



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0090408
(43) 공개일자 2025년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/10 (2025.05)
A61P 31/14 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0179291
(22) 출원일자 2023년12월12일
심사청구일자 2023년12월12일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정상택
서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 702호
정인지
서울특별시 노원구 동일로208길 20, 213동 1305호
이지선
서울특별시 은평구 은평로 220, 106동 1505호
(74) 대리인
위병갑

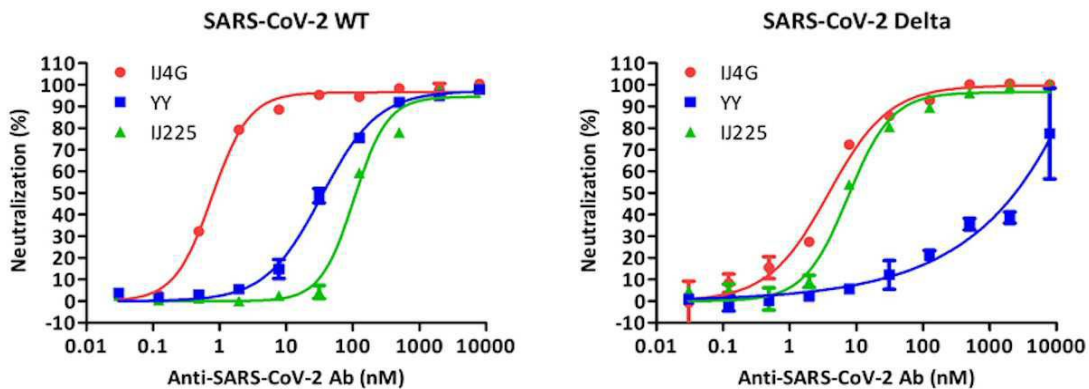
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 인간 코로나바이러스에 중화활성을 갖는 엔지니어링된 인간 항체

(57) 요약

본 발명은 인간 코로나바이러스에 중화활성을 갖는 엔지니어링된 인간 항체와 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 신규한 코로나바이러스에 대한 인간 항체들은 SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 또는 이의 변이체에 특이적으로 결합하며, 이에 대해 중화능을 나타내며, 교차 반응성을 가지므로, 이를 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료 용도로 활용할 수 있으며, 상기 항체 및 이의 면역학적 활성을 가진 단편들을 이용하여 다양한 종류의 코로나바이러스를 신속하게 검출할 수 있으므로, 인간 코로나바이러스, 특히, 높은 감염성을 가진 SARS-CoV-2와 이의 변이체의 면역 진단에 활용할 수 있다.

대표도 - 도27



(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
G01N 2333/165 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711197258
과제번호	00245059
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	암세포 사멸 효능 향상을 위한 CD89 결합 이중항체 개발 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2023.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711098515
과제번호	2019R1A4A1029000
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)기초연구실지원사업
연구과제명	면역관문 억제 항체치료 불응암 통합 제어 연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2019.09.01 ~ 2025.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

인간 코로나바이러스(coronavirus) 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 2

제 1항에 있어서, 인간 코로나바이러스는 SARS-CoV-1(Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus), MERS-CoV(Middle East respiratory syndrome coronavirus) 또는 SARS-CoV-2인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 3

제 1항에 있어서, 변이체는 SARS-CoV-2의 알파(alpha) 변이체, 베타(beta) 변이체, 감마(gamma) 변이체, 델타(delta) 변이체, 카파(kappa) 변이체 또는 뮤(mu) 변이체인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 4

제 1항에 있어서, 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 5

제 1항에 있어서, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1, 서열번호 3 내지 10의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH2, 및 서열번호 11 내지 16의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH3를 포함하는 VH 도메인을 포함하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 6

제 1항에 있어서, 서열번호 25 내지 27의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR1, 서열번호 28 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 30 내지 31의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR3, 및 서열번호 36 또는 37의 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VH 도메인을 포함하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 7

제 1항에 있어서, 서열번호 17 내지 19의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL1, 서열번호 20 또는 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열번호 22 내지 24의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL3를 포함하는 VL 도메인을 포함하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 8

제 1항에 있어서, 서열번호 38 내지 40의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR1, 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 42 내지 47의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR3, 및 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VL 도메인을 포함하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 9

제 1항에 있어서, 서열번호 49 내지 61의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하

는 VH 도메인을 포함하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 10

제 1항에 있어서, 서열번호 62 내지 72의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 VL 도메인을 포함하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 11

제 1항에 있어서, 인간 코로나바이러스의 RBD(Receptor Binding Domain)에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 12

제 1항에 있어서, 인간 코로나바이러스에 교차-반응성인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 13

제 12항에 있어서, SARS-CoV-1의 RBD 및 SARS-CoV-2의 RBD와 교차-반응성인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 14

제 13항에 있어서, SARS-CoV-1의 RBD, SARS-CoV-2의 RBD 및 이의 변이체의 RBD와 교차-반응성인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 15

제 1항에 있어서, 중화 항체인, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 16

제 15항에 있어서, 항체가 SARS-CoV-2 또는 이의 변이체를 중화시키는, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 17

제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 18

제 17항의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 19

제 18항의 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 20

제 1항의 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 인간 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 21

제 20항에 있어서, 인간 코로나바이러스 감염증은 MERS(Middle East respiratory syndrome), SARS(Severe acute respiratory syndrome) 또는 COVID-19(Coronavirus disease 2019)인, 인간 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 22

제 1항의 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는, 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체 검출용 조성물.

청구항 23

제 22항의 조성물을 포함하는 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체 검출 키트.

청구항 24

- (a) 검체로부터 분리된 시료를 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편과 접촉시키는 단계; 및
- (b) 항원-항체 복합체 형성을 검출하는 단계를 포함하는, 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체를 검출하는 방법.

청구항 25

- (a) 검체로부터 분리된 시료를 제 1항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편과 접촉시켜 항원-항체 복합체를 형성시키는 단계; 및
- (b) 상기 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하는, 인간 코로나바이러스 감염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 코로나바이러스에 중화활성을 갖는 엔지니어링된 인간 항체와 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코로나바이러스는 단일가닥 양성 RNA를 게놈으로 가지고 있는 외피가 있는 바이러스로 1937년 처음 발견된 이후 사람을 포함하여 다양한 동물에게서 분리되었다. 코로나바이러스는 4개의 그룹으로 나눌 수 있다. 이중 알파-코로나바이러스(Alpha-coronavirus)와 베타-코로나바이러스(Beta-coronavirus)는 주로 포유류에 감염되고, 감마코로나바이러스(Gamma-coronavirus)와 델타-코로나바이러스(Delta-coronavirus)는 조류에 감염되지만 최근 돼지에서 델타-코로나바이러스(Delta-coronavirus)의 감염이 확인된 사례가 있다. 코로나바이러스는 이중 간 감염이 이루어질 수 있다. 대표적인 사례로서 2003년에 전세계적으로 유행한 중증급성호흡기증후군을 일으키는 사스(SARS) 코로나바이러스와 2015년에 국내에 전파되어 확산된 메르스(MERS) 코로나바이러스를 들 수 있으며, 이들 바이러스 모두 박쥐에서 유래된 것으로 알려져 있다. 박쥐는 포유동물 중 비행능력이 있어 광범위한 지역에 서식할 수 있으며, 동굴 등 협소한 공간에서 다수의 개체가 집단으로 생활하는 특성으로 인하여 한 개체가 바이러스에 감염될 경우 집단으로 감염이 전달되고 비행을 통한 광범위한 지역으로의 이동을 통하여 다른 동물에 감염을 확산시킬 수 있다. 또한 박쥐는 다른 포유류와 달리 체온이 높아 바이러스에 대한 저항력이 있어 코로나바이러스 숙주인 박쥐는 영향을 받지 않고 지속적인 감염을 전파할 수 있다. 상기 기술한 바와 같이 코로나바이러스는 이중 간의 전파가 가능하고 박쥐에서 유래한 신종 코로나바이러스는 사람에게 전파하여 큰 문제를 발생시킬 수 있음이 확인되어 신종 박쥐 유래 코로나바이러스를 검출하기 위한 효과적인 진단법과 치료제의 개발이 시급하다. 현재 국내외에서 항바이러스제의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 임상에서 효능을 보인 비 특이적 항바이러스제는 type I 인터페론과 리바비린(ribavirin)이 있으나 감염초기에만 바이러스 억제 효과가 있는 것으로 보고된 바 있고, 메르스 코로나 바이러스 치료제와 사스 코로나 바이러스에 대한 치료제는 최근 개발 필요성이 높아짐에 따라 주목을 받고 있다(A. Zumla et.al, Nature Reviews Drug Discovery, 15:327-347,2016). 그러나, 현재 국내외에 허가 받은 치료제나 백신이 없고, 개발되는 물질의 평가 시스템이 확립되지 못하여 효능 평가를 위한 시스템 개발이 시급한 실정이다.

[0003] SARS-CoV-2 바이러스 감염증(신종 코로나바이러스 감염증, COVID-19)은 2019년 12월 중국 우한지역에서 발생했다고 보고되는 새로운 코로나바이러스로 감염 시 약 2~14일의 잠복기를 거친 뒤 발열 및 기침이나 호흡곤란 등 호흡기 증상, 폐렴이 주 증상으로 나타나지만 무증상 감염 사례도 나오고 있다. 세계보건기구(WHO)는 코로나-19에 대해 최고 경보단계인 '팬데믹(pandemic)'을 선언했으며, 2023년 11월 11일 기준으로 전세계 230개국의 확진자 690,240,112명, 사망자 6,906,402명을 발생시켜 전세계 보건, 경제, 사회적으로 매우 큰 손실을 야기하였다. SARS-CoV-2 바이러스는 2003년 유행한 SARS-CoV-1 바이러스와 같이 숙주세포에 존재하는 ACE2(Angiotensin converting enzyme 2) 수용체에 결합하며, SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질은 SARS-CoV-1 바이러스의

스파이크 단백질과 76% 유사하고 RBD(Receptor Binding Domain)는 74% 단백질 서열상의 유사함을 보이나, SARS-CoV-1 바이러스-RBD에 결합하는 3종의 공지된 항체 S230 (PDB:6NB6; Traggiai et al. 2004 Nature Med, Rocks et al. 2008 J Virol, Walls et al. 2019 Cell), m396 (PDB:2G75, 2DD8; Prabakaran et al. 2006 J Biol Chem) 및 80R (PDB:2GH2; Sui et al. 2004 PNAS)은 SARS-CoV-2 RBD에 결합하지 않는다.

[0004] SARS-CoV-2 바이러스의 유전체는 RNA 바이러스의 하나로 유전체가 들어있는 단백질 껍질 (capsid)를 외막 (envelope)이 둘러싸고 있고 표면에는 막 당단백질(membrane glycoprotein) 형태인 스파이크 단백질(spike protein)들이 돌기처럼 돌출된 구조를 가지며, 기능적으로 숙주세포의 수용체와 결합하는 S1 서브유닛(subunit)과 막에 융합하는 S2 서브유닛으로 나뉘며 S1 서브유닛에는 숙주세포의 ACE2 (Angiotensin converting enzyme 2) 수용체에 결합하는 RBD(Receptor binding domain)가 존재한다. 스파이크 단백질은 숙주에 존재하는 수용체인 ACE2와 결합하여 숙주세포의 안으로 침투하는 역할을 하여 숙주를 바이러스에 감염시키는 중요한 역할을 수행하므로, 접종 중이거나 개발 중인 백신 대부분이 스파이크 단백질을 무력화하는 중화항체를 유도하도록 설계되고 있었다. 그러나, 바이러스의 스파이크 단백질에서 다양한 변이가 일어나 다양한 변이체들이 돌파 감염되고 있어, 이에 대한 대책이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이를 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 인간 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체 검출 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 목적은 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 아울러, 본 발명의 목적은 인간 코로나바이러스 감염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 신규한 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 인간 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체 검출용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체 검출 키트를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체를 검출하는 방법을 제공한다.

[0018] 아울러, 본 발명은 인간 코로나바이러스 감염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 신규한 코로나바이러스에 대한 인간 항체들은 SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 또는 이의 변이체에 특이적으로 결합하며, 이에 대해 중화능을 나타내며, 교차 반응성을 가지므로, 이를 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료 용도로 활용할 수 있으며, 상기 항체 및 이의 면역학적 활성을 가진 단편들을 이용하여 다양한 종류의 코

로나바이러스를 신속하게 검출할 수 있으므로, 인간 코로나바이러스, 특히, 높은 감염성을 가진 SARS-CoV-2와 이의 변이체의 면역 진단에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 이량체(dimeric) SARS-CoV-2 RBD 영역 항원 단백질의 동물세포용 발현 벡터와 이를 동물세포에서 발현 및 정제하여 크기 및 순도를 SDS-PAGE 젤로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 SARS-CoV-2 RBD 영역에 대한 결합력이 향상된 인간 항체 클론들을 증폭하기 위한 반복적인 스크리닝 과정을 나타낸 도이다.

도 3은 유세포 분석기를 통한 SARS-CoV-2 친화성 성숙 라이브러리의 enrichment 테스트 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 SARS-CoV-2 RBD에 향상된 결합 친화도를 보이는 scFv 인간 항체 변이체 4종 (IJ427, IJ452, IJ2416 및 IJ2483)의 아미노산 서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 유세포 분석기를 이용한 4종의 scFv 항체 변이체 (IJ427, IJ452, IJ2416 및 IJ2483)의 SARS-CoV-2 RBD에 대한 결합력을 분석한 결과이다.

도 6은 SARS-CoV-2 RBD에 결합하는 4종 항체를 동물세포에서 발현 및 정제하여 SDS-PAGE 젤로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 SARS-CoV-2 RBD에 대한 4종의 항체 (IJ427, IJ2416, IJ4G 및 IJ24G)의 결합력을 ELISA 분석으로 확인한 도이다.

도 8은 SARS-CoV-2 RBD 결합 항체들의 공통된 CDR 돌연변이만을 가지는 항체 3종 (N57Y, F107Y 및 YY)을 동물세포에서 발현 및 정제하여 SDS-PAGE 젤로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 SARS-CoV-2 RBD 결합 항체들의 공통된 CDR 돌연변이만을 가지는 항체 3종 (N57Y, F107Y 및 YY)의 결합력을 ELISA 분석으로 확인한 도이다.

도 10은 SARS-CoV-2 RBD 결합 항체 2종 (IJ4G 및 YY)의 결합 친화도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 SARS-CoV-2 B.1.617.2 변이체 RBD 영역의 이량체 및 사량체 항원 단백질의 동물세포용 발현 벡터와 이를 동물세포에서 발현 및 정제하여 크기 및 순도를 SDS-PAGE 젤로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 SARS-CoV-2 B.1.617.2 변이 RBD 영역에 특이적으로 결합하는 인간 항체 클론들을 증폭하기 위한 반복적인 스크리닝 과정을 나타낸 도이다.

도 13은 유세포 분석기를 통한 SARS-CoV-2 B.1.617.2 라이브러리의 enrichment 테스트 결과를 나타낸 도이다.

도 14는 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 높은 결합 친화도를 보이는 4종의 scFv 인간 항체 변이체 (IJ30, IJ37, IJ64 및 IJ73)의 아미노산 서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 15는 유세포 분석기를 이용한 4종의 scFv 항체 변이체 (IJ30, IJ37, IJ64 및 IJ73)의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 결합력을 분석한 결과이다.

