

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 9월 27일 (27.09.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/128508 A2

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/42 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001902
- (22) 국제출원일: 2012년 3월 16일 (16.03.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0024332 2011년 3월 18일 (18.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): (주) 셀트리온 (CELLTRION, INC.) [KR/KR]; 인천광역시 연수구 송도동 13-6, 406-840 Incheon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 장신재 (CHANG, Shin Jae) [KR/KR]; 인천광역시 연수구 송도동 더샵센트럴파크 I 103동 4202호, 406-743 Incheon (KR). 김판겸 (KIM, Pan Kyeom) [KR/KR]; 인천광역시 남동구 구월 2동 현대힐스테이트 1502-803, 405-761 Incheon (KR). 홍혜진 (HONG, Hye Jin) [KR/KR]; 서울특별시 마포구 도화동 353번지 현대홈타운 207동 601호, 121-773

Seoul (KR). 김성현 (KIM, Sung Hyun) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 128동 706호, 305-755 Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

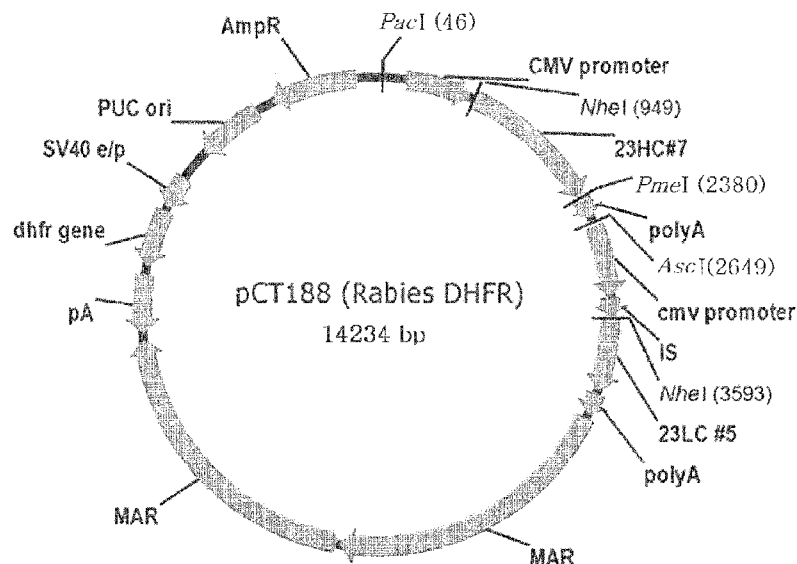
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BINDING MOLECULES CAPABLE OF NEUTRALIZING THE RABIES VIRUS, AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 광견병 바이러스를 중화시킬 수 있는 결합 분자

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to binding molecules capable of neutralizing the rabies virus. More particularly, the binding molecules of the present invention have the ability to neutralize the rabies virus derived from animals such as dogs, cows, mongooses, skunks, and wolves, and therefore may be effectively used in treating patients infected with the rabies virus derived from a wide variety of animals.

(57) 요약서: 본 발명은 광견병 바이러스를 중화시킬 수 있는 결합 분자에 관한 것으로, 더욱 상세하게 본 발명의 결합 분자는 개, 소, 몽구스, 박쥐, 스컹크 및 늑대와 같은 개체에서 유래한 광견병 바이러스를 대상으로 중화하는 능력을 가지고 있으므로, 광범위한 개체에서 유래한 광견병 바이러스에 감염된 환자를 치료하는데 유용하게 이용될 수 있다.



WO 2012/128508 A2



공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 광견병 바이러스를 중화시킬 수 있는 결합 분자

기술분야

- [1] 본 발명은 광견병 바이러스를 중화시킬 수 있는 결합 분자에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 광견병(rabies)은 바이러스성 인수공통 감염병이며, 주로 야생 및 애완 동물에 영향을 미칠 뿐 아니라 인간을 포함한 포유류에게 영향을 미쳐 급성 뇌 질환의 원인이 된다. 한 번 발생하면 거의 사망에 이르는 치명적인 질병으로, 에이즈와 더불어 치사율이 가장 높은 질병으로 알려져 있다. 이러한 광견병은 전세계적으로 퍼져 있으며, 매년 천만 명 이상이 감염 후 치료를 받으며 매년 40,000명에서 70,000명이 사망한다.
- [3] 광견병은 타액과 피로 전염되는데, 주로 광견병에 감염된 개 또는 고양이 등에 물리게 되면 발병한다. 또한 스컹크, 박쥐 등 대부분의 포유류에 의해 감염될 수 있다.
- [4] 광견병 바이러스(rabies virus)는 신체의 신경 조직을 통해 뇌신경 조직으로 도달한 뒤 실제 발병 증상을 나타낸다. 원래 인간의 뇌에는 혈액 내 장벽(blood brain barrier)이 존재하여 외부 물질을 차단하기 때문에 바이러스 등이 침투할 수 없으나, 광견병 바이러스는 RVG(rabies virus glycoprotein) 단백질을 통해 혈액 내 장벽을 통과하여 신경계(central nervous system) 뇌를 감염시킨다.
- [5] 초기에는 감기와 비슷한 증상 이외에, 물린 부위에 가려움증이나 열을 느낀다. 광견병이 진행되면서 불안감, 공수증(물 등의 액체를 삼키게 되면 근육이 경련을 일으키고 심한 통증을 느껴 물을 두려워하는 증상), 바람에 대한 두려움(바람이 감각 기관을 과민하게 함), 흥분, 마비, 정신 이상 등의 신경 이상 증상이 나타난다. 또한 햇빛에 과민 반응을 일으키기도 한다. 이러한 증상이 관찰된 수 2-7일 뒤에 전신의 신경이나 근육이 마비를 일으켜 혼수 상태에 빠지고, 호흡 장애로 사망하게 된다.
- [6] 광견병은 노출 후 예방은 즉각적인 국소 상처 보호 및 수동(항-광견병 이뮤노글로블린: 이하 "anti-rabies antibody"라 칭함) 및 능동(백신) 면역화의 투여를 통해 치료 및 예방될 수 있다.
- [7] 현재 개발된 anti-rabies antibody는 인간 유래 광견병 항체(human derived rabies immunoglobulin: 이하 "HRIG"라 칭함) 및 말 유래 광견병 항체(equine derived rabies immunoglobulin: 이하 "ERIG"라 칭함)가 있다. HRIG의 경우 원활한 공급이 어려우며, 가격이 고가이다. 또한 인간의 혈액에서 유래한 것으로 HIV 등의 감염 위험성이 높고, 다클론 항체(polyclonal antibody)여서 효능이 높지 않다. ERIG의

경우 말에서 유래하여 HRIG보다 치료 효율이 낮으며, 이로 인하여 HRIG보다 높은 용량으로 환자에게 투여된다. HRIG보다 저가이기는 하나 이 역시 원활한 공급이 되지 않고 있는 실정이며, 인간과는 다른 개체에서 유래한 항체임으로 과민증(anaphyaxis)가 올 수 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 노출 후 예방에서 광견병 바이러스를 중화시킬 수 있는 단일 항체(monoclonal antibody)의 사용이 제한되었다. 광견병-바이러스 중화 무린 단일 항체가 개발되었으나(Schumacher CL *et al.*, *J. Clin. Invest.* Vol. 84, p. 971-975, 1989), 짧은 혈청 반감기, 인간 이펙터 기능을 유도하는 능력 부재 및 인체에서 무린 항체에 대한 원치 않는 HAMA(human anti-mouse antibody) 반응이 유도되어 광견병에 감염된 인간 환자에 대한 직접적인 투여에는 제한되어 있다.

