



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월31일
(11) 등록번호 10-2196550
(24) 등록일자 2020년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) GO1N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/1036 (2013.01)
GO1N 33/56983 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0027251
(22) 출원일자 2015년02월26일
심사청구일자 2019년10월14일
(65) 공개번호 10-2016-0104785
(43) 공개일자 2016년09월06일
(56) 선행기술조사문헌
JP2004301518 A
JP2004107219 A
GenBank: BAP81672.1(2014.10.28.)*
BioResearch Open Access, Vol. 2, No. 1, pp.
55-60(2013. 2.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 메디안디노스틱
강원도 춘천시 동내면 순환대로 878
대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)
경상북도 김천시 혁신8로 177 (울곡동)
(72) 발명자
신연경
경기도 과천시 향교말길 8, 130-203
김은주
서울특별시 금천구 가산로7길 107, 201호 (가산동, 백운한비치아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대용, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 5 항

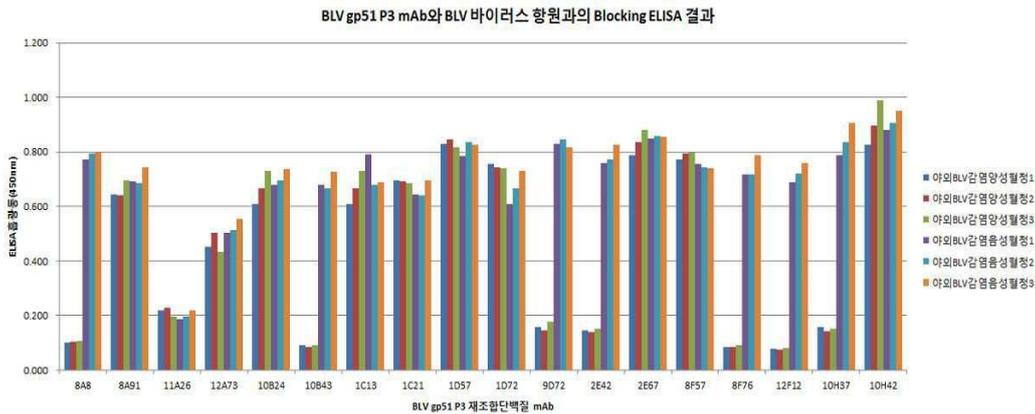
심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 소류코시스 바이러스 당단백질 51에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 소류코시스 바이러스의 당단백질 51에 대한 단일클론항체, 및 이 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다. 본 발명의 소류코시스 바이러스의 당단백질 51에 대한 단일클론항체는 소류코시스 바이러스의 당단백질 51에 대한 고친화도의 특이적 결합능력을 가지므로, 소류코시스 진단에 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 소류코시스 바이러스에 대한 단일클론항체는 소류코시스 진단용 키트의 제조에도 매우 유용하다.

대표도 - 도5b



- (52) CPC특허분류
C12N 2740/14011 (2013.01)
G01N 2800/26 (2013.01)
- (72) 발명자
조수동
 경기도 안양시 만안구 현충로 13, 302호 (안양6동, 대영빌라)
이경기
 경기도 안양시 만안구 연현로 79 석수엘지빌리지 202동 704호
송재영
 경기도 안양시 동안구 부림로 34, 206동 602호 (평촌동, 꿈마을우성아파트)
정광면
 강원도 춘천시 새청말길 26 113동 204호 (우두동, 강변코아루아파트)
이상오
 경기도 수원시 영통구 영통로514번길 53, 107동 1904호 (영통동, 황골마을주공2단지아파트)

- 김정화**
 강원도 춘천시 퇴계로 242 주공4단지 409동 1202호
- 김춘희**
 강원도 춘천시 동면 후석로326번길 63 104동 302호 (만천리, 대동다숲아파트)
- 전은성**
 강원도 춘천시 후석로186번길 9 103동 607호 (석사동, 진흥아파트)
- 이은정**
 강원도 춘천시 퇴계로 128 205동 101호 (퇴계동, 휴먼시아남춘천2단지아파트)
- 장상호**
 서울특별시 강남구 양재대로47길 18 102호 (일원동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545009050
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림축산검역본부
연구사업명	농림축산검역검사기술개발
연구과제명	소류코시스의 혈청학적 진단법 개량 및 개발
기여율	1/1
과제수행기관명	농림축산검역본부
연구기간	2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC 18355P 또는 KCTC 18356P인 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 소류코시스 바이러스(bovine leukemia virus) 당단백질 51(glycoprotein 51)에 대한 단일클론 항체.

청구항 2

제1항의 단일클론 항체를 생산하는 수탁번호 KCTC 18355P 또는 KCTC 18356P 인 하이브리도마 세포.

청구항 3

제1항의 소류코시스 바이러스에 대한 항체를 포함하는 소류코시스 진단용 조성물.

청구항 4

제1항의 소류코시스 바이러스에 대한 항체를 포함하는 소류코시스 진단 키트.

청구항 5

소류코시스 진단에 관한 정보를 제공하기 위해, 제1항의 소류코시스 바이러스에 대한 단클론항체를 이용하여 소로부터 분리된 생물학적 시료내 소류코시스 바이러스에 대한 항체를 검출하는 방법.

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 소류코시스 바이러스 당단백질 51에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이의 소류코시스 진단용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 소류코시스 바이러스 당단백질 51에 대한 단일클론항체, 이 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주, 상기 단일클론항체를 유효성분으로 포함하는 소류코시스 진단용 조성물 및 소류코시스 진단용 키트에 관한 것이다.

[0002] 삭제

배경기술

[0003] 소류코시스는 제2종 법정 가축전염병으로 소류코시스 바이러스(bovine leukemia virus, BLV)에 의하여 감염되는 소의 질병으로 태아 포함 전 연령대에 감염 가능하며, 대부분 불현 감염이나 일부 (~30%) PL(persistent lymphocytosis)을 나타내며, 일부 내부 다양한 장기에서 림프육종(lymphosarcoma)을 보이고 영향받은 장기에 따라 임상증상을 발현하기도 한다. 림프육종이 있는 소는 즉시 또는 수주 내지 수개월 경과 후 폐사하고 한번 감염되면 평생 소의 혈액 내에서 존재하며 근절이 어려운 질병이다.

[0004] BLV는 바이러스 분류학상 Retroviridae과에 속하는 Deltaretrovirus속의 바이러스이다. BLV는 단일가닥 RNA 게놈, 역전사효소(reverse transcriptase)를 포함한 몇 개의 효소와 구조단백질로 구성되어 있다. BLV를 구성하는 구조단백질로는 내부 단백질(p24, p15, p12, p10)과 엔벨로프 당단백질(gp51, gp30)이 있다. 이 중 엔벨로프 당단백질 중 하나인 gp51 단백질은 세포 바이러스 수용체(cellular viral receptor)를 인지하여 바이러스 감염에 있어 직접적인 역할을 할 뿐만 아니라, 강력한 면역반응을 유도한다. 따라서 BLV의 gp51 단백질은 질병 진단이나 모니터링 검사를 위한 항체검사법의 중요한 항원부위로 간주되며, 이러한 목적을 달성하기 위한 항체검사법에는 BLV의 gp51 단백질 내 에피토프를 인식하는 단클론항체의 확보가 중요하다.

[0005] 이를 위하여 BLV의 gp51 단백질에 대한 단클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제작하였고, 이 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단클론항체가 BLV의 gp51 단백질의 에피토프 부위를 특이적으로 인식하고, 블로킹 ELISA에 적용하였을 때 야외감염개체에서 BLV 항체를 효과적으로 검출할 수 있다는 사실을 확인하였다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[0007] 삭제

[0008] 삭제

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 생물학적 시료에서 소류코시스 바이러스(bovine leukemia virus)를 특이적으로 검출할 수 있는 모노클로날 항체를 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 소류코시스 바이러스의 당단백질 51(glycoprotein 51)에 대한 재조합 단백질을 과발현시켜 분리 및 정제하고, 이를 항원으로 사용한 세포융합법을 통해 당단백질 51에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 생산 하이브리도마 세포주를 성공적으로 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 소류코시스 바이러스 당단백질 51의 재조합 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 소류코시스 바이러스 당단백질 51에 대한 단일클론 항체를 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 소류코시스 바이러스 당단백질 51에 대한 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론 항체를 유효성분으로 포함하는 소류코시스 진단용 조성물을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론 항체를 유효성분으로 포함하는 소류코시스 진단 키트를 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단일클론 항체를 이용하여 소류코시스 바이러스에 대한 항체를 검출하는 방법을 제공하는데 있다.

[0016] 삭제

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

[0018] 삭제

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제3서열의 아미노산 서열로 표시되는 소류코시스 바이러스(bovine leukemia virus) 당단백질 51(glycoprotein 51)의 재조합 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0020] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC 18355P, KCTC 18356P인 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 소류코시스 바이러스 당단백질 51에 대한 단일클론 항체를 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 소류코시스 바이러스 당단백질 51에 대한 단일클론 항체를 생

산하는 수탁번호 KCTC 18355P, KCTC 18356P 인 하이브리도마 세포를 제공한다.