도 16은 SARS-CoV-2 변이체 B.1.617.2 RBD 결합 5종 항체 (IJ2, IJ30, IJ37, IJ64 및 IJ73)의 동물세포용 발현 벡터와 이를 동물세포에서 발현 및 정제하여 SDS-PAGE 젤로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 5종 항체 (IJ2, IJ30, IJ37, IJ64 및 IJ73)의 결합력을 ELISA 분석으로 확인한 도이다.

도 18은 SARS-CoV-2 변이체 B.1.617.2의 RBD 영역에 대한 결합력이 향상된 인간 항체 클론들을 증폭하기 위한 반복적인 스크리닝 과정을 나타낸 도이다.

도 19는 유세포 분석기를 이용한 SARS-CoV-2 B.1.617.2 친화성 성숙 라이브러리의 enrichment 테스트 결과를 나타낸 도이다.

도 20은 유세포 분석기를 이용한 6종의 scFv 항체 변이체 (IJ203, IJ225, IJ228, IJ232, IJ235 및 IJ274)의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 결합력을 분석한 결과이다.

도 21은 IJ225의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 향상된 결합 친화도를 보이는 scFv 인간 항체 변이체 IJ225의

아미노산 서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 22는 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 결합 IJ225 항체를 동물세포에서 발현 및 정제하여 SDS-PAGE 젤로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 23은 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 IJ225 항체의 향상된 결합력을 ELISA 분석으로 확인한 도이다.

도 24는 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 IJ225 항체의 결합 친화도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 25는 SARS-CoV-2 RBD에 결합하는 항체 IJ4G 및 YY, SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 결합하는 항체 IJ225의 교차 RBD 결합력을 ELISA 분석으로 확인한 도이다.

도 26은 SARS-CoV-2 RBD에 결합하는 항체 IJ4G 및 YY, SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 결합하는 항체 IJ225의 교차 RBD 결합 친화도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 27은 3종 항체 (IJ225, IJ4G 및 YY)의 SARS-CoV-2 슈도바이러스에 대한 중화능을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 28은 3종 항체 (IJ225, IJ4G 및 YY)의 SARS-CoV-1에 대한 결합력을 ELISA 분석으로 확인한 도이다.

도 29는 본 발명의 서열목록을 나타낸 도이다.

도 30은 본 발명의 항체들의 서열을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0022] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.
- [0024] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:
- [0025] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N, 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루탐산: E, 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H, 이소류신: I, 류신: L, 리신: K, 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P, 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W, 티로신: Y 및 발린: V.
- [0027] 일 측면에서, 본 발명은 인간 코로나바이러스(coronavirus) 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 관한 것이다.
- [0028] 일 구현예에서, 인간 코로나바이러스는 SARS-CoV-1(Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus), MERS-CoV(Middle East respiratory syndrome coronavirus) 또는 SARS-CoV-2일 수 있으며, SARS-CoV-1 또는 SARS-CoV-2인 것이 더욱 바람직하다.

- [0029] 일 구현예에서, 변이체는 SARS-CoV-2의 알파(alpha) 변이체 (B.1.1.7), 베타(beta) 변이체 (B.1.351), 감마(gamma) 변이체 (P.1), 델타(delta) 변이체 (B.1.617.2), 카파(kappa) 변이체 (B.1.617.1) 또는 뮤(mu) 변이체 (B.1.1.529)일 수 있으며, 델타(delta) 변이체 (B.1.617.2)인 것이 더욱 바람직하다.
- [0030] 일 구현예에서, 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1, 서열번호 3 내지 10의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH2, 및 서열번호 11 내지 16의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH3를 포함하는 VH 도메인을 포함할 수 있다.
- [0032] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 25 내지 27의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR1, 서열번호 28 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 30 내지 35의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR3, 및 서열번호 36 또는 37의 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VH 도메인을 포함할 수 있다.
- [0033] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 17 내지 19의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL1, 서열번호 20 또는 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열번호 22 내지 24의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL3를 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [0034] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 38 내지 40의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR1, 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 42 내지 47의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR3, 및 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [0035] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 49 내지 61의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 VH 도메인을 포함할 수 있다.
- [0036] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 62 내지 72의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [0037] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ4G일 수 있다.
- [0038] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ427일 수 있다.
- [0039] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ452일 수 있다.
- [0040] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ24G일 수 있다.
- [0041] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ2416일 수 있다.
- [0042] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ2483일 수 있다.
- [0043] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ30일 수 있다.
- [0044] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ37일 수 있다.
- [0045] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하

는 VH 도메인 및 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ64일 수 있다.

[0046] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ73일 수 있다.

[0047] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ2일 수 있다.

[0048] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 IJ225일 수 있다.

[0049] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 N57Y일 수 있다.

[0050] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 F107Y일 수 있다.

[0051] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 YY일 수 있다.

[0052] 본 발명의 항체들의 서열은 하기 표 1 및 2에 표시하였다.

표 1

항체 부위	항체 명칭	서열 (아미노산)	서열번호
VH	CDRH1	I4G, U427, U452 GFTFGNYA	1
		I24G, U2416, U2483, U30, U37, U64, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	2
	CDRH2	I4G, U452, N57Y, YY	3
		I427	4
		I24G, U2416	5
		U2483	6
		U30	7
		U37, U64, U73, U2	8
		U225	9
		F107Y	10
		I4G, U427	11
		I452	12
	CDRH3	I24G, U2483, U37, U64, U73, U2, F107Y, YY	13
		I2416, U30	14
		U225	15
		N57Y	16
	FR1	I4G, U427, U452, U24G, U2483, U30, U37, U64, U73, U2, N57Y, F107Y, YY	25
		U2416	26
		U225	27
		I4G, U427, U452, U30, U37, U64, U73, U2, U225	28
	FR2	U24G, U2416, U2483, N57Y, F107Y, YY	29
		I4G, U30	30
	FR3	I24G, U2416, U2483, N57Y, F107Y, YY	31
		I427	32
		U452	33
		U37	34
		U64, U73, U2, U225	35
	FR4	I4G, U427, U452	36
		I24G, U2416, U2483, U30, U37, U64, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	37
VL	CDRL1	I4G, U427, U452	17
		I24G, U2416, U2483, U30, U37, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	18
		U64	19
	CDRL2	I4G, U427, U452, U24G, U2416, U2483, U37, U64, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	20
		U30	21
	CDRL3	I4G, U427, U24G, U2416, U30, U37, U64, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	22
		U452	23
		U2483	24
	FR1	I4G, U427, U452, U24G, U2416, U2483, U30, U37, U64, U2, N57Y, F107Y, YY	38
		U73	39
		U225	40
	FR2	I427, U452, U2416, U2483, U4G, U24G, N57Y, F107Y, YY(N57Y/F107Y), U30, U37, U64, U73, U2, U225	41
		I4G, U427, U452, U24G	42
		U2416	43
		U2483	44
		U37	45
		U30, U64, U73, U2, N57Y, F107Y, YY	46
	FR3	I427, U452, U2416, U2483, U4G, U24G, N57Y, F107Y, YY(N57Y/F107Y), U30, U37, U64, U73, U2, U225	47
		I427, U452, U2416, U2483, U4G, U24G, N57Y, F107Y, YY(N57Y/F107Y), U30, U37, U64, U73, U2, U225	48

[0053]

표 2

항체 부위	항체 명칭	서열 (아미노산)	서열번호
VH	IJ4G	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFGNYAMHWVRQAPATGLQWLAMITSDGRY KFYADSVMGRTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSLDYYPHYFMDVW WGLGTTVAVSS	49
	IJ427	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFGNYAMHWVRQAPATGLQWLAMITSGGRYK FYADSVMSRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSLDYYPHYFMDVW GLGTTVAVSS	50
	IJ452	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFGNYAMHWVRQAPATGLQWLAMITSDGRY KFYADSVMGRTIGREDSKNTLYLQDLSRGEDTAVYVCVTQRDNLSLDYYPHYFMDVW WGLGTTVAVSS	51
	IJ24G	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAVITSGGRHK FYADSVKGRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW GGQTTVAVSS	52
	IJ2416	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAVITSGGRHK FYADSVKGRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW WGQTTVAVSS	53
	IJ2483	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAVITSGGRH KFYADSVKGRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW WGQTTVAVSS	54
	IJ30	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAMITSDGRN MFYADSVMGRTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW VWGQTTVAVSS	55
	IJ37	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAMITSDGRN EFYADGVEGRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW WGQTTVAVSS	56
	IJ64, IJ73, IJ2	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAMITSDGRN EFYADSVGRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW WGQTTVAVSS	57
	IJ225	QAQLVESGGALVLPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAMITSDGRYK FYADSVGRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW GGQTTVAVSS	58
	N57Y	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAVITSDGRYK FYADSVKGRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW GGQTTVAVSS	59
	F107Y	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAVITSDGRNK FYADSVKGRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW GGQTTVAVSS	60
	YY	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWVRQAPATGLQWLAVITSDGRYK FYADSVKGRFTISREDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYVCVTQRDNLSRDYYPHYFMDVW GGQTTVAVSS	61
VL	IJ4G, IJ427	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDP GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	62
	IJ452	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDP GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	63
	IJ24G	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDP PGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	64
	IJ2416	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDP TGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	65
	IJ2483	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDP PGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	66
	IJ30	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	67
	IJ37	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDP SGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	68
	IJ64	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDP SGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	69
	IJ73	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDP SGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	70
	IJ2, N57Y, F107Y, YY	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDP SGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	71
	IJ225	DVVLTSQPSLPLVTLGQPASISCRSSQSLVSDGDTYLNWFQRPQSGSPRRLIYQVSNRDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYCMQGSHPPTFGQGTKEIK	72
	CL	TVAAPSVFIFPPQDEQKLQSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSYISLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	73
	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCYKDDYFPPEVTWVSNVSGALTSGVHFPFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNHNKPSNTKVDKKV	74
	CH2	EPKSKDKTHCTCPPEAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAK	75
	CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDL DGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTKQKSLSPGK	76

[0054]

[0055]

일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 인간 기원의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 영역, 또는 이의 임의의 부분을 함께 포함할 수 있다.

[0056]

일 구현예에서, 본 발명의 항체는 단일클론항체일 수 있다.

[0057]

일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 인간 코로나바이러스의 RBD(Receptor Binding Domain)에 특이적으로 결합할 수 있으며, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 또는 이의 변이체의 RBD(Receptor Binding Domain)에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0058]

일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 또는 이의 변이체의 항원, 바이러스 입자 또는 바이러스에 감염된 세포에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0059]

일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 인간 코로나바이러스에 교차-반응성일 수 있으며, SARS-CoV-1의 RBD 및 SARS-CoV-2의 RBD와 교차-반응성이거나 SARS-CoV-1의 RBD, SARS-CoV-2의 RBD 및 이의 변이체의 RBD와 교차-반응성일 수 있다.

[0060]

일 구현예에서, 본 발명의 항체는 중화 항체일 수 있으며, SARS-CoV-2 또는 이의 변이체를 중화시킬 수 있다.

- [0061] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 SARS-CoV-1 야생형, SARS-CoV-2 야생형, SARS-CoV-2 알파 변이체, SARS-CoV-2 베타 변이체, SARS-CoV-2 감마 변이체, SARS-CoV-2 델타 변이체, SARS-CoV-2 카파 변이체 및 SARS-CoV-2 뮤 변이체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 RBD(Receptor Binding Domain)에 특이적으로 결합할 수 있으며, SARS-CoV-1 야생형의 RBD는 서열번호 79의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, SARS-CoV-2 야생형의 RBD는 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, SARS-CoV-2 델타 변이체의 RBD는 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0062] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄의 불변 영역(C_L), 중쇄의 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 1(C_H1), 서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 2(C_H2) 및 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 도메인 3(C_H3)를 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 항체는 전체(whole) 항체 형태일 뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(heavy chain)를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 항체 단편의 예는 (i) 경쇄의 가변 영역(VL) 및 중쇄의 가변 영역(VH)과 경쇄의 불변 영역(CL) 및 중쇄의 중쇄 불변 영역 도메인 1(C_H1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 C_H1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward ES et al., Nature 341:544-546 (1989)); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv 분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody) W094/13804) 등을 포함한다.
- [0064] 본 발명에서 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 동물 유래 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 및 이들의 면역학적 활성을 가진 단편으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 항체는 재조합적 또는 합성적으로 생산된 것일 수 있다.
- [0065] 원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여 시 면역거부반응이 일어날 수 있으며, 이러한 면역거부반응을 억제하고자 키메라 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메라 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환한 것이다. 키메라 항체는 동물 유래 항체에 비하여 항-아이소타입 반응에 있어서 상당 부분 개선되었으나, 여전히 동물 유래 아미노산들이 가변 영역에 존재하고 있어 잠재적인 항-이디오타입(anti-idiotypic) 반응에 대한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 부작용을 개선하고자 개발된 것이 인간화 항체(humanized antibody)이다. 이는 키메라 항체의 가변 영역 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementarity determining regions) 부위를 인간 항체 골격(framework)에 이식하여 제작된다.
- [0066] 인간화 항체를 제작하기 위한 CDR 이식(grafting) 기술에 있어서 가장 중요한 것은 동물 유래 항체의 CDR 부위를 가장 잘 받아들일 수 있는 최적화된 인간 항체를 선정하는 것이며, 이를 위하여 항체 데이터베이스의 활용, 결정구조(crystal structure)의 분석, 분자모델링 기술 등이 활용된다. 그러나, 최적화된 인간 항체 골격에 동물 유래 항체의 CDR 부위를 이식할지라도 동물 유래 항체의 골격에 위치하면서 항원 결합에 영향을 미치는 아미노산이 존재하는 경우가 있기 때문에, 항원 결합력이 보존되지 못하는 경우가 상당수 존재하므로, 항원 결합력을 복원하기 위한 추가적인 항체 공학 기술의 적용은 필수적이라고 할 수 있다.
- [0067] 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 생체에서 분리된 (생체에 존재하지 않는) 것 또는 비자연적으로 생산(non-naturally occurring)된 것일 수 있으며, 예컨대, 합성적 또는 재조합적으로 생산된 것일 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서, 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 자연적 또는 비자연적(예컨대, 합성적 또는 재조합적)으로 얻어질 수 있다. 항체는 생체 외뿐 아니라 생체 내에서도 매우 안정하고 반감기가 길기 때문에 대량 발현 및 생산에 유리하다. 또한, 항체는 본질적으로 다이머(dimer) 구조를 가지므로 접착능(avidity)이 매우 높다. 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 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 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[0069] 본 발명에서 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 와 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.

[0070] 본 발명에서 용어, "가변 영역(variable region) 또는 가변 부위 (variable domain)"는 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 변이를 보이는 항체 분자의 부분을 의미하고, 가변 영역에는 상보성 결정 영역인 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. 상기 CDR 사이에는 프레임 워크 영역(framework region, FR) 부분이 존재하여 CDR 고리를 지지해주는 역할을 한다. 상기 "상보성 결정 영역"은 항원의 인식에 관여하는 고리 모양의 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이 결정된다.

