



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0084079
(43) 공개일자 2024년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/10 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/10 (2023.08)
A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0168497

(22) 출원일자 2022년12월06일

심사청구일자 2022년12월06일

(71) 출원인

상지대학교산학협력단

강원도 원주시 상지대길 83 (우산동, 상지대학교)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

나정현

서울특별시 성북구 종암로14길 13-7, 202호

정상택

서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 702호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)유일하이스트

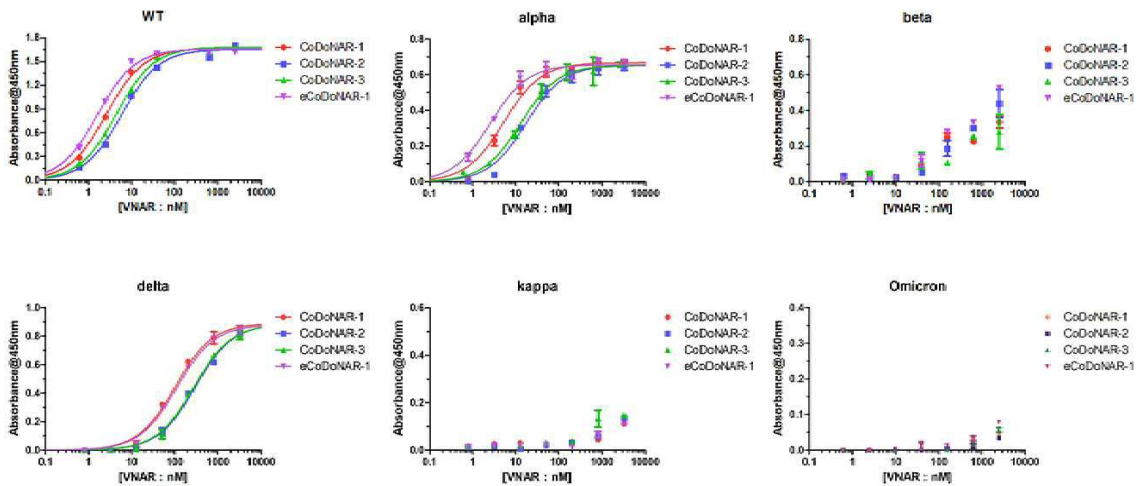
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 제2형 중증급성호흡기중후군 코로나 바이러스 표적 상어 유래 단일 도메인 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 RBD(receptor binding domain)에 특이적으로 결합하는 상어 유래 단일 도메인 항체(VNAR)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)
G01N 33/56983 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
G01N 2333/165 (2013.01)

(71) 출원인

재단법인 오송첨단의료산업진흥재단
 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명로 123
국립부경대학교 산학협력단
 부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

이원규
 경기도 고양시 덕양구 푸른마을로 54 푸른마을4단지아파트 404동 1602호
김진구
 부산광역시 해운대구 좌동순환로99번길 6 301-1204
채희도
 경기도 양주시 부흥로 1898-4, 102동 602호
김우성
 경기도 용인시 기흥구 이현로29번길 72-7, 107동 401호
이지선
 서울특별시 은평구 불광로1길 12, 8층 801호
정인지
 서울특별시 노원구 동일로208길 20, 209-606
이도현
 서울특별시 은평구 은평터널로 164 101-1402
이우준
 경상남도 창원시 마산회원구 양덕서로 30 메트로시티 1차 103동 1103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711135635
과제번호	2021R1F1A1060240
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	생산원가 절감형 고감도 신속 면역 진단 키트 플랫폼 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	상지대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 RBD(receptor binding domain)에 특이적으로 결합하는 상어 유래 단일 도메인 항체(VNAR)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 VNAR가 하기 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1;

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2;

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및

서열번호 5 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 VNAR가 하기 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1;

서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2;

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및

서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 VNAR가 하기 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1;

서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2;

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및

서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 VNAR가 하기 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1;

서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2;

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및

서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 VNAR가 하기 아미노산 서열들 중 하나를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열;

서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열;

서열번호 10로 표시되는 아미노산 서열; 및

서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

제 1항에 있어서,

적어도 1개 이상의 아미노산 치환이 보존적 치환인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 VNAR는 SARS-CoV-2 또는 이의 변이 바이러스에 중화능이 있는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

면역조정제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물에 접합된 제1항 내지 제5항, 제7항, 제8항 중 어느 한항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체.

청구항 10

제1항 내지 제5항, 제7항, 제8항의 어느 한항의 의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 11

제1항 내지 제5항, 제7항, 제8항의 어느 한항의 의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 유효성분으로 함유하는, 코로나바이러스감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제5항, 제7항, 제8항의 어느 한항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 코로나바이러스감염증-19 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)에 대한 단일 도메인 항체(Single domain antibody; sdAb) 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 RBD(receptor binding domain)에 특이적으로 결합하는 까치상어 유래 단일 도메인 항체(Variable new antigen receptor; VNAR)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신종 코로나바이러스인 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)는 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 수용체 결합 도메인(receptor binding domain; RBD)과 숙주 세포의 안지오텐신 전환 효소 2(angiotensin converting enzyme 2; ACE2) 사이의 상호 작용을 통해 숙주 세포로 감염된다.

[0003] 현재 다양한 COVID-19 치료제의 개발이 진행되고 있다. 예를 들어, 면역글로불린 G (Immunoglobulin G; IgG)

기반의 단일 클론 중화항체들이 SARS-CoV-2에 대한 치료제 및 진단 키트로 개발되고 있다.

