



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2019년03월22일  
 (11) 등록번호 10-1960968  
 (24) 등록일자 2019년03월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C07K 16/10 (2006.01) C12N 5/12 (2006.01)  
 G01N 33/569 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
 C07K 16/1009 (2013.01)  
 C12N 5/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0133574
- (22) 출원일자 2017년10월13일  
 심사청구일자 2017년10월13일
- (56) 선행기술조사문헌  
 JP2016132628 A\*  
 VIROLOGICA SINICA. 2011, 26(1):30-39.\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 주식회사 메디안디노스틱  
 강원도 춘천시 동내면 순환대로 878  
 대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)  
 경상북도 김천시 혁신8로 177 (울곡동)
- (72) 발명자  
 구복경  
 경상북도 김천시 농소면 월곡리 1296-306호  
 나진주  
 경상북도 김천시 혁신4로 72 천년나무 2단지  
 203-904  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이현지

**(54) 발명의 명칭** 구제역 바이러스 혈청형 A 탐지용 단일클론항체 및 이의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 구제역바이러스 7종의 혈청형 중 A형에 대한 특이 단일클론항체, 상기 단일클론항체를 포함하는 구제역 바이러스 A형 탐지용 조성물 및 상기 단일클론항체를 이용한 구제역 바이러스 A형 탐지용 키트에 관한 것으로, 보다 상세하게는 구제역바이러스 A형에만 특이적으로 결합하는 단클론항체의 특성을 활용하여 구제역 바이러스 A형 혈청형만을 감별할 수 있는 진단 키트를 개발함으로써 질병의 확산 방지를 위한 신속한 초기 예방 조치를 수행할 수 있다.

**대표도** - 도13

반복횟수	#1			#2			#3		
	음성	저양성	고양성	음성	저양성	고양성	음성	저양성	고양성
결과									
판정	-	+	+++	-	+	+++	-	+	+++

(52) CPC특허분류

**G01N 33/56983** (2013.01)

**C12N 2510/02** (2013.01)

**G01N 2333/09** (2013.01)

(72) 발명자

**유소윤**

경상북도 김천시 용전3로 10, 304동 103호(LH천년 나무 3단지)

**신문균**

충청남도 천안시 서북구 봉서산 1길 35 107동 201호(쌍용동, 파크밸리 동일하이빌)

**위성환**

경기도 군포시 오금로 34, 소월아파트 377동 1501호

**박경민**

강원도 춘천시 동면 소양강로 102 207동 504호 (장학리, 춘천장학엘에이치해운채아파트)

**박성진**

강원도 춘천시 윤교길6번길 32 (조양동)

**이혜영**

강원도 춘천시 행촌로 32번길 10-1번지 302호

**이은선**

강원도 춘천시 지석로 64 602동 1403호 (퇴계동, 주공6차아파트)

**민동숙**

강원도 춘천시 순환대로 876

**오진식**

경기도 수원시 영통구 봉영로 1526, 717동 1303호 (영통동, 살구골 동아아파트)

**정광면**

강원도 춘천시 영서로 2920 112동 203호 (사농동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M-1543082-2016-17-01

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림축산검역본부

연구사업명 농림축산검역검사기술개발

연구과제명 구제역 혈청형 (O, A, Asia1) 3중 감별 간이 항원진단키트 개발

기여율 1/1

주관기관 농림축산검역본부

연구기간 2016.01.01 ~ 2017.12.31

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

수탁번호 KCTC18576P 하이브리도마 세포 또는 수탁번호 KCTC18577P인 하이브리도마 세포에서 생산되는 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) 혈청형(serotype) A에 특이적으로 결합하는 단일클론항체.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 단일클론항체는 IgG1 타입인 것인, 단일클론항체.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 각각 표시되는 중쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 각각 표시되는 경쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

을 포함하는 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) 혈청형 A 탐지용 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 6**

서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11로 각각 표시되는 중쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 각각 표시되는 경쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

을 포함하는 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) 혈청형 A 탐지용 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 8**

서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열로 이루어지고, 상기 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 20의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것인 재조합 벡터.

**청구항 10**

서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주세포.

**청구항 11**

서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 32의 뉴클레오티드 서열로 이루어지고, 상기 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 28의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것인 재조합 벡터.

**청구항 13**

서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주세포.

**청구항 14**

구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) 혈청형(serotype) A에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 수탁번호 KCTC18576P 또는 KCTC18577P인 하이브리도마 세포.

**청구항 15**

콘주게이트 패드, 샘플패드, 멤브레인 및 흡수 패드를 포함하고,

상기 콘주게이트 패드는 생물학적 시료, FMDV 혈청형 A 에 특이적으로 결합하는 제1 단일클론항체 및 골드나노입자의 결합체(conjugate)를 포함하는 것이며,

상기 멤브레인은 FMDV 혈청형 A와 특이적으로 결합하는 제2 단일클론항체 및 대조군 항체에 결합하는 항체가 고정된 것이고,

상기 제1 단일클론항체는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 각각 표시되는 중쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 각각 표시되는 경쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;을 포함하는 것이고,

상기 제2 단일클론항체는 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11로 각각 표시되는 중쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 각각 표시되는 경쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;을 포함하는 것인,

FMDV 혈청형 A 탐지용 래피드 키트.

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

제15항에 있어서, 상기 제1 단일클론항체는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것이고,

상기 제2 단일클론항체는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것인, FMDV 혈청형 A 탐지용 래피드 키트.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 상기 제1 단일클론항체는 수탁번호 KCTC18577P인 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체이고,

상기 제2 단일클론항체는 수탁번호 KCTC 18576P인 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체인 것인, FMDV 혈청형 A 탐지용 래피드 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 구제역 바이러스 혈청형 A 탐지용 단일클론항체, 상기 단일클론항체를 이용한 구제역 바이러스 혈청형 A 탐지 방법 및 상기 단일클론항체를 이용한 구제역 바이러스 혈청형 A 탐지용 키트에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; 이하, FMDV)는 Picornaviridae, aphthovirus에 속하는 RNA 바이러스로서 전세계적으로 7종의 혈청형(O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2, SAT3)과 70여 종의 아형 바이러스가 분포하고 있다. FMDV에 감염된 개체(우제류 등)는 혀, 점막, 발굽 사이에 수포 및 가피를 형성하며 이병율이 높아 발생 시 OIE에 의무적으로 보고해야 하는 질병이며, 국내에서도 제 1종 법정 전염병으로 분류하고 있다.

[0003] 국내에서는 2000년 이후 9차례 구제역이 발생하여 막대한 경제적 피해(예를 들어, 2010년 안동에서 발생한 경우 직접적 피해규모 약 3조원 추정)가 초래되었으며, 가장 최근에는 2014년 12월부터 2015년 4월까지 7개 시도에서 약 185건, 2016년도 1월 내지 3월 사이 21건, 2017년 2월 9건의 의 구제역이 발생한 바 있다.

[0004] 현재 구제역 바이러스 항원을 진단하는 방법으로는 크게 유전자 검출 방법과 바이러스 단백질 항원을 검출하는 방법으로 나눌 수 있다. 유전자 검출방법으로는 리얼타임 RT-PCR 또는 일반적인 RT-PCR 등이 있으며, 단백질을 검출하는 방법으로는 항원 효소면역측정법(Antigen detecting Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Ag-ELISA), 래피드 키트(immunochromatographic assay) 등을 들 수 있다.

[0005] 리얼타임 RT-PCR의 경우, 구제역 바이러스 검출 민감도가 가장 높은 방법으로써, 감염의심 시료(혈액, 타액, 정액, 조직 등)를 실험실로 수송하여, 특수 차폐 실험실 내(생물안전 3등급 실험실)에서 시료로부터 총 RNA를 채취하여, 형광 검출 리얼타임 PCR 기기로 구제역 바이러스 특이 유전자 증폭을 수행하여, 구제역 양성 여부를 확인하는데 사용되나, RNA 추출부터 리얼타임 PCR을 작동하는 단계까지 상당한 숙련된 연구자가 요구되며, 특수 실험실 및 고가의 시약과 장비가 필요하다.