- [0022] 본 발명의 단일클론 항체는 소류코시스 바이러스(bovine leukemia virus) 당단백질 51(glycoprotein 51)에 고 친화도를 가지면서 특이적으로 결합한다.
- [0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 단일클론 항체는 서열목록 제4서열의 소류코시스 바이러스 당 단백질 51 부위에 특이적으로 결합한다.
- [0024] 본 발명의 단일클론 항체는 한국생명공학연구원 KCTC(Korean Collection for Type Cultures)에 2015년 02월 17 일자로 기탁번호 KCTC 18355P, KCTC 18356P 으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 항체이다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 “항체(antibody)”는 소류코시스 바이러스 당단백질 51에 대한 특이 항체로서, 완전한 항체 형태뿐만 아니라 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함하는 의미이다.
- [0026] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다 (Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)).
- [0027] 항체 분자의 항원 결합 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(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')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변 부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv (twochain 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. 이러한 항체 단편은 단백질 가수 분해 효소를 이용하여 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 과산화인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 항체는 바람직하게는 Fab 형태이거나 완전한 항체 형태이다.
- [0029] 본 명세서에서, 용어 “중쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0030] 또한 본 명세서에서 용어 “경쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VL 및 불변 영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “단일클론 항체”는, 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체분자를 의미하며, 단일클론 항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.
- [0032] 본 발명의 단일클론항체는 당해 기술분야에서 공지된 세포융합방법에 의해 생성된 하이브리도마 세포로부터 얻을 수 있다. 일반적으로 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마 세포는 항원 단백질을 주사한 마우스와 같은 면역학적으로 적합한 숙주 동물로부터의 면역세포와 암 세포주를 융합함으로써 만들어진다. 이러한 두 가지 세포의 융합은 당업계에서 공지되어 있는 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol)을 이용하는 방법을 통해 융합시키고 항체 생산 세포를 표준적인 배양 방법에 의해 증식시킨다. 한계 희석법(limited dilution)에 의한 서브클로닝을 실시하여 균일한 세포 집단을 수득하고 난 후, 항원에 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포를 시험관 또는 생체 내에서 대량으로 배양한다.
- [0033] 세포 융합에 사용되는 골수종 세포로는 마우스 유래의 p3/x63-Ag8, p3-U1, NS-1, MPC-11, SP2/0, F0, P3x63 Ag8, V653, S194, 랫트 유래의 R210 등 다양한 세포주를 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적 실시예에서 사용

된 세포주는 골수종 세포 SP2/0이다.

- [0034] 상기의 하이브리도마 세포가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않은 상태로 사용될 수 있으며, 또한 다양한 통상의 방법, 예를 들면 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등을 이용하여 고순도로 정제하여 사용될 수 있다.
- [0035] 소류코시스 바이러스 당단백질 51을 선택적으로 인식하는 단일클론을 선별하기 위하여 통상 사용되는 다양한 방법, 예를 들면, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역흡착법(ELISA), 면역형광법(Immunofluorescence), 웨스턴 블랏팅(Western blotting) 및 유세포 분석법 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 의하면, 효소면역흡착법(ELISA)에 의해 단일클론을 선별한다.
- [0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 소류코시스 바이러스에 대한 본 발명의 항체를 포함하는 소류코시스 진단용 조성물을 제공한다.
- [0037] 삭제
- [0038] 본 발명의 소류코시스 바이러스 당단백질 51에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체는 생물학적 시료에 적용하여 소류코시스를 진단하는데 사용될 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 사용된 용어 “생물학적 시료”란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 발명의 항체를 이용하여 항원-항체 복합체의 형성을 검출함으로써 소류코시스 바이러스 감염여부를 확인할 수 있다.
 상기한 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 또는 섬광계수법(scintillation counting method)으로 검출할 수 있다.
- [0040] 삭제
- [0041] 본 명세서상의 “검출”은 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러 가지 표지체를 사용하여 실시할 수 있다. 표지체의 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 또는 방사성 동위원소를 포함한다.
 검출 표지체로서 사용되는 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제 및 β -라타마제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하며, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르 및 이소루미놀 유도체 등을 포함하며, 미소입자로는 콜로이드 금 및 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H , ^{125}I 및 ^{125}I -볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함한다.
- [0042] 삭제
- [0043] 바람직하게는, 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있다. 효소면역흡착법(ELISA)에는 생물학적 시료에 존재하는 각종 질병 원인체에 대한 항체가 고체지지체에 부착된 항원과 반응하여 표지된 항체의 항원과 반응이 방해되는 원리를 이용하는 블로킹 ELISA, 표지항체와 생물학적 시료에 존재하는 질병원인체에 대한 항체가 고체지지체에 부착된 항원과 반응하기 위해 동시에 경쟁하는 원리를 이용하는 경쟁적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 본 발명의 항체는 검출 표지를 가질 수 있으며, 검출표지를 가지지 않을 경우는 본 발명의 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 소류코시스 바이러스에 대한 본 발명의 항체를 포함하는 소류코시스 진단 키트를 제공한다.

[0045] 삭제

[0046] 소류코시스 바이러스의 당단백질 51(glycoprotein 51)을 항원으로 하는 본 발명의 항체는 생물학적 시료에 적용되어 소류코시스 바이러스 감염 여부를 진단할 수 있다.

[0047] 본 발명의 소류코시스 진단 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표시된 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96-웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설포산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 소류코시스 진단에 관한 정보를 제공하기 위해, 본 발명의 소류코시스 바이러스에 대한 단클론항체를 이용하여 소로부터 분리된 생물학적 시료내 소류코시스 바이러스에 대한 항체를 검출하는 방법을 제공한다.

[0049] 삭제

[0050] 삭제

발명의 효과

[0051] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0052] (i) 본 발명은 소류코시스 바이러스의 당단백질 51에 대한 단일클론항체, 및 이 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.

[0053] (ii) 본 발명의 소류코시스 바이러스의 당단백질 51에 대한 단일클론항체는 소류코시스 바이러스의 당단백질 51에 대한 고친화도의 특이적 결합능력을 가지므로, 소류코시스 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

[0054] (iii) 본 발명의 소류코시스 바이러스에 대한 단일클론항체는 소류코시스 진단용 키트의 제조에도 매우 유용하다.

[0055] 삭제

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 BLV gp51 재조합단백질 제작 모식도이다.

도 2는 BLV gp51 재조합단백질의 발현 및 정제도 확인한 결과이다. (a) BLV gp51 P1, (b) BLV gp51 P2, (c) BLV gp51 P3, (d) BLV gp51 P4

도 3은 BLV gp51 P3 재조합단백질의 단클론항체들과 4종의 BLV gp51 재조합단백질과의 반응성을 나타낸 그래프이다.

도 4는 BLV gp51 P3 재조합단백질의 단클론항체들과 BLV gp51 재조합단백질과의 블로킹 능력을 확인한 결과이다. (a) BLV gp51 P1, (b) BLV gp51 P2, (c) BLV gp51 P3, (d) BLV gp51 P4

도 5a는 BLV gp51 P1,P2,P4 재조합단백질의 단클론항체들과 BLV 바이러스와의 블로킹 능력 확인결과이다.

도 5b는 BLV gp51 P3 재조합단백질의 단클론항체들과 BLV 바이러스와의 블로킹 능력 확인결과이다.

도 6은 단클론항체 9D72에 대한 웨스턴블롯 결과 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0059] 실시예

[0060] 실시예 1: BLV gp51 재조합단백질 항원 개발

[0061] BLV gp51 재조합단백질로서 BLV gp51 P1, P2, P3, P4로 명칭된 총 4종의 단백질을 생산하였다.

[0063] 1-1: BLV gp51 재조합단백질

[0064] BLV gp51 P1 및 P2 재조합단백질은 BLV gp51과 gp30 유전자를 포함하는 부위, BLV gp51 P3 및 P4 재조합단백질은 BLV gp51 유전자 부위를 pET21a 벡터에 PCR 클로닝하여 생산한 대장균 재조합단백질이다(도 1). BLV gp51 P1, P2, P3 및 P4 재조합단백질은 불용성(insoluble) 단백질로 다량 발현되어 변성시켜 정제하였다. 그 결과, 각각 57.2 kDa, 43.5 kDa, 27.5 kDa 및 17.5 kDa의 단백질을 수득하였다.

