



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0054935
(43) 공개일자 2024년04월26일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/10 (2023.08)
A61P 31/14 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-0048668(분할)
(22) 출원일자 2024년04월11일
심사청구일자 2024년04월11일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2018-0096102
원출원일자 2018년08월17일
심사청구일자 2021년06월04일</p> | <p>(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)</p> <p>(72) 발명자
권형주
충청북도 청주시 상당구 중흥로 70, 현대3차아파트 306동 1204호</p> <p>박병권
강원도 춘천시 백령로 215, 춘천일성트루엘더퍼스트 109동 805호</p> <p>김동범
강원특별자치도 춘천시 동면 소양강로 104 장학부영아파트 106동 1304호</p> <p>(74) 대리인
구현서</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 메르스 코로나바이러스 S 단백질에 대한 단클론 항체 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)의 스파이크 단백질 또는 그 단백질의 일부를 특이적으로 인지하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편에 있어서, 상기 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편은 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편:서열번호 1로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 단클론 항체 및 그 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도6a

A Spike506-2G10G5 Heavy chain

CTTCCG GAATTC
CAAGTTAAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGGGGTCACGGGGACTCTCTTGTGAAGGCTCAGGGTTTA
CTTTTAGTGGCTTCTGGATGAGCTGGGTTCGACAGACACCTGGTAAGACCCTGGAGTGGATTGGAGACATTAATTCTGATGG
CAGTATAATAAACTACGCACCATCCATCAAGGATCGATTCACTATCTTCAGAGACAATGACAAGACCACCCTGTACCTGCAG
ATGAGCAATGTGCGATCTGAGGACACAGCCACGTATTTCTGTTTCGATCTACTATGATTCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAG
GGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT AGATCT TCC

CDR1	CDR2
LPEFQVKLQESGGGLVQPGGSRGLSCEGS	GFTFSGFWMS
WVRQTPGKTLIEWIG	DINS DGSII NYAPSIKD
RFTIFRDNDKTT	
LYLQMSNVRS EDTATYFCSI	YD SWFAY
WGQGLTVTSAAKTPPSVYRSS	
CDR3	

(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

G01N 2333/165 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 10에 기재되는 펩타이드 서열을 에피토프로 인식하는 단클론 항체.

청구항 2

리포솜 내에 동시캡슐화된 메르스 코로나바이러스 유래 서열번호 10에 기재되는 에피토프 펩타이드 및 CpG-DNA 복합체를 동물에 주사하여 메르스 코로나바이러스를 인식하는 단클론 항체를 제조하는 방법.

청구항 3

제2항의 제조방법에 의하여 제조된 단클론 항체.

청구항 4

제1항 또는 제3항의 단클론 항체에 표지 물질을 접합한 컨쥬게이트를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 표지물질은 효소, 루시퍼레이즈, 자성입자, 형광물질 및 방사성 동위원소로 이루어진 군 으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

1) 샘플과 제1항 또는 제3항의 단클론 항체를 접촉시키는 단계; 및
2) 상기 단클론 항체를 시료 샘플과 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 대상체의 메르스 코로나바이러스 감염 여부에 대한 정보제공방법.

청구항 7

1) 제1항 또는 제3항의 단클론 항체; 및
2) 용기를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 키트.

청구항 8

제1항의 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 메르스 코로나바이러스 감염 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메르스 코로나바이러스 S 단백질에 대한 단클론 항체 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메르스 코로나바이러스(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV, 중동호흡기증후군 코로나바 이러스)는 2012년 사우디아라비아에서 처음 발견된 뒤 중동 지역에서 집중적으로 발생한 바이러스로, 코로나바 이러스(Coronaviridae) 군에 속하며 사스 코로나바이러스(SARS-CoV, 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스)와 유 사한 바이러스로 알려져 있다.

[0003] 메르스(MERS, 중동호흡기증후군)는 잠복기가 1주일 가량이며 발열을 동반한 기침, 호흡곤란, 숨가쁨, 가래 등 호흡기 증상을 주로 보이며 그 이외에도 두통, 오한, 콧물, 근육통뿐만 아니라 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 복통,

설사 등 소화기 증상도 나타날 수 있다. 다만 사스와는 달리 급성 신부전증을 동반한다. 사스보다 치사율이 6배 가량 높다는 조사 결과가 나오기도 하는 등 더 치명적인 양상을 보이고 있다. 연령대에 따라 치사율은 50%가 넘는다. 현재까지 중동호흡기증후군 바이러스 치료를 위한 항바이러스제는 개발되지 않았고 증상에 대한 치료를 위주로 하게 되며 중증의 경우 인공호흡기나 인공혈액투석 등을 받아야 되는 경우도 있다.

- [0004] 명확한 감염원과 감염경로는 확인되지 않았으나, 중동 지역의 낙타와의 접촉을 통해 감염될 가능성이 높고 사람 간 밀접접촉에 의한 전파가 가능하다고 보고되었다.
- [0005] MERS-CoV는 코로나바이러스 중에서 베타코로나바이러스의 일종으로, 유전자 길이는 다양하지만 약 30 kb에 해당하며, 11개의 ORF(open reading frame)를 지닌다. MERS-CoV의 구조 단백질은 S(spike), E(envelope), M(membrane) 및 NP(nucleocapsid) 단백질이 존재한다.
- [0006] MERS-CoV의 진단은 유전자 진단과 항원-항체 진단으로 분류되는데, 현재 WHO가 추천하는 표준 진단법은 콧물(nasal swap) 검체로부터의 바이러스 유전자 특이적 프라이머(primer)를 이용한 PCR이나 유전자 염기서열 분석에 의한 것이다. MERS-CoV의 항체 진단법은 NP 항원에 대한 항체 진단 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay, 효소면역흡착법)법이 시행되고 있으며, Euroimmun사(독일)에서 개발된 항체 진단 키트는 낙타의 MERS-CoV를 진단하는 용도로 사용되고 있다. 그러나 아직까지 인간 항원-항체 진단 키트로 개발된 제품은 없다.
- [0007] 한국등록특허 제1593641호에서는 '중동호흡기증후군 코로나바이러스 뉴클레오캡시드를 인식하는 항체 및 그의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0832870호에서는 '사스 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단클론항체 및 이것의 용도'가 개시되어 있다.
- [0008] [선행 특허 문헌]
- [0009] 대한민국 공개특허 10-2016-0145813

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 MERS-CoV의 S 단백질에 대하여 특이적인 신규한 단클론 항체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 MERS-CoV의 S 단백질에 대하여 특이적인 단클론 항체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)의 단백질 또는 그 단백질의 일부를 특이적으로 인지하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편에 있어서,
- [0014] 상기 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편은 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편:
- [0015] 서열번호 1로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 및
- [0016] 서열번호 4로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 단클론 항체를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 기능적 단편은 단일 측쇄 항체(scFv), 항원결합 분절(Fab), 본 발명의 CDR부위를 포함하는 경쇄 또는 중쇄인 것이 바람직하고, 상기 기능적 단편은 상기 본 발명의 CDR부위를 포함하는 가변 도메인(Variable domain)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 단클론 항체는 서열번호 7로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)의 단백질은 S 단백질인 것이 바람직하고, 상기 S 단백질의 일부는 서열번호 9로 기재되는 펩타이드 서열인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지

아니한다.

- [0020] 또 본 발명은 서열번호 9로 기재되는 펩타이드 서열을 에피토프로 인식하는 단클론 항체를 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 리포솜 내에 동시캡슐화된 메르스 코로나바이러스 유래 에피토프 펩타이드 및 CpG-DNA 복합체를 동물에 주사하여 메르스 코로나바이러스를 인식하는 단클론 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0022] 또 본 발명은 상기 본 발명의 제조방법에 의하여 제조된 단클론 항체를 제공한다.
- [0023] 또 본 발명은 상기 본 발명의 단클론 항체에 표지 물질을 접합한 컨쥬게이트를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 표지물질은 효소, 루시페레이즈, 자성입자, 형광물질 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0025] 또 본 발명은 1) 샘플과 본 발명의 단클론 항체를 접촉시키는 단계; 및
- [0026] 2) 상기 단클론 항체를 시료 샘플과 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는
- [0027] 대상체의 메르스 코로나바이러스 감염 여부에 대한 정보제공방법을 제공한다.
- [0028] 또 본 발명은 상기 본 발명의 단클론 항체; 및 용기를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 키트를 제공한다.
- [0029] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 조성물; 및 용기를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 키트를 제공한다.
- [0030] 본 발명은 상기 단클론항체를 시료 샘플과 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 메르스 코로나바이러스 검출방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란, 시료 중의 MERS-CoV S 항원과 이를 인지하는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 절편의 결합물을 의미하며, 이러한 항원-항체 복합체는 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 군에서 선택되는 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 그러나 반드시 이들로만 제한되지 않고 다양한 응용과 적용이 가능하다.
- [0032] 본 발명에서는 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러가지 표지체를 사용할 수 있다. 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 방사성 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있으며, 반드시 이들로만 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 검출 표지체로서 사용되는 바람직한 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제 또는 β -락타마제가 있으며, 바람직한 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트가 있으며, 바람직한 리간드로는 바이오틴 유도체가 있고, 바람직한 발광물로는 아크리디늄 에스테르 또는 이소루미놀 유도체가 있으며, 바람직한 미소입자로는 콜로이드 금 또는 착색된 라텍스가 있고, 바람직한 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H , ^{125}I 또는 ^{125}I -볼톤(Bolton) 헌터(Hunter) 시약이 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0034] 항원-항체 복합체를 검출하는 방법은 바람직하게는 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 효소면역흡착법은 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차 항체를 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 이차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다.
- [0035] 상기 단클론항체 또는 이의 절편은 검출 표지체를 가질 수 있으며, 검출 표지체를 가지지 않을 경우는 이들 단일클론 항체 또는 이의 절편을 포획할 수 있고, 검출 표지체를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명은 상기 단클론항체를 포함하는 메르스 코로나바이러스 검출용 키트를 제공한다.

- [0037] 본 발명의 검출용 키트는 상기 단클론항체, 기질과 반응하여 발색하는 표지체와 축합된 항체 및 발색기질을 포함한다. 본 발명의 검출용 키트에서 상기 단클론항체는 기관에 흡착된 상태로 제공될 수 있다. 상기 기관으로는 PVDF 막, 플레이트 및 슬라이드가 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 표지체로는 HRP, 발색기질로는 TMB가 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 검출용 키트는 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분을 가진 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다. 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 메르스 코로나바이러스 S 항원에 특이적인 단클론 항체를 이용하여 사람에서 메르스를 진단하기 위한 검출용 키트를 제공한다. 검출용 키트의 최종 검출방법으로는 면역크로마토그래피법, 래피드 진단법, 효소면역흡착법(ELISA) 또는 웨스턴 블롯이 이용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 바람직하게는 본 발명의 검출용 키트에 사용되는 검출방법은 면역크로마토그래피법(immunochromatography) 및 효소면역흡착법일 수 있다.
- [0039] 상기 면역크로마토그래피법을 이용한 메르스 코로나바이러스 검출용 키트는 시료를 주입하는 시료 주입부; 상기 시료 주입부로부터 일정 간격이 이격된 지점에 위치하는 메르스 코로나바이러스 S 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단클론항체가 결합된 금 축합체를 포함하는 결합부; 상기 결합부로부터 일정 간격이 이격된 위치에 메르스 코로나바이러스 S 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단클론항체가 고정된 검사선(test line); 및 항-마우스 IgG가 고정된 대조선(control line)이 순차적으로 구비되는 것이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 검출용 키트는 스트립 형태의 나이트로셀룰로오스 멤브레인에 유리섬유(glass fiber), 코튼(cotton) 또는 셀룰로오스 재질의 패드를 결합시켜서 시료를 투입할 수 있는 시료주입부가 구비되고, 상기 시료 주입부로부터 일정 간격을 유지하면서 콜로이드 골드(Colloidal gold)-메르스 코로나바이러스 항체가 축합된 복합체가 건조된 축합 패드, 상기 메르스 코로나바이러스 항체와 동일한 항원을 검출할 수 있는 다른 항체가 고정된 검사선 및 상기 축합 패드에 존재하는 단클론항체를 검출할 수 있는 이차 항체가 고정된 대조선이 순차적으로 구비된 면역스트립일 수 있다.
- [0041] 상기 면역크로마토그래피법 진단법은 상기 메르스 코로나바이러스 검출용 건조 조성물을 적용한 키트를 제작하여 사용하는 것으로 안정하여 장기간 보관하는 것이 가능하다.
- [0042] 상기 메르스 코로나바이러스 검출용 키트에 메르스 코로나바이러스를 함유하는 것으로 의심되는 시료를 투입하여 상기 테스트 스트립의 검사선과 대조선에 붉은 자주빛띠가 나타나면 메르스 코로나바이러스 감염을 양성으로 판정하고, 대조선에만 붉은 자주빛띠가 나타나면 메르스 코로나바이러스 감염을 음성으로 판정할 수 있다.
- [0043] 또한, 교차반응(cross reaction) 검사에서 타호흡기바이러스 바이러스를 적용하여 검사결과가 음성으로 나오는 것을 판독하여, 검사가 타호흡기바이러스와 얼마나 교차성이 없는지를 확인할 수 있다.
- [0044] 효소면역항체법을 이용한 키트의 경우, 본 발명의 단클론 항체가 코팅된 플레이트의 각 웰에 메르스 의심환자로부터 채취된 검체를 반응시키고, HRP(Horseradish peroxidase)-축합 MERS-CoV S 항원 특이 단클론항체를 첨가한 후, TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 기질용액을 각 웰에 처리하여 발색반응을 흡광도로 측정하는 것으로 구성된다. 바람직하게는, 본 발명의 검출용 키트는 사람 코로나바이러스로부터 메르스의 감별진단을 위한 특이적인 단클론 항체를 이용하여 양성대조군 및 정량적 분석이 가능하도록 재조합 S 항원을 추가로 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 상기 진단용 조성물은 본 발명의 단클론 항체 및 면역학적 분석에 사용되는 시약이 포함될 수 있다. 면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 항원-항체 결합을 원리로 하는 공지의 모든 정량분석방법에 사용되는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 상기 정량분석방법의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 면역블롯팅, 면역침전법, 효소면역분석법, 단백질 칩, 래피드 어세이 및 마이크로 어레이 방법 등이 있다.
- [0046] 상기에서 적합한 담체로는 이에 한정되지는 않으나 가용성 담체, 예컨대 당 분야에 공지된 생리화적으로 허용되는 완충액들 중 어느 한 가지(예를 들어, PBS) 또는 불용성 담체, 예컨대 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교텍스트란, 폴리사카라이드, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0047] 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지로는 효소, 형광물질, 발광물질 및 방사성 물질 등을 사용할 수 있다. 효소로는 과산화효소(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), β -D-갈락토시다아제, 글루코

스 옥시다아제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있으며, 형광물질로는 플루오르신 이소티옥시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 피코빌린(phycobilin) 단백질, 로다민(rhodamine), 피코에리트린(phycoerythrin), 피코시아닌(phyocyanin) 및 오르토프탈릭 알데히드(orthophthalic aldehyde)등을 사용할 수 있다. 발광물질로는 이소루미놀(isolumino), 루시게닌(lucigenin) 등을 사용할 수 있으며, 방사성 물질로는 ¹³¹I, ¹⁴C, ³H 등을 사용할 수 있다. 그러나, 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명의 기능적 항체 단편으로는 경쇄, 중쇄, 가변 영역, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Diabody, Tribody, dsFv, CDR을 함유하는 펩타이드 등을 들 수 있다.

[0049] Fab는 IgG를 단백질 분해효소 파파인으로 처리하여 수득되는 단편중(H쇄의 224번째의 아미노산 잔기로 절단된다), H쇄의 N 말단측 약 절반과 L쇄 전체가 디설파이드 결합(S-S 결합)으로 결합된 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0050] 본 발명의 Fab는 본 발명의 항체를 단백질 분해효소 파파인으로 처리하여 수득할 수 있다. 또는 당해 항체의 Fab를 암호화하는 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하고, 당해 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 발현시켜 Fab를 제조할 수 있다.