- [8] 이에 광견병 치료를 위하여 혈액에서 유래하지 않아 안정성이 높으며, 배양을 통한 합성으로 대규모 생산 공급이 가능하고, 균일한 품질 확보가 가능한 단일클론 항체의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자를 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 결합 분자에 하나 이상의 태그가 결합된 이뮤노컨쥬게이트를 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [13] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 발현 벡터가 형질전환된 세포주를 제공하는 것이다.
- [14] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 결합 분자를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 결합 분자를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [16] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 결합 분자를 이용한 광견병 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 결합 분자를 이용한 광견병 치료 및 예방 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 세포주를 배양하여 본 발명의 결합 분자를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [19] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 결합 분자를 이용한 광견병 바이러스 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [20] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자를 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자에 하나 이상의 태그가 결합된 이뮤노컨쥬게이트를 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현 벡터를 제공한다.
- [24] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 숙주 세포에 형질전환되어, 본 발명의 결합 분자를 생산하는 세포주를 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자 및 억제학적으로 허용가능한 부형제가 추가적으로 포함된 약학적 조성물을 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자 및 억제학적으로 허용가능한 부형제가 추가적으로 포함된 광견병 치료 및 예방용 조성물을 제공한다.
- [27] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자를 포함하는 광견병 진단용 키트를 제공한다.
- [28] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자를 포함하는 광견병 치료 및 예방용 키트를 제공한다.
- [29] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자를 이용한 광견병 진단 방법을 제공한다.
- [30] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자를 대상에게 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 광견병 치료 및 예방 방법을 제공한다.
- [31] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 세포주를 배양하여 본 발명의 결합 분자를 생산하는 방법을 제공한다.
- [32] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 결합 분자를 이용한 광견병 바이러스 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [33] 본 발명의 광견병 바이러스를 중화시킬 수 있는 결합 분자는, 다양한 광견병 바이러스를 대상으로 중화 능력을 보유하고 있음을 확인하였으므로, 광견병 바이러스에 감염된 환자를 대상으로 광견병 치료 및 예방에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [34] 도 1은 본 발명의 중쇄 및 경쇄 유전자를 포함하는 키메라 항체 발현 벡터를 도시한 것이다.
- [35] 도 2는 중국 개 광견병 바이러스(Rv342)를 이용한 in vivo 동물실험 결과를 도시한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 이하, 본 발명에서 사용되는 단어를 아래와 같이 정의한다.
- [37]
- [38] 본 발명에서 사용되는 "결합 분자"라는 용어는 키메라, 인간화 또는 인간

단일클론 항체와 같은 단일클론 항체를 포함하는 온전한(intact) 이뮤노글로블린(immunoglobulin), 또는 항원에 결합하는 이뮤노글로블린, 예를 들면 광견병 바이러스 또는 바이러스 외부의 G 단백질(Glycoprotein) 또는 그의 단편과의 결합을 위해 온전한(intact) 이뮤노글로블린과 경쟁하는 이뮤노글로블린 단편을 포함하는 가변성 도메인을 뜻한다. 구조와는 상관없이 항원-결합 단편은 온전한(intact) 이뮤노글로블린에 의해 인식된 동일한 항원과 결합된다. 항원-결합 단편은 결합 분자의 아미노산 서열의 2개 이상의 연속(contiguous) 아미노산 잔기, 20개 이상의 연속 아미노산 잔기, 25개 이상의 연속 아미노산 잔기, 30개 이상의 연속 아미노산 잔기, 35개 이상의 연속 아미노산 잔기, 40개 이상의 연속 아미노산 잔기, 50개 이상의 연속 아미노산 잔기, 60개 이상의 연속 아미노산 잔기, 70개 이상의 연속 아미노산 잔기, 80개 이상의 연속 아미노산 잔기, 90개 이상의 연속 아미노산 잔기, 100개 이상의 연속 아미노산 잔기, 125개 이상의 연속 아미노산 잔기, 150개 이상의 연속 아미노산 잔기, 175개 이상 연속 아미노산 잔기, 200개 이상의 연속 아미노산 잔기, 또는 250개 이상의 연속 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

- [39] 항원-결합 단편은 특히 Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단일-쇄 항체(scFv), 2가(bivalent) 단일-쇄 항체, 단일-쇄 파지 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), 폴리펩티드로의 특정 항원에 결합하기에 충분한 이뮤노글로블린의 하나 이상의 단편을 함유하는 폴리펩티드 등을 포함한다. 상기 단편은 합성으로 또는 완전한 이뮤노글로블린의 효소적 또는 화학적 분해에 의해 생성되거나, 재조합 DNA 기술에 의해 유전공학적으로 생성될 수 있다. 생성 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [40] 본 발명에서 사용되는 "약제학적으로 허용가능한 부형제"라는 용어는 용인가능한 또는 편리한 투약 형태를 제조하기 위한 약물, 제제 또는 결합 분자와 같은 활성 분자로 조합되는 불활성 물질을 의미한다. 약제학적으로 허용가능한 부형제는 비독성이거나, 적어도 독성이 사용된 용량 및 농도에서 수용자에게 이의 의도된 용도를 위해 허용될 수 있는 부형제이고, 약물, 제제 또는 결합 분제를 포함하는 제형화의 다른 성분과 양립할 수 있다.
- [41] 본 발명에서 사용되는 "치료학적으로 유용한 양"이라는 용어는 광견병 바이러스의 노출 전 또는 노출 후에 예방 또는 치료에 유효한 본 발명의 결합 분자의 양을 나타낸다.
- [42]
- [43] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [44]
- [45] 본 발명자들은 미국질병관리본부(Center for Disease Control: 이하 "CDC"라 칭함)에서 광범위한 광견병 바이러스에 중화 능력을 보인다고 검증된

하이브리도마 세포를 전달받아 이를 대상으로 마우스 타입 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 서열을 확보하였다. 이후 IgG1 백본(backbone)에 상기 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 연결하여 키메라 항체를 제조하였다. 이후 위와 같이 제조된 키메라 항체를 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 수행하여 다양한 광견병 바이러스를 대상으로 중화 능력 시험을 수행하였으며, 이를 통하여 본 발명의 단일클론 항체가 광범위한 개체에서 유래된 광견병 바이러스에 감염된 환자를 치료하는데 유용하게 이용될 수 있음이 확인되었다.

[46]

[47] 이에, 본 발명은 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자를 제공한다.

[48] 본 발명에 있어서, 상기 결합 분자는 서열번호 27로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 28로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 29로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR3 영역을 가지는 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[49] 또한 본 발명에 있어서, 상기 결합 분자는 서열번호 30으로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 31로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 32로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR3 영역을 가지는 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[50] 또한 본 발명에 있어서, 상기 결합 분자는 서열번호 27로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 28로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 29로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR3 영역을 가지는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 30으로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 31로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 32로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR3 영역을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 결합 분자는 Fab 절편, Fv 절편, 디아바디(diabody), 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인 것을 특징으로 한다.

[51] 또한 본 발명에 있어서, 상기 결합 분자는 서열번호 35로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[52] 또한 본 발명에 있어서, 상기 결합 분자는 서열번호 36으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[53] 또한 본 발명에 있어서, 상기 결합 분자는 서열번호 35로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 36으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 결합 분자는 Fab 절편, Fv 절편, 디아바디(diabody), 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인 것을 특징으로 한다.

[54] 또한 본 발명에 있어서, 상기 결합 분자는 서열번호 35로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역 및 서열번호 37로 기재되는 폴리펩티드 서열을

포함하는 불변 영역을 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[55] 또한 본 발명에 있어서, 상기 결합 분자는 서열번호 36으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역 및 서열번호 38로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 불변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[56] 또한 본 발명에 있어서, 상기 결합 분자는 서열번호 35로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역 및 서열번호 37로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 불변 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 36으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역 및 서열번호 38로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 불변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[57]

[58] 본 발명에 있어서, 가변영역의 CDR은 Kabat 등에 의해 고안된 시스템에 따라 통상적인 방법으로 결정되었다(문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th), National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 본 발명에 사용된 CDR 결정은 Kabat 방법을 사용했지만, 이외에 IMGT 방법, Chothia 방법, AbM 방법 등 다른 방법에 따라 결정된 CDR을 포함하는 결합분자도 본 발명에 포함된다.

[59]

[60] 본 발명의 상기 결합 분자는 항체인 것을 특징으로 한다.

[61] 또한 상기 광견병 바이러스는 개, 소, 몽구스, 박쥐, 스컹크 및 늑대로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 개체에서 유래된 것을 특징으로 한다.

[62]

[63] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자에 하나 이상의 태그가 결합된 이뮤노컨쥬게이트를 제공한다.

[64]

[65] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.

[66] 본 발명의 핵산 분자는 본 발명에서 제공하는 항체의 아미노산 서열을 당업자에게 알려진 바와 같이 폴리뉴클레오티드 서열로 번역된 핵산 분자 모두를 포함한다. 그러므로 ORF(open reading frame)에 의한 다양한 폴리뉴클레오티드 서열이 제조될 수 있으며 이 또한 모두 본 발명의 핵산 분자에 포함된다.

[67]

[68] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자를 암호화하는 핵산 분자가 삽입된 발현 벡터를 제공한다.