표 1

BLV gp51 재조합단백질의 유전정보

[0065]

Gene Origin	재조합 단백질	Gene Region	Primers	Size (kDa)	Fusion protein
BLV	gp51 P1	1446 bp (gp51+gp30)	Forward: 5' -CGCGAATTCTGGAGATGCTCCCTGTCCTAGGAAA-3' Reverse: 5' -CCGCGGCCGCCAGGTTAGAGTGAAAATTCC-3'	57.2	C-말단 6X 히스티딘
BLV	gp51 P2	1089 bp (gp51+gp30)	Forward: 5' -CGCGAATTCTGGAGATGCTCCCTGTCCTAGGAAA-3' Reverse: 5' -CGCCTCGAGAATGCGCAGGAAACAGCAAGGCTCATTA-3'	43.5	C-말단 6X 히스티딘
BLV	gp51 P3	648 bp (gp51)	Forward: 5' -CGCGAATTCTGGAGATGCTCCCTGTCCTAGGAAA-3' Reverse: 5' -CGCCTCGAGCCAGAAGATTGGGCGTCC-3'	27.5	C-말단 6X 히스티딘
BLV	gp51 P4	381 bp (gp51)	Forward: 5' -CGCGAATTCTGGAGATGCTCCCTGTCCTAGGAAA-3' Reverse: 5' -CGCCTCGAGCCAGAAGATTGGGCGTCC-3'	17.5	C-말단 6X 히스티딘

[0067] 삭제

[0068] 삭제

- [0069] 단계 1: 유전자 증폭
- [0070] 유전자 증폭을 위해 표 1에 기재된 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다:
- [0071] 변성: 94℃ 3분, 3-단계 사이클링(35 사이클): 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 1분, 마지막 연장: 72℃ 10분.
- [0072] PCR 산물을 pET21a 벡터에 클로닝한 다음, 콜로니를 선별하고 시퀀싱하여 염기서열을 확인하였다.
- [0074] 단계 2: 재조합 단백질의 발현 유도
- [0075] 클로닝한 벡터를 대장균에 도입 및 배양하여 발현을 유도하였다. SDS-PAGE를 실시하여 발현단백질의 크기 및 단백질 발현 성상을 확인하였다(용해물 펠렛, 불용성 단백질). 6XHis Tag을 이용하여 발현 단백질을 정제하고, SDS-PAGE를 실시하여 정제도 및 양을 측정하였다(도 2a-2d).
- [0077] **실시예 2: BLV gp51 항체 개발**
- [0078] BLV gp51에 특이적으로 반응하는 항체 개발을 위해 재조합 단백질(BLV gp51 P1, P2, P3, P4)을 개발하였고, 개발된 재조합 단백질을 이용하여 단클론항체 제작을 위해 마우스 면역을 진행하였다.
- [0080] 2-1: 재조합단백질에 대한 단클론항체
- [0081] *단계 1: 면역*
- [0082] 위에서 제조한 재조합단백질에 대한 단클론항체를 제작하기 위해 실험동물에 면역(immunization)을 실시하였다. 항원으로서 각 재조합 단백질(BLV gp51 P1, P2, P3, P4)을 0.5 mg/ml 농도로 준비하고 재조합단백질 200 μ l 와 Freund's Adjuvant(FA) 200 μ l를 혼합하여 Balb/C 마우스 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 재조합단백질 100 μ l를 복강으로 면역하고 4일 후 세포융합에 사용하였다.
- [0084] *단계 2: 세포융합 및 하이브리도마 제조*
- [0085] 면역화된 마우스 몸통 좌측에 위치한 비장(spleen)을 적출하여 DMEM 배지에 부유시킨다. 적출한 비장을 메쉬로 갈아서 세포를 분리하고 배양배지 DMEM과 혼합하여 비장세포 현탁액을 만들었다. 현탁액을 원심분리하여 상층액을 제거하고 비장세포와 골수세포주(SP2/0 Ag14 (ATCC, USA)) 1:5의 비율로 혼합한 후 원심분리하여 세포를 침전시켜 상층액은 제거한다. 원심분리된 세포를 천천히 분산시킨후 폴리에틸렌 글리콜 1500(PEG1500, Roche) 1 ml를 처리하고, 37℃에서 1분동안 유지시킨 후, DMEM 1ml을 첨가한다. 이후 DMEM 10 ml을 1분 동안 첨가하고, 37℃의 물에서 5분 동안 반응시킨 후 50 ml로 맞추어 다시 원심분리한다. 세포침전물을 분리배지(HAT배지)에 $1\sim 2 \times 10^5$ 세포/ml 농도로 재현탁시키고, 96웰 플레이트에 0.1 ml씩 분주한 후 37℃ 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.
- [0087] 단계 3: 하이브리도마 세포의 선별
- [0088] 상기 단계2에서 제조된 하이브리도마 세포군 중에서 BLV gp51 P1, P2, P3, P4에 특이적으로 반응하는 하이브리도마 세포를 선별하기 위하여 ELISA 분석 방법을 사용하였다.
- [0089] 96웰 마이크로플레이트에 목적으로 하는 항원 BLV gp51 P1, P2, P3, P4와 대조항원인 정상 세포 용해물을 한 웰당 각각 100 μ l(0.5 μ g/ml)씩 가하여 플레이트 표면에 부착시키고, 반응하지 않은 항원은 세척하여 제거하였다. BLV 바이러스 배양 상층액, 10% FBS만 들어있는 배양배지를 웰당 각각 100 μ l씩 가하여 플레이트 표면에 부착시키고, 반응하지 않은 항원은 세척하여 제거하였다. 하이브리도마 세포의 배양액을 각각 웰에 100 μ l씩을 가하여 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 인산 완충용액-트윈20(PBS-T) 용액으로 3회 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거하였다. 여기에 염소 항-마우스 IgG-호스레디쉬 퍼옥시다제(Goat anti-mouse IgG-HRP)를 가하여 1시간동안 실온에서 반응시킨 다음, PBS-T로 3회 세척하였다. 세척한 후 퍼옥시다제의 기질용액(TMB)을 가하여 반응시키고, 황산 0.5 M를 플레이트 각 웰에 50 μ l씩 분주한 뒤 Sunrise ELISA reader(Tecan)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 목적으로 하는 항원에 반응성이 높고, 대조항원에 반응성이 없는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주들을 선별하였다. 선별된 하이브리도마 세포주를 제한 희석하여 클로닝을 진행하여 단일클론화 하였고, 이후 위와 같은 방법으로 목적으로 하는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주를 선별하였다.
- [0090] 위와 같은 방법으로 BLV gp51 P1 재조합단백질에 대하여 10가지 단클론항체, BLV gp51 P2 재조합단백질에 대하여 22가지 단클론항체, BLV gp51 P3 재조합단백질에 대하여 18가지 단클론항체 및 BLV gp51 P4 재조합단백질에

대하여 11가지 단클론항체가 선발되었다. 선발된 항체의 결과는 표 2-5와 같다.

표 2

재조합단백질 BLV gp51 P1에 대한 단클론항체

No.	Clone Name	SCREEN RESULTS					ISOTYPING	SELECTION
		ELISA				IFA		
		E. coli cell lysate	BLV P1	10% FBS	BLV virus	BLV virus		
1	9F12	0.06	3.21	0.05	1.15	+	IgG1, kappa	●
2	9F37	0.05	2.67	0.06	1.33	+	IgG1, kappa	●
3	2H43	0.06	2.31	0.05	1.13	+	IgG2a, kappa	●
4	2H64	0.07	2.72	0.05	1.09	+	IgG2a, kappa	●
5	482	0.05	3.46	0.05	1.01	+	IgG2a, kappa	●
6	483	0.05	3.24	0.05	1.05	+	IgG1, kappa	●
7	5E17	0.05	2.98	0.05	1.00	+	IgG1, kappa	●
8	5E25	0.05	2.67	0.06	1.21	+	IgG1, kappa	●
9	10B65	0.05	3.26	0.05	2.11	+	IgG1, kappa	●
10	10B83	0.05	3.46	0.05	2.27	+	IgG2b, kappa	●

[0091]

표 3

재조합단백질 BLV gp51 P2에 대한 단클론항체

No.	Clone Name	SCREEN RESULTS					ISOTYPING	SELECTION
		ELISA				IFA		
		E. coli cell lysate	BLV P2	10% FBS	BLV virus	BLV		
1	8E2	0.06	3.64	0.06	0.09	-	-	●
2	8E16	0.06	3.79	0.05	0.08	-	IgM, kappa	●
3	8E12	0.08	3.81	0.05	0.19	+	IgG2b, kappa	●
4	8E24	0.07	4.00	0.05	0.19	+	IgG2b, kappa	●
5	3C34	0.12	4.00	0.06	0.62	+	IgG2b, kappa	●
6	3C44	0.12	3.88	0.05	0.67	+	IgG2b, kappa	●
7	3C40	0.06	4.00	0.05	0.13	-	IgM, kappa	●
8	3C51	0.06	3.79	0.05	0.12	-	IgG2b, kappa	●
9	4E64	0.12	4.00	0.05	0.71	+	IgG2b, kappa	●
10	4E84	0.14	3.94	0.05	0.81	+	IgG2b, kappa	●
11	4E63	0.07	3.67	0.06	0.11	-	IgM, kappa	●
12	4E86	0.07	3.58	0.05	0.11	-	IgM, kappa	●
13	7D94	0.08	2.76	0.05	0.09	+	IgG2b, kappa	●
14	7D11	0.06	2.88	0.04	0.08	-	IgG2b, kappa	●
15	1B22	0.12	3.89	0.05	0.69	+	IgG2b, kappa	●
16	1B30	0.11	4.00	0.05	0.74	+	IgG2b, kappa	●
17	1B33	0.06	3.93	0.05	0.09	-	-	●
18	1B45	0.06	3.67	0.05	0.08	-	-	●
19	8D54	0.09	4.00	0.05	0.30	+	IgG2b, kappa	●
20	8D71	0.07	3.88	0.05	0.20	+	IgG2b, kappa	●
21	8D55	0.06	3.73	0.05	0.08	-	IgG2b	●
22	8D64	0.07	4.00	0.06	0.08	-	IgG2b, kappa	●