[0051] F(ab')₂는 IgG를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 수득되는 단편중(H쇄의 234번째의 아미노산 잔기로 절단된다), Fab가 힌지영역의 S-S 결합을 개재하여 결합된 것보다 약간 큰 분자량 약 10만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0052] 본 발명의 F(ab')₂는 본 발명의 항체를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 수득할 수 있다. 또는 하기의 Fab'를 티오에테르 결합 또는 S-S 결합시켜 작제할 수 있다. Fab'는 상기 F(ab')₂의 힌지영역의 S-S 결합을 절단한 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0053] scFv는 1개의 VH와 1개의 VL을 12잔기 이상의 적당한 펩타이드 링커(P)를 사용하여 연결한 VH-P-VL 내지는 VL-P-VH 폴리펩타이드로, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0054] 본 발명의 scFv는 본 발명의 항체의 VH 및 VL을 암호화하는 cDNA를 수득하고, scFv를 암호화하는 DNA를 작제하며 당해 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하여 당해 발현 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.

[0055] Diabody는 항원 결합 특이성이 동일하거나 상이한 scFv가 이량체를 형성한 항체 단편이고, 동일한 항원에 대한 2가의 항원 결합 활성 또는 상이한 항원에 대한 2특이적인 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0056] 본 발명의 Diabody는 예를 들면, 본 발명의 항체의 VH 및 VL을 암호화하는 cDNA를 수득하고, 3 내지 15 잔기의 폴리펩타이드 링커를 갖는 scFv를 암호화하는 DNA를 작제하며 당해 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하여 당해 발현벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 Diabody를 발현시켜 제조할 수 있다.

[0057] 또한, linker P 길이가 3-10 일 때는 tribody가 형성되어, tribody로 포함할 수 있다.

[0058] dsFv는 VH 및 VL 중 각각 하나의 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 폴리펩타이드를 당해 시스테인 잔기 간의 S-S 결합을 개재하여 결합시킨 것을 말한다. 시스테인 잔기로 치환되는 아미노산 잔기는 Reiter 등에 의해 기재된 방법[참조: Protein Engineering, 7, 697(1994)]에 따라서 항체의 입체구조 예측에 근거하여 선택할 수 있다.

[0059] 또 본 발명은 상기 본 발명의 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 메르스 코로나바이러스 감염 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명의 억제학적 조성물에 포함되는 억제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 억제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 억제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed, 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [0061] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0001-10,000 mg/kg(체중)이다.
- [0063] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0064] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0065] 본 발명자들은 대표적인 대한민국과 사우디 아라비아 균주의 MERS-CoV S protein-RBD 유래 B 세포 에피토프 서열인 Spike-492 및 Spike-492 (L506F)를 선택하였다. 그 MERS-CoV S 단백질-RBD의 B 세포 에피토프 펩타이드 서열인 Spike-492 (L506F)는 L506F 치환체를 코딩한다. 여기서, 본 발명자들은 B 세포 에피토프 펩타이드와 Lipoplex (0) 복합체로 마우스를 면역화하여서 MERS-CoV S 단백질에 대해 특이적인 단클론 항체 506-2G10G5 및 492-1G10E4E2를 제조하였다. 두 단클론항체 모두 MERS-CoV의 S 단백질에 대한 강하고 특이적인 결합을 보였으나, 506-2G10G5 항체가 492-1G10E4E2에 비하여 Spike-492 및 Spike-492 (L506F) 펩타이드에 대한 더 높은 결합친화도를 나타내었다. 게다가, 간접 면역형광 어세이 및 공초점 어세이로부터 S 단백질에 대한 두 항체의 특이성을 확인하였다. 중요하게, 506-2G10G5 단클론 항체 처리는 MERS-CoV 감염된 플라크 퍼센트를 정상 마우스 IgG 및 492-1G10E4E2 처리에 비하여 효과적으로 감소시켰다. 종합하여 보면, 본 발명의 데이터는 506-2G10G5 단클론항체의 MERS-CoV 감염에 대한 진단 및 치료에 대하여 적용 가능하다는 것을 알 수 있다.

발명의 효과

- [0066] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 506-2G10G5 단클론항체는 MERS-CoV 감염에 대한 진단 및 치료에 적용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1은 B 세포 에피토프-특이적인 항체의 생산에 대한 그림.
- (A) MERS-CoV S 단백질의 도식적인 그림. S 단백질은 S1 및 S2 서브유닛으로 구성되고, RBD, receptor binding domain; FP, fusion peptide; HR1 및 HR2, heptad repeat region 1 및 2; TM, transmembrane; CP, cytoplasmic tail로 구성되었다. (B) B 세포 에피토프는 에피토프 예측, 표면 접근성 및 항원성 지수에 기반한 IEDB를 사용하여 선택하였다. (C) 혈청을 사용한 MERS-CoV Spike-492- 또는 Spike-492 (L506F)-특이적인 항체의 생산을 보여주는 ELISA 분석. 혈청은 B 세포 에피토프 펩타이드(Spike-492 또는 Spike-492 (L506F)) 및 Lipoplex (0)의 복합체로 면역화된 BALB/c 마우스로부터 분리하였다.
- 도 2는 항-Spike-492(L506F)-특이적인 단클론 항체 (506-2G10G5)를 생산하는 하이브리도마 클론의 스크리닝 그림.
- (A, B) BALB/c 마우스 3마리를 10일 간격으로 4회 DOPE:CHEMS 복합체에 동시캡슐화된 MB-ODN 4531(0) 및 Spike-492(L506F)로 i.p. 면역화하였다. Spike-492(L506F) 펩타이드 면역화된 마우스의 지라세포를 사용한 세포 융합 실험의 1차 스크리닝(HAT medium)의 ELISA 결과.
- (C, D) 하이브리도마 클론을 HT 배지에서 리미팅 희석 방법에 의한 서브클로닝을 수반하는 단클론항체의 생산을 위하여 선택함.
- 도 3은 항-Spike-492-특이적인 단클론 항체 (492-1G10E4E2)를 생산하는 하이브리도마 클론의 스크리닝 그림.(A, B) BALB/c 마우스 3마리를 10일 간격으로 4회 DOPE:CHEMS 복합체에 동시캡슐화된 MB-ODN 4531(0) 및 Spike-492로 i.p. 면역화하였다. Spike-492 펩타이드 면역화된 마우스의 지라세포를 사용한 세포 융합 실험의 1차 스크리닝(HAT medium)의 ELISA 결과.(C, D, E, F) 하이브리도마 클론을 HT 배지에서 리미팅 희석 방법에 의한 서브클로닝을 수반하는 단클론항체의 생산을 위하여 선택함.

도 4는 anti-MERS-CoV Spike-492 (L506F) 에피토프-특이적인 단클론항체의 정제 및 특성을 나타낸 그림. (A) pristine-primed 마우스를 506-2G10G5 클론으로 주사하고 복수를 얻은 후, 506-2G10G5 단클론항체를 Protein A agarose 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하고 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. R, 환원 조건; NR, 비환원 조건. (B) 정제된 506-2G10G5 단클론 항체의 이소타입은 ELISA로 결정. (C) MERS-CoV Spike-492 (L506F) 펩타이드에 대한 506-2G10G5 단클론 항체의 결합 친화도는 ELISA로 결정하고 EC₅₀ 값은 Sigma Plot 프로그램으로 평가하였다.

(D-G) MERS-CoV-감염 및 비감염된 Vero 세포 파쇄액을 PBS (-) 또는 PNGase F (+)로 처리하고, 그 파쇄액을 506-2G10G5 단클론항체로 면역블랏팅하였다. (D). 파쇄액을 anti-베타-actin 항체를 대조군으로 웨스턴 블랏팅 하였다 (E). 506-2G10G5 단클론항체를 사용한 웨스턴 블랏 분석은 506-2G10G5 단클론항체로 파쇄액의 면역침전을 수반하여 수행하였다 (F). 파쇄액을 대조군으로 anti-베타-actin 항체로 웨스턴 블랏팅을 수행하였다 (G). (H, I) 단클론 항체의 교차반응성. 96-웰 면역플레이트를 MERS-CoV Spike-492 (G) 또는 Spike-492 (L506F)(H) 로 코팅하고 492-1G10E4E2 또는 506-2G10G5 단클론항체로 배양하였다. Spike-492 (L506F) 펩타이드에 대한 492-1G10E4E2 항체의 반응성 및 506-2G10G5 항체의 Spike-492 펩타이드에 대한 반응성을 ELISA 분석으로 결정하였다.

도 5는 anti-MERS-CoV Spike-492 에피토프-특이적인 단클론항체의 정제 및 특성을 나타낸 그림. (A) 복수로부터 얻은 492-1G10E4E2 단클론항체를 Protein A agarose 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하고 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. R, 환원 조건; NR, 비환원 조건. (B) 정제된 492-1G10E4E2 단클론 항체의 이소타입은 ELISA로 결정. (C) MERS-CoV Spike-492 펩타이드에 대한 492-1G10E4E2 단클론 항체의 결합 친화도는 ELISA로 결정하고 EC₅₀ 값은 Sigma Plot 프로그램으로 평가하였다. (D-F) MERS-CoV-감염 및 비감염된 Vero 세포 파쇄액을 PBS (-) 또는 PNGase F (+)로 처리하고, 그 파쇄액을 492-1G10E4E2 단클론항체로 면역블랏팅하였다. (D). 492-1G10E4E2 단클론항체를 사용한 웨스턴 블랏 분석은 492-1G10E4E2 단클론항체로 파쇄액의 면역침전을 수반하여 수행하였다 (E). 파쇄액을 대조군으로 항-베타-액틴 항체로 웨스턴 블랏팅을 수행하였다(F).

도 6은 하이브리도마 세포 클론 492-1G10E4E2로부터 분리된 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인의 cDNA 서열.

(A) 중쇄 가변 도메인의 서열.

(B) 경쇄 가변 도메인의 서열.

예측된 아미노산 서열을 cDNA 서열 밑에 기재함.

도 7은 하이브리도마 세포 클론 506-2G10G5로부터 분리된 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인의 cDNA 서열.

(A) 중쇄 가변 도메인의 서열.

(B) 경쇄 가변 도메인의 서열.

도 8은 Spike-492 (L506F) 단클론항체로 MERS-CoV-감염된 세포의 검출을 위한 면역형광 어세이 및 공초점 현미경법. (A) 간접 면역형광 분석. MERS-CoV-감염 및 비감염된 Vero 세포의 혼합물을 506-2G10G5 항체 또는 정상 마우스 IgG로 염색하고 Alexa Flour 488-부착된 goat anti-mouse IgG 항체(녹색)로 배양하였다. 핵을 Hoechst 33258로 염색(청색)하였다. 이미지들을 형광 현미경으로 촬영하였다. (B) 공초점 현미경법. Vero 세포를 MERS-CoV로 2일간 감염시키고, 그 세포를 506-2G10G5 항체 또는 정상 마우스 IgG로 염색한 후 Alexa488-conjugated goat anti-mouse IgG 항체(green)로 배양하고, 핵은 Hoechst 33258 (blue)로 염색하였다. 스케일 바, 10 μ m.

도 9는 492-1G10E4E2 단클론항체로 MERS-CoV-감염된 세포의 검출을 위한 면역형광 어세이 및 공초점 현미경법. (A) 간접 면역형광 분석. MERS-CoV-감염 및 비감염된 Vero 세포의 혼합물을 492-1G10E4E2 항체 또는 정상 마우스 IgG로 염색하고 Alexa Flour 488-부착된 goat anti-mouse IgG 항체(녹색)로 배양하였다. 핵을 Hoechst 33258로 염색(청색)하였다. 이미지들을 형광 현미경으로 촬영하였다. (B) 공초점 현미경법. Vero 세포를 MERS-CoV로 2일간 감염시키고, 그 세포를 492-1G10E4E2 항체 또는 정상 마우스 IgG로 염색한 후 Alexa488-conjugated goat anti-mouse IgG 항체(green)로 배양하고, 핵은 Hoechst 33258 (blue)로 염색하였다. 스케일 바, 10 μ m.

도 10은 506-2G10G5 및 492-1G10E4E2 단클론 항체에 의한 MERS-CoV 감염의 저해를 나타낸 그림. MERS-CoV를 2 배 계대 희석 정상 마우스 IgG, 492-1G10E4E2 또는 506-2G10G5 단클론항체로 30분간 37° C에서 미리배양하였다. 바이러스-항체 혼합물을 Vero 세포에 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 DMEM/F12(0.6% oxoid 아가

포함)으로 대체하였다. 플라크를 감염 4일 후 crystal violet으로 염색하였다. (A) 플라크 감소 분석을 나타내는 대표적인 그림. (B) 100 $\mu\text{g}/\text{well}$ 에서 0 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 정상 마우스 IgG 또는 492-1G10E4E2 또는 506-2G10G5 단클론항체로 처리한 후 MERS-CoV에 대한 플라크 감소 분석의 정량화.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0068] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0069] 본 발명의 African green monkey 신장 세포인, Vero 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. Vero 세포를 10% 우태아 혈청(FBS, Thermo Fisher Scientific), 25 mM HEPES, 100 U/ml penicillin 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 유지하였다. 그 세포들을 37 °C, 95% air 및 5% CO₂에서 배양하였다. MERS-CoV/KOR/KNIH/002_05_2015는 대한민국 질병 관리본부로부터 얻었다 (Permission No. 1-001-MER-IS-2015001).
- [0071] 실시예 1: B 세포 에피토프 펩타이드 제조
- [0072] MERS-CoV M 단백질-특이적인 항체를 생산하기 위하여, 본 발명자들은 B 세포 에피토프를 에피토프 예측, 표면 접근성 및 항원성 지수에 기반하여 M 단백질을 분석하여 선택하였다. MERS-CoV M 단백질 (MERS-M158, ¹⁵⁸CDYDRLPNEVTAKPNVLIALKMVK¹⁸²; 서열번호 9)에 대한 B 세포 에피토프 서열을 분석하고, 그 펩타이드를 자동화된 펩타이드 합성기(Peptron III-R24, Peptron, Daejeon, Korea)로 합성하였다. 그 펩타이드를 역상 HPLC (Prominence HPLC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)으로 90% 이상의 순도로 정제하였다.
- [0073] MERS-CoV S 단백질의 B 세포 에피토프의 선택, 분석 및 합성은 Park BK, Lee SI, Bae J-Y et al (2018) Int J Pept Res Ther <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9731-8>에 기재된 것과 같이 수행하였다. MERS-CoV의 S 단백질에 대한 B 세포 에피토프 펩타이드 서열은 MERS-CV 균주(MERS-CoV/KOR/KNIH/002_05_2015 (GI: 829021049)) 유래 Spike-492 (⁴⁹²TKPLKYSYINKSRLLSDDRTEVPQ⁵¹⁶; 서열번호 9) 및 MERS-CV 균주(Spike glycoprotein universal sequence (GI: 510785803)) 유래 Spike-492 (L506F) (⁴⁹²TKPLKYSYINKSRFLSDDRTEVPQ⁵¹⁶; 서열번호 10)로 선택하고, 그 펩타이드를 자동화된 펩타이드 합성기(Peptron III-R24, Peptron, Daejeon, Korea)로 합성하였다. DOPE: CHEMS (Lipoplex (0)로 명명)로 동시캡슐화된 B 세포 에피토프 펩타이드 및 CpG-DNA (MB-ODN 4531 (0)) 복합체를 제조하였다.
- [0075] 실시예 2: 마우스 면역화
- [0076] BALB/c (4 주령, 암컷, H-2^b) 마우스를 Nara-Biotec (Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 마우스를 특이 무균 조건 하에서 한림대학교 동물실험실에서 유지하였고, 동물 실험은 한림대 동물실험 윤리위원회(Permit number, Hallym2016-51)의 승인을 받았다. 마우스를 200 μl 의 Spike-492 펩타이드(50 μg) 또는 Spike-492 (L506F) 펩타이드 (50 μg) 및 Lipoplex (0)복합체로 G. Wu, D. Kim, J.N. Kim, et al., Theranostics, 8(2018), pp. 78-91에 기재된 것과 같이 10일에 3회 복강내(i.p.) 주사하였다.
- [0078] 실시예 3: 마우스 Anti-MERS-CoV S 단백질 단클론 항체의 생산
- [0079] 표준 하이브리도마 기술에 따라서, 하이브리도마 세포를 anti-Spike-492-특이적인 단클론 항체(492-1G10E4E2) 및 anti-Spike-492(L506F)-특이적인 단클론 항체(506-2G10G5)를 생산하기 위하여 선택하였다[G. Wu, D. Kim, J.N. Kim, et al., A Theranostics, 8(2018), pp. 78-91; W.M. Yokoyama, M. Christensen, G.D. Santos, et al., Curr. Protoc. Immunol., Chapter 2(2006), Unit 2.5].
- [0080] 10일 간격으로 3회, BALB/c 마우스에 i.p.로 DOPE:CHEMS 복합체에 동시캡슐화된 MERS- Spike-492 펩타이드 (50 μg) (또는 Spike-492(L506F) 펩타이드) 및 MB-ODN 4531(0) (50 μg)로 주사하였다.