[69] 상기 발현 벡터로는 셀트리온 고유의 발현 벡터인 MarEx 벡터(특허출원 10-2006-0020723 참조) 및 상업적으로 널리 사용되는 pCDNA 벡터, F, R1, RP1, Col, pBR322, ToL, Ti 벡터; 코스미드; 람다, 람다이드(lambdoid), M13, Mu, p1 P22, Q μ , T-even, T2, T3, T7 등의 파아지; 식물 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나에서 선택된 발현 벡터를 이용하는 것이 바람직하나 이에

한정되는 것은 아니며, 당업자에게 발현 벡터로 알려진 모든 발현 벡터는 본 발명에 사용 가능하며, 발현 벡터를 선택할 때에는 목적으로 하는 숙주 세포의 성질에 따른다. 숙주세포로의 벡터 도입시 인산칼슘 트랜스펙션, 바이러스 감염, DEAE-덱스트란 조절 트랜스펙션, 리포펙타민 트랜스펙션 또는 전기천공법에 의해 수행될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며 당업자는 사용하는 발현 벡터 및 숙주 세포에 알맞은 도입 방법을 선택하여 이용할 수 있다. 바람직하게 벡터는 하나 이상의 선별 마커를 함유하나 이에 한정되지 않으며, 선별 마커를 포함하지 않은 벡터를 이용하여 생산물 생산 여부에 따라 선별이 가능하다. 선별 마커의 선택은 목적하는 숙주 세포에 의해 선별되며, 이는 이미 당업자에게 알려진 방법을 이용하므로 본 발명은 이에 제한을 두지 않는다.

[70] 본 발명의 핵산 분자를 정제를 용이하게 하기 위하여 태그 서열을 발현 벡터 상에 삽입하여 융합시킬 수 있다. 상기 태그로는 헥사-히스티딘 태그, 헤마글루티닌 태그, myc 태그 또는 flag 태그를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니며 당업자에게 알려진 정제를 용이하게 하는 태그는 모두 본 발명에서 이용 가능하다.

[71]

[72] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 숙주 세포에 형질전환되어, 본 발명의 결합 분자를 생산하는 세포주를 제공한다.

[73] 본 발명에 있어서, 상기 세포주는 포유동물, 식물, 곤충, 균류 또는 세포성 기원의 세포를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 상기 포유동물 세포로는 CHO 세포, F2N 세포, CSO 세포, BHK 세포, 마우스(Bowes) 흑색종 세포, HeLa 세포, 911 세포, AT1080 세포, A549 세포, HEK 293 세포 및 HEK293T 세포로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 숙주 세포로 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 당업자에게 알려진 포유동물 숙주세포로 사용 가능한 세포는 모두 이용 가능하다.

[74]

[75] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자 및 약제학적으로 허용가능한 부형제가 추가적으로 포함된 약학적 조성물을 제공한다.

[76] 본 발명의 조성물은 광견병 바이러스 중화 능력을 가지는 결합 분자 이외에 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 당업자에게 이미 잘 알려져 있다.

[77] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자 및 약제학적으로 허용가능한 부형제가 추가적으로 포함된 광견병 치료 및 예방용 조성물을 제공한다.

[78] 본 발명의 조성물은 본 발명의 광견병 바이러스 중화 능력 가지는 결합 분자 이외에 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 당업자에게 이미 잘 알려져 있다.

[79] 또한 본 발명의 예방 및 치료용 조성물은 적어도 5개의 다른 광견병 치료제를 포함할 수 있으며, 또한 여러 종류의 단일클론 항체를 포함할 수 있으며, 이를

통해 중화 활성에 상승 작용을 나타낼 수 있다.

- [80] 아울러 본 발명의 예방 및 치료용 조성물을 추가로 적어도 하나의 다른 치료제 또는 진단제를 포함할 수 있다. 상기 치료제로는 항-바이러스 약제를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 약제로는 항체, 소분자, 유기 또는 무기 화합물, 효소, 폴리뉴클레오티드 서열, 항-바이러스성 펩티드 등일 수 있다.
- [81] 본 발명의 예방 및 치료용 조성물은 제조 및 저장 조건하에서 무균하고 안정하며, 전달시 또는 전달 전에 적절한 약제학적으로 허용 가능한 부형제 중에 재구성을 위해 분말 형태로 존재할 수 있다. 살균성 주사용액 제조를 위한 살균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 구성성분의 분말과 이의 미리 살균-여과된 용액으로부터 추가의 원하는 구성성분을 생산하는 진공 건조 및 동결 건조이다. 본 발명의 조성물은 용액 상태일 수 있고, 적절한 약제학적으로 허용 가능한 부형제가 단위 투여량 주사형을 제공하기 위해 전달되기 전 또는 전달 시에 첨가 및/또는 혼합될 수 있다. 바람직하게 본 발명에 사용되는 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 고 약물농도에 알맞고, 알맞은 흐름성을 유지할 수 있고, 필요에 따라 흡수가 지연될 수 있다.
- [82] 본 발명의 예방 및 치료용 조성물 투여의 최적 경로 선택은 조성물 내의 활성 분자들의 물리-화학적 특성, 임상적 상황의 긴급성 및 원하는 치료용 효과에 대한 활성 분자의 플라즈마 농도의 관계를 포함하는 여러 인자들에 의해 영향을 받는다. 예를 들어 본 발명의 단일클론 항체는 임플란트 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는, 조절된 방출 제형과 같은 그들의 신속한 방출을 막은 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 다가무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 폴리머가 본 발명에 사용될 수 있다. 또한 단일클론 항체는 항체의 불활성화를 막은 물질 또는 화합물로 코팅되거나 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 단일클론 항체는 적합한 담체-리포솜 또는 희석제와 함께 투여될 수 있다.
- [83] 본 발명의 예방 및 치료용 조성물의 투여 방법은 경구 및 비경구로 나눌 수 있으며, 바람직한 투여 경로는 정맥 내이나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [84] 상기 경구 형태로는 정제, 트로키제, 약용 드롭스제, 수성 또는 유성 현탁제, 산제 또는 분산과립제, 에멀전제, 강성 캡슐제, 연성 젤라틴 캡슐제, 시럽제 또는 엘릭서제, 필제, 당의정, 액제, 겔제 또는 슬러리제로서 제제화될 수 있다. 이들 제형은 불활성 희석제, 과립화 또는 봉해제, 결합제, 광택제, 보존제, 착색제, 풍미제 또는 감미제, 식물성유 또는 미네랄유, 습윤제 및 점증제를 함유하는 약제학적 부형제를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [85] 상기 비경구 형태로는 수성 또는 비수성 등장성 살균 비독성 주사 또는 주입 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 용액 또는 현탁액은 적용된 투여량 및 농도에서 수용체에 비독성인 1,3-부탄디올, 링거스 용액, 행크스 용액, 등장성 염화나트륨 용액과 같은 약제, 오일, 지방산, 국소마취제, 보존제, 완충액, 점도 또는 용해도 증가제, 수용성 항산화제, 유용성 항산화제 및 금속 킬레이트화제를

포함할 수 있다.

[86]

[87] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 상기 결합 분자를 포함하는 광견병 진단용 키트를 제공한다: 1) 본 발명의 광견병 바이러스 중화 능력을 가진 결합 분자; 및 2) 용기.

[88]

[89] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 상기 결합 분자를 포함하는 광견병 치료 및 예방용 키트를 제공한다: 1) 본 발명의 광견병 바이러스 중화 능력을 가진 결합 분자; 및 2) 용기.

[90]

[91] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 상기 결합 분자를 이용한 광견병 진단 방법을 제공한다: 1) 대상의 시료와 본 발명의 광견병 바이러스 중화 능력을 가진 결합 분자를 접촉시키는 단계; 및 2) 상기 단계 1)의 결과를 분석하여 광견병 감염 여부를 판별하는 단계.

[92]

[93] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 상기 결합 분자를 대상에게 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 광견병 치료 및 예방 방법을 제공한다: 광견병에 감염되었다고 확인된 대상에게 광견병 바이러스 중화 능력을 가진 결합 분자를 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계.

[94]

[95] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자를 생산하는 방법을 제공한다: 1) 상기 세포주를 배양하는 단계; 및 2) 발현된 결합 분자를 회수하는 단계.