[0071] 본 발명에서 사용되는 용어 "scFv(single chain fragment variable)"는 유전자 재조합을 통해 항체의 가변영역만을 발현시켜 만든 단쇄항체를 말하며, 항체의 V_H 영역과 V_L 영역을 짧은 펩티드 사슬로 연결한 단일쇄 형태의 항체를 말한다. 상기 용어 "scFv"는 달리 명시되지 않거나, 문맥상 달리 이해되는 것이 아니라면, 항원 결합 단편을 비롯한 scFv 단편을 포함하고자 한다. 이는 통상의 기술자에게 자명한 것이다.

[0072] 본 발명에서 용어, "상보성결정영역(complementarity determining region, CDR)"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역 (hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다 (CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 항원결정부위에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다.

[0073] 본 발명에서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.

[0074] 본 발명에서 용어, "항원결합단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 일부를 의미한다. 예를 들어, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂ 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 항원결합단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 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 가변 영역 및 경쇄 가변 부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변 부위와 경쇄 가변 부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있으며, 당업계에 적절한 서열이 알려져 있다. 상기 항원결합단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0075] 본 발명에서 용어 "힌지 영역(hinge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, C_{H1} 및 C_{H2} 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)를 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다. 예컨대, 상기 힌지는 인간 항체로부터 유래한 것일 수 있으며, 구체적으로, IgA, IgE, 또는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG 3, 또는 IgG4로부터 유래한 것일 수 있다.

[0076] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 이를 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.

[0077] 본 발명의 핵산 분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. 단리된 핵산은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합

성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 작동가능하게 연결된 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[0078] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 항체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 핵산 분자는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 핵산 분자의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA)분자일 수 있다.

[0079] 본 발명에 따른 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 단백질 발현을 위해 발현벡터에 삽입될 수 있다. 발현벡터는, 통상 조절 또는 제어(regulatory) 서열, 선별마커, 임의의 융합 파트너, 및/또는 추가적 요소와 작동가능하게 연결된, 즉, 기능적 관계에 놓인 단백질을 포함한다. 적절한 상태에서, 핵산으로 형질전환된 숙주세포, 바람직하게는, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자 포함 발현벡터를 배양하여 단백질 발현을 유도하는 방법에 의해 본 발명에 따른 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편이 생산될 수 있다. 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모를 포함하는 다양한 적절한 숙주세포가 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 외인성 핵산을 숙주세포에 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주세포에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는, 생산비가 저렴하여 산업적 이용가치가 높은 대장균을 숙주세포로 생산할 수 있다.

[0080] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에شري키아속(*Escherichia* sp.)균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus* sp.)균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 벡터는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0081] 본 발명에서 용어, "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생(exogenous) 또는 이종(heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코즈미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

[0082] 일 구현예에서, 상기 벡터의 제작 시, 상기 항체를 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(enhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.

[0083] 본 발명에서, 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터

에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

- [0084] 본 발명에서, 용어 "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.
- [0085] 일 구현예에서, 상기 숙주 세포는 박테리아 또는 동물세포일 수 있으며, 동물 세포주는 CHO 세포, HEK 세포 또는 NSO 세포일 수 있고, 박테리아는 대장균일 수 있다.
- [0086] 일 측면에서, 본 발명은 상기의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 숙주 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 회수하는 단계를 포함하는 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0087] 일 구현예에서, 숙주 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 회수하는 단계 이후에 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0088] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 당해 기술분야에서 공지된 다양한 방법으로 분리 또는 정제될 수 있다. 표준 정제방법은 크로마토그래피 기술, 전기영동, 면역, 침강, 투석, 여과, 농축, 및 크로마토포커싱(chromatofocusing) 기술을 포함한다. 당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 예를 들어 박테리아 단백질 A, G, 및 L과 같은 다양한 천연 단백질이 항체와 결합하며, 상기 단백질은 정제에 이용될 수 있다. 종종, 특정 융합 파트너에 의한 정제가 가능할 수 있다.
- [0089] 본 발명에 따른 상기 벡터를 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 대장균 또는 효모 세포 등에 형질전환시킨 후, 형질전환된 숙주 세포를 배양함으로써 본 발명에 따른 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 대량 생산할 수 있다. 숙주 세포의 종류에 따른 적절한 배양 방법 및 배지 조건 등은 당해 분야의 통상의 기술자에게 알려진 공지 기술로부터 당업자가 용이하게 선택할 수 있다. 상기 숙주 세포는 대장균(*E. coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 원핵 생물일 수 있다. 또한, 사카로마이세스 세르비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모, 곤충 세포, 식물 세포, 동물 세포로부터 유래한 진핵 세포일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 동물 세포는 자가 또는 동종 이계 동물 세포일 수 있다. 자가 또는 동종 이계 동물 세포에 도입하여 제조된 형질전환체는 개체에 투여되어 암을 치료하는 세포치료 등에 이용될 수도 있다. 상기 숙주 세포로의 벡터 도입방법은 당업자에게 공지된 어느 방법을 사용해도 무방하다. 트랜스제닉(예를 들면, 유전공학처리된) 마우스, 또는 다른 포유동물을 비롯한 다른 유기체들이 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 생산하는데 사용될 수 있다(예를 들어 US 6,300,129 참조). 예를 들어, 마우스 면역 유전자의 가변 영역(중쇄 V, D, 및 J 세그먼트, 및 경쇄 V 및 J 세그먼트)만을 상응하는 인간 가변 서열로 대체시켜 공학처리된 마우스가 인간 가변 서열을 갖는 고친화성 항체를 대량 생산하는데 사용될 수 있다는 것이 알려져 있다(예를 들면, US 6,586,251; US 6,596,541, 및 US 7,105,348 참조).
- [0090] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는 인간 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0091] 일 구현예에서, 인간 코로나바이러스 감염증은 MERS(Middle East respiratory syndrome), SARS(Severe acute respiratory syndrome) 또는 COVID-19(Coronavirus disease 2019)일 수 있다.
- [0092] 일 구현예에서, COVID-19은 SARS-CoV-2 야생형, SARS-CoV-2 알파 변이체, SARS-CoV-2 베타 변이체, SARS-CoV-2 감마 변이체, SARS-CoV-2 델타 변이체, SARS-CoV-2 카파 변이체 또는 SARS-CoV-2 뮤 변이체의 감염에 의한 것일 수 있다.
- [0093] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 인간 코로나바이러스 감염증의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0094] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 인간 코로나바이러스 감염증 및 이로 인한 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

- [0095] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 인간 코로나바이러스 감염증을 예방 또는 치료하는데 유효한 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack PublishingCo.에 기술되어 있다.
- [0096] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 인간 코로나바이러스 감염증의 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0097] 본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack PublishingCompany, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0098] 일 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 또는 주사 제형이 더욱 바람직하다.
- [0099] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토크페놀, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 (예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.
- [0100] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 인간 코로나바이러스 감염증이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 박쥐, 낙타, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, "검체"란 이로부터 분리한 비말, 가래, 전혈, 혈장, 혈청, 뇨 또는 타액일 수 있다.
- [0101] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수

소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0102] 일 측면에서, 본 발명은 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함하는, 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0103] 검출(진단) 조성물에 사용되는 본 발명의 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편들은 검출 가능하게 표시되는 것이 바람직하다. 생분자들을 표시하는데 사용 가능한 다양한 방법들이 당업자에게 잘 알려져 있고, 본 발명의 범주 내에서 고려된다. 상기 방법들은 Tijssen, 'Practice and theory of enzyme immuno assays', Burden, Rhand von Knippenburg (Eds), Volume 15 (1985), 'Basic methods in molecular biology'; Davis LG, Dimer MD; Battey Elsevier (1990), Mayer et al., (Eds) 'Immunochemical methods in cell and molecular biology' Academic Press, London (1987), or in the series 'Methods in Enzymology', Academic Press, Inc 에 기술되어 있다.
- [0104] 통상의 기술자에게 공지되어 있는 표시 방법과 많은 다른 표시들이 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 표시 종류의 예로는 효소, 방사성 동위원소, 콜로이드 금속, 형광 화합물, 화학발광 화합물 및 생발광 화합물이 있다.
- [0105] 통상적으로 사용되는 표시들은 형광물질 (가령, 플루레신, 로다민, 텍사스 레드 등), 효소 (가령, 고추냉이 퍼 옥시다아제, β -갈락토시다아제, 알칼리 포스파타아제), 방사성 동위원소 (가령, ^{32}P 또는 ^{125}I), 바이오틴, 디곡 시게닌, 콜로이드 금속, 화학발광 또는 생발광 화합물 (가령, 디옥세탄, 루미놀 또는 아크리디늄)을 포함한다. 효소 또는 바이오티닐기의 공유 결합법, 요오드화법, 인산화법, 바이오틴화법 등과 같은 표시 방법들이 당 분야에 잘 알려져 있다.
- [0106] 검출 방법들로는 오토라디오그래피, 형광 현미경, 직접 및 간접 효소반응 등이 있으며, 이에 제한되지는 않는다. 통상적으로 사용되는 검출 분석법으로는 방사성 동위원소 또는 비-방사성 동위원소 방법이 있다. 이들은 그중에서도 웨스턴블롯팅, 오버레이-분석법, RIA(Radioimmuno Assay) 및 IRMA(Immune Radioimmunometric Assay), EIA(Enzyme Immuno Assay), ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), FIA(Fluorescent Immuno Assay) 및 CLIA(Chemiluminescent Immune Assay)이 있다.
- [0107] 일 측면에서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체 검출 키트에 관한 것이다.
- [0108] 일 구현예에서, 상기 키트는 본 발명에 따른 조성물 및 상기 항원-항체 복합체 검출용 시약을 포함할 수 있다. 상기 항원-항체 복합체 검출용 시약은 방사상면역분석, ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) 또는 면역 형광분석용 시약을 포함한다.
- [0109] 일 구현예에서는 항원-항체 복합체 검출은 항원 항체 결합을 통해 항체 및/또는 항원을 간단하게 검출할 수 있는 Ouchterlony 플레이트, 웨스턴블롯, Crossed IE, Rocket IE, Fused Rocket IE, Affinity IE와 같은 면역 전기영동 (Immuno Electrophoresis)로 달성될 수 있다. 이러한 방법에 사용되는 시약 또는 물질은 공지된 것으로서, 예를 들면 항원-항체반응, 항원에 특이적으로 결합하는 기질, 핵산 또는 펩타이드 앵타머, 복합체와 상호작용하는 수용체 또는 리간드 또는 보조인자와의 반응을 통해 검출될 수 있거나, 또는 질량분석기를 이용할 수 있다. 상기 본원의 항원-항체 복합체와 특이적으로 상호작용 또는 결합하는 시약 또는 물질은 칩 방식 또는 나노 입자(nanoparticle)와 함께 사용될 수 있다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984 등에 기재되어 있다. 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석하여 즉, 정상 시료와의 시그널 대조를 수행함으로써, 대상에서 코로나바이러스를 검출함으로써 코로나바이러스 감염 여부를 진단할 수 있다.
- [0110] 일 측면에서, 본 발명은 검체로부터 분리된 시료를 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편과 접촉시키는 단계; 및 항원-항체 복합체 형성을 검출하는 단계를 포함하는, 인간 코로나바이러스 또는 이의 변이체를 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0111] 일 구현예에서, 인간 코로나바이러스는 SARS-CoV-1(Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus), MERS-

CoV(Middle East respiratory syndrome coronavirus) 또는 SARS-CoV-2일 수 있으며, SARS-CoV-1 또는 SARS-CoV-2인 것이 더욱 바람직하다.

[0112] 일 구현예에서, 변이체는 SARS-CoV-2의 알파(alpha) 변이체 (B.1.1.7), 베타(beta) 변이체 (B.1.351), 감마(gamma) 변이체 (P.1), 델타(delta) 변이체 (B.1.617.2), 카파(kappa) 변이체 (B.1.617.1) 또는 뮤(mu) 변이체 (B.1.1.529)일 수 있으며, 델타(delta) 변이체 (B.1.617.2)인 것이 더욱 바람직하다.

[0113] 일 측면에서, 본 발명은 검체로부터 분리된 시료를 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편과 접촉시켜 항원-항체 복합체를 형성시키는 단계; 및 상기 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하는, 인간 코로나 바이러스 감염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0114] 일 구현예에서, 인간 코로나바이러스는 SARS-CoV-1(Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus), MERS-CoV(Middle East respiratory syndrome coronavirus) 또는 SARS-CoV-2일 수 있으며, SARS-CoV-1 또는 SARS-CoV-2인 것이 더욱 바람직하다.

[0115] 일 구현예에서, 변이체는 SARS-CoV-2의 알파(alpha) 변이체 (B.1.1.7), 베타(beta) 변이체 (B.1.351), 감마(gamma) 변이체 (P.1), 델타(delta) 변이체 (B.1.617.2), 카파(kappa) 변이체 (B.1.617.1) 또는 뮤(mu) 변이체 (B.1.1.529)일 수 있으며, 델타(delta) 변이체 (B.1.617.2)인 것이 더욱 바람직하다.

[0117] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0119] 실시예 1. SARS-CoV-2 RBD에 대한 항체 제작

[0120] 1-1. SARS-CoV-2 바이러스의 RBD(Receptor Binding Domain) 이량체 항원 제작

[0121] 바이러스가 숙주세포를 감염시키기 위해 숙주세포에 존재하는 ACE2(Angiotensin converting enzyme 2) 수용체 표면에 결합한다고 알려진 RBD(Receptor Binding Domain) 영역에 결합하는 항체를 만들기 위하여 SARS-CoV-2 바이러스의 RBD 영역을 항원으로 준비하였다. 또한, 유세포 분리기를 이용하여 항체를 스크리닝하기에 보다 적합한 항원을 제작하고자 상기 항원에 GST 태그를 융합한 이합체(dimeric) 형태의 항원을 제조하기 위해 동물 세포 발현용 벡터들을 제작하였다. (Gibco, 12338-018) 30 ml에 동물 세포 발현용 벡터를 혼합한 후 PEI(Polyethylenimine) (Polyscience, 23966) 및 각 벡터를 4:1 비율로 섞어, 상온에서 20 분간 두었다가 전달 2×10^6 cells/ml의 밀도로 300 ml 계대배양한 Expi293F 동물세포에 처리하여 트랜스펙션한 뒤, shaking CO₂ incubator에서 37°C, 125rpm 및 8% CO₂ 조건으로 7일간 인큐베이션한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 평형(equilibrium)을 맞추고 이를 바틀탑 필터(Bottle top filter)를 이용해 0.2μm 필터(Merck Millipore)로 여과하고, 여과된 배양액에 GSH 레진 1 ml를 첨가하여 4°C에서 16 시간 동안 교반하였다. 이 후, 컬럼을 통해 레진을 회수하고 5ml PBS로 세척하였으며, 2.5 ml의 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 및 10mM reduced glutathione (SIGMA)으로 용출하였다. Centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 PBS로 buffer exchange를 진행한 후, SDS-PAGE를 통해 비환원 조건 (NR)과 환원 조건 (R)에서 각각 정제된 SARS-CoV-2 RBD-GST 항원 단백질의 크기와 순도를 분석하였다 (도 1). 또한, 유세포 분리를 이용한 스크리닝에 사용하기 위해 GST가 융합된 이량체 항원 단백질 SARS-CoV-2 RBD-GST에 Alexa488 형광분자를 표지하였다.