[0006] 항원 효소면역측정법의 경우, 구제역 양성을 판정함과 동시에 혈청형까지 분석할 수 있는 방법이나, 특수 차폐 실험실 내에서 인큐베이터(incubator), 플레이트 와셔(plate washer), 리더(reader) 등의 장비가 필요하며, 숙련된 연구자가 요구되며, 3시간 이상의 검사 시간이 소요된다.

[0007] 현장진단키트(immunochromatographic assay)의 경우, 니트로셀룰로오즈 막의 모세관력(capillary force)과 금 나노입자 등을 이용한 시그널링을 통해 구성된 진단시스템으로써, 별도의 장비나 숙련도 등이 필요 없으며, 구제역이 발생한 농장에서 이동하지 않고 바로 그 현장 내에서 시료 적용 후 10 내지 15분 이내에 결과 확인이 가능한 장점이 있다. 구제역 임상 축이 발생한 현장에서 채취된 수포시료를 적용하여 구제역 여부를 판단할 수 있는 구제역 공통 신속 진단키트는 기개발되어 발생 초기에 신속하게 진단할 수 있는 체계를 갖추고 있다.

[0008] 그러나 구제역 바이러스는 7종의 혈청형으로 뚜렷이 구분되어 혈청형 상호 방어가 되지 않는 특성이 있어, 질병의 확산 방지를 위한 신속한 초기 예방 조치를 위한 적절한 백신 선정을 위해서는, 현장에서 혈청형 분석까지 가능한 혈청형 감별 신속 진단키트 개발이 매우 시급한 실정이며, 특히 국내에서는 9번의 발생 중 2건의 FMDV A형 혈청형과 8건의 FMDV O형 혈청형이 발생되었으며, 2017년 발생에는 최초로 구제역 O형과 A형이 동시에 발생되어, 이러한 혈청형 A를 신속하게 감별할 수 있는 현장 진단 키트 개발이 방역 현장에서 우선적으로 필요한 상황이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 본 발명의 목적은 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; 이하, FMDV) 혈청형(serotype) A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 백터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 백터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 FMDV 혈청형 A 탐지용 래피드 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 FMDV 혈청형 A 탐지 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0015] 본 발명은 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) 혈청형(serotype) A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 그 용도에 관한 것이다.

[0016] 이하 본 발명을 더욱 자세하게 설명하고자 한다.

[0017] 본 발명의 일 예는 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) 혈청형(serotype) A에 특이적으로 결합하는 단일클론항체에 관한 것이다.

[0018] 구제역 바이러스는 피코르나바이러스과 아프타바이러스(Aphthovirus)속에 속하며, 여과성 병원체로서 처음 발견된 동물바이러스로서 소 등 우제류 동물에 감염된다. 바이러스의 입자는 직경이 22 내지 28nm이고, 외피(envelope)가 없이 4종류의 구성 단백질 60분자로 구성된 캡시드(Capsid) 단백질이 5' 말단에 VPg 단백질이 공유 결합된 외가닥의 (+)RNA를 둘러싸고 있다.

[0019] 구제역 바이러스는 7종의 혈청형인 O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2 및 SAT3으로 구성되며, 혈청형 간 상호 방어 면역이 형성되지 않는다. 다시 말해서, 감수성 동물에 구제역 바이러스 O형 혈청형에 대한 백신을 접종하여 적절한 방어 면역이 형성되었다하더라도 다른 구제역 바이러스 혈청형 A 바이러스가 침입하게 되면 방어되지 못하고 구제역이 발생하게 된다.

[0020] 구제역의 확산 방지를 위한 신속한 초기 예방 조치로서 적절한 백신 선정을 위해서는 현장에서 혈청형 분석까지 가능한 혈청형 감별 신속 진단키트 개발이 매우 시급한 실정이며, 특히 국내에서는 9번의 발생 중 2건의 FMDV A형 혈청형과 8건의 FMDV O형 혈청형이 발생되었으며, 2017년 발생 시에는 최초로 구제역 O형과 A형이 동시에 발생되어, 혈청형 A를 신속하게 감별할 수 있는 현장 진단 키트 개발이 방역 현장에서 우선적으로 필요한 상황이다.

[0021] 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘지며, 중쇄 불변 영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 및 엡실론( $\epsilon$ ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1( $\gamma$ 1), 감마2( $\gamma$ 2), 감마3( $\gamma$ 3), 감마4( $\gamma$ 4), 알파1( $\alpha$ 1) 및 알파2( $\alpha$ 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 타입을 가진다.

- [0022] 용어, "단일클론항체"는 상기 항체 분자가 단일 분자로 구성되도록 제조된 것을 의미한다. 단일클론항체는 동일한 에피토프를 갖는 항원에 대해서만 반응하는 특이성을 가지며, 또한 특정 에피토프에 대해서만 친화성을 나타낸다.
- [0023] 상기 단일클론항체는 수탁번호 KCTC18576P 또는 KCTC18577P인 하이브리도마 세포에서 생산되는 것일 수 있다.
- [0024] 상기 하이브리도마 세포는 당업계에서 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 구체적으로, 상기 하이브리도마 세포는 면역원인 FMDV 혈청형 A를 동물에 면역시키고, 상기 피면역 동물로부터 유래된 항체 생산세포인 B 세포를 골수종세포와 융합시켜서 하이브리도마를 제조한 다음, 그 중에서 구체적 바이러스 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 선택하는 방법으로 제조할 수 있다.
- [0025] 상기 피면역 동물은 실시예에서 사용된 마우스뿐만 아니라 염소, 양, 모르모트, 래트 또는 토끼와 같은 동물을 사용할 수 있다.
- [0026] 상기 피면역 동물을 면역시키는 방법으로는 당업계에 이미 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 마우스를 면역시키는 경우 1회에 1 내지 100 ug의 면역원을 동량의 생리 식염수 및/또는 프로인드 어주번트(Freund's adjuvant) 등의 항원 보조제로 유화시켜, 상기 피면역원 동물의 복부의 피하 또는 복강 내에 2 내지 5주마다 2 내지 6회 접종시키는 방법으로 수행될 수 있다.
- [0027] 피면역 동물을 면역시킨 후에는 최종 면역 3 내지 5일 후 비장 또는 림프절을 적출하여 당업계에서 이미 공지되어 있는 세포 융합법에 따라서, 융합 촉진제의 존재 하에 이들의 조직에 포함되어 있는 B 세포를 골수종세포와 융합시키게 된다. 상기 융합 촉진제는 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 물질을 사용할 수 있다.
- [0028] 상기 골수종세포는 예를 들어, P3U1, NS-1, P3x63. Ag 8.653, Sp2/0-Ag14와 같은 마우스 유래 세포, AG1, AG2와 같은 래트 유래 세포를 사용할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0029] 또한, 상기 당업계에 공지된 세포 융합법은 예를 들어, B세포와 골수종세포를 1:1 내지 10:1의 비율로 혼합시켜, 이에 분자량 1,000 내지 6,000의 PEG를 10 내지 80%의 농도로 첨가하여, 30 내지 37에서 1 내지 10분 동안 배양하는 방법으로 수행될 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마는, 예를 들어, 하이브리도마만이 생존 가능한 HAT 배지 등의 선택 배지에서 배양하고, 하이브리도마 배양 상층액 중의 항체 활성을 ELISA 등의 방법을 이용하여 측정하여 선택할 수 있다.
- [0031] 최종적으로, FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마는, 예를 들어, FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마에 대하여, 한계 희석 등의 방법에 의해 클로닝을 반복함으로써 선별될 수 있다.
- [0032] 한편, 상기 단일클론항체는 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgA, IgM 타입일 수 있으며, 예를 들어, IgG<sub>1</sub> 타입일 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 항체의 경쇄 불변 영역은  $\lambda$  또는  $\kappa$  형일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 일 예는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 중쇄 CDR(complementarity determining region) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0035] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 각각 표시되는 중쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 각각 표시되는 경쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;을 포함하는 것일 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 일 예는 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이

상의 중쇄 CDR(complementarity determining region) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

