(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0130632
(43) 공개일자 2018년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/10 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0066197
(22) 출원일자 2017년05월29일
심사청구일자 2017년05월29일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
장준
서울특별시 서대문구 연희로 38-20 103동 1203호 (연희동,대우아파트)
(74) 대리인
손민

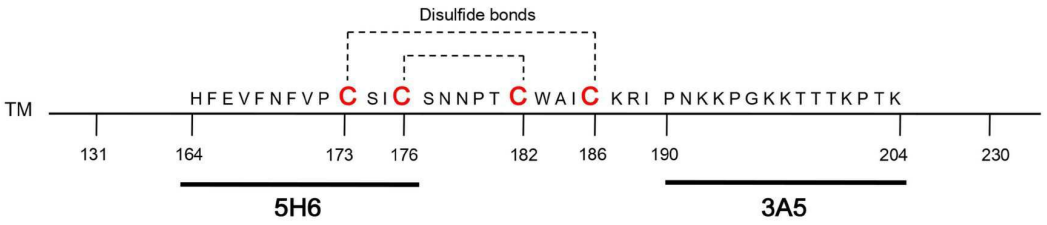
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **호흡기 신시치아 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스의 Gcf 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체, 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체, 상기 단클론 항체를 포함하는 호흡기 신시치아 바이러스의 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 상기 단클론 항체를 호흡기 신시치아 바이러스에 감염된 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스의 감염증 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 단클론 항체는, 생체에 감염된 RSV를 제거하는 효과와 함께 RSV의 감염에 의한 체중감소를 억제하고 감소된 체중을 신속하게 회복시키는 효과를 동시에 나타낼 수 있으므로, RSV 감염증의 효과적인 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
C07K 2317/92 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

RSV(Respiratory syncytial virus)의 Gcf 단백질에 특이적으로 결합하고, 서열번호 2 및 3의 아미노산 서열로 구성되는 단클론 항체.

청구항 2

제1항의 단클론 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 서열번호 의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 5

제4항의 발현 벡터가 도입된 형질전환체.

청구항 6

제1항의 항체를 포함하는, RSV(Respiratory syncytial virus) 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항의 항체를 RSV(Respiratory syncytial virus) 감염이 의심되는 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, RSV 감염증 치료방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 호흡기 신시치아 바이러스의 Gcf 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체, 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체, 상기 단클론 항체를 포함하는 호흡기 신시치아 바이러스의 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 상기 단클론 항체를 호흡기 신시치아 바이러스에 감염된 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 신시치아 바이러스의 감염증 치료 방법에 관한 것이다

배 경 기 술

[0002] 인간 호흡기 신시치아 바이러스(human RSV)는 뉴모바이러스 속(genus Pneumovirus) 및 파라믹소바이러스 과(family Paramyxoviridae)에 속하는 음성극성(negative-sense), 비분절화(non-segmented) RNA 바이러스이다. RSV는 유아 및 노인에게 심각한 상부 및 하부 기도에 대한 호흡기 질환의 중요한 원인이다. 이에 효과적인 RSV 백신을 개발하기 위하여 많은 노력이 있었으나, RSV 미접촉 유아 및 어린이에게 안전하고, 효과적이며, 허가된 RSV 백신은 아직까지 없다. 1960년대에는 FI-RSV(formalin-inactivated RSV)가 임상 연구되었으나, FI-RSV는 어린이들에게 심각한 질환을 야기하여, 두 명이 사망하고, FI-RSV를 접종한 개체의 약 80%가 병원에서 치료를 받았다. 지금까지 정제된 RSV F, G 및 M 단백질이 서브유닛 백신으로서 개발되었고, RSV G 당단백질이 RSV 바이러스 감염에 대한 중화 항체를 나타내어, 보호 항원 중 하나로서 알려져 왔다. 또한, RSV F 및 G 단백질은 수많은 임상 시험의 대상이 되어 왔다. 예를 들어, BBG2Na는 RSV A G 단백질의 중심 보존된 부분(G2Na)이 연쇄상구균 G 단백질의 알부민 결합 도메인(BB)의 C-말단에 융합된 형태의 재조합 융합 단백질로서, RSV 서브유닛 백신 후보자로서 폐 면역병리 유도 없이 보호 면역 반응을 유발할 수 있음이 알려져 있으나, 임상 3상에서 BB 요소에 의하여 타입 III 과민반응을 야기하는 것이 보고된 바 있다(Polack et al., The Pediatric infectious disease journal 23, S65-S73, 2004).

[0003] RSV G 단백질의 비당화 부위는 지금까지 알려진 A 및 B 균주 간에 보존된 13개의 아미노산 펩타이드에 해당한다. G 단백질의 헤파린 결합 도메인은 일차 감염 동안 세포 표면에 위치한 글리코사미노글리칸(GAGs)과의 초기 상호작용에 중요한 역할을 담당하고, G 단백질의 CX3C 케모카인 모티프인 182-186 아미노산 부위는 CX3CR1과 상호작용하여 기능한다. RSV G 단백질 또는 펩타이드 면역화와 관련된 많은 연구들은 RSV G 단백질의 백신 접종이 백신에 의한 폐 호산구증(eosinophilia) 및 Th2-타입의 우세 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13 및 이오탁신) 생산과 관련되어 있다고 보고하고 있다. 여기서, RSV G 단백질에 매개되는 폐 호산구증은 RSV G 단백질의 184-193 아미노산 잔기를 포함하는 보조 T 세포 에피토프와 관련된 것으로 알려진 바 있다. 다만, RSV F(F51-66)의 CD4+ T 세포 에피포트 및 185 번 및 188번 아미노산 잔기의 알라닌 치환을 포함하는 mGcf의 융합 단백질인 Th-mGcf는 백신 매개 폐 호산구증 또는 심각한 체중 감소를 유발하지 않으면서도 높은 RSV G-특이적 항체 반응을 유도하며, 바이러스 제거 효과를 보이는 것으로 알려진 바 있다. 또한, 설하 투여 경로를 통하여 콜레라 톡신과 RSV B Gcf를 마우스에 백신화한 경우, RSV B 특이적 항체 반응을 나타내면서도 기도에 심각한 폐 호산구 유도를 야기하지 않은 것으로 알려진 바 있다. 이러한 이유로, RSV G 단백질은 지금까지도 유망한 백신 후보로서 여겨지고 있다.

[0004] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 RSV의 감염증을 보다 효과적으로 치료할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, RSV의 Gcf 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체가 RSV의 감염증을 특이적으로 치료할 수 있을 뿐만 아니라, RSV의 감염에 의한 체중감소를 억제하고 감소된 체중을 신속하게 회복시키는 효과를 동시에 나타낼 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 하나의 목적은 HBV(hepatitis B virus)의 표면항원 프리-S1(preS1)에 특이적으로 결합하는, 항체를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는, RSV 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 RSV 감염이 의심되는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, RSV 감염증의 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 RSV의 감염증을 보다 효과적으로 치료할 수 있는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중,

RSV의 G 단백질에 주목하게 되었다. 상기 RSV의 G 단백질은 RSV의 흡착에 관여하여 RSV의 증식에 필수적인 역할을 수행하기 때문에, RSV의 감염증 치료제제의 표적이 될 수 있다. 이에, RSV의 G 단백질을 항원으로 사용하는 다양한 형태의 단클론 항체를 개발하고, 이들 항체의 RSV 치료효과를 연구하였다.