[0093]

표 4

재조합단백질 BLV gp51 P3에 대한 단클론항체

No.	Clone Name	SCREEN RESULTS					IFA	ISOTYPING	SELECTION
		ELISA							
		E. coli cell lysate	BLV P3	10% FBS	BLV Virus				
1	12F12	0.07	3.83	0.06	0.83	+	IgG2b, kappa	●	
2	1D57	0.07	3.76	0.05	0.94	+	IgG2b, kappa	●	
3	1D72	0.06	3.98	0.05	0.79	+	IgG2b, kappa	●	
4	12A73	0.06	3.49	0.05	0.21	+	IgG1, kappa	●	
5	11A26	0.06	3.67	0.06	0.55	+	IgG1, kappa	●	
6	10H37	0.08	3.77	0.05	0.98	+	IgG2b, kappa	●	
7	10H42	0.06	3.62	0.05	0.97	+	IgG2b, kappa	●	
8	8F57	0.07	3.63	0.05	0.82	+	IgG2b, kappa	●	
9	8F76	0.07	3.57	0.05	0.79	+	IgG2a, kappa	●	
10	8A91	0.06	3.57	0.05	0.81	+	IgG2b, kappa	●	
11	8A8	0.07	3.92	0.06	0.81	+	IgG2b, kappa	●	
12	10B24	0.08	3.74	0.05	0.83	+	IgG2b, kappa	●	
13	10B43	0.06	3.23	0.05	0.85	+	IgG1, kappa	●	
14	9D72	0.09	3.83	0.04	1.01	+	IgG2b, kappa	●	
15	2E42	0.07	3.73	0.05	0.94	+	IgG2b, kappa	●	
16	2E67	0.06	3.45	0.05	0.96	+	IgG2b, kappa	●	
17	1C13	0.07	3.63	0.05	0.84	+	IgG2b, kappa	●	
18	1C21	0.06	3.52	0.05	0.78	+	IgG2b, kappa	●	

[0095]

표 5

재조합단백질 BLV gp51 P4에 대한 단클론항체

No.	Clone Name	SCREEN RESULTS					IFA	ISOTYPING	SELECTION
		ELISA							
		E. coli cell lysate	BLV P4	10% FBS	BLV virus				
1	1C27	0.06	2.86	0.06	1.98	+	IgG1, kappa	●	
2	1C28	0.06	2.94	0.05	1.42	+	IgG1, kappa	●	
3	12864	0.07	2.84	0.05	1.35	+	IgG2a, kappa	●	
4	12867	0.07	2.89	0.05	1.85	+	IgG2a, kappa	●	
5	3C96	0.05	3.23	0.06	1.09	+	IgG2b, kappa	●	
6	8F50	0.05	3.46	0.05	1.25	+	IgG1, kappa	●	
7	8F51	0.06	3.56	0.05	1.09	+	IgG1, kappa	●	
8	5G67	0.08	3.44	0.05	0.97	+	IgG1, kappa	●	
9	5G89	0.06	3.21	0.05	1.06	+	IgG1, kappa	●	
10	11D25	0.05	2.76	0.05	1.22	+	IgG1, kappa	●	
11	11D56	0.05	2.88	0.04	0.95	+	IgG1, kappa	●	

[0097]

[0100] 실시예 3: 블로킹능을 가지는 BLV gp51 단클론항체 선발

[0101] 3-1: BLV gp51 재조합단백질 4종과의 블로킹능 확인

[0102] 위와 같은 방법으로 선발된 단클론항체와 4종의 BLV gp51 재조합단백질과의 반응성 및 블로킹능을 간접 ELISA법 (indirect ELISA)과 블로킹 ELISA법을 이용하여 확인하였다.

[0104] 간접 ELISA법(indirect ELISA)

[0105] 단계 1: mAb와 항원과의 반응

- [0106] mAb를 PBS 버퍼에 1/10 희석 후 BLV gp51 재조합단백질이 코팅된 플레이트에 100 μ l씩 분주하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 0.05% PBST 버퍼로 3번 세척하였다.
- [0107]
- [0108] 단계 2: 2차 Ab과의 반응
- [0109] 2차 항체인 페록시다아제 표지(Peroxidase labeled) 항-마우스 IgG(H+L) 항체(KPL)를 50 ng로 희석하여 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 0.05% PBST 버퍼로 3번 세척하였다.
- [0111] 단계 3: 기질 반응
- [0112] 기질(TMB; Surmodics)을 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 상온에서 10분 반응시켰다.
- [0114] 단계 4: 기질 반응 중지 및 리딩
- [0115] 황산 0.5 M를 플레이트에 50 μ l씩 분주한 뒤 Sunrise ELISA reader(Tecan)를 이용하여 450 nm에서 리딩 후 결과를 분석하였다.
- [0117] 블로킹 ELISA
- [0118] 단계 1: 혈청과 항원과의 반응
- [0119] 혈청을 0.1% PBST 버퍼에 1/2 희석 후 BLV gp51 재조합단백질이 코팅된 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 0.05% PBST 버퍼로 3번 세척하였다.
- [0121] 단계 2: mAb와 항원과의 반응
- [0122] mAb를 PBS 버퍼에 1/10 희석 후 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 0.05% PBST 버퍼로 3번 세척하였다.
- [0124] 단계 3: 2차 Ab과의 반응
- [0125] 2차 항체인 페록시다아제 표지(Peroxidase labeled) 항-마우스 IgG(H+L) 항체(KPL)를 50 ng로 희석하여 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 0.05% PBST 버퍼로 3번 세척하였다.
- [0127] 단계 4: 기질 반응
- [0128] 기질(TMB; Surmodics)을 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 상온에서 10분 반응시켰다.
- [0130] 단계 5: 기질 반응 중지 및 리딩
- [0131] 황산 0.5 M를 플레이트에 50 μ l씩 분주한 뒤 Sunrise ELISA reader(Tecan)를 이용하여 450 nm에서 리딩 후 결과를 분석하였다.
- [0133] 실험 결과 4종의 BLV gp51 재조합단백질로 만든 단클론항체들 모두 각각 P1, P2, P3, P4의 재조합단백질과 반응성이 있으나 블로킹능은 없는 것으로 나타났다(BLV gp51 P1,P2,P4 단클론항체 결과 생략). 실험결과 중 BLV gp51 P3 재조합단백질로 만든 단클론항체들 9개에 대한 결과들도 4a-4d에 나타났다.
- [0135] 3-2: BLV 바이러스와의 블로킹능 확인
- [0136] 선발된 단클론항체와 BLV 바이러스 간의 블로킹능을 블로킹 ELISA법을 이용하여 확인하였다.
- [0138] 블로킹 ELISA
- [0139] 단계 1: 혈청과 항원과의 반응
- [0140] 혈청을 0.1% PBST 버퍼에 1/2 희석 후 BLV 바이러스가 코팅된 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 0.05% PBST 버퍼로 3번 세척하였다.
- [0142] 단계 2: mAb와 항원과의 반응
- [0143] mAb를 PBS 버퍼에 1/10 희석 후 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 0.05% PBST 버퍼로 3번 세척하였다.
- [0145] 단계 3: 2차 Ab과의 반응

- [0146] 2차 항체인 페록시다아제 표지(Peroxidase labeled) 항-마우스 IgG(H+L) 항체(KPL)를 50 ng로 희석하여 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 0.05% PBST 버퍼로 3번 세척하였다.
- [0148] 단계 4: 기질 반응
- [0149] 기질(TMB; Surmodics)을 플레이트에 100 μ l씩 분주하고 상온에서 10분 반응시켰다.
- [0151] 단계 5: 기질 반응 중지 및 리딩
- [0152] 황산 0.5 M를 플레이트에 50 μ l씩 분주한 뒤 Sunrise ELISA reader(Tecan)를 이용하여 450 nm에서 리딩 후 결과를 분석하였다.
- [0154] 실험 결과 4종의 BLV gp51 재조합단백질로 만든 단클론항체들 중 BLV gp51 P1, P2, P4 재조합단백질로 만든 단클론항체들 중에는 블로킹능을 가진 항체들은 존재하지 않았으며, 블로킹능을 가진 항체들은 모두 BLV gp51 P3 재조합단백질로 만든 항체들에서 나타났다. BLV gp51 P3 재조합단백질로 만든 단클론항체 중 8A8, 10B43, 9D72, 2E42, 8F76, 12F12, 10H37 항체(총 7개)만이 블로킹능이 우수하였다. 실험결과 중 BLV gp51 P1, P2, P4 재조합단백질로 만든 단클론항체들 중 일부와 BLV gp51 P3 재조합단백질로 만든 단클론항체들에 대한 결과들도 5a 및 5b에 나타냈다(BLV gp51 P1, P2, P4 단클론항체 일부 결과 생략).
- [0156] **실시예 4: BLV gp51 P3 재조합단백질로 만든 단클론항체 에피토프 인식 부위 및 타입 결정**
- [0157] BLV gp51 P3 재조합단백질로 만든 단클론항체 중 8A8, 10B43, 9D72, 2E42, 8F76, 12F12, 10H37 항체(총 7개)는 위의 ELISA 결과에서 볼 수 있듯이 BLV gp51 P1, P2, P3, P4 재조합단백질에 모두 반응한다. 그러므로 BLV gp51 P1, P2, P3, P4 부위 중 공통적인 부분인 BLV gp51 P4 부위 중 특정 에피토프 부위를 인식하는 항체들이었으므로 보인다.
- [0158] 또한 이러한 단클론항체들이 인식하는 아미노산 서열부위의 형태(conformational type 혹은 sequential type)를 결정하기 위하여 BLV gp51 P4 재조합단백질을 사용하여 웨스턴블롯(western blotting)을 실시하였다. 음성대조로 노말(normal) 세포 용해물을 사용하였다. 실험 결과 BLV gp51 P4 재조합단백질과 블로킹능이 있는 7개의 단클론항체들은 모두 웨스턴블롯에서 반응을 확인하였다. 그러므로 7개의 단클론항체들은 모두 sequential type의 항체들이었으므로 보인다. 단클론항체 9D72에 대한 웨스턴블롯 결과 사진은 도 6에 나타냈다(9D72 클론을 제외한 결과 사진은 생략).
- [0159] 삭제
- [0160] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0161] 삭제

