부작용이 없을 뿐만 아니라 염증에 의한 증상을 치료할 것으로 보이므로 실제 적용 시 현저한 우수성이 있을 것이다. 그러므로 바이러스감염 초기에 세포에서의 바이러스 증식 억제는 화학약제와 인터페론병용으로 하고, 바이러스감염의 증기 또는 증상이 나타난 이후부터는 hzVSF와 화학약품을 병용하여 면역병리 현상 억제뿐만 아니라 바이러스 증식을 억제할 필요가 있다. 즉, 상기와 같은 결과들은 바이러스 증식 억제능이 뛰어난 화학약품(또는 인터페론)과 면역병리현상 억제능이 뛰어난 본원발명의 hzVSF\_wt 및 이의 다양한 변이체의

병용치료 가능성을 시사하는 것이다. 그러나, 이외에도 hzVSF\_wt 및 이의 다양한 변이체 단독으로도 부작용없는 항바이러스제로의 적용을 시사하는 것이다.

[381]

[382] 실시예 16-2: C형 간염 바이러스 (HCV 1a)에 대한 hzVSF 변이체의 항바이러스 효과 확인

[383] 다음으로, C형 간염 바이러스에 대해 hzVSF 변이체의 항바이러스 효과를 확인하고자, 대표적으로 hzVSF\_var13에 대하여 실험을 수행하였다.

[384] 먼저, hzVSF 변이체의 HCV 1a 복제 억제 효과를 확인하기 위해, HCV TNcc (TN cell-culture derived; 유전자형 1a)가 감염된 Huh7 세포에 hzVSF\_var13을 각 용량에 따라 처리하고 3, 6, 9, 12 일에 세포를 수득하였다. 그 다음, HCV 감염 세포를 회수한 후 트라이졸 (trizol)을 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이후 역전사를 통해 cDNA를 수득한 다음, Accupower 2x greenstar qPCR Master mix (bioneer)를 사용하여 qPCR로 HCV RNA 및 보정을 위한 GAPDH (housekeeping gene)의 정량분석을 진행하였다.

[385] HCV 표적 PCR 프라이머로는 forward 5'-GGGCTATAAGGTGCTAGTGC-3' (서열번호 157), reverse 5'-GGCTGCCAGTGGTAATTGTT-3' (서열번호 158)을 사용하였고, GAPDH PCR 프라이머로는 forward 5'-TCCCTGAGCTGAACGGGAAG-3' (서열번호 159), reverse 5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3' (서열번호 160)을 사용하였다.

[386] 그 결과, HCV 1a RNA의 함량은 hzVSF\_var13을 0.1 U/ml 이상의 농도로 처리한 경우 시간이 지남에 따라 감소하는 것을 확인하였으며, 이러한 HCV 1a 복제 억제 효과는 hzVSF\_var13의 농도 의존적인 것을 확인하였다 (도 36의 A).

[387] 나아가, hzVSF\_var13을 처리한 경우 HCV core 단백질의 함량을 확인하기 위해 웨스턴블랏 분석을 수행한 결과, 처리된 농도 의존적으로 단백질 함량이 감소하는 것을 확인하였다 (도 36의 B).

[388]

[389] 다음으로, hzVSF\_var13의 HCV 약물 대비 효과를 확인하고자 하였다. HCV TNcc (유전자형 1a)가 감염된 Huh7 세포에 hzVSF\_var13과 HCV 약물 (sofosbuvir, simeprevir)을 각 용량에 따라 처리하고 일주일마다 HCV 감염세포를 회수한 후 트라이졸을 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이후 역전사를 통해 cDNA를 얻었다. 그 다음, Accupower 2x greenstar qPCR Master mix(bioneer)를 사용하여 qPCR로 HCV 전체 RNA(서열번호 157 및 158의 프라이머를 사용) 및 보정을 위한 GAPDH (housekeeping gene)의 정량분석을 진행하였다.

[390] 그 결과, hzVSF\_var13을 1 µg/ml 농도로 처리한 경우에는 대조군 약물에 비해서도 현저하게 HCV 1a의 복제를 억제하는 것을 확인하였다 (도 37).

[391] 따라서, HCV TNcc (유전형 1a) 감염세포에 hzVSF 변이체 투여는 HCV 유전자 (RNA) 및 HCV core 단백을 감소시키므로, hzVSF 변이체가 HCV에 대한

항바이러스 효과를 가진다는 것을 알 수 있었다.

[392]

[393] 실시예 16-3: C형 간염 바이러스 (HCV 1b)에 대한 hzVSF 변이체의 항바이러스 효과 확인

[394] 다음으로, hzVSF 변이체의 HCV 1b 복제 억제 효과를 확인하기 위해, HCV 유전자형 1b의 subgenomic replicon을 발현하는 Huh7 세포에 hzVSF\_var13과 HCV 약물 (sofosbuvir, simeprevir)을 각 용량에 따라 처리하고, 일주일마다 HCV 감염 세포를 회수한 후, 트라이졸을 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이후 역전사를 통해 cDNA를 얻었다. Accupower 2x greenstar qPCR Master mix (bioneer)를 사용하여 qPCR로 HCV 전체 RNA 및 보정을 위한 GAPDH (housekeeping gene)의 정량분석을 진행하였다.

[395] HCV 표적 PCR 프라이머로는 forward 5'-ATGCAGCCCAAGGGTATAAG-3' (서열번호 161), reverse 5'-GGTTCTGATGTTAGGGTCGATAC-3' (서열번호 162)를 사용하였고, GAPDH PCR 프라이머로는 서열번호 159 및 160의 프라이머를 사용하였다.

[396] 그 결과, hzVSF\_var13을 처리한 경우 농도 의존적으로 HCV 1b의 복제를 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 hzVSF\_var13을 1 µg/ml 농도로 처리한 경우 대조군 약물인 Sofosbuvir 및 Simeprevir와 유사한 수준으로 효과를 보이는 것을 확인하였다 (도 38의 B). 또한, hzVSF\_var13의 처리 농도별로 HCV NS5A의 수준을 웨스턴블랏으로 확인한 결과, 농도 의존적으로 HCV NS5A의 양이 감소하는 것을 확인하였다 (도 38의 A).

[397] 따라서, HCV replicon (유전형 1b) 발현 세포에 hzVSF\_var13 투여는 HCV 유전자 (RNA) 및 HCV NS5A 단백질의 양을 감소시키므로, HCV에 대한 항바이러스 효과를 가지는 것을 알 수 있었다.

[398]

[399] 실시예 16-4: C형 간염 바이러스 (HCV 2a)에 대한 hzVSF 변이체의 항바이러스 효과 확인

[400] 다음으로, hzVSF 변이체의 HCV 2a 복제 억제 효과를 확인하기 위해, HCV 유전형 2a가 감염된 JFH-1 세포에 hzVSF\_var13과 HCV 약물 (sofosbuvir, simeprevir)을 각 용량에 따라 처리하고, 일주일마다 HCV 감염세포를 회수한 후 트라이졸을 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이후 역전사를 통해 cDNA를 얻었다. 그 다음, Accupower 2x greenstar qPCR Master mix (bioneer)를 사용하여 qPCR로 HCV 전체 RNA 및 보정을 위한 GAPDH (housekeeping gene)의 정량분석을 진행하였다. HCV 표적 PCR 프라이머는 서열번호 157 및 158의 프라이머를 사용하였고, GAPDH PCR 프라이머는 서열번호 159 및 160의 프라이머를 사용하였다.

[401] 그 결과, hzVSF\_var13을 처리한 경우 7 주 경과 시점에서는 처리 농도에 큰 차이 없이 대조군 약물과 유사한 수준으로 HCV 2a의 복제를 억제하는 것을

확인하였다 (도 39의 B). 나아가, 상기 결과를 장기적으로, 즉 21 주까지 확인하였을 때, 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도로 처리한 경우에는 Sofosbuvir 및 simeprevir를 처리한 경우와 유사하게 HCV 2a의 복제 억제 효과가 유지되는 것을 확인하였다 (도 40).

[402] 상기 결과를 종합하면, HCV 유전형 2a 감염세포에 hzVSF\_var13을 투여하는 경우, HCV 유전자 (RNA) 및 HCV core 단백질 (도 39의 A)을 감소시키므로 HCV에 대한 항바이러스 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

[403]

[404] 실시예 17: 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 hzVSF의 치료 효과 확인

[405]

[406] 본원발명의 hzVSF의 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 및 항염증 효과를 확인하기 위하여, 마우스에서 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[407] 4주령의 암컷 Balb/c 마우스에  $1 \times 10^5$  pfu의 H1N1 Influenza A/Puerto Rico/8/34 바이러스를 비강으로 감염시킨 후, 감염 2, 4 또는 6일째 25, 100, 400 unit의 hzVSF\_var13을 꼬리 정맥으로 투여하였다. 바이러스 감염 후 7일과 9일째 마우스를 희생하여 H&E 염색, 폐와 몸무게의 무게, 점막 상피 세포 및 섬모, 및 면역조직화학염색법으로 면역세포의 침윤을 조사하였다.

[408]

[409] 그 결과, 500 U의 hzVSF\_var13을 투여한 군에서는 대조군에 비하여 인플루엔자 역가가 100배 이상 감소하였다 (도 41).

[410] 또한, H1N1 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 군은 폐포에 면역세포와 침윤이 일어난 반면에, 100 U과 400 U을 투여한 군은 투여시기에 관계 없이 비감염 대조군의 폐조직처럼 정상 폐처럼 인플루엔자 바이러스에 의한 증상이 치료되었다. 25 U을 투여한 경우에도 투여 시기에 의한 차이는 있으나 면역세포의 침윤을 억제하므로 치료 효과가 있음을 확인하였다(도 42).

[411] 아울러, 마우스 폐의 기도 상피세포 (epithelial cell)의 섬모 (cilia)를 관찰한 결과, 비감염 대조군과 400 U hzVSF\_var13 투여군은 폐 기도에 섬모를 가지고 있는 상피세포를 관찰할 수 있는 반면에, 바이러스에 감염된 폐에서는 상피세포 층이 바이러스 감염에 의하여 소실되었다 (도 43).

[412] 또한, 폐 무게와 마우스의 몸무게 비율을 측정한 결과, 바이러스에 감염된 군은 폐에 액체가 차는 폐렴증상으로 인하여 몸무게당 폐의 비율이 증가하는 반면에, hzVSF\_var13을 투여한 군은 농도에 어느 정도 비례하여 정상 마우스의 몸무게당 폐의 비율 방향으로 감소하는 것을 확인하였다 (도 44).

[413] 마지막으로, hzVSF\_var13의 면역세포 침윤 억제효과를 관찰하기 위하여 면역조직화학염색법으로 CD4 T 세포 (도 45 및 46)와 대식세포 (macrophage)의 마커 (도 47 및 48)를 이용하여 확인하였다 (도 46과 48에서는  $10^7$  pfu 감염). H1N1 인플루엔자 바이러스  $10^7$  pfu 감염 후 7일째의 마우스 폐 염색에서 CD4 T 세포와

대식세포의 침윤이 일어난 반면, hzVSF\_var13을 투여한 군에서는 CD4 T 세포와 대식세포의 침윤이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다 (도 45 내지 48).

[414]

[415] 이와 같은 결과들은 본 발명의 hzVSF 및 이의 다양한 변이체들이 인플루엔자 바이러스에 대한 탁월한 항바이러스 효과뿐만 아니라, 더욱이 면역세포의 침윤을 억제하는 항염증 효과로 염증을 억제하여, 부작용이 없는 항바이러스제뿐 아니라 항염증제로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[416]

[417] 실시예 18: 다양한 바이러스에 대한 hzVSF의 항바이러스 효과 확인

[418]

[419] 본 발명의 hzVSF\_wt 및 이의 변이체들이 다양한 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, hzVSF\_wt 및 대표적인 변이체인 hzVSF\_var13의 효과를 *in vitro* 및 *in vivo*에서 확인하였다. *in vitro* 실험은 항바이러스능에 대한 것이고, *in vivo* 실험은 항바이러스 및 항염증에 대한 것이다.

[420] 그 결과를 표 15에 나타냈다.

[421]

[422] [표15]

Virus	Antiviral effects	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Encephalomyocarditis virus(EMCV)	+++	+++
Mengovirus	+++	NT
Reovirus	+	NT
Influenza virus	+	+++
HIV	++	NT
HCMV	+	NT
Mouse hepatitis virus (MHV)	++	+++
Hantaan Virus	++	NT
HBV	++	NT
HCV	++	NT

[423] ※ NT: Not tested

[424]

[425] 그 결과, 뇌심근염 (EMCV) 바이러스에 대해서는 hzVSF가 *in vitro* 및 *in*

vivo에서 다 탁월한 항바이러스능과 항염증을 나타냈다. Mengovirus에 대해서는 *in vitro*에서 탁월한 항바이러스능을 보였다. 레오바이러스 (Reovirus)에 대해서도 역시 *in vitro* 및 *in vivo*에서 효과를 나타냈다. HIV에 대해서도 역시 *in vitro*에서 항바이러스 효능을 나타냈다. HCMV에 대해서도 항바이러스능 및 항염증능을 보였다. 한탄바이러스 (Hantaan virus)에 대해서도 *in vitro*에서 효능을 나타냈으며, B형 및 C형 간염 바이러스에 대해서도 *in vitro*에서 항바이러스능을 보였다. 사람 간염과 유사한 기전으로 마우스에서 간염을 야기하는 MHV에 대해서는 특히 *in vivo*에서 항바이러스 및 항염증능을 나타냈다. 인플루엔자 바이러스에 대하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항바이러스 및 항염증능을 나타내었으며, *in vivo*에서 효능이 더욱 탁월하였다.

[426]

[427] 실시예 19: 마우스모델에서 mVSF 투여에 의한 염증성 사이토카인 분비 억제 효과 확인

[428]

[429] mVSF가 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 마우스에 EMC-D 바이러스를 감염시키고 mVSF를 투여한 뒤 3일 후, 염증성 사이토카인의 양을 혈청에서 ELISA로 측정하였다. 하기 표 16에서 보는 바와 같이 바이러스 감염 후 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  및 MCP-1이 증가되었으나, mVSF의 투여는 이러한 염증성 사이토카인의 발현을 저해하였다.

[430]

[431] [표16]

Sample	Cytokine(pg/ml) : 바이러스감염 3일 후 측정				
	IL-12	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	CCL2 (MCP-1)
Normal	ND	2.9	4.6	1.3	13.8
EMC-B	1.1	190.3	44.3	91.4	1752.7
EMC-D	1.6	21.3	15.8	29.2	609.3
EMC-D+VSF(1000unit)	1.2	6.5	8.8	6.2	124.9

[432] \*ND - not detected

[433]

[434] 상기 결과로부터 mVSF는 바이러스 감염에 의해 유도되는 염증을 억제하는 항염증 효과도 있음을 알 수 있었다.

[435]

[436] 또한, 마우스 급성간염에서 mVSF가 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 마우스에 마우스 간염 바이러스를 감염시키고 VSF를 처리한 뒤

1일 또는 3일 후, 염증성 사이토카인의 양을 혈청에서 ELISA로 측정하였다. 하기 표 17에서 보이는 바와 같이 바이러스 감염 후 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  및 MCP-1이 증가되었으나, VSF의 투여는 이러한 염증성 사이토카인의 발현을 저해하였다. 또한 IFN- $\alpha$ 의 1 회 병용투여가 더 큰 상승효과를 나타내는 것을 볼 수 있었다.

[437]

[438] [표17]

	Cytokine(pg/ml)						
	sample	IL-12	TNF- $\alpha$	INF- $\gamma$	CCL2(MCP-1)	IL-10	IL-6
감염 후 1일	Normal	ND	5.4	1.2	ND	ND	1.2
	Virus infection	14.2	40.0	166.2	1165.5	ND	205.6
	virus+VSF	ND	8.4	1.9	16.9	ND	5.0
	virus+IFN- $\alpha$ 1회+VSF	ND	9.1	1.6	13.0	ND	1.5
감염 후 2일	Normal	ND	2.1	ND	ND	ND	ND
	virus infection	8.7	38.0	724.3	344.5	ND	13.7
	virus+VSF	ND	32.4	74.5	129.9	ND	9.2
	virus+IFN- $\alpha$ 1회+VSF	ND	4.0	20.3	13.9	ND	1.4

[439]

[440] 상기 결과부터 VSF는 바이러스 감염에 의해 유도되는 염증을 억제하는 항염증 효능도 있음을 알 수 있었다.

[441]

[442] 실시예 20: 마우스 모델에서 hzVSF 투여에 의한 염증성 사이토카인 분비 억제 효과 확인

[443]

[444] 본 발명의 hzVSF가 염증성 질환의 치료를 위한 염증성 사이토카인의 분비를 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[445]  $1 \times 10^5$  pfu의 H1N1 (Influenza A/PR8) 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스의 폐와 감염 1일 후 500 unit의 hzVSF\_var13을 투여한 마우스의 폐를 적출하였다. GLB (Greenberger Lysis Buffer)를 폐와 함께 균질화한 후, 얼음 상에 30분간 정치 후,  $3,470 \times g$ , 7 분,  $4^\circ\text{C}$ 에서 원심분리를 수행하였다. 상층액을 수득한 후,  $420 \times$

g, 10 분, 4 °C에서 원심분리 후, 상기 폐 시료와 capture bead, PE detection reagent를 1:1:1로 50  $\mu$ l씩 혼합한 후, 빛을 차단한 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 세척 버퍼로 bead를 재현탁한 후, FACS cantoII로 데이터를 측정하였다.

[446]

[447] 그 결과, 인플루엔자 바이러스 감염 7일에 마우스의 폐에 pro-inflammatory cytokine에 속하는 IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL2 (MCP-1)의 양이 현격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 본 발명의 hzVSF\_var13 투여 결과, 마우스의 폐에서 상기 사이토카인의 생성을 현저하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (도 49).

[448] 즉, 다양한 염증성 사이토카인을 억제하여 바이러스 감염에 의한 다양한 염증성 질환의 치료제로서 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[449]

[450] 실시예 21: 비멘틴 과발현 세포주 (stable cell line)에서 EMC-D 감염 후 hzVSF의 효과 확인

[451]

[452] 비멘틴을 발현하지 않는 MCF-7 세포에 비멘틴 (wt) 또는 hzVSF와의 결합부위를 돌연변이시킨 비멘틴 (mt)을 형질전환시켜 비멘틴 (wt) 또는 비멘틴 (mt) 과발현 세포주를 제조하였다. 그 다음, 비슷한 발현수준을 가진 선별된 세포를 이용하여 MVIT assay를 수행하였다.

[453] 구체적으로, 웰 당  $2 \times 10^4$  개의 세포를 접종한 후, 2 MOI의 EMC-D 바이러스를 감염시키고, 2 시간 후 hzVSF\_var13을 256 U으로부터 4 배씩 연속적으로 희석하여 첨가하고 2 일간 배양하였다. 그 다음, 세포를 메탄올로 고정시킨 후 0.5 % 크리스탈 바이올렛 (crystal violet)으로 염색하여 공기 건조한 후 관찰하였다.

[454] 그 결과, MCF-7 모세포, Mock 및 비멘틴 (mt)는 EMC-D 바이러스 감염에 대한 hzVSF의 효능을 관찰하지 못한 반면, 비멘틴 (wt)을 발현하는 MCF-7은 바이러스 감염에 의하여 비멘틴이 VSF 수용체 (VR)로 구조적인 변화가 유도되어, hzVSF의 항바이러스 효능이 있음을 확인할 수 있었다 (도 50 및 도 51).

[455]

[456] 다음으로, 세포 독성을 확인하기 위해 WST assay를 추가적으로 실시하였다. 상기 MVIT assay와 동일한 조건에서 비멘틴 (wt) 및 비멘틴 (mt) 세포를 3일간 배양한 후, 테트라졸리움 염 (tetrazolium salt, WST-1)을 처리하여 추가적으로 4시간 배양하고, 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정 후, 상층액을 제거한 다음 세포를 메탄올로 고정시킨 후, 0.5 % 크리스탈 바이올렛을 이용하여 고정 염색을 20 분간 진행한 후 공기 건조시켰다. 염색된 세포를 메탄올에 녹여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정함.

[457] 그 결과, MCF-7 모세포, Mock 및 비멘틴 (mt)은 EMC-D 바이러스 감염에 대한

hzVSF의 효능을 관찰하지 못한 반면, 비멘틴 (wt)을 발현하는 MCF-7은 바이러스 감염에 의하여 비멘틴이 VSF 수용체 (VR)로 구조적인 변화가 유도되어 hzVSF의 항바이러스 효능이 있는 것을 확인하였다 (도 52).

[458]

[459] 다음으로, 비멘틴 과발현 세포주 (stable cell line)에서 EMC-D 감염에 따른 VSF 수용체 (VR)의 발현 양상을 확인하고자 하였다. 이에, 각각의 stable MCF-7 세포, 즉 비멘틴 (wt) 및 비멘틴 (mt)에 5 MOI의 EMC-D를 9 시간 감염시킨 후, hzVSF\_var13으로 세포를 면역염색시켰다. 세포를 고정시킨 후 permeabilization 시키고 1:250으로 희석시킨 hzVSF\_var13을 세포와 반응시켰다. 2차 항체로 FITC-goat human IgG로 반응시키고 형광현미경으로 세포에서의 hzVSF에 대한 수용체 (VR) 발현을 확인하였다 (500 배율).

[460] 그 결과, 도 55에서와 같이 mock 및 hzVSF의 결합부위가 돌연변이된 비멘틴 발현 세포에는 hzVSF\_var13이 결합하지 않았으나, wt의 비멘틴을 발현하는 세포에서는 바이러스 감염에 의하여 VR이 발현되는 것을 확인하였다 (도 53).

[461]

[462] 실시예 22: E. coli에서 정제한 VR WT 및 MT와 VSF의 결합 확인

[463]

[464] Ni-NTA system을 이용하여 정제된 p60 재조합 단백질 5 mg과 hzVSF\_var13을 molar ratio 2:1로 계산하여 최종 부피가 700 ml가 되도록 PBS (phosphate buffered saline)로 채운 뒤 4 °C 오비탈 셰이커 (orbital shaker)에서 3 시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, protein A 비드 (50 % slurry)를 첨가하여 4 °C에서 1 시간 인큐베이션한 후, protein A-hzVSF-VR 복합체를 3,000 x g로 4 °C에서 3 분간 원심분리하였다. 그 다음, 상층액을 제거하고, PBS로 비드를 세척한 후 3,000 x g로 4 °C에서 3 분간 다시 원심분리하였고, 이 과정을 3 회 반복하였다. 그 다음, 2X SDS-표본 완충액을 넣고 5 분간 boiling하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏을 진행하였다.

[465] 그 결과, 비멘틴의 Y150/R186/Q195/R217/K235/R270 6개 아미노산을 각각 F, K, N, K, R 및 K로 치환 돌연변이를 시킨 단백질은 hzVSF와의 결합이 확연하게 떨어지는 것을 확인하였다 (도 54). 이로써 hzVSF는 비멘틴의 Y150/R186/Q195/R217/K235/R270에 결합한다는 것을 알 수 있었다.

[466]

[467] 실시예 23: HEK293T 세포에서 과발현시킨 VR (mt)와 VSF와의 결합 확인

[468]

[469] HEK293T 세포에 p60 WT 또는 p60 MT를 형질전환시킨 후 hzVSF\_v13과의 결합을 확인하였다.

[470]

구체적으로,  $2 \times 10^6$  개의 HEK293T 세포를 100 mm 배양접시에 접종한 후, p60 WT (wild-type) 및 MT (mutant-type) DNA (vector : pcDNA3.1mycHisC)로 형질전환시키고, 48 시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 상기 세포를 회수한

후 1 ml의 1 % CHAPS 용해 완충액을 첨가하고, 20 분간 얼음에 정치시켜 세포를 용해시켰다. 용해된 세포를 4 °C에서 13,000 rpm으로 15 분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 700 mg의 단백질에 50 % slurry의 protein A 비드를 첨가하여 4 °C에서 1시간 동안 preclear 반응을 하였다. 그 다음, 4 °C에서 3,000 x g로 3 분간 원심분리한 후, 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. hzVSF\_var13을 1:100으로 처리한 후, 4 °C에서 밤새 인큐베이션하여 VSF와 VR을 결합시켰다. 그 다음, 50 % slurry의 protein A를 첨가한 후, 4 °C에서 1 시간 동안 반응시켰다. Protein A-VSF-VR 복합체를 얻고 비드를 세척하기 위하여 4 °C에서 3,000 x g로 3 분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 그 다음, 침전된 복합체에 1 % CHAPS 용해 완충액을 첨가하여 비드를 3번 세척하였다. 2X SDS-표본 완충액을 넣고 boiling하여 SDS-PAGE와 immunoblot을 수행하였다.

[471] 그 결과, 세포에서 과발현시킨, 비멘틴의 Y150/R186/Q195/R217/K235/R270 6개 아미노산을 각각 F, K, N, K, R 및 K로 치환 돌연변이를 시킨 단백질은 hzVSF와의 결합이 확연하게 떨어지는 것을 확인하였다 (도 55). 이로써 hzVSF는 비멘틴의 Y150/R186/Q195/R217/K235/R270에 결합하는 것을 알 수 있었다. 6개의 아미노산을 돌연변이로 치환시킨 lane에서 VSF와의 약한 결합은 HEK293T 세포에 내재하는 야생형 비멘틴과 과발현시킨 변이 비멘틴과의 dimerization 및 tetramerization으로 인하여 VSF가 약하게 결합하는 것으로 추정된다.

[472]

[473] 상기 결과에 이어, 컴퓨터 프로그램을 이용하여 비멘틴-VSF 결합 모델을 확인하였다 (도 56 내지 도 58). 분석에 사용된 구체적인 프로그램은 하기와 같다.

[474]

[475] VR dimer modeling: Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0

[476] (Component software Template detection: HHpred 1.51

[477] Secondary structure prediction: Psi-pred 2.5

[478] Disorder prediction: Disopred 2.4

[479] Transmembrane prediction: MemSAT\_SVM

[480] Multi-template modelling and ab initio: Poing 1.0

[481] Re-orienting structures for easy viewing: OVOP)

[482]

[483] Complex modeling of VR\_dimer and VSF : Pymol

[484] Complex modeling of VR\_dimer and chemical : autodock vina

[485]

[486] VR 다이머 모델링을 통하여 VR이 hzVSF와 결합하였을 때의 구조를 추정하였으며, 결론적으로 hzVSF는 비멘틴의 Y150/R186/Q195/R217/K235/R270 잔기에 결합하는 것을 확인하였다.

[487]

[488] 상기와 같은 결과는 본 발명의 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는

항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편이 광범위한 바이러스 질환에 대해 항바이러스 및 항염증 효과를 나타낼 것을 시사하는 것으로, 기존 항바이러스제인 인터페론이나 화학요법제와는 다르게 부작용 없이, 바이러스 감염 세포에만 선택적으로 적용하여, 치료시 소량으로 가능하며, 면역세포 침윤을 억제하여 항염증 작용을 하며 다양한 바이러스 치료제로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[489]

[490] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

## 청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항체는 마우스 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체인 것인, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드의 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, 이들의 이량체, 미니바디(minibodies), 디아바디(diabodies) 및 다량체(multimer) 또는 이중 특이성 항체 단편인 것인, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 3 또는 서열번호 14로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 4 또는 서열번호 15로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 5로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 6, 서열번호 16, 서열번호 17, 또는 서열번호 18로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 7 또는 서열번호 19로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 서열번호 20으로 기재된 중쇄 FR1 (Framework region 1); 서열번호 21로 기재된 중쇄 FR2; 서열번호 22 또는 서열번호 28로 기재된 중쇄 FR3; 및 서열번호 23으로 기재된 중쇄 FR4를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 24로 기재된 경쇄 FR1; 서열번호 25로 기재된 경쇄 FR2; 서열번호 26으로 기재된 경쇄 FR3; 및 서열번호 27로 기재된 경쇄 FR4를 포함하는, 경쇄 가변 영역을 추가로 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 인간화 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은,  
 (a) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 6, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3;  
 (b) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 16, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3;  
 (c) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 17, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3;  
 (d) 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3;



서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 19로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4;

(m) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 15로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 28, 및 서열번호 23으로 각각 기재된 중쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4, 및 서열번호 5, 서열번호 18, 및 서열번호 19로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3 및 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 및 서열번호 27로 각각 기재된 경쇄 FR1, FR2, FR3 및 FR4; 또는

(n) 서열번호 2, 서열번호 14, 및 서열번호 4로 각각 기재된 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 및 중쇄 CDR3, 및 서열번호 5, 서열번호 16, 및 서열번호 7로 각각 기재된 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3를 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.