[0012] 이처럼 개발된 단클론 항체 중에서, 특히 RSV의 G 단백질의 164번 내지 176번 아미노산으로 구성된 Gcf(G protein core fragment)를 에피토프로 사용하는 단클론 항체는 다른 Gcf를 에피토프로 사용하는 단클론 항체 보다도 RSV의 G 단백질과의 결합친화도가 우수하고, RSV에 감염된 세포에도 특이적으로 결합하며, RSV에 감염된 세포에서 발현된 Gcf에 대한 결합친화도 역시 우수하고, 생체내에서 우수한 RSV 제거활성을 나타낼 뿐만 아니라, RSV에 감염된 개체에서 RSV의 감염에 의한 체중감소를 억제하고 감소된 체중을 신속하게 회복시키는 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0013] 특히, 상기 단클론 항체가 나타내는 RSV의 감염에 의한 체중감소를 억제하고 감소된 체중을 신속하게 회복시키는 효과는, 상기 단클론 항체가 단순히 감염된 RSV를 제거하는 효과 뿐만 아니라, RSV의 감염에 의하여 손상된 생체시스템의 회복을 촉진시키는 효과도 함께 나타냄을 암시한다.

[0014] 종래의 RSV의 감염증 치료제제는 대체로 생체에 감염된 RSV 감염증을 치료하는 효과를 나타내기는 하였으나, 이처럼 RSV의 감염에 의하여 손상된 생체시스템의 회복을 촉진시키는 효과를 나타내는 경우는 지금까지 전혀 보고되지 않았다.

[0015] 따라서, 본 발명의 단클론 항체는 생체에 감염된 RSV를 제거하는 효과와 함께 RSV의 감염에 의하여 손상된 생체시스템을 회복시키는 효과를 나타낸다는 점에서 종래의 단클론 항체와는 전혀 구별되며, 이러한 단클론 항체는 종래에는 전혀 보고되지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.

[0016] 상기의 목적을 달성하기 일 실시양태로서, 본 발명은 RSV(Respiratory syncytial virus)의 Gcf 단백질에 특이적으로 결합하고, 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 구성되는 단클론 항체를 제공한다.

[0017] 본 발명의 용어 "RSV의 G 단백질"은 RSV 주요 부착 단백질로서, 본 발명에서는 이의 일 부분이 호흡기 신시치아 바이러스 백신 면역원의 구성 성분으로 사용된다. 상기 RSV의 G 단백질 및 이를 코딩하는 유전자의 정보는 미국 국립 보건원 유전자 은행과 같은 공지의 데이터 베이스를 통하여 수득할 수 있다.

[0018] 본 발명의 용어 "RSV의 Gcf 단백질(RSV G protein core fragment)"은 RSV G 단백질의 중심 보존된 도메인(central conserved domain) 부위에 대한 아미노산 서열로 구성된 단백질을 말한다.

[0019] 상기 RSV의 Gcf 단백질의 구체적인 아미노산 서열은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, RSV의 G 단백질의 131 내지 230번 부위(서열번호 1)의 아미노산 서열이 될 수 있고, 다른 예로서 RSV의 G 단백질의 144 내지 159번 부위, 164 내지 176번 부위, 174 내지 187번 부위 또는 190 내지 204번 부위의 아미노산 서열이 될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명에서 상기 RSV의 Gcf 단백질은, 야생형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 변이체를 포함한다. 상기 변이체란 Gcf 단백질의 야생형 아미노산 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 야생형 아미노산 서열과 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다.

[0021] 또한, 상기 RSV의 Gcf 단백질은 상기 서열로 기재한 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서 본 발명의 단클론 항체와 결합할 수 있다면, 본 발명의 범주에 제한 없이 포함된다.

[0022] 본 발명에서 용어, "상동성"은 주어진 단백질 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0를 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어 "RSV의 Gcf 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체"는 RSV의 Gcf 단백질에 결합하여 RSV에 대한 중화 활성을 나타낼 수 있는 단클론 항체를 의미한다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 단클론 항체는 생체에 감염된 RSV를 제거하는 효과와 함께 RSV의 감염에 의하여 손상된 생체시스템을 회복시키는 효과를 동시에 나타낼 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 RSV의 G

단백질의 164 내지 176번 부위를 에피토프로 인식할 수 있는 단클론 항체가 될 수 있고, 다른 예로서, 서열번호 2의 중쇄 아미노산 서열과 서열번호 3의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 단클론 항체가 될 수 있다.

[0025] 본 발명의 용어 "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 항체 단편을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 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, 스캡, 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. 상기 항체 단편은 항원결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fd, Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 등을 포함한다. 상기 Fd는 Fab 단편에 포함되어 있는 중쇄 부분을 의미한다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 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')2 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')2 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 용어, "단클론 항체"는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단클론 항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.

[0027] 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 불리우는 3개의 다변가능한 영역 및 4개의 구조 영역(framework region)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리우고, 또한 상기 CDR은 중쇄에 위치한 경우, 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 중쇄 CDR3로, 경쇄에 위치한 경우, 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 경쇄 CDR3로 불리운다.

[0028] 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.

[0029] 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.

[0030] 본 발명에서 용어, "혼성(hybrid)에 의한 불변 영역"이란 단쇄 면역 글로불린의 중쇄 불변 영역이 2종류 이상의 면역글로불린 중쇄 불변 영역, 구체적으로 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM에서 선택된 2 이상의 면역글로불린 중쇄 불변 영역에서 유래된 서열을 모두 포함하는 것을 의미한다.

[0031] 그 예로, IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하다.

[0032] 특별히 이에 제한되지는 않으나, 본 발명에서 상기 항체는 바람직하게는 인간화 항체일 수 있다.

[0033] 본 발명에서 용어, "인간화 항체(humanized antibody)"는 생쥐 단일클론항체의 CDR 서열의 전부 또는 일부를 인간 항체에 이식시킨 형태의 항체를 의미하며, 그 예로 생쥐 단일클론항체의 CDRs를 인간 항체 유래의 FR과 재조합시켜 인간화 가변영역을 제조하고 이를 바람직한 인간 항체의 불변영역과 재조합시켜 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 생쥐 유래의 CDRs만을 이식하는 경우 인간화 항체의 친화도가 떨어질 수 있으므로, FR 아미노산 잔기를 생쥐 항체의 아미노산으로 치환시켜 친화도를 증진시킬 수도 있으나, 이에 제한

되지 않는다.

[0034] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

[0035] 상기 항체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0036] 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 단클론 항체를 구성하는 서열번호 2의 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열번호 3의 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드 서열이 될 수 있다.

[0037] 본 발명에서 제공하는 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 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 작동가능하도록 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.

[0038] 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 포함하는 발현벡터 또는 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하는 발현벡터일 수 있다.

[0039] 본 발명에서 제공하는 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현벡터가 도입되어 형질전환된 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.

[0040] 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, 리포좀 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.