- [0004] 일례로, 한국 특허공개공보 제2022-0136945호(발명의 명칭: 사스-코로나바이러스-2 스파이크 단백질의 에피토프에 결합하는 사스-코로나바이러스-2 중화 결합 분자)는, SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 RBD(receptor binding domain)에 특이적으로 결합하는 단일 클론 항체(monoclonal antibody)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 개시하고 있다.
- [0005] SARS-CoV-2의 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 RBD에 특이적으로 결합하는 단일 도메인 항체(sdAb)은 낙타류와 연골어류에서 유래된 단일 도메인 항체들이 개발되고 있다. 예를 들어, 낙타 유래 단일 도메인 항체가 SARS-CoV-2를 광범위하게 중화 시킨다는 논문(Arsenal of nanobodies shows broad-spectrum neutralization against SARS-CoV-2 variants of concern in vitro and in vivo in hamster models / Martin A. Rossotti / Communications biology, 2022, 5, 993 과 상어 유래 단일 도메인 항체가 SARS-CoV-2를 광범위하게 중화 시킨다는 논문(a Class of Shark-Derived Single-Domain Antibodies can Broadly Neutralize SARS-Related Coronaviruses and the Structural Basis of Neutralization and Omicron Escape Bo Feng et al. / Small Methods, 2022, 6(7), e2200387 이 발표되기도 했다.
- [0006] 15 kDa의 분자량보다 작은 단일 도메인 항체들의 특정 그룹, 예를 들어 VNAR(variable new antigen receptor)은 상어 및 가오리와 같은 연골 어류에서 발견되었다. 단일 도메인 항체는 표적 단백질에 대한 높은 친화성, 더 나은 열 안정성, 작은 분자량 및 비포유동물 발현 시스템에서 낮은 생산 비용과 같은 이점을 갖는다. 단일 도메인 항체의 장점 중 하나는 IgG 기반의 단일 클론 항체보다 크기와 구조가 더 작고, 항원에 결합하는 상보성 결정부위가 매우 길기 때문에 전통적인 인간 항체가 도달할 수 없는 에피토프에 결합할 수 있다는 것이다.
- [0007] 한편 기존의 단일 클론 중화항체 개발의 경우, IgG 기반의 단일 클론 항체(150 kDa)의 분자 질량은 상대적으로 커서, 조직 침투가 어렵고, 투여 부위 주변으로의 확산이 쉽지 않아, 치료 효과가 불충분해지기 쉬우며, 면역원성 발생의 위험성 또한 높은 것으로 알려져 있다. 그리로 또 한편으로는 이러한 문제 극복을 위해 동물에서 유래된 단일 클론 항체의 경우는 완전 인간화를 추구하고 있는데, 이 경우 기존 항체보다 긴 개발 기간 및 높은 생산 단가의 문제가 있으며, 항체 자체의 새로운 안정성 이슈가 발생하는 등 여러 가지 요인으로 인해 개발이 쉽지 않은 상황이다.
- [0008] 이러한 기존 항체 치료제의 대안으로 새롭게 연구되고 있는 것으로 나노바디(Nanobody, VHH, Nb)와 VNAR와 같은 단일 도메인 항체가 있다(예를 들어 한국공개특허 10-2022-0064331(발명의 명칭:SARS-CoV-2에 대한 단일 도메인 항체 및 이의 용도) 참조).
- [0009] 나노바디는 낙타과 동물 등에서 발견되는 중쇄 전용 항체(hcAb)의 항원 인식 가변 부위(variable region)를 말한다. VNAR는 연골어류 동물 등에서 발견되는 면역글로불린 NAR(IgNAR)의 항원 인식 가변 부위를 말한다. 특히 기존 단일 클론 항체와 비교하여 단일 도메인 항체는 구조적으로 높은 항원 친화성 및 항원 특이성을 가지면서, 더 작은 크기(기존 IgG 기반 단일 클론 항체의 1/10 크기, 15 kDa)를 가지고 있어 조직 침투성이 상대적으로 높은 특성을 가지고 있다. 산업적 활용에 있어서도 단일 도메인 항체 구조는 높은 열 안정성을 가지고 있어서, 진단키트 제작에의 활용에 용이하고, 항체 제품으로 제작시 완제품에 대한 보관 및 사용에서 높은 편의성을 제공한다.
- [0010] 이에, 본 발명자들은 까치상어 유래 VNAR 제작 기술에 기반한, SARS-CoV-2를 표적화하는 신규 VNAR를 개발함으로써, 본 출원에 이르렀다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Bo Feng et al., a Class of Shark-Derived Single-Domain Antibodies can Broadly Neutralize SARS-Related Coronaviruses and the Structural Basis of Neutralization and Omicron Escape, Small Methods(2022), 6(7), e2200387
- (비특허문헌 0002) Obinna C. Ubah et al., Mechanisms of SARS-CoV-2 neutralization by shark variable new antigen receptors elucidated through X-ray crystallography, Nature communications(2021), 12, 7325

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)에 결합하는 상어 유래 단일 도메인 항체(Variable new antigen receptor, VNAR) 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 RBD(receptor binding domain)에 특이적으로 결합하는 상어 유래 단일 도메인 항체(VNAR)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0014] 일 측면에서, 상기 VNAR가 하기 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편일 수 있다.

[0015] 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1;

[0016] 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2;

[0017] 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및

[0018] 서열번호 5 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3.

[0019] 본 발명의 일 양태에서, 상기 VNAR는 적어도 1개 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 상기 적어도 1개 이상의 아미노산 치환이 보존적 치환일 수 있으며, 아미노산의 비-유전자 코딩 아미노산 또는 합성 아미노산으로의 치환일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 양태에서, 상기 항체는 이중특이적 또는 다중특이적일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 양태에서, VNAR는 SARS-CoV-2 또는 이의 변이 바이러스에 중화능이 있다.

[0022] 본 발명의 일 양태에서, 면역조절제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물이 접합될 수 있다. 이에, 본 발명은 면역조절제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물에 접합된 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체를 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는, 핵산 분자를 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 접합체를 유효성분으로 함유하는, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 아울러, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 코로나바이러스감염증-19 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에서는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 수용체 결합 도메인(receptor binding domain; RBD)에 특이적으로 결합하는 상어 유래 단일 도메인 항체(Variable new antigen receptor, VNAR)를 제작하였고, 이의 RBD에 대한 친화성 및 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 중화능이 우수함을 확인하였으므로, 상기 단일 도메인 항체를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 COVID-19 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로 용이하게 이용될 수 있다.

[0027] 또한, 상기 단일 도메인 항체를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 COVID-19 진단을 위해 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 일 실시예에 따라 제조한 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 수용체 결합 도메인(receptor binding domain; RBD) 특이적 단일 도메인 VNAR 항체의 아미노산 서열이다.

도 2는 Hiload 16/600 superdex 75 pg를 활용한 4종의 VNAR의 크기 배제 크로마토그래피 결과이다.

도 3은 4종의 VNAR 최종 정제 결과이다.

도 4는 ELISA 기반의 SARS-CoV-2 야생형 및 변이체 RBD에 대한 4종의 VNAR 결합력 검증 결과이다.

도 5는 CH3를 C-말단에 융합하여 포유류 기반 단백질 발현 시스템을 활용하여 제조한 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 RBD 특이적 VNAR의 SARS-CoV-2 야생형 pseudovirus에 대한 *in vitro* 중화능을 확인한 것이다.

도 6은 <실시예 1>에 따라 제조한 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 RBD 특이적 VNAR에 1시간 동안 다양한 온도에서 열 스트레스를 가한 후 야생형 RBD에 대한 4종의 VNAR 결합력 검증 결과이다.