[청구항 7] 제2항에 있어서, 상기 인간화 항체는 각각 서열번호 10 및 서열번호 12; 서열번호 32 및 서열번호 34; 서열번호 36 및 서열번호 38; 서열번호 40 및 서열번호 42; 서열번호 44 및 서열번호 46; 서열번호 48 및 서열번호 50; 서열번호 52 및 서열번호 54; 서열번호 56 및 서열번호 58; 서열번호 60 및 서열번호 62; 서열번호 64 및 서열번호 66; 서열번호 68 및 서열번호 70; 서열번호 72 및 서열번호 74; 서열번호 76 및 서열번호 78; 또는 서열번호 80 및 서열번호 82로 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.

[청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 마우스 항체는 서열번호 137로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 138로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 139로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 134로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 135로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 136으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.

[청구항 9] 제2항에 있어서, 상기 마우스 항체는 서열번호 9로 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8로 기재된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.

[청구항 10] 제2항에 있어서, 상기 키메라 항체는 서열번호 141 또는 서열번호 142로 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 140으로 기재된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.

[청구항 11] 제2항에 있어서, 상기 키메라 항체는 서열번호 146 또는 서열번호 148로 기재된 중쇄 및 서열번호 144로 기재된 경쇄를 포함하는, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.

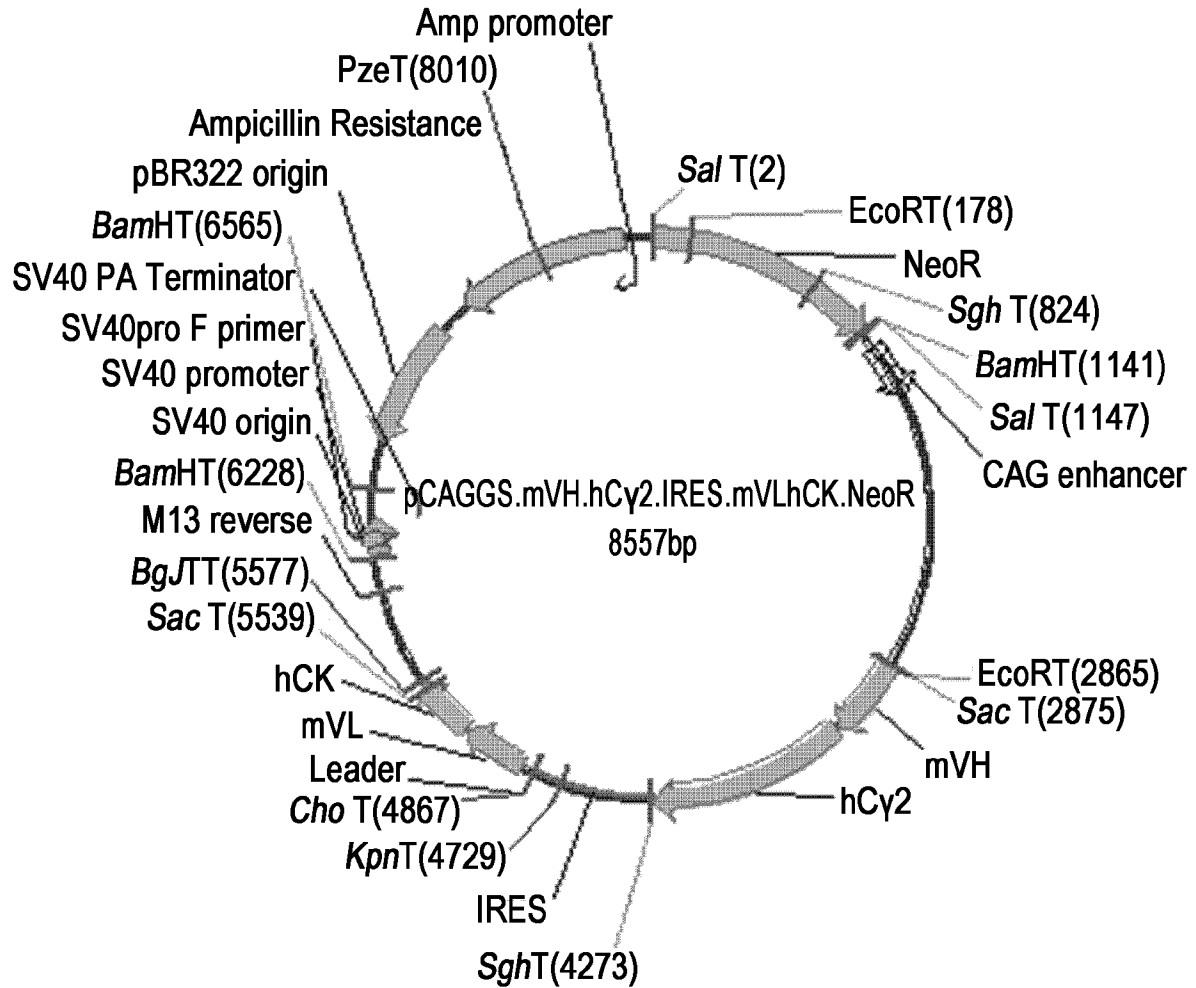
- [청구항 12] 제3항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 131로 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 133으로 기재된 경쇄 가변 영역이 링커로 연결된 것인, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.
- [청구항 13] 제3항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 130의 염기 서열로 코딩되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 132의 염기 서열로 코딩되는 경쇄 가변 영역이 링커로 연결된 것인, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.
- [청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편은 서열번호 1의 펩타이드의 9 번째, 45 번째, 54 번째, 76 번째, 94 번째 또는 129 번째 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.
- [청구항 15] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 16] 제15항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 17] 제16항의 벡터가 도입된 세포.
- [청구항 18] 제17항의 세포를 이용한 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편의 생산방법.
- [청구항 19] 제18항의 생산방법에 의해 생산된 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편.
- [청구항 20] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체 또는 상기 펩타이드의 결합 단편을 포함하는, 항바이러스용 조성물.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 조성물은 항바이러스 작용에 의한 바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료를 수행하는 것인 조성물.
- [청구항 22] 제20항에 있어서, 상기 조성물은 바이러스 감염 세포 특이적으로 작용하는 것인 조성물.
- [청구항 23] 제20항에 있어서, 상기 조성물은 면역세포 침윤을 억제하는 것인, 조성물.
- [청구항 24] 제20항에 있어서, 상기 조성물은 염증반응을 억제하는 것인, 조성물.
- [청구항 25] 제20항에 있어서, 상기 바이러스는 바이러스 감염에 의해 숙주 세포의 비멘틴 (vimentin)의 일부가 숙주 세포막 외부로 노출되는 것을 특징으로 하는 바이러스인, 조성물.
- [청구항 26] 제20항에 있어서, 상기 바이러스는 오소믹소비리데(Orthomyxoviridae) 속 바이러스, 피코르나비리데(Picornaviridae) 속 바이러스, 레트로비리데(Retroviridae) 속 바이러스, 헤르페스(Herpes) 속 바이러스, 필로비리데(Filoviridae) 속 바이러스, 코로나비리데(Coronaviridae) 속 바이러스, 헤파드나비리데(Hepadnaviridae) 속 바이러스, 플라비비리데(Flaviviridae) 속 바이러스, 부냐비리데(Bunyaviridae) 속 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 조성물.
- [청구항 27] 제20항에 있어서, 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스, 간염 바이러스, 뇌심근염 바이러스, 멩고 바이러스 (Mengovirus), 레오바이러스 (Reovirus), HIV (human immunodeficiency virus),

에볼라바이러스(Ebolavirus), 중증급성호흡기증후군  
 코로나바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus; SARS),  
 중동호흡기증후군 코로나바이러스(Middle East Respiratory Syndrome  
 Coronavirus; MERS), HCMV (human cytomegalovirus), 및 한탄 바이러스로  
 이루어진 군에서 선택된 바이러스인 조성물.

- [청구항 28] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체 또는 상기 펩타이드의 결합  
 단편을 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 29] 제28항에 있어서, 상기 염증성 질환은 바이러스 감염에 의한 것인 조성물.
- [청구항 30] 제20항의 조성물을 바이러스에 감염된 인간을 제외한 개체에 투여하는  
 단계를 포함하는, 바이러스 감염 질환의 치료 방법.
- [청구항 31] 제28항의 조성물을 염증성 질환에 걸린 인간을 제외한 개체에 투여하는  
 단계를 포함하는, 염증성 질환의 치료 방법.

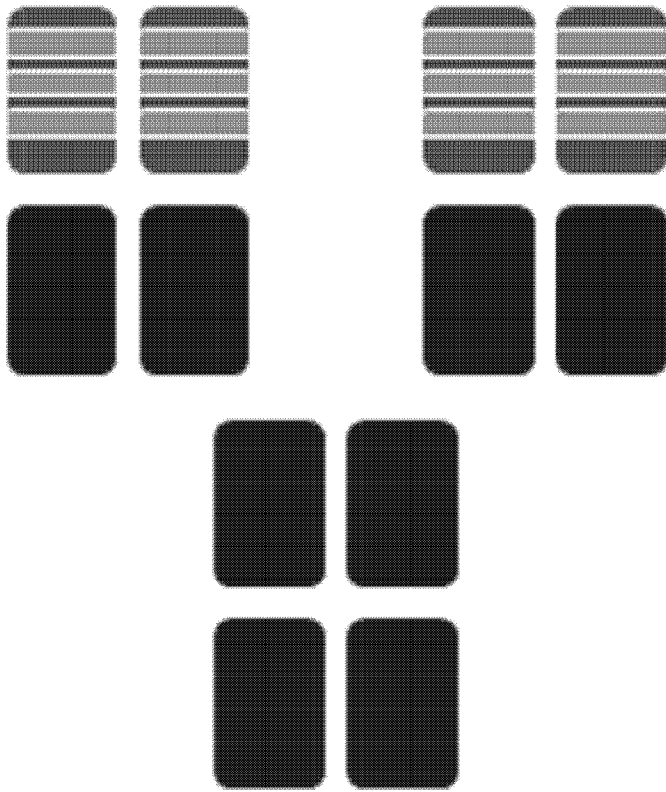
[도 1]

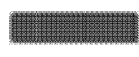

# pCAGGS.Ck.mVL.IRES.C $\gamma$ <sub>2</sub>.mVH.neo



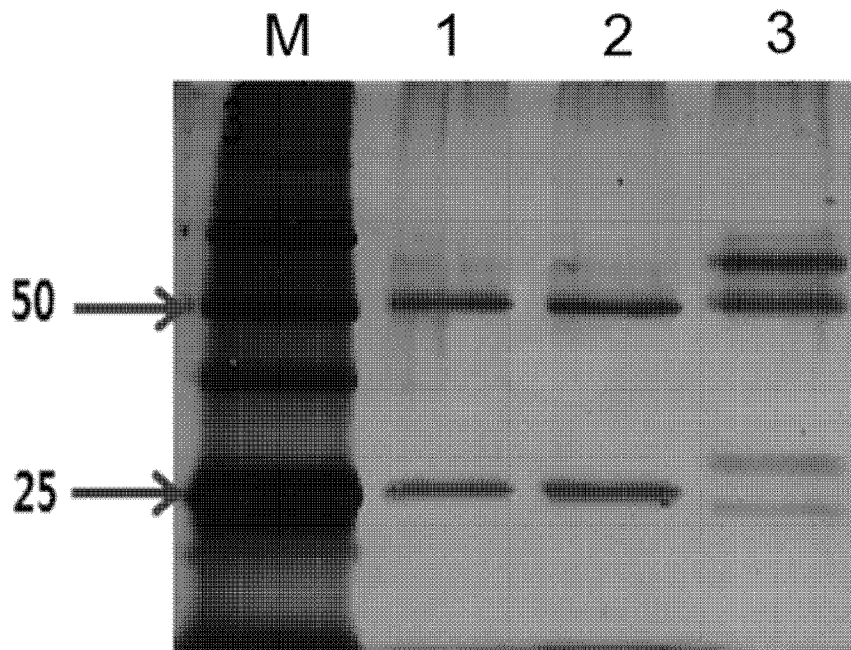
**chVSF HC and LC**  
**(simultaneous expression vectors)**

[도2]



 Mouse sequence  
 Human sequence

[도3]



1. chVSF  $\gamma$ 2
2. chVSF  $\gamma$ 4
3. mVSF

[도4]

CGTCGACGAGATCCAGCTGCAGCAGTCT

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCT

GGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTACT

CATTCACTGGCTACAACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATT

GGAAATATTGATCCTTACTATGGTAGTACTACTACAATCAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACA

TTGACTGTAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGA

CTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAGACTGGGACGAGGGCTATGGACTACTGGGGTCAA

GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

CCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGTCCACCTCCACCGAGACCACTCCTCTAGGCCACCT

CAGGAGGATCCGGTGGAA

GGTGGCTCTGGTGGAGGTGGCTCTGACATCCAGATGACTCAGTC

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTG

CATCTGTGGGAGAACTGTCACCATGACATGTCGAGCAAGTGAGAAATATTTACAGTAATTTAG

CATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGTTGCAACAACTTAG

CAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATC

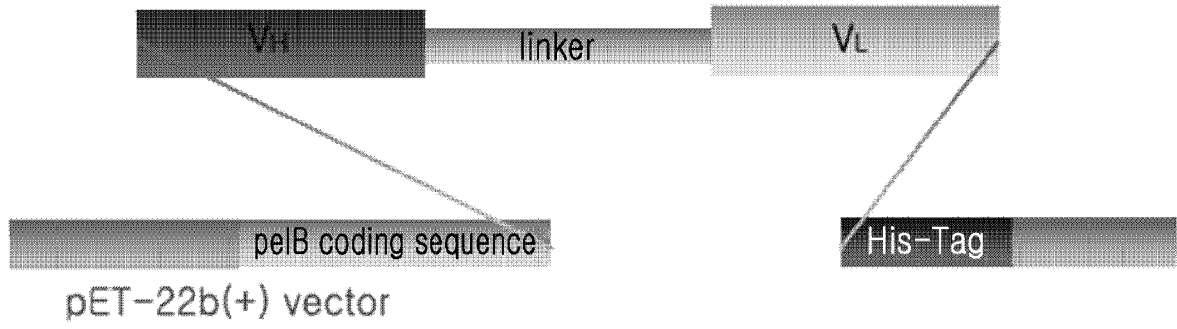
AACAGCCTGCAGCCTGAAAGATTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTTATGGTTCCTCCTCGG

ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC

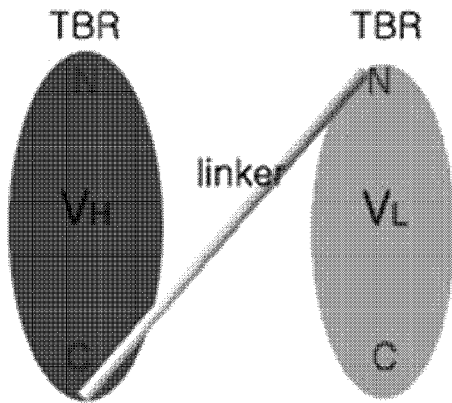
CCGTGGTTCGACCTTTAGTTTGGAGCTCC

[도5]

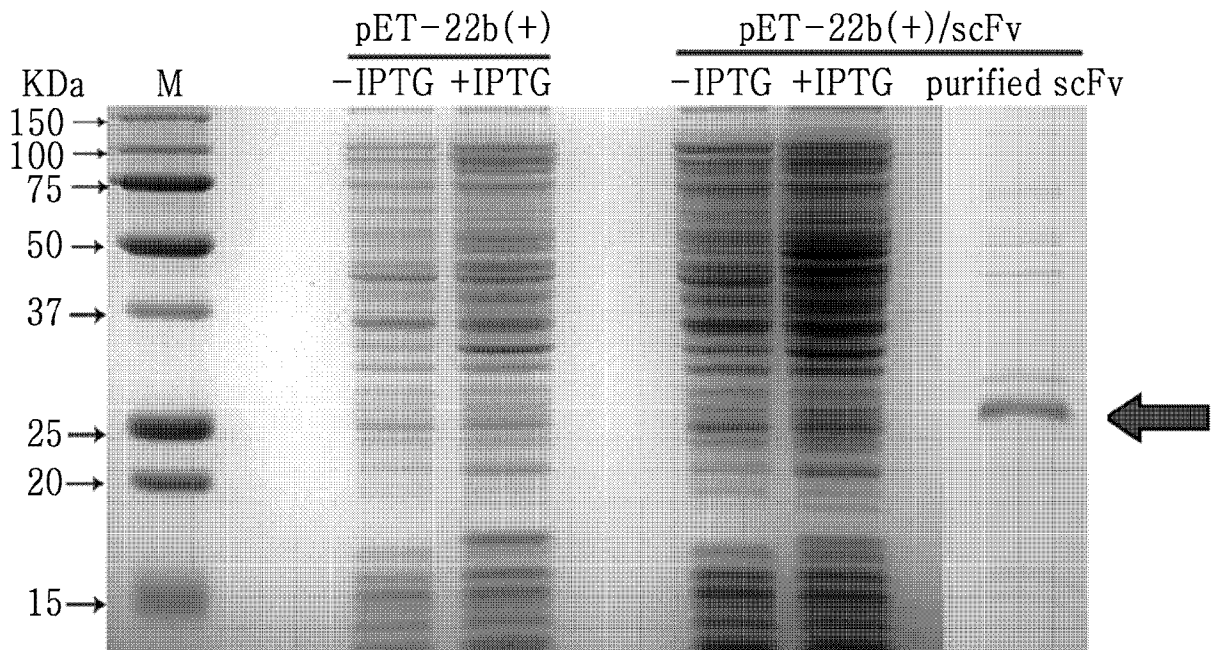
(A)



(B)



[도6]



Lane 1: molecular weight marker.

Lane 2: pET-22b (+) (no induction).

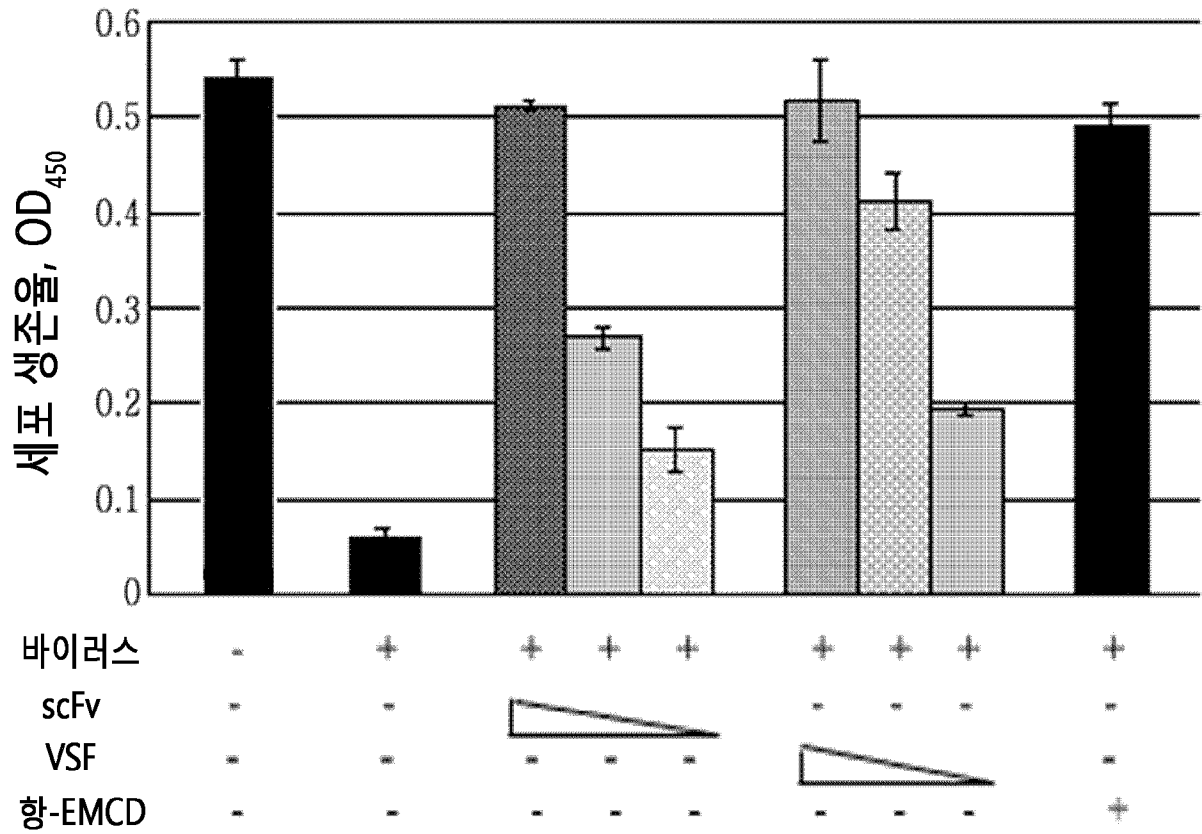
Lane 3: pET-22b (+) (IPTG induction)

Lane 4: pET-22b (+)/scFv (no induction)

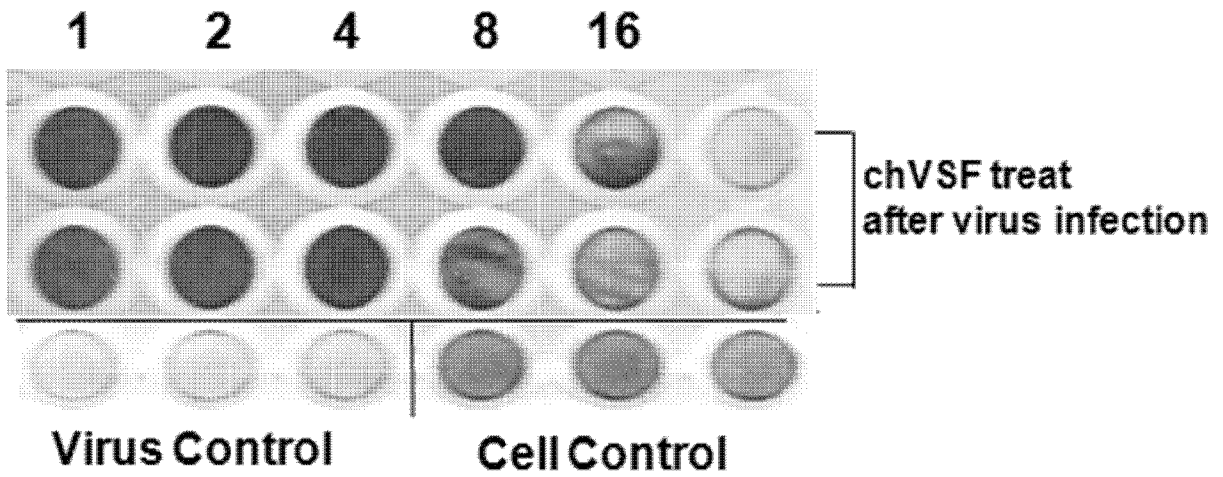
Lane 5: pET-22b (+)/scFv (IPTG induction)

Lane 6: purified scFv by Ni-NTA column (IPTG induction)

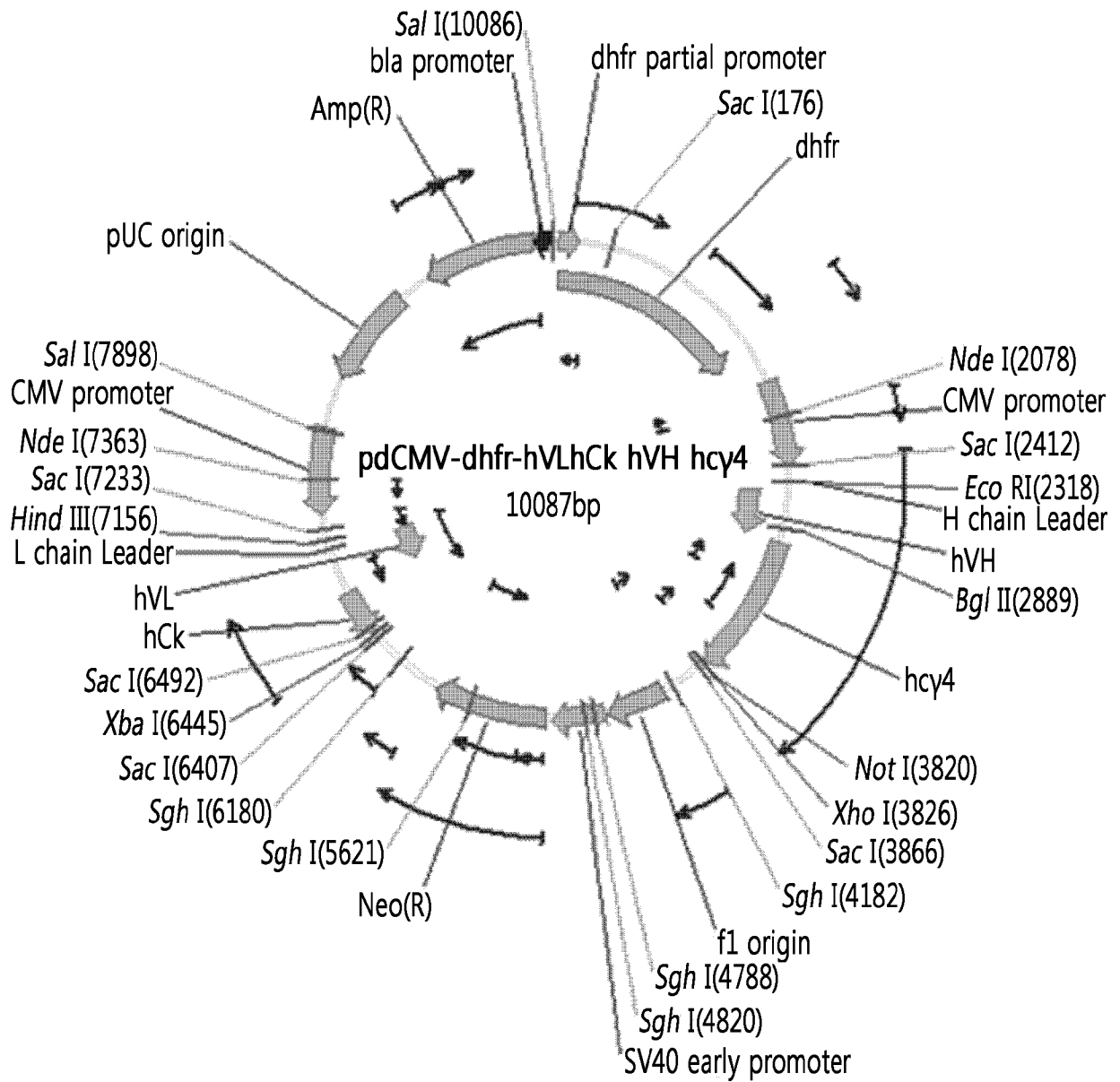
[도7]