[0123] 1-2. Anti-SARS-CoV-2 scFv 항체 거대 error prone 라이브러리 제작

[0124] 친화성 성숙(affinity maturation)을 통해 이전에 본 발명자들이 Anti-SARS-CoV-1 항체인 S230를 사용하여 SARS-CoV-2에 결합하도록 진화시킨 항체들 S.IJ4, S.IJ24 및 S.IJ39 (한국특허 공개번호 10-2022-0163625)의 SARS-CoV-2 RBD에 대한 결합력을 더욱 향상시키고자, 각각의 scFv 항체에 TaqPolymerase (TaKaRa), dNTPs (Invitrogen), MgCl₂ 및 MnCl₂ (SIGMA)를 사용하여 0.3% 돌연변이가 생기도록 Error Prone PCR 기법을 사용하여 유전체를 증폭하였다. 증폭된 유전체에 *Sfi* I (New England BioLab) 제한효소를 처리하고, *Sfi* I 제한효소 처리된 pMopac12-NlpA-FLAG 벡터에 T4 DNA Ligase (enzymatics)를 사용하여 삽입시킨 후 Jude I 세포에 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균들을 고체배지에 스프레딩한 후 37°C에서 16시간 배양하고, 2% 글루코스가 포함된 TB

배지로 회수하여 각 2×10^8 크기의 초기 라이브러리를 확보하였다.

[0126] 1-3. 인간 항체 변이체 스크리닝

[0127] 실시예 1-2에서 제작한 S.IJ4, S.IJ24 및 S.IJ39 라이브러리 세포 각 1 ml을 2% 글루코스 및 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 클로람페니콜이 포함된 25 ml TB 배지에서 37°C 및 250 rpm으로 4시간 배양하고, 배양된 세포를 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 클로람페니콜이 포함된 100 ml의 TB 배지에 1:100 비율로 분주하여 $\text{OD}_{600} = 0.5$ 까지 배양한 후 20분간 25°C 및 250 rpm에서 cooling을 진행하고, 1 mM IPTG를 첨가하여 25°C 및 250 rpm로 5시간 동안 Induction하여 단백질이 과발현된 대장균을 $\text{OD}_{600} = 8$ 을 기준으로 수득하였다. 이 후, 세포들을 유세포 분리기를 이용한 스크리닝에 적합한 스페로플라스트(spheroplasts) 형태로 만들기 위해 1 ml의 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 사용하여 재부유하여 2번의 세척으로 잔여 배지를 제거한 뒤, 1 ml의 STE [0.5 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8.0)] 용액에서 37°C, 30분간 로테이션을 통해 삼투압 충격을 주는 방법으로 세포 외막을 제거하였다. 1 ml의 Solution A 및 50 mg/ml lysozyme solution 20 μl 를 혼합한 용액에서 37°C로 15분간 로테이션하여 펩티도글리칸(peptidoglycan) 층을 제거하였다. 이 후, 1 ml의 PBS로 세척하고 이 중 300 μl 를 700 μl 의 PBS 및 200 nM (monomer 기준)의 항원단백질 (상기 실시예 1-1에서 제작한 SARS-CoV-2 RBD-GST-Alexa488)을 넣고 상온에서 1시간 동안 로테이션하여 스페로플라스트에 형광 프로브를 표지하였다. 항원 결합력 증가로 높은 형광을 보이는 클론들을 유세포 분리기(flow cytometry)를 이용하여 회수하였으며, 회수된 클론들에서 scFv 유전자들을 PCR 방법으로 증폭하고, 배양, 발현유도, 세포외막과 펩티도글리칸층을 없애는 스페로플라스팅(spheroplasting) 과정, 항원 표지 및 유세포 분리기의 선택적인 게이팅(gating)을 통해 SARS-CoV-2의 RBD 영역에 이전보다 향상된 친화도를 보이는 스페로플라스트들을 선별하는 과정을 반복하였다. 유세포 분석기를 이용한 선별 과정과 순도(purity)를 높이기 위한 재선별 과정 후에, 농축과정, PCR 증폭을 통한 선별된 scFv 변이체 유전자 확보 과정, 서브 클로닝 과정 및 트랜스포메이션(transformation) 과정을 거치고, 원하는 클론들을 증폭(enrich)하기 위해 다음 라운드의 선별 과정을 수행하였다. 이와 같이 반복되는 여러 라운드의 탐색 과정으로 SARS-CoV-2 RBD 영역에 이전보다 향상된 친화도를 가지는 scFv 변이체 클론들을 확보하였다 (도 2).

[0129] 1-4. scFv 변이체들의 증폭 확인

[0130] 실시예 1-3의 방식으로 제작된 각 라운드 라이브러리와 대조군으로 scFv 형태의 S230, 및 모항체인 S.IJ4, S.IJ24 및 S.IJ39를 스페로플라스트로 제조하고, 스크리닝에 이용된 SARS-CoV-2 RBD-GST-Alexa488 항원을 100 nM (monomer 기준)의 농도로 결합시켜 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 항원과의 비-특이적인 결합을 제거하기 위해 PBS로 두 차례 세척한 후 유세포 분석을 진행하였을 때, 라운드가 진행될수록 SARS-CoV-2 RBD 영역에 대한 결합력이 향상된 변이체들이 라이브러리에서 증폭되는 것을 확인하였다 (도 3).

[0132] 1-5. scFv 항체 변이체들의 유전자 서열 분석

[0133] 실시예 1-3에서 확보한 scFv 변이체 클론들의 유전자 서열을 확인하기 위하여 Sanger sequencing을 이용하여 DNA 염기 서열을 분석하였으며, 분석을 통해 항체 서열을 가지는 scFv 항체 변이체 4종 IJ427, IJ452, IJ2416 및 IJ2483을 선별하였다 (도 4).

[0135] 1-6. SARS-CoV-2 RBD 영역에 대한 결합력 분석

[0136] 실시예 1-5에서 선별한 4종의 scFv 항체 변이체들의 SARS-CoV-2 RBD 영역에 대한 결합력을 확인하기 위해, 유세포 분석기를 이용한 결합력 분석을 진행하였다. 이를 위하여 각각의 변이체와 대조군으로 사용될 scFv 형태의 S230, 모항체인 S.IJ4 및 S.IJ24를 스페로플라스트들로 제조하고, SARS-CoV-2 RBD-GST-Alexa488 항원을 34 nM (monomer 기준)의 농도로 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 항원과의 비-특이적인 결합을 제거하기 위해 PBS로 두 차례 세척한 후 유세포 분석기를 이용하여 SARS-CoV-2 RBD 영역에 대한 결합력을 분석하였다. 분석 결과, 4종의 scFv 변이체들에서 대조군인 S230, 모항체 S.IJ4 및 S.IJ24에 비해 현저하게 증가된 형광 신호를 나타내, 이를 통해 SARS-CoV-2 RBD 영역에 향상된 결합력을 가지는 scFv 항체 변이체들을 선별하였음을 확인하였다 (도 5).

[0138] 1-7. IgG 형태 항체 생산 및 정제

[0139] 선별된 4종의 scFv 항체 변이체가 IgG 형태에서도 SARS-CoV-2 RBD와의 향상된 결합력을 가지는지 확인하기 위해, 4종의 scFv (IJ427, IJ452, IJ2416 및 IJ2483)의 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 각각 제작하였다. 또한, IJ427, IJ452, IJ2416 및 IJ2483를 서열에 따라 두 가지 그룹으로 나누고, 각 그룹의 공통된 돌연변이만을 포함한 IJ4G 및 IJ24G 변이체를 도출하여, 이의 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 각각 제작하였다. IJ427, IJ452, IJ2416, IJ2483, IJ4G 및 IJ24G 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄 유전자를 각각 1:1의 비율로 섞고, PEI와 변이체 유전자를 4:1의 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 전날 2×10^6 cells/ml의 밀도로 계대배양해 놓은 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션하였다. 그 후, CO₂ 인큐베이터에서 37 °C, 125 rpm 및 8 % CO₂ 조건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 25xPBS를 이용해 평형을 맞추고, 0.2 µm syringe filter (Merck Millipore)를 이용해 여과하였다. 여과된 배양액에 Protein A 레진 150 µl을 넣고 상온에서 1 시간 교반한 후 원심분리기를 이용해 단백질이 결합된 레진을 회수하였다. 회수한 레진을 1 ml PBS로 세척하고 600 µl 100 mM glycine (pH 2.7)으로 용출한 후, 1M Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 중화시키고 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 PBS로 buffer exchange를 진행하였다. SDS-PAGE를 통해 비환원 조건 (Non-reducing)과 환원 조건(Reducing)에서 정제된 4종의 단백질의 크기와 순도를 분석하였다 (도 6) (IJ452 및 IJ2483 변이체는 발현이 되지 않음).

[0141] 1-8. IgG 형태 변이체들의 SARS-CoV-2 RBD에 대한 결합력 분석

[0142] 단백질 상에서 SARS-CoV-2 RBD에 대한 항체의 결합력을 확인하기 위해, 실시예 1-7에서 발현 및 정제한 4종의 항체 (IJ427, IJ2416, IJ4G 및 IJ24G)와 S230, 모항체인 S.IJ4 및 S.IJ24에 대해 ELISA 실험을 진행하였다. His 태그를 융합(fusion)한 단량체(monomeric) 형태의 RBD를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석하여 50 µl씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 well microplate (costar)에 4 °C로 16 시간 동안 고정화한 후 100 µl의 4% 스킴 밀크(skim milk) (GenomicBase) (in 0.05% PBST, pH 7.4)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 150 µl로 4 회씩 세척한 뒤 1 µM 농도부터 연속 희석한 7종의 항체 (IJ427, IJ2416, IJ4G, IJ24G, S230, S.IJ4 및 S.IJ24)를 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후 Anti-Protein A-HRP (Genscript) 50 µl로 상온에서 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 µl 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석한 결과, 새로 발굴한 4종의 항체가 기존 S.IJ4 항체 및 S.IJ24 항체보다 SARS-CoV-2 RBD에 최대 179배 향상된 결합력을 가지는 것을 확인하였다 (도 7).

[0144] 실시예 2. SARS-CoV-2 RBD에 대한 항체 변이체 제작

[0145] 2-1. CDR 부분에 공통된 돌연변이를 가지는 변이체 항체 제작 및 생산

[0146] 서열 분석에서 상기 실시예 1에서 선별한 SARS-CoV-2 RBD 영역에 대한 결합력이 향상된 IJ4G, IJ427, IJ452, IJ24G, IJ2416, IJ2483의 6종의 항체들이 CDR2의 57N 및 CDR3의 107F 위치에 모두 돌연변이가 발생한 것으로 나타나 (도 4), 상기 두 위치의 돌연변이가 SARS-CoV-2 RBD 영역에 대한 결합력 향상을 유도하는 것으로 예상되어 이를 확인하고자 S230에 N57Y, N57H, F107Y, YY(N57Y/F107Y) 또는 HY(N57H/F107Y) 돌연변이를 가지는 항체 5종의 중쇄 및 경쇄 동물세포 발현 벡터를 QuikChange™ site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 각각 제작하였다. 실시예 1-7에 기술한 방법으로 Expi293F 세포에 제작한 동물세포 발현용 벡터를 PEI(Polyethylenimine)를 사용하여 트랜스펙션하고 7일 동안 배양한 후, Protein A 레진 150 µl을 사용하여 정제하였다. 발현이 되지 않은 N57H 및 HY(N57H/F107Y) 변이체를 제외하고 SDS-PAGE를 통해 비환원 조건(Non-reducing)과 환원 조건(Reducing)에서 정제된 3종의 단백질의 크기와 순도를 분석하였다 (도 8).

[0148] 2-2. SARS-CoV-2 RBD 영역에 대한 결합력 분석

[0149] 단백질 상에서 SARS-CoV-2 RBD에 대한 항체의 결합력을 측정하기 위해, 실시예 2-1에서 발현 및 정제한 3종의 항체 (N57Y, F107Y 및 YY)와 S230, S.IJ4, S.IJ24, IJ4G, IJ427, IJ24G 및 IJ2416에 대하여 ELISA 실험을 진행하였다. His 태그를 융합(fusion)한 단량체(monomeric) 형태의 RBD를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석하여 50 µl씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 well microplate (costar)에 4 °C로 16 시간 동안 고정화한 후 100 µl의 4% 스킴 밀크(skim milk) (GenomicBase) (in 0.05% PBST, pH 7.4)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹 하였다. 0.05% PBST 150 µl로 4 회씩 세척한 뒤 1 µM 농도부터 연속 희석한 10종의 항체 (N57Y, F107Y, YY, S230, S.IJ4, S.IJ24, IJ4G, IJ427, IJ24G 및 IJ2416)를 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후 Anti-Protein A-HRP (GensScript) 50 µl로 상온에서 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 µl 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석한 결과, SARS-CoV-2 RBD 영역에 대해 N57Y 및 F107Y는 친화성 성숙(affinity maturation) 전인 S.IJ4 및 S.IJ24 항체와 비슷한 정도의 결합력을 보였으나, 두 돌연변이가 모두 도입된 YY 변이체의 경우 친화성 성숙 전 항체인 S.IJ4 및 S.IJ24 보다 현저하게 향상된 결합력을 나타냈다 (도 9). 또한 HY 돌연변이가 도입된 IJ24G 및 IJ2416 변이체보다 YY가 도입된 IJ4G, IJ427 및 YY가 더 높은 결합력을 나타내 RBD 영역과의 결합에 N57Y 및 F107Y의 돌연변이가 중요하다는 것을 확인하였다(도 9).

[0151] 2-3. SARS-CoV-2 RBD에 대한 결합 친화도 분석

[0152] 상기 실시예에서 선별한 IJ4G 및 YY의 SARS-CoV-2 RBD에 대한 결합 친화도를 측정하기 위해, Octet BLI system R8 (Sartorius)를 사용하였다. 구체적으로, NTA biosensor에 1× Kinetic Buffer를 사용하여 평형(equilibrium)을 맞추고 1× Kinetic Buffer에 희석한 50 nM 농도의 SARS-CoV-2 RBD-His 항원 250 µl을 180초 동안 고정화하였다. 그 후, 연속 희석한 250 µl의 항체를 600초 동안 흘려 SARS-CoV-2 RBD와 결합시키고 1× Kinetic Buffer를 이용하여 600초 동안 결합을 해리시켰다. Octet BLI Analysis 12.2 software로 표준 방정식을 이용하여 fitting을 진행하였고, R² 값이 0.99보다 크도록 k_{on}, k_{off} 및 K_D 값을 계산하였다. 분석 결과, SARS-CoV-2 RBD에 대하여 IJ4G는 0.447 nM, YY는 1.77 nM의 결합 친화도를 가지고 매우 강하게 결합하는 것을 확인하였다 (도 10).