- [0081] 면역화된 마우스로부터 유래된 지라를 표준 하이브리도마 기술에 따라서 융합에 사용하였다. HAT 배지 및 HT 배지에서 하이브리도마 클론을 표준 리미팅 희석 프로토콜로 선택하여서 클론 세포 군을 얻었다. 복수를 얻기 위해서 그 선택된 하이브리도마 클론을 BALB/c 마우스의 복강에 주사하였다. anti-Spike-492-특이적인 단클론 항체(492-1G10E4E2) 및 anti-Spike-492(L506F)-특이적인 단클론 항체(506-2G10G5)를 단백질-A column 크로마토그래피로 복수액으로부터 정제하였다.
- [0082] 그 단클론 항체의 아이소타입을 결정하기 위하여, isotyping 키트(Southern Biotechnology Associates Inc, Birmingham, USA)를 사용하였다.
- [0084] 실시예 4: ELISA Assay
- [0085] 에피토프 펩타이드 특이적인 항체 타이터를 측정하기 위하여, 5 µg/웰의 MERS-CoV Spike-492 또는 Spike-492 (L506F) 펩타이드를 96-웰 면역플레이트(Thermo Fisher Scientific) 상에 코팅한 후 4° C에서 오버나잇 배양하고, PBST (0.05% Tween-20이 보충된 PBS)로 세척한 후 1% BSA를 포함하는 PBST 로 블리킹하였다.
- [0086] 마우스 혈청을 안와 출혈(orbital bleeding)로 모아서 1:3 비율로 연속적으로 희석하고 각 플레이트의 웰에 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 배양하였다. HRP(Horseradish peroxidase)-부착된 goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA, USA)를 1시간 동안 2차 항체로 사용하였다.
- [0087] PBST로 세척 후, TMB(tetramethylbenidine) peroxidase 기질(KPL, SeraCare, Milford, MA, USA)을 처리하고 반응을 TMB-stop 용액(KPL)으로 정지하였다. 흡광도를 Spectra Max 250 microplate 리더(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 450nm에서 측정하였다. 단클론항체의 아이소타입의 동정을 위하여, HRP- 부착된 anti-mouse IgG (각 isotype) 항체(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)를 사용하였다. 교차-반응성을 검출하기 위하여, 96-웰 면역플레이트를 MERS-CoV Spike-492 또는 Spike-492 (L506F) 펩타이드로 상기와 같이 코팅하였다.
- [0088] 그 코팅된 웰을 2차 항체 배양 전에 2시간 동안 492-1G10E4E2 단클론항체 또는 506-2G10G5 단클론 항체로 배양하였다.
- [0090] 실시예 5: ELISA에 의한 친화 상수 측정
- [0091] Anti-Spike-492-특이적인 단클론항체(492-1G10E4E2) 및 anti-Spike-492(L506F)-특이적인 단클론항체(506-2G10G5)의 결합 친화도를 결정하기 위하여, 5 µg/웰의 Spike-492 및 Spike-492 (L506F) 에피토프 펩타이드를 96-웰 면역플레이트에 코팅한 후, 1% BSA를 포함하는 PBST로 블리킹하였다.
- [0092] 그 단클론 항체를 PBST에서 1:5 계대 희석하여서 각 플레이트에 첨가한 후, 상온에서 2시간 배양하였다. PBST로 세척 후, horseradish peroxidase가 부착된 anti-IgG 항체를 각 플레이트에 첨가하였다. 플레이트에서 항체의 양을 tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase 기질(KPL, SeraCare, Milford, MA, USA)로 현상하였다.
- [0093] 흡광도를 Spectra Max 250 microplate 리더(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 405 nm에서 측정하고, D.I. Kisiela, H. Avagyan, D. Friend, et al., PLoS Pathog., 11(2015), pp. e1004857에 기재된 것과 같이, SigmaPlot 프로그램으로 계산하여서 EC50 값을 결정하였다.
- [0095] 실시예 6: 웨스턴 블롯팅 및 면역침전법
- [0096] MERS-CoV-감염된 Vero 세포를 세포 파쇄 버퍼(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaF, 2 mM Na3VO4, protease 저해제 콕테일 및 10% NP-40)로 파쇄한 후, SDS-PAGE 상에 로딩하였다. 그 분리된 단백질들을 nitrocellulose 막으로 옮긴 후 3% BSA를 포함한 PBST로 블리킹하였다. 그 막을 MERS-CoV Spike-492 단클론 항체 또는 Spike-492 (L506F) 단클론 항체를 처리하고 PBST로 세척하고 HRP 부착된 goat anti-mouse IgG 항체로 처리하였다.
- [0097] 그 막을 chemiluminescence 용액으로 검출하고, ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, California, USA)로 도안화하였다. 면역침전을 위하여, 바이러스 감염된-Vero 세포 파쇄액을 MERS-CoV Spike-492 단클론항체 또는 Spike-492 (L506F) 단클론항체로 4° C에서 오버나잇 배양하고 MERS-CoV의 S 단백질을 Protein-A 비드(Repligen,

Waltham, MA, USA)로 1시간 동안 침전시켰다. 그 면역침전된 단백질을 MERS-CoV Spike-492 단클론항체 또는 Spike-492 (L506F) 단클론항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다.

[0100] 실시예 7:탈당화 어세이(Deglycosylation Assay)

[0101] 세포 파쇄액을 Vero 세포 및 MERS-CoV-감염된 Vero 세포로부터 파쇄 버퍼(0.5% SDS, 1% β -mercaptoethanol)로 얻어서 그 파쇄액을 100° C에서 10분간 가열하였다. 그 파쇄액을 펩타이드-N-glycosidase (PNGase) F (Elpis Biotech, Daejeon, Korea)로 37° C에서 2시간 처리한 후 100° C에서 10분간 가열하였다. 처리 후에 그 샘플을 MERS-CoV Spike-492 단클론항체 또는 Spike-492 (L506F) 단클론항체로 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

[0102] 면역침전법을 위하여 그 PNGase F 처리된 샘플을 MERS-CoV Spike-492 단클론항체 또는 Spike-492 (L506F) 단클론항체로 4° C에서 오버나잇 배양하고 MERS-CoV Spike-492 단클론항체 또는 Spike-492 (L506F) 단클론항체로 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다.

[0104] 실시예 8:anti-MERS CoV S 단백질단클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 클로닝

[0105] Anti-Spike-492 펩타이드-특이적인 단클론 항체 (492-1G10E4E2) 및 anti-Spike-492(L506F) 펩타이드-특이적인 단클론 항체(506-2G10G5)를 생산하는 Hybridoma 세포(492-1G10E4E2 클론 및 506-2G10G5)를 배양하고 마우스 단클론 항체 isotyping 키트(Dipstick format, Bibco BRL or Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 아이소타이핑하였다. 총 RNAs를 하이브리도마 세포(492-1G10E4E2 클론 및 506-2G10G5)로부터 RNeasy Mini Kit (Qiagen)로 추출하고, cDNAs를 생성하였다.

[0106] Anti-Spike-492 펩타이드-특이적인 단클론 항체 (492-1G10E4E2)의 가변 중쇄 및 경쇄 도메인(V_H 및 V_L)에 대한 서열을 클로닝하기 위하여, 그 cDNAs를 Vent polymerase (NEB)를 사용하여 하기 프라이머 세트를 이용하여 증폭하였다. 중쇄 프라이머를 위하여, IGG2A (5'-GGA AGA TCT CTT GAC CAG GCA TCC TAG AGT CA-3';서열번호 11) 및 5'MH2 (5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3';서열번호 12)을 사용하였다.

[0107] kappa 체인 프라이머를 위하여, 3'Kc (5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3';서열번호 13) 및 5'Mk (5'-GG GAG CTC GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3';서열번호 14)를 사용하였다.

[0108] anti-Spike-492(L506F)펩타이드-특이적인 단클론 항체(506-2G10G5)의 가변 중쇄 및 경쇄 도메인(V_H 및 V_L)에 대한 서열을 클로닝하기 위하여, 그 cDNAs를 Vent polymerase (NEB)를 사용하여 하기 프라이머 세트를 이용하여 증폭하였다. 중쇄 프라이머를 위하여, IGG1 (5'-GGA AGA TCT ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC-3';서열번호 11) 및 5'MH2 (5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3';서열번호 12)를 사용하였다.

[0109] kappa 체인 프라이머를 위하여, 3'Kc (5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3';서열번호 13) 및 5'Mk (5'-GG GAG CTC GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3';서열번호 14)를 사용하였다.

[0110] 표준 PCR 반응을 25 주기 동안 수행하였다. 그 PCR 산물들을 직접적으로 pGEM-T easy vector (Promega)에 라이게이션하였다. 클론된 mouse Ig 삽입체를 DNA 시퀀싱으로 분석하였다.

[0112] 실시예 9: 간접 면역형광 어세이 및 공초점 이미지들

[0113] 간접 면역형광 어세이(indirect immunofluorescence assay:IFA)를 수행하기 위하여, MERS-CoV 감염된 Vero 세포 및 -비감염된 Vero 세포의 혼합물(ratio 1:3)을 슬라이드 글래스 상에 플레이팅하였다. 그 혼합된 세포들을 아세톤으로 고정화하고 증류수로 세척하고, normal mouse IgG, MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체로 37° C에서 배양하였다. 2시간 배양한 후, 그 슬라이드들을 PBS 및 DW로 세척한 후, Alexa Flour 488-부착된 goat anti-mouse IgG 항체 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 배양하였다. 샘플들을 마운팅한 후 형광 현미경(IX70, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

[0114] 공초점 이미지들을 관찰하기 위하여, Vero 세포들 (5×10^4 세포)를 12-웰 배양 플레이트 내의 커버 글라스 상

에 플레이팅하고 MERS-CoV (0.1 MOI)로 2일간 감염시켰다. 그 세포들을 4% paraformaldehyde로 고정화하고 1% BSA 및 0.1% triton X-100을 포함하는 PBS로 30분간 블러킹하였다. MERS-CoV Spike-492 단클론 항체를 플레이트에 첨가하고 2시간 배양한 후, Alexa488 부착된 goat anti-mouse IgG로 1시간 동안 배양하였다. 핵을 Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific)로 염색하였다. 그 슬라이드들을 Carl Zeiss LSM710 (Carl Zeiss, Oberkochen, DE)으로 관찰하였다.

[0116] 실시예 10: 플라크(Plaque) 감소 어세이

[0117] 6×10^5 Vero 세포/웰을 six-웰 플레이트(Thermo Fisher Scientific) 상에 플레이팅하고 12시간 동안 배양하였다. 감염시키기 전에, MERS-CoV를 두 배 연속 희석된 정상 mouse IgG, 492-1G10E4E2 단클론 항체 또는 506-2G10G5으로 30분간 37° C에서 미리 배양하였다. 바이러스-항체 혼합물을 Vero 세포에 500 μ l의 PBS로 첨가하였다. 1시간 배양 후, 상등액을 제거하고 3 ml의 0.6% oxid 아가를 포함한 DMEM/F12 배지(Thermo Fisher Scientific)를 첨가하였다. 각 웰에서 형성된 플라크를 배양 4일 후 crystal violet으로 염색하였다. 그 플라크들을 카운팅하고 퍼센트를 계산하였다.

[0119] 상기 실시예의 결과는 하기와 같다.

[0121] B 세포 에피토프 분석 및 MERS-CoV S 단백질 에피토프를 타겟팅하는 항체의 생산

[0122] B 세포 에피토프 동정 및 선택은 에피토프 기반 항체 생산에 중요한 고려사항 중 하나이므로 MERS-CoV S 단백질의 명백한 B 세포 에피토프 아미노산 서열을 에피토프 예측, 표면 접근성 및 항원성 스케일에 기반하여 IEDB(Immune Epitope Database and Analysis Resources)을 이용하여 예측하였다. S 단백질 내에 RBD 도메인은 숙주에 결합에 관여하기 때문에, S 단백질 내에 RBD 도메인 내에 492-516 아미노산을 가지는 Spike-492 및 Spike-492 (L506F) 펩타이드 서열을 선택하여 합성하였다(도 1A 및 B). B 세포 에피토프로서 효율성을 결정하기 위하여, 각 펩타이드 및 Lipoplex (O) 복합체를 제조하여서 BALB/c 마우스에 면역화하였다. 항체 타이틀을 스크리닝하기 위하여, ELISA를 면역화된 항체의 혈청으로부터 수행하였다. 양 펩타이드 모두 펩타이드-특이 IgGs의 생산을 유도할 수 있다(도 1C). 따라서 면역원성 에피토프를 성공적으로 고안되고 생산되었다.

[0123] MERS-CoV의 Spike-492 (L506F) 또는 Spike-492 에피토프-특이적인단클론 항체의 생산

[0124] MERS-CoV S 단백질 에피토프-특이적인단클론 항체를 생산하기 위하여, 지라세포를 리포솜(DOPE;CHEMS)내에 동시 캡슐화된 Spike-492 (L506F) 또는 Spike-492 에피토프 펩타이드 및 CpG-DNA 복합체 면역화된 마우스로부터 모았다. 그 마우스 지라세포를 SP2/0와 융합하고, Spike-492 (L506F) 에피토프 펩타이드-특이적인 항체를 생산하는 506-2G10G5 클론을 HAT 및 HT 보충물로 선택하였다(도 2).

[0125] 그 마우스 지라세포를 SP2/0와 융합하고, Spike-492 에피토프 펩타이드-특이적인 항체를 생산하는 492-1G10E4E2 클론을 HAT 및 HT 보충물로 선택하였다(도 3).

[0126] MERS-CoV의 Spike-492 (L506F) 또는 Spike-492 에피토프-특이적인단클론 항체의 특성

[0127] 다량의 단클론 항체를 얻기 위하여, 506-2G10G5 클론 또는 492-1G10E4E2 클론을 복수 생산을 위하여 마우스 복강내로 주사하고, 복수액을 506-2G10G5 클론 또는 492-1G10E4E2 클론으로 주사된 마우스로부터 모아서 정제하였다(도 4A 및 도 5A). 다음 506-2G10G5 또는 492-1G10E4E2 단클론항체의 아이소타입 분류를 ELISA로 수행하여 각각 IgG1 및 IgG2a로 발견하였다(도 4B 및 도 5B). Spike-492 (L506F) 또는 Spike-492 펩타이드를 타겟팅하는 단클론항체의 결합 친화도를 Spike-492 (L506F) peptide 또는 Spike-492 ELISA로 결정하였고, 506-2G10G5 및 492-1G10E4E2 단클론항체의 EC50 값들은 각각 178 pM 및 3.3 nM이었다(도 4C 및 도 5C).