[0041] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 RSV 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0042] 상기 항체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0043] 보다 구체적으로, 상기 약학 조성물은 상기 항체를 포함하는, RSV 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있으며, 상기 조성물은 RSV 감염증의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 용어 "RSV 감염증"이란, RSV 감염에 의해 유발되는 호흡기 질환을 의미하며, 일 예로서 기침, 재채기, 고열, 천명, 기관지염, 세기관지염, 폐렴, 천식, 크룹 및 호흡기 부전 등이 될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 용어, "예방"이란 상기 조성물의 투여에 의해 RSV 감염증의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있으며, 상기 "치료"란 상기 조성물의 투여에 의해 RSV 감염증에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0046] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 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, 계면

활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0048] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 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, 동결건조제제, 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0049] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0050] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0051] 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, 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.

[0052] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 RSV 감염이 의심되는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 RSV 감염증의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0053] 상기 방법은 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 RSV가 감염되거나 감염된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 RSV 감염을 예방 또는 치료하는 방법일 수 있으며, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0054] 상기 개체는 소, 돼지, 양, 닭, 개, 인간 등을 포함하는 포유동물, 조류 등을 포함하며, 본 발명의 상기 조성물의 투여에 의해 RSV 감염이 치료되는 개체는 제한없이 포함한다.

[0055] 이때, 상기 항체는 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 항체는 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, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0056] 본 발명에서 제공하는 단클론 항체는, 생체에 감염된 RSV를 제거하는 효과와 함께 RSV의 감염에 의한 체중감소를 억제하고 감소된 체중을 신속하게 회복시키는 효과를 동시에 나타낼 수 있으므로, RSV 감염증의 효과적인 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 G core 단편에 대한 2 개의 단클론 항체 (5H6, 3A5)의 에피토프 매핑 및 친화도 측정한 결과를 나타내는 도면으로서, (A)는 RSV A2 균주 및 Gcf 서열의 G 표면 당 단백질의 1 차 구조를 나타내는 개략도이고, (B)는 RSV G 단백질 의 알려진 B-세포 에피토프 펩타이드(펩타이드 G/144-159, G/164-176, G/174-187, G/174-187)를

사용하여 ELISA를 사용하여 단클론 항체(5H6 및 3A5)의 에피토프 맵핑 및 친화성 측정을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 포유류 세포에서 발현되는 G 단백질에 대한 단일 클론 항체의 결합 특성을 나타내는 도면으로서, (A)는 96-웰 플레이트를 200 PFU의 정제 된 RSV A2 바이러스 입자로 코팅하였다. 5H6은 10㎍ / ㎖에서, 3A5는 500㎍ / ㎖에서 연속 희석되었다.

분석은 ELISA를 사용하여 수행되었다. (B)는 유동 세포 계측법을 사용하여 시험 관내 결합 분석결과이다. RSV 입자에 대한 5H6 또는 3A5의 결합은 히스토그램 및 평균 형광 강도 (MFI)에 의해 나타내었다. (C)는 분비 된 G 단백질과 Gcf는 각각 RSV A2와 rAd / 3XG에 감염된 HEp-2 세포로부터 제조되었다. 96- 웰 플레이트는 웰 당 상등액 5 ㎍으로 코팅되었다.

도 3은 시스테인 치환에 의한 Gcf 유도체에 대한 단일 클론 항체의 결합 특성을 나타낸다. (A)는 96- 웰 플레이트를 웰 당 50 ng의 Gcf 및 돌연변이 Gcf 유도체로 코팅하였다. 항체를 500 ㎍/ml에서 연속 희석하여 ELISA를 시행하였다. (B)는 Gcf 및 돌연변이 Gcf 유도체에 대한 웨스턴블랏 분석결과를 나타낸다.

도 4는 체외 중화 및 5H6 및 3A5의 생체 내 RSV 제거 활성을 나타낸다. (A)는 체외 플라크 감소 분석. Palivizumab, heparin, 5H6, 3A5를 200 ± 300 PFU의 RSV A2와 함께 37 ℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 이어, 혼합물을 1.5 시간 동안 HEp-2 세포에 첨가하고, 5 일 후에 플라크를 계수하였다. (B)는 마우스 모델에서 단클론 항체로 예방 치료효과를 나타낸다. BALB / c 마우스에게 각 단클론 항체 100 ㎍을 근육 내 주사하여 1 일 후 10-6 PFU의 RSV A2 (n = 4 마우스 / 군)를 비강 내로 투여하였다. 감염 후 4 일째, 폐 균질화물을 제조하고 폐 바이러스 역가를 플라크 분석법으로 측정하였다. 검출 한계는 폐 조직 1g 당 94 PFU였다. N.D., 감지되지 않았다.

도 5는 5H6 및 3A5에 의한 Gcf- 관련 주 화성 활성의 억제여부를 확인한 결과를 나타낸다. mAb에 의한 Gcf의 시험 관내 주 화성 활성의 억제를 THP-1 세포를 이용한 주 화성 검정법을 사용하여 분석하였다. 10 ㎍의 야생형 Gcf를 하부 챔버에 100 ㎍의 mAb와 함께 미리 배양하고, 5 × 10^5 개의 THP-1 세포를 나중에 상부 챔버에 첨가하였다. 무 혈청 배지 단독 또는 10 % FBS 배지를 각각 음성 대조군 또는 양성 대조군으로 사용하였다. 조립 된 판을 37 ℃에서 5 시간 동안 배양하였다. 막의 바닥에 부착 된 세포를 세고, 이동율을 계산하였다.

도 6은 BALB / c 마우스의 체중 변화에 대한 단클론 항체 5H6 및 3A5의 예방 적 투여 효과를 나타낸다. BALB / c 마우스를 RSV G 단백질 (vvG)을 발현하는 6 × 10^6 PFU의 재조합 백시 니아 바이러스로 희생시켰다. 4 주 후 각 쥐 300 μg을 마우스에 근육 내 주사하였다. 모든 그룹은 1 일 후 3 x 10^6 PFU의 RSV A2 (n = 4 마우스 / 그룹)를 비강 내로 투여 한 다음 매일 무게를 매겼다. *, p <0.05; **, p <0.01; ***, p <0.001, PBS 군에 비해 5H6 또는 3A5 처리 군에서 체중이 유의하게 증가 함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] **실시예 1: 실험방법**

[0060] **실시예 1-1: 항체**

[0061] Gcf에 대한 mAb를 생성하기 위해, 마우스에게 Gcf를 주사하였다. 이어, 비장에서 B 세포를 분리 한 후, 불후의 골수종 세포와 융합시켰다. Gcf에 대한 특이 적 항체를 생산하는 하이 브리 도마의 선별을 위해, 하이 브리 도마 배양 상등액을 사용하여 ELISA를 수행하였다. 끝으로, 친화성 측정에 기초하여, 분석을 위해 두 mAb 클론 (5H6 및 3A5)을 선택하고 정제하였다.

[0062] **실시예 1-2: 세포 및 바이러스**

[0063] HEp-2 세포 (ATCC, Manassas, VA)를 10 % 불활성화 된 FBS, 2 mM 글루타민, 20 mM HEPES, 비 필수 아미노산, 페니실린 및 스트렙토 마이신이 포함된 MEM(Life Technologies, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다.

[0064] RSV A2를 HEp-2 세포에서 증식시키고, RSV A2 역가를 표준 플라크 분석법으로 측정하였다.

[0065] **실시예 1-3: Gcf 단백질의 생산**

[0066] RSV G 단백질(RSV A2 strain) 의 아미노산 서열 131 내지 230번 부위(서열번호 1)에 해당하는 Gcf 단백질을 코딩하는 DNA 핵산 서열을 가장 사용빈도가 높은 코돈으로 대체시킨 333bp 길이의 뉴클레오티드를 합성하였다(Bioneer Corp., Daejeon, Korea).