[0154] 실시예 3. SARS-CoV-2 델타 변이체 바이러스의 RBD에 대한 항체 제작

[0155] 3-1. B.1.617.2 바이러스의 RBD 항원 제작

[0156] SARS-CoV-2 바이러스 델타 변이체 (B.1.617.2) 바이러스의 RBD 영역에 GST 태그를 융합한 이량체(dimeric) 형태 및 스트렙타비딘(Streptavidin) 태그를 융합한 사합체 형태의 항원을 제조하기 위해 동물 세포 발현용 벡터를 제작하였다. 제작한 동물세포 발현용 벡터를 실시예 1-1에 기술한 방법으로 Expi293F 동물세포에 트랜스펙션한 뒤 7일동안 배양하였다. 여과된 배양액에 각각 GSH 레진 및 Ni-NTA 레진 1 ml을 각각 첨가하여 4 °C에서 16 시간 교반한 후 컬럼을 통해 흘려주어 레진을 회수하고 5 ml PBS, 5 ml의 10 mM 및 20 mM 이미다졸로 세척하였으며, 세척 후 2.5 ml의 pH8.0의 50mM Tris-HCl+10mM reduced glutation (SIGMA) 및 250 mM 이미다졸로 각각 용출하였다. Centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 PBS로 buffer exchange를 진행한 후, SDS-PAGE를 통해 비환원 조건(NR)과 환원 조건(R)에서 정제된 각 항원 단백질의 크기와 순도를 분석하였다 (도 11).

[0158] 3-2. 인간 항체 변이체 스크리닝

[0159] 실시예 3-1에서 제작한 스트렙타비딘이 융합된 사합체 항원 단백질 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD-Streptavidin에 Alexa488 형광분자를 표지하고, 본 발명자들이 이전에 제작한 SARS-CoV-1 S230, m396 및 80R 라이브러리 세포 (한국특허 공개번호 10-2022-0163625)를 스페로플라스트로 만든 후, 200 nM (monomer 기준)의 항원단백질인 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD-Streptavidin-Alexa488을 넣고 상온에서 1시간 동안 로테이션하여 스페로플라스트에 형광 프로브를 표지하였다. 항원 결합력 증가로 높은 형광을 보이는 클론들을 유세포 분리기(flow cytometry)를 이용하여 회수하였으며, 원하는 클론들을 증폭(enrich)하기 위해 여러 라운드의 선별 과정을 수행하였다. 반복

되는 여러 라운드의 탐색 과정으로 ARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 친화도를 가지는 scFv 변이체 클론들을 확보하였다 (도 12).

[0161] 3-3. scFv 변이체들의 증폭 확인

[0162] 실시예 3-2에서 제작한 각 라운드 라이브러리와 scFv 형태의 모항체 S230, m396 및 80R들을 스페로플라스트로 제조하였다. 준비된 스페로플라스트들에 스크리닝에 이용된 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD-Streptavidin-Alexa488 항원을 100 nM (monomer 기준)의 농도로 결합시키고 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 항원과의 비-특이적인 결합을 제거하기 위해 PBS로 두 차례 세척한 후 유세포 라운드가 진행될수록 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력이 향상된 변이체들이 라이브러리에서 증폭되는 것을 확인하였다 (도 13).

[0164] 3-4. scFv 변이체들의 유전자 서열 분석

[0165] 실시예 3-2에서 확보한 scFv 변이체 클론들의 유전자 서열을 확인하기 위하여 Sanger sequencing을 이용하여 DNA 염기 서열을 분석하였으며, 분석을 통해 항체 서열을 가지는 scFv 항체 변이체 4종 (IJ30, IJ37, IJ64 및 IJ73)을 선별하였다 (도 14).

[0167] 3-5. SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력 분석

[0168] 실시예 3-4에서 선별한 4종의 scFv 항체 변이체들의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력을 확인하기 위해, 유세포 분석기를 이용한 결합력 분석을 진행하였다. 이를 위하여 상기 4종의 변이체와 대조군으로 사용될 scFv 형태의 S230을 스페로플라스트들로 제조하고, 스크리닝에 이용된 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD-Streptavidin-Alexa488 항원을 70 nM(monomer 기준)의 농도로 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 항원과의 비-특이적인 결합을 제거하기 위해 PBS로 두 차례 세척한 후 유세포 분석기를 이용하여 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력을 분석하였다. 분석 결과, 4종의 scFv 변이체들에서 대조군인 scFv 형태의 S230에 비해 현저히 증가된 형광 신호를 나타내었으며, 이를 통해 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 결합력은 지니는 scFv 항체 변이체들을 선별하였음을 확인하였다 (도 15).

[0170] 3-6. IgG 형태 항체 생산 및 정제

[0171] 실시예 3-4에서 선별된 4종의 scFv 항체 변이체가 IgG 형태로도 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD와의 향상된 결합력을 가지는지 확인하기 위해, 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 각각 제작하였다. 또한, 선별된 4종의 항체를 서열 중 공통된 돌연변이만을 포함한 IJ2 변이체를 추가로 IgG 형태로 발현하기 위해 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 제작하였다. 실시예 1-7에 기술한 방법으로 제작한 동물세포 발현용 벡터를 PEI(Polyethylenimine)를 사용하여 Expi293F 세포에 트랜스펙션하고 7일 동안 배양한 후, Protein A 레진 150 μ l을 사용하여 정제하였다. SDS-PAGE를 통해 비환원 조건(NR)과 환원 조건(R)에서 정제된 5종의 단백질 (IJ30, IJ37, IJ64, IJ73 및 IJ2)의 크기와 순도를 분석하였다 (도 16).

[0173] 3-7. IgG 형태 변이체들의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력 분석

[0174] 단백질 상에서 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 항체의 결합력을 측정하기 위해, 실시예 3-6에서 발현 및 정제한 5종의 항체와 모항체인 S230에 대하여 ELISA 실험을 진행하였다. His 태그를 융합한 단량체 형태의 B.1.617.2 RBD를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 μ g/ml로 희석하여 50 μ l씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 well microplate (costar)에 4 $^{\circ}$ C로 16 시간 동안 고정화한 후 100 μ l의 4% 스킴 밀크(skim milk) (GenomicBase) (in 0.05% PBST, pH 7.4)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹 하였다. 0.05% PBST 150 μ l로 4 회씩 세척한 뒤 1 μ M 농도부터 연속 희석된 5종의 항체를 50 μ l 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후 Anti-Protein A-HRP (Genscript) 50 μ l로 상온에서 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific)을 50 μ l씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄ 50 μ l씩 넣어주어 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해

분석하였다. 그 결과, 상기 5종의 항체가 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 결합력을 가지는 것으로 나타났으며, 그 중 IJ2 항체가 가장 높은 결합력을 나타냈다 (도 17).

[0176] 실시예 4. SARS-CoV-2 델타 변이체 바이러스의 RBD에 대한 항체 변이체 제작

[0177] 4-1. Anti-SARS-CoV-2 B.1.617.2 scFv 항체 거대 error prone 라이브러리 제작

[0178] 실시예 3에서 발굴한 항체들의 SARS-CoV-2 델타 변이체 (B.1.617.2)의 RBD에 대한 결합력을 친화성 성숙을 통해 더욱 향상시키기 위하여, 결합력이 가장 높았던 IJ2 및 IJ30을 선별하고, 각각의 scFv 항체에 TaqPolymerase (TaKaRa), dNTPs (Invitrogen), MgCl₂ 및 MnCl₂ (SIGMA)를 사용하여 0.3% 돌연변이가 생기도록 Error Prone PCR 기법을 사용해 유전체를 증폭하였다. 증폭된 유전체에 *Sfi* I (New England BioLab) 제한효소 처리하고, *Sfi* I 제한효소 처리되어 있는 pMopac12-NlpA-FLAG 벡터에 T4 DNA Ligase (enzymatics)를 사용하여 삽입시킨 후 Jude I 세포에 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균들을 고체배지에 스프레딩한 후 37℃에서 16시간 배양하고, 2% 글루코스가 포함된 TB 배지로 회수하여 각 2×10^8 크기의 초기라이브러리를 확보하였다.

[0180] 4-2. 인간 항체 변이체 스크리닝

[0181] 실시예 3-1에서 제작한 GST가 융합된 이량체 항원 단백질 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD-GST에 Alexa488 형광분자를 표지하고, 실시예 4-1에서 제작한 IJ2 및 IJ30 라이브러리 세포를 스페로플라스트로 만든 후, 100 nM (monomer 기준)의 항원단백질인 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD-GST-Alexa488을 첨가하고 상온에서 1시간 동안 로테이션하여 스페로플라스트에 형광 프로브를 표지하였다. 항원 결합력 증가로 높은 형광을 보이는 클론들을 유세포 분리를 이용하여 회수하였으며, 원하는 클론들을 증폭하기 위해 여러 라운드의 선별 과정을 수행하였다. 반복되는 여러 라운드의 탐색 과정으로 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 이전보다 향상된 친화도를 가지는 scFv 변이체 클론들을 확보하였다 (도 18).

[0183] 4-3. scFv 변이체들의 증폭 확인

[0184] 실시예 4-2의 방식으로 제작된 각 라운드 라이브러리와 scFv 형태의 S230, 모항체인 IJ2 및 IJ30을 스페로플라스트로 제조하였다. 준비된 스페로플라스트들에 스크리닝에 이용된 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD-GST-Alexa488 항원을 25 nM (monomer 기준)의 농도로 결합시키고 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 항원과의 비-특이적인 결합을 제거하기 위해 PBS로 두 차례 세척한 후 유세포 분석을 진행한 결과, 라운드가 진행될수록 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력이 향상된 변이체들이 라이브러리에서 증폭되는 것을 확인하였다 (도 19).

[0186] 4-4. SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력 분석

[0187] 실시예 4-3에서 선별한 6종의 scFv 항체 변이체들 (IJ203, IJ225, IJ228, IJ232, IJ235 및 IJ274)의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력을 확인하기 위해, 유세포 분석기를 이용한 결합력 분석을 진행하였다. 이를 위하여 각각의 변이체와 대조군으로 사용될 scFv 형태의 S230 및 모항체인 S.IJ2를 스페로플라스트들로 제조하였다. 준비된 스페로플라스트들에 스크리닝에 이용된 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD-GST-Alexa488 항원을 25 nM (monomer 기준)의 농도로 결합시키고 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 항원과의 비-특이적인 결합을 제거하기 위해 PBS로 두 차례 세척한 후 유세포 분석기를 이용하여 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력을 분석하였다. 분석 결과, IJ225 변이체가 대조군인 scFv S230 및 모항체 IJ2에 비해 현저히 증가된 형광 신호를 나타내었으며, 새로 발굴한 다른 변이체들보다도 매우 높은 형광신호를 나타내, SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 매우 향상된 결합력을 지니는 scFv 항체 변이체임을 확인하였다 (도 20).

[0189] 4-5. scFv IJ225의 유전자 서열 분석

[0190] 확보한 scFv 변이체 IJ225의 유전자 서열을 확인하기 위하여 Sanger sequencing을 이용하여 DNA 염기 서열을 분석하였다 (도 21).

[0192] 4-6. scFv IJ225의 IgG 형태 항체 생산 및 정제

[0193] 선별된 IJ255 scFv 항체 변이체가 IgG 형태로도 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD와의 향상된 결합력을 가지는지 확인하기 위해, 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 각각 제작하였다. 실시예 1-7에 기술한 방법으로 Expi293F 세포에서 항체를 생산한 후, 비환원 조건(NR)과 환원 조건(R)에서 정제된 IJ225의 단백질의 크기와 순도를 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 22).

[0195] 4-7. IgG 형태 항체의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD 영역에 대한 결합력 분석

[0196] 단백질 상에서 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 항체의 결합력을 측정하기 위해, 실시예 4-6에서 발현 및 정제한 IJ225, 대조군인 S230, 및 모항체인 IJ2에 대하여 ELISA 실험을 진행하였다. His 태그를 융합(fusion)한 단량체(monomeric) 형태의 B.1.617.2 RBD를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석하여 50 µl씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 well microplate (costar)에 4 °C로 16 시간 동안 고정화한 후 100 µl의 4% 스킵 밀크 (GenomicBase) (in 0.05% PBST, pH 7.4)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹 하였다. 0.05% PBST 150 µl로 4 회씩 세척한 뒤 1 µM 농도부터 연속 희석한 3종의 항체 (IJ225, S230 및 IJ2)를 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후 Anti-Protein A-HRP (GensScript) 50 µl로 상온에서 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 µl 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석한 결과 IJ225가 IJ2보다 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대해 매우 향상된 결합력을 가지는 것을 확인하였다 (도 23).

[0198] 4-8. IJ225의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 결합 친화도 분석

[0199] IJ225의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대한 결합 친화도를 측정하기 위해서 Octet BLI system R8 (Sartorius)를 사용하였다. NTA biosensor에 1× Kinetic Buffer를 사용하여 평형을 맞추고 1× Kinetic Buffer에 희석한 50 nM 농도의 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD-His 항원 250 µl을 180초 동안 고정화하였다. 그 후, 연속 희석한 250 µl의 항체를 600초 동안 흘려 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD와 결합시키고 1× Kinetic Buffer를 이용하여 600초 동안 결합을 해리시켰다. Octet BLI Analysis 12.2 software로 표준 방정식을 이용하여 fitting을 진행하였고, R² 값이 0.99보다 크도록 k_{on}, k_{off} 및 K_D 값을 계산하였다. 분석 결과, SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대해 IJ225가 1.23 nM의 결합 친화도를 가지고 매우 강하게 결합하는 것을 확인하였다 (도 24).

[0201] 실시예 5. SARS-CoV-2 RBD 교차 결합력 확인

[0202] 5-1. 결합력 분석

[0203] 본 발명에서 SARS-CoV-2 RBD에 결합하도록 진화시킨 IJ4G 및 YY 항체가 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 결합하는지, SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 결합하도록 진화시킨 IJ225가 SARS-CoV-2 RBD에 결합하는지 교차 결합력을 확인하기 위하여 ELISA 분석을 수행하였다. His 태그를 융합한 단량체 형태의 RBD를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 희석하여 50 µl씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 well microplate (costar)에 4 °C로 16 시간 동안 고정화한 후 100 µl의 4% 스킵 밀크 (GenomicBase) (in 0.05% PBST, pH 7.4)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹 하였다. 0.05% PBST 150 µl로 4 회씩 세척한 뒤, 250 nM 농도부터 연속 희석한 3종의 항체 (IJ225, IJ4G 및 YY)를 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후 Anti-Protein A-HRP (GensScript) 50 µl로 상온에서 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H₂SO₄을 50 µl 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다. 분석 결과, IJ225 항체가 SARS-CoV-2 RBD에 YY보다는 약하지만 강하게 결합하는 것을 확인하였고, IJ4G 변이체가 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 IJ225 보다 강하게 결합하는 것을 확인하였다. 그러나 YY 항체의 경우 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대해서는 매우 약하게 결합하는 것을 확인하였다 (도 25).

[0205] 5-2. 결합 친화도 분석

[0206] 본 발명에서 SARS-CoV-2 RBD에 결합하도록 진화시킨 IJ4G 및 YY 항체가 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD (서열번호 78)에 결합하는지, SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 결합하도록 진화시킨 IJ225가 SARS-CoV-2 RBD (서열번호 77)에 결합하는지, Octet BLI system R8 (Sartorius)를 사용하여 결합 친화도를 BLI 분석으로 확인하였다. NTA biosensor에 1× Kinetic Buffer를 사용하여 평형을 맞추고 1× Kinetic Buffer에 희석한 50 nM 농도의 RBD-His 항원 250 μl을 180초 동안 고정화하였다. 그 후, 연속 희석한 250 μl의 항체를 600초 동안 흘려 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD와 결합시키고 1× Kinetic Buffer를 이용하여 600초 동안 결합을 해리시켰다. Octet BLI Analysis 12.2 software로 표준 방정식을 이용하여 fitting을 진행하였고, R^2 값이 0.99보다 크도록 k_{on} , k_{off} 및 K_D 값을 계산하였다. 분석 결과, SARS-CoV-2 RBD에 대하여 IJ225 항체가 1.30 nM의 결합 친화도를 가지고 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD와 유사한 정도로 강하게 결합하며, B.1.617.2 RBD에 대하여 IJ4G 항체가 0.231 nM의 결합 친화도를 가지고 매우 강하게 결합하는 것을 확인하였다. 그러나 ELISA 분석 결과와 마찬가지로 YY 항체의 경우 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 대하여 141 nM의 약한 결합 친화도를 지니는 것을 확인하였다 (도 26).