- [0038] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11로 각각 표시되는 중쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 각각 표시되는 경쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;을 포함하는 것일 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0040] 용어 “항체(antibody)”는 FMDV 혈청형 A에 대한 특이 항체로서, FMDV 혈청형 A에 대해 특이적으로 결합하며, 완전한 항체 형태뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다. 완전한 항체에 대한 설명은 상기 언급한 바와 같다.
- [0041] 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3 개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [0042] 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VL 및 불변 영역 도메인 CL을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [0043] 용어, “CDR(complementarity determining region)”은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다(CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다.
- [0044] 용어, "항원 결합 단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩티드의 일부를 의미한다. 예를 들어, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv 또는 scFv일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 상기 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)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. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0045] 상기 항체는 단일클론항체, 이특이적 항체, 비-인간 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 항체는 인간화 항체(humanized antibody) 또는 인간 항체(human antibody)일 수 있다. 비-인간, 예를 들어, 마우스의 인간화 항체는 마우스의 면역글로불린으로부터 유도되는 최소 서열을 포함하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린의쇄 또는 그의 단편, 예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 항체의 기타 항원-결합 서브서열일 수 있다.
- [0047] 비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간인 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 인간화는 필수적으로 설치류 동물의 CDR 또는 CDR 서

열을 인간 항체에 상응하는 서열 대신 치환시켜 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 인간화 항체는 키메릭 항체이며, 실질적으로 온전한 인간 항체의 가변 영역보다 적은 영역이 비-인간 종으로부터 상응하는 서열에 의해 치환될 수 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 골격(-framework, FR) 잔기가 설치류 동물의 항체에 있는 유사 부위로부터의 잔기로 대체된 인간화 항체일 수 있다.

- [0048] 상기 인간 항체는 중쇄 및 경쇄의 가변 및 불변영역의 서열이 인간으로부터 유래한 항체를 의미하며, 인간 항체는 파아지 디스플레이 라이브러리를 포함한 당업자에게 널리 알려진 다양한 기술, 예를 들어, 유전적 재조합 기술과 세포공학 기술을 이용하여 생성될 수 있다.
- [0049] 용어 "키메릭"은 항체 또는 항원-결합 부위가 2 개의 상이한 종으로부터 유래한 서열들을 포함하는 것을 의미한다.
- [0050] 상기 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, FMDV 혈청형 A에 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서 첨부한 서열번호에 기재된 아미노산 서열의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0051] 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산의 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예를 들어, 소수성, 친수성, 전하, 크기와 같은 특성에 기초하여 이루어진다. 예를 들어, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고, 알라닌, 글리신과 세린은 유사한 크기를 가지며, 페닐알라닌, 트립토판과 티로신은 유사한 모양을 갖는다. 따라서, 상기 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글리신과 세린; 및 페닐알라닌, 트립토판과 티로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0052] 한편, 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0053] 상기 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 상기 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0054] 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 서열번호의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 최소 70%의 상동성, 최소 80%의 상동성 또는 최소 90%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.
- [0055] 서열의 비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 통해, 인터넷 상에서 blastp, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램을 이용할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 일 예는 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0057] 일 양태로서 상기 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드인 것일 수 있다.
- [0058] 상기 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 20의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0059] 일 양태로서 상기 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드인 것일 수 있다.
- [0060] 상기 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0061] 또 다른 일 양태로서 상기 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드인 것일 수 있다.

- [0062] 상기 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 28의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0063] 또 다른 일 양태로서 상기 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드인 것일 수 있다.
- [0064] 상기 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 32의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0065] 용어 “폴리뉴클레오티드(polynucleotide)”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.
- [0066] 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다.
- [0067] 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함하며, 이는 당업계에 공지된 엄격 조건(stringent conditions) 하에서, 예를 들어, 상기 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) 혈청형(serotype) A에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 서열과 혼성화될 수 있는 서열을 의미한다.
- [0068] 또한, 상기 중쇄 가변영역 및/또는 경쇄 가변영역의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [0069] 상기 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다.
- [0070] 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 95%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 목적은 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.
- [0072] 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 8의 아미노산서열로 이루어진 경쇄 가변영역인 것일 수 있으며, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역인 것일 수 있다.
- [0073] 상기 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열로 이루어지고, 상기 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 20의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0074] 또한, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 16의 아미노산서열로 이루어진 경쇄 가변영역인 것일 수 있으며, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역인 것일 수 있다.
- [0075] 상기 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 32의 뉴클레오티드 서열로 이루어지고, 상기 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 28의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0076] 용어 "벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, CoIE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λgt4λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0077] 상기 재조합 벡터에서 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 용어 "작동적으로 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 따라서, 이에 의해

상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.

- [0078] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0079] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pL $\lambda$  프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0080] 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0081] 한편, 상기 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 발현할 수 있는 벡터는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역이 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환 (co-transformation) 및 표적 형질전환 (targeted transformation)을 통하여 숙주 세포로 도입될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 또 다른 일 예는 FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포에 관한 것이다.
- [0083] 상기 숙주세포는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다.
- [0084] 즉, 상기 숙주세포는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포의 게놈 상에 포함하거나, 또는 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 포함된 재조합 벡터를 포함하는 것이다.
- [0085] 상기 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 20의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0086] 상기 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0087] 또한, 상기 숙주세포는 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다.
- [0088] 즉, 상기 숙주세포는 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포의 게놈 상에 포함하거나, 또는 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 포함된 재조합 벡터를 포함하는 것이다.
- [0089] 상기 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 28의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0090] 상기 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 32의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0091] 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균

과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주 등이 이용될 수 있다.

- [0092] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl<sub>2</sub> 방법 또는 전기천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0093] *E. coli* 등의 미생물을 이용하는 경우 생산성은 동물세포 등에 비하여 높은 편이나 당화(glycosylation) 문제로 인해 인такт(intact)한 Ig 형태의 항체 생산에는 적당하지 않지만, Fab 및 Fv와 같은 항원 결합 단편의 생산에는 사용될 수 있다.
- [0094] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 또 다른 일 예는 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) 혈청형(serotype) 0에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포에 관한 것이다.
- [0096] 상기 하이브리도마 세포는 수탁번호 KCTC18576P 또는 KCTC18577P인 것인 하이브리도마 세포일 수 있다.
- [0097] 상기 하이브리도마 세포는 한국생명공학연구원 KCTC(Korean Collection for Type Cultures)에 2017년 05월 24일자로 수탁번호 KCTC18576P와 KCTC18577P로 기탁하였다.
- [0098] 한편, 기탁된 하이브리도마 세포는 미생물 기탁에 대한 부다페스트 조약의 규정에 따라 보관되고 상기 수탁 번호를 참조하여 일반인들에게 분양이 가능하다. 즉, 기탁물들은 기탁 시료 관리를 위한 가장 최근의 요청 이후 적어도 5년의 기간 동안, 어떤 경우에는 기탁일 이후 적어도 30년의 기간 동안 또는 그 기탁물의 개시를 공표하는 어느 특허의 강제 가능한 시기 동안, 그 기탁물의 생존을 유지하고 오염되지 않도록 모든 주의를 다하여 보관한다.
- [0099] 기탁자에게는 기탁물의 상태 때문에 요청 시 수탁기관이 시료를 분양할 수 없을 경우에는 그 기탁물을 대체해야 하는 의무가 있다. 대상이 되는 기탁물에 대한 일반인의 입수 가능성을 제한하는 모든 제약들은 그 기탁물을 개시하고 있는 특허가 허여되면 완전히 없어지게 된다.
- [0100] 상기 하이브리도마 세포의 제조 방법은 상기한 바와 같다.
- [0101] 본 발명의 또 다른 일 예는 콘주게이트 패드, 샘플패드, 멤브레인 및 흡수 패드를 포함하는 FMDV 혈청형 A 탐지용 래피드 키트에 관한 것이다.
- [0102] 상기 콘주게이트 패드는 생물학적 시료, FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 제1 단일클론항체 및 골드나노입자의 결합체(conjugate)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0103] 상기 제1 단일클론항체는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 각각 표시되는 중쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 각각 표시되는 경쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;을 포함하는 것일 수 있다.
- [0104] 또한, 상기 제1 단일클론항체는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [0105] 또한, 상기 제1 단일클론항체는 수탁번호 KCTC18577P인 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체인 것일 수 있다.
- [0106] 상기 멤브레인은 FMDV 혈청형 A과 특이적으로 결합하는 제2 단일클론항체 및 상기 대조군 항체에 결합하는 항체가 고정된 것일 수 있다.
- [0107] 상기 제2 단일클론항체는 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11로 각각 표시되는 중쇄 CDR1(complementarity

determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 각각 표시되는 경쇄 CDR1(complementarity determining region 1), CDR2(complementarity determining region 2) 및 CDR3(complementarity determining region 3) 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;을 포함하는 것일 수 있다.