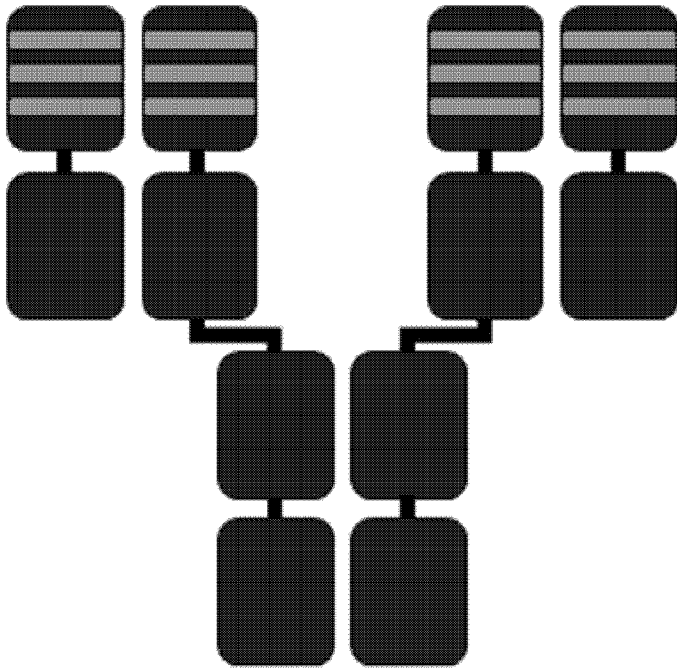
[도8]



[도9]

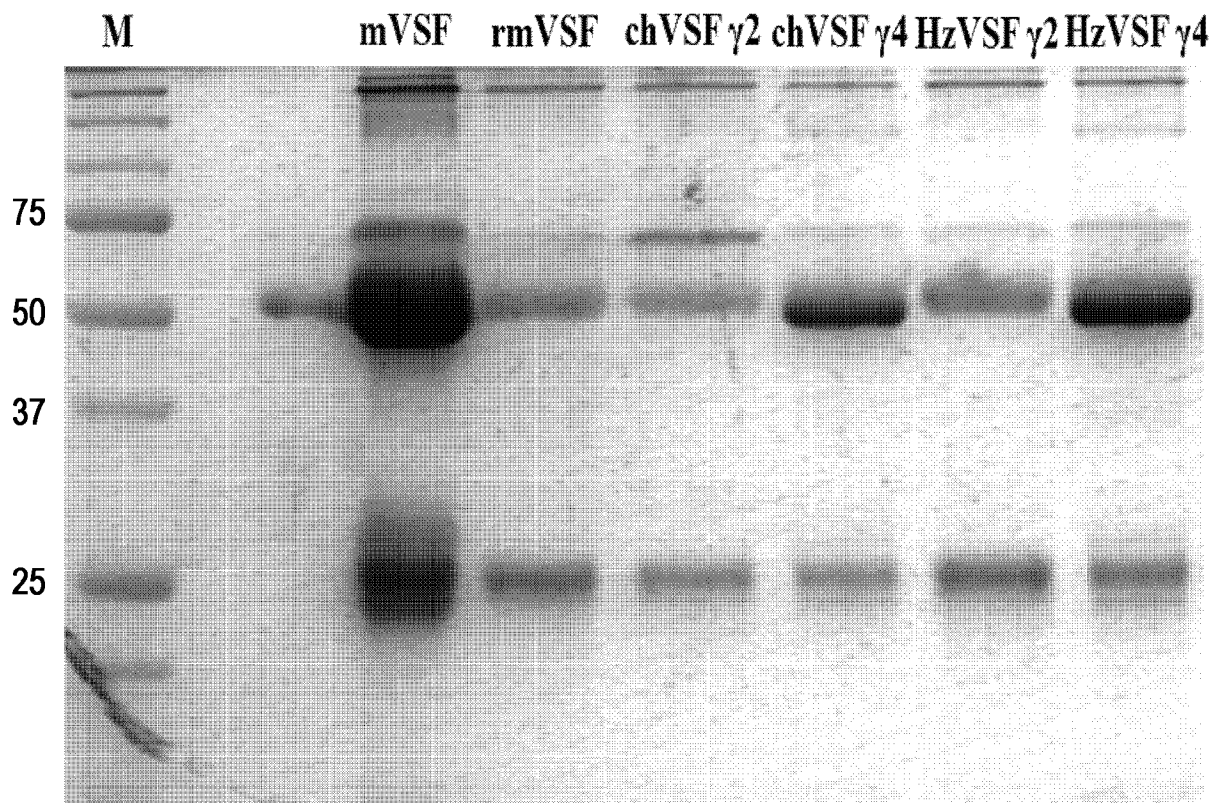


[도10]



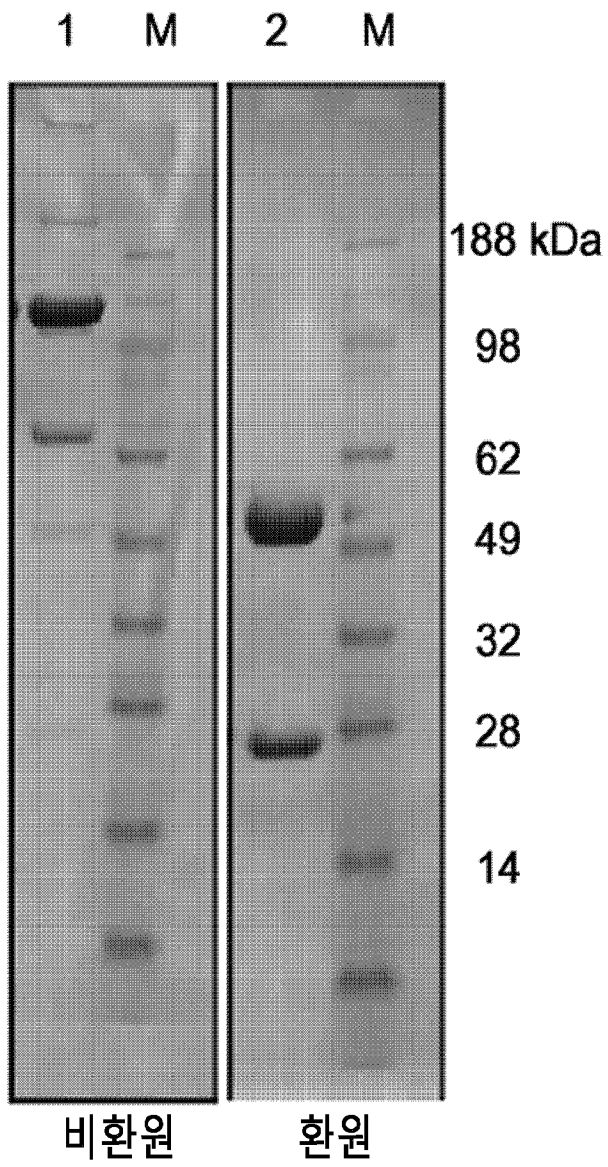
Humanized Ab

[도11]

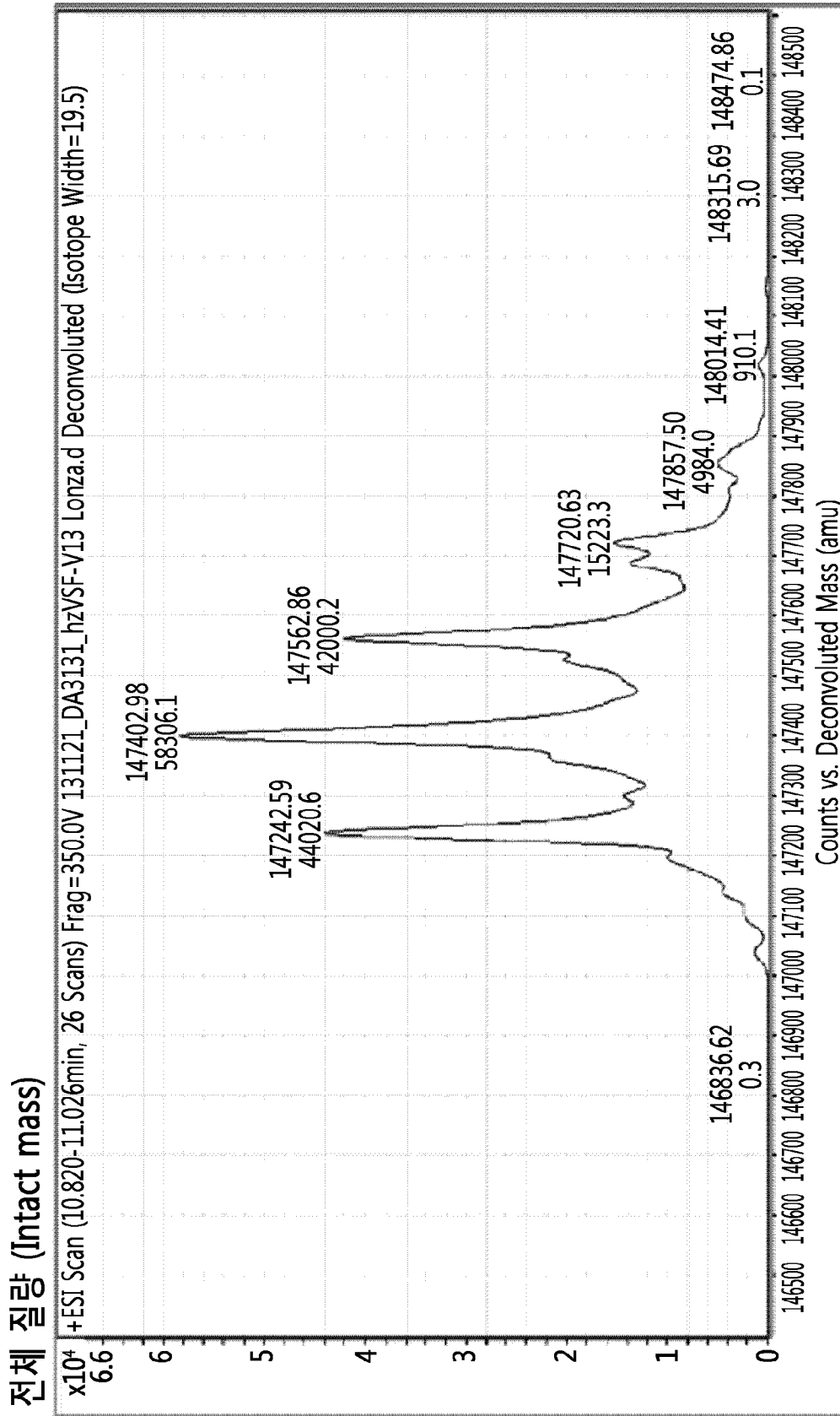




[도 13]



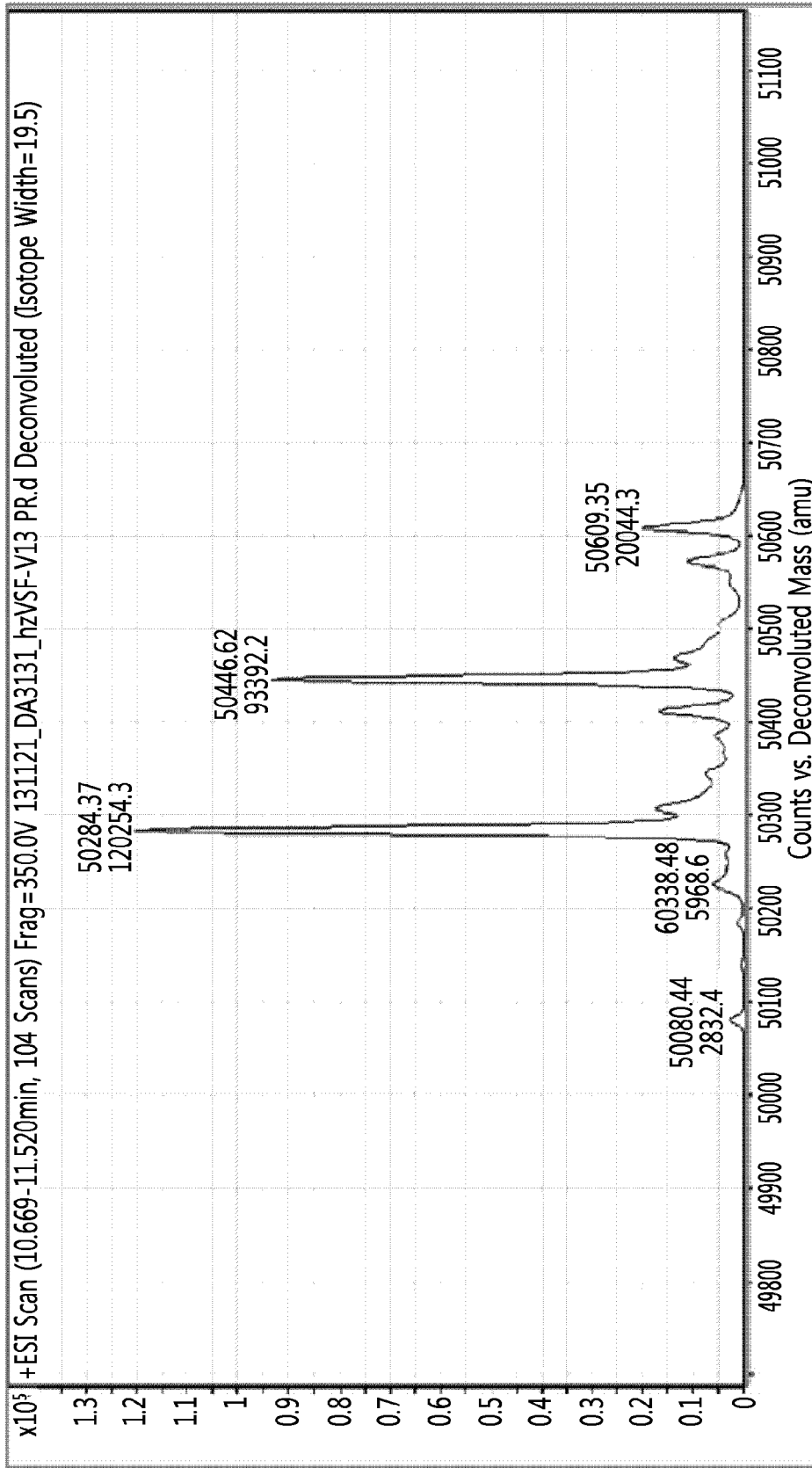
[도 14a]



**Major 147242.59, 147402.98, 147562.86 Da ...**

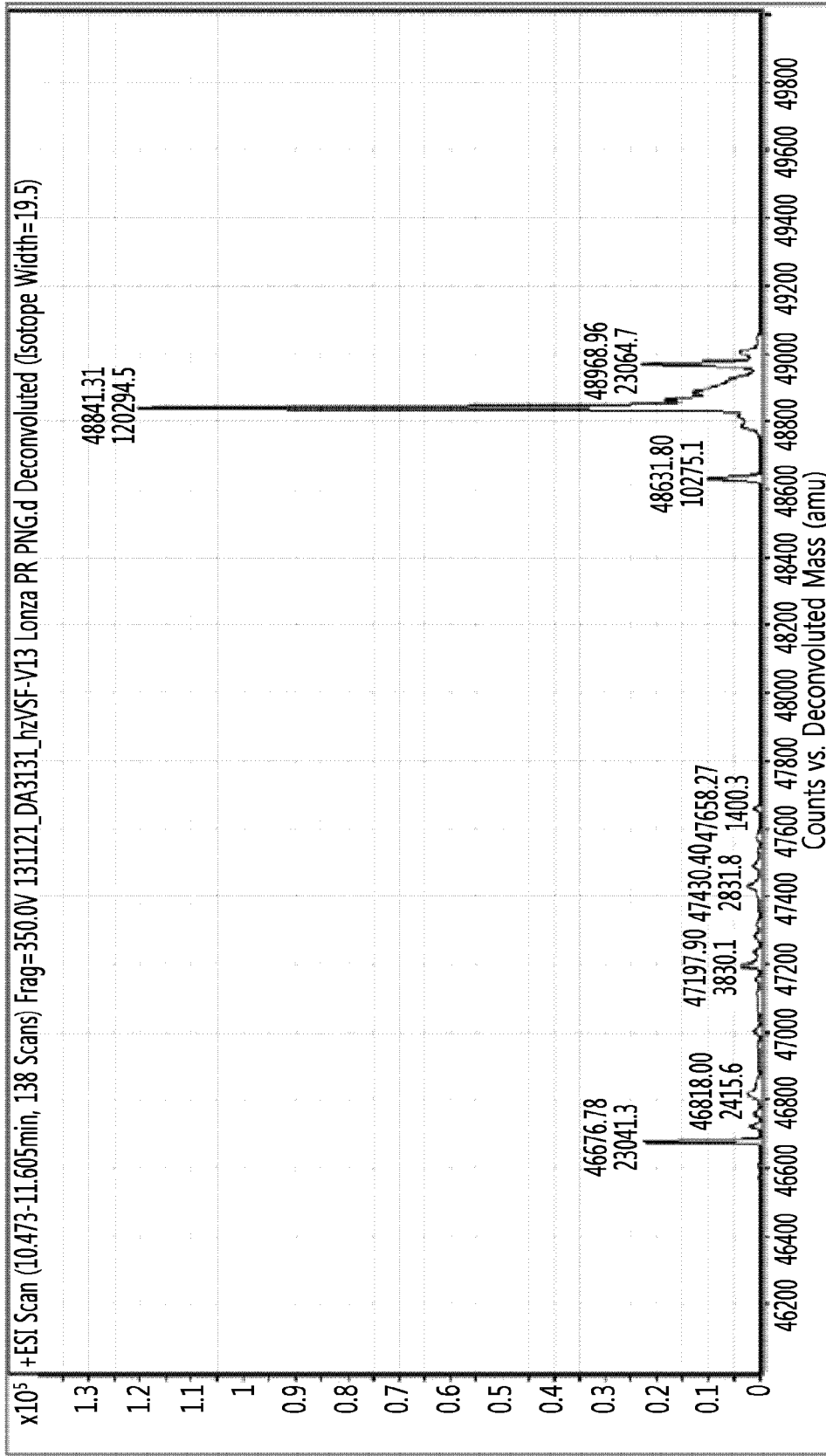
[도 14b]

중쇄 (부분 환원 후)



[도 14c]

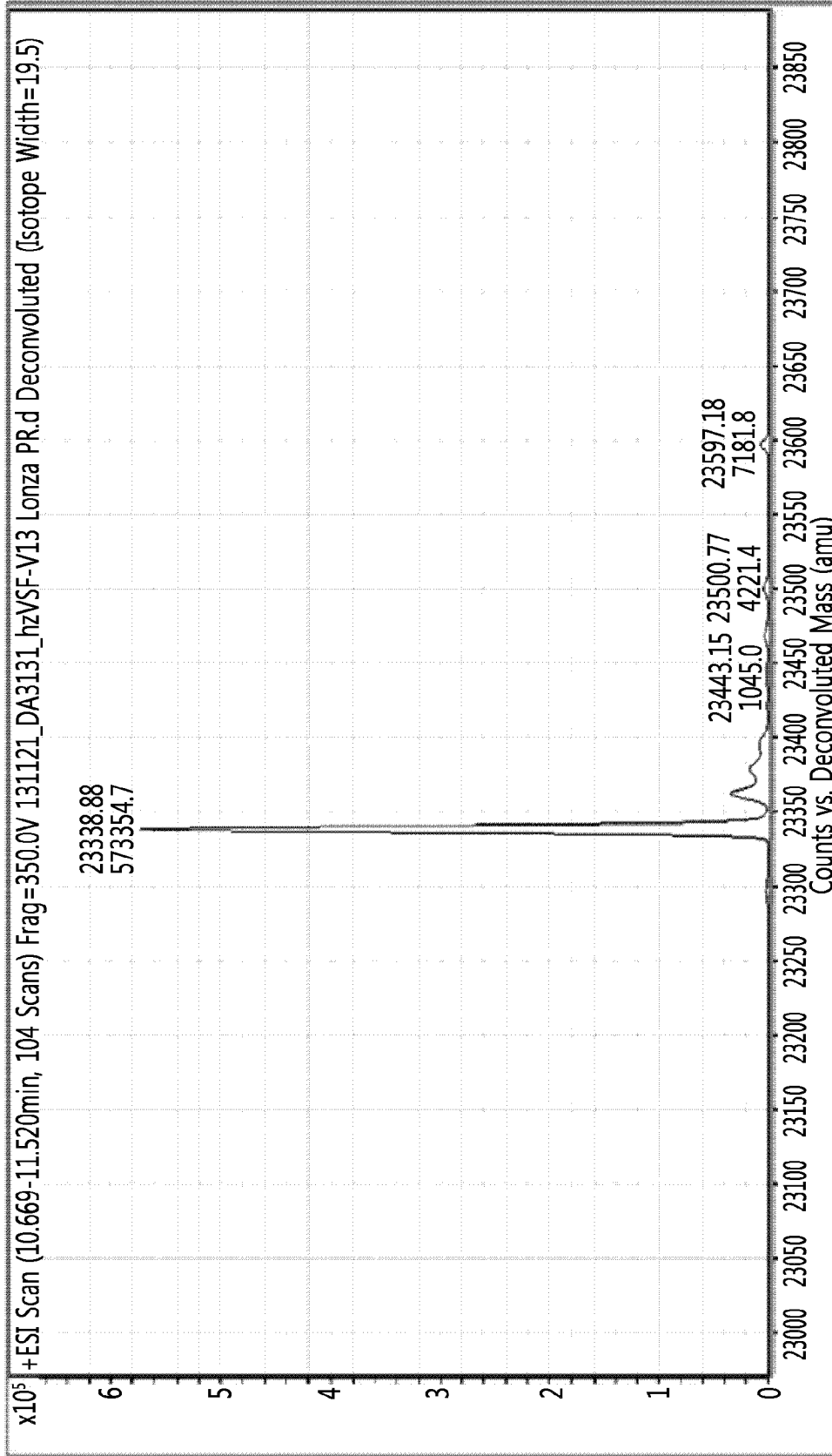
중쇄 (부분 환원) + PNGase F 처리 (N-연결 글리칸 제거)



Major 48841.31 Da

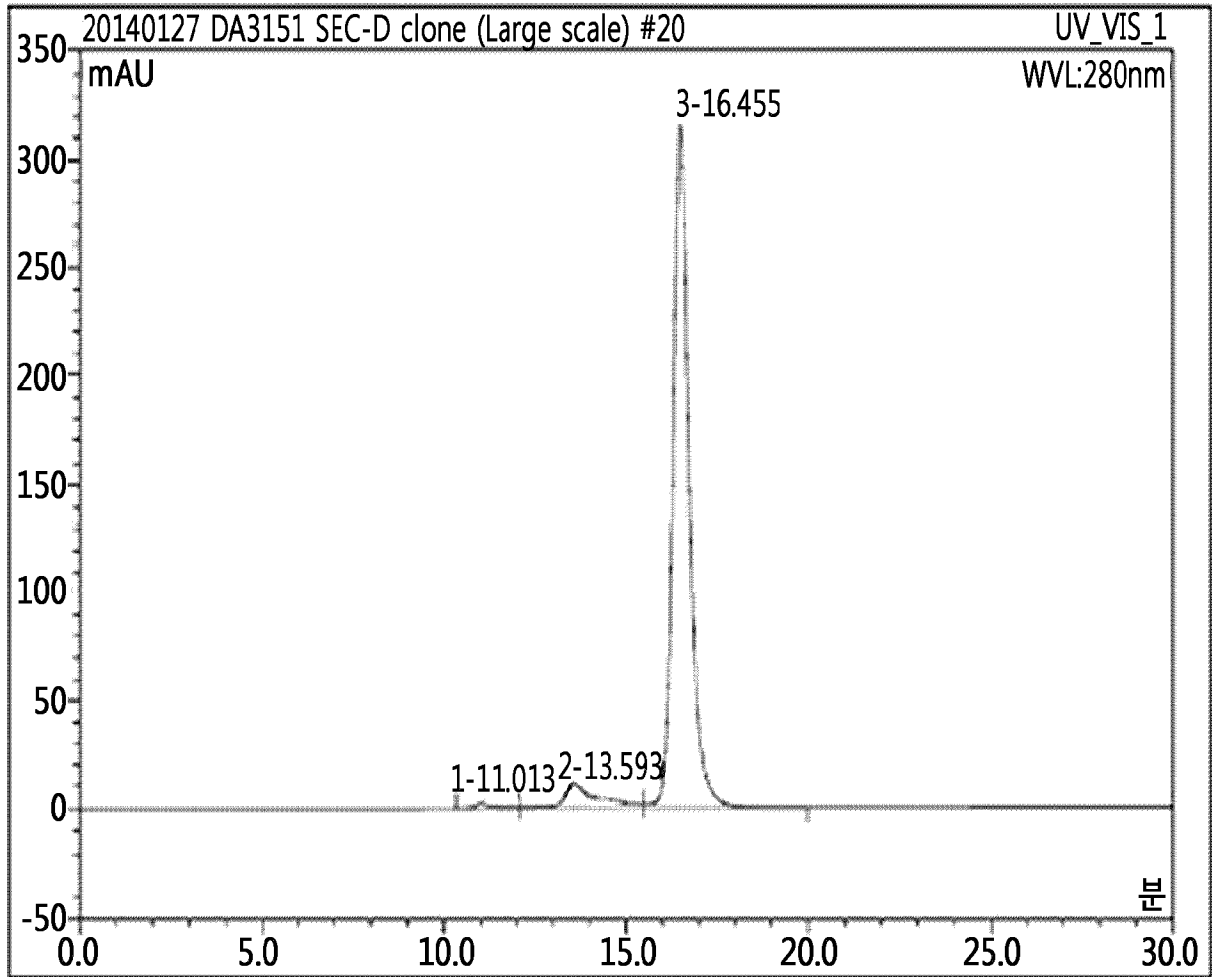
[도 14d]

경색 (부분 환원 후)



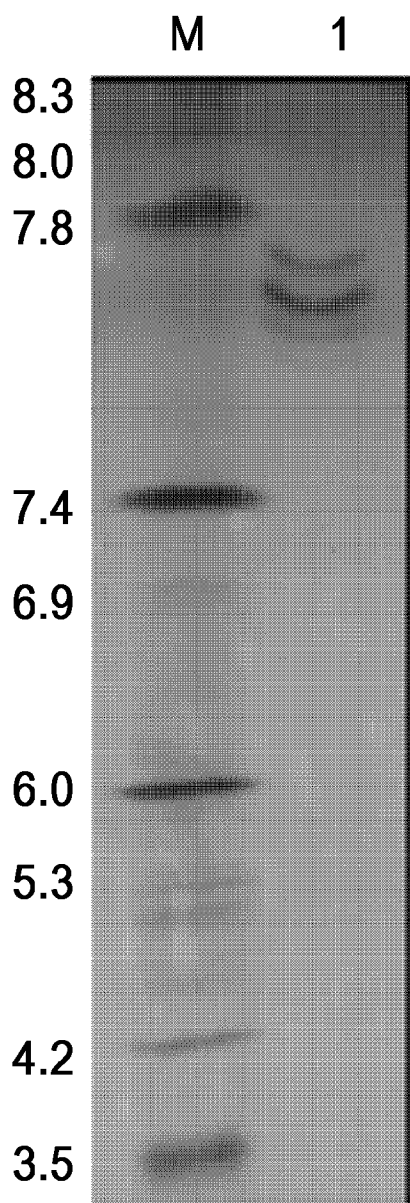
Major 23338.88 Da

[도 15]