[0128] MERS-CoV의 Spike-492 (L506F) 또는 Spike-492 에피토프-특이적인 단클론 항체에 의한 MERS-CoV S 단백질의 검출

[0129] 추가적으로 단클론 항체의 특성을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 MERS-CoV 감염 및 비감염된 Vero 세포로 웨스턴 블롯 및 면역침전을 수행하였다. 웨스턴 블롯팅 결과(도 4D, 도 5D)는 두 단클론항체 모두 MERS-CoV-감염된 Vero 세포에서 S 단백질에 특이적인 밴드를 검출하였으나, 비감염된 Vero 세포에서는 밴드가 관찰되지 않았

다. PNGase(peptide-N-glycosidase) F로 처리는 미처리된 샘플과 비교하여 S 단백질 밴드의 분자량 감소를 야기하였고(도 4D 및 도 5D) 이것은 두 단클론항체 모두 그것의 당화 및 비당화 형태의 S 단백질을 인지할 수 있다는 것을 시사한다. 또한, 단클론항체가 자연 형태의 S 단백질을 인식할 수 있는지를 평가하기 위하여 면역침전을 수행하였다. 본 발명자들은 두 항체 모두 MERS-CoV-감염된 Vero 세포 파쇄액 유래 자연 형의 S 단백질을 면역침전하였다(도 4F 및 도 5E). 각 해당 에피토프로 506-2G10G5 및 492-1G10E4E2 단클론항체의 교차반응성을 결정하기 위하여, ELISA를 수행하였다. 506-2G10G5 단클론항체는 Spike-492 (L506F)에 대한 492-1G10E4E2 단클론항체에 의하여 나타난 것과 비교하여 Spike-492 펩타이드에 대한 현저한 교차반응성을 나타내었다(도 4H 및 I). 따라서 두 항체 모두 MERS-CoV의 S 단백질에 대한 특이적인 결합을 나타내었다.

[0131] anti-Spike-492 (L506F) 펩타이드-특이적인 및 anti-Spike-492 펩타이드-특이적인 단클론 항체의 가변 도메인의 클로닝

[0132] 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(V_H 및 V_L)을 코딩하는 cDNA 서열을 Spike-492 (L506F) 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포(506-2G10G5)로부터 통상의 중쇄 및 경쇄 프라이머를 사용하여 클로닝하였다. DNA 시퀀싱에 의하여 확인한 그 서열들을 도 6에 나타내었다.

[0133] 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(V_H 및 V_L)을 코딩하는 cDNA 서열을 Spike-492 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포(492-1G10E4E2)로부터 통상의 중쇄 및 경쇄 프라이머를 사용하여 클로닝하였다. DNA 시퀀싱에 의하여 확인한 그 서열들을 도 7에 나타내었다.

[0134] 그 서열들을 단백질 BLAST 프로그램으로 공지된 서열과의 호모로지를 분석하였다.

[0135] 506-2G10G5 및 492-1G10E4E2 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 코딩하는 cDNA는 각각 보고된 면역글로블린 가변 중쇄 및 경쇄 도메인과 약 80 ~ 95% 및 93 ~ 98% 호모로지를 나타내었다.

[0136] MERS-CoV-감염된 세포에서 S 단백질에 대한 506-2G10G5 또는 492-1G10E4E2 단클론항체의 반응성

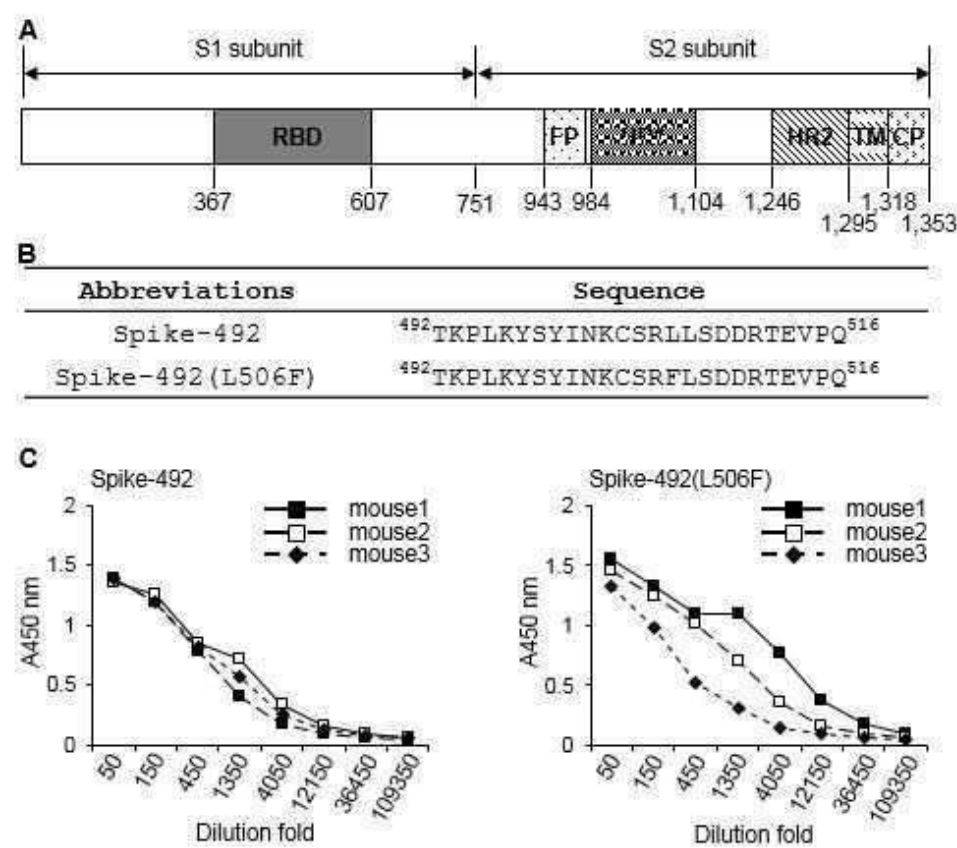
[0137] 추가적으로 IFA(indirect immunofluorescence assay)로 506-2G10G5 또는 492-1G10E4E2 단클론항체의 반응성의 폭을 분석하였다. 형광 현미경법은 두 항체 모두로 배양된 바이러스 감염된 세포에서 강한 형광 신호를 나타내었으나, 정상 마우스 IgG일 경우에는 형광이 관찰되지 않았다(도 8A 및 도 9A). MERS-CoV의 S 단백질에 대한 두 항체 모두의 특이성을 확인하기 위하여, 공초점 현미경법을 수행하였다. MERS-CoV-감염된 또는 비감염된 Vero 세포들은 정상 마우스 IgG 또는 506-2G10G5 또는 492-1G10E4E2 단클론항체로 염색되었다. 공초점 현미경법의 이미지들은 506-2G10G5 또는 492-1G10E4E2 단클론 항체로 염색된 MERS-CoV 감염된 세포의 원형질 부위 내에서 형광 신호가 명확하게 나타났다. 정상 마우스 IgG로 배양된 세포에서는 염색이 관찰되지 않았다(도 8B 및 도 9B). 이 결과들은 MERS-CoV-감염된 세포에서 MERS-CoV의 S 단백질의 효과적인 검출에서 두 단클론 항체의 특이성을 나타내었다.

[0138] 506-2G10G5 단클론항체는 Vero 세포의 MERS-CoV 감염을 저해함

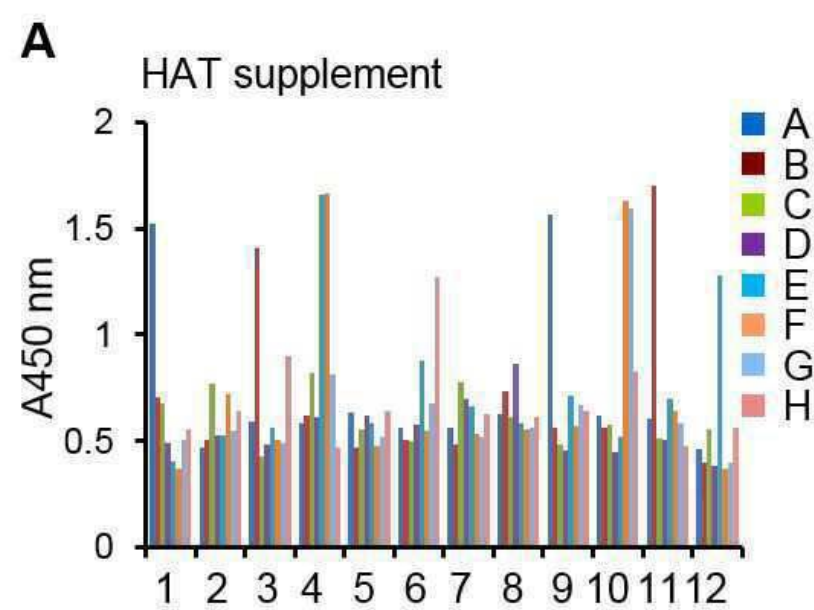
[0139] 추가적으로 플라크 감소 어세이에서 MERS-CoV에 대한 두 단클론 항체의 저해 활성을 조사하였다. 이 어세이에서, 두 단클론항체는 정상 마우스 IgG와 비교하여 농도 의존적으로 플라크 형성을 저해하였다. 그러나, 506-2G10G5 단클론 항체로 처리한 경우에 492-1G10E4E2 단클론 항체와 비교하여 농도 의존적으로 플라크 형성의 더 높은 저해가 관찰되었다(도 10A 및 B). 따라서 이러한 결과는 506-2G10G5 단클론 항체의 효과가 MERS-CoV 감염에 대한 잠재적인 치료적 적용 가능성을 나타낸다.