- [0108] 또한, 상기 제2 단일클론항체는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [0109] 또한, 상기 제2 단일클론항체는 수탁번호 KCTC 18576P인 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론항체인 것일 수 있다.
- [0110] 본 발명에서 구제역 바이러스 항원 진단에 사용하고 있는 면역크로마토그래피법은 일반적으로 항원-항체 반응을 이용하여 임신진단 또는 간염발병 등과 같은 각종 질병의 검사를 가능하게 하는 진단법으로서 모세관 현상이 작용하는 다공성 박막을 고상(solid phase)으로 하고 금 콜로이드 또는 착색 폴리스티렌 나노 입자 등의 유색입자를 측정 라벨로 사용하는 신속 현장진단용 면역검사법의 일종이다.
- [0111] 본 발명의 키트는 FMDV 혈청형 A에 고 친화도를 가지면서 반응하는 단클론 항체를 이용하여 구제역바이러스에 감염된 동물 개체에서 유래한 다양한 시료에서 FMDV 혈청형 A의 감염을 특이적으로 진단할 수 있게 한다.
- [0112] 본 발명의 또 다른 일 예는 구제역 바이러스(Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) 혈청형(serotype) A의 탐지 방법에 관한 것이다.

**발명의 효과**

- [0113] 본 발명은 구제역 바이러스 탐지용 단일클론항체, 상기 단일클론항체를 포함하는 구제역 바이러스 탐지용 조성물 및 상기 단일클론항체를 이용한 구제역 바이러스 탐지용 키트에 관한 것이다. 구제역 바이러스는 7종의 혈청형으로 뚜렷이 구분되어 상호 방어가 되지 않는 특성이 있어 구제역 양성 판정 후 추가적인 혈청형 진단 과정이 필요하다. 본 발명을 통해 개발된 FMDV A 특이 단일클론항체를 이용하여 구제역 혈청형 A를 조기에 신속하게 감별할 수 있는 현장 진단 키트를 개발하였으며, 이를 통해 적합한 구제역 백신선정 등 구제역 확산 방지를 위한 보다 신속한 초기 예방 조치 수행이 가능해질 것으로 판단된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0114] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 간접효소면역측정법의 원리를 보여주는 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 FMDV A 형에 특이적인 단클론항체 3종에 대한 pairing test를 통한 FMDV O형, A형, Asia1형에 대한 반응성 평가 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 단일클론항체 매칭 테스트(matching test)의 반응원리를 보여주는 모식도이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 스트립을 보여주는 그림이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 FMDV A 포천주( $5.43 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml) 검체에서의 양성 민감도 및 검출한계 측정 비교 결과를 보여주는 사진이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 FMDV A 말레이시아주( $2.00 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml) 검체에서의 양성 민감도 및 검출한계 측정 비교 결과를 보여주는 사진이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 FMDV A 이라크주( $2.67 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml) 검체에서의 양성 민감도 및 검출한계 측정 비교 결과를 보여주는 사진이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 FMDV A Zabaykalsky주( $2.00 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml) 검체에서의 양성 민감도 및 검출한계 측정 비교 결과를 보여주는 사진이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 FMDV A 혈청형 외에 다른 FMDV 혈청형과의 교차반응을 확인하기 위해 혈청

형 0 바이러스를 이용한 교차반응성 평가 결과를 보여주는 사진이다.

도 10는 본 발명의 일 실시예에 따라 FMDV A 혈청형 외에 다른 FMDV 혈청형과의 교차반응을 확인하기 위해 혈청형 0 바이러스를 이용한 교차반응성 평가 결과를 보여주는 사진이다.

도 11는 본 발명의 일 실시예에 따라 FMDV A 혈청형 외에 다른 FMDV 혈청형과의 교차반응을 확인하기 위해 혈청형 Asia1 바이러스를 이용한 교차반응성 평가 결과를 보여주는 사진이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 FMDV A 혈청형 외에 다른 FMDV 혈청형과의 교차반응을 확인하기 위해 혈청형 C, SAT1, SAT2 및 SAT3 바이러스를 이용한 교차반응성 평가 결과를 보여주는 사진이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 래피드 테스트(Rapid test)의 재현성을 확인하기 위해 재조합 항원(FMDV A 재조합 P1 단백질)을 희석하여 만든 양성 검체 2종(중, 고역가)과 음성 검체 1종으로 3개의 스트립으로 재현성 시험한 결과를 보여주는 사진이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0115] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0117] **실시예 1. 항체 선정**

[0118] FMDV 혈청형 A에 특이적으로 반응하는 단클론항체를 선별하기 위하여 (효소면역측정법(ELISA, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)을 사용하였다.

[0119] 구체적으로, 목적으로 하는 불활화 FMDV A (IRAQ strain)와 교차반응성을 확인하기 위해 불활화 FMDV O(Manisa strain), 불활화 FMDV Asia1(Shamir strain)을 각각 96웰 마이크로플레이트의 한 웰당 각각 100 ul(0.5 ug/ml)씩 가하여 플레이트 표면에 부착시키고, 반응하지 않은 항원은 세척하여 제거하였다.

[0120] 그 다음, 0.1% casein-PBS blocking 용액을 웰 당 100ul씩 분주한 후 37에서 2 시간 동안 반응 후 인산 완충용액-트윈20(0.05% tween-20 (v/v)이 포함되어있는 인산완충용액, pH 7.4)(이하 PBS-T)로 3회 세척하였다.

[0121] 그 다음, 하이브리도마 세포의 배양액을 각 웰에 100 ul씩을 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후, PBS-T 용액으로 3회 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거하였다. 여기에 염소 항-마우스 IgG-호스레디쉬 퍼옥시다제 (Goat anti-mouse IgG-HRP)를 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음, PBS-T로 3회 세척하였다. 세척한 후 퍼옥시다제의 기질용액(TMB)을 가하여 반응시키고, 황산 0.5 M를 플레이트 각 웰에 50 ul씩 분주한 뒤 Sunrise ELISA reader(Tecan)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 항원에 대한 반응성 및 교차반응성을 측정하여, 그 결과를 표 1 및 2에 나타내었다.

[0122] FMDV A형을 특이적으로 진단하기 위한 목적으로 Capture 및 Conjugate 항체를 선별하기 위해 FMDV A 특이 고역가 단클론항체 7종을 이용하여 총 49(7x7)가지의 capture-conjugate 항체 pair strip을 평가하여, 그 결과 일부를 도 2에 나타내었다.