도 7은 파지 디스플레이 라이브러리 제작을 위해 자체적으로 제작한 pYJ 벡터의 맵을 도시하고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 용어 "항체"는 이의 가장 넓은 의미로 사용되고, 이들이 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한, 비제한적으로 단클론성 항체, 다클론성 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 전장 항체 및 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 다양한 항체 구조를 포괄한다. 용어 "항체"는 종래의 4-쇄 항체, 단일 도메인 항체, 및 이의 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0031] 용어 "단일-도메인 항체" 또는 "sdAb"는 중쇄 (heavy chain)만 가지고 있는 항체 및 이의 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0032] 용어 "나노바디" 또는 "nanobody"는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)를 갖는 단일 도메인 항체 유래 항원-결합 폴리펩티드를 지칭한다. nanobody 단독은 상응하는 CDR-함유 폴리펩티드와 짝짓기 없이 항원에 결합할 수 있다.
- [0033] 용어 "상어 유래 단일 도메인 항체" 또는 "Variable new antigen receptor (VNAR)"는 2개의 상보성 결정 영역 (CDR)와 2개의 초가변 영역 (HV)을 갖는 단일 도메인 항체 유래 항원-결합 폴리펩티드를 지칭한다. VNAR 단독은 상응하는 CDR-함유 폴리펩티드와 짝짓기 없이 항원에 결합할 수 있다.
- [0034] "항체 단편" 또는 "항원-결합 단편"은 온전한 항체의 한 부분, 바람직하게는 온전한 항체의 항원 결합 및/또는 가변 영역을 포함한다.
- [0035] 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는, 본원에서 사용된 경우 서열에서 초가변성이고/거나 구조적으로 정의된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다.
- [0036] 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 카뎀 시스템에 의해 정의된 바와 같이 초가변 영역을 지칭하는데 사용된다. Kabat, Elvin A., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)을 참고한다. 카뎀 상보성 결정 영역 (CDR)는 서열 가변성에 근거하고 가장 흔하게 사용된다.
- [0037] 천연 항체는, 예를 들어, 단일특이적이다. 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "다중특이적"은 항원 결합 단백질이 폴리에피토프 특이성을 갖는 (즉, 1개의 생물학적 분자에서 2개의, 3개의, 또는 초과, 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있거나 2개의, 3개의, 또는 초과, 상이한 생물학적 분자에서 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는) 것을 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이 "이중특이적"은 항원 결합 단백질이 2개의 상이한 항원-결합 특이성을 갖는 것을 나타낸다.
- [0038] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "단일 특이적"은 동일한 항원의 동일한 에피토프를 결합시키는 하나 이상의 결합 부위 각각을 갖는 항원 결합 단백질을 나타낸다.
- [0039] 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열에 대하여 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성" 및 "상동성"은, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해, 필요하면, 서열 정렬 및 갭 도입 후, 그리고 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환 고려 없이, 특이적 펩티드 또는 폴리펩티드 서열에서 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성의 결정 목적을 위한 정렬은 당업계에서 기술 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어, 공공연하게 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 MEGALIGN (DNATAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업계에서 숙련가는, 비교될 서열의 전장에

걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬 측정을 위한 적당한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0040] 본 발명은 (이후 "항-SARS-CoV-2 VNAR"로 지칭되는) SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 RBD(receptor binding domain)에 특이적으로 결합하는 상어 유래 단일 도메인 항체(VNAR)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예컨대, 항-SARS-CoV-2VNAR, 항-SARS-CoV-2 중쇄-단독 항체(HCAb) (예를 들면, 인간 면역글로불린 G (IgG)의 결정성 단편(Fc 단편)에 항-SARS-CoV-2 VNAR가 융합된 항-SARS-CoV-2 VNAR-Fc 융합 단백질), 또는 다른 나노바디 혹은 VNAR와 같은 단일 도메인 항체, 전장 4-쇄 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들면, Fab 또는 scFv)에 항-SARS-CoV-2 VNAR가 융합된 다중특이적 항원 결합 단백질, 그리고 이의 제조 및 용도에 관한 것이다.

[0041] 이에, 본 발명은 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0042] 본 발명은 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 당단백질(spike glycoprotein)의 RBD(receptor binding domain)에 특이적으로 결합하는 상어 유래 단일 도메인 항체(VNAR)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0043] 일 측면에서, 표 1과 같이, 상기 VNAR가 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2; 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및 서열번호 5 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함한다.

표 1

[0044]

VNAR	서열번호	아미노산 서열
CDR1	1	GVSCGLYA
	2	GVSCGLSA
HV2	3	TRWEPIT
HV4	4	NKGSKS
CDR3	5	KAQVHTTWGTSCSGDQY
	6	KAQDHTTWGTSCSSDNY
	7	KAQIHTTWGTSCSGDQN

[0045] 다른 측면에서, 상기 VNAR가 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2; 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함한다.

[0046] 다른 측면에서, 상기 VNAR가 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2; 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함한다.

[0047] 다른 측면에서, 상기 VNAR가 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2; 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및 서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함한다.

[0048] 다른 측면에서, 상기 VNAR가 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2; 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함한다.

[0049] 또 다른 측면에서, 상기 VNAR가, 도 1 및 표 2에 도시한 바와 같이, 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열; 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열; 서열번호 10로 표시되는 아미노산 서열; 및 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

표 2

[0050]

VNAR	서열번호	아미노산 서열
CoDoNAR-1	8	AHVDQTPRVATKETGESLI INCVLRGVSCGLYATSWSRRIIPDSTRWEPITIGGRYVESVNKGSKSFSLQIK DLTVEDSVTFYCKAQVHTTWGTSCSGDQYDGTGTVLTVN
CoDoNAR-2	9	AHVDQTPRVATKETGESLI INCVLRGVSCGLSATNWSRRIIPDSTRWEPITIGGRYVESVNKGSKSFSLQIK DLTVEDSVTFYCKAQDHTTWGTSCSSDNYDGTGTVLTVN
CoDoNAR-3	10	AHVDQTPRVATKETGESLI INCVLRGVSCGLYATSWSRRIIPDSTRWEPITIGGRYVESVNKGSKSFSLQIK DLTVENSVTFYCKAQIHTTWGTSCSGDQNDGTGTVLTVN
eCoDoNAR-1	11	AHVDQTPRVATKETGESLI INCVLRGVSCGLYATSWSRRIIPNSTRWEPITIGGRYVESVNKGSKSFSLQIK DLTVEDSVTFYCKAQVHTTWGTSCSGDQYDGTGTVLTVN

[0051]

서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2; 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함할 수 있다.

[0052]

서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2; 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및 서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3을 포함할 수 있다.

[0053]

서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV2; 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HV4; 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함할 수 있다.

[0054]

상기 항-SARS-CoV-2 VNAR는 전술한 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 58%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0055]

예를 들어, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR의 CDR1은 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 58%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0056]

다른 예를 들어, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR의 HV2는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 58%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0057]

다른 예를 들어, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR의 HV4는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 58%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0058]

예를 들어, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR의 CDR3는 서열번호 5 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 58%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0059]

예를 들어, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR는 서열번호 8 내지 11 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 58%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0060]

본 발명에서, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 RBD 또는 이의 변이체에 결합할 수 있다. 또한, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR와 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 RBD 사이의 결합의 KD는 10^{-6} M 내지 10^{-12} M, 10^{-6} M 내지 10^{-11} M, 10^{-6} M 내지 10^{-10} M, 10^{-6} M 내지 10^{-9} M, 또는 10^{-6} M 내지 10^{-8} M일 수 있다.

[0061]

본 발명에서, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR는 SARS-CoV-2 또는 이의 변이 바이러스에 중화능을 갖는다.