[0067] 상기 뉴클레오티드를 주형으로 하고, 하기 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 증폭산물을 수득하였다. 이어, 상기 증폭산물을 제한효소인 EcoR I과 Hind III(New England Biolabs, Beverly, MA)로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단한 pET21d 벡터(Novagen, Madison, WI)에 삽입하여, 재조합 벡터 pET-21d(+)-RSV Gcf를 수득하였다.

[0068] 정방향 프라이머: 5'-GGG CCC GAATTC CCG TCA AGA CCA AAA ACA CAACA-3'(서열번호 6)

[0069] 역방향 프라이머: 5'-GGGCCC AAG CTT GGG CTT GGT GGT GGG TAC TTC-3'(서열번호 7)

[0070] 상기 pET-21d(+)-RSV Gcf를 대장균 BL21(DE3)(Novagen)에 도입하여 형질전환체를 제작하고, 상기 형질전환체를 배양한 후, 0.5M IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Takara, Shiga, Japan)를 가하여 RSV Gcf 단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 RSV Gcf 단백질은 Ni-NTA 친화크로마토그래피(affinity chromatography ;Peptron, Daejeon, Korea) 방법으로 정제하였다.

[0071] **실시예 1-4: ELISA 분석**

[0072] G 단백질 B 세포 에피토프에 상응하는 펩타이드를 에피토프 맵핑을 위해 합성하고, 말단에 바이오틴을 결합시켰다.

[0073] 그런 다음, 96웰 플레이트의 각 웰을 200 ng 스트렙토 아비딘으로 코팅하였다. 이어, PBST(PBS 중 0.05 % Tween 20)로 세척하고, 200 ng의 바이오틴이 결합된 펩타이드를 가하여, 펩타이드가 코팅된 플레이트를 제작하였다.

[0074] 한편, HEp-2 세포에 코팅 항원으로서의 배양 상등액을 MOI 0.01로 RSV A2를 감염 시키거나, 또는 48 시간 후에 Gcf를 발현시키는 재조합 아데노 바이러스(rAd/3XG)를 감염시킨 후, 배양하였다. 이어, 상기 배양된 배양상등액 5 ㎍을 96웰 플레이트의 각 웰에 코팅하였다.

[0075] 대장균에서 발현 된 항원에 대해, 96- 웰 플레이트를 50 ng의 Gcf 또는 그의 돌연변이체로 코팅하였다.

[0076] 항원 코팅 된 플레이트를 1 % 탈지유 함유 PBS로 블로킹 한 후, PBST 함유 1 % 탈지유 중 5H6 및 3A5의 2배 희석액을 첨가하였다.

[0077] HRP-접합 된 토끼 항-마우스 IgG(Abcam, Cambridge, UK)로 배양 한 후, 플레이트를 3,30,5,50-테트라 메틸 벤지딘 퍼옥시다아제 기질(KPL, Gaithersburg, MD)을 첨가하여 전개시킨 후, 반응을 종료시키고, Thermo ELISA 플레이트 판독기로 450 nm에서 분석하였다.

[0078] **실시예 1-5: 단클론 항체의 친화성분석**

[0079] 항체의 친화도 상수(Kaff)는 시그 모이 드 ELISA 곡선의 OD50을 이용하여 질량 작용의 법칙(Law of Mass Action)에 기초한 ELISA에 의해 측정하였다.

[0080] 이를 위하여, 각각의 항체 에피토프에 상응하는 200 ng 및 100 ng의 펩타이드로 96-웰 플레이트의 각 웰을 코팅하였다.

[0081] 상기 친화도 상수는 하기 식으로 산출하였다.

[0082] $[Ag'] = [Ag]/2$, $Kaff = 1/2(2[Ab']_t-[Ab]_t)$

[0083] 상기 식에서 $[Ab]_t$와 $[Ab']_t$는 각각 [Ag]와 [Ag']로 코팅된 플레이트의 OD50과 OD50'에서의 웰 내의 전체 항체 농도 (M)를 나타낸다.

[0084] **실시예 1-6: 시험관내 바이러스 결합분석**

[0085] 3×10^4 HEp-2 세포를 RSV A2 입자와 함께 4℃에서 30 분간 배양하였다. 항-CD16/32 항체를 처리한 후, 5H6 또는 3A5 mAb 1㎍을 첨가하고, 4 ℃에서 30 분간 반응시킨 후, PE conjugated rat antimouse IgG1로 염색하였다. 끝으로, 상기 세포를 DAPI 용액으로 처리하여 살아있는 세포를 구별하였다. 이때, 유세포 분석은 LSR Fortessa (BD Biosciences)에서 수행되었고, 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (Tree Star Inc.)를 사용하여 분석되었다.

[0086] **실시예 1-7: 웨스턴블럿 분석**

[0087] 야생형 Gcf 및 돌연변이 체 Gcf 에의 단클론 항체의 결합은 표준 웨스턴 블 랏팅에 의해 결정되었다. 5H6 결합의 경우, 100 ng의 단백질이 DTT의 유무에 관계없이 처리되었다. 3A5 결합의 경우 동일한 방법으로 3 ㎍의 단백질을 분리하였다. 겔을 PVDF 멤브레인 (Pall, Ann Arbor, MI, USA)으로 옮겼다. 블로킹 후, 5H6 및 3A5와 함께 RT에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 세척하고, HRP-토끼 항-마우스 IgG와 함께 반응시켰다.

[0088] **실시예 1-8: 플라크 분석**

[0089] 200±300 PFU의 RSV A2에 2㎍의 Palivizumab, 헤파린, 5H6 mAb 또는 3A5 mAb를 처리하고, 37 ℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 반응물을 HEp-2 세포에 가하고, 37 ℃에서 1.5 시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 반응액을 제거하고, HEp-2 세포에 1% 아가로스를 중첩시킨 후, 5 일 후에 플라크를 계수하였다.

[0090] **실시예 1-9: 동물실험**

[0091] 6 주령의 암컷 BALB/c 마우스에 각 단클론 항체 100 ㎍을 근육 주사하였다. 하루 후, 이소플루란으로 상기 마우스를 마취시키고, RSV A2를 비강 내 투여하였다.

[0092] 백신에 의한 부작용 치료를 확인하기 위하여, BALB/c 마우스에 RSV G 단백질(vvG)을 발현하는 6×10^6 PFU의 재조합 백시 니아 바이러스를 주사하였다. 4 주가 경과된 후, 300 ㎍의 5H6 mAb 또는 3A5 mAb를 마우스에 근육 주사하였다.

[0093] 1일이 경과된 후, 모든 마우스에 3×10^6 PFU의 RSV A2를 비강 내로 투여 한 다음, 체중의 변화를 측정하였다.

[0094] **실시예 1-10: RSV 역가측정**

[0095] RSV에 감염된 마우스로부터 폐조직을 적출하고, 70 ㎛ 셀 스트레이너를 통해 혈청이 함유되지 않은 MEM으로 관류시켰다. 이어, HEp-2 세포에 대한 표준 플라크 분석에 의해 폐 상등액의 RSV 역가를 측정하였다. 이때, 데이터는 폐 조직 1g 당 PFU로 표시하였고, RSV의 검출 한계는 폐 조직 1g 당 94 PFU로 설정하였다.