도면

도면1

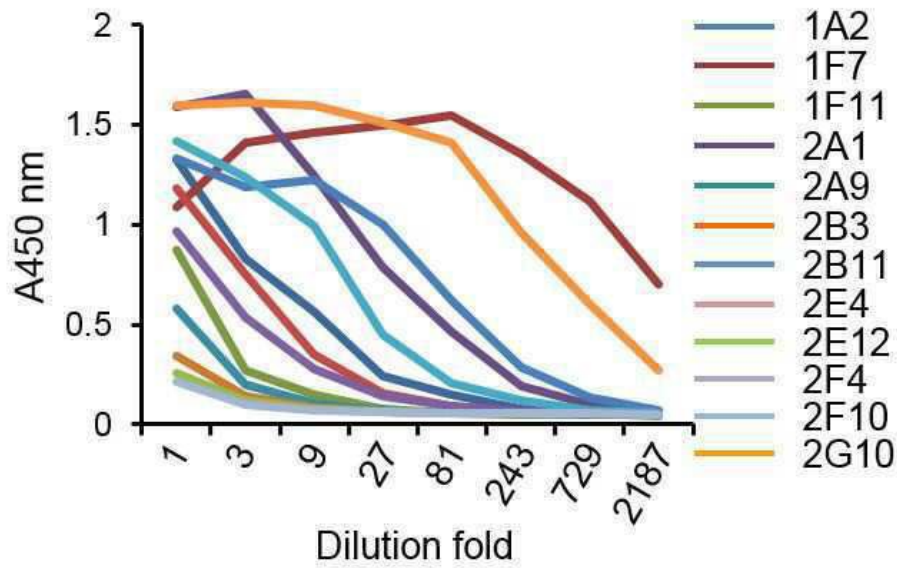


도면2a



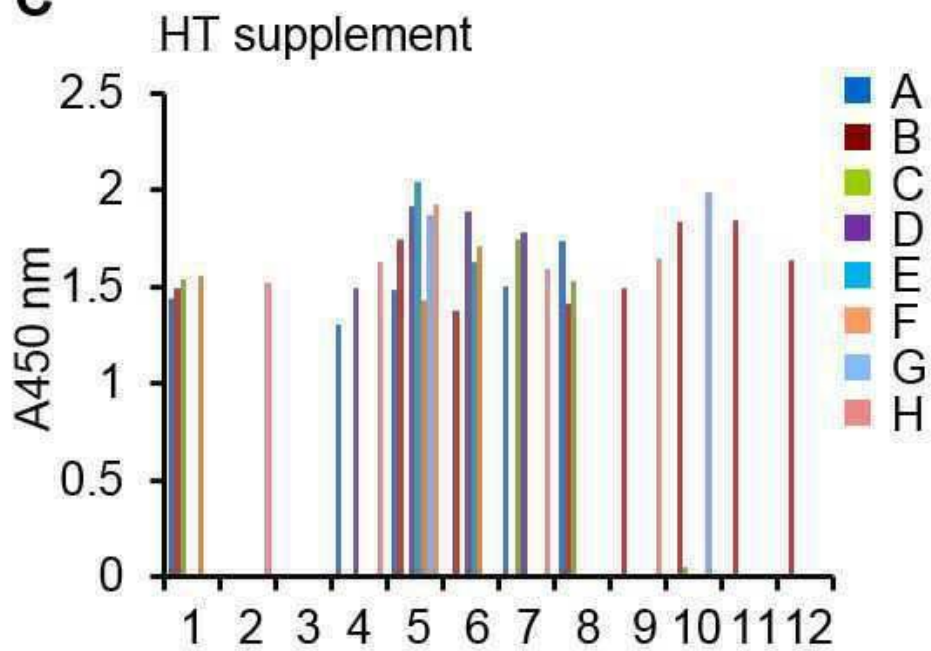
도면2b

B

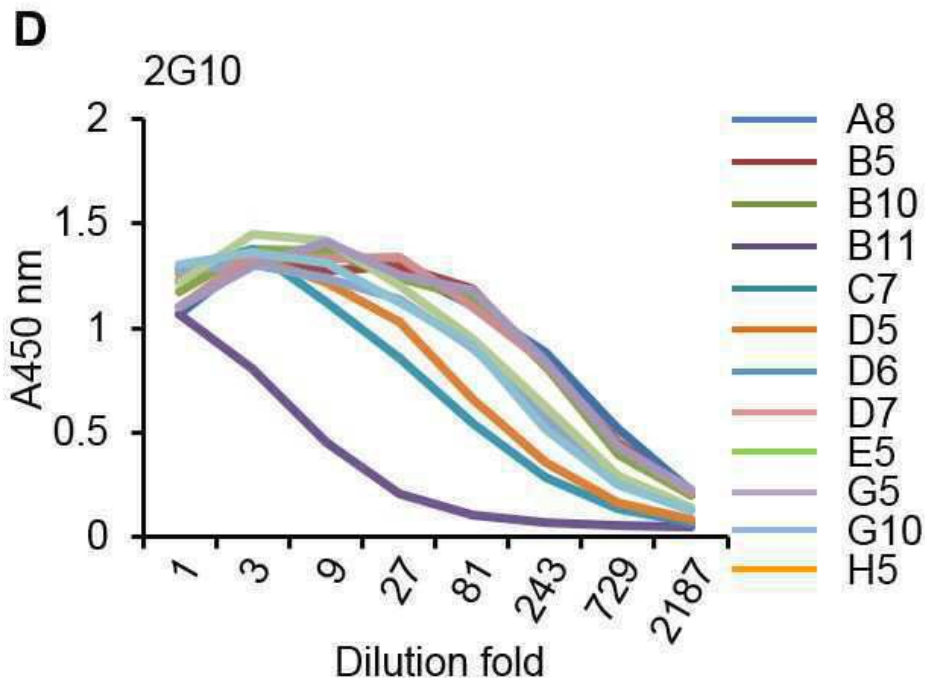


도면2c

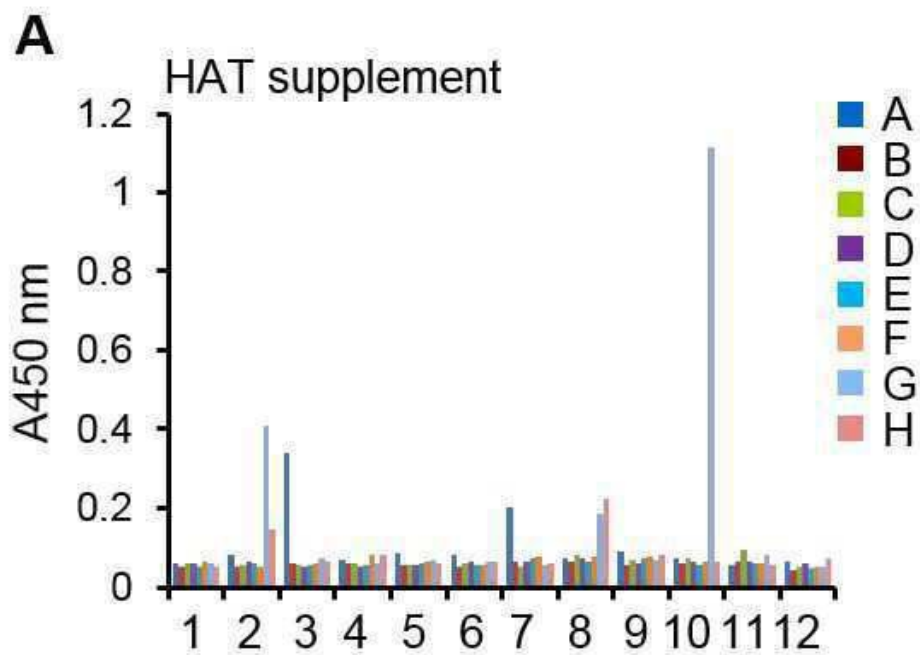
C



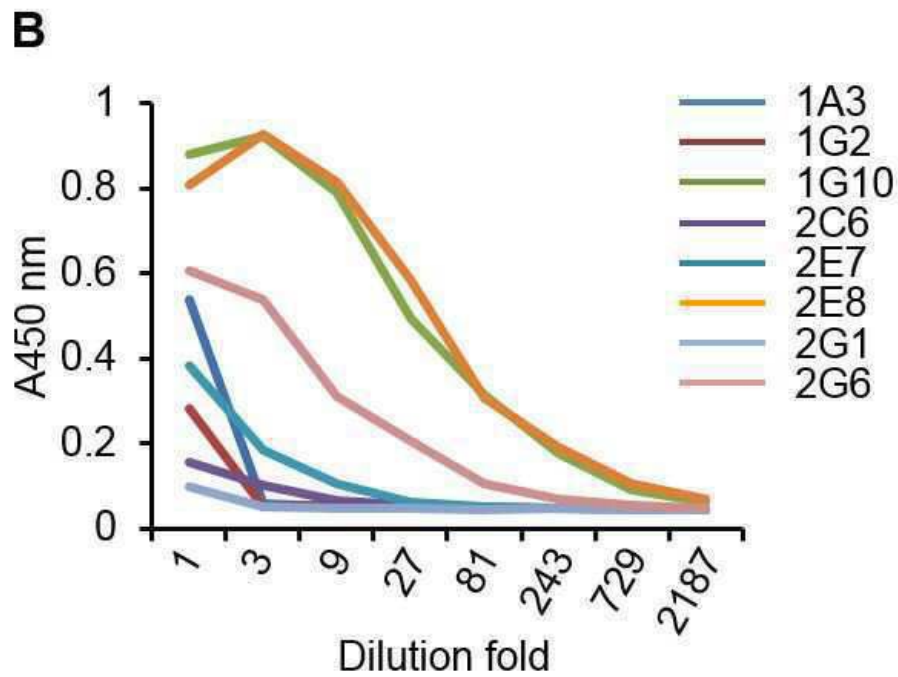
도면2d



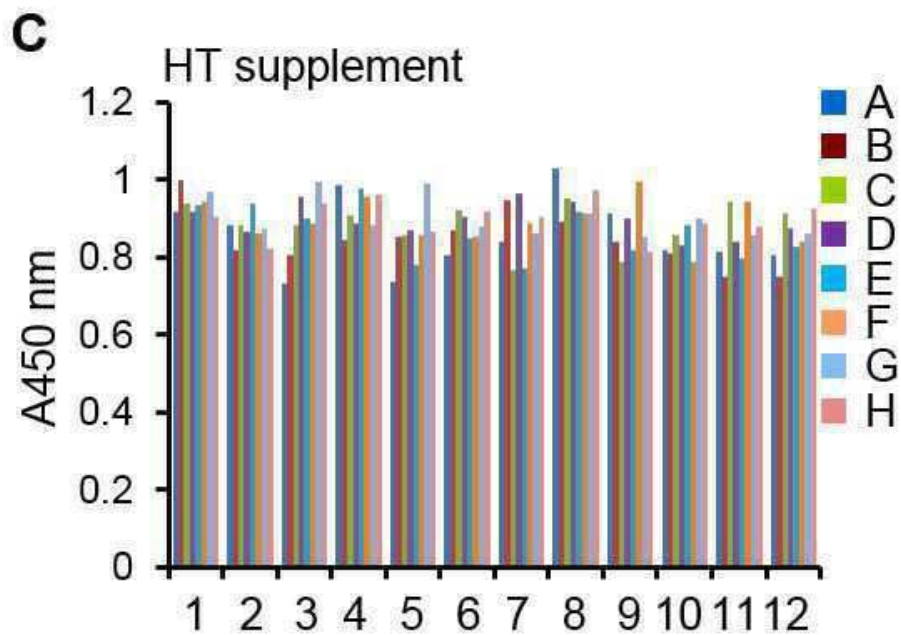
도면3a



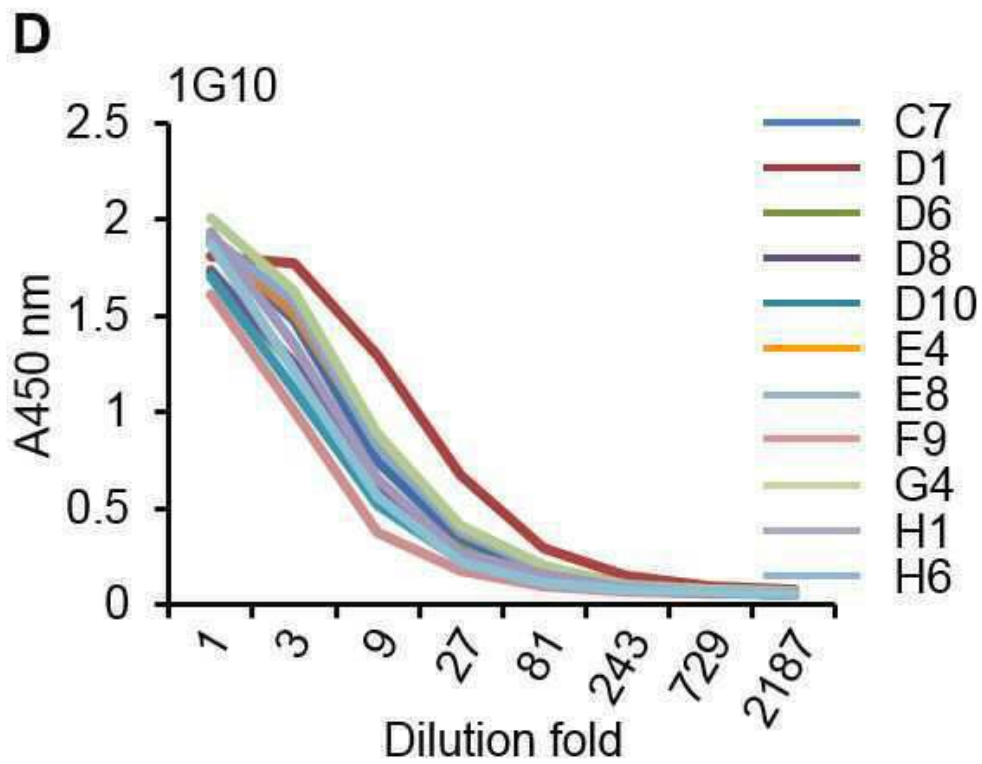
도면3b



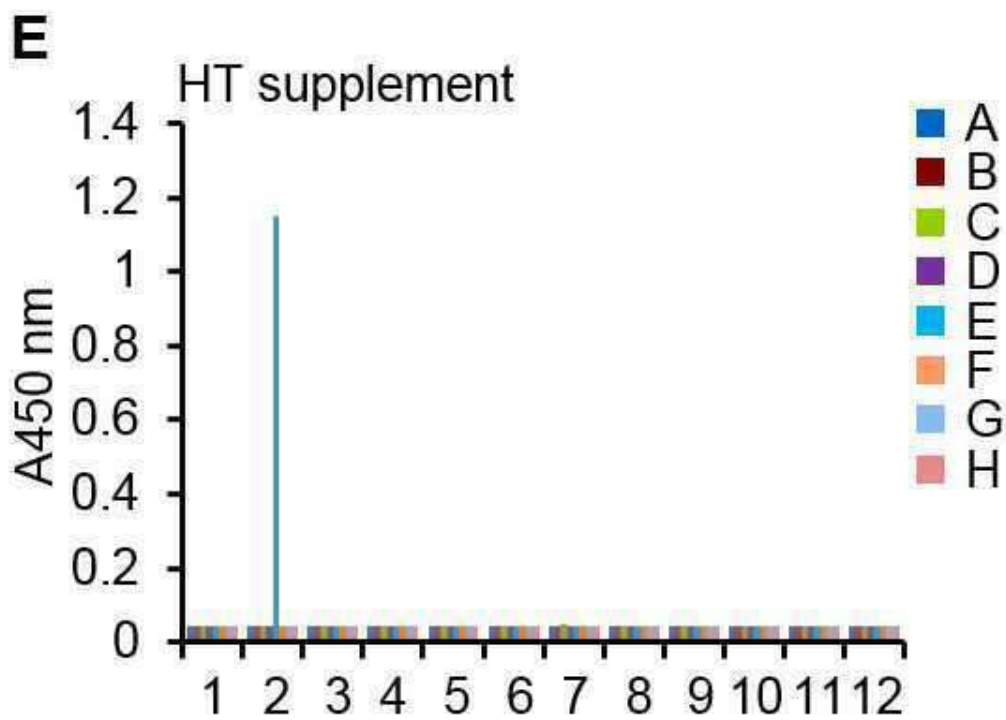
도면3c



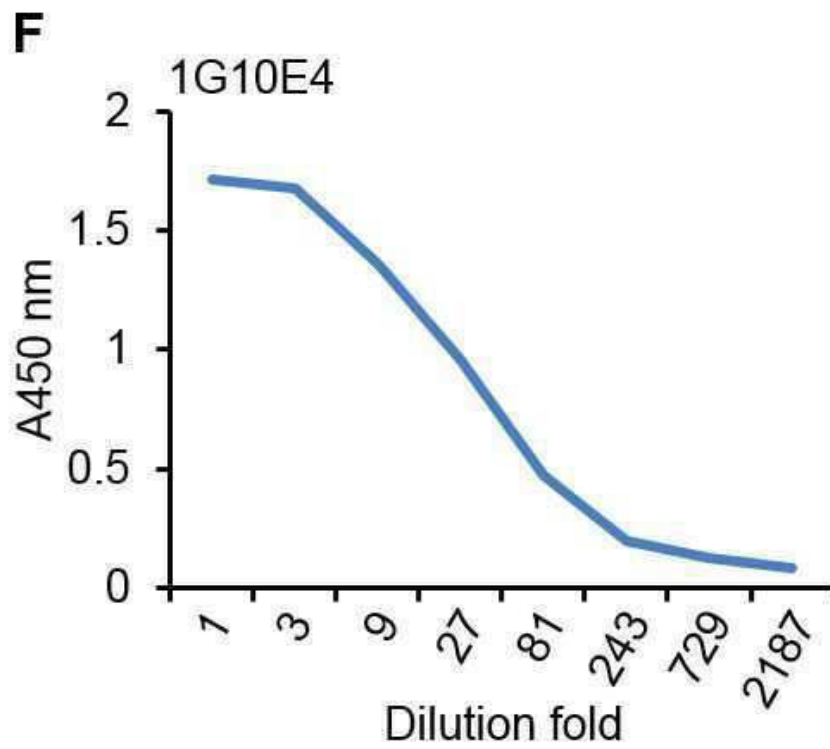
도면3d



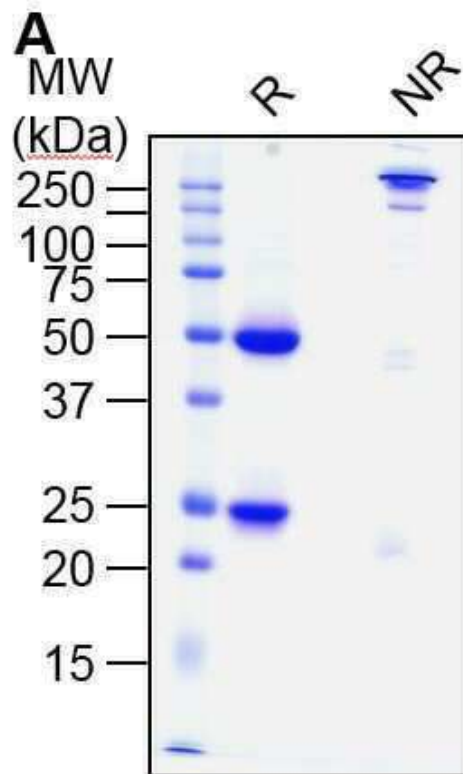
도면3e



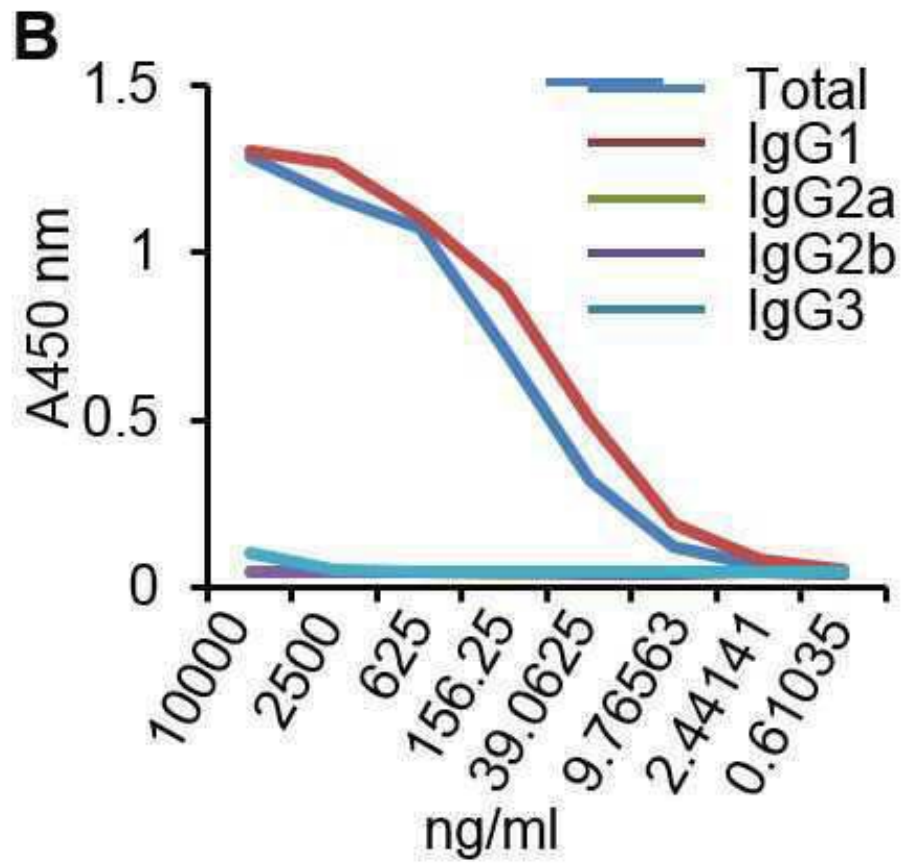
도면3f



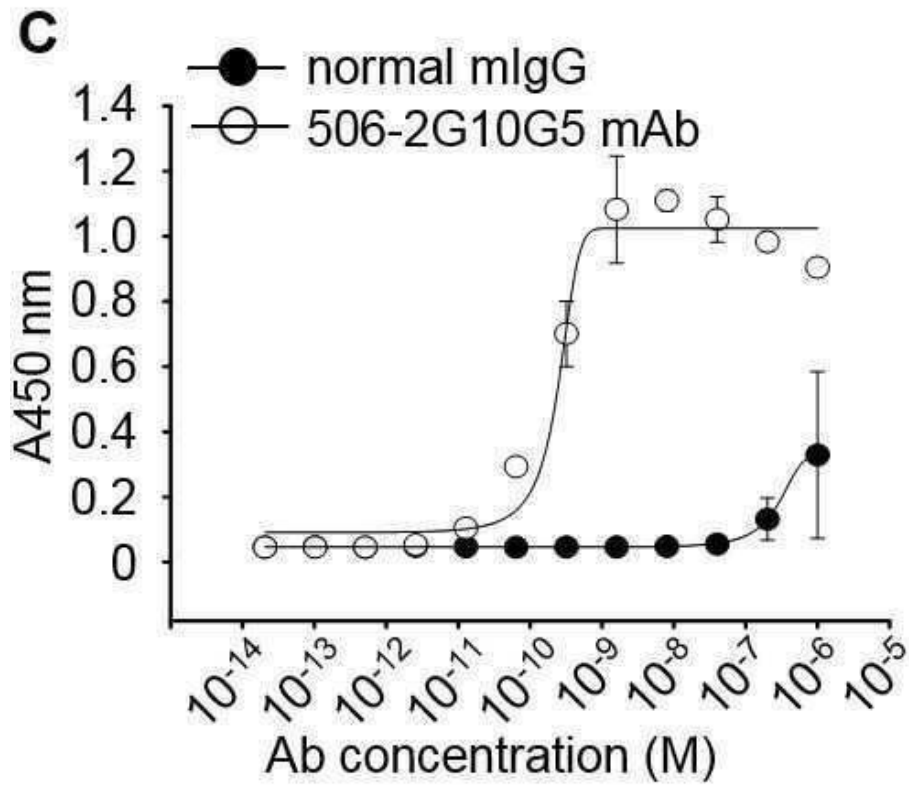
도면4a



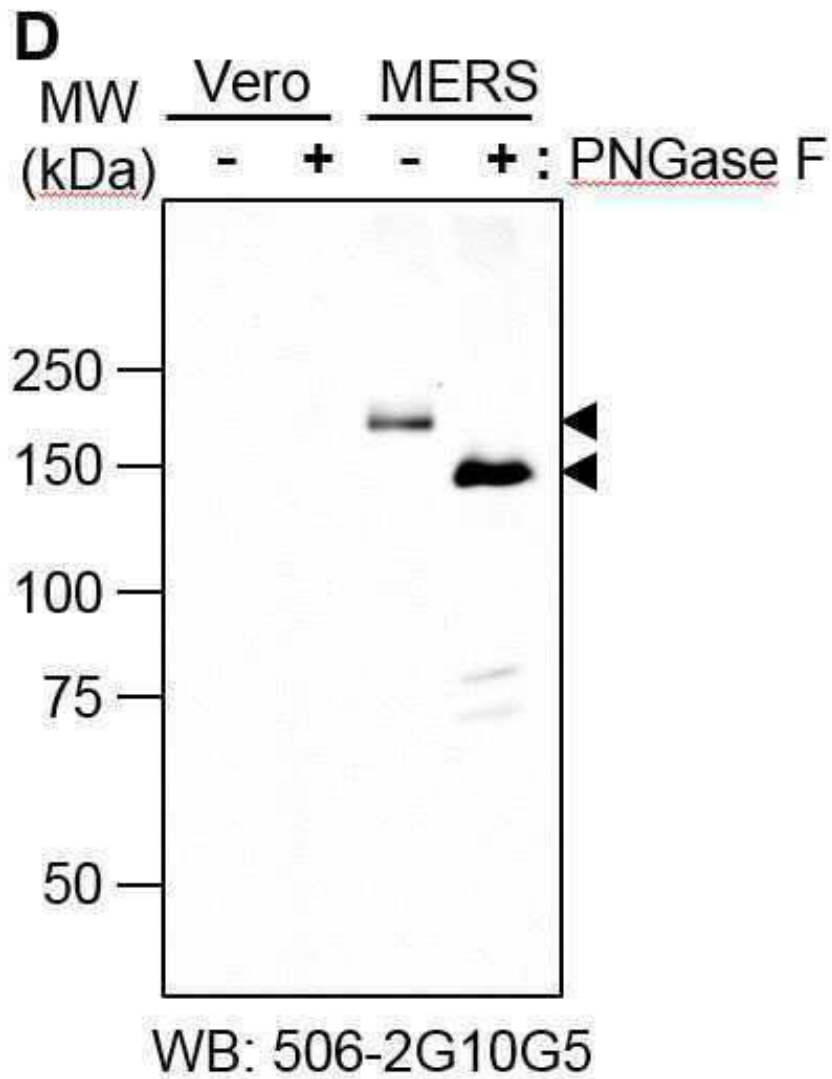
도면4b



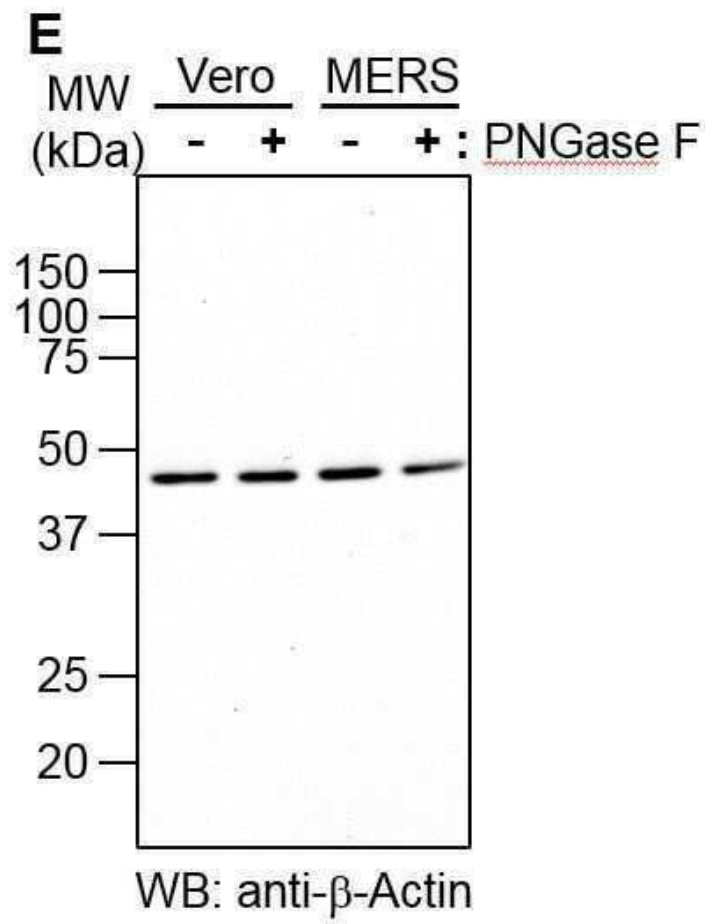
도면4c



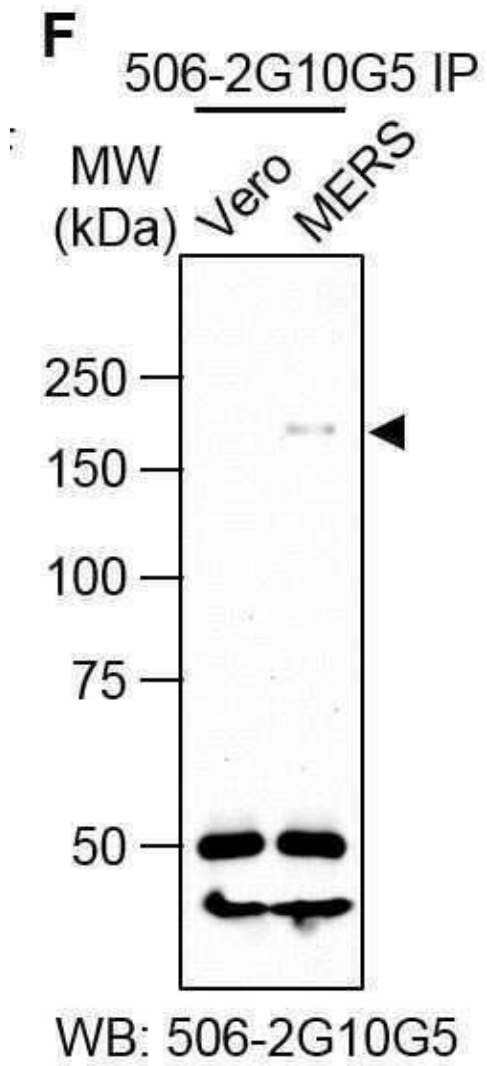
도면4d



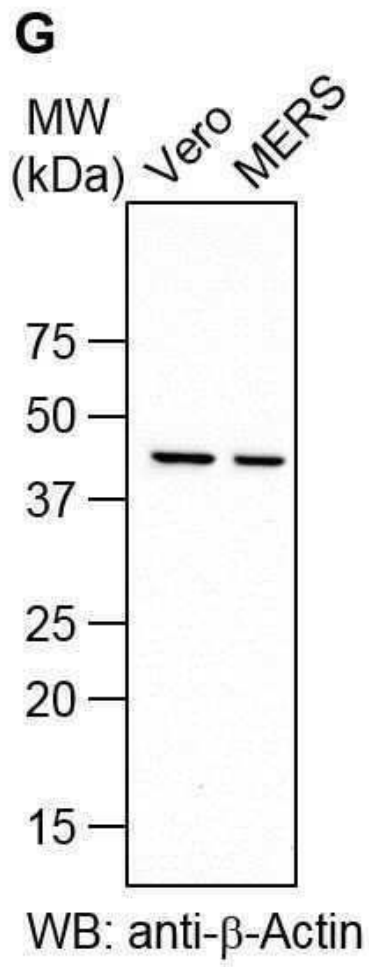
도면4e



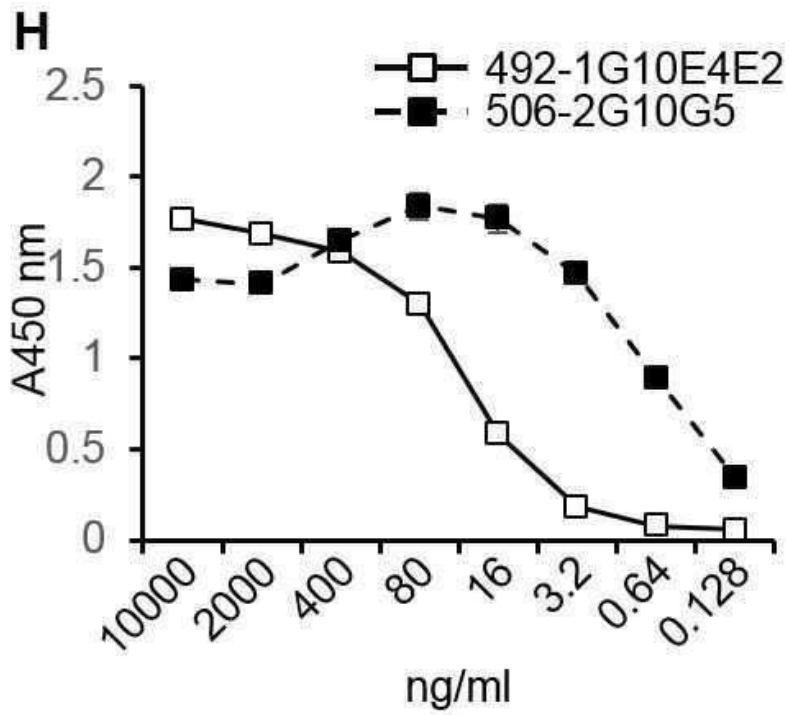
도면4f



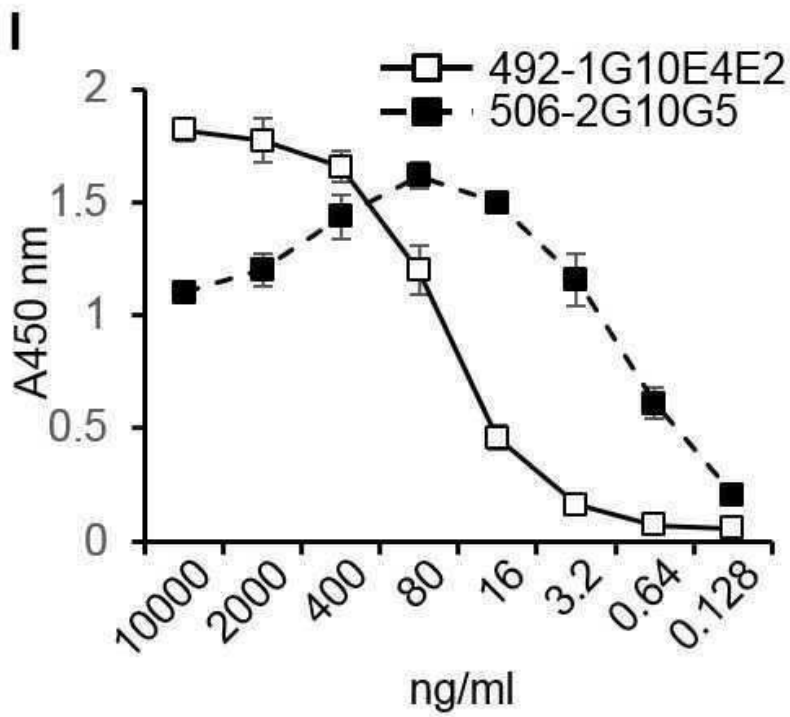
도면4g



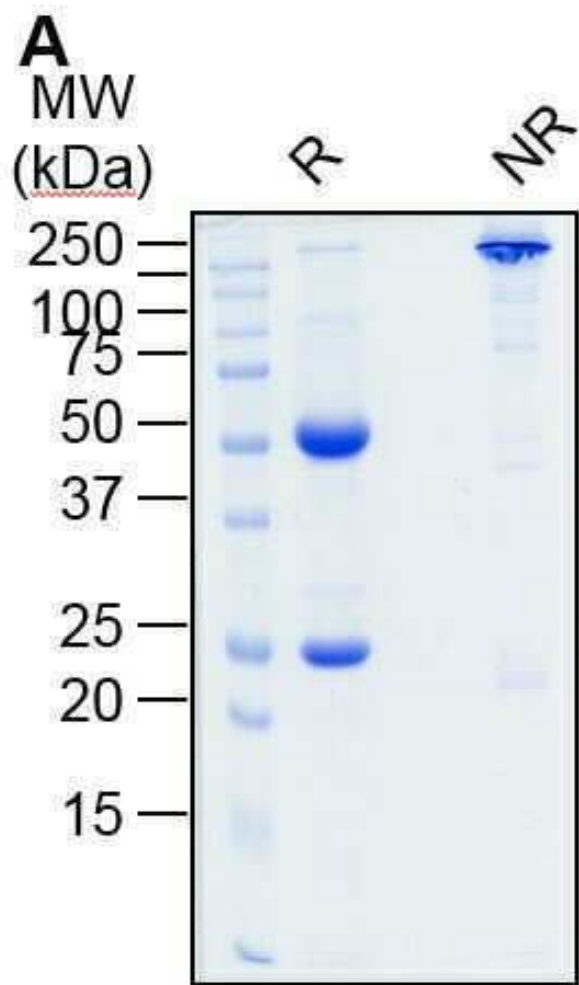
도면4h



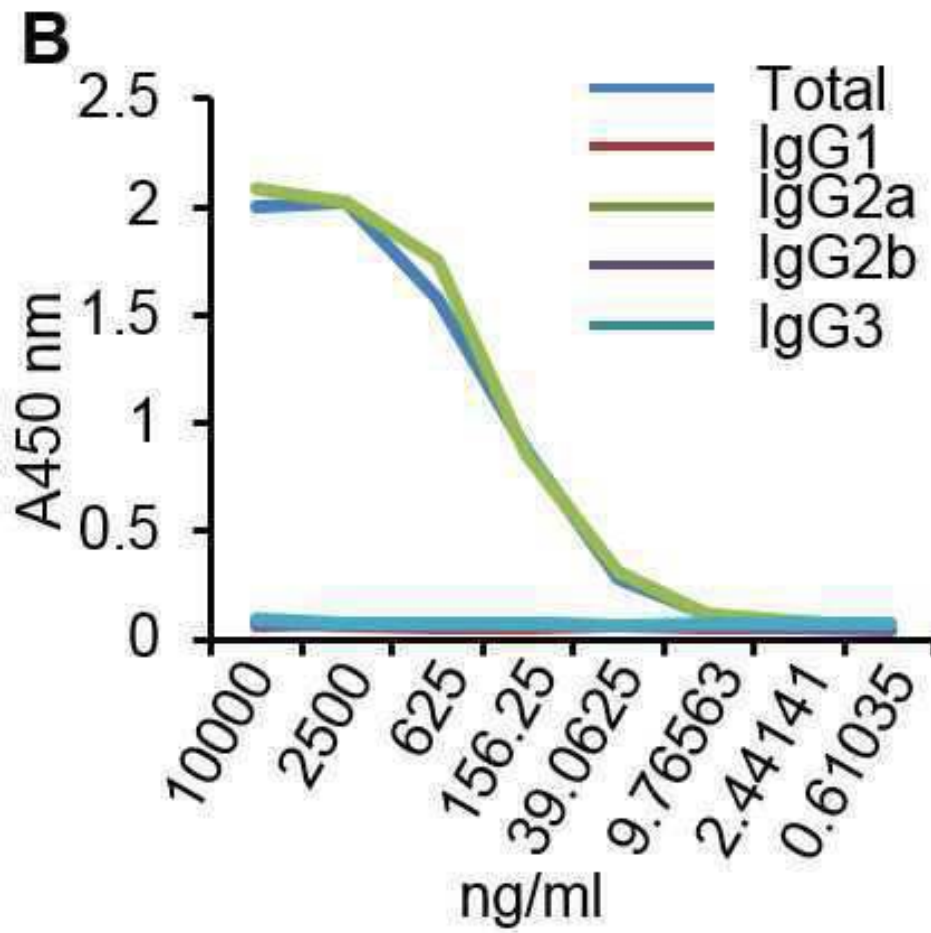
도면4i



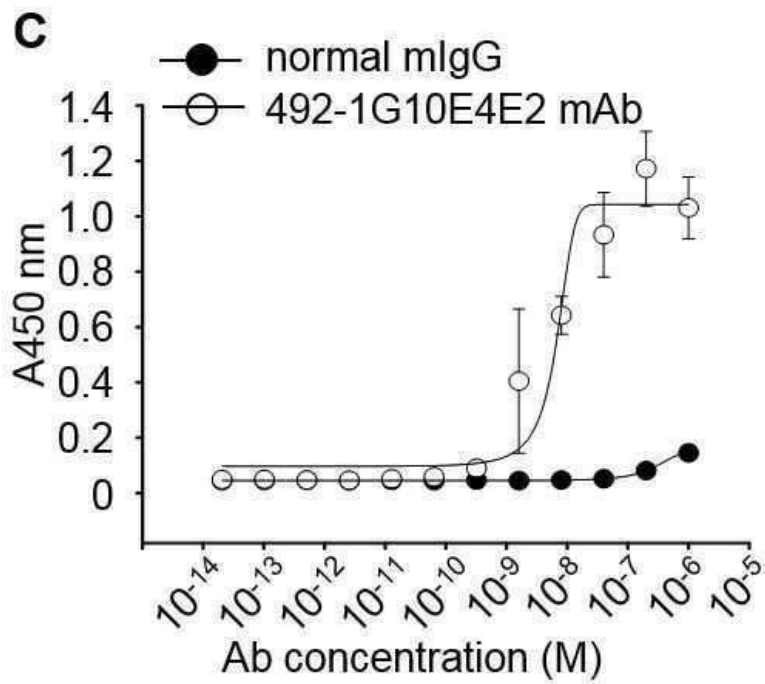
도면5a



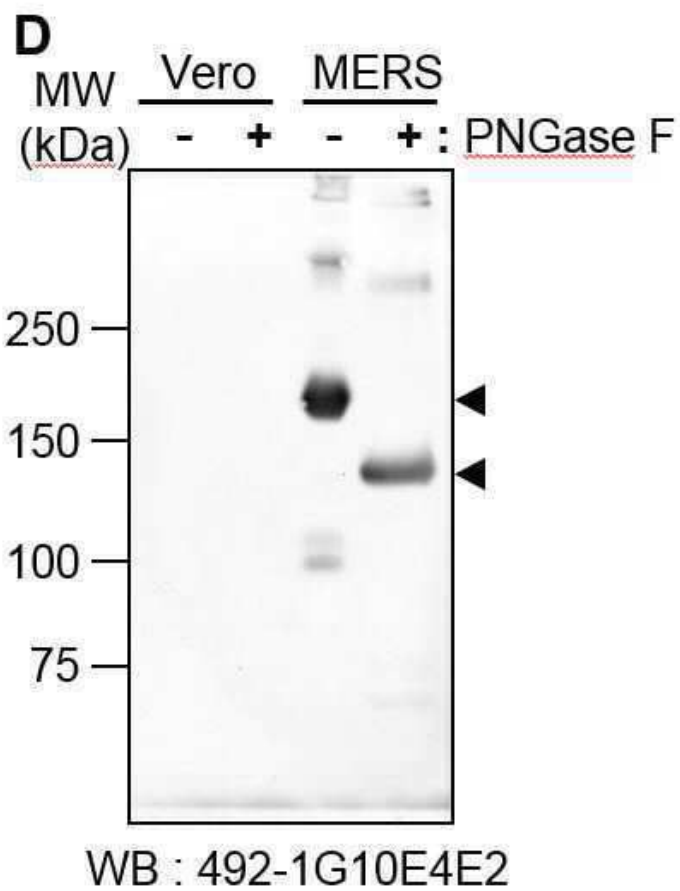
도면5b



도면5c

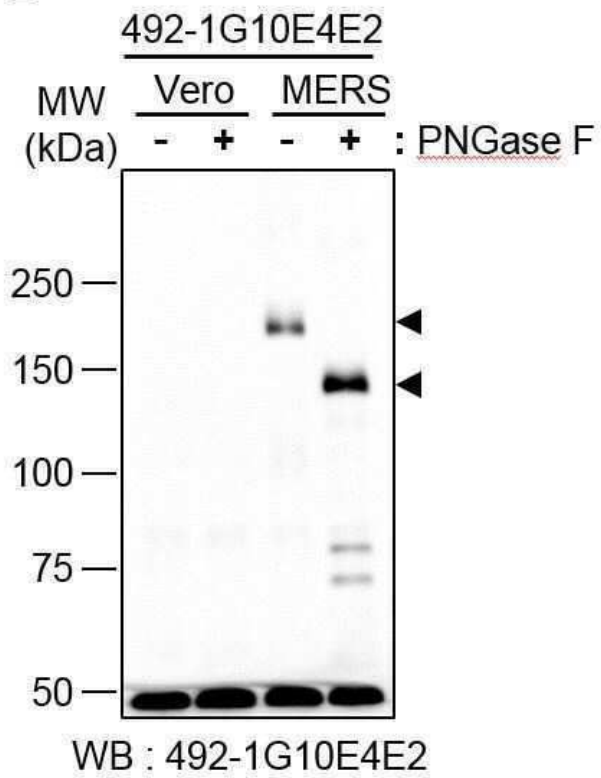


도면5d

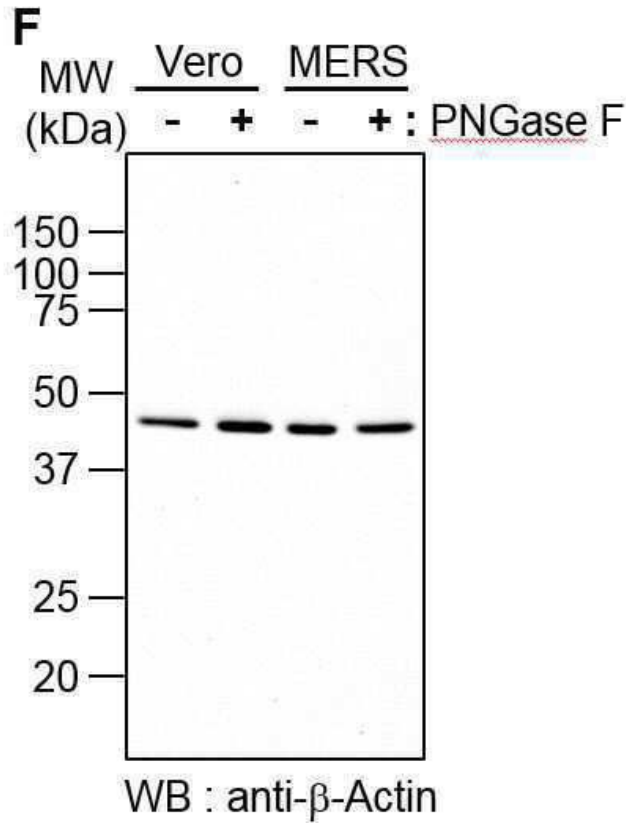


도면5e

E



도면5f



도면6a