[0062]

또한, VNAR는 인간 중쇄 분절을 발현시키는 유전자식 마우스 또는 랫트에 의해 생산된 인간 VNAR일 수 있다. 예를 들면, 특허 US20090307787A1, US8,754,287, US20150289489A1, US20100122358A1, 및 WO2004049794를 참고한다.

[0063]

또한, 본 발명에 따른 VNAR는 키메라 항체일 수 있다. 특정한 키메라 항체는, 예를 들면, 특허 US4,816,567; 및

Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))에서 기재된다.

- [0064] 본 발명에서, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR는 서열번호 24 내지 46 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명에서, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함한 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 아미노산 서열 변이체를 포함한다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 인코딩하는 핵산 서열에의 적당한 변형 도입에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 그와 같은 변형은, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내에서 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합은 최종 작제물에 이르도록 만들어질 수 있고, 단 최종 작제물은 원하는 특징, 예를 들면, 항원-결합을 보유한다. 일부 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 그와 같은 변형이 항원을 결합시키는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한 하나 이상의 추가적인 영역(HVR) 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화성을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경은 HVR에서 실시될 수 있다. 그와 같은 변경은 HVR "핫스팟" 또는 CDR의 외부일 수 있다.
- [0066] 또한, 상기 아미노산 치환은 적어도 1개(예컨대, 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 아미노산 치환일 수 있다. 또한, 상기 적어도 1개의 아미노산 치환은 보존적 치환일 수 있고, 비-유전자 코딩 아미노산 또는 합성 아미노산으로의 치환일 수 있다.
- [0067] 일부 구현예에서, 상기 아미노산 치환은 CDR 영역에 있을 수 있고, CDR1, 및/또는 CDR3에서 적어도 1개(예컨대, 임의의 1, 2, 3, 또는 4개)의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0068] 예를 들어, CDR1의 아미노산 서열 1 또는 2에서 8개의 아미노산들 중 적어도 1개의 아미노산이 치환될 수 있다. 다른 예로 CDR3의 아미노산 서열 5 내지 7에서 17개의 아미노산들 중 적어도 1개의 아미노산이 치환될 수 있다.
- [0069] 일부 구현예에서, 상기 아미노산 치환은 HV 영역에 있을 수 있고, HV2 및/또는 HV4에서 적어도 1개(예컨대, 임의의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0070] 예를 들어 HV2의 아미노산 서열 3에서 7개의 아미노산들 중 적어도 1개의 아미노산이 치환될 수 있다. 다른 예로 HV4의 4에서 6개의 아미노산들 중 적어도 1개의 아미노산이 치환될 수 있다.
- [0071] 또한, 상기 아미노산 서열 삽입은 1개의 잔기부터 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 가진 항체를 포함한다. .
- [0072] 본 발명에서, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 진단 모이어티 또는 생체 적합성 조절제와 연결되거나, 그에 융합되거나, 그에 접합되거나 (예를 들어, 공유 또는 비-공유), 또는 달리 그와 회합될 수 있다. 예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드(예를 들어, 생물독소, 바이오마커, 정제 태그 등), 단백질, 중합체, 핵산 분자, 소분자, 모방제, 합성 약물, 무기 분자, 유기 분자 또는 방사성동위원소가 접합 또는 회합될 수 있다.
- [0073] 또한, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 생물학적 분자(예를 들어, 펩티드 또는 뉴클레오티드), 소분자, 형광단, 또는 방사성동위원소일 수 있는 진단제 또는 검출가능한 작용제, 마커 또는 리포터에 접합 또는 회합될 수 있다. 표지된 조절자는 SARS-CoV-2 감염의 발생 또는 진행을 모니터링하는데, 또는 본원에 개시된 항체를 포함하는 특정한 요법의 효능을 결정하거나 (즉 테라그노시스), 또는 향후의 치료 과정을 결정하는 임상 시험 절차의 일부로서 유용할 수 있다. 이러한 마커 또는 리포터는 또한 본원에 개시된 항체를 정제하는데 유용할 수 있다.
- [0074] 또한, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 면역조절제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물에 접합될 수 있다. 이에, 본 발명은 면역조절제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물에 접합된 본 발명에 따른 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체를 제공한다.
- [0075] 또한, 본 발명은 본원에 개시된 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0076] 또한, 본 발명은 (a) 항체가 발현되도록 하는 조건 하에 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 발현된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법을 제

공한다.

- [0077] 본 발명에서, 본원에 개시된 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다. 단리되고 서브클로닝된 하이브리도마 세포 (또는 파지 또는 효모 유래 콜로니)는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서의 역할을 할 수 있다. 보다 특히, 단리된 DNA (변형될 수 있음)는 항체의 제조를 위해 불변 및 가변 영역 서열을 클로닝하는데 사용될 수 있다.
- [0078] 하나의 예시적인 방법은 선택된 세포로부터의 RNA의 추출, cDNA로의 전환, 및 항체 특이적 프라이머를 사용한 PCR에 의한 증폭을 수반한다. 적합한 프라이머는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 본원에 예시된 바와 같이 많은 상업적 공급원으로부터 용이하게 이용가능하다. 조합 라이브러리의 스크리닝에 의해 단리된 재조합 인간 또는 비-인간 항체를 발현시키기 위해, 항체를 코딩하는 DNA를 재조합 발현 벡터 내로 클로닝하고, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모, 및 박테리아를 포함한 숙주 세포 내에 도입된다. 일부 구현예에서, 달리 목적하는 구축물을 생산하지 않는 원숭이 COS 세포, NS0 세포, 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 골수종 세포 내로 조정자가 도입되어 그에 의해 발현된다.
- [0079] 본 발명에서, 상기 핵산 분자는 벡터 내에, 적절한 경우에 핵산의 발현을 제어하는 프로모터와 함께 존재한다. 또한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법을 사용하여 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 포함하는 발현 벡터를 구축할 수 있다.
- [0080] 많은 상업적으로 입수가능한 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 본원에 개시된 항체를 발현시키는데 사용될 수 있다. 본원에 개시된 항체가 재조합 발현 또는 본원에 개시된 다른 기술 중 어느 하나에 의해 생산되었으면, 이는 면역글로불린의 정제에 대해 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 또는 보다 일반적으로 단백질의 정제에 대한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제될 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명은 본원에 개시된 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체를 유효성분으로 함유하는, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0082] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효량의 본원에 개시된 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체를 포함하는 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 코로나바이러스감염증-19의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0083] 또한, 본 발명은 코로나바이러스감염증-19의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체의 용도를 제공한다.
- [0084] 본 발명에서, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체에 대한 내용은 전술한 바와 동일하므로, 구체적인 설명은 상기 내용을 인용하고, 이하에서는 약학적 조성물 및 용도의 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.
- [0085] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본원에 기재된 1종 이상 (예를 들어, 2 또는 3종)의 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있고, 이들은 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질을 중화한다.
- [0086] 본 발명에 따른 약학적 조성물을 개체, 구체적으로 COVID-19 환자 또는 COVID-19에 걸릴 위험이 있는 환자에 투여함으로써, COVID-19를 예방 또는 치료할 수 있고, 환자의 COVID-19 관련 입원 또는 ER 방문을 감소시킬 수 있다.
- [0087] 상기 환자는 중등도 내지 중증 COVID-19를 갖지만, 입원하지는 않을 수 있고, 또는 경도 내지 중등도 COVID-19를 갖을 수 있다.
- [0088] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본원에 기재된 항체의 형태, 의도된 전달 방식, 및 수많은 다른 변수에 따라, 관련 기술분야에서 인식되는 기술을 사용하여 목적하는 바와 같이 제제화될 수 있다.
- [0089] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경장, 비경구 또는 국소 투여를 위해 제제화될 수 있다. 사실상, 모든 3가지 유형의 제제를 동시에 사용하여 활성 성분의 전신 투여를 달성할 수 있다.