[96]

[97] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 광견병 바이러스를 검출하는 방법을 제공한다: 1) 대상의 시료와 본 발명의 광견병 바이러스 중화 능력을 가진 결합 분자를 접촉시키는 단계; 및 2) 상기 결합 분자가 대상 시료에 특이적으로 결합하는지 측정하는 단계.

[98]

대상의 시료는 (잠재적) 감염 대상으로부터의 혈액, 혈청, 조직 또는 다른 생물학적 물질을 포함하지만, 이것에 한정되지는 않는 생물학적 샘플일 수 있다. (잠재적) 감염 대상은 인간 대상일 수 있지만, 또한 광견병 바이러스의 담체로서 의심되는 동물들일 수 있다. 대상 시료는 먼저 그것을 검출 방법에 더 적절하게 만들기 위해 조작될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 분자 또는 이뮤노컨쥬게이트는 결합 분자와 광견병 바이러스 또는 대상 시료에 존재하는 그것의 항원성 성분 사이의 면역학적 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에서 대상 시료와 접촉된다. 대상 시료 내의 광견병 바이러스의 존재를 나타내는 면역학적 복합체의 형성은 적절한 수단에 의해 검출되고 측정된다. 이러한 방법으로 방사면역측정법(RIA), ELISA, 면역형광법, 면역 조직 화학, FACS,

BIACORE, 웨스턴 블롯 분석과 같은 면역분석이 있지만, 이것에 한정되는 것은 아니다.

[99]

[100] 이하 본 발명을 실시예에 따라 상세히 설명한다. 하기의 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명이 이들에 한정되는 것은 아니다.

[101]

[102] <실시예>

[103]

[104] **실시예 1: 하이브리도마(hybridoma) 세포 선별**

[105] 미국질병관리본부(Center for Disease Control: 이하 "CDC"라 칭함)에서 보관중인 하이브리도마 세포에 대한 이전 실험 및 기록에 의거하여 약 10여 개의 하이브리도마 세포를 선별한 후, 각 클론들의 배양배지에서의 Fab 타이터(titer)를 RFFIT(Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test)(Smith, J. S. et al., *Geneva: World Health Organization*, pp.181-191, 1996; 및 centers for Disease Control and Prevention, *Morb. Mortal. Weekly Rep.* 49(RR-1), 1-21, 1999) 방법으로 측정하였으며, 그 결과는 표 1에 기재하였다. 그 결과 이 중에서 일정수준 이상(0.7 IU/ml)의 클론들을 선별하였으며, 클론들의 이름은 다음과 같다: #62-62-5, #62-62-6, #2-21-8, #2-21-14 및 #2-21-23.

[106]

[107] 표 1

[Table 1]

클론 타이터 조사 결과

Sample ID	아이소타입(Isotype)	타이터(Titer)
62-111-1	IgG2a	0.03
62-105-06	Undetermined	0.03
62-62-5	IgG2a	0.7
62-80-6	IgG2b	0.7
2-21-20	IgG2a	0.1
62-28-5	IgG2a	0.03
62-114-6	IgG3	0.03
2-21-23	IgG2a	83
2-21-8	IgG2a	150
2-21-14	IgG2a	17.8
62-139-2	IgG1	0.03
2-21-17	Undetermined	0.03

[108]

[109] 이 중에서 선별된 하이브리도마 세포로부터 정제하여 단일클론 항체를 수득한 후 타이터 관련 실험으로 RFFIT를 수행하였다.

[110]

[111] 표 2

[Table 2]

정제된 클론을 이용한 RFFIT 결과

항체명 (항체 농도)	타이터	IU/ml	IU/mg
2-21-8 (3.5 mg/mL)	13500	158.82	45.4
62-80-6 (3.58 mg/mL)	60	0.71	0.2
2-21-23 (4.9 mg/mL)	7500	88.24	18.0
2-21-14 (1.9 mg/mL)	1900	22.35	11.7

[112]

[113] 표 2의 4개의 클론들을 상대로 미국 CDC에서 보관 중인 전 세계 광견병 바이러스에 대한 RFFIT를 수행하였다. 미국 CDC에서는 전 세계의 약 50 여종에 해당하는 광견병 바이러스를 보유하고 있으며, 바이러스의 리스트는 아래 표 3과 같다.

[114]

[115] 표 3

[Table 3]

미국 CDC 보유 광견병 바이러스 리스트

No.	광견병 바이러스 종류	기원
1	CVS-11	-
2	Mongoose RSA	Mongoose, South Africa
3	CASK	Skunk, California, USA
4	Dog Tun	Dog, Tunisia
5	dog gab	Dog, Gabon
6	TXXF	Gray fox, TX
7	Dog thai	Dog, Thailand
8	Dong son	Dog, Mexico
9	Phi 002	Human/dog, Philippines
10	DR MX	Bat, Mexico
11	DR Brazil	Bat, Brazil
12	phi dog	Human/dog, Philippines
13	WA Bat	Bat, Washington, USA
14	3860 Bat	Bat, California, USA
15	Dog Arg	Dog, Argentina
16	TX SK	Skunk, Texas, USA
17	RAC	Raccoon, Georgia, USA
18	China 2005	Dog, China
19	Rv342 China	Cow/dog, China
20	TX Coyote	Coyote, Texas, USA
21	rv61	Human (ex dog), United Kingdom(ex India)
22	AL Bat	Bat, California, USA
23	LC NY	Bat, New York, USA
24	Bat Ef	Bat, Pennsylvania, USA
25	C1434	Bat, Alabama, USA
26	ABV (SM 4476)	Australia Bat Virus
27	Wu ABLV	Australia Bat Lyssa Virus
28	AZ Bat	Bat , Arizona

29	VA 399	Bat, Virginia, USA
30	TN 410	Bat, Tennessee, USA
31	TN 132	Bat, Tennessee, USA
32	SK 4384	Skunk, Texas, USA
33	AK FX	Arctic Fox, Alaska, USA
34	857r	Raccoon dog, Russia, Far East
35	I-148	Dog, India
36	Mongoose PR	Mongoose, Puerto-Rico
37	Gray FX-AZ	Gray Fox, Arizona, USA
38	NC SK	Skunk, Wisconsin, USA
39	323R	Dog / Coyote, Texas, USA
40	RVHN	Human (ex wolf), Russia, Arctic
41	MI1625	Bat, Tennessee, USA
42	I-151	Dog, India
43	TN-269	Bat, Tennessee, USA
44	Sri Lanka	Cow, Sri Lanka
45	Myotis	Bat, Washington, USA

[116] 그 결과, 표 3에 기재된 광견병 바이러스에 대하여 각 클론들의 RFFIT 결과값을 아래 표 4에 기재하였다. 수치가 높을수록 높은 중화효능을 나타낸다.

[117]

[118] 표 4

[Table 4]

미국 CDC에서 수행된 RFFIT 결과

N o	광견병 바이러스 종류	SRIG	2-21-8(IU/mg)	62-80-6(IU/ mg)	2-21-23(IU/m g)	2-21-14(IU/m g)
1	CVS-11	170	13500(45.4)	60(0.2)	7500(18.0)	1900(11.8)
2	Mongoose RSA	33	1300(22.5)	45(0.8)	1200(14.8)	250(8.0)
3	CASK	250	110(0.3)	625(1.4)	15625(25.5)	2400(10.1)
4	Tunissia dog	1100	42724(22.2)	1800(0.9)	42724(15.9)	38206(36.6)
5	Gabon dog	1000	10000(5.7)	60(0)	10000(4.1)	1500(1.6)
6	TXFX	250	24747(56.6)	2700(6.0)	113263(184.9)	5700(24.0)
7	THAI DOG	85	15625(105.0)	125(0.8)	9500(45.6)	1100(13.6)
8	Sonora dog	230	24747(61.5)	480(1.2)	34800(61.8)	7500(34.3)
9	002 Philippines	320	49326(88.1)	75(0.1)	40269(51.4)	5100(16.8)
10	DR MX	270	49326(104.4)	16(0)	6800(10.3)	1200(4.7)
11	DR Brazil	250	12000(27.4)	440(1.0)	12000(19.6)	1400(5.9)
12	Dog Phi	70	700057.1)	125(1.0)	7000(40.8)	1300(19.5)
13	WA Bat	250	142857(326.5)	440(1.0)	151565(247.5)	78124(328.9)
14	3860 CA Bat	250	17(0)	3125(7)	<5(0)	7(0)
15	Dog Arg	230	174692(434.0)	1500(3.6)	34800(61.8)	6000(27.5)
16	TX SK	250	174692(399.3)	<5(0)	151565(247.5)	8000(33.7)
17	RAC	250	5400(12.3)	14(0)	5400(8.8)	800(3.4)