**표 1**

[0123]

Clone names (14 clones)	ELISA screening plate (O.D)		Isotype	Immunogen
	FMDV A Coated conc.(0.5ug/ml)			
8H6	1.83		IgG1	FMDV A22 IRAQ (inactivated)
3H28	2.57		IgG1	
12B2	2.64		IgG1	
12B10	2.58		IgG1	
1H77	2.28		IgG1	
1H69	2.28		IgG1	
2H31	1.57		IgG3 and M	
9G42	2.65		IgG2a	
9G57	2.66		IgG2a	

12H15	1.00	IgG3	FMDV A22 IRAQ (antigen bank)
6E82	2.49	IgG1	
6E96	2.31	IgG1	
1A70	1.66	IgG1	
10C13	2.38	IgG2a	

**표 2**

Immunogen	Clones	ELISA Screening plate (coated conc. 0.5ug/ml) (O.D)		
		FMDV A	FMDV O	FMDV Asial
FMDV A IRAQ (inactivated)	8H6	1.83	0.10	0.10
	3H28	2.57	0.15	0.27
	12B2	2.64	0.09	0.13
	12B10	2.58	0.08	0.22
	1H77	2.28	0.19	1.11
	1H69	2.28	0.22	0.79
	2H31	1.57	0.43	0.61
	9G42	2.65	2.88	2.75
FMDV A22 IRAQ (antigen bank)	9G57	2.66	2.99	2.72
	12H15	1.00	0.06	0.15
	6E82	2.49	0.08	0.11
	6E96	2.31	0.08	0.08
	1A70	1.66	0.12	1.39
	10C13	2.38	1.01	2.87

[0125]

[0127]

[0128]

[0129]

[0131]

[0132]

[0133]

[0135]

[0136]

표 1 및 표 2에서 확인할 수 있듯이, 총 14 종의 단클론항체 반응성을 분석한 결과 8H6, 2H31 12H15 와 1A70은 O.D 1.0 수준을 나타냈으며, 그 외 나머지 단클론항체들은 모두 높은 반응성을 나타냈다(표1). 8H6, 3H28, 12B2, 12B10, 12H15, 6E82, 6E96 단클론항체 7종은 FMDV A에 특이적으로 인지하는 단클론항체로 확인되었다.

표 2에서 확인할 수 있듯이, Serotype 0, Asial에는 반응을 하지 않고 Serotype A형에 특이적으로 반응하는 특이성이 인정되는 클론 8H6, 3H28, 12B2, 12B10, 12H15, 6E82 및 6E96 클론 7개 클론을 얻을 수 있었다.

표 2 및 도 2에서 확인할 수 있듯이, 1차 선별된 capture-conjugate 항체 pair중에서 FMDV A 포천주에는 반응성이 높으면서 FMDV O manisa 및 FMDV Asia 1 배양액에는 반응성이 없는 FMDV A specific capture-conjugate 항체 pair 3종을 선정하였으며 이중 capture 항체로써 6E82, conjugate 항체로써 3H28을 사용할 경우 가장 높은 민감도를 나타내는 것으로 확인되었다.

**실시예 2. 하이브리도마의 제작 및 단일클론항체 생산**

**2-1. 면역원 준비**

FMDV 혈청형 A에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 제작하기 위해, FMDV A (IRAQ)을 BHK21 세포에 접종 후 37도에서 24시간 배양을 통해 증폭된 FMDV A 를 수거하였다. 그 다음, 바이너리 에틸렌이민(Binary Ethylenimine; BEI)을 0.003N 농도로 처리한 후 37도에서 24시간 동안 진탕배양하여 불활화 후, 티오황산나트륨(sodium thiosulfate) 0.002N을 첨가하여 중화시킨다. 불활화 배양 상층액에 PEG6000(Poly Ethylene Glycol; PEG)과 염화나트륨(sodium chloride; NaCl)을 각각 7.5%, 2.3% 첨가하고 24시간 동안 4도에서 stirring incubation한다. PEG6000 처리 상층액은 11,000RPM에서 20분간 원심 분리한 후 pellet을 TN buffer(pH 7.6)로 다시 풀어준다. 11,000RPM에서 20분간 다시 원심 분리하여 상층액을 설탕 밀도 기울기 원심 분리법(sucrose density gradient centrifugation)으로 초원심 분리(30,000rpm, 4시간)하여 순도 높은 FMDV A 분획을 수득하였다.

**2-2. 면역화**

2-1에서 수득한 불활화된 FMDV A를 이용하여 실험동물에 면역(immunization)을 실시하였다. 구체적으로, 항원으로 불활화 FMDV A(IRAQ strain)을 0.25 mg/ml 농도로 준비하고, 재조합단백질 200ul와 Freund's Adjuvant(FA) 200ul를 혼합하여 Balb/C 마우스(♀오리엔트바이오) 복강에 2주 간격으로 1-3차 면역을 실시하였다. 퓨전 면역 검사를 위해 3차 면역 1주 후, 마우스 혈청을 이용하여 간접(indirect) ELISA 검사를

실시하였다. 최종 부스팅을 위해 제조합단백질 100ul를 복강으로 면역하고 4일 후 세포융합에 사용하였다.

[0138] **2-3. 세포융합 및 하이브리도마 제조**

[0139] 면역화된 마우스 몸통 좌측에 위치한 비장(spleen)을 적출하여 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에 부유시켰다. 적출한 비장을 메쉬로 갈아서 세포를 분리하고, 배양배지 DMEM과 혼합하여 비장세포 현탁액을 제조하였다. 그 다음, 상기 현탁액을 1,200rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 비장세포와 골수세포주(SP2/0 Ag14 (ATCC, USA))를 1:5의 세포 수 비율로 혼합한 후, 1,200rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 세포를 침전시켜 상층액은 제거하였다. 원심 분리된 세포를 천천히 분산시킨 후 폴리에틸렌 글리콜 1500(PEG1500, Roche) 1.0 ml을 처리하고, 37에서 1분 동안 유지시킨 후 DMEM 1ml을 첨가하였다. 그 다음, DMEM 10 ml을 1분 동안 서서히 첨가하고, 37의 물에서 5분 동안 반응시킨 후 50.0 ml로 맞추고, 1,200rpm에서 5분 동안 원심 분리하였다. 세포침전물을 분리배지(HAT배지)에  $1 \times 10^5$  내지  $2 \times 10^5$  cells/ml 농도로 재현탁시키고, 96웰 플레이트에 0.1 ml씩 분주한 후 37 이산화탄소 배양기에서 배양하여 하이브리도마 세포를 제조하였다.

[0141] **2- 4. 하이브리도마 세포의 선별**

[0142] 상기 제조한 하이브리도마 세포군 중에서 FMDV A에 특이적으로 반응하는 하이브리도마 세포를 선별하기 위하여 ELISA 분석 방법을 사용하였다.

[0143] 구체적으로, 목적으로 하는 불활화 FMDV(IRAQ strain)을 96웰 마이크로플레이트의 한 웰당 각각 100 ul(0.5 ug/ml)씩 가하여 플레이트 표면에 부착시키고, 반응하지 않은 항원은 세척하여 제거하였다. 그 다음, 0.1% casein-PBS blocking 용액을 웰 당 100ul씩 분주한 후 37에서 2 시간 동안 반응 후 인산 완충용액-트윈 20(0.05% tween-20 (v/v)이 포함되어있는 인산완충용액, pH 7.4)(이하 PBS-T)로 3회 세척하였다.

[0144] 그 다음, 하이브리도마 세포의 배양액을 각 웰에 100 ul씩을 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후, PBS-T 용액으로 3회 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거하였다. 여기에 염소 항-마우스 IgG-호스레디쉬 퍼옥시다제 (Goat anti-mouse IgG-HRP)를 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음, PBS-T로 3회 세척하였다. 세척한 후 퍼옥시다제의 기질용액(TMB)을 가하여 반응시키고, 황산 0.5 M를 플레이트 각 웰에 50 ul씩 분주한 뒤 Sunrise ELISA reader(Tecan)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 목적으로 하는 항원에 반응성이 높은 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주들을 선별하였다 (도 2).

[0145] 선별된 하이브리도마 세포주들을 제한 희석하여 클로닝을 진행하여 단일클론화 하였고, 이후 위와 같은 방법으로 목적으로 하는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주를 선별하였다. 위와 같은 방법으로 불활화 FMDV A에 반응하는 14가지 단일클론항체가 선별되었다(표 1).

[0147] **2-5. 복수제작 및 정제**

[0148] FMDV 혈청형 A에 특이적으로 반응하는 7종 하이브리도마(표 2)를 이용하여 생산된 복수(ascitic fluids)를 0.45um filter 후 protein G column(GE, Sweden)에 바인딩 시켰으며, elution buffer(100mM glycine HCl, pH 2.8)를 이용하여 단일클론항체 만 elution 한 후 dialysis(MWCO 12,000~14,000)를 통해 PBS(pH 7.0)로 버퍼 교환 하였으며, 10% SDS-PAGE를 통해 순도를 확인 하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0149] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 중쇄(약 50kDa)와 경쇄(약 25kDa)가 주로 염색되어 높은 순도로 정제되었음을 확인 하였다.