- [0090] 또한, 본원 기재된 항체를 적혈구 상에 흡착시켜 폐로의 우선적 전달을 용이하게 함으로써 간 및 비장에서의 프로세싱을 통한 반감기 단축을 방지하고 폐에서의 보다 높은 농도를 제공할 수 있다.
- [0091] 일반적으로, 본원에 개시된 항체는 이를 필요로 하는 대상체에게 경구, 정맥내, 동맥내, 피하, 비경구, 비강내, 근육내, 심장내, 뇌실내, 기관내, 협측, 직장, 복강내, 피내, 국소, 경피, 및 척추강내, 또는 달리 이식 또는 흡입에 의한 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의해 생체내 투여될 수 있다. 투여의 적절한 제제 및 경로는 의도된 용도 및 치료 요법에 따라 선택될 수 있다.
- [0092] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 예방을 위한 약학적으로 유효량으로 투여된다. 상기 약학적으로 유효량은 의사 또는 다른 임상가에 의해 추구되는, 대상체에서 생물학적 또는 의학적 반응을 도출할 항체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물의 양을 의미한다. 또한, 예방 및/또는 치료 효과를 갖는 요법의 양을 달성하기 위해 특정 빈도로 다중 용량의 항체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 투여할 수 있다.
- [0093] 상기 약학적으로 유효량은 전형적으로 치료될 대상체의 체중, 그의 신체 상태, 치료될 상태의 광범위함, 및 치료될 대상체의 연령에 따라 좌우된다. 일반적으로, 본원에 개시된 항체는 용량당 약 10 ng/kg 체중 내지 약 100 mg/kg 체중 범위, 약 50 μ g/kg 체중 내지 약 5 mg/kg 체중 범위, 약 100 μ g/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중 범위, 약 100 μ g/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중 범위, 0.5 mg/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중 범위의 양으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 항체는 적어도 약 100 μ g/kg 체중, 적어도 약 250 μ g/kg 체중, 적어도 약 750 μ g/kg 체중, 적어도 약 3 mg/kg 체중, 적어도 약 5 mg/kg 체중, 또는 적어도 약 10 mg/kg 체중의 용량으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0094] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약 100 mg 내지 약 10,000 mg의 용량, 약 200 mg 내지 약 9,000 mg의 용량, 약 300 mg 내지 약 8,000 mg 용량, 약 400 mg 내지 7,000 mg 용량, 500 mg 내지 5,000 mg 용량으로 환자에게 정맥내로 또는 피하로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 통상적으로 환자에게 다수회 투여된다. 예시적인 치료 요법은 2주마다 1회, 1개월 1회, 또는 3 내지 6개월마다 1회 투여를 수반한다. 예를 들어, 환자는 사이클로서 4주마다, 예를 들어 28일마다 1회 항체를 (예를 들어, 정맥내 제제로서) 제공받을 수 있다. 투여 빈도는 환자에서의 항체의 약동학적 프로파일에 따라 조정될 수 있다. 예를 들어, 항체의 반감기는 2주 투여 빈도를 필요로 할 수 있다. 일부 방법에서, 상이한 결합 특이성을 갖는 2종 이상의 항체가 동시에 투여될 수 있고, 이러한 경우에 투여되는 각각의 항체의 투여량은 제시된 범위 내에 속한다.
- [0096] 투여량 및 빈도는 환자에서의 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간 항체가 가장 긴 반감기를 나타내고, 그 다음으로 인간화 항체, 키메라 항체, 및 비인간 항체이다. 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 달라질 수 있다.
- [0097] 치료 요법의 지속기간은 치료될 질환, 환자의 연령 및 상태, 환자의 질환의 병기 및 유형, 환자가 치료에 어떻게 반응하는지 등에 좌우된다. 임상가는 요법의 효과를 면밀하게 관찰하고 필요에 따라 임의의 조정을 행할 수 있다. 작용제가 조합되어 사용되는 경우에, 2종 이상의 치료제는 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여되고, 즉 본원에 개시된 항체는 제2 치료제를 투여하기 전에, 제2 치료제와 공동으로, 또는 제2 치료제의 투여에 후속하여 투여될 수 있다.
- [0098] 또한, 본 발명은 본원에 개시된 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 코로나바이러스감염증-19 진단용 키트를 제공한다.
- [0099] 본 발명에서, 상기 항-SARS-CoV-2 VNAR를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 대한 내용은 전술한 바와 동일하므로, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용하고, 이하에서는 진단용 키트의 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.
- [0100] 본원에 따른 진단용 키트는 SARS-CoV-2 감염을 검출, 진단 또는 모니터링하는 시험관내 또는 생체내 방법, 및 현재 SARS-CoV-2에 감염된 환자로부터의 세포, 또는 과거 SARS-CoV-2 감염으로부터 회복된 환자로부터의 세포를 포함한 SARS-CoV-2 감염된 세포를 확인하기 위해 환자로부터 세포의 스크리닝에 이용할 수 있다.
- [0101] 일부 구현예에서, 치료를 위한 SARS-CoV-2에 감염된 개체를 확인하는 단계, 환자 또는 환자로부터 수득된 샘플을 본원에 개시된 항체와 접촉시키는 것을 포함하는 SARS-CoV-2 감염의 진행을 모니터링하는 단계, 및 샘플 내 SARS-CoV-2 항원에 대한 항체의 존재 또는 부재, 또는 회합 수준을 검출하는 단계를 포함한다. 또는, 환자 샘플 (예를 들어, 혈장 또는 혈액)에서 바이러스 수준을 검출 및 정량화하는데 사용될 수 있다. 상기 방법은 결합 수

준을 대조군과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0102] 또한, 본 발명에 따른 진단용 키트는 본원에 기재된 항체, 및 환자로부터의 샘플에 대한 본원에 기재된 항체의 효과를 검출하기 위한 시약을 포함할 수 있다.