[0096] **실시예 1-11: 주화성 분석**

[0097] 주화성 분석은 8 ㎛ 공극 크기 (SPL)를 갖는 트랜스 웰 삽입 플레이트를 사용하여 수행되었다. 10 ㎍의 야생형 Gcf와 100 ㎍의 mAb (5H6 또는 3A5)를 4 ℃에서 30 분간 혼합 한 후, 혼합물을 인서트 플레이트의 하부 챔버에 넣었다. 음성 대조군으로서, 항체 (5H6 또는 3A5)를 함유하는 무 혈청 배지 또는 무 혈청 배지를 하부 챔버에 첨가하였다. 양성 대조군으로 10 ㎍의 야생형 Gcf를 함유 한 무 혈청 배지 또는 10 % FBS 배지를 하부 챔버에 첨가하였다. CX3CR1 수용체를 발현하는 5×10^5 THP-1 세포 (ATCC, Manassas, VA)를 플레이트의 상부 챔버에 첨가하였다. 조립 된 플레이트를 37 ℃에서 5 시간 배양하였다.

[0098] 하부 챔버로 이동 된 세포 수를 세고, 세포이동수준은 하기 식을 사용하여 산출하였다:

[0099] 100 × {[(이동 된 세포의 평균 수 / 현미경 관찰 영역의 면적) × 트랜스 웰 삽입 부의 면적] / 시드 된 세포의 수}.

[0100] **실시예 2: RSV의 G 단백질에 대한 단클론 항체의 제작 및 특성분석**

[0101] **실시예 2-1: RSV의 G 단백질에 대한 단클론 항체의 제작**

[0102] RSV의 정제된 재조합 G 단백질의 코어 단편(Gcf)을 이용하여, 공지된 방법에 따라, RSV의 G 단백질에 대한 단클론 항체를 제작하고, 상기 Gcf에 대하여 높은 친화성을 나타내는 두 종류의 단클론 항체인 5H6 및 3A5 mAb를 선발하였다.

[0103] 상기 선발된 각 mAb의 에피토프를 분석하기 위하여, Gcf의 단편 펩타이드(G/144-159, G/164-176, G/174-187 및 G/190-204)를 합성하고, 이들 합성된 펩타이드에 대한 상기 5H6 및 3A5 mAb의 결합 친화성을 ELISA 방법으로 분석하였다(도 1a).

[0104] 도 1a에서 보듯이, 5H6 mAb는 G/164-176에 대하여 가장 높은 결합 친화도를 나타내고, 3A5 mAb는 G/190-204에 대하여 가장 높은 결합 친화도를 나타냄을 확인하였다.

[0105] **실시예 2-2: RSV의 G 단백질에 대한 단클론 항체의 결합친화도 분석**

[0106] 상기 각 mAb와 펩타이드의 결합친화성 상수(Kaff)를 측정하기 위하여, G/164-176 또는 G/190-204를 100 또는

200 ng으로 처리하고, 이에 결합되는 각 mAb의 농도를 측정한 후, 하기 식에 대입하여, 각 mAb의하였다(도 1b).

[0107] $[Ag'] = [Ag]/2$, $Kaff = 1/2(2[Ab']_t-[Ab]_t)$

[0108] 상기 식에서 $[Ab]_t$와 $[Ab']_t$는 각각 [Ag]와 [Ag']로 코팅 된 플레이트의 OD50과 OD50'에서의 웰 내의 전체 항체 농도 (M)를 나타낸다.

[0109] 결과적으로, 5H6 mAb의 경우, 결합친화성 상수가 1.66×10^9로 산출되었고, 3A5의 경우, 5.6×10^7로 산출되었다.

[0110] 상기 결과로부터, 5H6 mAb는 3A5보다 30 배 더 높은 결합 친화도를 나타냄을 알 수 있었다.

[0111] **실시예 3: RSV에 대한 단클론 항체의 결합특성분석**

[0112] **실시예 3-1: ELISA 분석**

[0113] RSV에 대한 상기 각 mAb의 결합 친화도를 측정하기 위하여, 정제된 RSV A2 바이러스 입자에 대한 상기 각 mAb의 결합능력을 ELISA 방법으로 평가하였다(도 2a).

[0114] 도 2a에서 보듯이, RSV 입자에 결합하는 5H6의 농도는 0.8㎍/㎖이고, 3A5의 농도는 20㎍/㎖ 임을 확인하였다.

[0115] 따라서, RSV에 대하여 5H6이 3A5보다 25 배 높은 결합 친화도를 나타냄을 알 수 있었다.

[0116] **실시예 3-2: 유세포 분석**

[0117] 유세포 분석을 통해, RSV가 감염된 세포에 대한 상기 각 mAb의 결합특성을 분석하였다(도 2b).

[0118] 도 2b에서 보듯이, RSV가 감염된 세포에 5H6 또는 3A5 mAb를 처리한 경우에는 형광신호가 특이적으로 증가됨을 확인하였다.

[0119] 따라서, RSV가 감염된 세포에도 5H6 또는 3A5 mAb가 특이적으로 결합됨을 알 수 있었다.

[0120] **실시예 3-3: Gcf에 대한 결합력 분석**

[0121] RSV가 감염된 세포에서 발현된 Gcf에 대하여도, 상기 각 mAb가 결합되는지를 확인하고자하였다.

[0122] 대략적으로, RSV A2 또는 Gcf를 발현할 수 있는 재조합 아데노바이러스(rAd/3XG)를 사용하여 HEp-2 세포를 감염시키고, 상기 감염된 세포의 배양액을 시료로 하여, 상기 각 mAb가 결합되는지의 여부를 ELISA 방법으로 분석하였다(도 2c).

[0123] 도 2c에서 보듯이, 5H6이 3A5보다 현저히 높은 수준으로, RSV A2 또는 Gcf를 발현할 수 있는 재조합 아데노바이러스(rAd/3XG)에 감염된 HEp-2 세포에서 발현된 Gcf와 결합할 수 있음을 확인하였다.

[0124] **실시예 3-4: Gcf의 시스테인 잔기의 영향 분석**

[0125] 상기 도 1a에서 보듯이, Gcf의 에피토프 영역에는 4개의 시스테인 잔기(173, 176, 182 및 186)가 존재하는 바, 상기 시스테인 잔기가 상기 각 mAb의 결합에 영향을 미치는지 확인하였다.

[0126] 우선, 상기 4개의 시스테인 잔기(173, 176, 182 및 186)의 전체 또는 일부를 알라닌으로 치환시킨 변이체 펩타이드를 각각 제작하고, 이들 변이체 펩타이드에 대한 상기 각 mAb의 결합 친화성을 ELISA 방법으로 분석하였다(도 3a).

[0127] 도 3a에서 보듯이, 5H6 mAb의 경우, 야생형 펩타이드와 173 및 182번 시스테인이 치환된 변이체 펩타이드와 결합하였고, 3A5 mAb의 경우, 176 및 182번 시스테인이 치환된 변이체 펩타이드를 제외한 나머지 펩타이드와 모두 결합함을 확인하였다.

[0128] 상기와 동일한 변이체 펩타이드에 대한 상기 각 mAb의 결합활성을 웨스턴블럿 분석을 통해 검증하였다(도 3b).