[0151] **실시에 3. 단일클론항체 매칭 실험**

[0152] **3-1. 니트로셀룰로오스 막에 단일클론항체 부동화(immobilization)**

[0153] 총 7종의 정제된 단일클론항체를 각각 니트로셀룰로스 막(Millipore, 독일)에 2mg/ml의 농도로 분주(1ul/cm, test line)하고, 염소 항-마우스 IgG(goat anti-mouse IgG, Arista biological, USA)를 2mg/ml의 농도로 분주(1ul/cm, control line) 후 제습환경(습도 20% 이하)에서 밤새 부동화 하였다.

[0155] **3-2. 금 나노입자-단일클론항체 접합체**

[0156] 또한 상기 7종의 정제된 단일클론항체를 각각 약 40nm의 콜로이드성 금(colloidal gold, 525nm, O.D 1.0, ㈜메디안디노스틱)에 단일클론항체 7ug/ml의 농도로 커플링 하였으며, BSA(Bovine Serum Albumin) 으로 블로킹하여, 단일클론항체가 축합되어있는 금 접합체를 제작하였다(O.D 7.0, 13ul 소요 / test strip).

[0158] **3-3. 검체 희석버퍼 (specimen dilution buffer)**

[0159] 검역본부에서 준비된 FMDV 배양액을 희석하기 위한 검체 희석버퍼는 0.4% tween-20, 50mM sodium tetraborate 12H<sub>2</sub>O, pH 9.0으로 제작하였다.

[0160]

[0161] **3-4. 단일클론항체 매칭 테스트(matching test)**

[0162] capture 단일클론항체와 conjugate 단일클론항체가 FMDV 와 함께 sandwich 항원-항체 복합체를 형성할 경우 conjugate 단일클론항체와 축합되어있는 금 나노입자에 의해서 붉은색 시험선이 형성되며, capture항체 또는 conjugate 항체 중 FMDV와 반응하지 않을 경우 검사선이 형성되지 않는다.

[0163] 구체적으로, FMDV 배양액 30ul를 각각의 단일클론항체 금 접합체가 포함된 검체 희석버퍼 30ul와 혼합 후 각각의 단일클론항체가 분주되어있는 스트립에 5분 간 반응시킨 후 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0164] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 배양액 내에 FMDV와 반응이 있을 경우 capture mAb - FMDV - 금 접합체 mAb의 sandwich antigen-antibody 복합체가 형성되어 붉은색 검사선 이 형성되고, capture mAb 또는 금 접합체 mAb 중 어느 한 종이라도 배양액 내 FMDV와 반응성이 없을 경우 검사선 에서 항원-항체 복합체가 형성되지 않기 때문에 붉은색 검사선이 형성되지 않음을 확인하였다.

[0166] **실시예 4. 면역크로마토그래피(Immunochromatographic) 스트립 제작**

[0167] 상기 항체 matching test를 통해 최종 선발된 6E82(capture용), 3H28(conjugate용) 클론을 이용하여 FMDV 혈청형 A 특이적 항원진단용 현장진단키트를 제작하였다.

[0169] **4-1. 단일클론항체를 이용한 래피드 현장진단 키트 제조**

[0170] **1) Capture 분주 및 고정**

[0171] 항 마우스 IgG (Arista, 2mg/ml, 대조선 용 항체)와 마우스 항 FMDV A 단일클론항체 (6E82(KCTC18576P), 2mg/ml, 검사선 용 항체)에 각각 0.5% 수크로즈 (Sigma)와 0.1% Na<sub>3</sub> (Sigma)를 첨가하여 분주용 항체용액을 제조하였다. Plastic backing card (PJ상사)에 니트로셀룰로오스 멤브레인(Millipore)을 접합시킨 후, 대조선 (control line)으로써 항 마우스 IgG(anti-mouse IgG)를, 검사선(test line)으로써 6E82 단일클론항체를 각각 bed speed 10cm/sec, 분주 부피 0.9 μl/cm로 분주하였다. 항체가 분주된 니트로셀룰로오스 멤브레인을 제습 캐비닛(습도 20% 이하)에서 24시간 이상 건조하여 항체를 고정시켰다.

[0173] **2) 금 접합체 제조**

[0174] 금 접합체는 항체와 금 입자(40nm)가 결합한 결합체를 뜻하며, 접합체 제조를 위해 흡착 방법을 이용하여 다음과 같이 제조를 하였다.

[0175] 구체적으로, 정제 완료된 3H28 항체(1mg/ml)를 준비하고, 금 용액(40nm 콜로이드성 금(colloidal gold))은 분광 광도계(Spectrophotometer)를 이용하여 525nm 파장에서 OD값 1.0 및 pH는 9.0으로 보정하여 준비하였다. 그 후, 항체 농도가 5ug/ml이 되도록 금용액(colloidal gold, pH 9.0) 10ml에 3H28 항체를 첨가하고 37, 20분간 반응시켰다. 금입자 표면에 항체가 반응하지 못한 부분을 블로킹하기 위해 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin)을 1% 농도가 되도록 첨가하고 37에서 20분간 반응시킨 후 원심 분리하였다(12,000rpm, 10분). 원심 분리 후 상층액을 버리고, 1% BSA 용액으로 금접합체를 세척하고 다시 12,000rpm, 10분 원심 분리한 후 상층액을 제거하였다. 초기 금 용액 부피의 약 1/10 (1ml)이 되도록 1% BSA 용액 1ml을 첨가하여 금접합체를 현탁한 후, 분광 광도계를 이용하여 525nm 파장에서 OD값을 측정하였다(0.D 10.0).

[0176] 금접합체는 안정성을 확보하기 위해 자당, 카세인, BSA 및 Na<sub>3</sub>를 첨가하여 유리 섬유(glass fiber)에 건조하였다. 구체적으로, 자당(sucrose) 5%(w/v), 카세인 0.1%(w/v), BSA 1%(w/v), Na<sub>3</sub> 0.1%의 농도가 되도록 첨가한 후, 금 접합체를 분광 광도계(525nm) OD 값 7로 보정한 후 유리 섬유 패드에 분주(1ml/5mm x 300mm)하여 제습공간(습도 20%)에서 건조하였다.

[0178] **3) 스트립의 제조**

[0179] 스트립은 샘플패드(Ahlstrom), 금접합체 패드(Ahlstrom), 멤브레인(Millipore) 및 흡수패드(Ahlstrom)를 중첩

되게 하여 일정한 방향으로 흘러가면서 capture와 반응하도록 하는 형태를 갖는다. 멤브레인에 항체가 고정되어 있으면 금접합체 패드, 샘플패드와 흡수패드를 각각 정해진 위치에 중첩되도록 붙이고 로터리 슬리터(rotary slit)를 이용하여 4mm간격으로 절단한다. 완성된 스트립을 하우징에 넣어 조립하고 알루미늄 파우치에 실리카겔과 밀봉하여 포장한다.

**4) 검출 용액 제조**

50mM Borax buffer(pH 9.0)에 Tween-20 (Sigma) 0.4%(v/v), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.01%(w/v) 가 되도록 검출 용액을 제조하였다.

**5) 사용 방법 및 결과 판정 방법**

희석 튜브에 희석 버퍼와 테스트하고자 하는 샘플을 50ul:50ul(1:1)로 잘 섞어 혼합용액을 제조한 후 혼합용액 100ul를 래피드 현장진단키트의 검체투입구에 적하한다. 10분 후 육안으로 결과를 판정한다.

육안으로 보았을 때, 대조선과 검사선 위치에 붉은색 선이 나타나면 양성, 대조선에만 붉은색 선이 나타나면 음성으로 판정하고, 대조선에 붉은 색 선이 나타나지 않는 경우 재실험한다.