[0103] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0104] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0105] <실시예 1> 라이브러리 제작 및 SARS-CoV-2에 대한 단일 도메인 항체의 선별

[0106] 도 1은 일 실시예에 따라 제조한 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 당 단백질(spike glycoprotein)의 수용체 결합 도메인(receptor binding domain; RBD) 특이적 단일 도메인 VNAR 항체의 아미노산 서열이다.

[0107] 도 1에 도시한 바와 같이, 국내에서 서식하는 까치상어의 SARS-CoV-2 야생형 RBD를 면역 후, 파지 표시 (phage display) 기반의 항체 라이브러리를 구축하였다.

[0108] 구체적으로, 면역 항원에 결합하는 단일 도메인 항체를 코딩하는 유전자 증폭을 위해 SARS-CoV-2 야생형 RBD가 면역된 까치상어의 비장으로부터 추출한 총 RNA로부터 cDNA를 합성한 후, 아래 표 3의 특이 프라이머(specific primer)를 이용하여 면역글로불린 NAR의 항원 인식 가변부위 (variable region)인 VNAR를 코딩하는 유전자 단편을 증폭하고, pRSET 벡터를 기반으로 파지 표시가 가능하고 His6 tag과 FLAG tag를 사용할 수 있도록 자체 제작한 phagemid인 pYJ 벡터에 VNAR 유전자 단편을 클로닝하였다.

표 3

[0109]	프라이머	염기서열
	포워드 프라이머 (Forward Primer)	attactggccccagccggccatggctgcacatgtcgatcaaaccaccagagt g
	리버스 프라이머 (Reverse Primer)	gatcttggcctcccggccattcacagtcakcacgggtgccagyccc

[0110] 진술한 특이 프라이머는 용도에 맞게 염기(들)의 추가, 삭제, 대체 등을 통해 적합한 프라이머로 변경될 수도 있다.

[0111] 도 7은 파지 디스플레이 라이브러리 제작을 위해 자체적으로 제작한 pYJ 벡터의 맵을 도시하고 있다.

[0112] 도 7에 도시한 바와 같이, pYJ 벡터는 pRSET 벡터를 기반으로 파지 표시가 가능하고 Lac 프로모터와 같은 벡터의 일반적인 구성요소들과 함께 His6 tag과 FLAG tag를 사용할 수 있다.

[0113] 제작된 면역 라이브러리의 삽입율(insert)은 100%임을 확인하였고, 다양성(diversity)은 1.1×10^9 cfu/mL임을 확인하였다.

[0114] 이를 활용하여, 야생형 RBD를 표적으로 하는 바이오패닝(bio-panning)을 3회 반복으로 진행하여 총 positive clone들을 400개 확인하였다. 그 뒤 positive 클론들을 항체 발현용 대장균에 형질전환 후, VNAR가 발현된 대장균의 periplasmic fraction을 확보한 다음, 이를 이용한 ELISA 결과 결합력이 우수한 30종의 클론들을 선별할 수 있었다. 30종의 clone들의 아미노산 서열을 분석한 결과, 일부 클론들이 아미노산 서열이 같음을 확인할 수 있었고, 아미노산 서열이 다른 클론은 총 4종임을 확인할 수 있었다.

[0115] 항원 결합에 주요한 역할을 하는 CDR1, HV2, HV4, CDR3의 서열 차이에 따라 CoDoNAR-1, 2, 3로 각각 명명했으며, 1종의 항체의 경우는 CDR 및 HV 서열들은 같은데, 프레임워크 서열이 CoDoNAR-1과 달라 eCoDoNAR-1으로 명명하였다.

[0116] 도 1에서 CoDoNAR-1 내지 CoDoNAR-1, 및 달라 eCoDoNAR-1의 아미노산 서열은 표 2에서 언급한 서열번호 8 내지 11의 아미노산 서열과 동일하다. 아울러, 도 1의 CoDoNAR-1 내지 CoDoNAR-1, 및 달라 eCoDoNAR-1의 아미노산 서열은 항원 결합에 주요한 역할을 하는 CDR1, HV2, HV4, CDR3을 포함하고 있고, 전체 아미노산 서열중에 항원 결합에 주요한 역할을 하는 아미노산들을 노란색으로 표시하였다.