18	China 2005	1400	53887(22.0)	8000(3.2)	59744(17.4)	42724(32.1)
19	Rv342 China	290	9500(18.1)	60(0.1)	8000(11.3)	10000(36.3)
20	TX Coyote	250	38206(87.3)	1600(3.6)	40269(65.7)	5100(21.5)
21	rv61	170	230(0.8)	xxx	200(0.5)	xxx
22	AL Bat	170	170(0.6)	xxx	170(0.4)	xxx
23	LC NY	170	3125(10.5)	xxx	3125(7.5)	xxx
24	Bat Ef	170	170(0.6)	xxx	170(0.4)	xxx
25	C1434	170	210(0.7)	xxx	230(0.6)	xxx
26	ABV (SM 4476)	145	125(0.5)	xxx	210(0.6)	xxx
27	Wu ABLV	320	390(0.7)	xxx	320(0.4)	xxx
28	AZ Bat	100	<5(0)	xxx	9(0)	xxx
29	VA 399	100	<5(0)	xxx	<5(0)	xxx
30	TN 410	100	20432(116.8)	xxx	<5(0)	xxx
31	TN 132	100	<5(0)	xxx	<5(0)	xxx
32	SK 4384	230	70(0.2)	<5(0)	1900(3.4)	xxx
33	AK FX	230	xxx	60(0.1)	9500(16.9)	xxx
34	857r	180	250(0.8)	1600(5.0)	18086(41.0)	xxx

35	I-148	145	210(0.8)	12(0)	40269(113.4)	3600(26.1)
36	Mong PR	180	15625(49.6)	320(1.0)	174692(396.1)	xxx
37	Gray FX-AZ	180	170(0.5)	xxx	1500(3.4)	xxx
38	NC SK	180	1000(3.2)	xxx	13500(30.6)	xxx
39	323R	230	xxx	xxx	8500(15.1)	xxx
40	RVHN	250	xxx	>11(0)	>11(0)	xxx
41	MI 1625	250	xxx	133591(298.5)	250(0.4)	xxx
42	I-151	145	210(0.8)	<5(0)	38206(107.5)	1600(11.6)
43	TN 269	145	17(0.1)	<5(0)	13(0)	<5(0)
44	Sri Lanka	145	95(0.4)	<5(0)	75(0.2)	xxx
45	Myotis	145	54(0.2)	xxx	50(0.1)	xxx

[119] (SRIG: Standard Rabies ImmunoGlobulin)

[120] (xxx: 수행하지 않음)

[121]

[122] 이 중에서 2-21-23 클론이 전반적으로 높은 효능을 보여, 셀트리온으로 전달되었으며, 위의 2-21-23 클론의 가변영역과 인간타입 항체의 불변영역을 이용하여 키메라 단일클론 항체를 제조하였다.

[123]

[124] 실시예 2: 하이브리도마 세포(hybridoma cell)가 분비하는 키메라 항체(chimeric 항체)에 대한 cDNA 확보

[125] 실시예 2-1: 세포 배양

[126] 미국 CDC로부터 하이브리도마 세포 #2-21-8, 2-21-14, 2-21-23, 62-80-6이 입고되었으며, 위의 세포들을 5% 소태아 혈청(FBS; Sigma, 12003C)이 첨가된 IMDM 배지(Invitrogen 12440-053)에서 배양하였다. 배양기간 동안, Mycoplasma

PCR ELISA kit(Roche, 11663925910)를 이용하여, mycoplasma 오염 여부를 조사하였으며, 배양액에 mycoplasma가 없음을 확인하였다.

[127]

[128] 실시예 2-2: 하이브리도마 세포가 분비하는 마우스 타입 항체의 중쇄와 경쇄 가변영역 DNA 확보

[129] 배양 중인 하이브리도마 #2-21-23에서 RNeasy plus mini kit(Qiagen, 74134)를 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. 분리한 1 μ g의 전체 RNA를 주형(template)으로 SMARTer PCR cDNA synthesis kit(Clontech, 634925)를 사용하여, 역전사 반응(reverse transcription)과 5' 및 3' 고속 cDNA 말단 증폭 중합효소 연쇄반응(5' and 3' RACE PCR; Rapid Amplification of cDNA Ends Polymerase Chain Reaction)를 동시에 진행함으로써, 5'와 3' 말단에 특정 서열을 가지는 cDNA library를 합성하였다. cDNA library 합성 반응 조건은 아래와 같다. 먼저, 1 μ g의 전체 RNA를 3' SMART CDS Primer II A(5' - AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CT(30)N-1N-3': 서열번호 1)와 혼합한 후, 72°C에서 3분 및 42°C에서 2분 반응을 하였다. 그 후, SMARTer II A Oligonucleotide(5'- AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA -3': 서열번호 2)와 역전사 효소를 첨가하여 혼합하고, 42°C에서 60 분, 70°C에서 10분의 역전사 반응을 수행함으로써, 5' 말단과 3' 말단에 특정 서열을 가지는 first strand cDNA를 합성하였다. First strand cDNA를 주형으로, 5' PCR Primer II A(5' - AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT -3': 서열번호 3)를 이용하여 95°C에서 1분 열 변성 후, 95°C에서 15초, 65°C에서 30초 그리고 68°C에서 30초 조건으로 30회 반복하는 중합효소 연쇄반응을 통해, 5'과 3' 말단에 특정 서열을 가지는 cDNA library를 최종 합성 및 증폭하였다.

[130] 합성된 cDNA library에서 하이브리도마 세포가 분비하는 마우스(mouse) 타입 항체의 가변영역에 대한 특이적인 cDNA를 증폭하기 위하여, Advantage2 PCR Kit (Clontec, 639207)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 진행하였다. 사용한 센스 프라이머(sense primer)는 앞서 사용한 SMARTer PCR cDNA synthesis kit에 포함되어 있는 primer로서, cDNA의 5' 말단의 특정 서열과 일치하는 5' PCR primer II A(5'- AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT -3': 서열번호 3)이다. 중쇄의 경우, 안티센스 프라이머는 IgG2a의 중쇄 불변영역에 특이적인 서열을 대상으로 하는 서열(5'- GCC AGT GGA TAG AGC GAT G -3': 서열번호 4)을 사용하였으며, 경쇄의 경우, k 사슬 또는 λ 사슬의 불변영역에 특이적인 서열을 대상으로 각각 서열 5'- GTG GGA AGA TGG AGA CAG TTG -3'(서열번호 5)와 5'- GGA CAG TCA GTT TGG -3'(서열번호 6)을 사용하였다. 이들 프라이머를 이용하여, 95°C 1분 열 변성 후 95°C에서 30초, 68°C에서 1분 조건으로 30회 반복하는 중합효소 연쇄반응을 통해, 하이브리도마 세포 #2-21-23이 발현하는 항체에 대한 가변영역 전체를 포함하는 cDNA 단편을 확보하였다. 중쇄와 경쇄 각각의 가변영역 전체를 포함하는 cDNA 단편을 TOPO TA cloning kit(Invitrogen, K4500)에 있는 TA 벡터에 클로닝한 후, 염기서열을 분석하였다. 염기서열

분석결과, 중쇄의 경우, 한 개의 아미노산이 다른 3 가지의 IgG2a 감마 사슬(gamma chain) 가변영역 DNA 서열을 확보하였다. 이 경우, 가변영역에 대한 cDNA 단편을 확보하기 위한 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) 과정에서의 돌연변이 (mutation)에 의해, 1가지가 아닌 3가지의 중쇄 가변영역이 확보된 것으로 생각한다. 그리고 경쇄의 경우는 1개의 카파 사슬(kappa chain) 대한 가변영역 DNA 서열을 확보하였다.