수탁번호

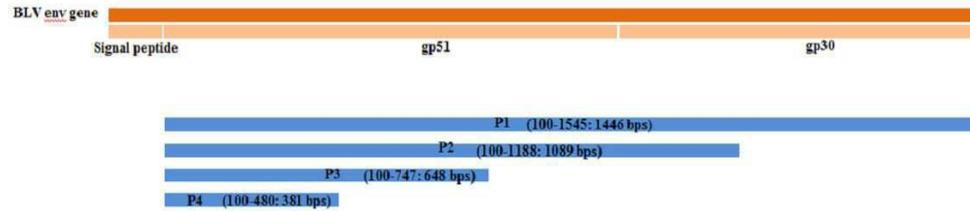
- [0162] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
수탁번호 : KCTC18355BP
수탁일자 : 20150213

기탁기관명 : 한국생명공학연구원
수탁번호 : KCTC18356BP

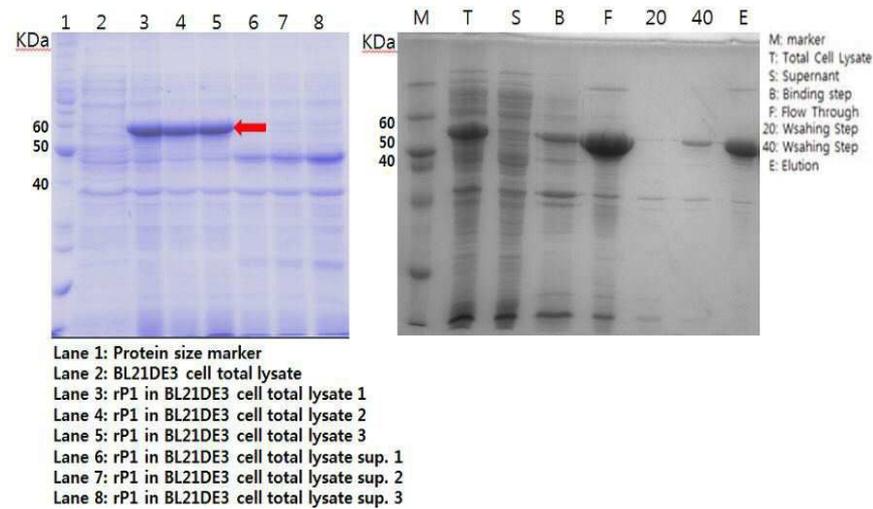
수탁일자 : 20150213

도면

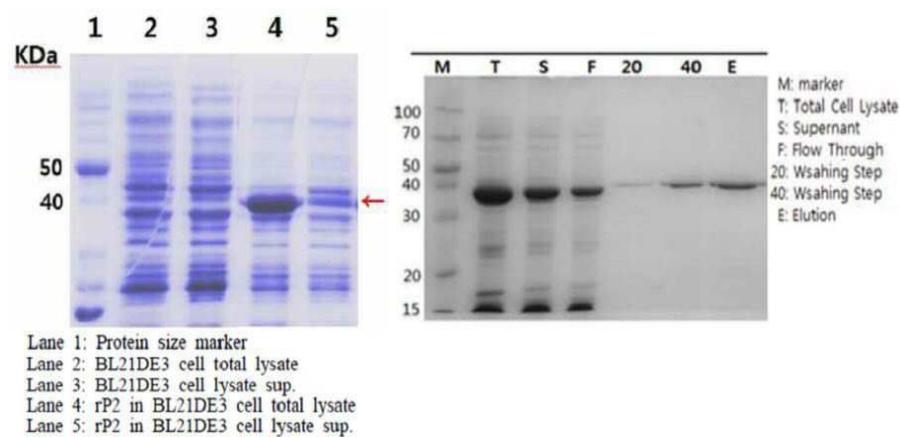
도면1



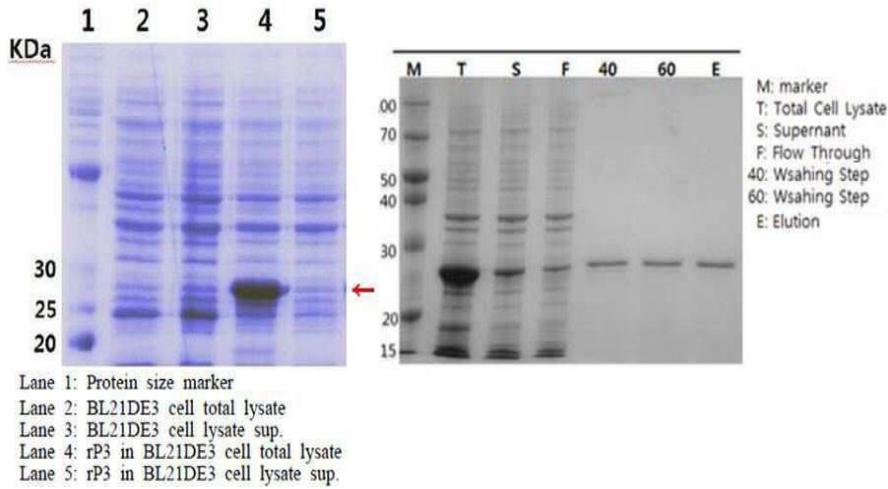
도면2a



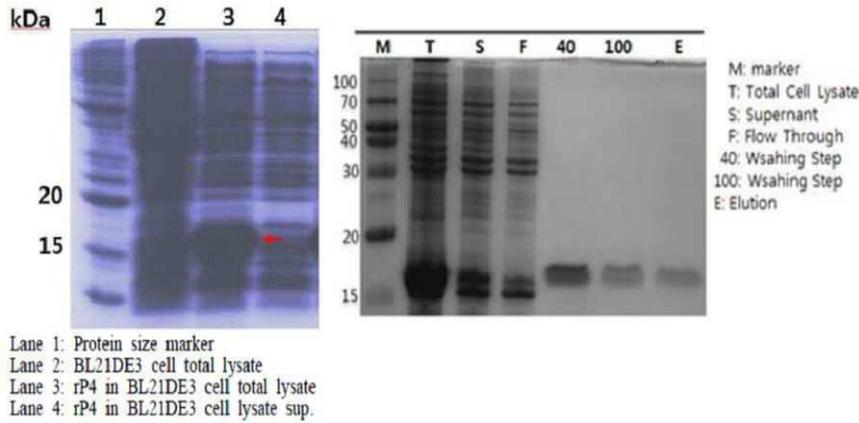
도면2b



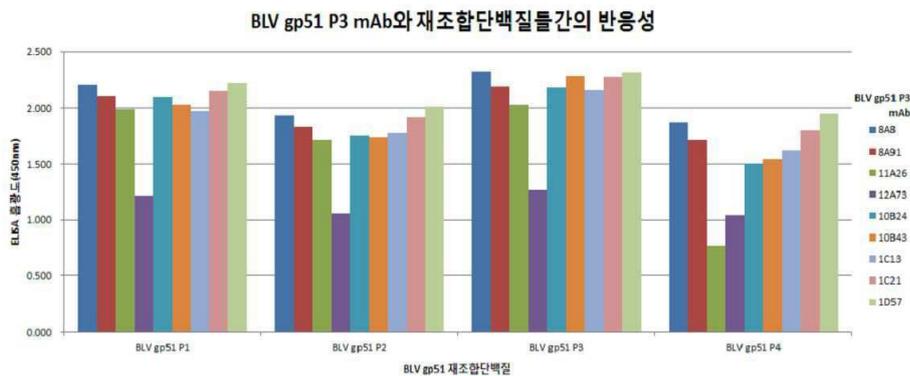
도면2c



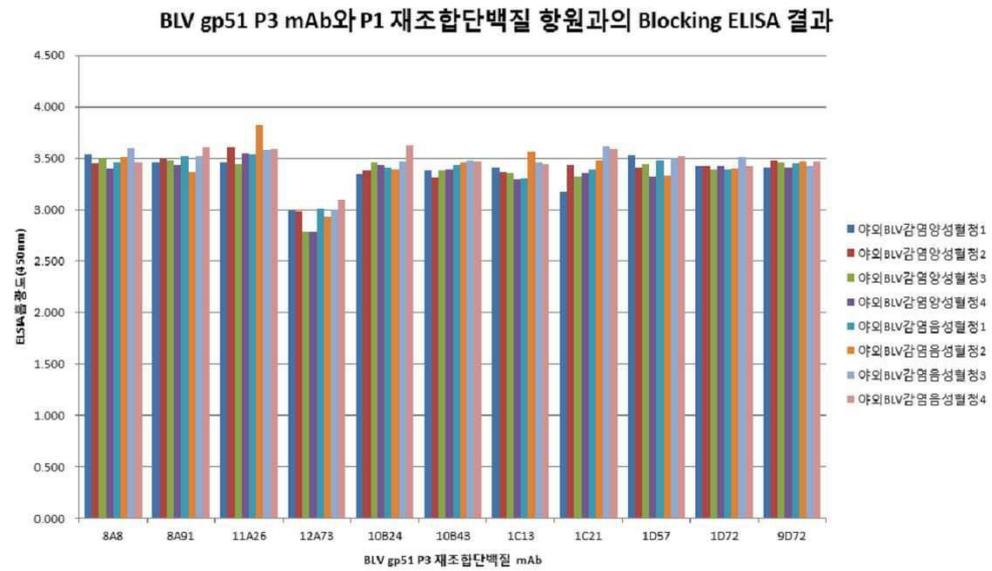
도면2d



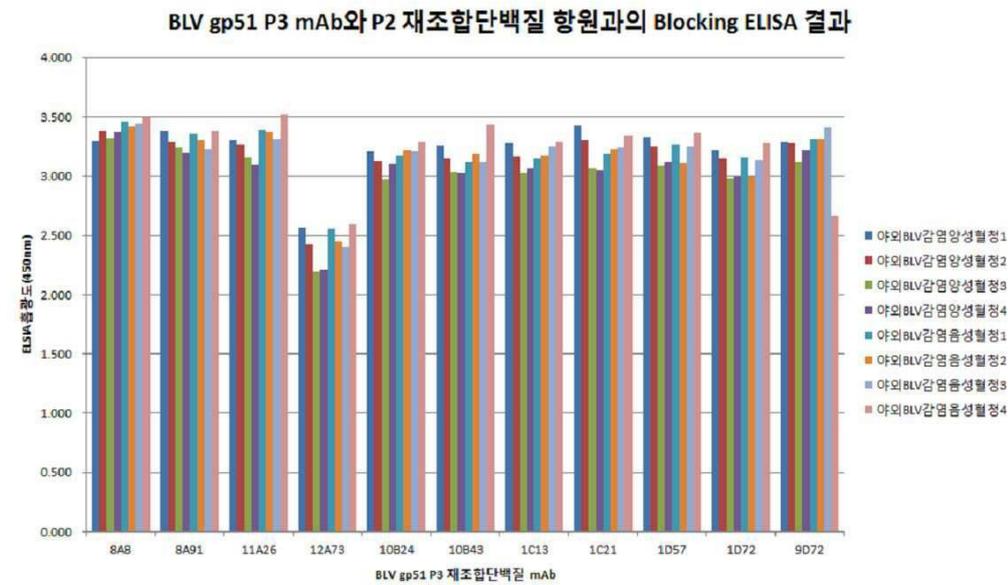
도면3



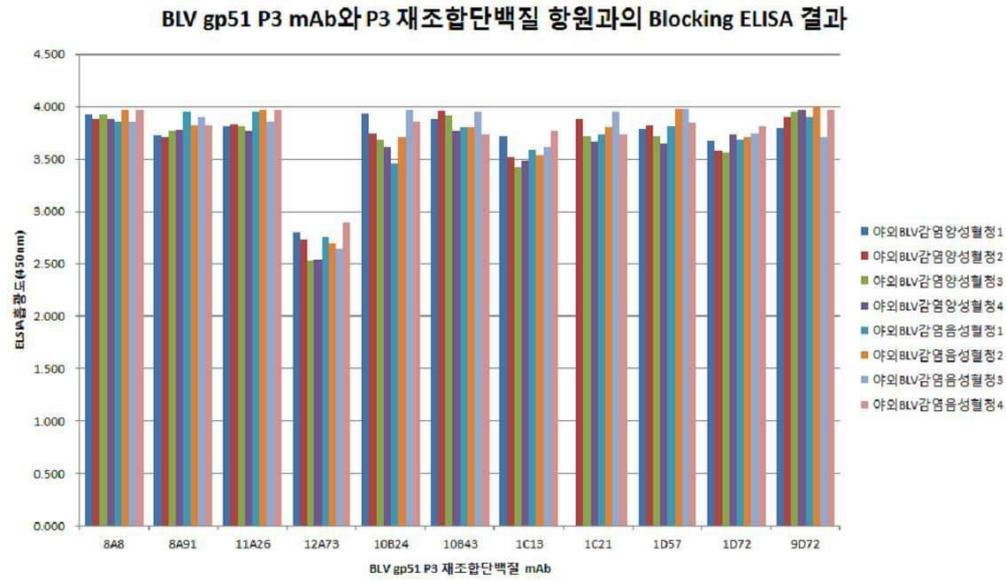
도면4a



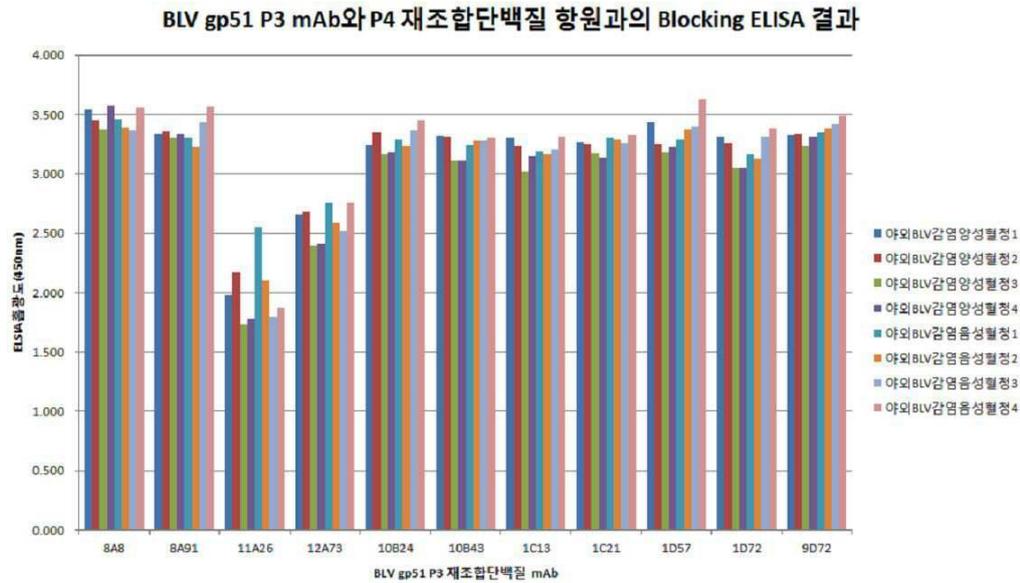
도면4b



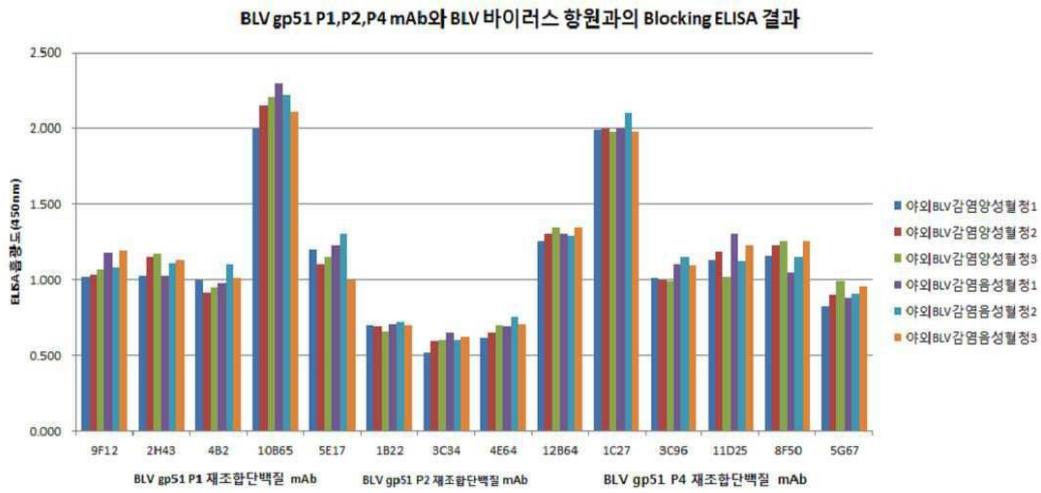
도면4c



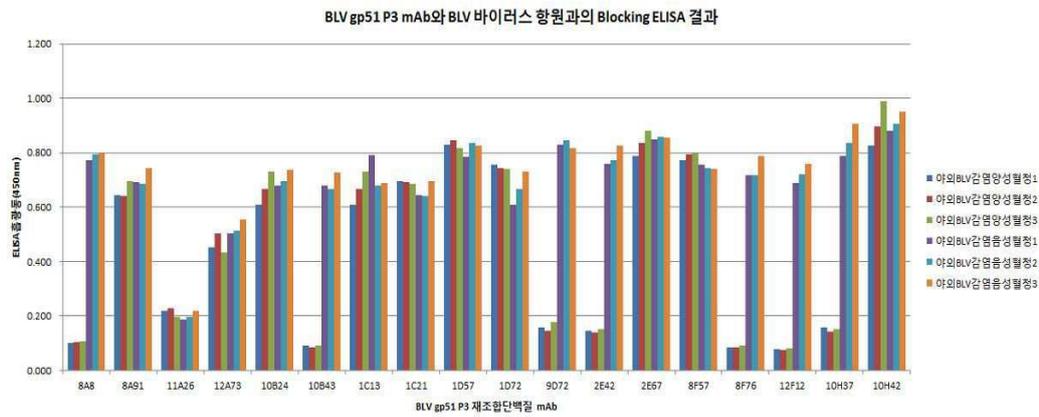
도면4d



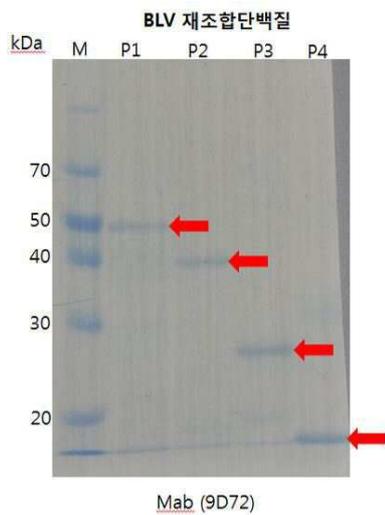
도면5a



도면5b



도면6



서열 목록

<110> MEDIAN Diagnostics Inc.
 <120> Monoclonal Antibodies Specifically Binding to Glycoprotein 51 of
 Bovine Leukemia Virus and Its Use
 <130> PN150029
 <160> 16
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BLV gp51 P1 A/a
 <400> 1

Trp Arg Cys Ser Leu Ser Leu Gly Asn Gln Gln Trp Met Thr Ala Tyr
 1 5 10 15
 Asn Gln Glu Ala Lys Phe Ser Ile Ser Ile Asp Gln Ile Leu Glu Ala
 20 25 30
 His Asn Gln Ser Pro Phe Cys Ala Lys Ser Pro Arg Tyr Thr Leu Asp
 35 40 45
 Ser Val Asn Gly Tyr Pro Lys Ile Tyr Trp Pro Pro Pro Gln Gly Arg
 50 55 60
 Arg Arg Phe Gly Ala Arg Ala Met Val Thr Tyr Asp Cys Glu Pro Arg
 65 70 75 80
 Cys Pro Tyr Val Gly Ala Asp Arg Phe Asp Cys Pro His Trp Asp Asn
 85 90 95
 Ala Ser Gln Ala Asp Gln Gly Ser Phe Tyr Val Asn His Gln Ile Leu
 100 105 110
 Phe Leu His Leu Lys Gln Cys His Gly Ile Phe Thr Leu Thr Trp Glu
 115 120 125
 Ile Trp Gly Tyr Asp Pro Leu Ile Thr Phe Ser Leu His Lys Ile Pro
 130 135 140