A Spike506-2G10G5 Heavy chain

CTTCCG GAATTC

CAAGTTAAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGGGGTCACGGGGACTCTCTTGTGAAGGCTCAGGGTTTA
 CTTTATAGTGGCTTCTGGATGAGCTGGGTTTCGACAGACACCTGGTAAGACCCTGGAGTGGATTGGAGACATTAATTCTGATGG
 CAGTATAATAAACTACGCACCATCCATCAAGGATCGATTCACATATCTTCAGAGACAATGACAAGACCACCCTGTACCTGCAG
 ATGAGCAATGTGCGATCTGAGGACACAGCCACGTATTTCTGTTTCGATCTACTATGATTCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAG
 GGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT AGATCT TCC

CDR1 CDR2

LPEFQVKLQESGGGLVQPGGSRGLSCEGSGFTFSGFWMSWVRQTPGKLEWIGDINSDGSIINYAPSIKDRFTIFRNDKTT
 LYLQMSNVRSEDATYFCSTIYDWSWFAYWGQGLVTVSAAKTTPPSVYRSS

CDR3

도면6b

B Spike506-2G10G5 Kappa chain

GG GAGCTC
 GATATTGTGCTCACACAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
 CATTGTACATAGCAATGGAAACACCTATTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
 TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
 GAGGCTGAAGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACATGTTCTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAAT
 CAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC GCATGC ACC

CDR1 CDR2
 ELDIVLTQSPVLSPLVSLGDAQSISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
 RVEAEDLGVIYCFQGSHPRTFEGGKLEIKRADAAPTVSACT