[0129] 도 3b에서 보듯이, 5H6 mAb의 경우, 야생형 펩타이드를 제외한 어떠한 변이체 펩타이드와도 결합하지 않았으나, 3A5 mAb의 경우, 야생형 펩타이드 및 176 및 182번 시스테인이 치환된 변이체 펩타이드와는 약하게 결합하였으나, 나머지 변이체 펩타이드와는 강하게 결합됨을 확인하였다.

[0130] **실시예 4: 단클론 항체의 RSV 제거활성**

[0131] 이전 결과에서, 우리는 5H6 및 3A5 mAb가 RSV 입자 및 포유 동물 세포 발현 G 단백질에 결합함을 확인하였다.

[0132] 상기 mAb의 시험관내 바이러스 제거활성을 평가하기 위해, Palivizumab, 헤파린, 5H6 또는 3A5를 처리하여 배양된 HEp-2 세포에 RSV를 감염시키고, 상기 RSV의 수준을 측정하였다(도 4a). 이때, Palivizumab은 RSV를 제거한다고 알려져 있고, RSV의 G 단백질에는 헤파린 결합 도메인이 포함되어 있으므로, 헤파린 역시 RSV가 HEp-2 세포에 결합하는 것을 억제하는 제제로서 사용될 수 있다.

[0133] 도 4a에서 보듯이, 대조군인 Palivizumab를 처리한 경우, RSV 플라크의 수준을 약 99.7 % 감소시키고, 헤파린을 처리한 경우에는, RSV 플라크의 수준을 약 96 % 감소시킴을 확인하였다.

[0134] 이에 반하여, 5H6 및 3A5 mAb를 처리한 경우에는, RSV 플라크의 수준이 감소되지 않았다.

[0135] 이러한 결과는 5H6 및 3A5 mAb가 생체 외에서는 RSV에 영향을 미치지 않는 것으로 분석되었다.

[0136] 이에 따라, 상기 Palivizumab, 5H6 또는 3A5 mAb가 생체내의 폐에서 바이러스 제거활성을 나타내는지를 확인하였다.

[0137] 대략적으로, 상기 5H6 및 3A5 mAb를 BALB/c 마우스의 근육에 주사하고, 24시간이 경과된 후, RSV를 감염시켰으며, 4일 후에, 상기 마우스의 폐에서 RSV의 역가를 측정하였다(도 4b).

[0138] 도 4b에서 보듯이, 대조군인 Palivizumab를 처리한 경우, 마우스의 폐에서 RSV 플라크가 검출되지 않았고, 5H6 및 3A5 mAb를 처리한 마우스의 폐에서 RSV의 역가가 현저히 감소됨을 확인하였는데, 5H6 mAb를 투여한 경우, 약 93%가 감소되었고, 3A5 mAb를 투여한 경우, 약 90%가 감소됨을 확인하였다.

[0139] 따라서, 상기 5H6 및 3A5 mAb는 생체내에서 RSV 제거활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0140] **실시예 5: Gcf의 주화성에 대한 단클론 항체의 영향 분석**

[0141] 앞서 연구를 통해 Gcf가 주화성을 나타냄이 알려져 있으므로, 상기 Gcf의 주화성에 상기 각 mAb가 영향을 미치는지 확인하고자하였다(도 5).

[0142] 도 5에서 보듯이, THP-1 세포에 Gcf를 처리한 경우, 세포이동수준이 증가하였으나, 상기 Gcf와 5H6 또는 3A5 mAb를 함께 처리한 경우, 세포이동수준이 감소되었으며, 3A5 mAb 보다는 5H6 mAb를 처리한 경우, 세포이동성이 더욱 감소됨을 확인하였다.

[0143] 상기 결과로부터, 5H6 및 3A5 mAb가 G 단백질과 관련된 주화성을 억제할 수 있는 것으로 분석되었다.

[0144] **실시예 6: 백신투여관련 체중감소에 미치는 단클론 항체의 영향 분석**

[0145] 이전의 연구를 통해, RSV G 단백질(vvG)을 발현하는 재조합 백시 니아 바이러스를 백신으로 사용할 경우, 체중감소, 폐 호산구 증가 등의 백신 유래 부작용이 발생됨이 알려져 있다.

[0146] 이에 따라, 상기 각 mAb가 이러한 백신 유래 부작용을 억제할 수 있는지 확인하고자하였다.

[0147] 대략적으로, BALB/c 마우스를 vvG로 면역시키고, 4주가 경과된 후, 상기 각 mAb를 근육 내 투여 하고, 시간의 경과에 따른 체중변화를 비교하였다(도 6). 이때, 대조군으로는 Palivizumab을 투여한 마우스를 사용하였다.

[0148] 도 6에서 보듯이, 상기 각 mAb 중에서 3A5 mAb를 처리한 경우에는 5일 동안 약 8%의 체중이 감소되다가 6일째에 감소된 체중이 회복됨을 확인한 반면, 5H6 mAb를 처리한 경우에는 2일 동안 약 4%의 체중이 감소되다가 3일째에 감소된 체중이 회복됨을 확인하였다.

[0149] 즉, 3A5 mAb를 처리한 경우에 비하여, 5H6 mAb를 처리한 경우에는 RSV의 감염에 의한 마우스의 체중감소 수준이 억제될 뿐만 아니라, 감소된 체중이 신속하게 회복됨을 알 수 있었다.

[0150] 상기 5H6 mAb가 나타내는 RSV의 감염에 의한 체중감소를 억제하고 감소된 체중을 신속하게 회복시키는 효과는, 상기 5H6 mAb가 단순히 감염된 RSV를 제거하는 효과 뿐만 아니라, RSV의 감염에 의하여 손상된 생체시스템의 회복을 촉진시키는 효과도 함께 나타냄을 암시한다.

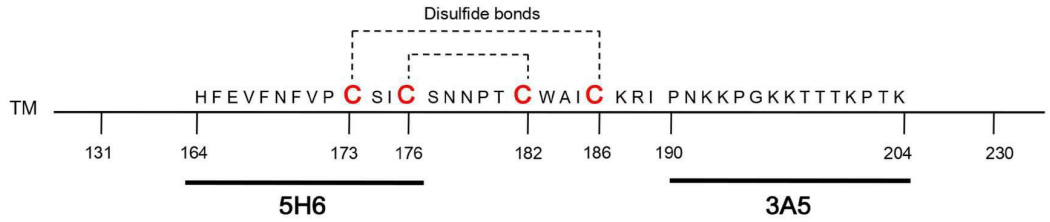
[0151] 종래의 RSV의 감염증 치료제제는 대체로 생체에 감염된 RSV 감염증을 치료하는 효과를 나타내기는 하였으나, 이처럼 RSV의 감염에 의하여 손상된 생체시스템의 회복을 촉진시키는 효과를 나타내는 경우는 지금까지 전혀 보고되지 않았다.