[131]

[132] 실시예 2-3: 키메릭 항체(chimeric antibody)를 암호화 하는 중쇄와 경쇄 cDNA 제작

[133] 중첩 중합효소 연쇄반응(overlapping PCR)을 이용하여, 마우스 타입 항체 사슬의 가변영역 DNA 서열을 인간 타입(human type) 항체의 불변영역에 연결하여 키메릭 항체를 제작하였다. 먼저 중첩 중합효소 연쇄반응을 진행하기 위하여, 표 5에 기재된 프라이머를 이용하여, 95°C에서 5분 열 변성 후, 95°C에서 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 35회 반복하여, 마우스 타입의 경쇄(카파 사슬)와 중쇄(감마 사슬) 가변영역에 대한 중합효소 연쇄반응 산물과 인간 타입의 경쇄(카파 사슬)와 중쇄(감마 사슬) 불변영역에 대한 중합효소 연쇄반응 산물을 확보하였다. 이후 가변영역과 불변영역의 중합효소 연쇄반응 산물을 주형으로 하고, HC F1과 HC R2 프라이머를 이용하여, 앞서 언급한 것과 같은 조건으로 PCR을 진행하여 가변영역과 불변영역이 연결된 중쇄를 확보하였다. 경쇄의 경우도 LC F1과 LC R2 프라이머를 이용하여 같은 방식으로 중합효소 연쇄반응을 진행하여 가변영역과 불변영역이 연결된 경쇄를 확보하였다. 최종적으로 확보된 중쇄와 경쇄 각각을 PCR2.1 TA 클로닝 벡터에 클로닝하였다. 클로닝 후 후, 염기서열 분석에 의해, 중첩 중합효소 연쇄반응 과정에서 돌연변이(mutation)가 발생하지 않았음을 확인하였다.

[134]

[135] 표 5

[Table 5]

프라이머 정보

Primer 명칭	설명	염기 서열
HC F1	마우스 타입 중쇄의 가변영역에 대한 센스 프라이머	5'- GCT AGC GCC ACC ATG AGA GTG CTG ATT CTT TTG TGC -3'(서열번호 7)
HC R1	마우스 타입 중쇄의 가변영역에 대한 안티센스 프라이머	5'- TGG TGG AGG CTG AGG AGA CGG TGA CTG AGG-3'(서열번호 8)
HC F2	인간 타입 중쇄의 불변영역에 대한 센스 프라이머	5'- CAC CGT CTC CTC AGC CTC CAC CAA GGG CCC -3'(서열번호 9)
HC R2	인간 타입 중쇄의 불변영역에 대한 안티센스 프라이머	5'- GTT TAA ACG TGT CAT TTA CCC GGA GAC AGG GAG A -3'(서열번호 10)
LC F1	마우스 타입 경쇄의 가변영역에 대한 센스 프라이머	5'- GCT AGC GCC ACC ATG GAT TCA CAG GCC CAG GT -3'(서열번호 11)
LC R1	마우스 타입 경쇄의 가변영역에 대한 안티센스 프라이머	5'- GCA GCC ACA GTT CGT TTT ATT TCC AGC TTG GTC CCC -4'(서열번호 12)
LC F2	인간 타입 경쇄의 불변영역에 대한 센스 프라이머	5'- GGA AAT AAA ACG AAC TGT GGC TGC ACC ATC -3'(서열번호 13)
LC R2	인간 타입 경쇄의 불변영역에 대한 안티센스 프라이머	5'- AGG GAT ATC GCG CGC TAA CAC TCT CCC CTG TTG AAG CTC -3'(서열번호 14)

[136]

[137] 실시예 2-4: 키메라 항체 발현 벡터 제작

[138] 확보된 중쇄와 경쇄를 포함하는 PCR2.1 TA 클로닝 벡터에 제한효소 *Nhe* I과 *Pme* I을 처리하여 중쇄 유전자와 경쇄 유전자를 확보한 후, 확보된 중쇄 유전자와 경쇄 유전자를 각각 동일한 제한효소로 처리된 pCT145 벡터와 pCT147 벡터에 삽입하였다. pCT145 및 pCT147 벡터는 각각 항체의 중쇄와 경쇄를 클로닝하기 위해 제작된 셀트리온 고유의 벡터이다. 이후, 중쇄 전사단위(프로모터-중쇄 유전자-폴리에이)와 경쇄 전사단위(프로모터-경쇄

유전자-폴리에이))를 같이 포함하는 발현 벡터를 제작하기 위하여, 중쇄 유전자를 포함하는 pCT145 벡터에 제한효소 *Pac* I과 *Asc* I을 처리하여 중쇄 전사단위를 확보한 다음, 경쇄 유전자를 포함하는 pCT147 벡터에 동일한 제한효소를 처리하여 중쇄 전사단위를 삽입하였다. 이후 제한효소를 이용하여, 중쇄 전사단위와 경쇄 전사단위를 동시에 포함하는 벡터를 선별하여 pCT188로 명명하였다(도 1 참조). 선별된 벡터는 Endofree plasmid maxi kit(QIAGEN, Germany, 12362)를 이용하여 추출되었으며, 추출된 DNA 중 일부를 이용하여 염기서열 분석을 통해 최종적으로 항체의 염기서열을 확인하였다. 확인된 서열은 아래 표 6과 같다.

[139]

[140] 표 6

[Table 6]

마우스 타입 단일클론 항체 서열 정보

서열 종류	서열
중쇄 가변영역 CDR1 폴리뉴클레오티드	AGTGATCATAGCTGGCAC(서열번호 15)
중쇄 가변영역 CDR2 폴리뉴클레오티드	TACATACACTACGATGGTAGCACTGACTACAACCC ATCTCTCAAAAGT (서열번호 16)
중쇄 가변영역 CDR3 폴리뉴클레오티드	GAAACGATCTACTATGGTAACCCCTATGGTATGGA CTAC (서열번호 17)
경쇄 가변영역 CDR1 폴리뉴클레오티드	AAATCCAGTCAGAGTCTGTTCAACAGTGGAACCCG AAAGAACTACTTGGCT (서열번호 18)
경쇄 가변영역 CDR2 폴리뉴클레오티드	TGGGCATCCACTAGGGAATCT (서열번호 19)
경쇄 가변영역 CDR3 폴리뉴클레오티드	AAGCAATCTTATAATCTGTACACG (서열번호 20)
중쇄 가변영역 #1 폴리뉴클레오티드	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGT GAAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACTGT CACTGGCTACTCCGTCACCAAGTGATCATAGCTGGC ACTGGATCCGGCAGTTTCCAGAAAACAACTGGAA TGGATGGGCTACATACACTACGATGGTAGCACTGA CTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTTTATCAC TCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGT TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATAT TACTGTGCAAGAGAAACGATCTACTATGGTAACCC CTATGGTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAG TCACCGTCTCCTCA(서열번호 21)
중쇄 가변영역 #6 폴리뉴클레오티드	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGT GAAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACTGT CACTGGCTACTCCGTCACCAAGTGATCATAGCTGGC ACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAA TGGATGGGCTACATACACTACGATGGTAGCACTGA CTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTTTATCAC TCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGT

	TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATAT TACTGTGCAAGAGAAACGATCTACTATGGTAACCC CTATGGTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAG TCACCGTCTCCTCA(서열번호 22)
중쇄 가변영역 #7 폴리뉴클레오티드	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGT GAAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACTGT CACTGGCTACTCCGTCACCAGTGATCATAGCTGGC ACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAA TGGATGGGCTACATACTACGATGGTAGCACTGA CTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTTTGTCAC TCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGT TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATAT TACTGTGCAAGAGAAACGATCTACTATGGTAACCC CTATGGTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAG TCACCGTCTCCTCA(서열번호 23)
경쇄 가변영역 폴리뉴클레오티드	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCGCCCTCCCTGGCT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCA AATCCAGTCAGAGTCTGTTCAACAGTGGAACCCGA AAGAACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGG GCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCA CTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCTCCATCAG CAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT GCAAGCAATCTTATAATCTGTACACGTTCCGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAA(서열번호 24)
중쇄 가변영역 CDR1 폴리펩티드	SDHSWH (서열번호 27)
중쇄 가변영역 CDR2 폴리펩티드	YIHYDGSTDYNPSLKS (서열번호 28)
중쇄 가변영역 CDR3 폴리펩티드	ETIYYGNPYGMDY (서열번호 29)
경쇄 가변영역 CDR1 폴리펩티드	KSSQSLFNSGTRKNYLA (서열번호 30)
경쇄 가변영역 CDR2 폴리펩티드	WASTRES (서열번호 31)
경쇄 가변영역 CDR3	KQSYNLYT (서열번호 32)