[0208] 실시예 6. 중화능 검증

[0209] 본 발명에서 발굴한 항체들이 실제로 중화능이 있는지 HIV-1 기반의 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV-2 B.1.617.2의 슈도바이러스를 이용하여 중화능을 검증하였다. Opti-MEM 배양액에 SARS-CoV-2 스파이크 발현 플라스미드와 외피 및 패키징 플라스미드를 섞은 후, PEI(Polyethylenimine) (Polyscience, 23966)와 플라스미드를 3:1 비율로 섞어 상온에서 10 분간 두었다가 전날 8×10^5 cells/ml의 밀도로 배양한 HEK293T 세포에 트랜스펙션한 뒤, CO₂ 인큐베이터에서 37 °C 및 5 % CO₂ 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 취하여 0.45 μm syringe filter (Merck Millipore)로 여과하여 슈도바이러스를 생산하였다. Opti-MEM 배양액에 ACE2 발현 플라스미드 및 TMPRSS2 발현 플라스미드를 섞은 후, PEI와 플라스미드를 3:1 비율로 섞어 상온에서 10 분간 두었다가 전날 8×10^5 cells/ml의 밀도로 배양한 HEK293T 세포에 트랜스펙션한 뒤, CO₂ 인큐베이터에서 37 °C 및 5 % CO₂ 조건으로 48시간 동안 배양하였다. ACE2-TMPRSS2가 발현된 100 μl의 HEK293T 세포를 2×10^5 cells/ml의 밀도로 white 96 well plate에 분주하고 24시간 후, 37 °C에서 1시간 인큐베이션시킨 연속 희석한 항체와 슈도바이러스의 혼합물 100 μl을 ACE2-TMPRSS2 발현 HEK293T 세포가 있는 96 웰 플레이트로 옮기고 37 °C 및 5 % CO₂ 조건으로 48시간 동안 인큐베이션하였다. 48시간 후, 상등액을 제거하고 20 μl의 1×CCLR(Cell Culture Lysis Reagent) (Promega)를 첨가한 후, 100 μl luciferase assay system (Promega)를 첨가하고 luciferase 발광정도를 Micro plate reader로 측정하였다. 측정된 luciferase 신호를 GraphPad Prism 프로그램을 이용하여 슈도바이러스 양성 웰(positive well) (=100%), ACE2-TMPRSS2 세포 음성 웰(negative well) (= 0 %)로 정규화하여 계산하였다. 분석 결과, IJ4G 항체가 SARS-CoV-2에 대하여 0.77 nM의 IC₅₀을 지니며, SARS-CoV-2 B.1.617.2에도 3.832 nM의 IC₅₀로 가장 높은 중화능을 보이는 것을 확인하였다. YY 항체는 SARS-CoV-2 슈도바이러스만을 중화시켰으며, IJ225는 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV-2 B.1.617.2 슈도바이러스를 모두 중화시키는 것을 확인하였다 (도 27).

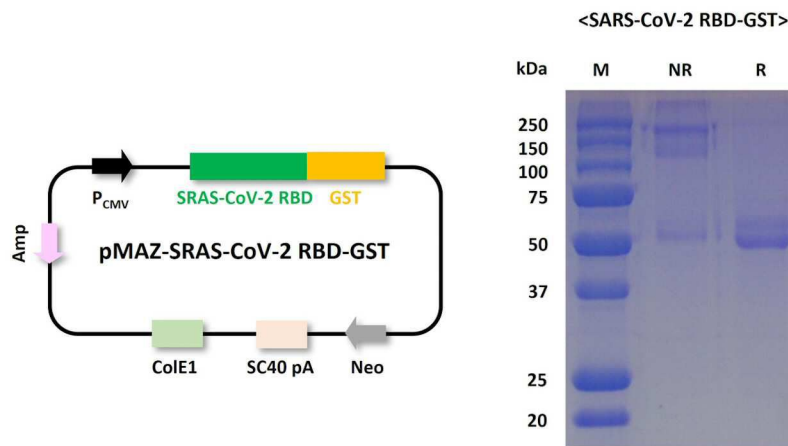
[0211] 실시예 7. SARS-CoV-1 교차 결합력 분석

[0212] Anti-SARS-CoV-1 항체 S230을 SARS-CoV-2 RBD에 결합하도록 진화시킨 IJ4G 및 YY와 SARS-CoV-2 B.1.617.2 RBD에 결합하도록 진화시킨 IJ225가 모항체와 같이 SARS-CoV-1에 결합할 수 있는지 교차 결합력을 확인하기 위하여 ELISA 분석을 진행하였다. His 태그를 융합한 단량체 형태의 SARS-CoV-1 RBD (서열번호 79)를 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 μg/ml로 희석하여 50 μl씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 well microplate (costar)에 4 °C로 16 시간 동안 고정화한 후 100 μl의 4% 스킵 밀크 (GenomicBase) (in 0.05% PBST, pH 7.4)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹 하였다. 0.05% PBST 150 μl로 4 회씩 세척한 뒤 250 nM 농도부터 연속 희석된 3종의 항체 (IJ225, IJ4G 및 YY)를 50 μl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후 Anti-Protein

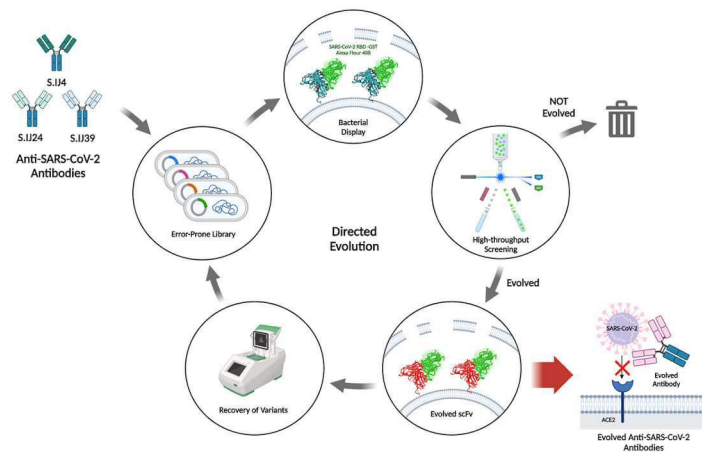
A-HRP (GensScript) 50 μ l로 상온에서 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 다시 세척하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific)을 50 μ l씩 첨가해 발색한 뒤 2 M H_2SO_4 을 50 μ l 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다. 분석 결과, 모든 항체가 모항체인 S230과 비슷하게 SARS-CoV-1 RBD에 잘 결합하는 것을 확인하였다 (도 28).

도면

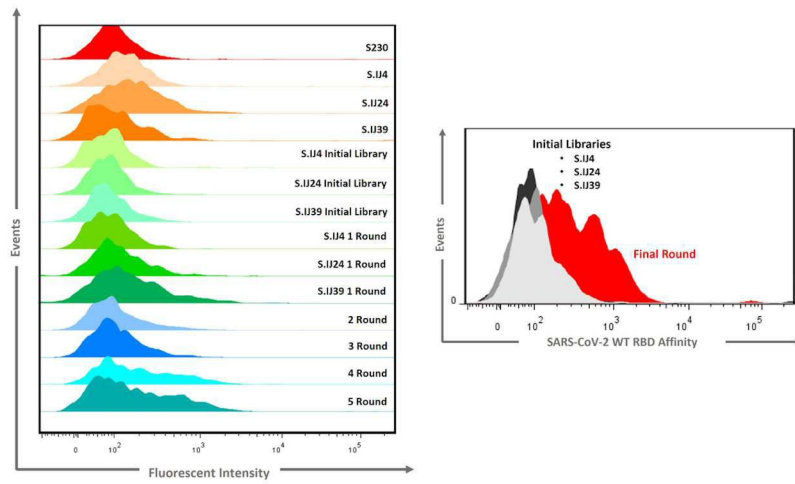
도면1



도면2



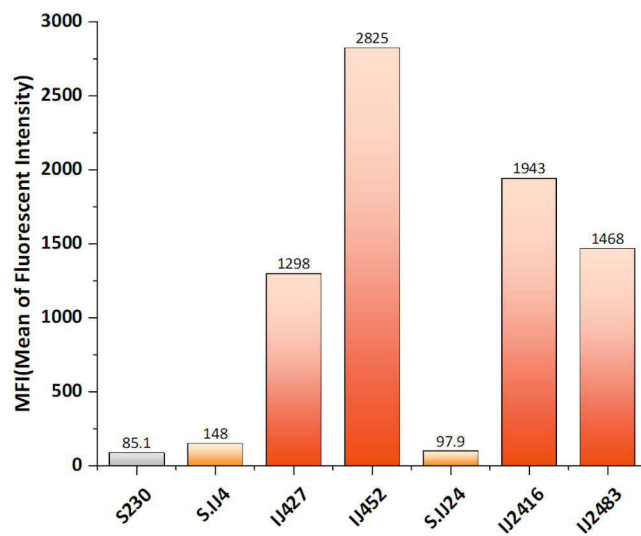
도면3



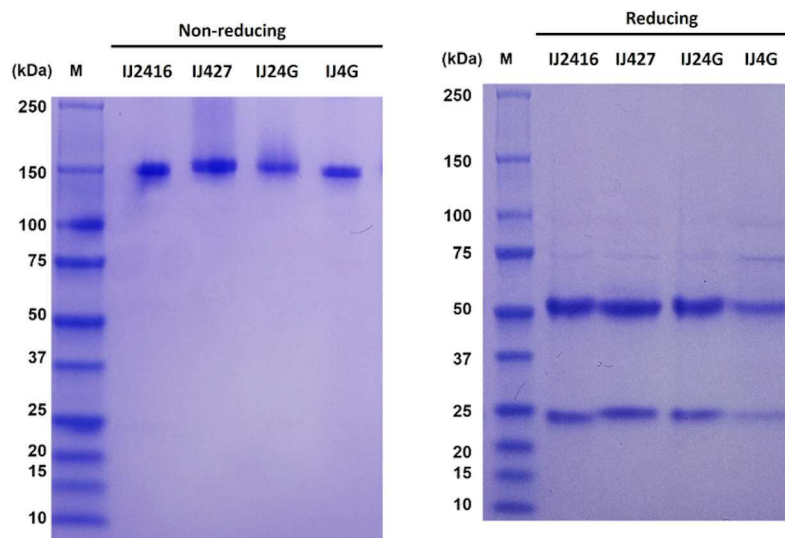
도면4

VH	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
S230	QAGLVESGGALVQGRSLRLSCAAS	QPTFPNTYA	MSHWVQAPATGLQNLAV	ITSDGRNK	FYADSVKGRFTISRDSKNTLYLQMSLGRGDTAVYTC	VTQRKNSRDYFPYTHRMGV	WGQTTVAIVSS
S.IJ4	G.....	H.....	M.....	Y.....	MS.....	L.....Y.....	L.....
S.IJ24	G.....	G.....	M.....	Y.....	M.....G.....	L.....Y.....G.....	L.....
IJ427	S.....	G.....	H.....	Y.....	G.....Y.....	Y.....	
IJ452	S.....	G.....	H.....	Y.....	G.....Y.....	Y.....	
IJ2416	S.....	G.....	H.....	Y.....	G.....Y.....	Y.....	
IJ2483	S.....	G.....	H.....	Y.....	G.....Y.....	Y.....	
VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
S230	DVVLTSGLPLSLPTLQPSISCRSS	QSIVYSDDTY	LNWFQGRQGSFRLLY	QYQ	NRDSGVDFRFSGGSGSTFTLKISRVEAEDVGVYTC	MQGSHMFPT	FQGGTVLEIK
S.IJ4	E.....	E.....	E.....	E.....	P.....	E.....	
S.IJ24	E.....	E.....	E.....	E.....	P.....	E.....	
IJ427	E.....	E.....	E.....	E.....	P.....	E.....	
IJ452	E.....	E.....	E.....	E.....	P.....	E.....	
IJ2416	E.....	E.....	E.....	E.....	P.....	E.....	
IJ2483	E.....	E.....	E.....	E.....	P.....	E.....	