[0152] 따라서, 본 발명의 단클론 항체는 생체에 감염된 RSV를 제거하는 효과와 함께 RSV의 감염에 의하여 손상된 생체

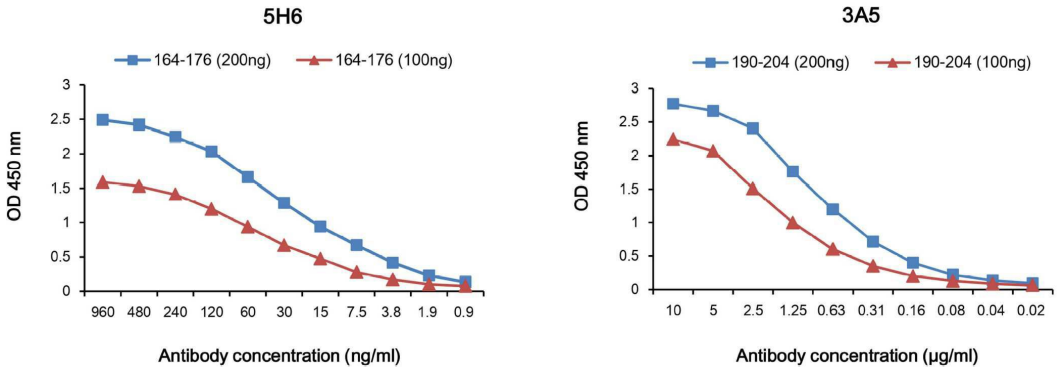
시스템을 회복시키는 효과를 나타낸다는 점에서 종래의 단클론 항체와는 전혀 구별되는 특징을 나타냄을 알 수 있었다.