 Asp Pro Pro Gln Pro Asp Phe Pro Gln Leu Asn Ser Asp Trp Val Pro
 145 150 155 160

Ser Val Arg Ser Trp Ala Leu Leu Leu Asn Gln Thr Ala Arg Ala Phe
 165 170 175
 Pro Asp Cys Ala Ile Cys Trp Glu Pro Ser Pro Pro Trp Ala Pro Glu
 180 185 190
 Ile Leu Val Tyr Asn Lys Thr Ile Ser Ser Ser Gly Pro Gly Leu Ala
 195 200 205
 Leu Pro Asp Ala Gln Ile Phe Trp Val Asn Thr Ser Ser Phe Asn Thr
 210 215 220
 Thr Gln Gly Trp His His Pro Ser Gln Arg Leu Leu Phe Asn Val Ser
 225 230 235 240
 Gln Gly Asn Ala Leu Leu Leu Pro Pro Ile Ser Leu Val Asn Leu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Ser Ser Ala Pro Pro Thr Arg Val Arg Arg Ser Pro Val Ala
 260 265 270
 Ala Leu Thr Leu Gly Leu Ala Leu Ser Val Gly Leu Thr Gly Ile Asn
 275 280 285
 Val Ala Val Ser Ala Leu Ser His Gln Arg Leu Thr Ser Leu Ile His
 290 295 300
 Val Leu Glu Gln Asp Gln Gln Arg Leu Ile Thr Ala Ile Asn Gln Thr
 305 310 315 320
 His Tyr Asn Leu Leu Asn Val Ala Ser Val Val Ala Gln Asn Arg Arg
 325 330 335
 Gly Leu Asp Trp Leu Tyr Ile Arg Leu Gly Phe Gln Ser Leu Cys Pro
 340 345 350
 Thr Ile Asn Glu Pro Cys Cys Phe Leu Arg Ile Gln Asn Asp Ser Ile
 355 360 365
 Ile Arg Leu Gly Asp Leu Gln Pro Leu Ser Gln Arg Val Ser Thr Asp
 370 375 380
 Trp Gln Trp Pro Trp Asn Trp Asp Leu Gly Leu Thr Ala Trp Val Arg
 385 390 395 400
 Glu Thr Ile His Ser Val Leu Ser Leu Phe Leu Leu Ala Leu Phe Leu

405 410 415
 Leu Phe Leu Ala Pro Cys Leu Ile Lys Cys Leu Thr Ser Arg Leu Leu

420 425 430
 Lys Leu Leu Arg Gln Ala Pro His Phe Pro Glu Ile Ser Leu Thr Pro
 435 440 445

Lys Pro Asp Ser Asp Tyr Gln Ala Leu Leu Pro Ser Ala Pro Glu Ile

450 455 460
 Tyr Ser His Leu Ser Pro Val Lys Pro Asp Tyr Ile Asn Leu Arg Pro
 465 470 475 480
 Cys Pro

<210> 2