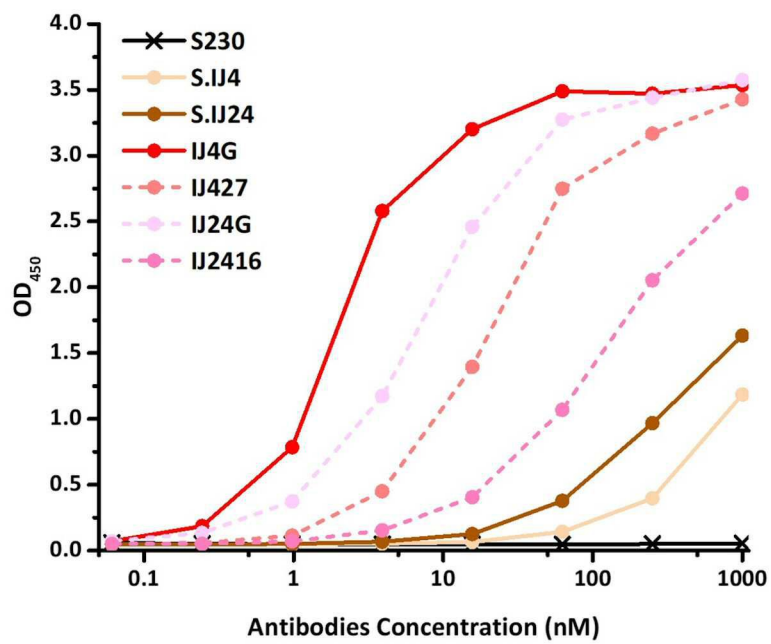
도면5



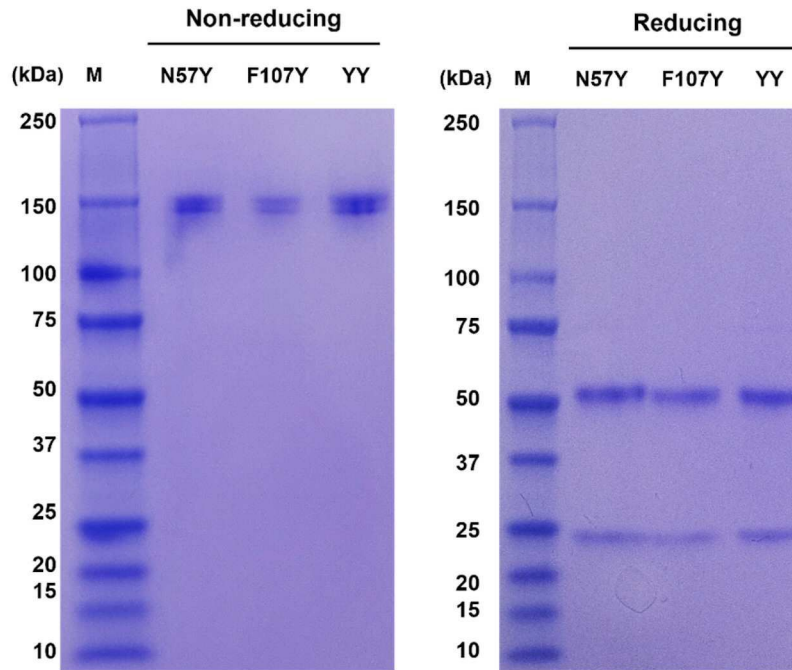
도면6



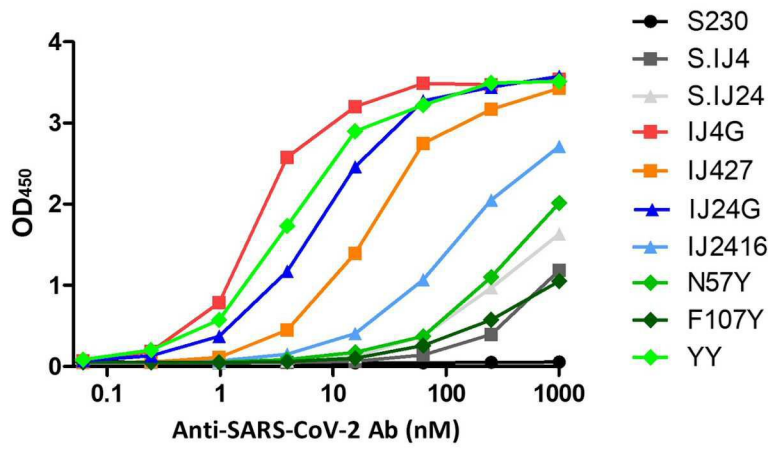
도면7



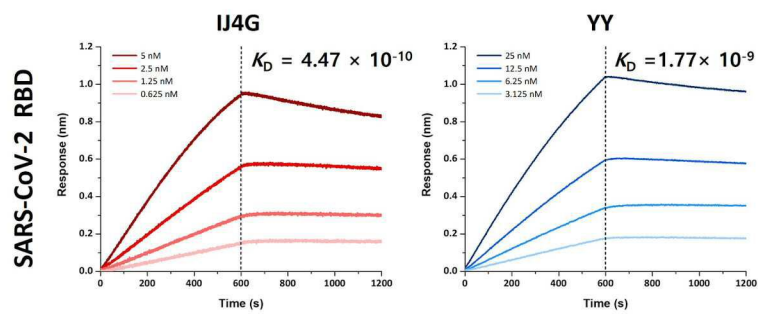
도면8



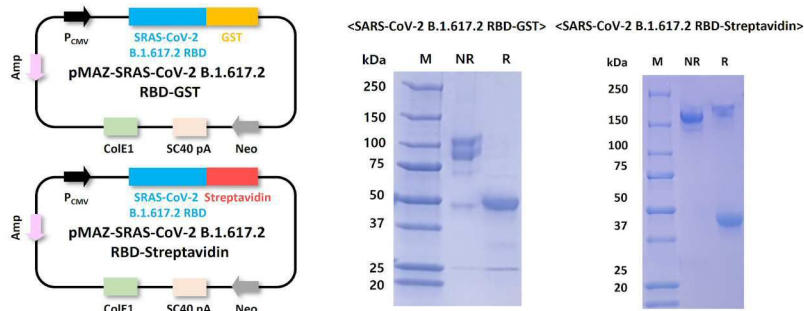
도면9



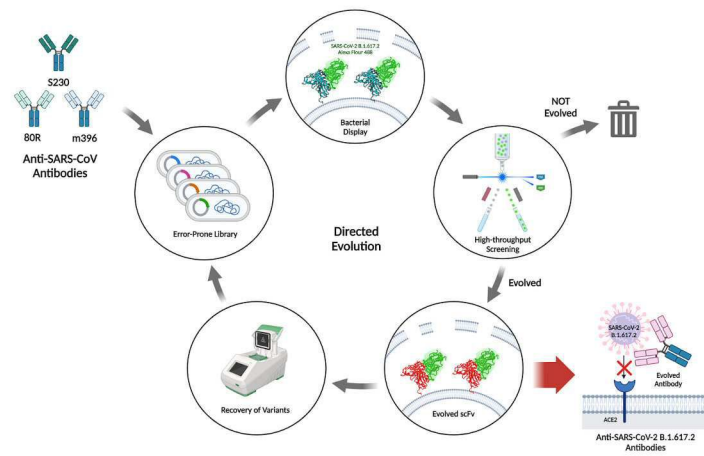
도면10



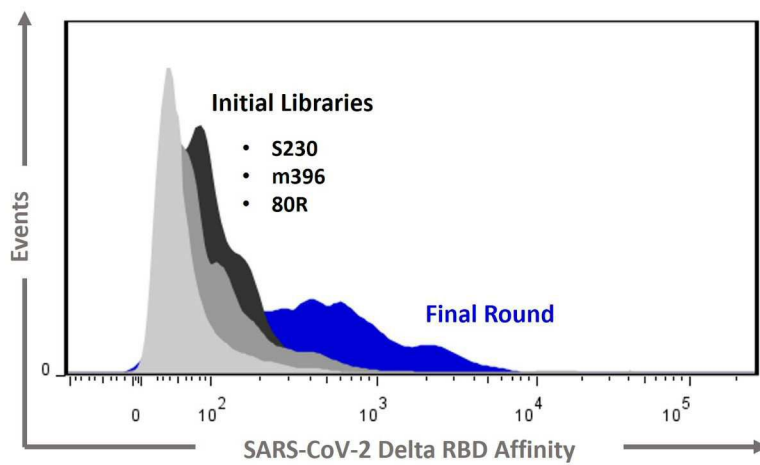
도면11



도면12



도면13

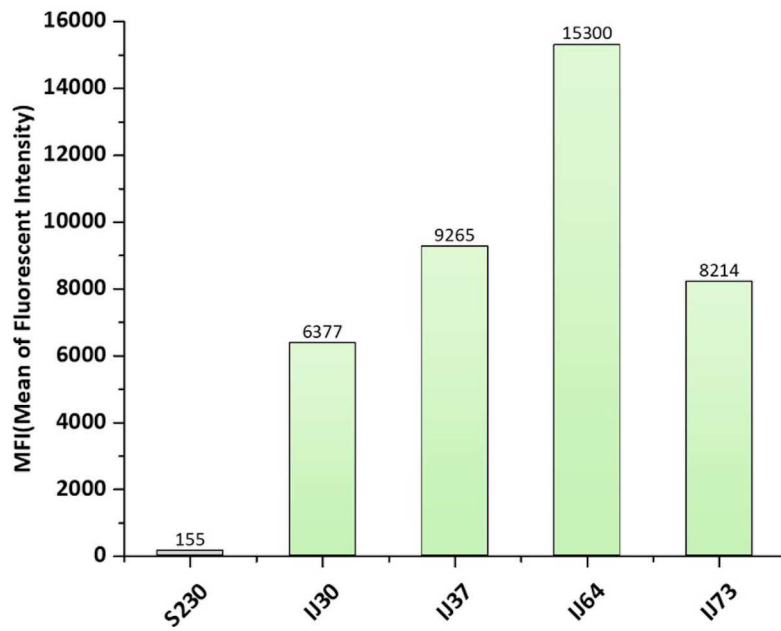


도면14

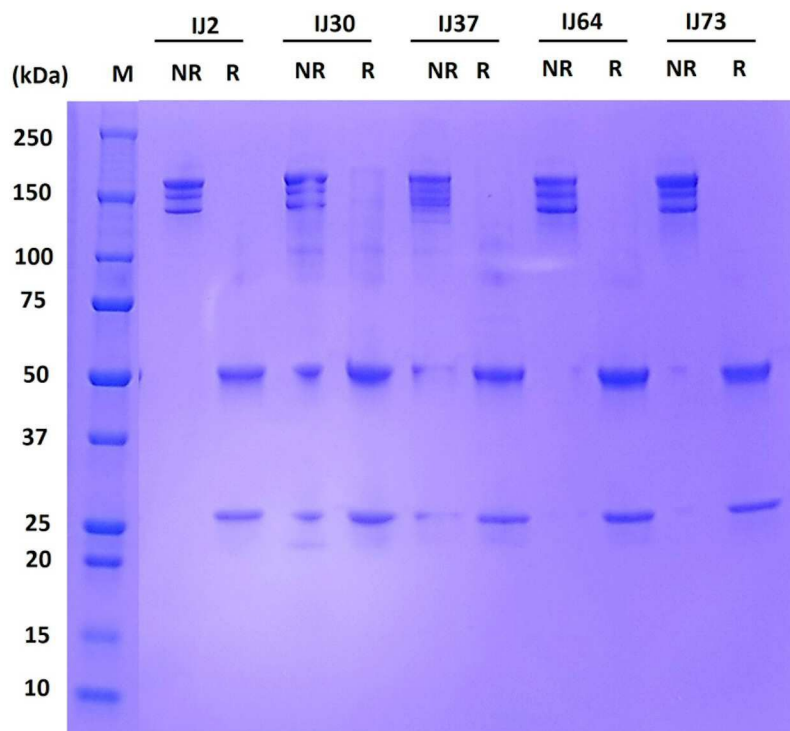
VH	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
8230	QAQLVESGGGLVPGASLALSCAAS	QFTFRNYA	MHWVRQAPATLQWLAIV	ITSDGRNK	PYADSVKGRFTISREDKNTLYLQMDLAGEITAVVYC	VTQRDNRSDYFPHDMGV	WGQDTTAVYSS
1330			M	M	M	G	Y
1337			M	E	E	Y	Y
1364			M	E	E	Y	Y
1373			M	E	E	Y	Y

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
8230	DVVLTSPLPLPTLQPAISICRSS	QSIYISDGDY	LNWFQQRFGQSFRLLIY	QVS	NRDSGVPRFSGSGSGSTDTLKISRVEAEDVGVVYC	MQGSIMPTT	FQGTSTVEIK
1330							
1337							
1364							
1373							