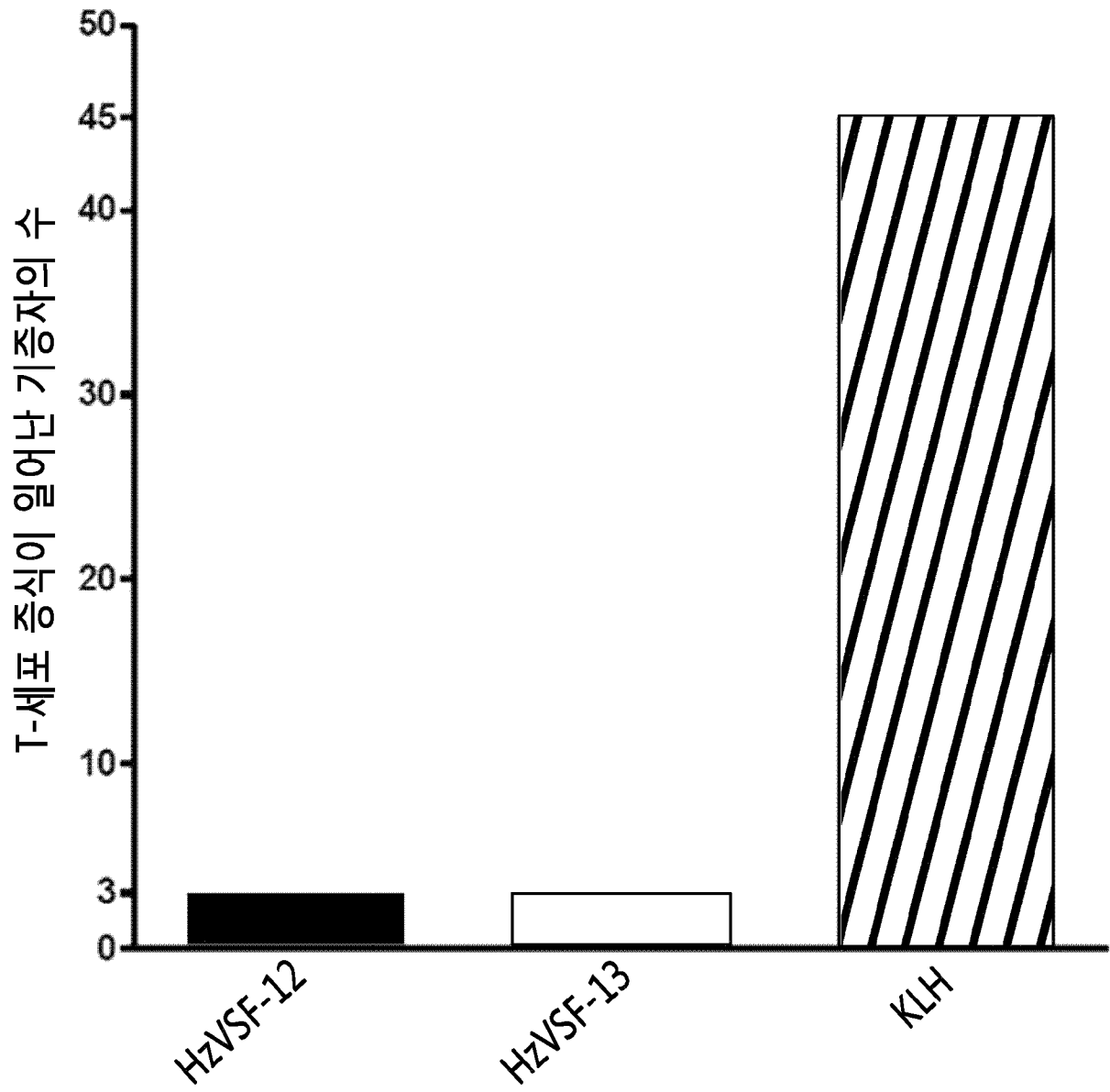


No.	Ret.시간 분	피크 이름	높이 mAU	면적 mAU*분	Rel.면적 %	양	종류
1	11.01	n.a.	2.262	1.304	0.72	n.a.	BM
2	13.59	n.a.	11.330	12.308	6.84	n.a.	M
3	16.49	n.a.	316.673	116.343	92.44	n.a.	MB
합계:			330.265	179.955	100.00	0.000	

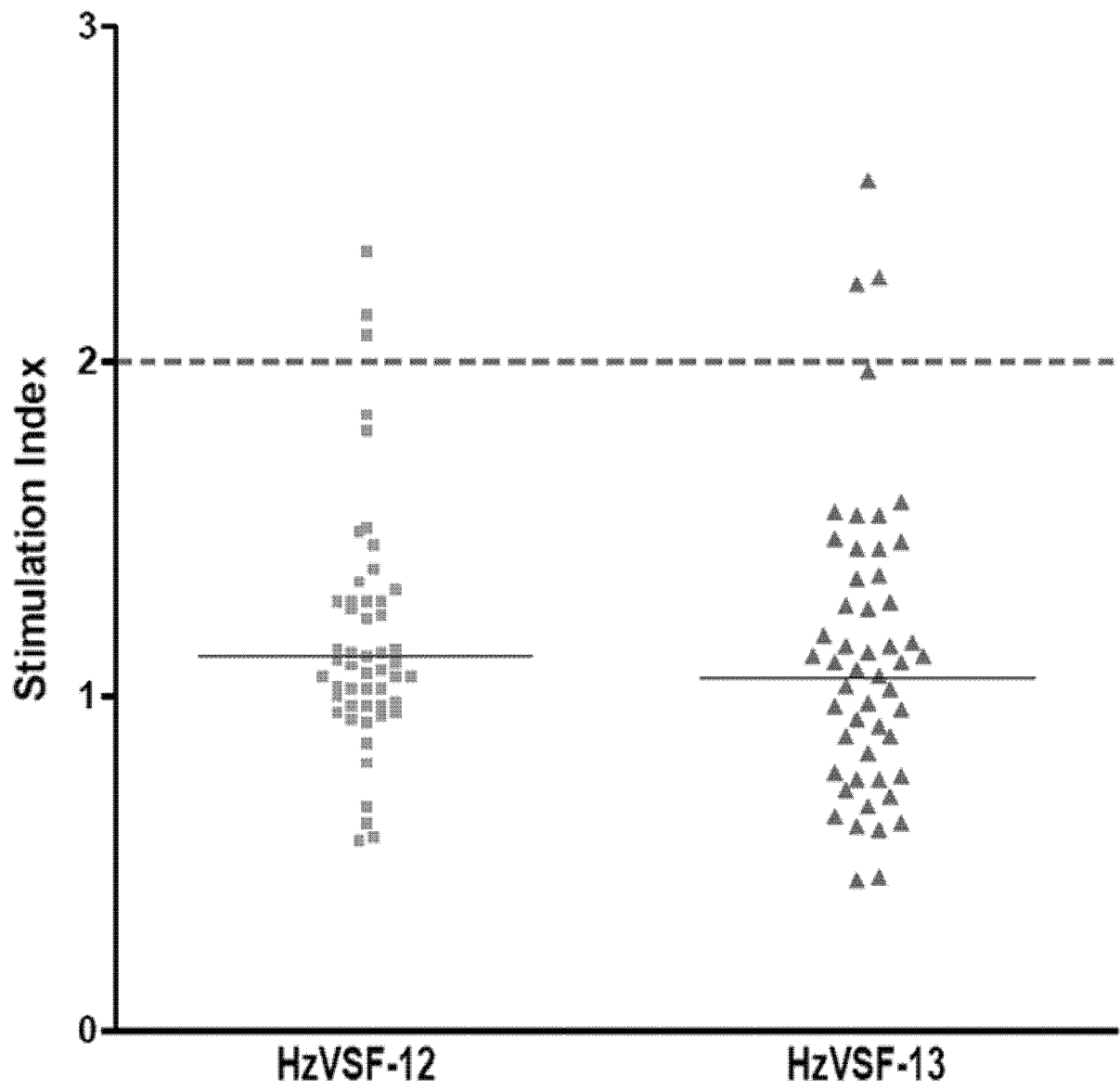
[도 16]



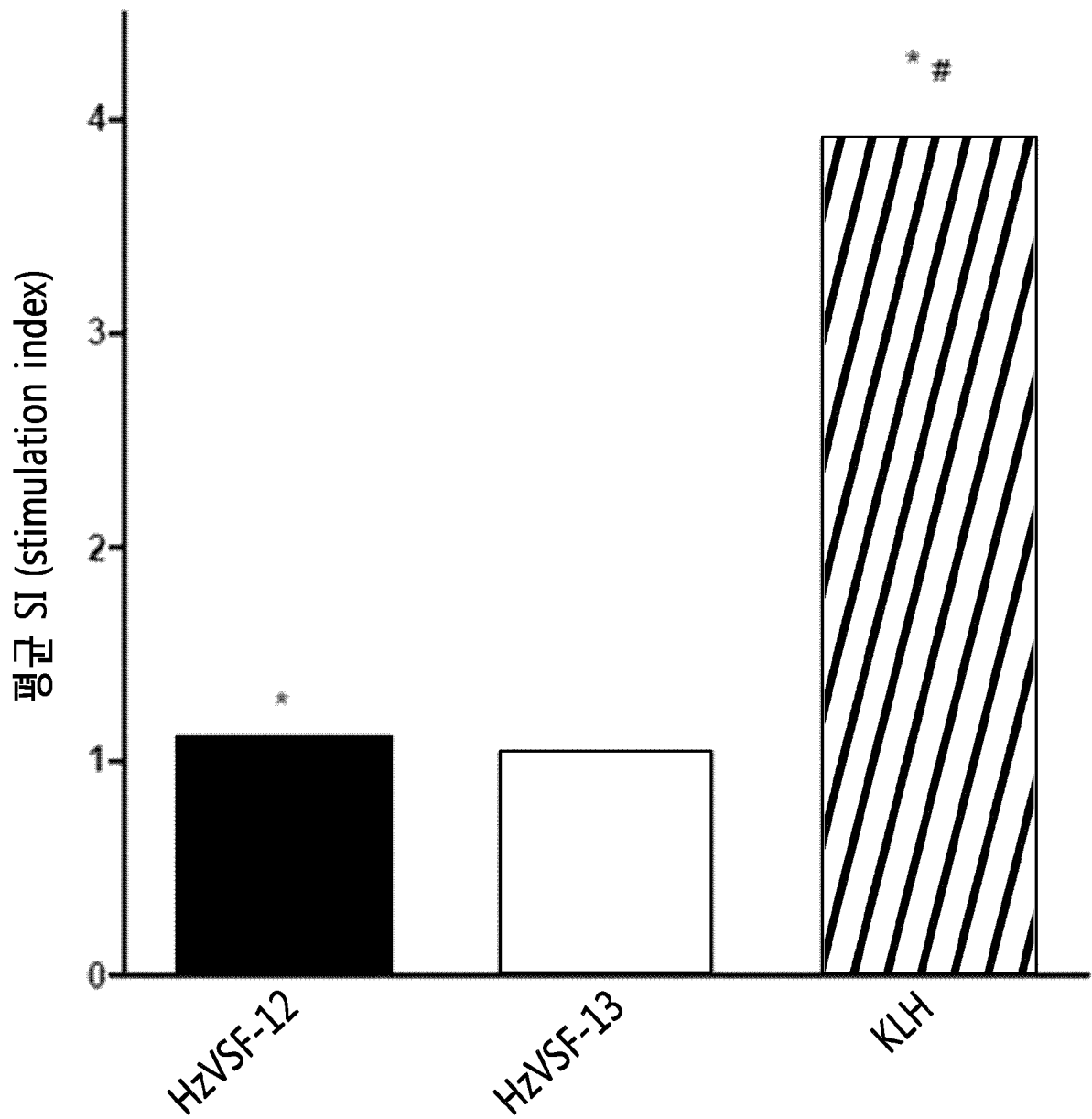
[도17]



[도18]



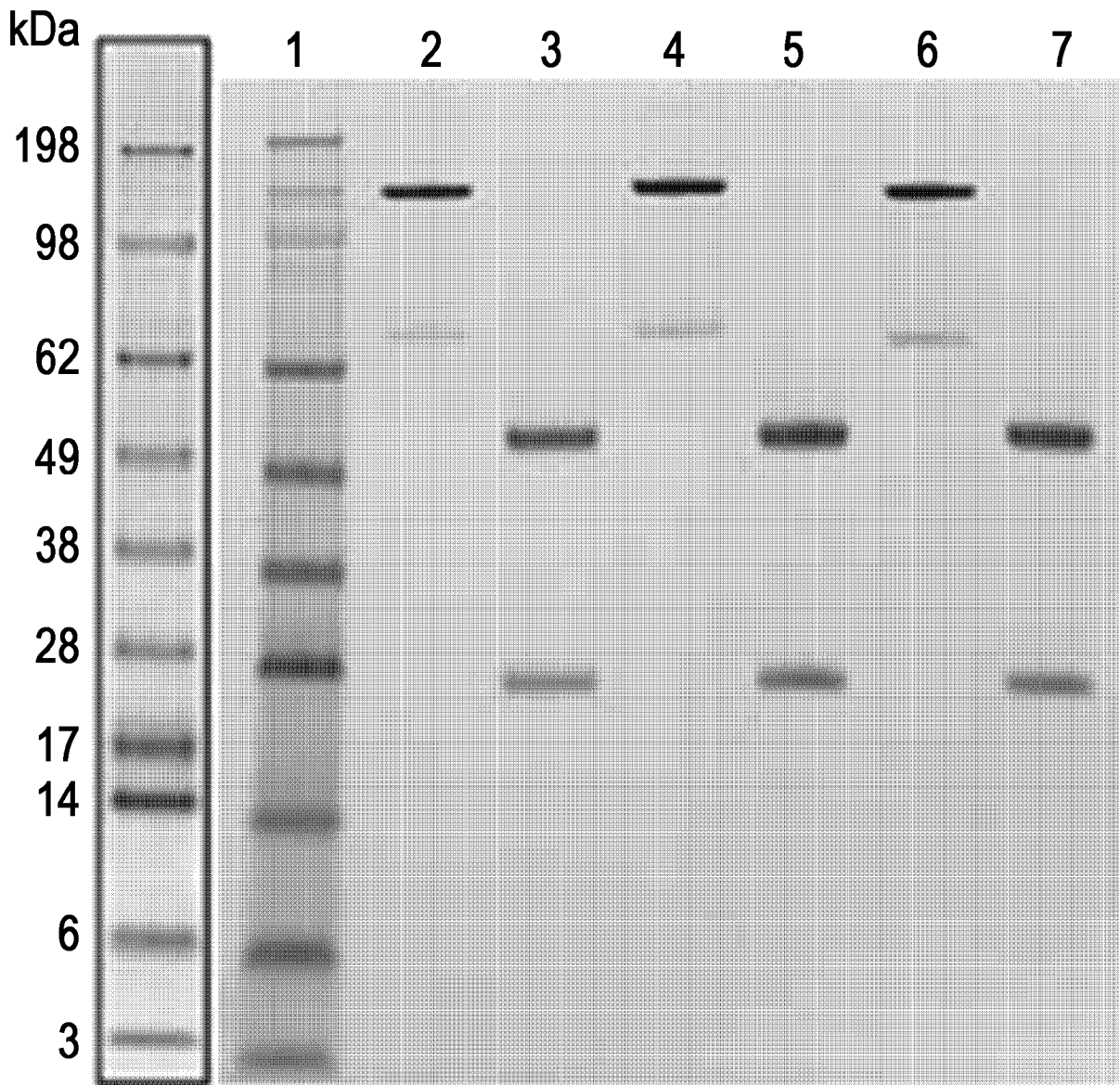
[도19]



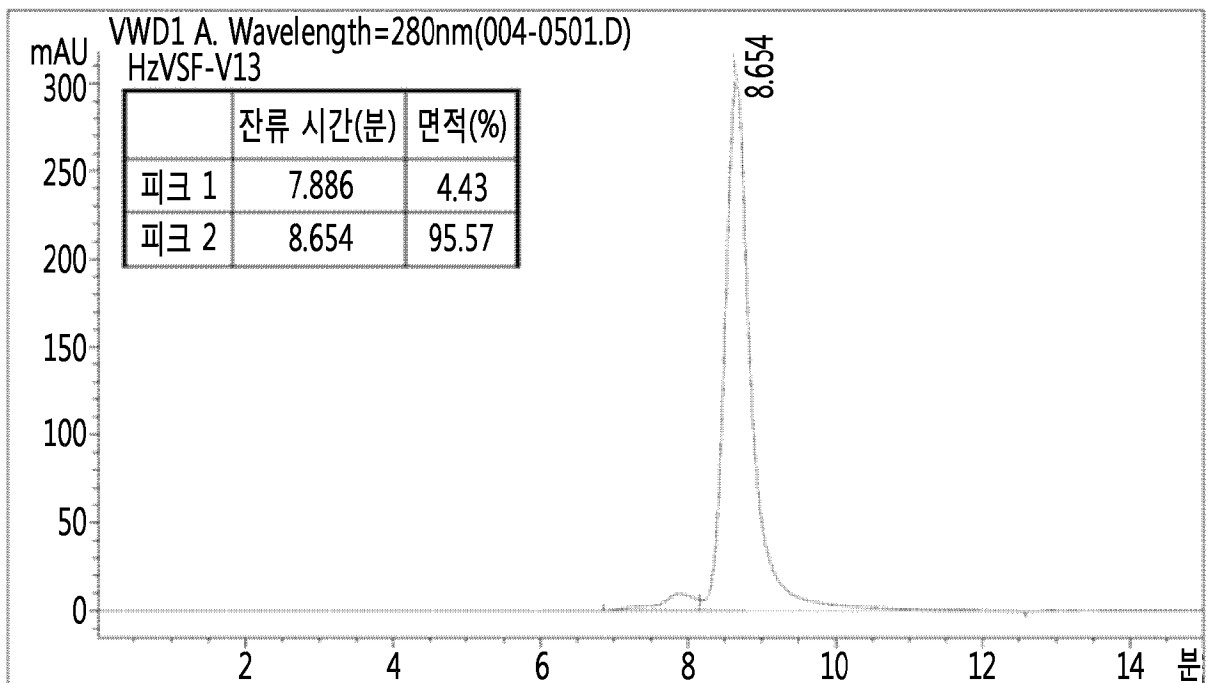
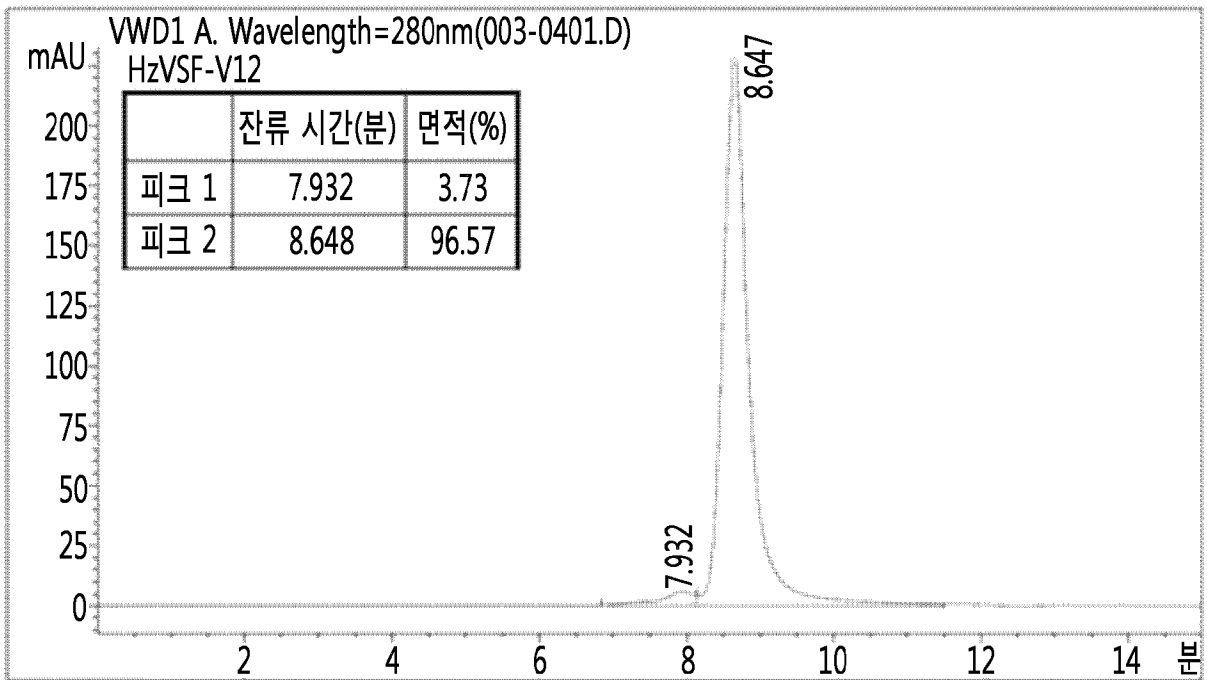
\* 대조군 대비 유의적 수준

# HzVSF-12 및 HzVSF-13 대비 유의적 수준

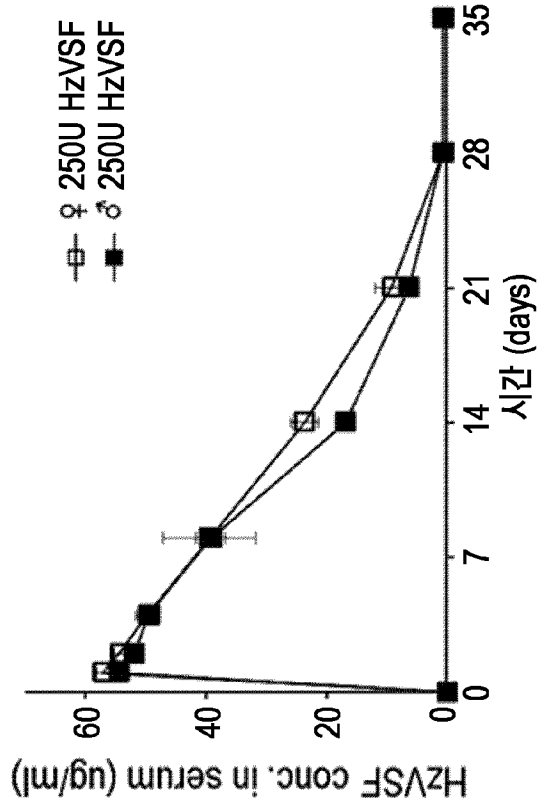
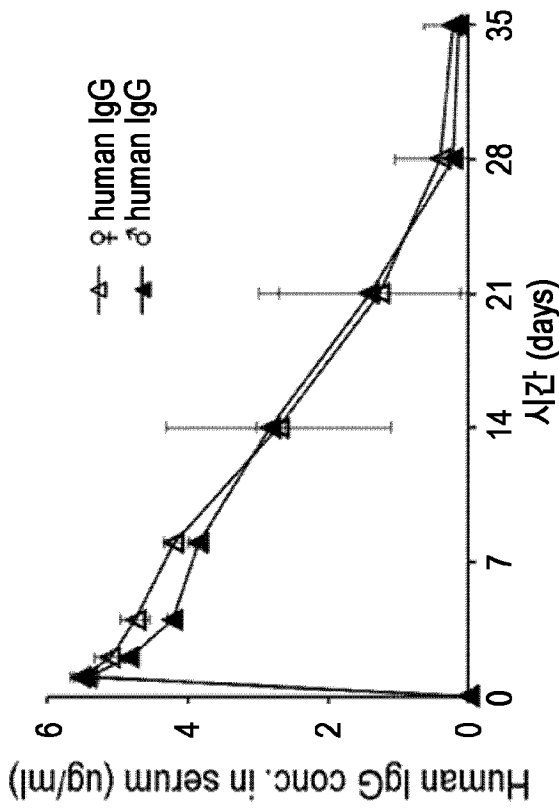
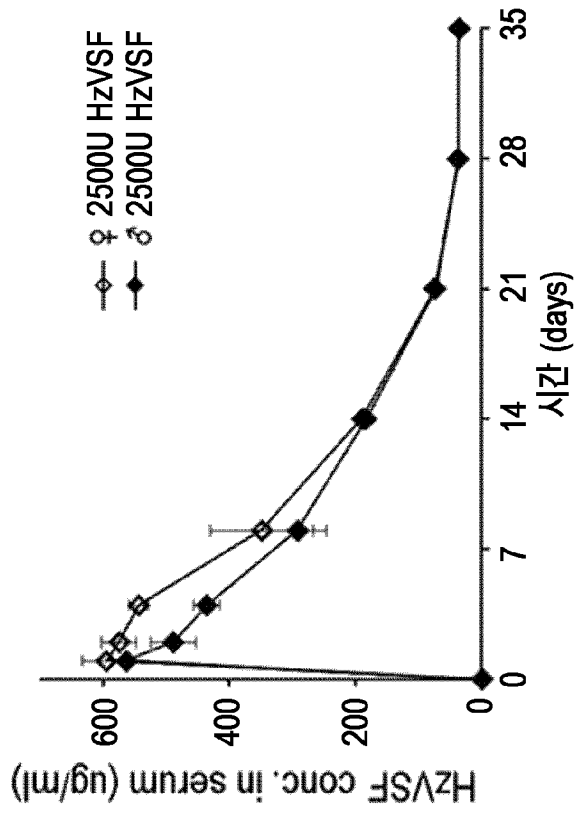
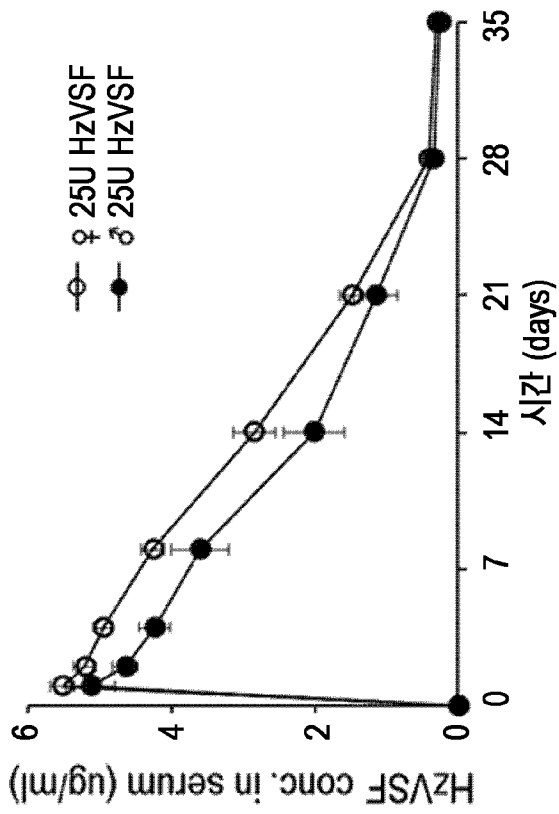
[도20]



[도21]