폴리펩티드	
중쇄 가변영역 #1 폴리펩티드	DVQLQESGPDLVKPSQSLTCTVTGYSVTS D H S W H WIRQFPENKLEWMGYIH Y D G S T D Y N P S L K S R I F I T R D T S K N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A R E T I Y Y G N P Y G M D Y W G Q G T S V T V S S (서열번호 33)
중쇄 가변영역 #6 폴리펩티드	DVQLQESGPDLVKPSQSLTCTVTGYSVTS D H S W H WIRQFPGNKLEWMGYIH Y D G S T D Y N P S L K S R I F I T R D T S K N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A R E T I Y Y G N P Y G M D Y W G Q G T S V T V S S (서열번호 34)
중쇄 가변영역 #7 폴리펩티드	DVQLQESGPDLVKPSQSLTCTVTGYSVTS D H S W H WIRQFPGNKLEWMGYIH Y D G S T D Y N P S L K S R I F V T R D T S K N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A R E T I Y Y G N P Y G M D Y W G Q G T S V T V S S (서열번호 35)
경쇄 가변영역 폴리펩티드	DIVMSQSPPSLA V S A G E K V T M S C K S S Q S L F N S G T R K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L S I S S V Q A E D L A V Y Y C K Q S Y N L Y T F G G G T K L E I K (서열번호 36)

[141]

[142] 실시예 3: 일시적 형질도입 방법에 의한 키메라 항체의 생산

[143] 세포 내 일시적 형질도입을 위하여 양이온성 폴리머(cationic polymer)인 FreeStyle™ Max(Invitrogen, 16447-100)를 사용하였으며, 제조사의 사용설명서에 따라 형질도입을 수행하였다. 형질도입 전날, EX-CELL 293 Serum free media(Sigma, 14571C: 이하 "EX-CELL 293 배지"라 기재함)에서 자라는 F2N 세포를 원심 분리하여, FreeStyle293 serum free media(Gibco, 12338)로 배지를 교체하였으며, 0.8×10^6 개의 세포 농도로 250 ml shaker flask 두 개를 이용하여 50 ml씩(총 100 ml)접종하였다. 형질 도입 당일 날, 키메라 항체 유전자를 포함하는 pCT178 DNA 125 μ g과 FreeStyle™ Max 시약 125 μ l를 각각 OptiPRO SFM II (Invitrogen, 12309) 배지를 이용하여 2 ml volume으로 희석한 후, 가볍게 섞어 주었다. 즉시 희석된 FreeStyle™ Max 시약 용액을 DNA가 희석되어 있는 용액에 섞은 다음, 상온에서 17분 반응하였다. 상온에서 17분 반응하는 동안, 형질 도입에 사용할 접종된 F2N 세포의 수를 측정하고, 그 FreeStyle293 배지를 이용하여, 세포 농도를 1.0×10^6 개가 되도록 희석하였다. 17분 후, DNA와 FreeStyle™ Max 시약 혼합 용액을 F2N 세포에 처리함으로써 형질도입을 진행하였다. 형질도입 다음날, 동량의 EX-CELL 293 배지를 형질도입된 세포에 첨가하여 7일 동안 배양함으로써 단일클론 항체를 생산하였다.

[144]

[145] 실시예 4: 키메릭 단일클론 항체의 효능 확인

[146] 실시예 4-1: *in vitro* 실험

[147] 실시예 3에서 생산된 단일클론 항체에서 3개의 키메라 형태의 후보를
수득하였으며, 이를 아래 표 7과 같이 적절한 농도로 희석하여 키메릭 단일클론
항체로 전환시키기 전의 원래 마우스 항체 2-21-23과 함께 대표적인 광견병
바이러스를 대상으로 중화능력 실험을 수행하였으며, 이는 RFFIT를 통해
수행되었다. 그 결과는 표 8에 기재하였다.

[148]

[149] 표 7

[Table 7]

실험에 사용된 2-21-23의 마우스 항체와 키메릭 형태 단일클론 항체의 농도

단일클론 항체 (항체 농도)	1:10 타이터 (IU/mg)	1:100 타이터 (IU/mg)	1:1000 타이터 (IU/mg)
마우스 항체 2-21-23 (121 ug/mL)	1500 (198.3)	210 (27.8)	7 (0.9)
키메릭 항체 #1 2-21-23 (116 ug/mL)	1400 (193.1)	95 (13.1)	11 (1.6)
키메릭 항체 #6 2-21-23 (95 ug/mL)	1200 (202.1)	110 (18.5)	9 (1.5)
키메릭 항체 #7 2-21-23 (186 ug/mL)	6800 (584.9)	270 (23.2)	25 (2.2)

[150]

[151] 표 8

[Table 8]

키메릭 형태로 전환된 단일클론 항체의 RFFIT의 결과

광견병 바이러스 종류	SRIG	2-21-23 마우스 항체 (121 ug/mL) Titer (IU/mg)	키메릭 항체 #1 2-21-23 (116 ug/mL) Titer (IU/mg)	키메릭 항체 #6 2-21-23 (95 ug/mL) Titer (IU/mg)	키메릭 항체 #7 2-21-23 (186 ug/mL) Titer (IU/mg)
China 2005	210	2200 (173.2)	540 (44.3)	230 (23.1)	5700 (291.9)
Rv342(China)	210	1600 (125.9)	320 (26.3)	200 (20.1)	8000 (409.6)
Dog Thai	210	1300 (102.3)	320 (26.3)	170 (17.0)	4600 (235.5)
Phi 002	180	2200 (202.0)	250 (23.9)	320 (37.4)	6000 (358.4)
Phi Dog	180	1500 (137.7)	9 (0.9)	45 (5.3)	2700 (161.3)
Mong RSA	180	70 (6.4)	5 (0.5)	6 (0.7)	145 (8.7)
Dog Tun	230	1600 (115.0)	230 (17.2)	145 (13.3)	5700 (266.5)
Dog Gab	230	1500 (107.8)	70 (5.2)	145 (13.3)	1600 (74.8)
DR MX(Mexico)	230	1100 (79.1)	110 (8.2)	145 (13.3)	1500 (70.1)
I-148(India)	210	1900 (149.5)	290 (23.8)	125 (12.5)	7500 (384.0)
TX SK	170	1600 (155.6)	75 (7.6)	60 (7.4)	4600 (291.0)
SK 4384(Texas)	170	440 (42.8)	42 (4.3)	25 (3.1)	1600 (101.2)
RVHN(Russia)	210	159750 (12573.8)	33489 (2749.5)	174692 (17513.0)	174692 (8944.8)
Sri Lanka	210	1100 (86.6)	9 (0.7)	<5 (0)	2200 (112.6)
Dog Son	210	800 (63.0)	75 (6.2)	25 (2.5)	4600 (235.5)

[152]

[153] 이 결과를 통해 높은 효능을 보이는 키메릭 항체 #7 2-21-23이 선별되었다.

[154] 다음 표 9는 키메릭 항체 #7 2-21-23에 대한 결정이 이루어진 다음 본격적으로 표 8에서 이루어지지 않았던 바이러스를 이용해 SRIG와 비교한 실험 결과이다.

[155]

[156] 표 9

[Table 9]

광견병 바이러스 종류	SRIG (actual titer)	2-21-23 키메릭 항체 #7 (9 ug/mL) Titer (IU/mg)
Dog ARG	250	1300 (1155.6)
857r(27)	210	1400 (1481.5)
AK Fox	210	1200 (1269.8)
WA Bat	250	1300 (1155.6)
rv61	170	1400 (1830.1)
AL Bat	170	1200 (1568.6)
Bat Ef	170	1300 (1699.3)
C1434	170	1400 (1830.1)
Gray FX-AZ	180	340 (419.8)
NC SK	180	230 (284.0)
323R	230	1400 (1352.7)
I-151	145	1400 (2145.6)
TN 269	145	60 (15/20 in well 1:5) (1.8)
Myotis	145	1000 (1532.6)

[157]

[158] 실시예 4-2: *in vivo* 동물실험

[159] 상기 실시예들에서 선별된 2-21-23 키메릭 항체 #7이 *in vivo*에서 광견병 바이러스에 대한 치료 효과를 가지는지 조사하기 위하여 다음과 같이 시리아 햄스터(Syrian hamster)를 이용하여 동물실험을 진행하였다. 본 동물실험에서는 중국 개 광견병 바이러스 Rv342를 사용하였다.