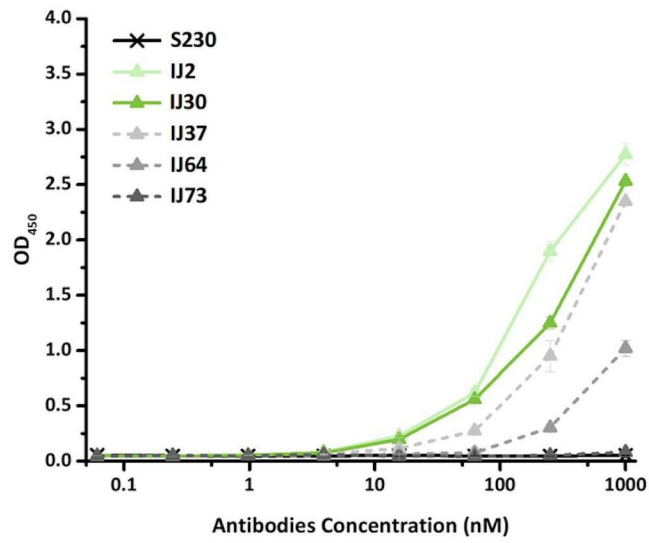
도면15



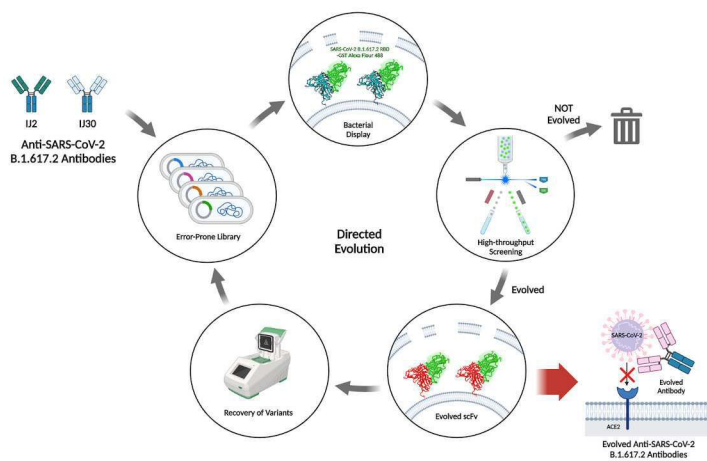
도면16



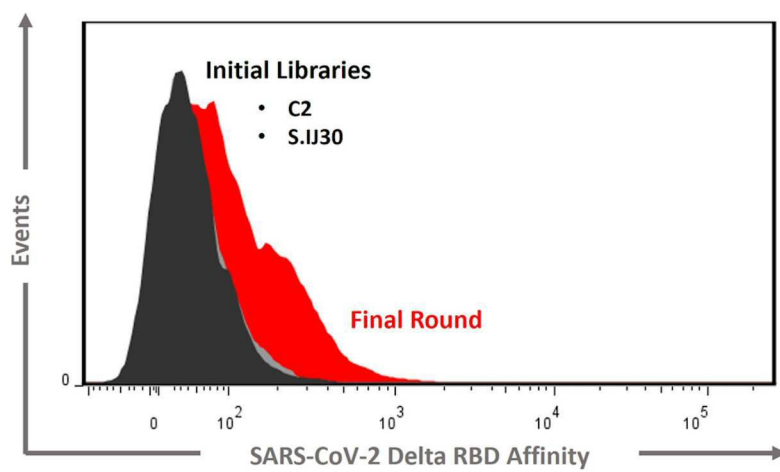
도면17



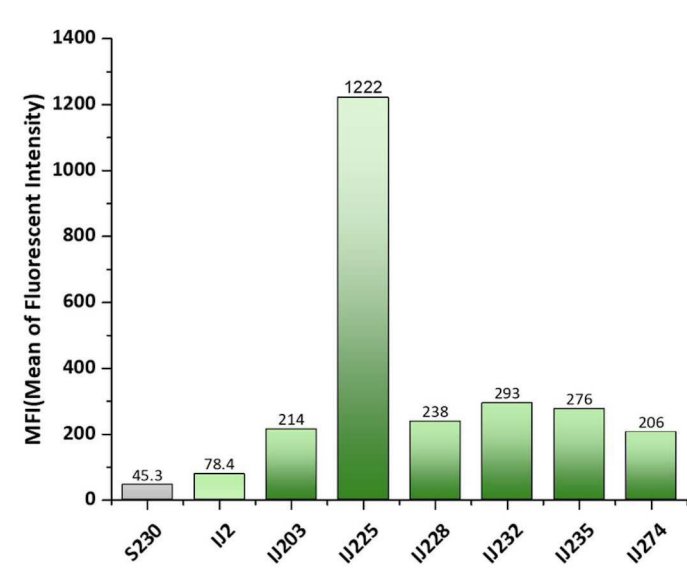
도면18



도면19



도면20

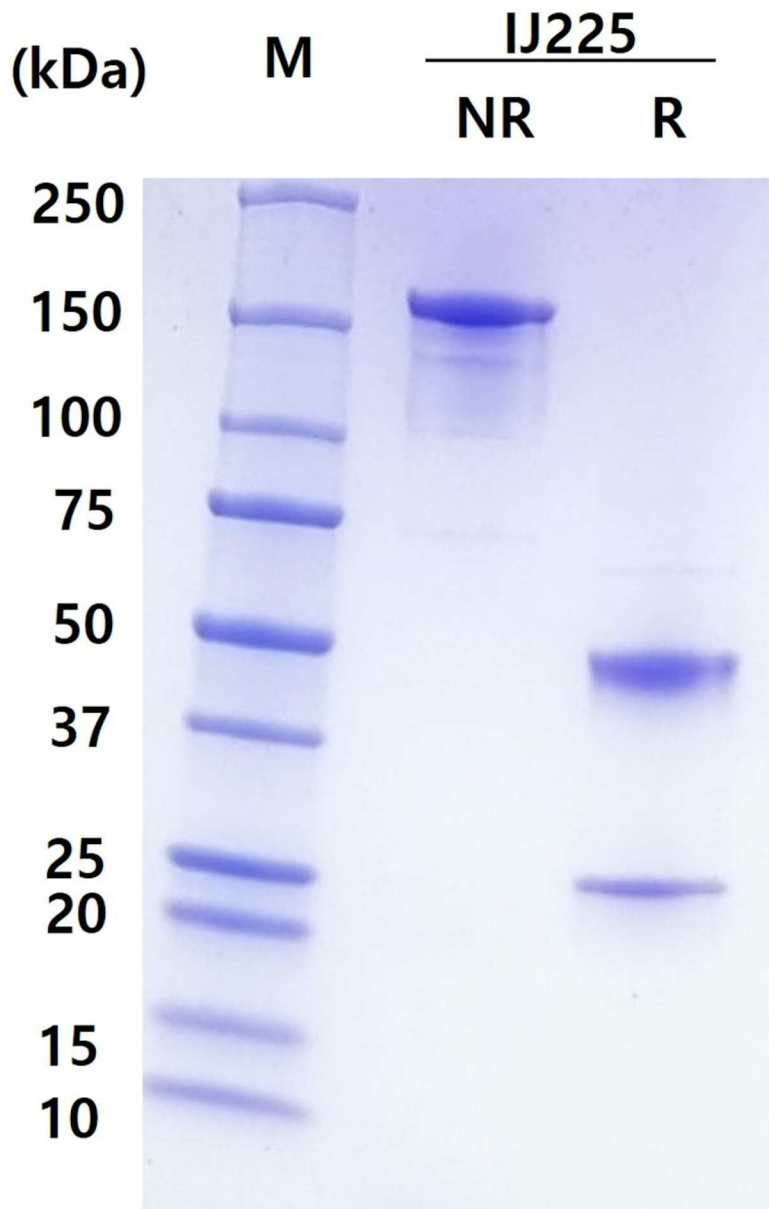


도면21

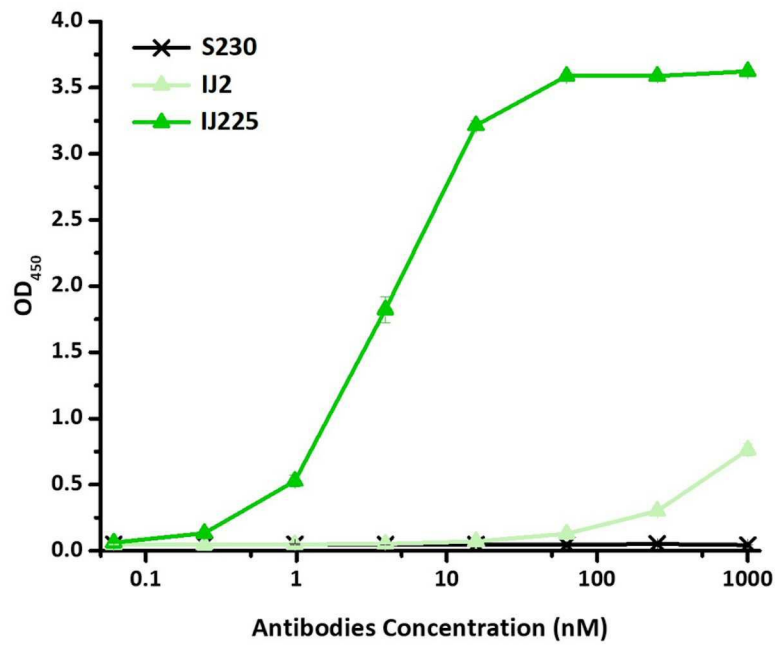
VH									
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4		
S230	QAQIVSGGALVGRHSIALSCAAS	GTTFNRYA	MHWVQAATGLQWLAV	ITSDGRNK	FYADSVKGRFTISREDSKLTLYQMDELAGESTAVYTC	VTQRDNRSRVFHYVFRHMDV	WDGTTVAIVSS		
IJ2	L.....		M.....	E.....	E.....	Y.....			
IJ225	L.....		M.....	YE.....	E.....	E.....	N.....		

VL									
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4		
S230	DVVLTQSPFLPLFLQSPATISCRSS	QSIVYSQGY	LMWFQQRPGQPPRLIY	QYS	NRDGGVPRFRFGSGGSDFTLKISRVEARDGVVTC	MGGRHWPT	PGQTRVYIK		
IJ2	L.....				A.....				
IJ225	L.....				A.....				

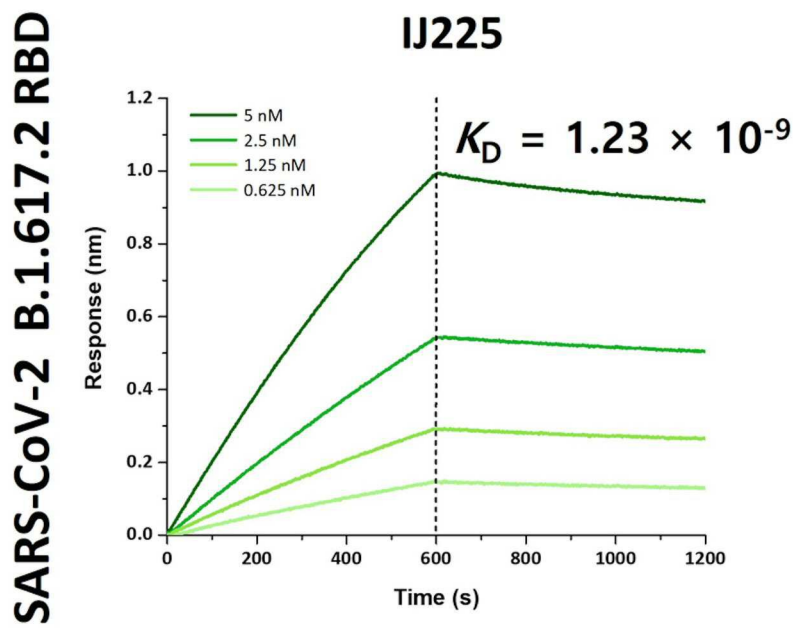
도면22



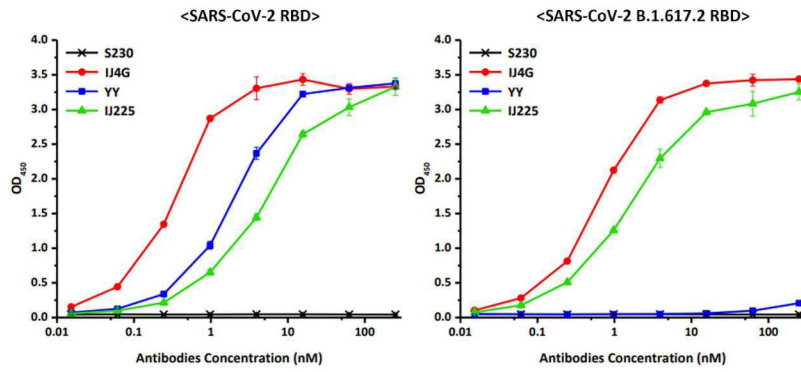
도면23



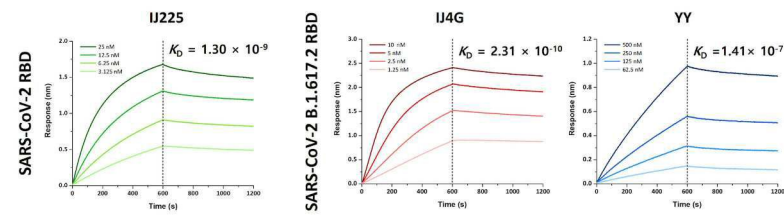
도면24



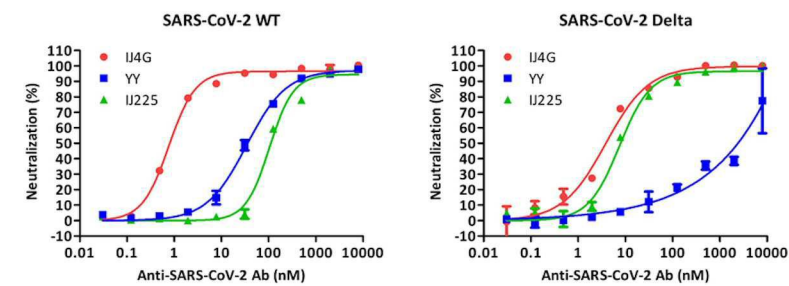
도면25



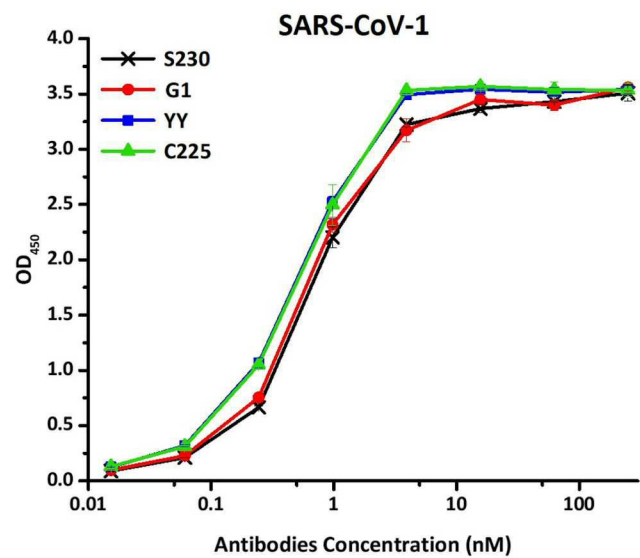
도면26



도면27



도면28



도면29

항체 부위	항체 명칭	서열 (아미노산)	서열번호
VH	CDRH1	U4G, U427, U452	1
		U24G, U2416, U2483	2
	CDRH2	U30, U37, U64, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	3
		U4G, U452, N57Y, YY	4
		U427	5
		U24G, U2416	6
		U2483	7
		U30	8
		U37, U64, U73, U2	9
		U225	10
		F107Y	11
		U4G, U427	12
	CDRH3	U452	13
		U24G, U2483, U37, U64, U73, U2, F107Y, YY	14
		U2416, U30	15
		U225	16
		N57Y	17
VL	FR1	U4G, U427, U452, U24G, U2483, U30, U37, U64, U73, U2, N57Y, F107Y, YY	25
		U2416	26
		U225	27
	FR2	U4G, U427, U452, U30, U37, U64, U73, U2, U225	28
		U24G, U2416, U2483, N57Y, F107Y, YY	29
	FR3	U4G, U30	30
		U24G, U2416, U2483, N57Y, F107Y, YY	31
		U427	32
		U452	33
		U37	34
	FR4	U64, U73, U2, U225	35
		U4G, U427, U452	36
		U24G, U2416, U2483, U30, U37, U64, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	37
	CDRL1	U4G, U427, U452	17
		U24G, U2416, U2483, U30, U37, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	18
		U64	19
	CDRL2	U4G, U427, U452, U24G, U2416, U2483, U37, U64, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	20
		U30	21
	CDRL3	U4G, U427, U24G, U2416, U30, U37, U64, U73, U2, U225, N57Y, F107Y, YY	22
		U452	23
		U2483	24
	FR1	U4G, U427, U452, U24G, U2416, U2483, U30, U37, U64, U73, U2, N57Y, F107Y, YY	38
		U73	39
		U225	40
		U427, U452, U2416, U2483, U4G, U24G, N57Y, F107Y, YY, N57Y, F107Y, U30, U37, U64, U73, U2, U225	41
	FR3	U4G, U427, U452, U24G, U2416	42
		U2416	43
		U2483	44
		U37	45
		U30, U64, U73, U2, N57Y, F107Y, YY	46
	FR4	U427, U452, U2416, U2483, U4G, U24G, N57Y, F107Y, YY, N57Y, F107Y, U30, U37, U64, U73, U2, U225	47
		U427, U452, U2416, U2483, U4G, U24G, N57Y, F107Y, YY, N57Y, F107Y, U30, U37, U64, U73, U2, U225	48

도면30

항제 부위	항제 명칭	서열 (아미노산)	서열번호
VH	IJ4G	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFGNYAMHWRQAPATGLQWLAMITSDGRY KFYADSVMGRTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNSLDYYPHYFHDMDV WGLGTTTAVSS	49
	IJ427	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFGNYAMHWRQAPATGLQWLAMITSGGRYK FYADSVMSRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNSLDYYPHYFHDMDV WGLGTTTAVSS	50
	IJ452	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFGNYAMHWRQAPATGLQWLAMITSDGRY KFYADSVMGRTISRSDSKNTLYLQDLSRGEDTAVYYCVTQRDNSLDYYPHYFHDMDV WGLGTTTAVSS	51
	IJ24G	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAVITSGRHK FYADSVKGRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV WGQGTITAVSS	52
	IJ2416	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAVITSGRHK FYADSVKGRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV WGQGTITAVSS	53
	IJ2483	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAVITSGRHK KFYADSVKGRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV WGQGTITAVSS	54
	IJ30	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAMITSDGRN MFYADSVMGRTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV VWGQGTITAVSS	55
	IJ37	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAMITSDGRN EFYADGVEGRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV WGQGTITAVSS	56
	IJ64, IJ73, IJ2	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAMITSDGRN EFYADSVGRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV WGQGTITAVSS	57
	IJ225	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAMITSDGRY FYADSVGRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV WGQGTITAVSS	58
	N57Y	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAVITSDGRYK FYADSVKGRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV WGQGTITAVSS	59
	F107Y	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAVITSDGRN FYADSVKGRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV WGQGTITAVSS	60
	YY	QAQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYAMHWRQAPATGLQWLAVITSDGRYK FYADSVKGRFTISRSDSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCVTQRDNDRDYYPHYFHDMDV WGQGTITAVSS	61
VL	IJ4G, IJ427	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDP GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	62
	IJ452	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDP GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	63
	IJ24G	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDP GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	64
	IJ2416	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDP TGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	65
	IJ2483	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDP GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	66
	IJ30	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDS GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	67
	IJ37	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDP SGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	68
	IJ64	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDP SGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	69
	IJ73	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDP SGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	70
	IJ2, N57Y, F107Y, YY	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDP SGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	71
	IJ225	DVLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGETYLNWFQRPQSPRRLIYQVSNRDS GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGSHPWPTFGQGTKEIK	72
CL		TVAAPSVFHPSPDEQLKSGTASVYCLNINFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	73
CH1		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLLVDFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG VLSSTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV	74
CH2		EPKSKDKTHICTCPAPELGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK	75
CH3		GQPREPQVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDLS DGSEFYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	76

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.