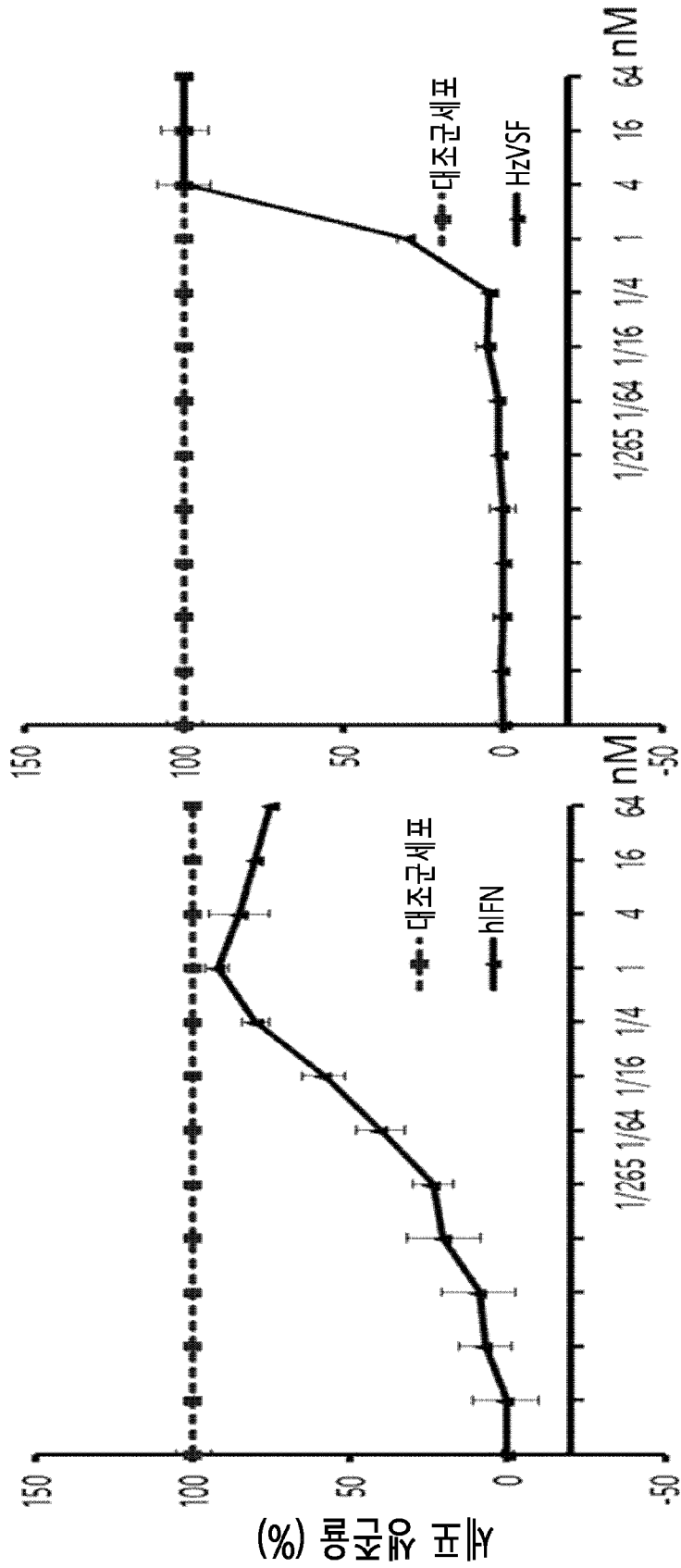


[도22]

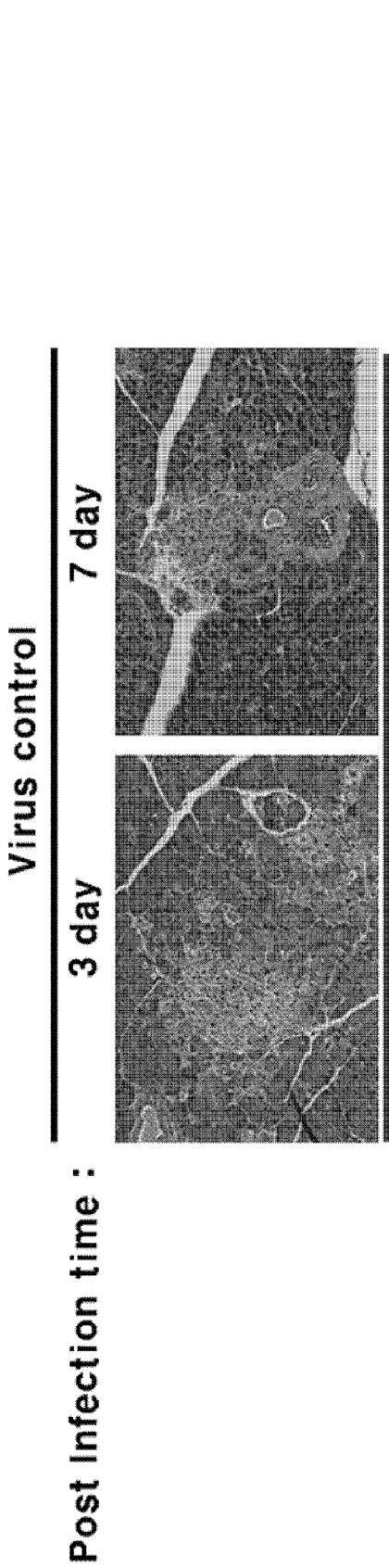




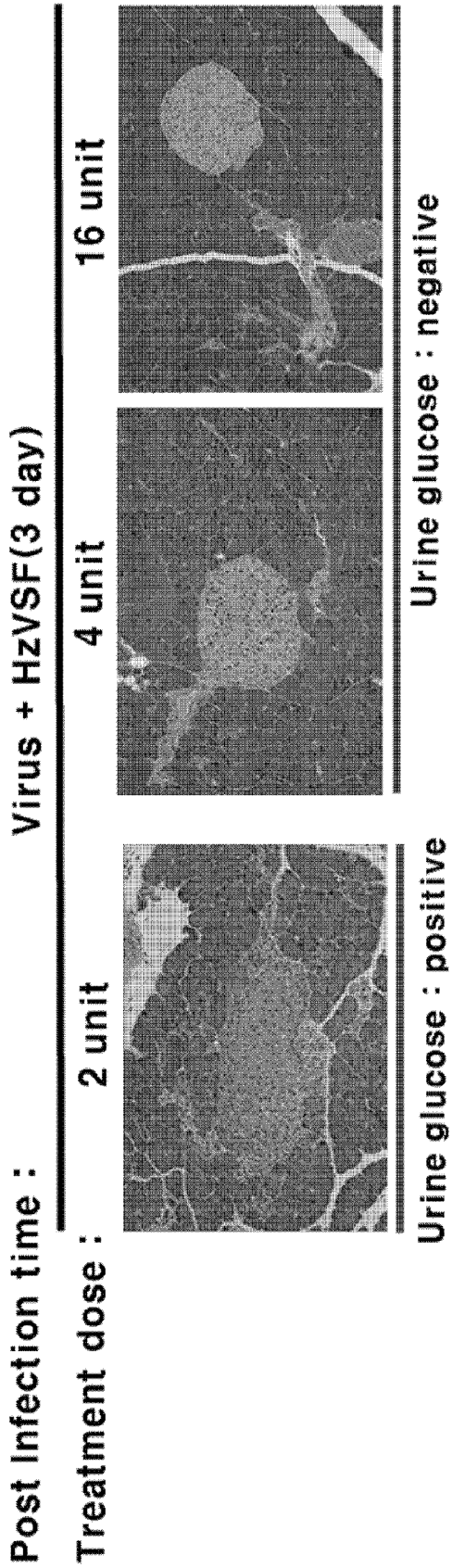
[도24]



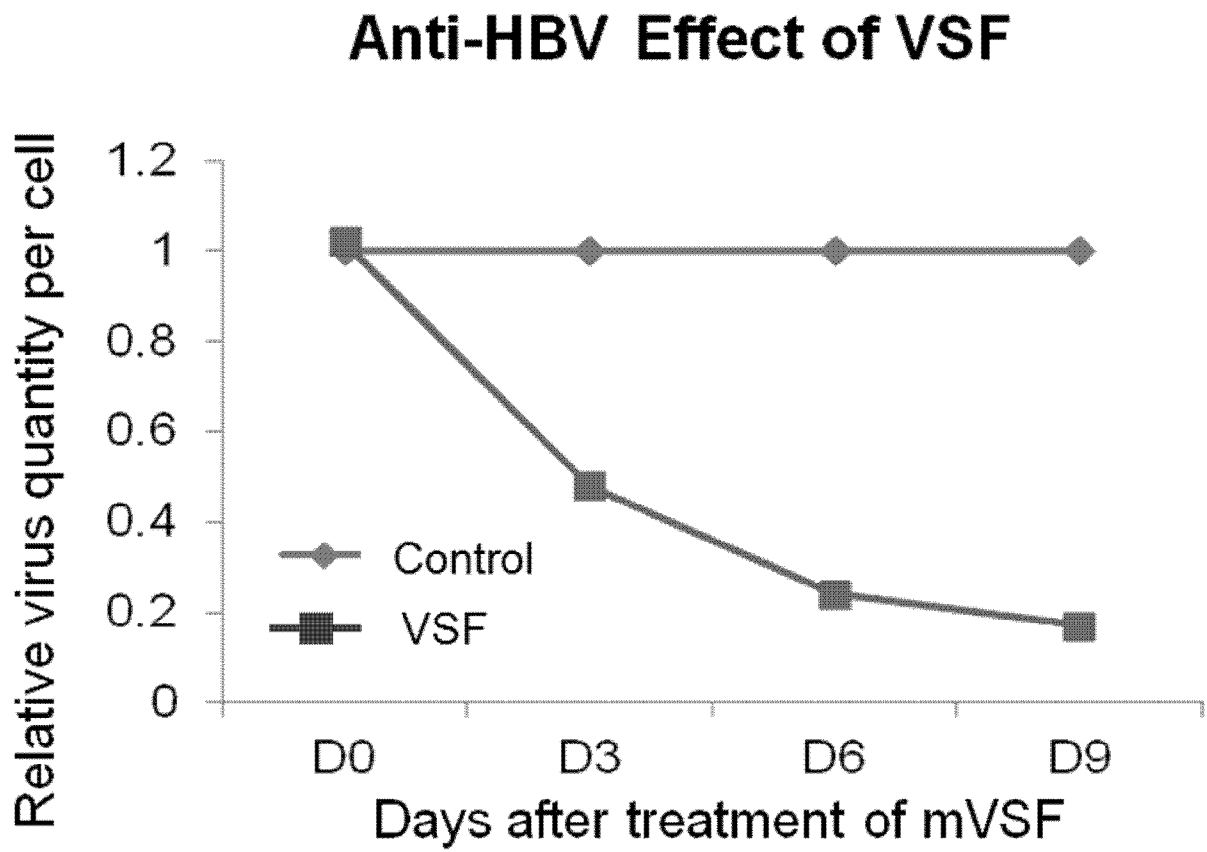
[도25]



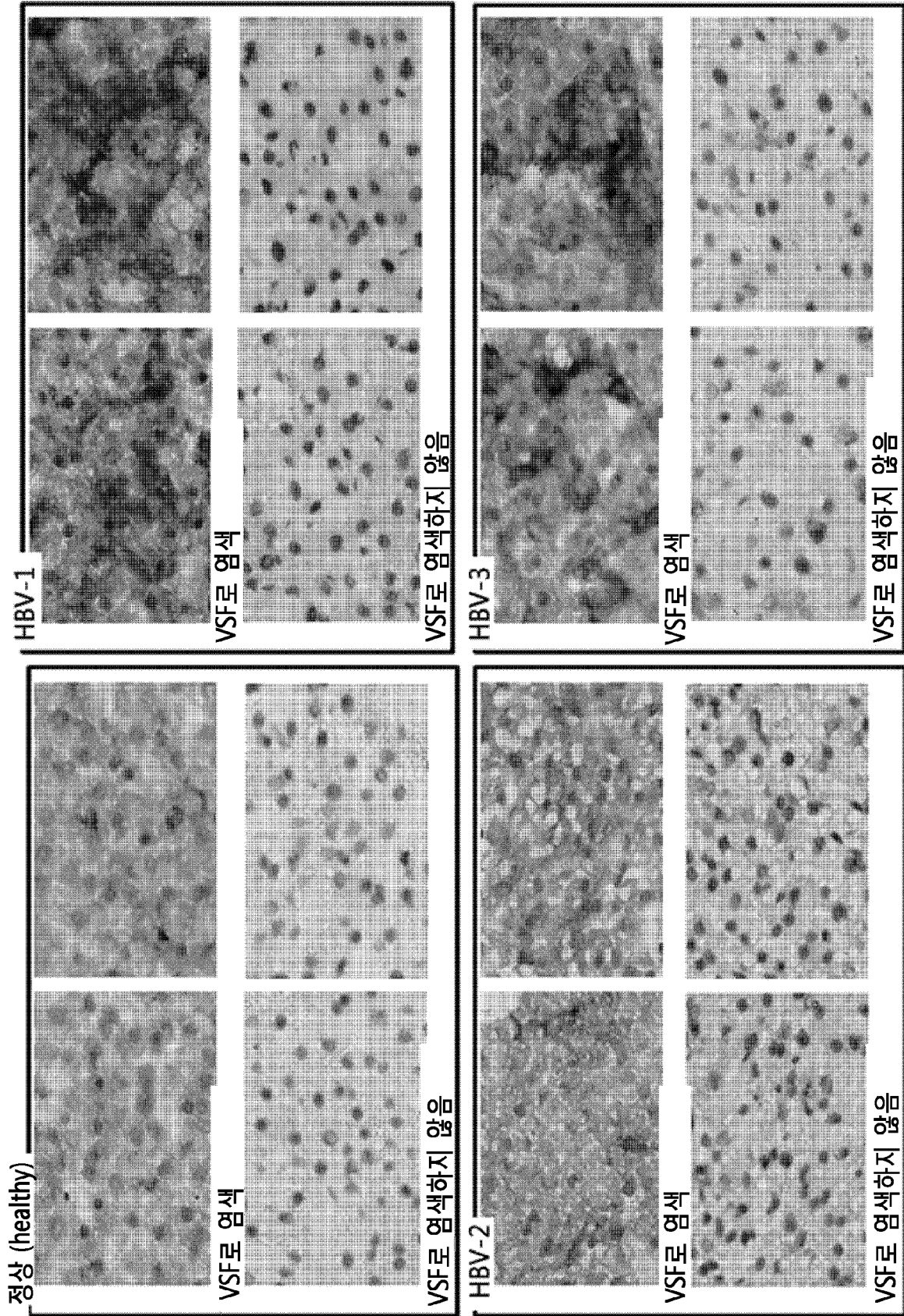
**Urine glucose : positive**



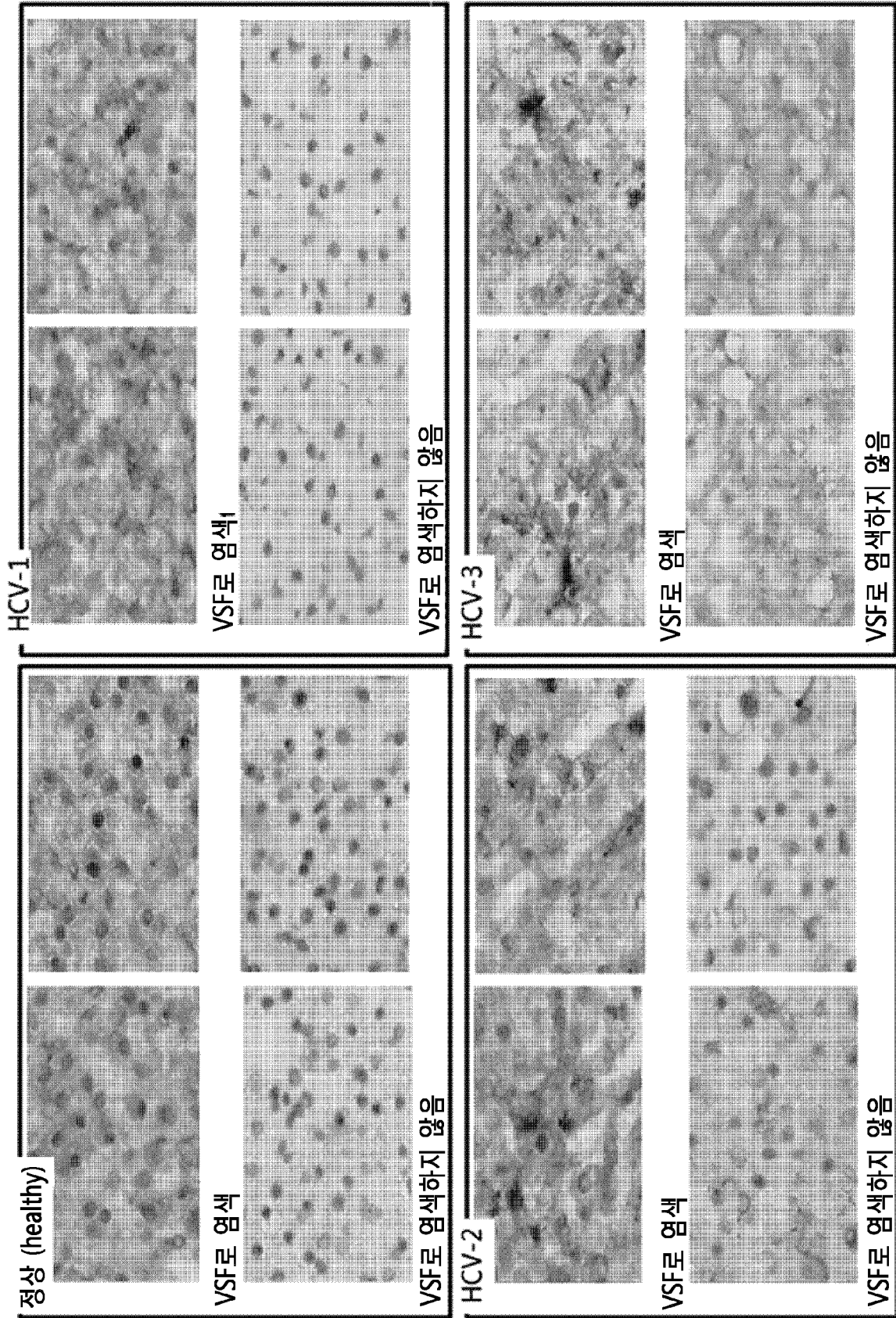
[도26]



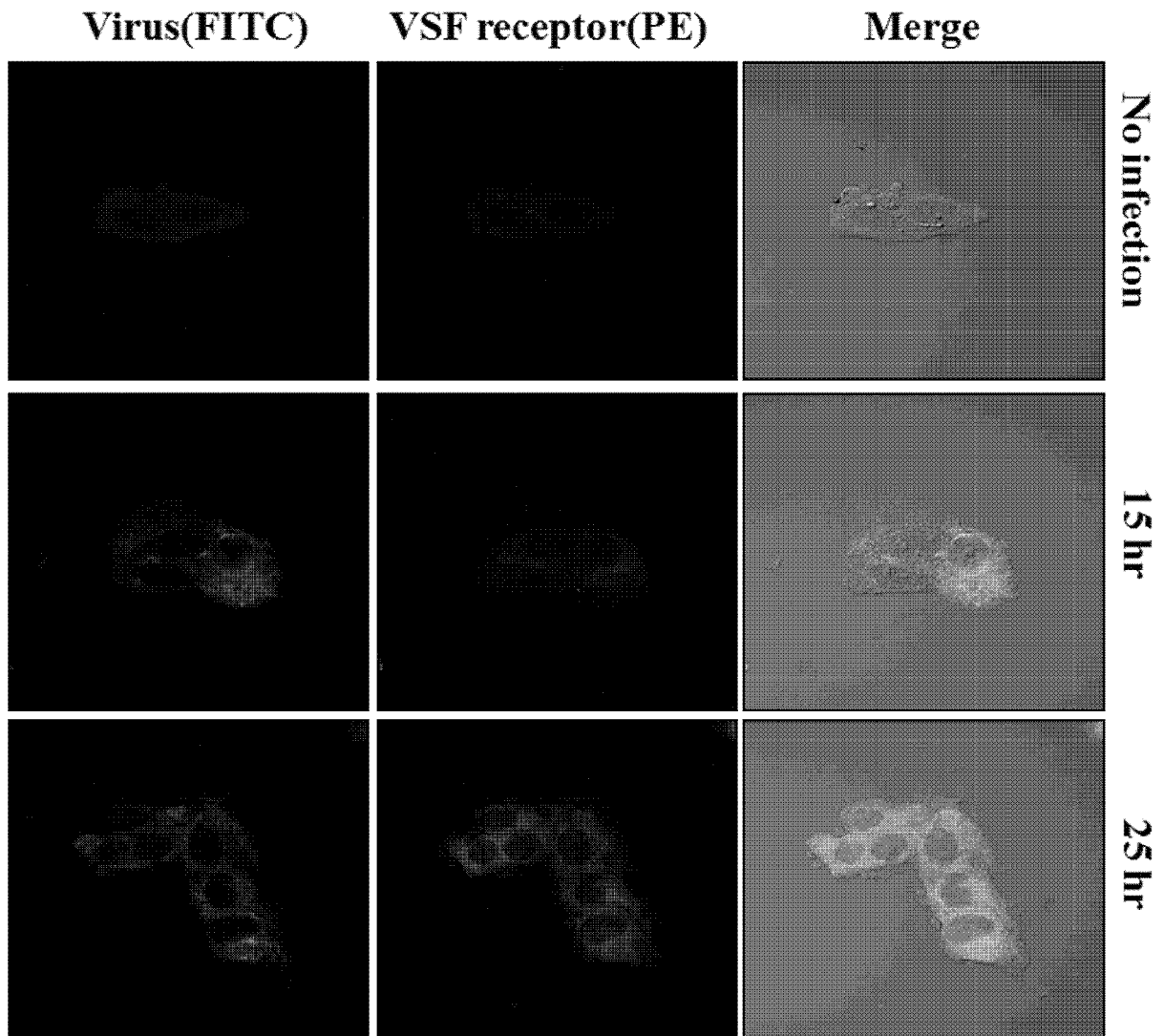
[도27]



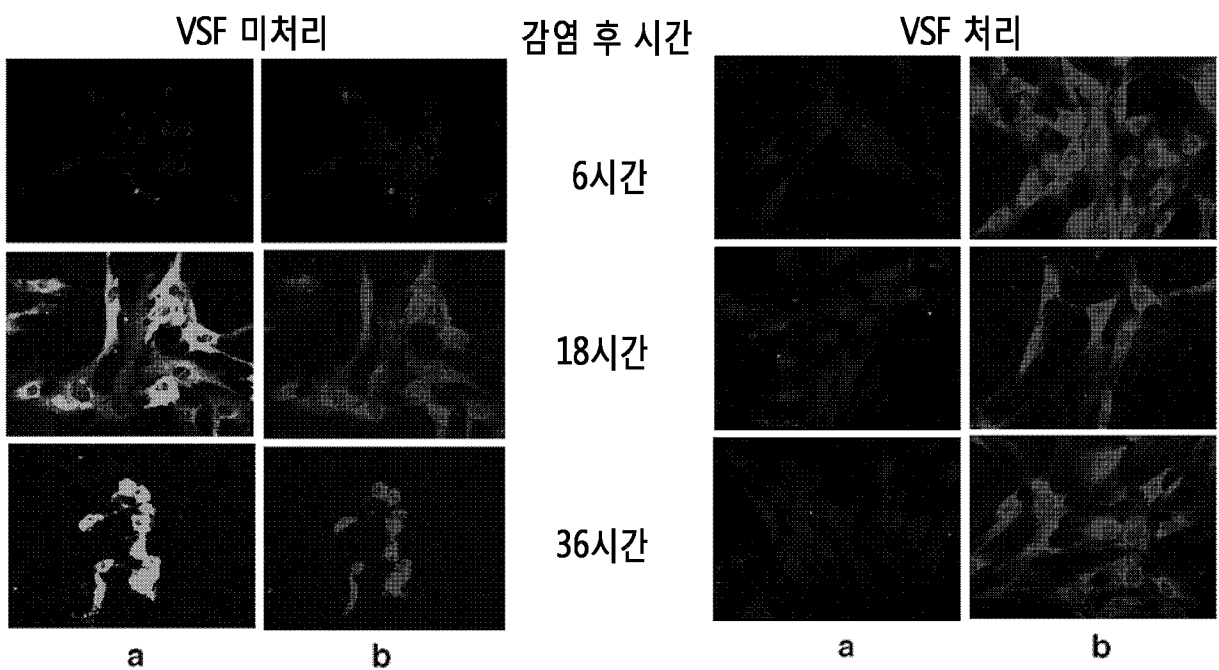
[도28]



[도29]

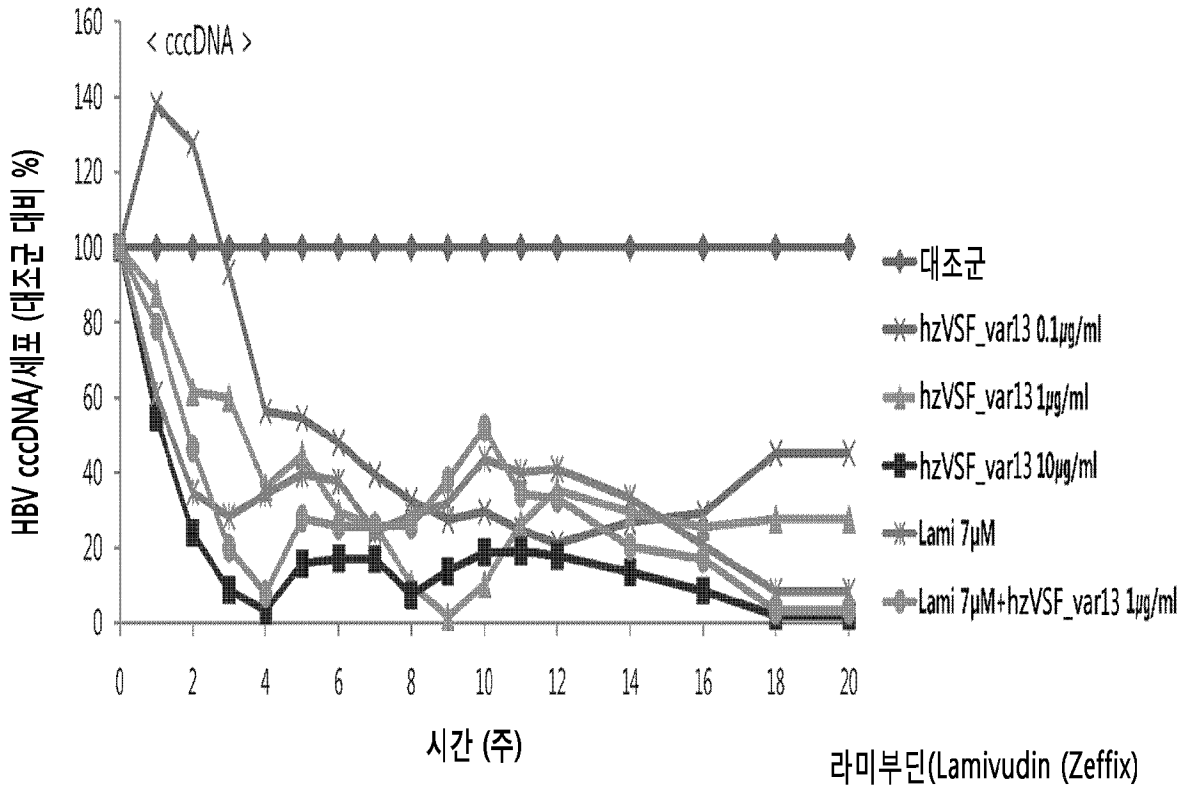


[도30]