도면

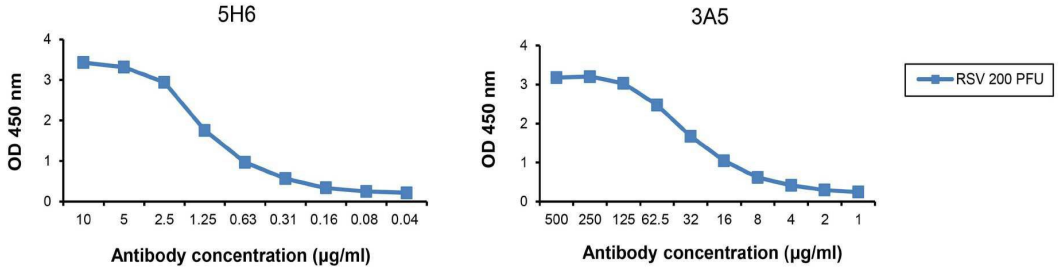
도면1a



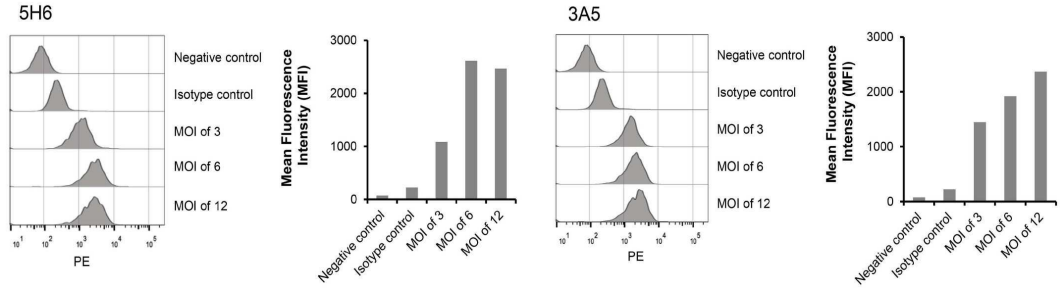
도면1b



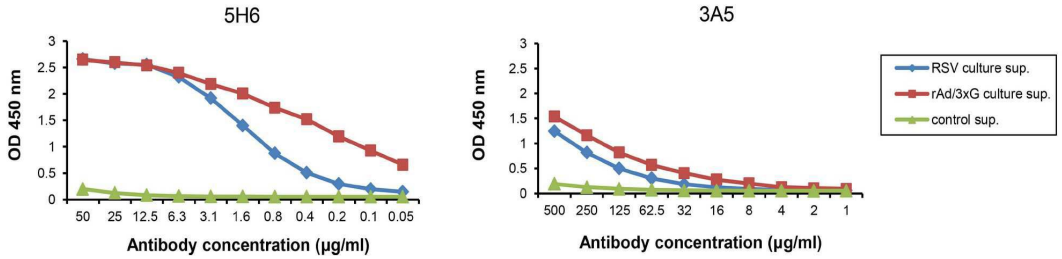
도면2a



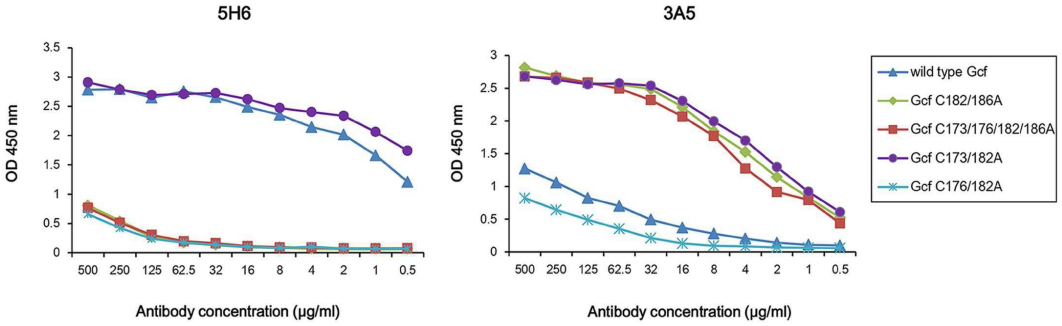
도면2b



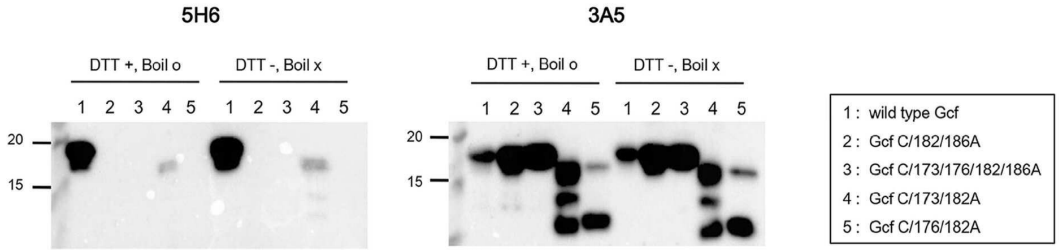
도면2c



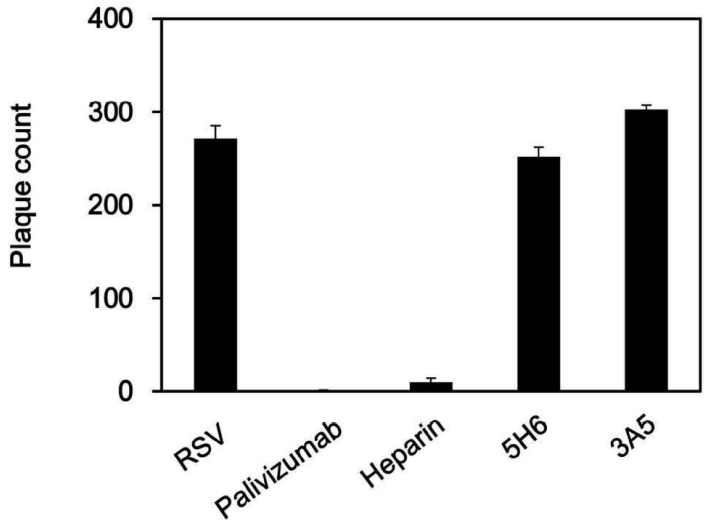
도면3a



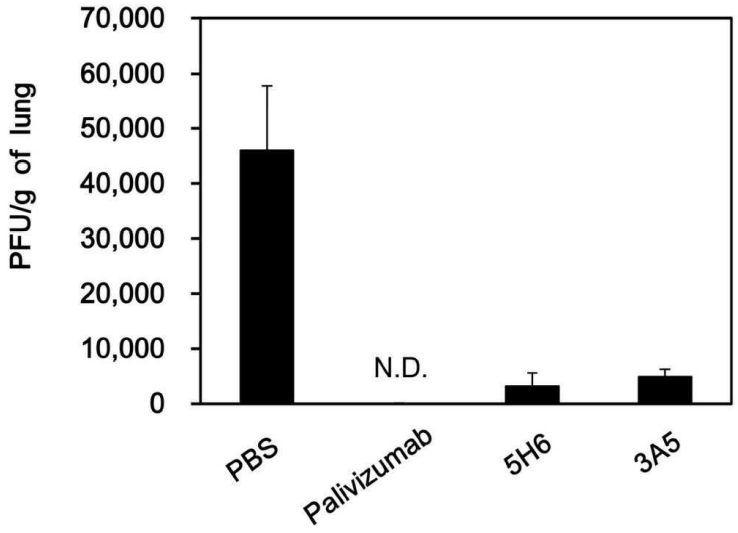
도면3b



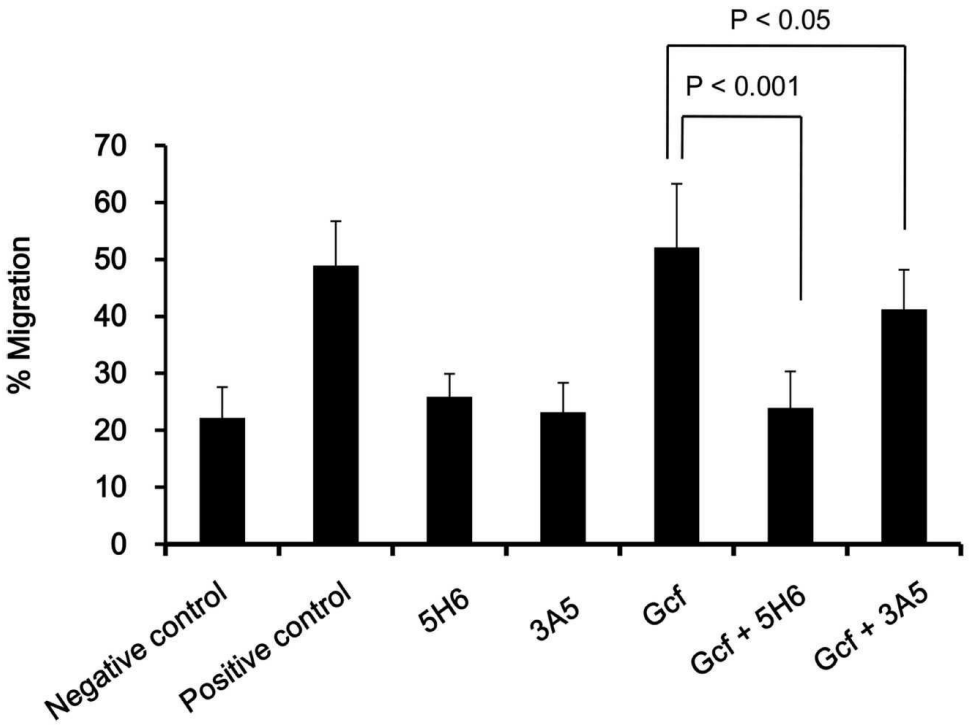
도면4a



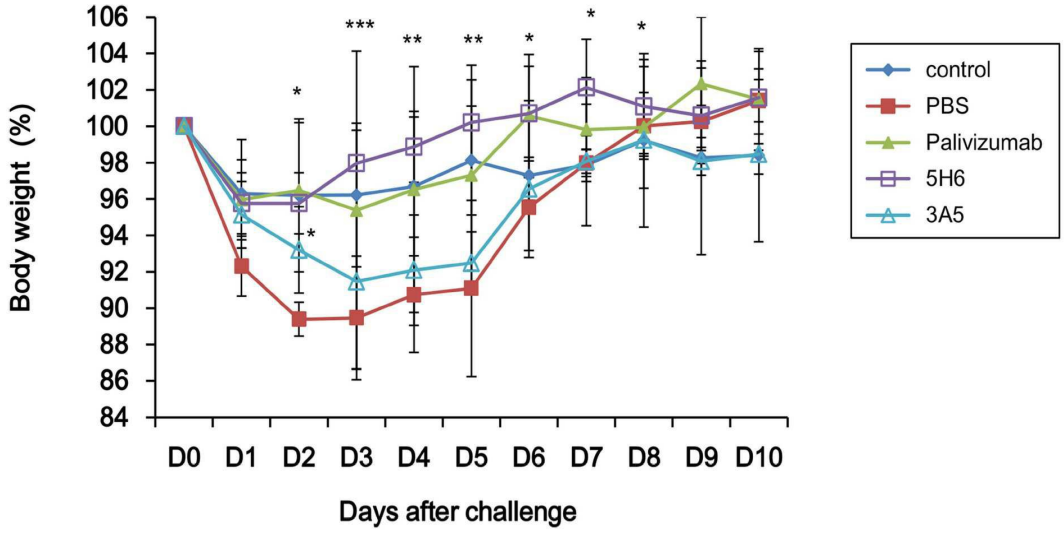
도면4b


70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
PFU/g of lung
N.D.
PBS
Palivizumab
5H6
3A5

도면5


P < 0.05
P < 0.001
70
60
50
40
30
20
10
0
% Migration
Negative control
Positive control
5H6
3A5
Gcf
Gcf + 5H6
Gcf + 3A5

도면6



서 열 목 록

<110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation

<120> Antibody which specifically recognize Respiratory syncytial virus, and use thereof

<130> KPA161681-KR

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G protein core fragment

<400> 1

Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro
1 5 10 15

Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn Asn Asp
20 25 30

Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn
35 40 45

Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu Lys Thr

65 70 75 80

Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu Val Pro

85 90 95

Thr Thr Lys Pro

100

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable region

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Phe Ile His Tyr Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Pro Ile Ser Asp Gly Tyr Tyr Gly Asn Ala Val Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region

<400> 3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg
100 105 110

<210> 4

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable region

<400> 4

gaggtccagc tgcaacaatc tgggcctgag ctggtgaggc ctggggaatc agtgaagatt 60

tcctgcaagg gttccggcta cacattcact gattatgcta tgcactgggt gaagcagagt 120

catgcaaaga gtctagagtg gattggagtt atttttattc actatgataa tacaaactac 180

aaccagaagt ttaagggcaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccag cacagcctat 240

ttggaacttg ccagattgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aagatcccct 300

cctatctctg atggttacta cgggaatgct gttgactact ggggtcaagg aacctcagtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 5

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region

<400> 5

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gaccattgta catagtgatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caagcgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ttcaaggttc acatgttccg 300

tggacgttcg gcggaggcac caaggtggaa atcaga 336

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gggcccgaat tcccgtcaag accaaaaaca caaca 35

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gggcccaagc ttgggcttgg tggtgggtac ttc 33