**시험예 1. 양성 민감도 및 검출한계 측정**

FMDV A 바이러스를 각각 종(strain)별로 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml로 희석하여 준비하고 각 키트의 용법용량에 따라 민감도를 비교하여, 그 결과를 표 3 내지 표 4 및 도 5 내지 8에 나타내었다.

**표 3**

검체 No.	실시예			비교예			비고 (검출한계)
	희석비율			희석비율			
	1/10	1/100	1/1000	1/10	1/100	1/1000	
1	++	+	-	-	-	-	FMDV A 포천주 (5.43 x 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml)
2	++	+	-	+	-	-	FMDV A 말레이시아주 (2.00 x 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml)
3	++	+	-	-	-	-	FMDV A 이라크주 (2.00 x 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml)
4	++	+	-	+	-	-	FMDV A Zabaykalsky주 (2.67 x 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml)

**표 4**

	FMDV A 포천주	FMDV A 말레이시아주	FMDV A 이라크주	FMDV A Zabaykalsky주
민감도 (TCID <sub>50</sub> /ml)	5.43 x 10 <sup>4</sup>	2.00 x 10 <sup>4</sup>	2.00 x 10 <sup>4</sup>	2.67 x 10 <sup>4</sup>

표 3 내지 표 4 및 도 5 내지 8에서 확인할 수 있듯이, 실시예는 3가지 중에서 비교예 보다 10배 이상 민감도가 우수한 것을 확인하였다.

**시험예 2. 교차반응성 평가**

FMDV A 혈청형(serotype) 외에 다른 FMDV 혈청형과의 교차반응 여부를 확인하기 위해 혈청형 0, Asia1, C, SAT1, SAT2 및 SAT3 바이러스를 이용하여 테스트를 진행하여, 그 결과를 표 5 및 도 9 내지 12에 나타내었다.

표 5

혈청형 (serotype)	종 (Strain)	TCID <sub>50</sub> /ml	판정
0	manisa	5.75 X 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	3039	2.20 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	타이완	8.25 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	BFS 1860	2.30 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	충주	1.50 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	합천	1.53 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	파주	5.94 X 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	양주	8.66 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	강화	3.89 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	진천	3.94 X 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	화천	2.71 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	김제	5.04 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	SKR/02	3.04 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	campos	3.18 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
primosky	4.62 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-	
Asial	shamir	4.74 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	CAM9/80	6.17 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
	MOG/05	5.36 X 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
C3	-	4.74 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
SAT1	-	2.00 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
SAT2	-	6.32 x 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-
SAT3	-	5.20 x 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-

[0199] 표 5 및 도 9 내지 12에서 확인할 수 있듯이, FMDV 혈청형 A 이외 혈청형과의 교차반응성은 확인되지 않았다. 즉, FMDV 혈청형 A에만 반응성을 나타내며, 나머지 혈청형에는 반응성이 없어 국내에서 주요 발생 보고된 FMDV 혈청형 A에 대한 현장 감별 진단키트 개발에 적용될 수 있음을 확인하였다.

[0201] **시험예 3. 재현성 시험**

[0202] 재현성을 확인하기 위해 재조합 항원을 희석하여 만든 양성 검체 2종(중, 고역가)과 음성 검체 1종으로 3개의 스트립으로 재현성 시험을 진행하여, 그 결과를 표 6 및 도 13에 나타내었다.

표 6

반복횟수	#1			#2			#3		
	음성	중양성	고양성	음성	중양성	고양성	음성	중양성	고양성
판정	-	+	+++	-	+	+++	-	+	+++

[0205] 표 6 및 도 13에서 확인할 수 있듯이, 3회 반복테스트 모두 음성은 음성으로 판정되었고, 고양성이 저양성보다 높게 표현되며, 양성도 양성으로 모두 판정된 것을 확인하였다. 또한, 양성인 경우 3회 모두 감도가 비슷한 수준으로 나타나 재현성이 우수한 것으로 확인하였다.

수탁번호

[0206]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC18576P

수탁일자 : 20170524

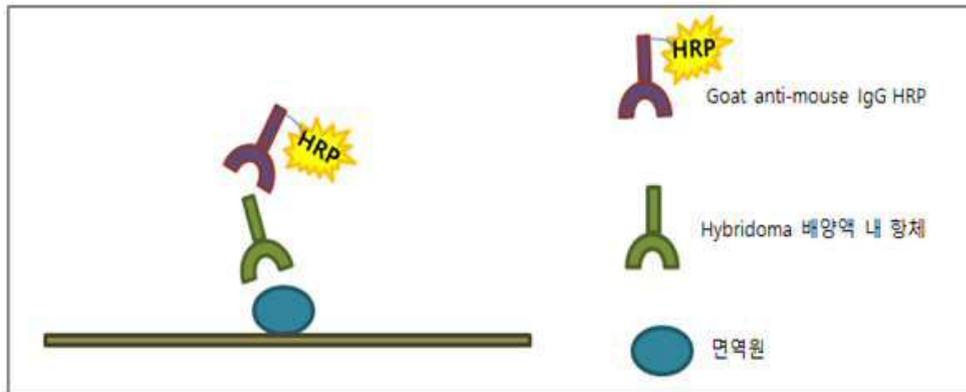
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC18577P