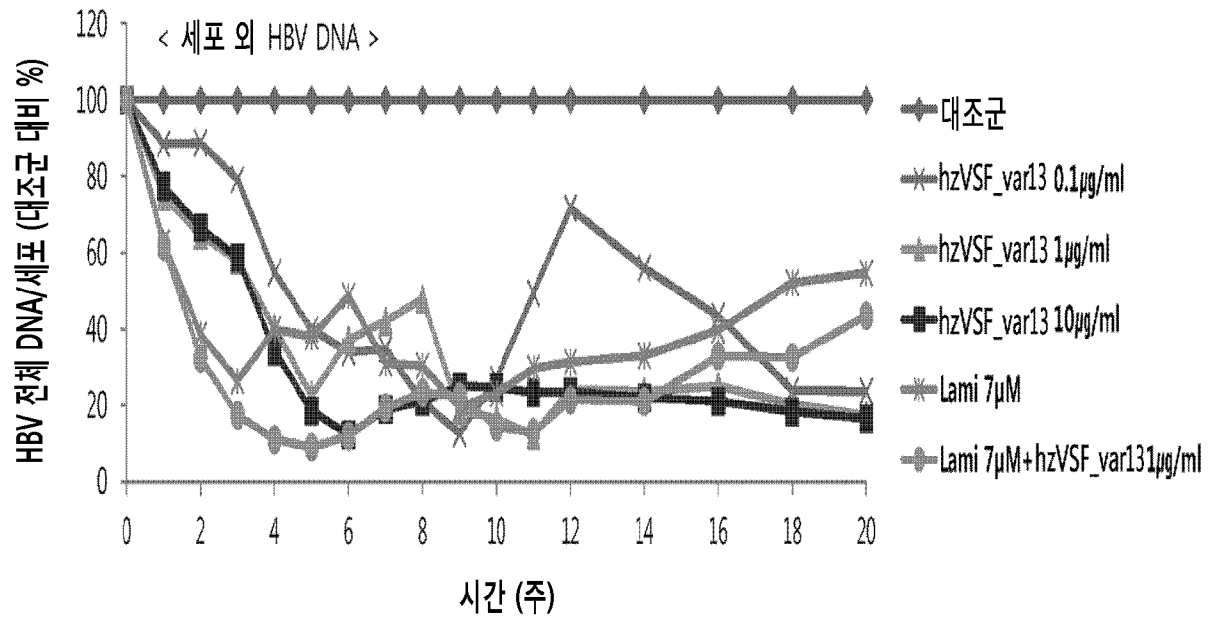


a : EMCV 바이러스 단백질, b : VSF 표적 분자

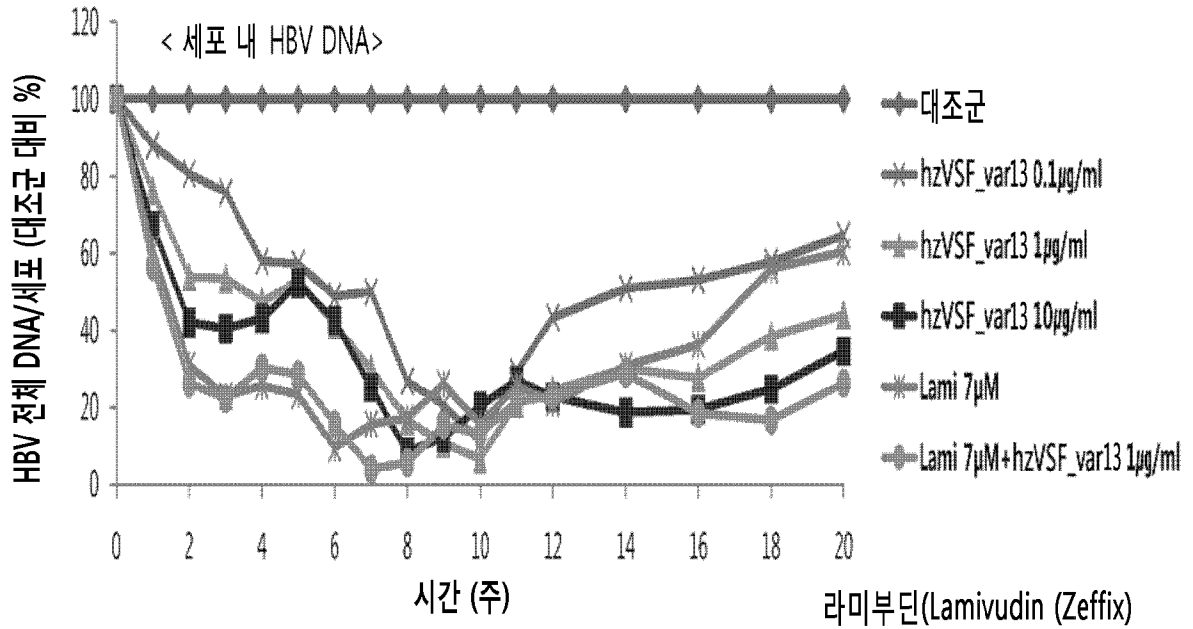
[도31]



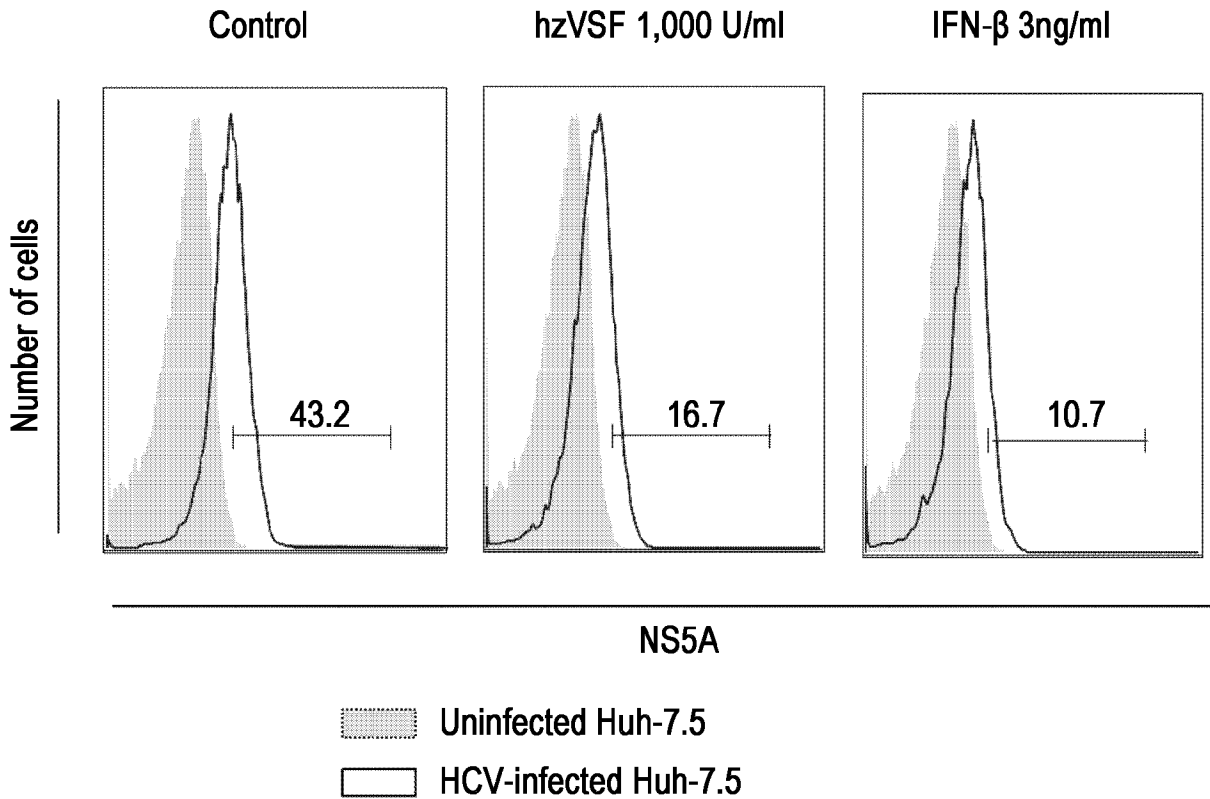
[도32]



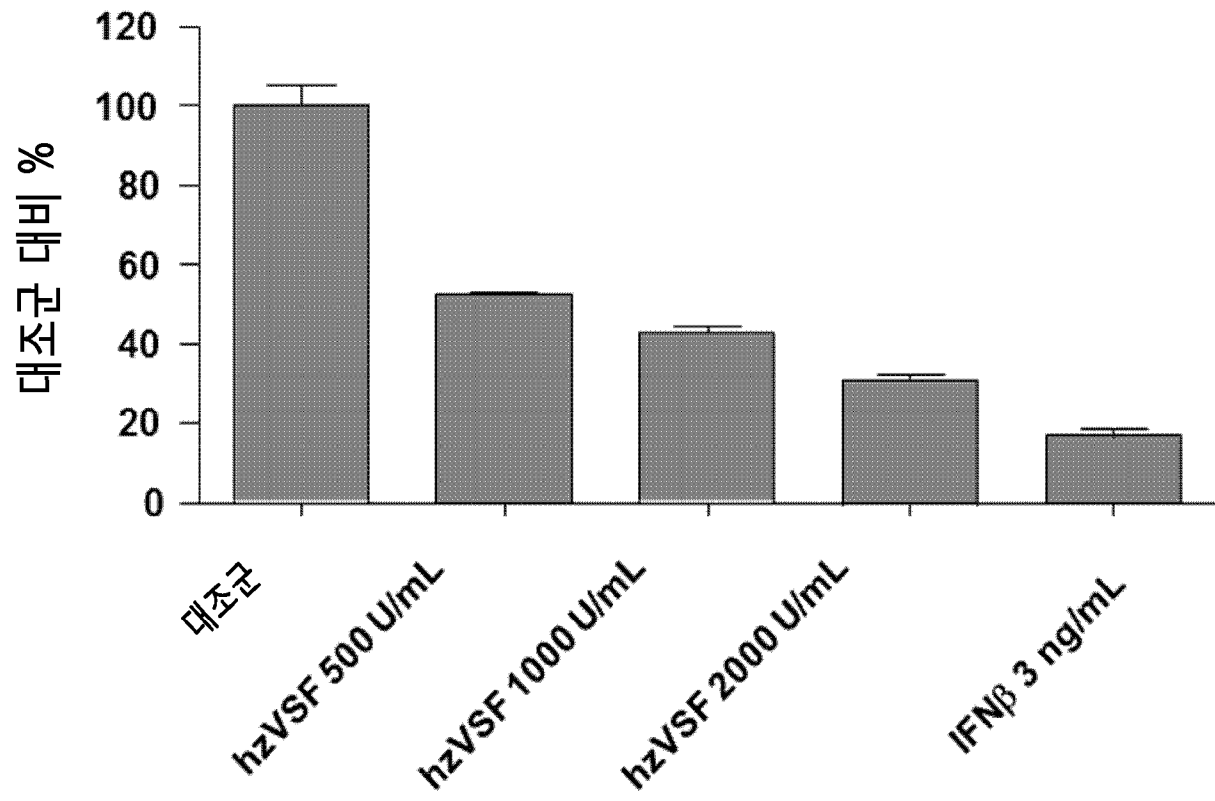
[도33]



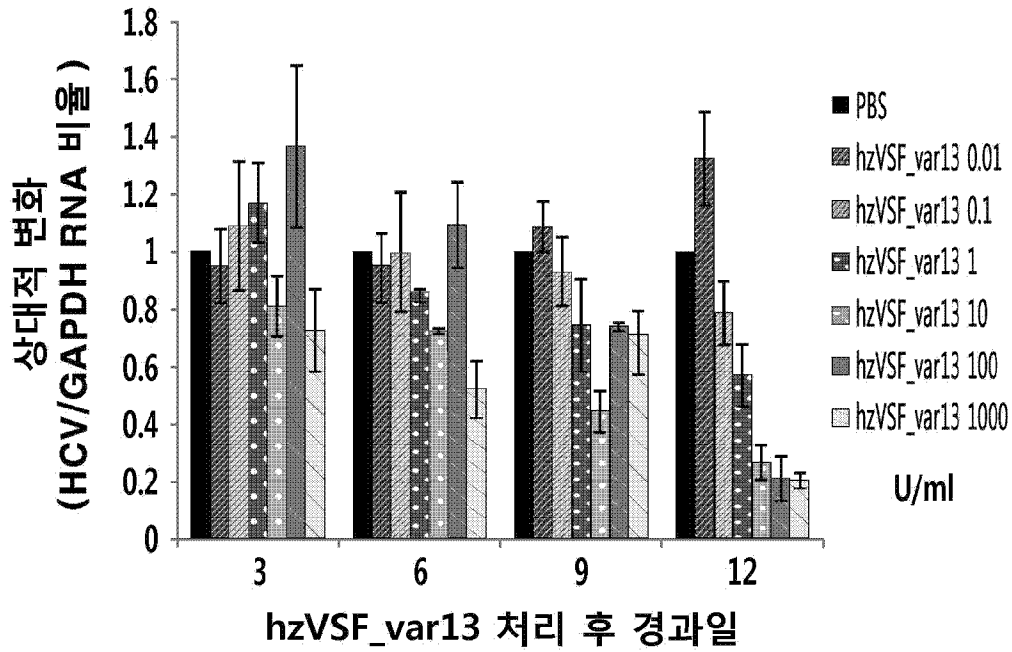
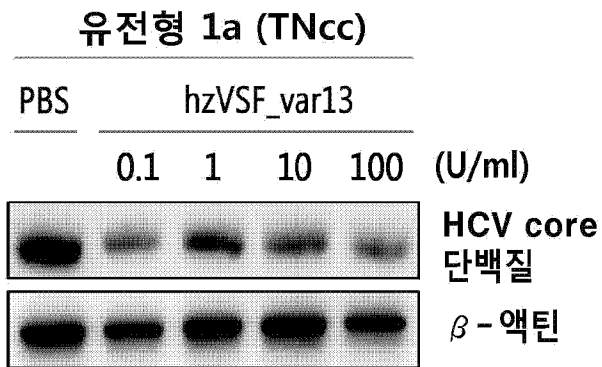
[도34]



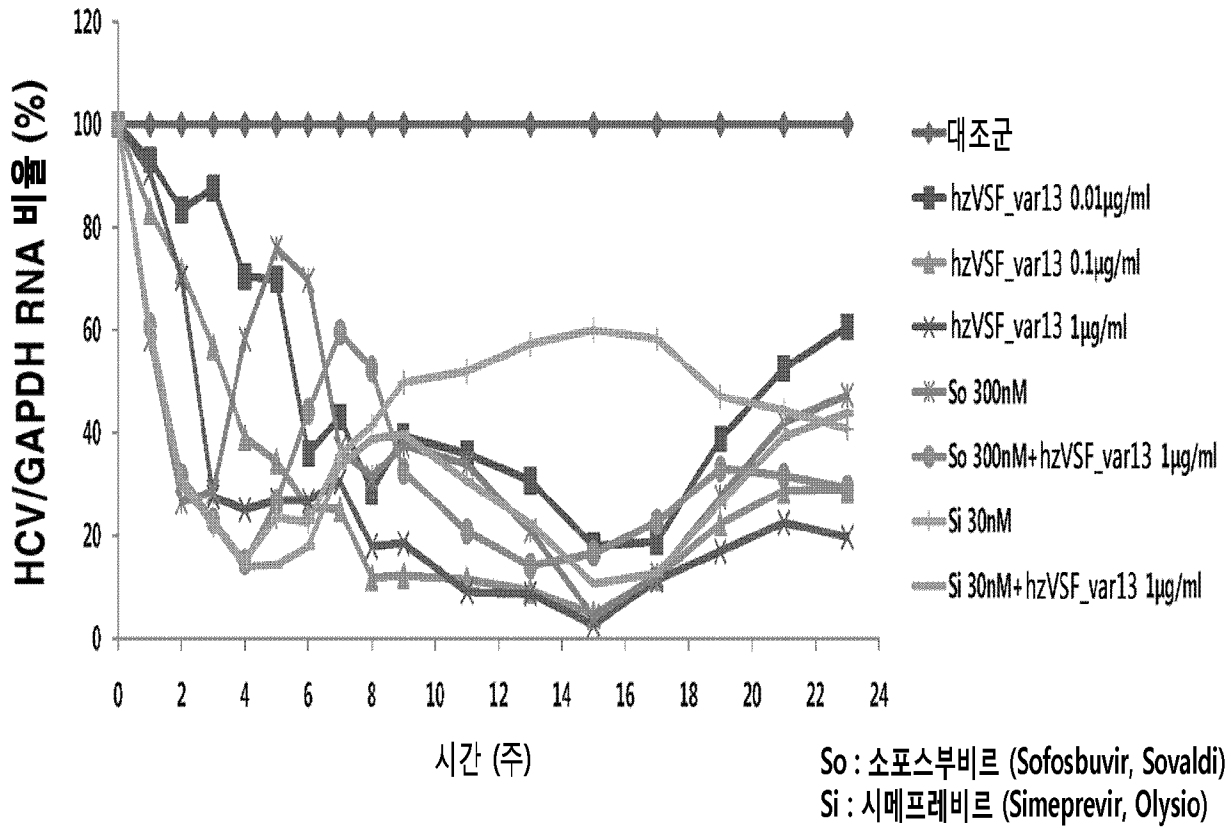
[도35]



[도36]

**A. 리얼타임 RT-PCR****B. 웨스턴 블랏**

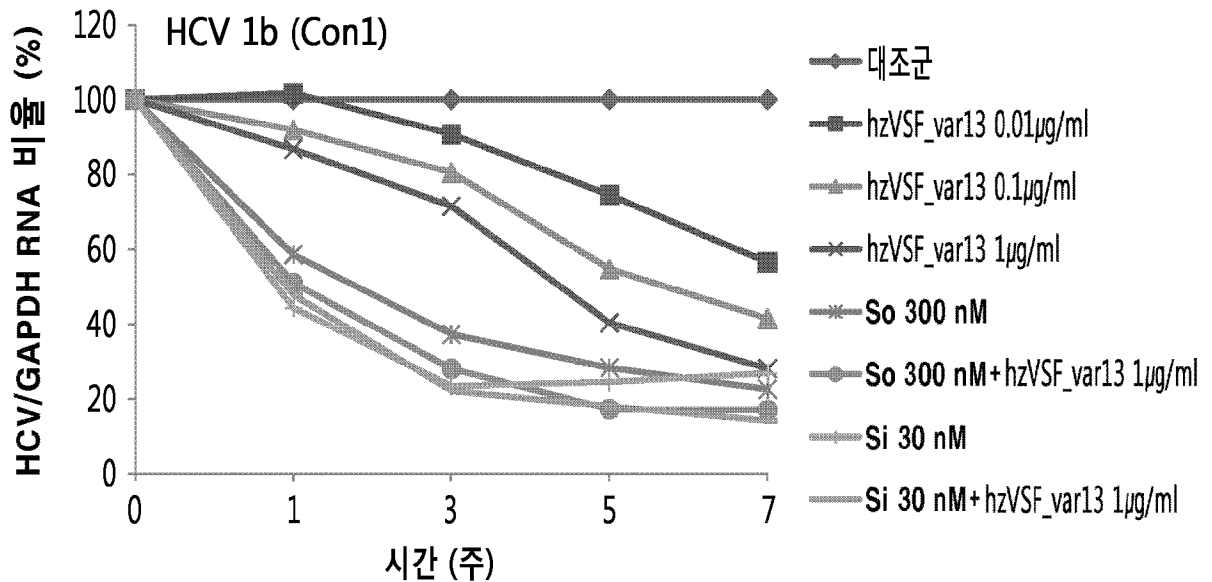
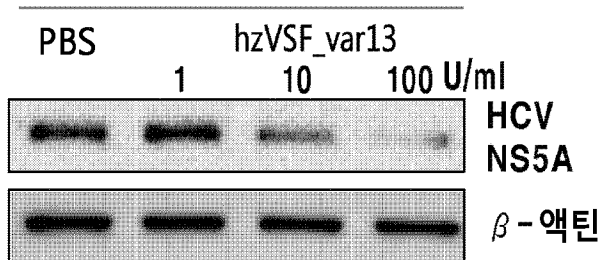
[도37]



[도38]

A

레플리콘

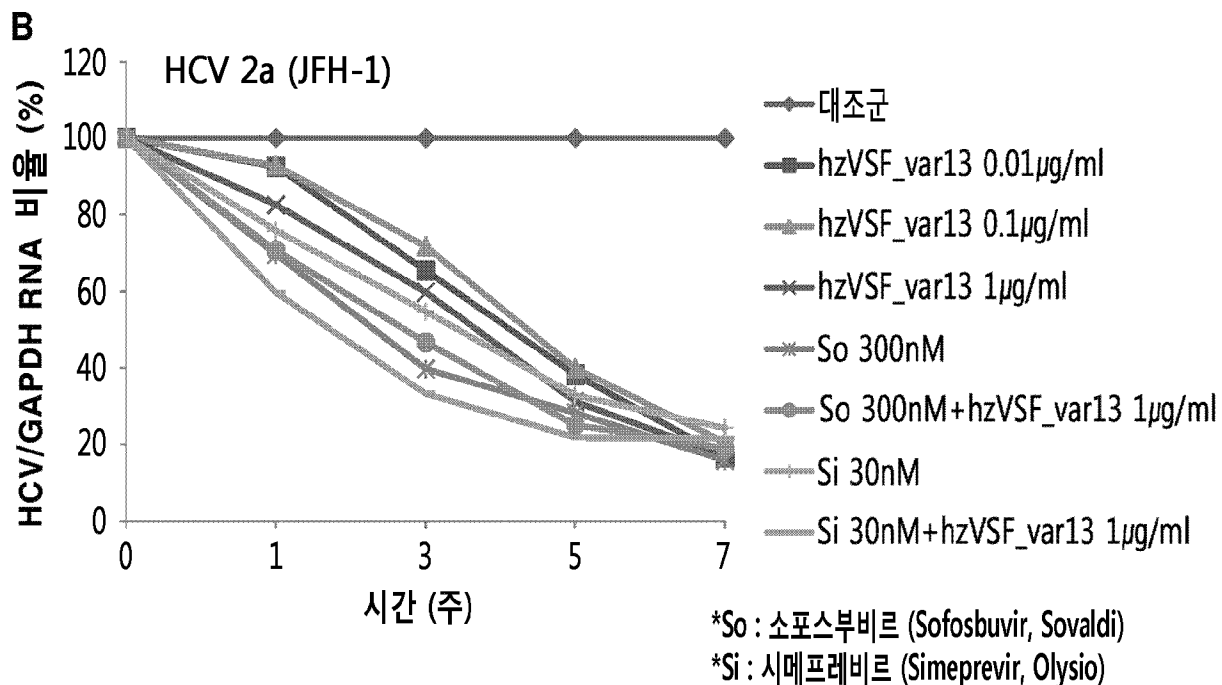
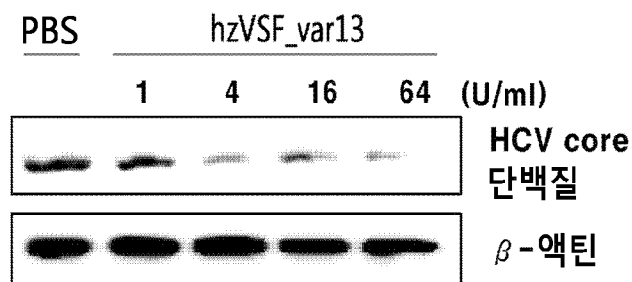


\*So : 소포스부비르 (Sofosbuvir, Sovaldi)

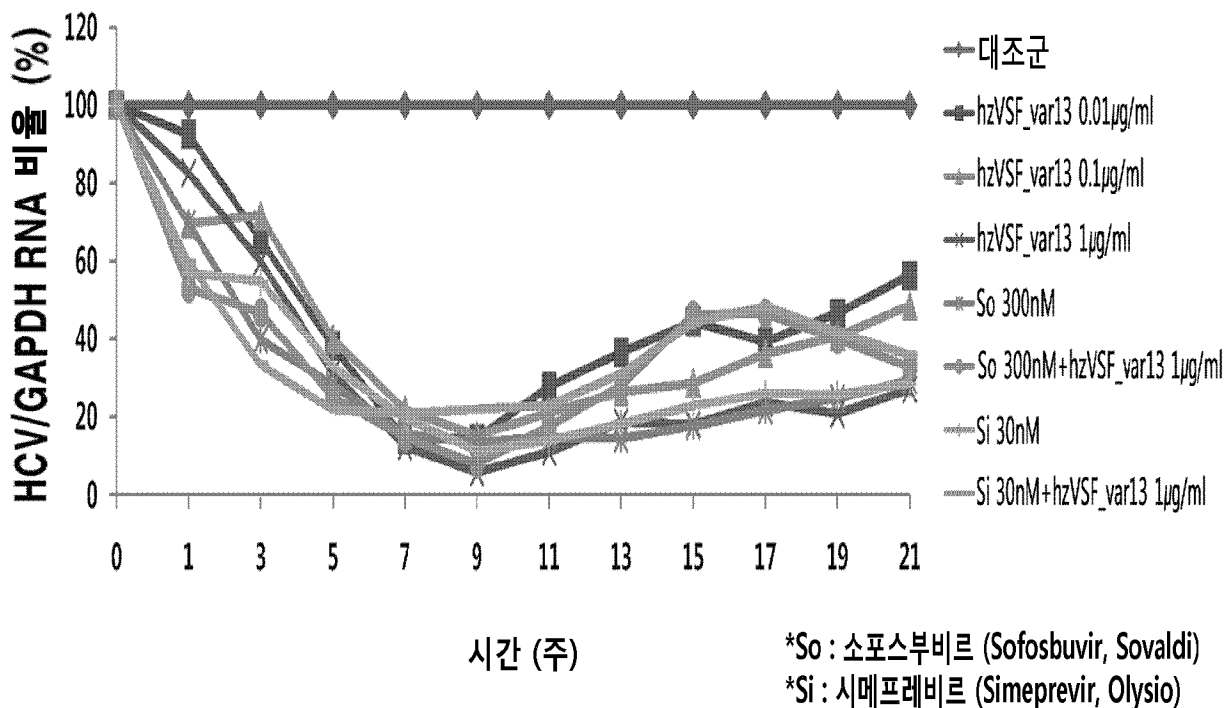
\*Si : 시메프레비르 (Simeprevir, Olysio)

[도39]