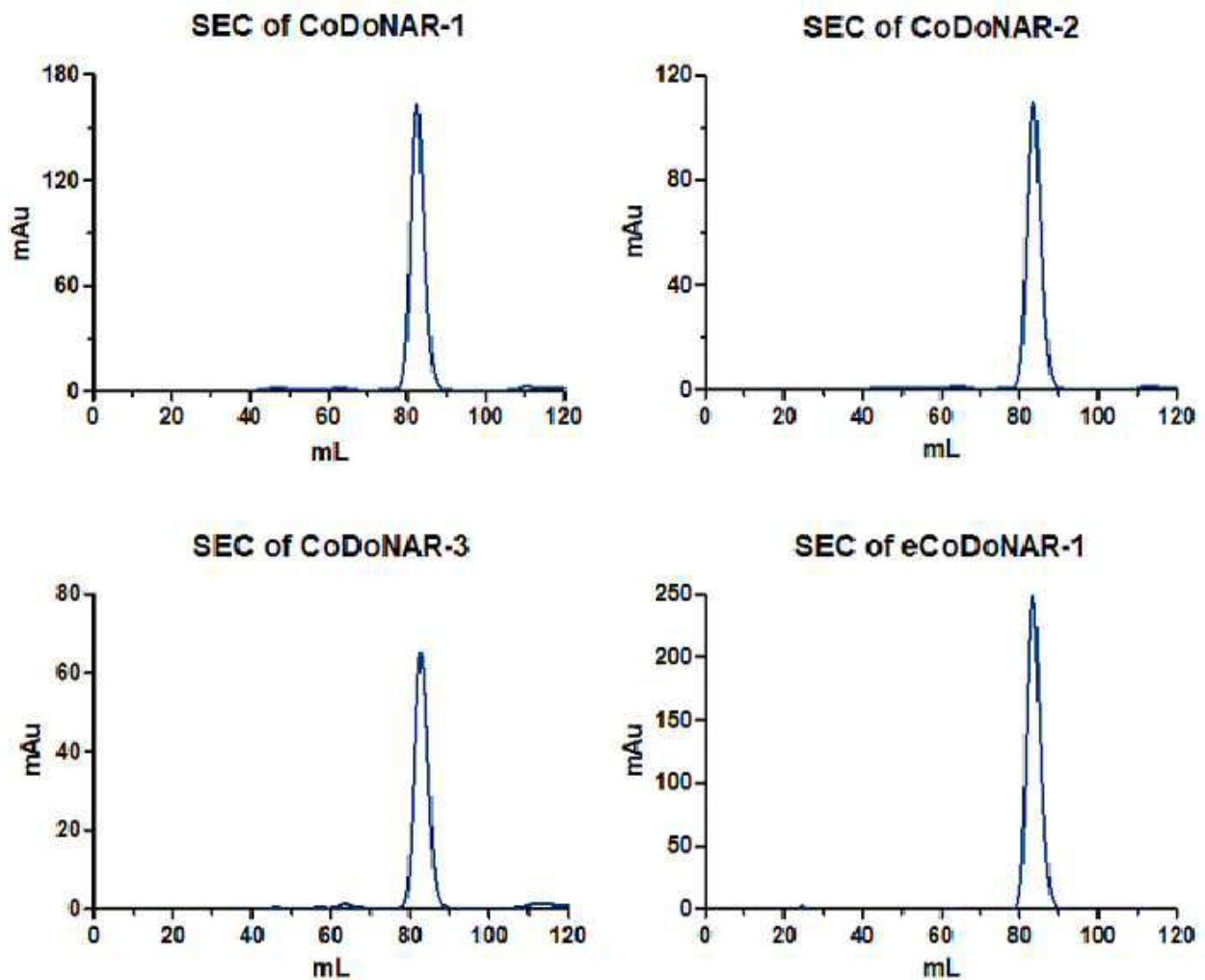
- [0117] 도 2는 HiLoad 16/600 superdex 75 pg를 활용한 4종의 VNAR의 크기 배제 크로마토그래피 결과이다. 도 3은 4종의 VNAR 최종 정제 산물을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다 (왼쪽부터, 1번 lane: protein size marker, 2번 lane: CoDoNAR-1, 3번 lane: CoDoNAR-2, 4번 lane: CoDoNAR-3, 5번 lane: eCoDoNAR-1).
- [0118] 도 2에 도시한 바와 같이, 대장균 단백질 발현 시스템을 활용하여 4종의 VNAR를 발현한 후, Ni-NTA 및 크기배제 크로마토그래피를 진행한 정제된 결과, 모노머 형태의 VNAR만을 선택적으로 분리할 수 있음을 확인하였다. 도 3은 대장균 단백질 발현 시스템을 활용하여 최종적으로 생산한 monomer VNAR의 SDS-PAGE 결과를 도시하고 있다.
- [0119] <실시예 2> 세포 표면 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질에 대한 단일 도메인 항체의 결합력 검증
- [0120] 도 4는 ELISA 기반의 SARS-CoV-2 변이체 RBD에 대한 4종의 VNAR 결합력을 검증한 결과이다.
- [0121] 도 4에 도시한 바와 같이, SARS-CoV-2 야생형 및 5종의 변이체 (alpha, beta, delta, kappa, omicron BA.1)에 서 유래된 RBD에 대한 모노머 형태의 VNAR의 결합력 검증 결과, 야생형, alpha, delta RBD에는 nM 수준으로 4종의 항체 모두 결합하는 것을 확인했으며, beta, kaapa, omicron RBD에는 μ M 수준으로 약하게 결합하는 것이 확인되었다.
- [0122] 4종의 VNAR 중 CoDoNAR-1과 eCoDoNAR-1이 RBD들에 대해 CoDoNAR-2와 CoDoNAR-3보다 결합력이 우수함을 확인하였다.
- [0123] <실시예 3> SARS-CoV-2에 대한 단일 도메인 항체의 *in vitro* 중화능 확인
- [0124] 야생형 SARS-CoV-2 pseudovirus에 대한 CoDoNAR-1 및 eCoDoNAR-1 단일 도메인 항체 클론들의 *in vitro* 중화능을 확인하였다.
- [0125] 도 5는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 RBD에 특이적으로 결합하는 상어 유래 단일 도메인 항체들의 SARS-CoV-2 야생형 pseudovirus에 대한 *in vitro* 중화능을 확인한 것이다.
- [0126] 도 5에 도시한 바와 같이, 결합력이 가장 우수한 CoDoNAR-1과 eCoDoNAR-1에 인간 면역글로불린 G의 CH3 도메인을 CoDoNAR-1 및 eCoDoNAR-1의 C-말단에 융합(fusion)하여 생산하기 위해, 포유류 세포 단백질 발현 벡터인 pMAZ vector에 클로닝하였다. 클로닝한 CoDoNAR-1-CH3 및 eCoDoNAR-1-CH3 발현벡터를 polyethyleneimine을 이용하여 Expi293F에 형질전환 시킨 후, 일시발현을 진행하였다. 발현이 완료된 CoDoNAR-1-CH3 및 eCoDoNAR-1-CH3는 CH3의 C-말단에 도입되어 있는 His₆ tag를 활용하여 Ni-NTA 크로마토그래피를 진행한 후, HiLoad 16/600 superdex 200 pg를 활용한 크기 배제 크로마토그래피를 추가적으로 진행하여 고순도로 정제하였다. 정제된 CoDoNAR-1-CH3 및 eCoDoNAR-1-CH3를 활용하여 SARS-CoV-2 야생형 pseudovirus에 대한 중화효능 실험결과 nM 수준의 중화효능이 있음을 확인하였다.
- [0127] <실시예 4> 열 스트레스를 가한 단일 도메인 항체의 세포 표면 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질에 대한 단일 도메인 항체의 결합력 검증도 6은 열 스트레스를 가한 CoDoNAR-1 및 eCoDoNAR-1의 SARS-CoV-2 야생형 RBD에 대한 결합력을 ELISA 기반으로 검증한 결과이다.
- [0128] 도 6에 도시한 바와 같이, 상기 <실시예 1>의 방법으로 정제된 CoDoNAR-1 및 eCoDoNAR-1을 37℃, 50℃, 80℃의 온도에서 1시간 동안 열처리 후, 야생형 SARS-CoV-2에서 유래된 RBD에 대한 2종류의 단일 도메인 항체들의 결합력을 ELISA로 분석한 결과, 모든 온도에서 열처리 전과 유사한 수준의 결합력을 유지하고 있음을 검증하였다.
- [0129] 전술한 실시예 1을 통해 라이브러리 제작 및 SARS-CoV-2에 대한 상어 유래 단일 도메인 항체의 선별을 진행하고, 실시예 2를 통해 세포 표면 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질에 대한 단일 도메인 항체의 결합력을 검증하고, 실시예 3을 통해 SARS-CoV-2에 대한 단일 도메인 항체의 *in vitro* 중화능을 확인하였다. 마지막으로 실시예 4를 통해 단일 도메인 항체의 열안정성을 확인하였다.
- [0130] 이를 통해 SARS-CoV-2에 대한 중화항체 치료제 연구개발의 후보물질로 활용할 수 있고, 신속하고 간편하게 비말을 활용하여 SARS-CoV-2에 대한 감염여부를 확인하는 신속진단키트 개발을 위한 프로브로 활용할 수 있다.
- [0131] 본 출원은 실시예를 참조하여 설명되었지만, 본 출원의 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 수정을 이루어질 수 있고, 그리고 균등물로 그 구성요소를 대체할 수 있다. 특히, 구조적 충돌이 없는 한, 각 실시예에서 언급된 각 기술적 특징은 어떠한 방식으로든 조합될 수 있다. 본 출원은 여기서 개시된 특정 실시예에 제한되지 않고, 청구범위의 범위 내에 속하는 모든 기술적 해결방법을 포함한다.