CDR3

도면7a

A Spik492-1G10E4E2 Heavy chain

CTTCCG GAATTC
 CAAGTTTCAGCTGGAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGGGCTTCAGTGACGGTGTCTGCAAGGCTTCGGGCTACACAT
 TTACTGACTATGAAATGCACCTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTGATCCTGAAACTGGTGG
 TACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGC
 CTGACATCTGAGGAGTCTGCCGTCTATTACTGTACAAGACCAAGTAGCTACGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAG
 TCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGAC
 TCTAGGATGCCTGGTCAAG AGATCT TCC

CDR1 CDR2
 LPEFQVQLEQSGAELVRPGASVTVSCKASGYTFDYEHWVKQTPVHGLEWIGRIDPETGGTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM
 ELRLSTSEESAVYYCTRPSSYDAMDYWGQTSVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKRSS

CDR3

도면7b

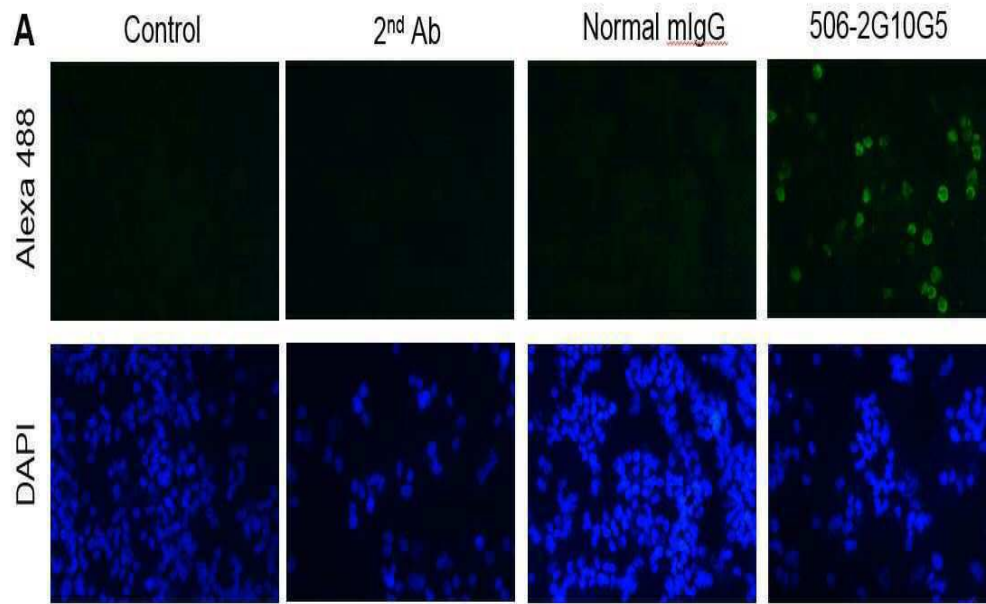
B Spike492-1G10E4E2 kappa chain

GG GAGCTC
 GATATTGTGCTGACACAGTCTACACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCA
 TTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTC
 CAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT
 GAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACATGTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAACGGG
 CTGATGCTGCACCAACTGTATCC GCATGC ACC