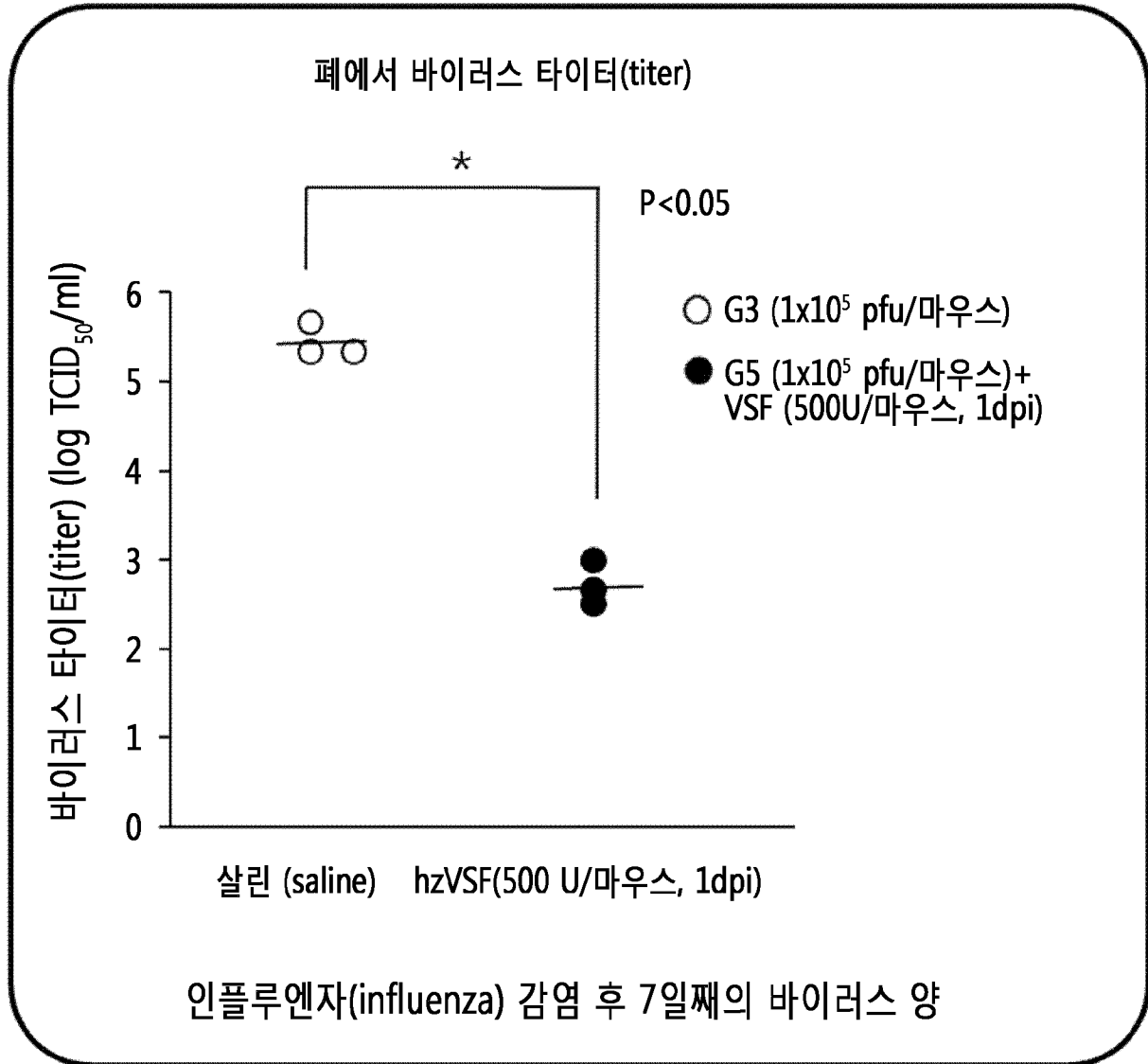
**A** 유전형 2a (JFH-1)



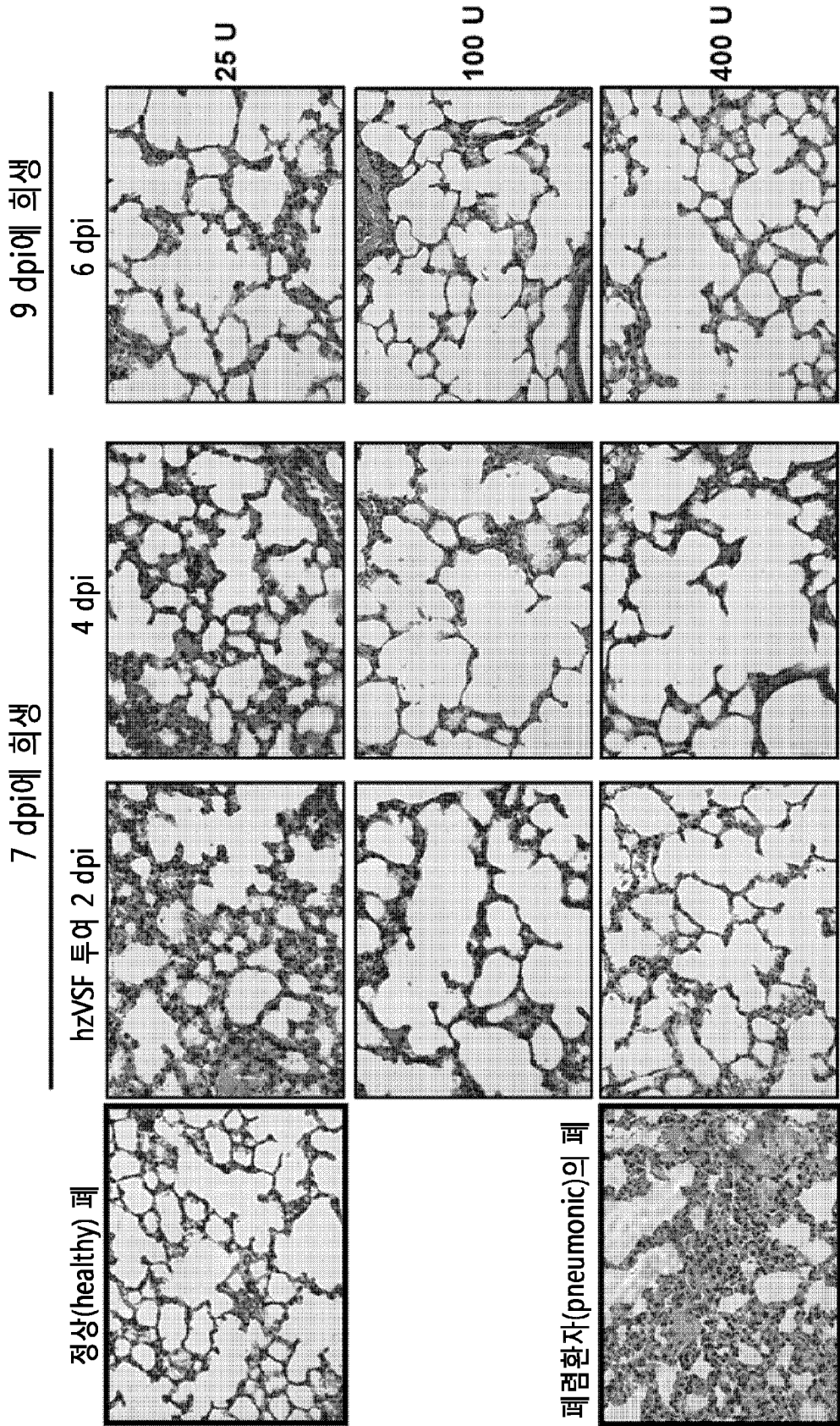
[도40]



[도41]

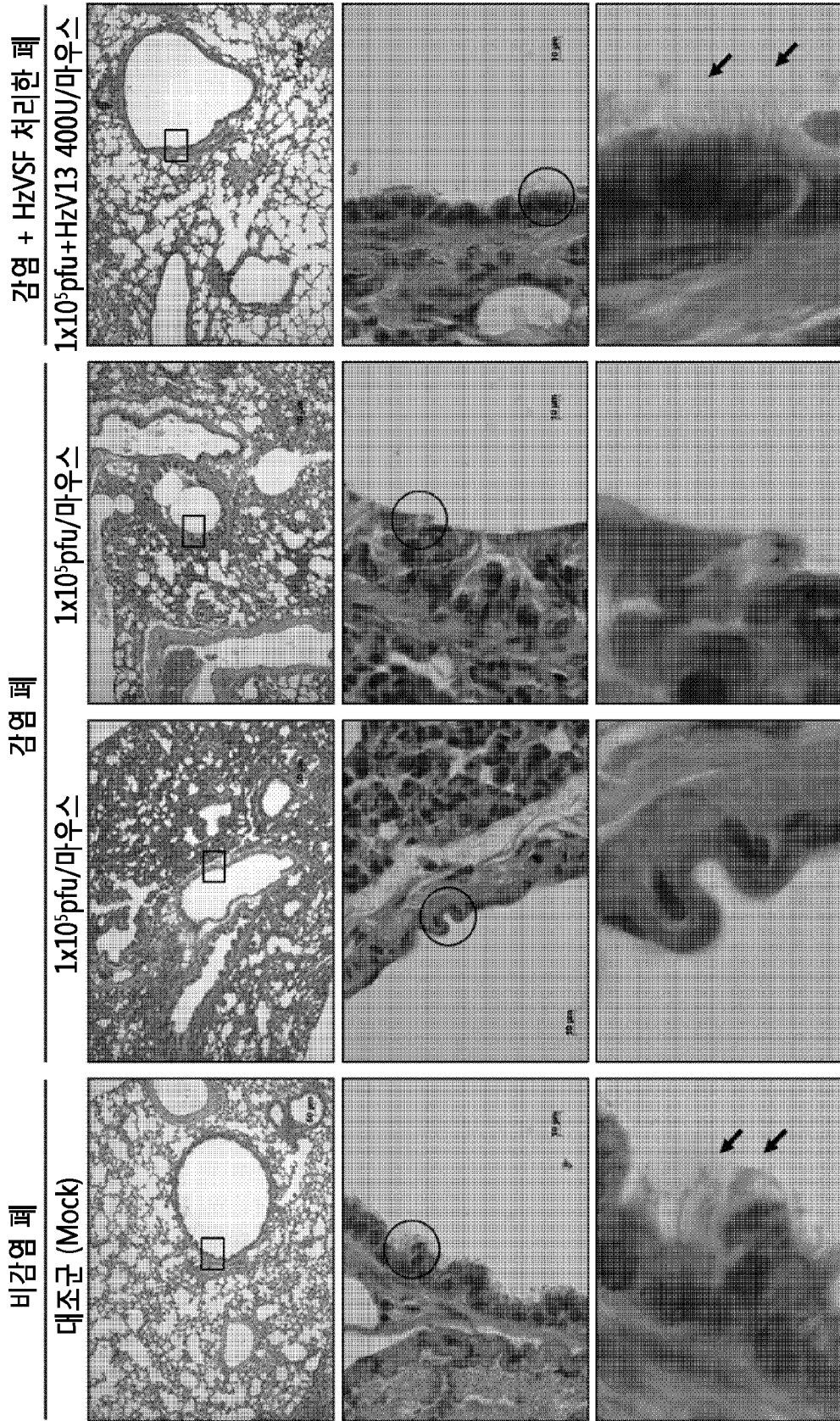


[도42]

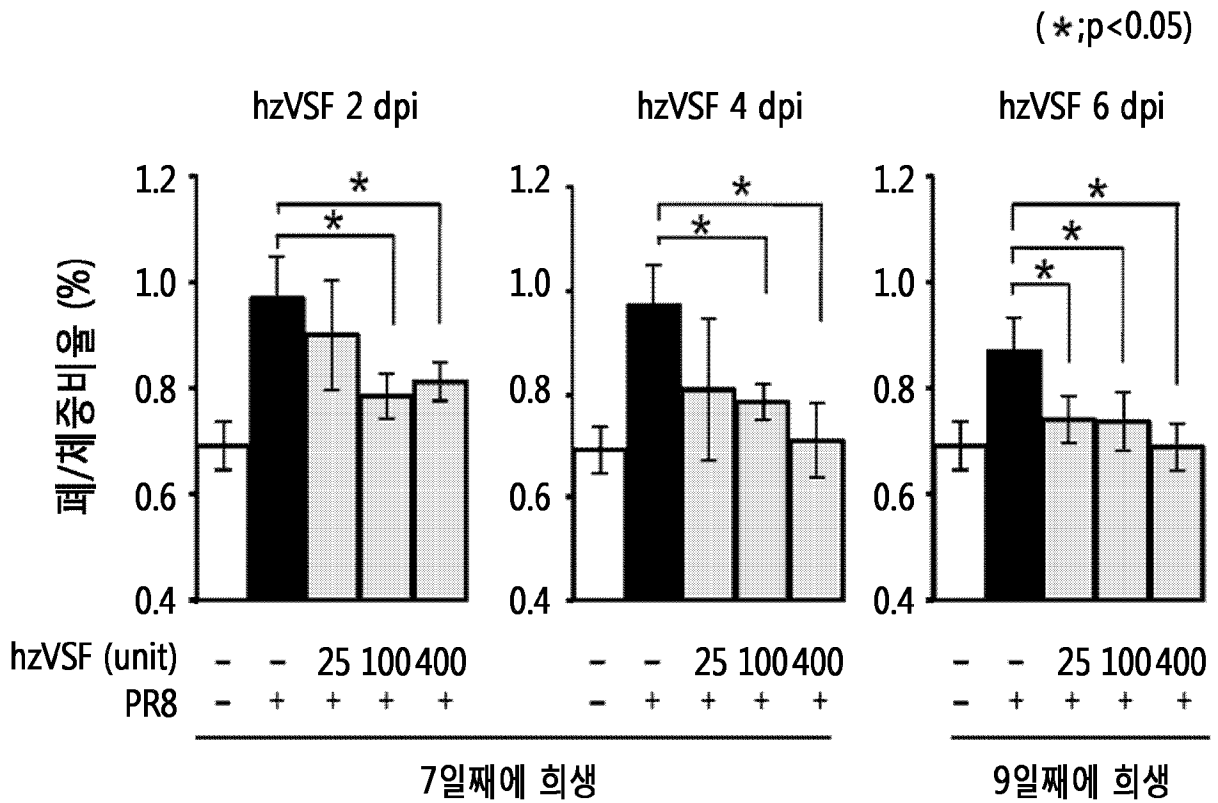


[도43]

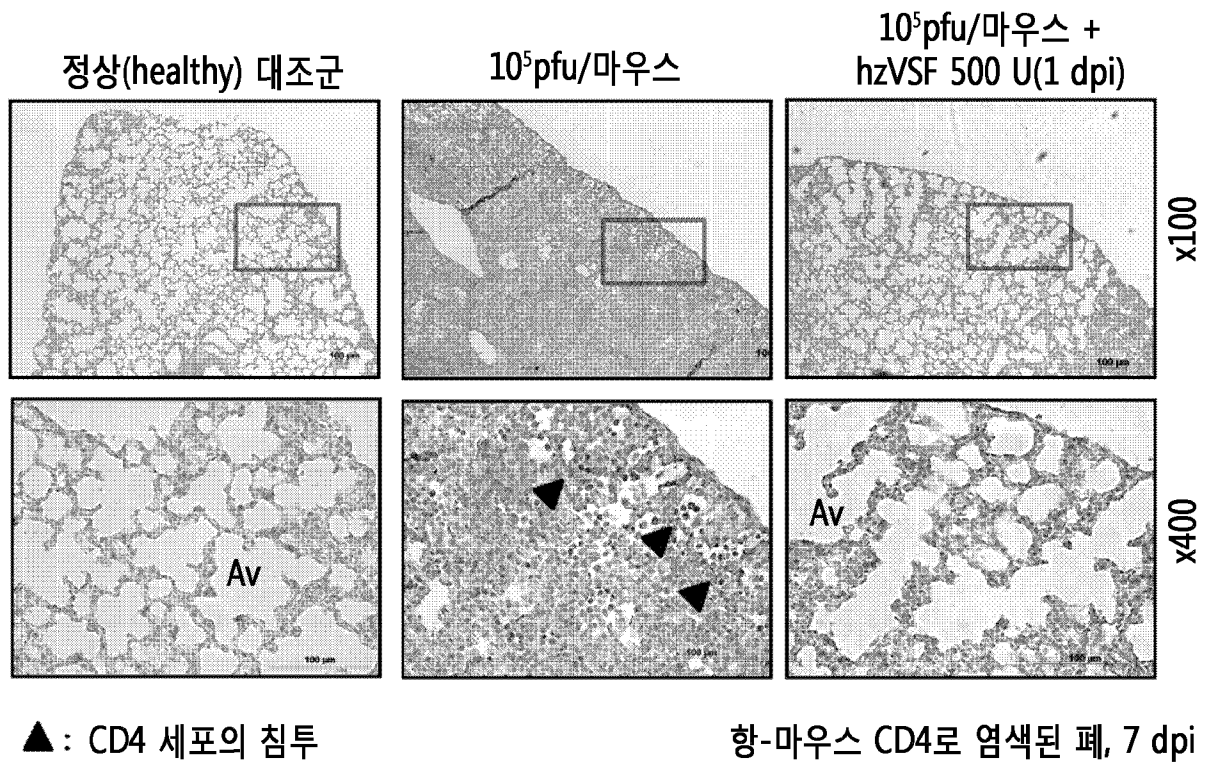
7 dpi



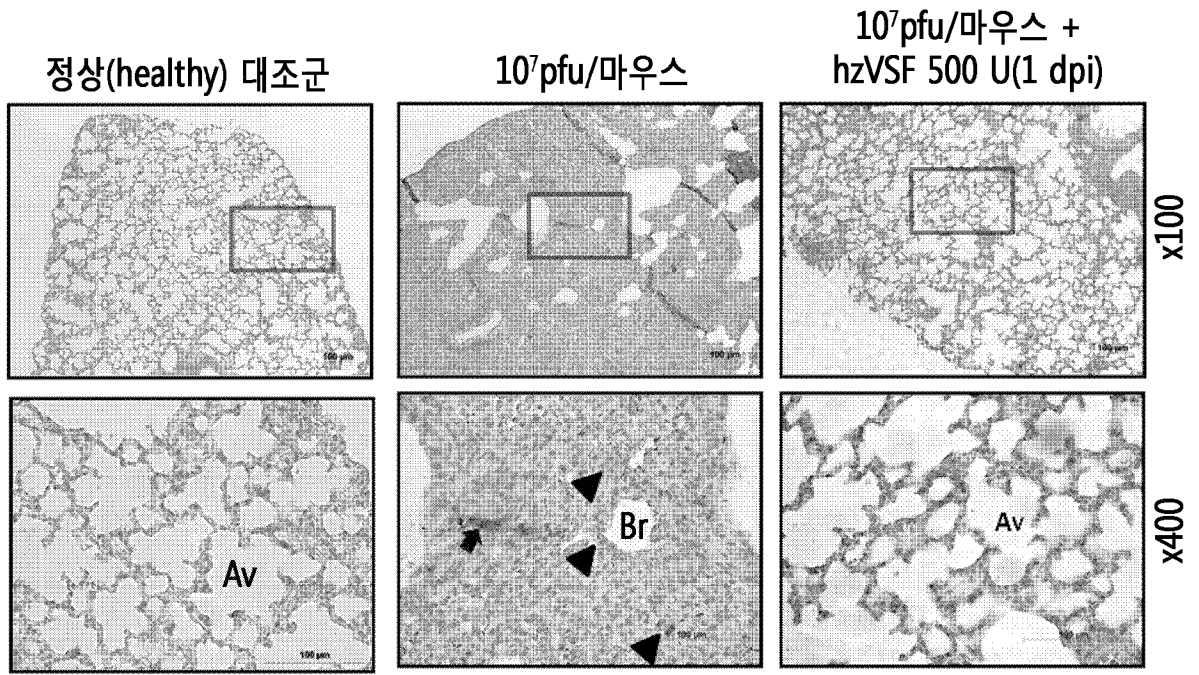
[도44]



[도45]



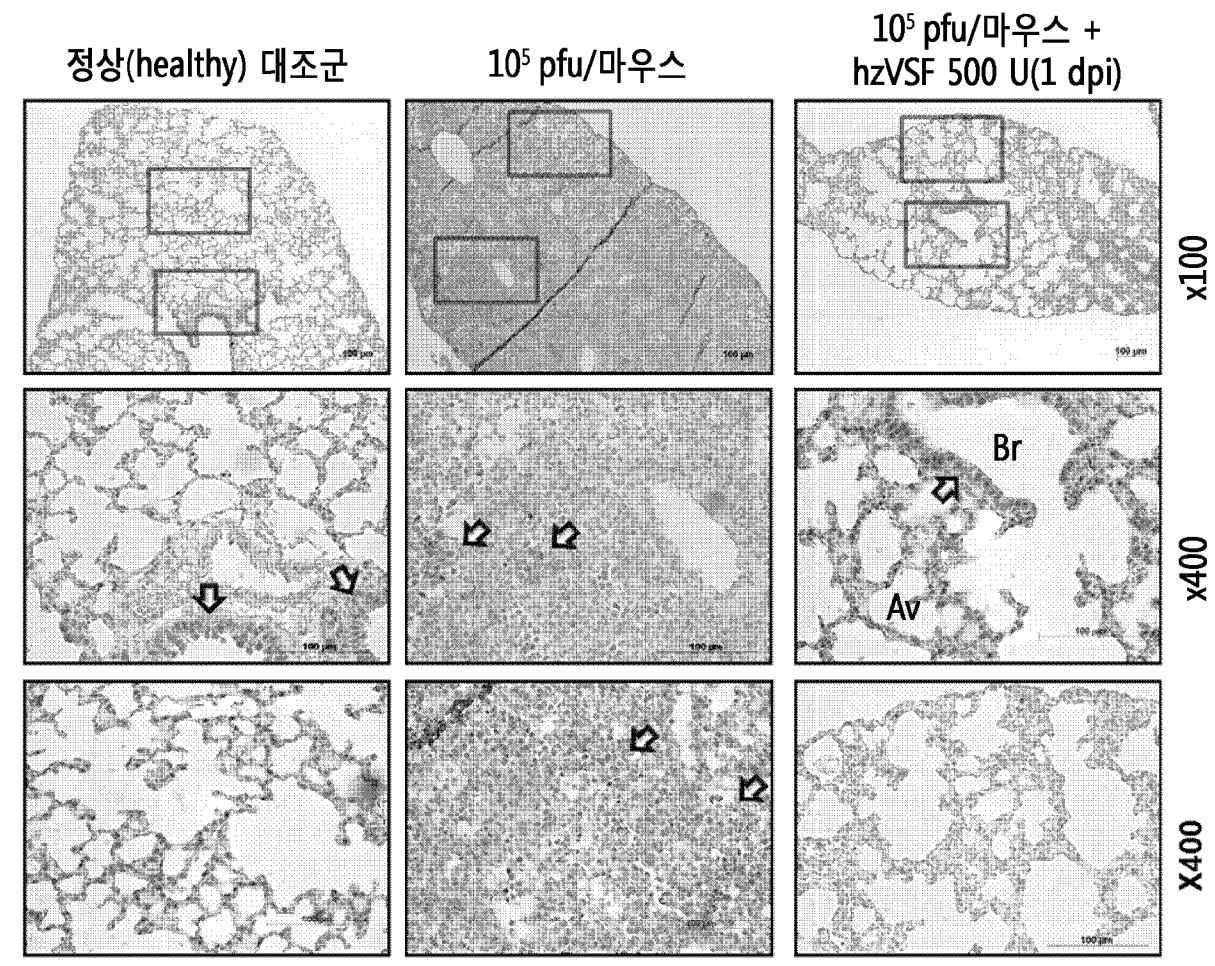
[도46]



▲ : CD4 세포의 침투

항-마우스 CD4로 염색된 폐, 7 dpi

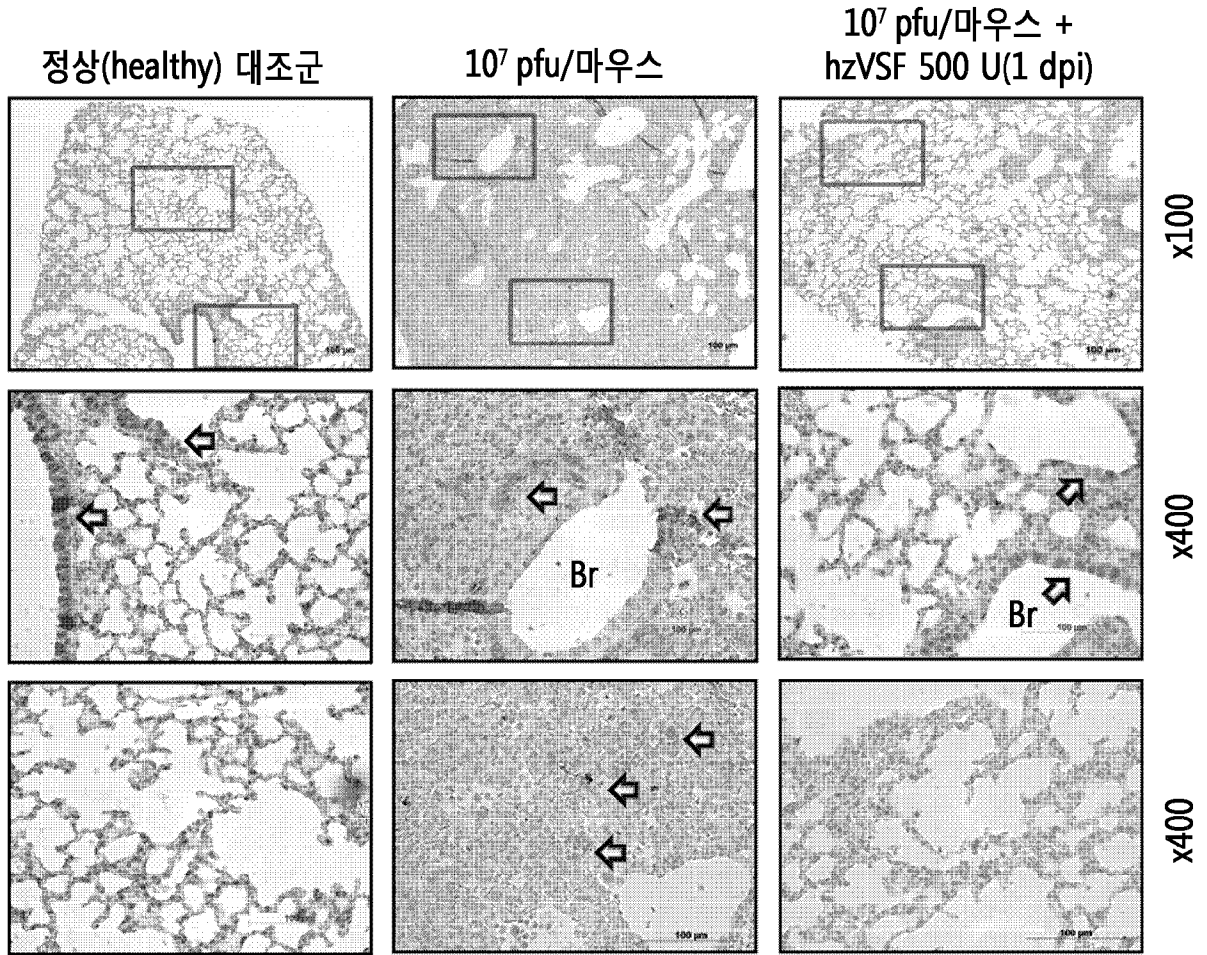
[도47]