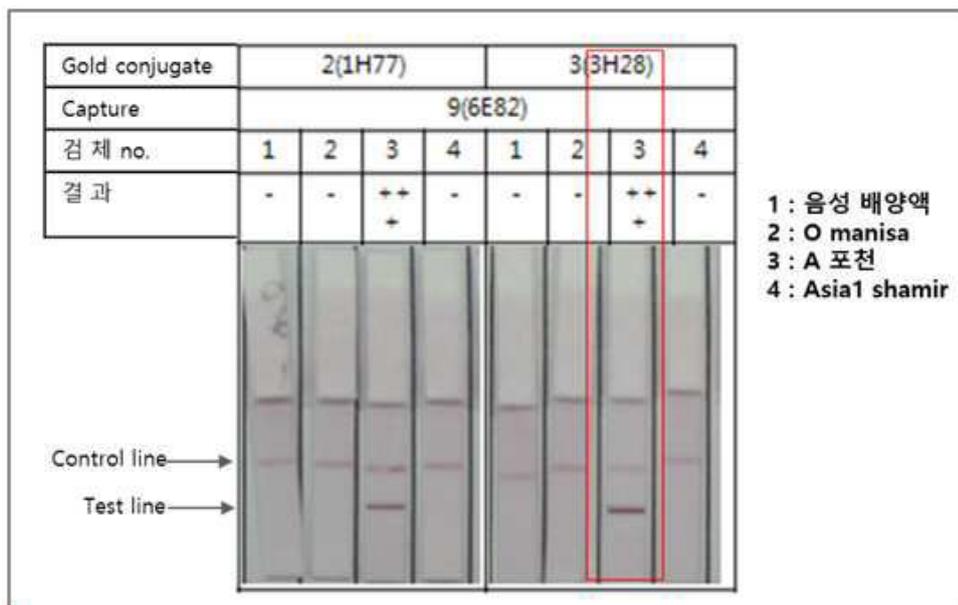
수탁일자 : 20170524

도면

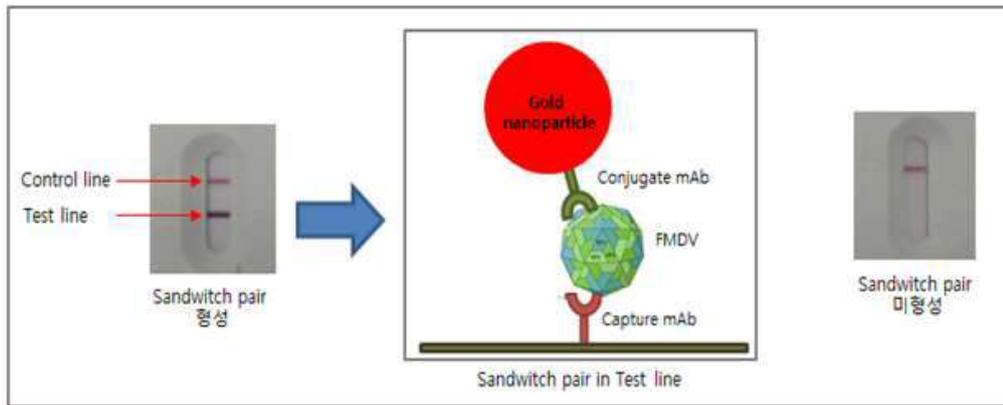
도면1



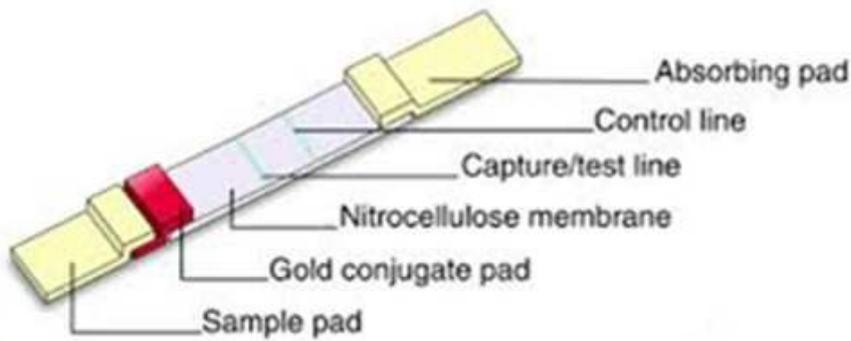
도면2



도면3



도면4



도면5

역가 ( $5.43 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /ml)	실시에			비교예		
	원액	1/10	1/100	원액	1/10	1/100
희석배수						
결과사진						
판정	++	+	-	-	-	-

도면6

역가 ( $2.00 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /ml)	실시에			비교예		
	원액	1/10	1/100	원액	1/10	1/100
결과사진						
판정	++	+	-	+	-	-

도면7

역가 ( $2.67 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /ml)	실시에			비교예		
	원액	1/10	1/100	원액	1/10	1/100
결과사진						
판정	++	+	-	-	-	-

도면8

역가 ( $2.00 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /ml)	실시예			비교예		
	원액	1/10	1/100	원액	1/10	1/100
결과사진						
판정	++	+	-	+	-	-

도면9

Strain	manisa	3039	타이완	BFS 1860	충주	함천	파주	양주
결과사진								
판정	-	-	-	-	-	-	-	-

도면10

Strain	강화	진천	화천	김제	SKR102	campos	primosky
결과사진							
판정	-	-	-	-	-	-	-

도면11

Strain	shamir	CAM	MOG
결과사진			
판정	-	-	-

도면12

Strain	C3	SAT1	SAT2	SAT3
결과사진				
판정	-	-	-	-

도면13

반복횟수	#1			#2			#3		
검체	음성	저양성	고양성	음성	저양성	고양성	음성	저양성	고양성
결과									
판정	-	+	+++	-	+	+++	-	+	+++

서열목록

<110> MEDIAN Diagnostics Inc.

REPUBLIC OF KOREA(Animal and Plant Quarantine Agency)

<120> Monoclonal Antibodies for detecting Foot and Mouth Disease Virus serotype A and using the same

<130> PN170197

<160> 32

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR 1\_3H28

<400> 1

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR 2\_3H28

<400> 2  
 Ile Asp Pro Glu Ile Gly Asp Pro  
 1 5  
 <210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> HCDR 3\_3H28  
 <400> 3  
 Ala Glu Tyr Gly Tyr Arg Pro Phe Ala Tyr  
 1 5 10  
 <210> 4  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3H28 Heavy chain V-region  
 <400> 4  
 Glu Leu Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Met Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Ile Gly Asp Pro Lys Tyr Asp Pro Asn Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ala Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Trp Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Glu Tyr Gly Tyr Arg Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 5  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LCDR 1\_3H28  
 <400> 5  
 Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LCDR 2\_3H28  
 <400> 6

Leu Val Ser  
 1  
 <210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LCDR 3\_3H28  
 <400> 7

Gln His Ile Arg Glu Leu Thr  
 1 5  
 <210> 8  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3H28 Light chain V-region  
 <400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser



Ala Glu Tyr Gly Tyr Arg Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6E82 Heavy chain V-region

<400> 12

Glu Leu Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Ile Gly Asp Pro Lys Tyr Asp Pro Asn Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ala Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Trp Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Glu Tyr Gly Tyr Arg Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR 1\_6E82

<400> 13

Ser Ser Val Ser Tyr

1 5

<210> 14

<211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LCDR 2\_6E82  
 <400> 14  
 Asp Thr Ser  
 1  
 <210> 15  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LCDR 3\_6E82  
 <400> 15  
 His Gln Trp Arg Thr Ile Pro Tyr  
 1 5  
  
 <210> 16  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 6E82 Light chain V-region  
 <400> 16  
 Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Arg Thr Ile Pro Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Pro Ser Trp Lys Ser Asn

	100	105	
<210>	17		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	HCDR 1_3H28		
<400>	17		
ggcttcaaca ttaaagacac ctat			24
<210>	18		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	HCDR 2_3H28		
<400>	18		
attgatcctg agattggtga tcct			24
<210>	19		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	HCDR 3_3H28		
<400>	19		
gccgagtatg gttacaggcc ttttgcttac			30
<210>	20		
<211>	352		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	3H28 Heavy chain V-region		
<400>	20		
gaacttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagctg			60
tcctgcacag cttctggett caacattaaa gacacctata tacactgggt gatgcagagg			120
cctgaacagg gcctggagtg gattgggagg attgatcctg agattggtga tcctaaatat			180
gaccggaact tccagggcaa ggccactata gcagcagaca catcctcaa cacagcctac			240

ttgtgggtca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc cgagtatggt 300  
 tacaggcctt ttgcttactg gggccaaggg actctgtgtca ctgtctctgc ag 352  
 <210> 21  
 <211> 30  
 <212> DNA  
  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Lcdr 1\_3H28  
 <400> 21  
 aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat 30  
 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Lcdr 2\_3H28  
 <400> 22  
 cttgtatcc 9  
 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Lcdr 3\_3H28  
 <400> 23  
 cagcacatta gggagcttac acg 23  
  
 <210> 24  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3H28 Light chain V-region  
 <400> 24  
 gacattgtgc tgacacagtc tctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcaactggaac 120  
 caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 180  
 ggggtccctg ccaggttcag cggcagtggg tctgggacag acttcacct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatgc agcaacctat tactgtcagc acattagga gcttacacgt 300

tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac 330

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR 1\_6E82

<400> 25

ggcttcaaca ttaaagacac ctat 24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR 2\_6E82

<400> 26

attgatcctg agattggtga tcct 24

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR 3\_6E82

<400> 27

gccgagtatg gttacaggcc ttttgcttac 30

<210> 28

<211> 352

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6E82 Heavy chain V-region

<400> 28

gaacttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagctg 60

tcctgcacag cttctggett caacattaaa gacacctata tacactgggt gaagcagagg 120

cctgaacagg gcctggagtg gattgggagg attgatcctg agattggtga tcctaaatat 180

gacccgaact tccagggcaa ggccactata gcagcagaca catcctccaa cacagcctac 240  
 ttgtgggtca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc cgagtatggt 300  
 tacaggcctt ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc ag 352  
 <210> 29  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LCDR 1\_6E82  
 <400> 29  
 tcaagtgtga gttac 15  
 <210> 30  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > LCDR 2\_6E82  
 <400> 30  
 gacacatcc 9  
 <210> 31  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LCDR 3\_6E82  
 <400> 31  
 caccagtgga gaactatccc gtacac 26  
 <210> 32  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 6E82 Light chain V-region  
 <400> 32  
 caaattgttc tcatccagtc tccagcaate atgtctgcct ctccagggga gaaggtcacc 60  
 atgacctgca gtgccacctc aagtgtgagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120  
 acctcccca aaagatggat ttatgacaca tccaaattgg cttctggagt ccctagtgcg 180

ttcagtgcca gtgggtctgg gacctttac tctctcacia tcagcagcgt ggaggctgaa	240
gatgctgcca cttattactg ccaccagtgg agaactatcc cgtacacgtt cgggggggga	300
ccaagctgga aatcaaac	318