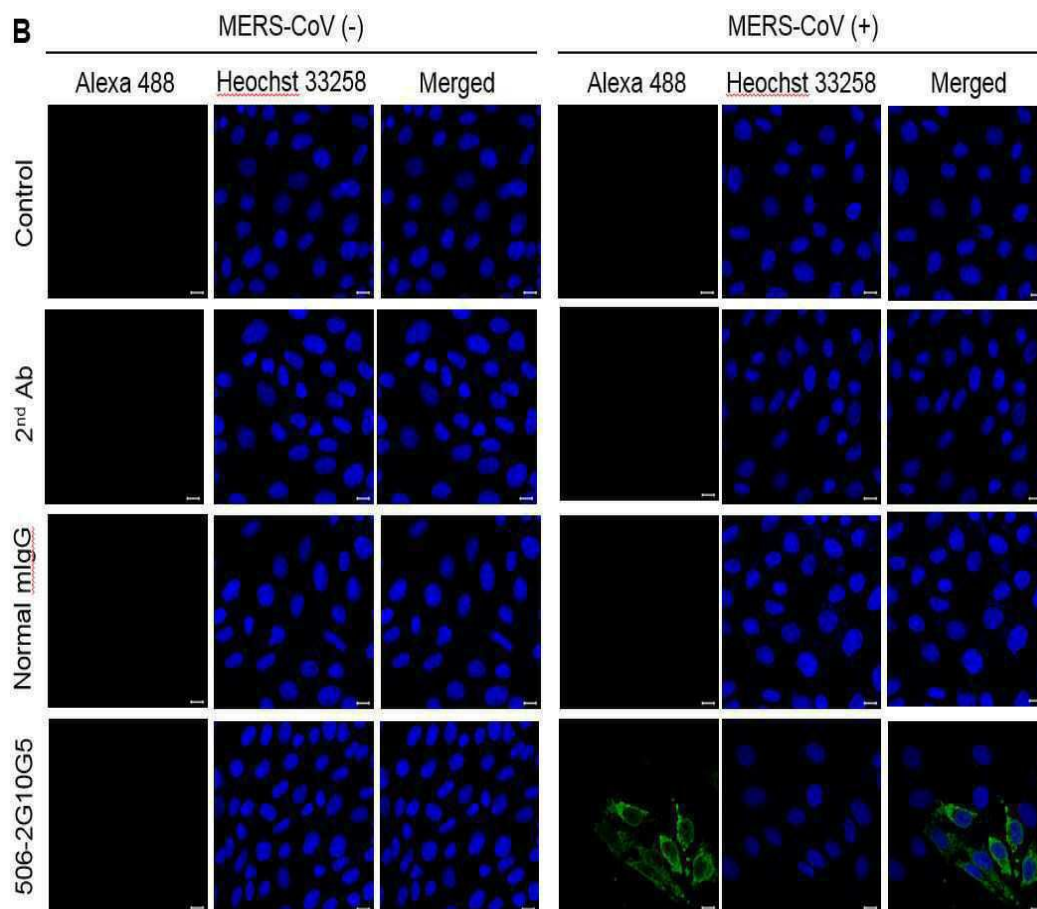
CDR1 CDR2
 ELDIVLTQSTLSPLVSLGDAQSISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV
 EAEDLGIYYCFQGSHPRTFEGGKLEIKRADAAPTVSACT

CDR3

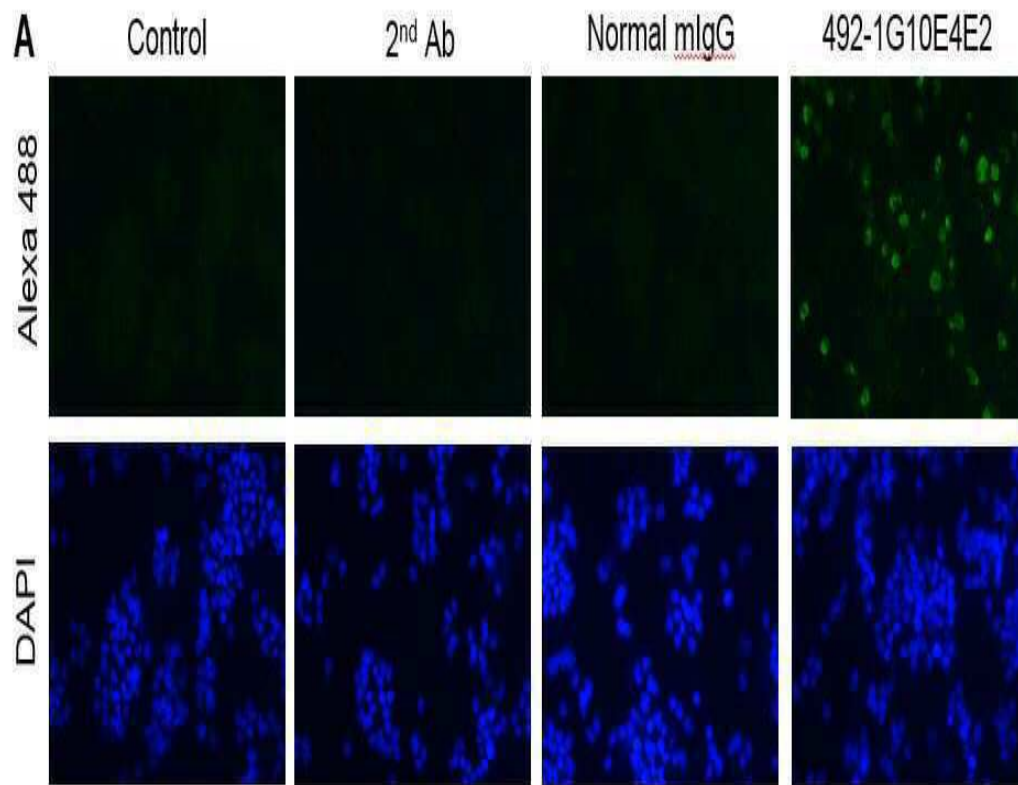
도면8a



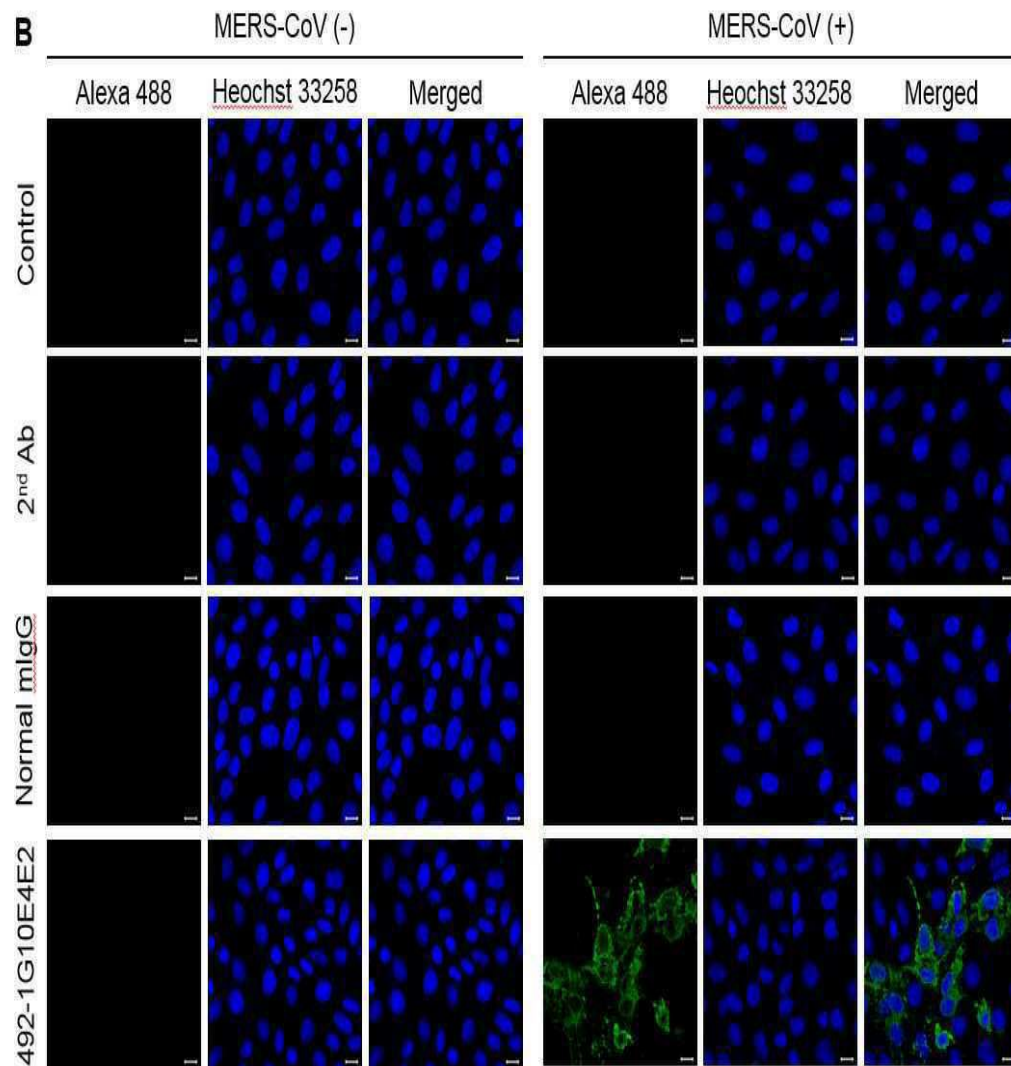
도면8b



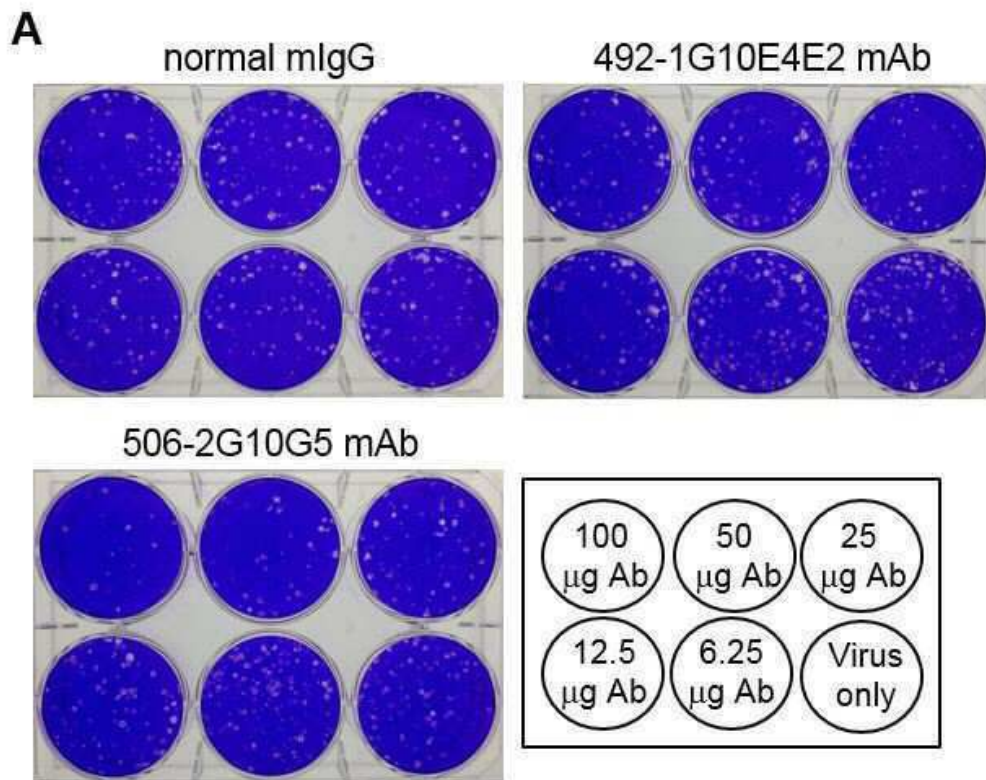
도면9a



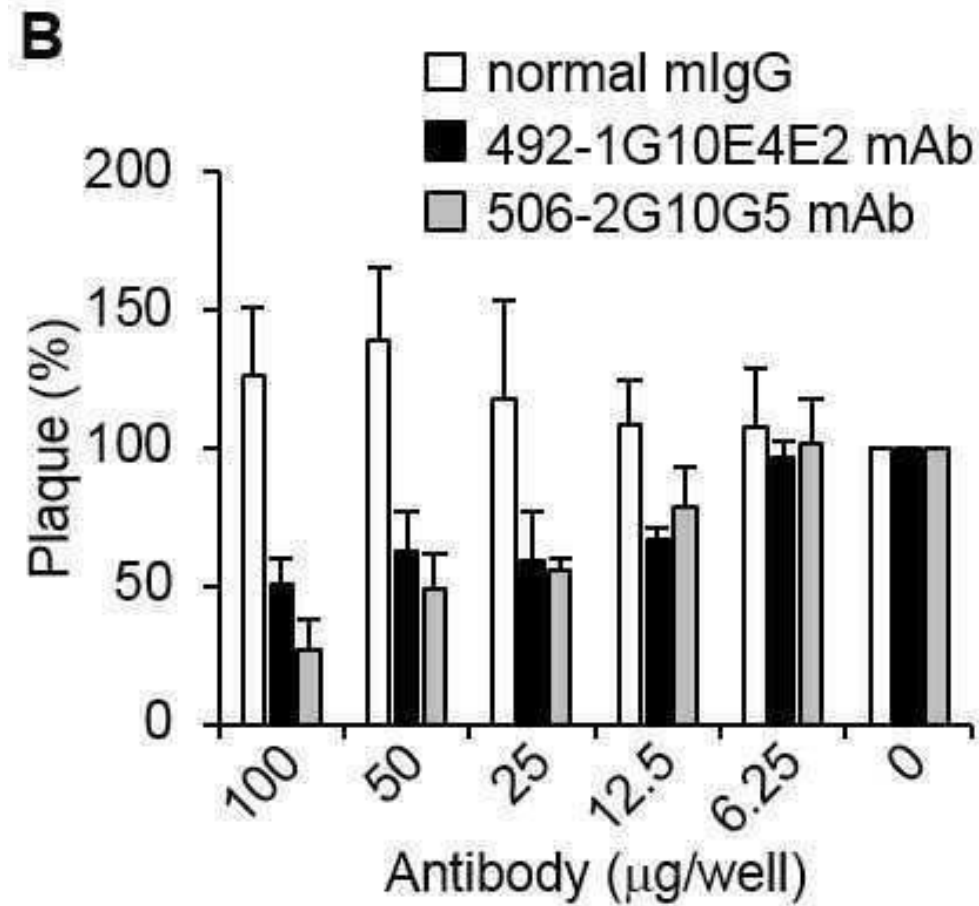
도면9b



도면10a



도면10b



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> An monoclonal antibody against S protein of MERS-CoV and use of the same
- <130> P18-0113HS
- <160> 14
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CDR1 of VH
- <400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Phe Trp Met Ser

1

5

10

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR2 of VH

<400> 2
 Asp Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ile Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Ile Lys
 1 5 10 15
 Asp

<210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR3 of VH
 <400> 3

Tyr Tyr Asp Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR1 of VL
 <400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR2 of VL
 <400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR3 of VL
 <400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr

1 5
 <210> 7
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH
 <400> 7

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

1 5 10 15
 Gln Pro Gly Gly Ser Arg Gly Leu Ser Cys Glu Gly Ser Gly Phe Thr
 20 25 30
 Phe Ser Gly Phe Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Thr
 35 40 45
 Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ile Ile Asn Tyr
 50 55 60
 Ala Pro Ser Ile Lys Asp Arg Phe Thr Ile Phe Arg Asp Asn Asp Lys
 65 70 75 80

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Asn Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Thr Tyr Phe Cys Ser Ile Tyr Tyr Asp Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125
 Val Tyr Arg Ser Ser
 130

<210> 8

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400>

> 8

Glu Leu Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser

1 5 10 15

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val

20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly

35 40 45

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe

85 90 95

Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

100 105 110

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ala Cys Thr

115 120 125

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

<213> MERS-CoV/KOR/KNIH/002_05_2015

<400> 9

Thr Lys Pro Leu Lys Tyr Ser Tyr Ile Asn Lys Cys Ser Arg Leu Leu

1 5 10 15

Ser Asp Asp Arg Thr Glu Val Pro Gln

20 25

<210> 10

<211> 25
 <212> PRT
 <213> MERS-CoV/KOR/KNIH/002_05_2015
 <400> 10
 Thr Lys Pro Leu Lys Tyr Ser Tyr Ile Asn Lys Cys Ser Arg Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Asp Asp Arg Thr Glu Val Pro Gln
 20 25

<210> 11
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 ggaagatctc ttgaccaggc atcctagagt ca 32
 <210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35
 <210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 ggtgcatgcg gatacagttg gtgcagcatc 30

<210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

gggagctcga yattgtgnts acmcarwctm ca

32