↑ : 대식세포 (macrophage) 침투

항-마우스 F4/80으로 염색된 폐 (대식세포), 7dpi

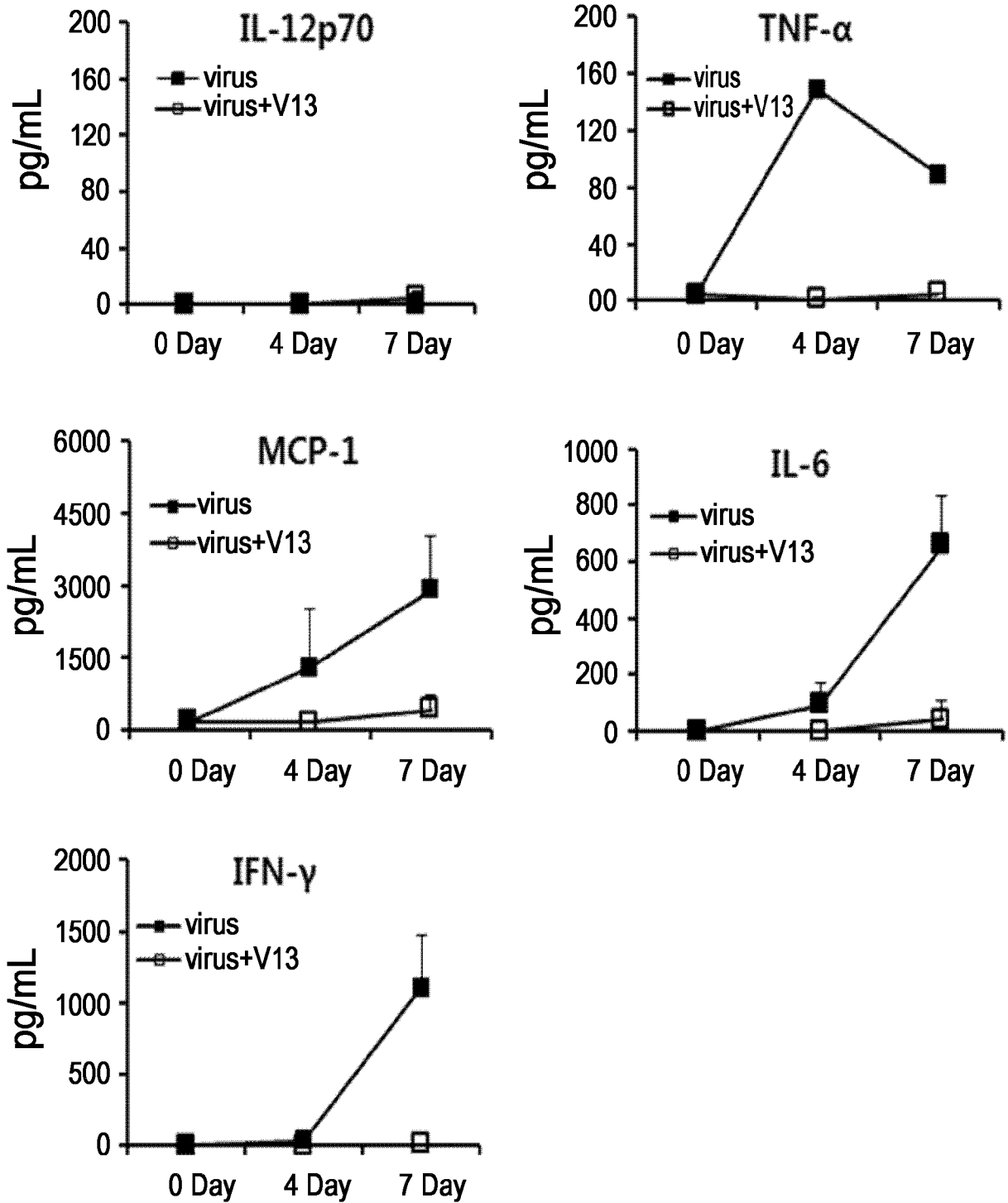
[도48]



↑ : 대식세포 (macrophage) 침투

항-마우스 F4/80으로 염색된 폐 (대식세포), 7dpi

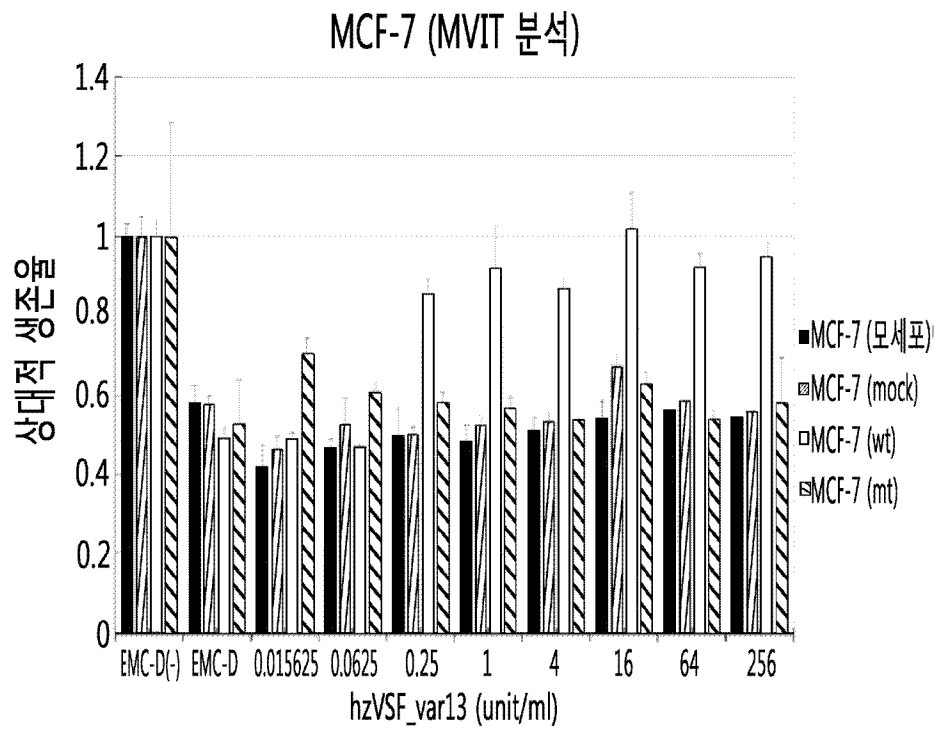
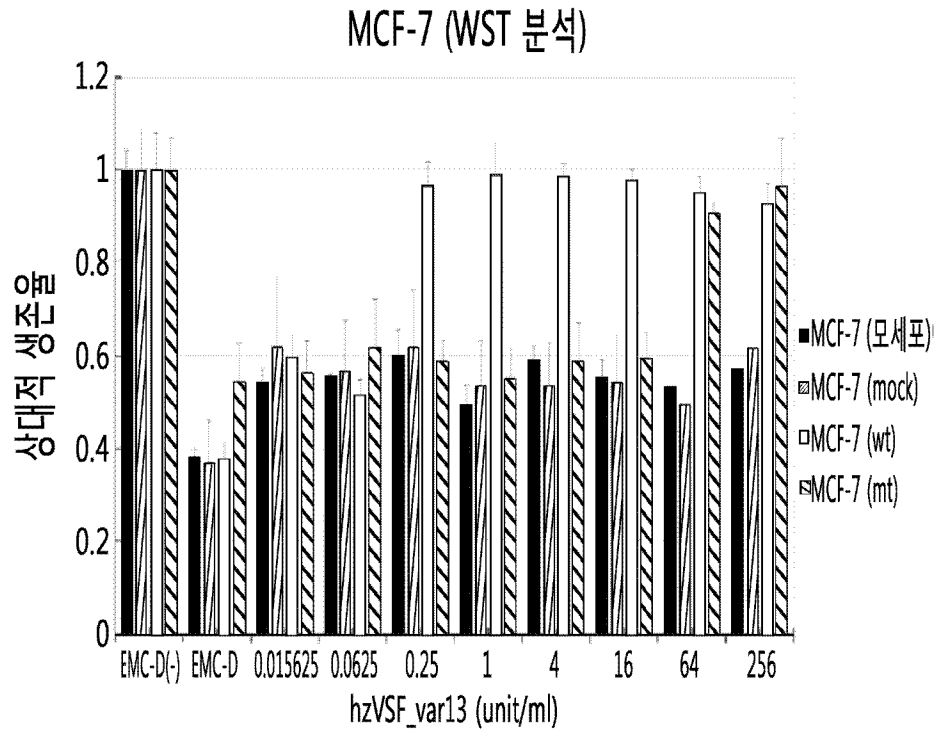
[도49]





[도51]

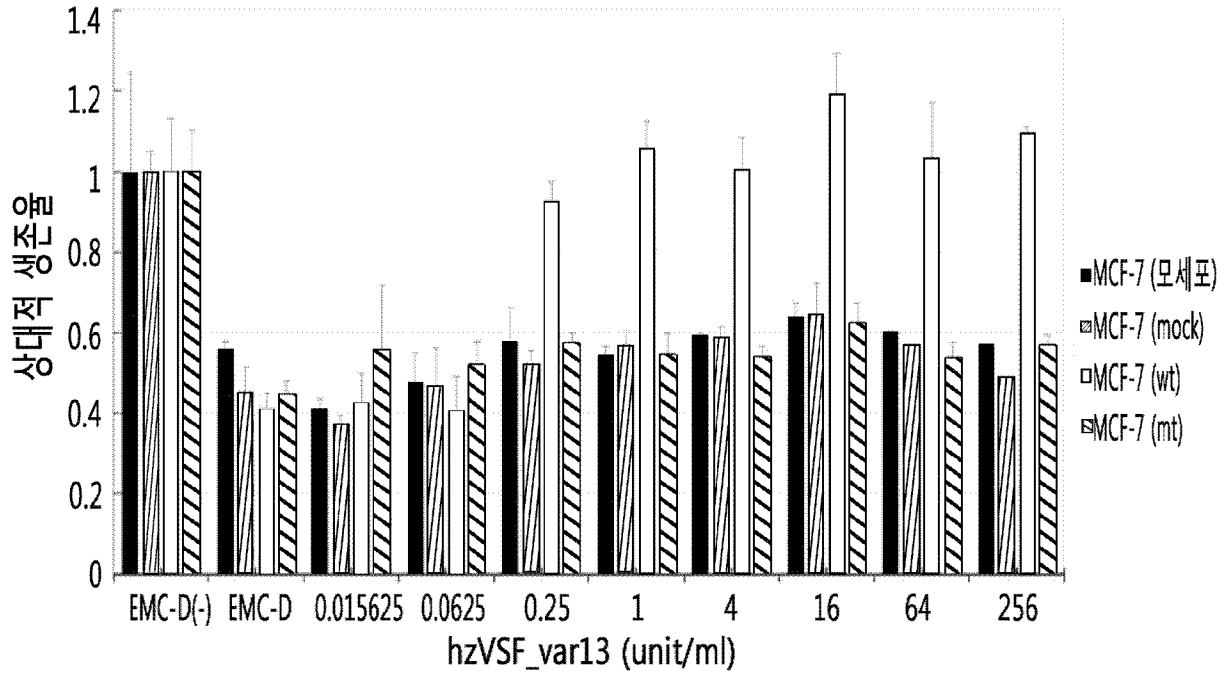
WST 분석



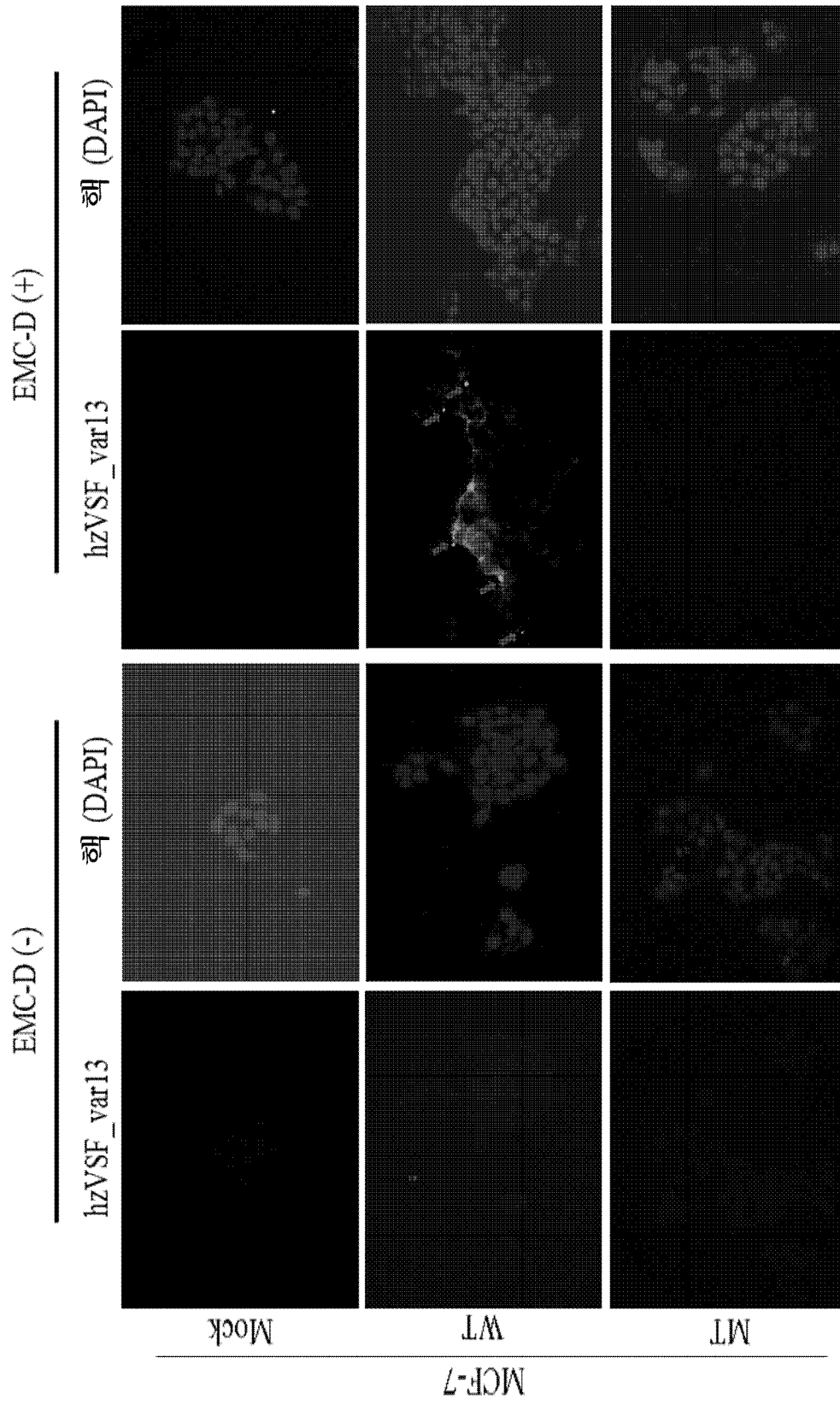
[도52]

## MVIT 분석

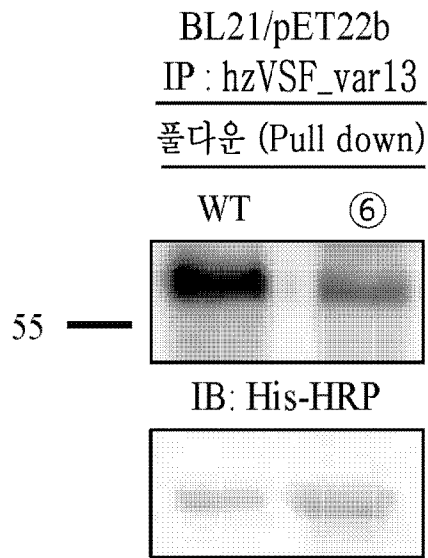
## MCF-7 (MVIT 분석)



[도53]



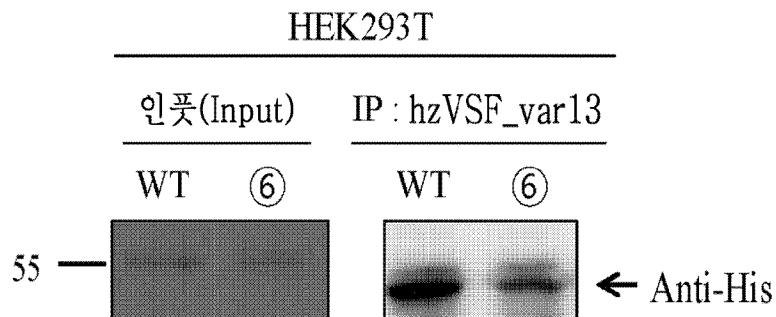
[도54]



인풋(Input), 쿠마시 염색

야생형(WT) 및 Y150F/R186K/Q195N/R217K/K235R/R270K (⑥)

[도55]



[도56]

## 비멘틴-VSF 결합 모델



녹색: p60

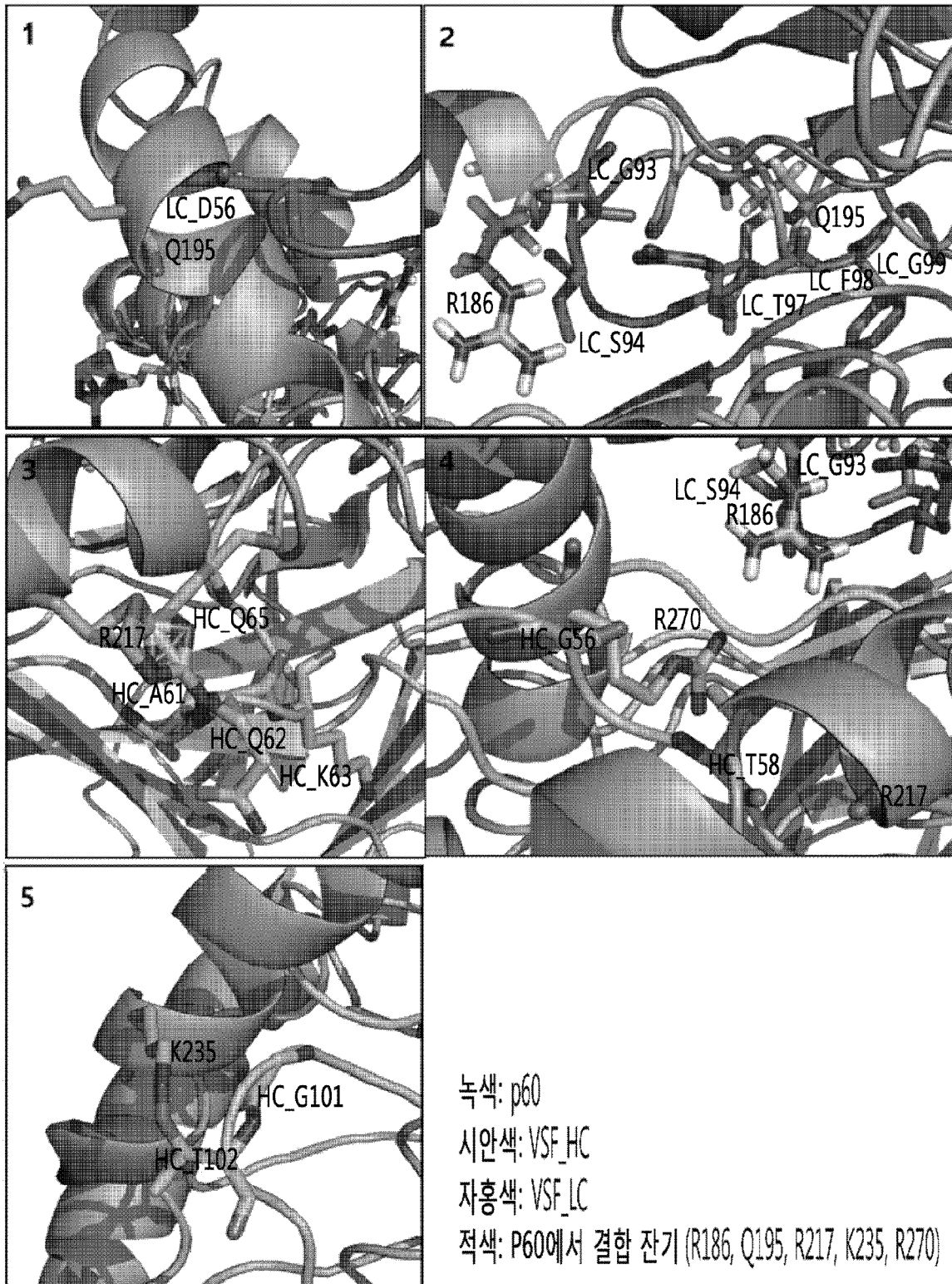
시안색: VSF\_HC

자홍색: VSF\_LC

적색: P60에서 결합 잔기 (R186, Q195, R217, K235, R270)

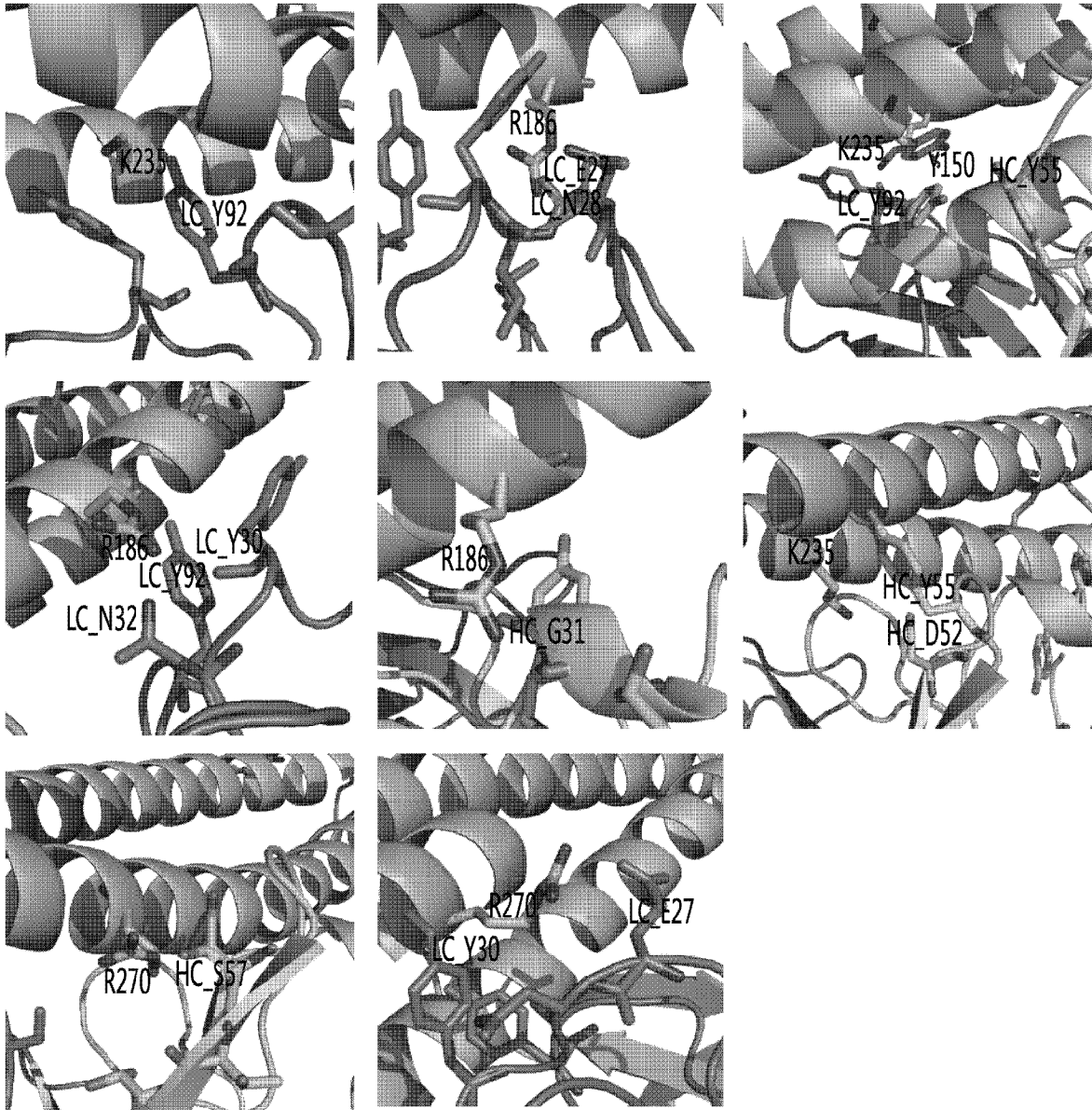
[도57]

## 비멘틴-VSF 결합 모델



[도58]

## 비멘틴-HzVsf 닥킹(docking) 모델



-녹색: p60, 시안색: HC, 자홍색: LC

-p60에서 결합잔기 (Y150, R186, K235, R270)에 대한 테트라머 Vsf의 결합잔기 확인:  
Vsf의 CDR영역에 존재함을 확인.

-복합체 모델링에서 Q195, R217에 대한 결합은 보이지 않음.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2016/006215**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C07K 16/18(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i*

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/18; A61K 39/395; C07K 14/085; C12N 15/113; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above  
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: vimentin, antibody, anti-virus, anti-inflammatory

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0027016 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 14 March 2013 See abstract; paragraphs [0099], [0123]-[0124]; claims 1-9, 22-31.	1-31
X	LIANG et al., "Vimentin Binding is Critical for Infection by the Virulent Strain of Japanese Encephalitis Virus", Cellular Microbiology, Vol. 13, No. 9, pages 1358-1370 (2011) See abstract; pages 1360-1361.	1-31
X	WO 2014-138183 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 12 September 2013 See abstract; claim 20.	1-31
X	WO 2015-010791 A2 (KLARESKOG et al.) 29 January 2015 See abstract; paragraph [0007].	1-31
A	KR 10-2003-0066419 A (IMMUNEMED INC.) 09 August 2003 See the entire document.	1-31

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 SEPTEMBER 2016 (27.09.2016)

Date of mailing of the international search report

**27 SEPTEMBER 2016 (27.09.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2016/006215**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0027016 A	14/03/2013	AU 2011-235369 A1	06/10/2011
		AU 2011-235369 B2	24/12/2015
		CA 2794930 A1	06/10/2011
		CN 102884075 A	16/01/2013
		EP 2554550 A1	06/02/2013
		JP 2013-523662 A	17/06/2013
		JP 5925759 B2	25/05/2016
		US 2013-0130971 A1	23/05/2013
		US 9205128 B2	08/12/2015
		WO 2011-120474 A1	06/10/2011
WO 2014-138183 A1	12/09/2014	CN 105209489 A	30/12/2015
		EP 2964672 A1	13/01/2016
		JP 2016-512197 A	25/04/2016
		US 2016-0009812 A1	14/01/2016
WO 2015-010791 A2	29/01/2015	EP 3024849 A2	01/06/2016
		US 2016-159922 A1	09/06/2016
		WO 2015-010791 A3	07/05/2015
KR 10-2003-0066419 A	09/08/2003	AU 2003-206222 A1	02/09/2003
		US 2005-0080236 A1	14/04/2005
		US 7514082 B2	07/04/2009
		WO 03-064461 A1	07/08/2003

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> <b>C07K 16/18(2006.01)I, A61K 39/395(2006.01)I, A61K 39/00(2006.01)I</b>		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/18; A61K 39/395; C07K 14/085; C12N 15/113; A61K 39/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 비멘틴, 항체, 항바이러스, 항염증		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2013-0027016 A (센트로 데 인제니에리아 제네티카 와이 바이오테크놀로지야) 2013.03.14 요약; 단락 [0099], [0123]-[0124]; 청구항 1-9, 22-31 참조.	1-31
X	LIANG 등, 'Vimentin binding is critical for infection by the virulent strain of Japanese encephalitis virus' Cellular Microbiology, Vol.13, No.9, pages 1358-1370 (2011) 요약; 페이지 1360-1361 참조.	1-31
X	WO 2014-138183 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2014.09.12 요약; 청구항 20 참조.	1-31
X	WO 2015-010791 A2 (KLARESKOG 등) 2015.01.29 요약; 단락 [0007] 참조.	1-31
A	KR 10-2003-0066419 A (주식회사 이문메드) 2003.08.09 전체 문헌 참조.	1-31
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2016년 09월 27일 (27.09.2016)	국제조사보고서 발송일 2016년 09월 27일 (27.09.2016)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0027016 A	2013/03/14	AU 2011-235369 A1	2011/10/06
		AU 2011-235369 B2	2015/12/24
		CA 2794930 A1	2011/10/06
		CN 102884075 A	2013/01/16
		EP 2554550 A1	2013/02/06
		JP 2013-523662 A	2013/06/17
		JP 5925759 B2	2016/05/25
		US 2013-0130971 A1	2013/05/23
		US 9205128 B2	2015/12/08
		WO 2011-120474 A1	2011/10/06
WO 2014-138183 A1	2014/09/12	CN 105209489 A	2015/12/30
		EP 2964672 A1	2016/01/13
		JP 2016-512197 A	2016/04/25
		US 2016-0009812 A1	2016/01/14
WO 2015-010791 A2	2015/01/29	EP 3024849 A2	2016/06/01
		US 2016-159922 A1	2016/06/09
		WO 2015-010791 A3	2015/05/07
KR 10-2003-0066419 A	2003/08/09	AU 2003-206222 A1	2003/09/02
		US 2005-0080236 A1	2005/04/14
		US 7514082 B2	2009/04/07
		WO 03-064461 A1	2003/08/07