[160] 동물 실험 그룹은 총 4개로 나누어졌으며, 이는 1. Rv342 바이러스만 주입한 그룹, 2. Rv342 바이러스와 백신(Human diploid Imovax® Sanofi Pasteur)을 주입한 그룹, 3. Rv342 바이러스와 2-21-23 키메릭 항체 #7을 주입한 그룹, 4. Rv342 바이러스와 2-21-23 키메릭 항체 #7 그리고 백신(Human diploid Imovax® Sanofi Pasteur)을 주입한 그룹으로 이루어 졌다. Rv342 바이러스는 MICLD50/ml 근거하여 1/100 희석하여 50 µl를 근육주사를 하였고, 백신은 1ml 당 약 2.5 IU 이상의 백신 바이러스 주를 50 µl를 주사하였고 (0, 3, 7, 14일), 키메릭 항체 #7은 0.6 mg/mL 중 50 µl을 주사하였다. 백신과 키메릭 항체 #7은 Rv342 바이러스 주사 24시간 후에 각각 주사하였다.

[161] 실험 결과는 표 10 및 도 2와 같다. 바이러스와 2-21-23 키메릭 항체 #7를 주입한 경우(그룹 3) 관찰기간인 45일까지 모두 생존하였으나, 바이러스만

주입하거나(그룹 1) 바이러스와 백신을 주입한 경우(그룹 2)에는 모두 사망하였다. 또한, 바이러스와 2-21-23 키메릭 항체 #7 그리고 백신을 주입한 경우(그룹 4)에도 90% 이상의 생존율을 나타냈다.

[162] 표 10

[Table 10]

in vivo 동물실험 결과

동물실험 그룹	처리	총 햄스터 수	생존 햄스터 수	생존율*
1	Rv342 바이러스	6	0	0%
2	Rv342 바이러스 + 백신	6	0	0%
3	Rv342 바이러스 + 2-21-23 키메릭 항체 #7	12	12	100%
4	Rv342 바이러스 + 2-21-23 키메릭 항체 #7 + 백신	12	11	91.7%

[163] * 관찰기간: 바이러스 감염 후 45일

[164]

[165] 지금까지 예시적인 실시 태양을 참조하여 본 발명을 기술하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명의 범주를 벗어나지 않고서도 다양한 변화를 실시할 수 있으며, 그의 요소들을 등가물로 대체할 수 있음을 알 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명이 본 발명을 실시하는데 계획된 최상의 양식으로서 개시된 특정 실시 태양으로 국한되는 것이 아니며, 본 발명이 첨부된 특허청구범위의 속하는 모든 실시 태양을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

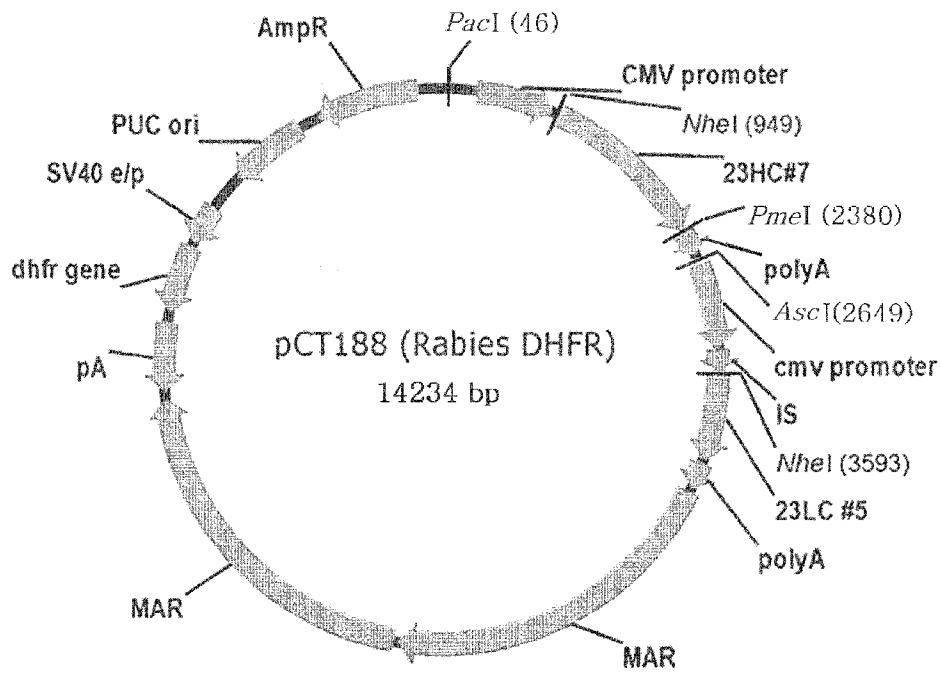
청구범위

- [청구항 1] 카바트(Kabat) 방법에 따라, 서열번호 27로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 28로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 29로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR3 영역을 가지는 가변 영역을 포함하는, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자.
- [청구항 2] 카바트(Kabat) 방법에 따라, 서열번호 30으로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 31로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 32로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR3 영역을 가지는 가변 영역을 포함하는, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자.
- [청구항 3] 카바트(Kabat) 방법에 따라, 서열번호 27로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 28로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 29로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR3 영역을 가지는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 30으로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 31로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 32로 기재되는 폴리펩티드를 포함하는 CDR3 영역을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자.
- [청구항 4] 서열번호 35로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역을 포함하는, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자.
- [청구항 5] 서열번호 36으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역을 포함하는, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자.
- [청구항 6] 서열번호 35로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 36으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자.
- [청구항 7] 서열번호 35로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역 및 서열번호 37로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 불변 영역을 포함하는 중쇄를 포함하는, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자.
- [청구항 8] 서열번호 36으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역

- 및 서열번호 38로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 불변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자.
- [청구항 9] 서열번호 35로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역 및 서열번호 37로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 불변 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 36으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 가변 영역 및 서열번호 38로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 불변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자.
- [청구항 10] 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자는 항체인 것을 특징으로 하는 결합 분자.
- [청구항 11] 제 3항 또는 제 6항에 있어서, 상기 결합 분자는 Fab 절편, Fv 절편, 디아바디(diabody), 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 결합 분자.
- [청구항 12] 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 광견병 바이러스는 개, 소, 몽구스, 박쥐, 스핑크 및 늑대로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 개체에서 유래된 것을 특징으로 하는 결합 분자.
- [청구항 13] 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 결합 분자에 추가적으로 하나 이상의 태그가 결합된 이뮤노컨쥬게이트.
- [청구항 14] 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 결합 분자를 암호화하는 핵산 분자.
- [청구항 15] 제 14항의 핵산 분자가 삽입된 발현 벡터.
- [청구항 16] 제 15항의 발현 벡터가 숙주 세포에 형질전환되어, 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는 결합 분자를 생산하는 세포주.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서, 상기 숙주 세포는 CHO 세포, F2N 세포, CSO 세포, BHK 세포, 바우스(Bowes) 흑색종 세포, HeLa 세포, 911 세포, AT1080 세포, A549 세포, HEK 293 세포 및 HEK293T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 세포주.
- [청구항 18] 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 결합 분자 및 약제학적으로 허용가능한 부형제가 추가적으로 포함된 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 결합 분자 및 약제학적으로 허용가능한 부형제가 추가적으로 포함된 광견병 치료 및 예방용 조성물.
- [청구항 20] 1)제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 결합 분자; 및

- 2) 용기
를 포함하는 광견병 진단용 키트.
- [청구항 21] 1) 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 결합 분자; 및
2) 용기
를 포함하는 광견병 치료 및 예방용 키트.
- [청구항 22] 1) 대상의 시료와 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 결합 분자를
접촉시키는 단계; 및
2) 상기 단계 1)의 결과를 분석하여 광견병 감염 여부를 판별하는
단계
를 포함하는 광견병 진단 방법.
- [청구항 23] 광견병에 감염되었다고 확인된 대상에게 제 1항 내지 제 9항 중
어느 한 항의 결합 분자를 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는
단계
를 포함하는 광견병 치료 및 예방 방법.
- [청구항 24] 1) 제 16항의 세포주를 배양하는 단계; 및
2) 발현된 결합 분자를 회수하는 단계
를 포함하는 광견병 바이러스에 결합하여 중화 능력을 가지는
결합 분자를 생산하는 방법.
- [청구항 25] 1) 대상의 시료와 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 결합 분자를
접촉시키는 단계; 및
2) 상기 결합 분자가 대상 시료에 특이적으로 결합하는지
측정하는 단계
를 포함하는 광견병 바이러스를 검출하는 방법.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

중국 개 광견병 바이러스(Rv342)를 이용한

In vivo 동물실험