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BLV gp51 P2 A/a
 <400> 2

Trp Arg Cys Ser Leu Ser Leu Gly Asn Gln Gln Trp Met Thr Ala Tyr
 1 5 10 15
 Asn Gln Glu Ala Lys Phe Ser Ile Ser Ile Asp Gln Ile Leu Glu Ala

20 25 30
 His Asn Gln Ser Pro Phe Cys Ala Lys Ser Pro Arg Tyr Thr Leu Asp
 35 40 45
 Ser Val Asn Gly Tyr Pro Lys Ile Tyr Trp Pro Pro Pro Gln Gly Arg
 50 55 60
 Arg Arg Phe Gly Ala Arg Ala Met Val Thr Tyr Asp Cys Glu Pro Arg
 65 70 75 80
 Cys Pro Tyr Val Gly Ala Asp Arg Phe Asp Cys Pro His Trp Asp Asn
 85 90 95

Ala Ser Gln Ala Asp Gln Gly Ser Phe Tyr Val Asn His Gln Ile Leu
 100 105 110
 Phe Leu His Leu Lys Gln Cys His Gly Ile Phe Thr Leu Thr Trp Glu

<211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BLV gp51 P3 A/a

<400> 3

Trp Arg Cys Ser Leu Ser Leu Gly Asn Gln Gln Trp Met Thr Ala Tyr
 1 5 10 15
 Asn Gln Glu Ala Lys Phe Ser Ile Ser Ile Asp Gln Ile Leu Glu Ala
 20 25 30
 His Asn Gln Ser Pro Phe Cys Ala Lys Ser Pro Arg Tyr Thr Leu Asp
 35 40 45
 Ser Val Asn Gly Tyr Pro Lys Ile Tyr Trp Pro Pro Pro Gln Gly Arg
 50 55 60
 Arg Arg Phe Gly Ala Arg Ala Met Val Thr Tyr Asp Cys Glu Pro Arg
 65 70 75 80
 Cys Pro Tyr Val Gly Ala Asp Arg Phe Asp Cys Pro His Trp Asp Asn
 85 90 95
 Ala Ser Gln Ala Asp Gln Gly Ser Phe Tyr Val Asn His Gln Ile Leu
 100 105 110
 Phe Leu His Leu Lys Gln Cys His Gly Ile Phe Thr Leu Thr Trp Glu
 115 120 125
 Ile Trp Gly Tyr Asp Pro Leu Ile Thr Phe Ser Leu His Lys Ile Pro
 130 135 140
 Asp Pro Pro Gln Pro Asp Phe Pro Gln Leu Asn Ser Asp Trp Val Pro
 145 150 155 160
 Ser Val Arg Ser Trp Ala Leu Leu Leu Asn Gln Thr Ala Arg Ala Phe
 165 170 175
 Pro Asp Cys Ala Ile Cys Trp Glu Pro Ser Pro Pro Trp Ala Pro Glu
 180 185 190
 Ile Leu Val Tyr Asn Lys Thr Ile Ser Ser Ser Gly Pro Gly Leu Ala
 195 200 205