도면

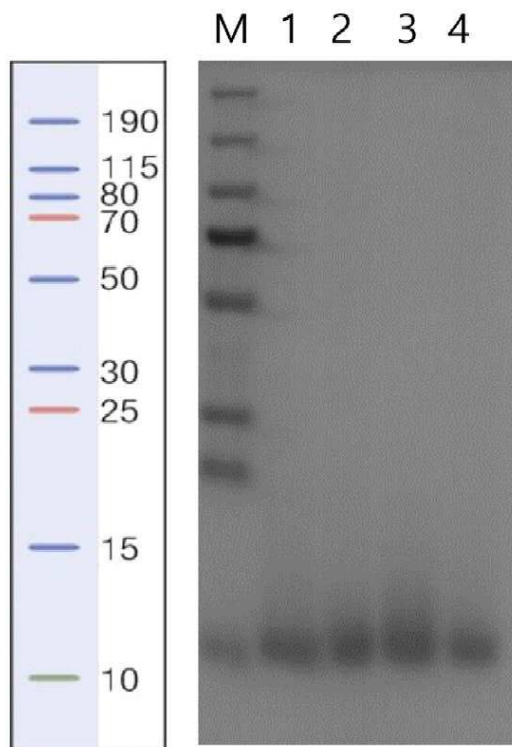
도면1



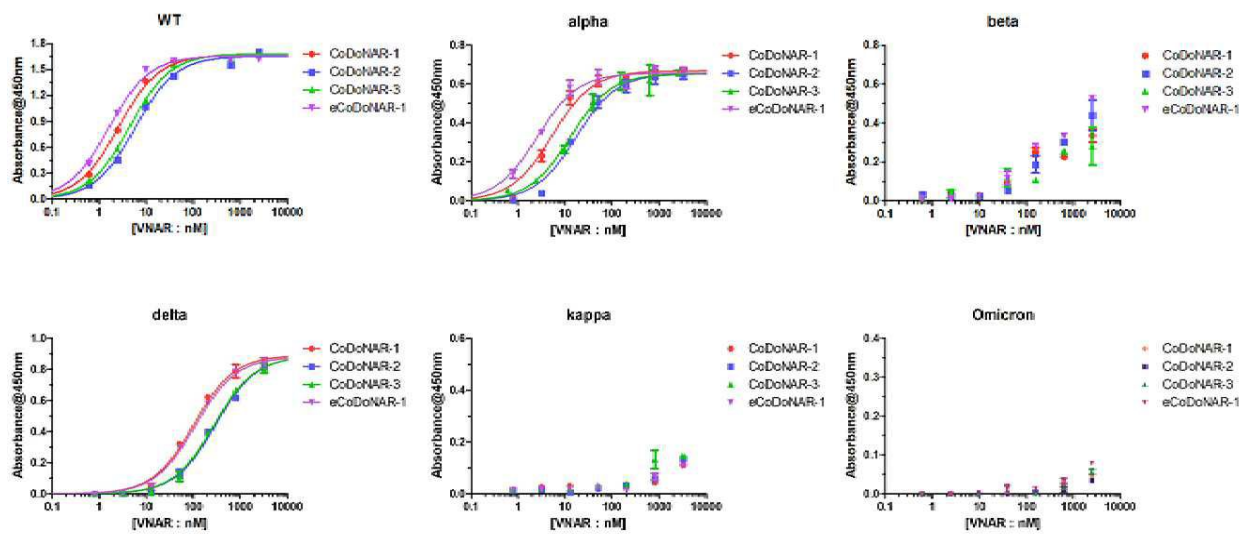
도면2



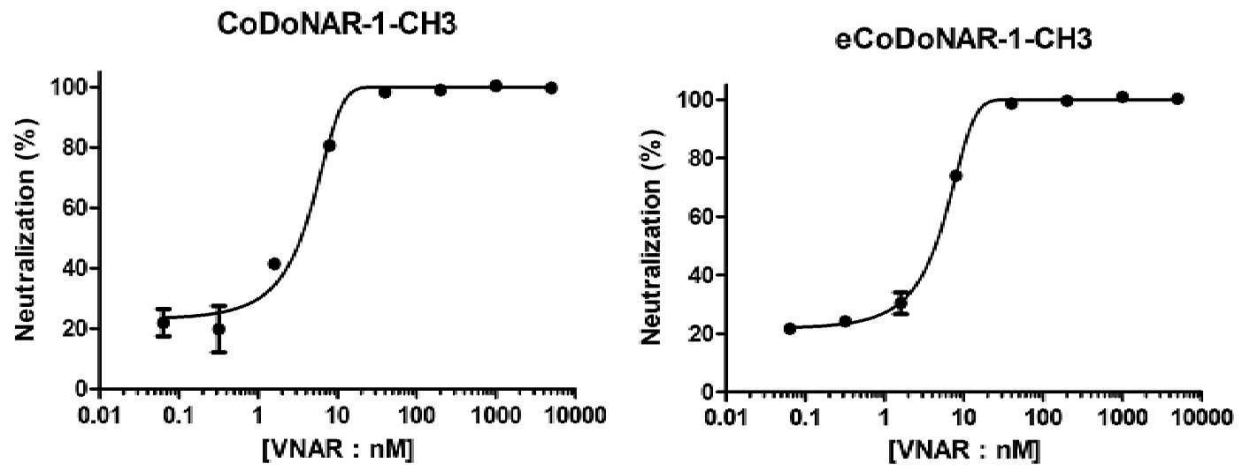
도면3



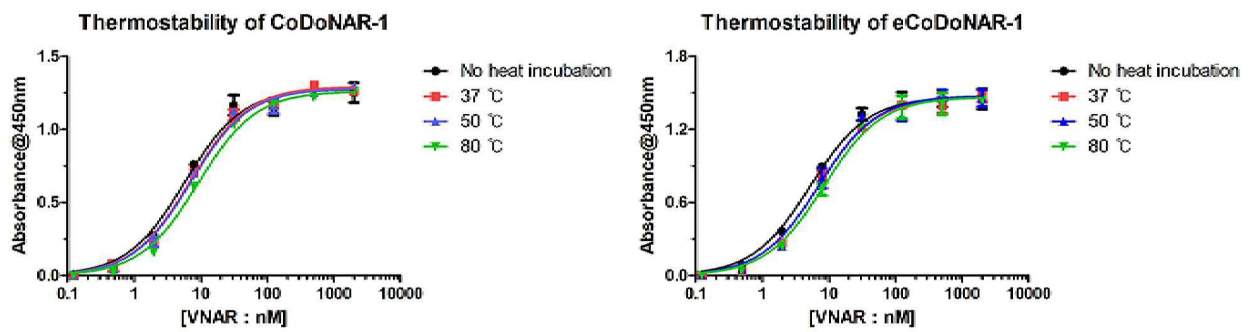
도면4



도면5



도면6



도면7