Leu Pro Asp Ala Gln Ile Phe Trp

210 215

<210> 4

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BLV gp51 P4 A/a

<400> 4

Trp Arg Cys Ser Leu Ser Leu Gly Asn Gln Gln Trp Met Thr Ala Tyr

1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Lys Phe Ser Ile Ser Ile Asp Gln Ile Leu Glu Ala

20 25 30

His Asn Gln Ser Pro Phe Cys Ala Lys Ser Pro Arg Tyr Thr Leu Asp

35 40 45

Ser Val Asn Gly Tyr Pro Lys Ile Tyr Trp Pro Pro Pro Gln Gly Arg

50 55 60

Arg Arg Phe Gly Ala Arg Ala Met Val Thr Tyr Asp Cys Glu Pro Arg

65 70 75 80

Cys Pro Tyr Val Gly Ala Asp Arg Phe Asp Cys Pro His Trp Asp Asn

85 90 95

Ala Ser Gln Ala Asp Gln Gly Ser Phe Tyr Val Asn His Gln Ile Leu

100 105 110

Phe Leu His Leu Lys Gln Cys His Gly Ile Phe Thr Leu Thr Trp

115 120 125

<210> 5

<211> 1446

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BLV gp51 P1 Nucleotide

<400> 5

tggagatgct ccctgtccct aggaaaccaa caatggatga cagcatataa ccaagaggca 60

aaattttcca tctccattga ccaaatacta gaggctcata atcagtcacc tttctgtgcc 120

aagtctccca gatacacctt ggactctgia aatggctatc ctaagatcta ctggccccc	180
ccacaagggc ggcgccggtt tggagccagg gccatggtca catatgattg cgagccccga	240
tgcccttatg tgggggcaga tcgcttcgac tgccccact gggacaatgc ctcccaggcc	300
gatcaaggat ccttttatgt caatcatcag attttatcc tgcacttaa acaatgcat	360
ggaattttca ctctaacctg ggagatatgg ggatatgac ccctgatcac cttttcttta	420
cataagatec ctgatecccc tcaaccggac tttccccagt tgaacagtga ctgggttccc	480
tctgtcagat catgggcctt gcttttaaac caaacagcac gggccttccc agactgtgct	540
atatgttggg aaccttcccc tcctgggct cccgaaatat tagtatataa caaaaccatc	600
tccagctctg gaccggcct cgccctccc gacgccc aaa tcttctgggt caacacgtcc	660
tcgtttaaca ccaccaagg atggcaccac cttcccaga ggttgttgtt caatgtttct	720
caaggcaacg cctgttatt acctectatc tcctggtta atctctctac ggcttctec	780
gcccctcta cccgggtcag acgtagtccc gtcgcagccc tgacctagg cctagccctg	840
tcagtggggc tcaactggaat taatgtggcc gtgtctgccc ttagccatca gagactcacc	900
tcctgatcc agttctgga gcaagatec caacgcttga tcacagcaat taaccagacc	960
cactataatt tgcttaatgt ggctctgtg gttgccaga accgacgggg gcttgattgg	1020
ttgtacatcc ggcctgggtt tcaaagccta tgtcccaca ttaatgagcc ttgctgttc	1080
ctgcgcatc aaaaatgact cattatcgc ctgggtgate tccagcctct ctgcaaaaga	1140
gtctctacag actggcagtg gccctggaat tgggatctgg ggctcactgc ctgggtgca	1200
gaaaccatc attctgttct aagcctgttc ctattagccc ttttttctct ctctctgccc	1260
ccctgctga taaaatgctt gacctctgc cttttaaac tcctccggca ggctccccac	1320
ttccctgaaa tctcctaac ccctaaacc gattctgatt atcaggcctt gctaccatct	1380
gcaccagaga tctactctca cctctcccc gtc aaaccg attacatcaa cctccgacc	1440
tgccct	1446
<210> 6	
<211> 1089	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> BLV gp51 P2 Nucleotide	
<400> 6	
tggagatgct ccctgtccct aggaaaccaa caatggatga cagcatataa ccaagaggea	60
aaattttcca tctccattga ccaaaacta gaggctcata atcagtcacc tttctgtgcc	120

aagtctccca gatacacctt ggactctgta aatggctatc ctaagatcta ctggccccc 180
 ccacaagggc ggcgccggtt tggagccagg gccatggtca catatgattg cgagccccga 240
 tgcccttatg tgggggcaga tcgcttcgac tgcceccact gggacaatgc ctcccaggcc 300
 gatcaaggat ccttttatgt caatcatcag attttatcc tgcacttaa acaatgtcat 360

ggaattttca ctctaacctg ggagatatgg ggatatgac ccctgatcac cttttcttta 420
 cataagatcc ctgatecccc tcaaccggac tttcccagc tgaacagtga ctgggttccc 480
 tctgtcagat catgggcctt gcttttaaac caaacagcac gggccttccc agactgtgct 540
 atatgttggg aaccttcccc tcctgggct cccgaaatat tagtatataa caaaaccatc 600
 tccagctctg gaccggcct cgccctccc gacgccc aaa tcttctgggt caacacgtcc 660
 tcgtttaaca ccaccaagg atggcaccac ccttcccaga ggttgttgtt caatgtttct 720
 caaggcaacg ccttgttatt acctctatc tcctgggta atctctctac ggcttctcc 780

gccctccta cccgggtcag acgtagtccc gtcgcagccc tgacctagg ctagccctg 840
 tcagtggggc tcaactggaat taatgtggcc gtgtctgccc ttagccatca gagactcacc 900
 tcctgatcc acgttctgga gcaagatcag caacgcttga tcacagcaat taaccagacc 960
 cactataatt tgcttaatgt ggcctctgtg gttgccaga accgacgggg gcttgattgg 1020
 ttgtacatcc ggcctgggtt tcaaagccta tgcaccaca ttaatgagcc ttgctgttc 1080
 ctgcgcatt 1089

<210> 7
 <211> 648
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BLV gp51 P3 Nucleotide

<400> 7
 tggagatgct ccctgtccct aggaaaccaa caatggatga cagcatataa ccaagaggca 60
 aaattttcca tctcattga ccaataacta gaggctcata atcagtcacc tttctgtgcc 120
 aagtctccca gatacacctt ggactctgta aatggctatc ctaagatcta ctggccccc 180
 ccacaagggc ggcgccggtt tggagccagg gccatggtca catatgattg cgagccccga 240
 tgcccttatg tgggggcaga tcgcttcgac tgcceccact gggacaatgc ctcccaggcc 300
 gatcaaggat ccttttatgt caatcatcag attttatcc tgcacttaa acaatgtcat 360
 ggaattttca ctctaacctg ggagatatgg ggatatgac ccctgatcac cttttcttta 420
 cataagatcc ctgatecccc tcaaccggac tttcccagc tgaacagtga ctgggttccc 480

tctgtcagat catgggcct gcttttaaac caaacagcac ggccttccc agactgtgct 540
 atatgttggg aaccttccc tcctgggct cccgaaatat tagtatataa caaacaccatc 600
 tccagctctg gaccggcct cgcctccc gacgccc aaa tcttctgg 648

<210> 8

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BLV gp51 P4 Nucleotide

<400>

8

tggagatgct ccctgtcct aggaaccaa caatggatga cagcatataa ccaagaggca 60
 aaattttcca tctcattga ccaataacta gaggtcata atcagtcacc tttctgtgcc 120
 aagtctccca gatacacctt ggactctgta aatggctatc ctaagatcta ctggccccc 180
 ccacaagggc ggcgccggtt tggagccagg gccatggtca catatgattg cgagcccga 240
 tgccttatg tgggggcaga tgccttcgac tgcceccact gggacaatgc ctcccaggcc 300
 gatcaaggat ccttttatgt caatcatcag atttattcc tgcacttaa acaatgcat 360
 ggaattttca ctctaacctg g 381

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BLV gp51 P1 Forward Primer

<400> 9

cgcaattct ggagatgctc cctgtcccta ggaaa 35

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BLV gp51 P1 Reverse Primer

<400> 10

cccgcggccg cccaggttag agtgaaaatt cc 32

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> BLV gp51 P2 Forward Primer

<400> 11
 cgccaattct ggagatgctc cctgtcccta ggaaa 35

<210> 12
 <211> 37
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> BLV gp51 P2 Reverse Primer

<400> 12
 cgccctcgaga atgcgcagga aacagcaagg ctatta 37

<210> 13
 <211> 35
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> BLV gp51 P3 Forward Primer

<400> 13
 cgccaattct ggagatgctc cctgtcccta ggaaa 35

<210> 14
 <211> 28
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> BLV gp51 P3 Reverse Primer

<400> 14
 cgccctcgagc cagaagattt gggcgtcc 28

<210> 15
 <211> 35
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> BLV gp51 P4 Forward Primer

<400> 15
 cgccaattct ggagatgctc cctgtcccta ggaaa 35

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BLV gp51 P4 Reverse Primer

<400> 16

cgcctcgagc ccagaagatt tgggcgtcc

29