

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 11월 1일 (01.11.2018) WIPO | PCT

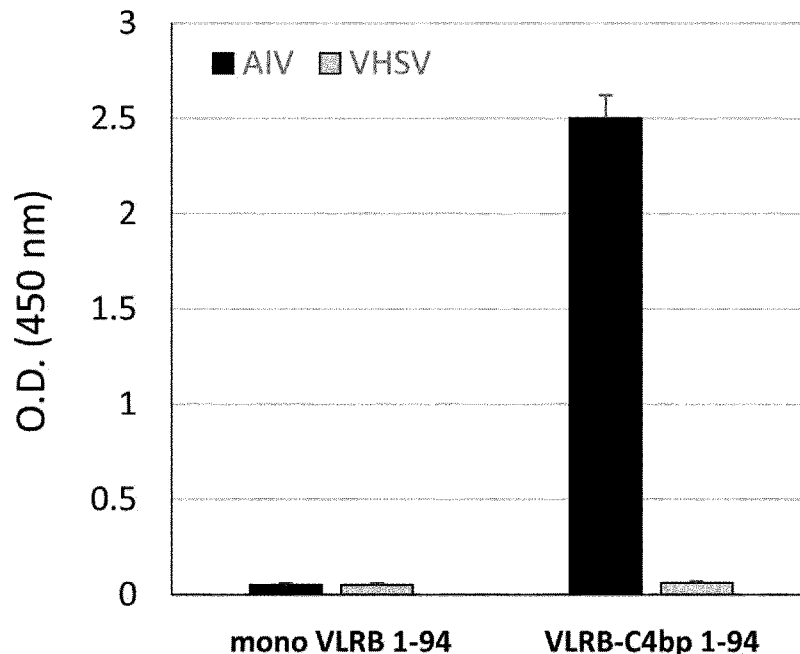


(10) 국제공개번호
WO 2018/199538 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/004463
- (22) 국제출원일: 2018년 4월 18일 (18.04.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0052501 2017년 4월 24일 (24.04.2017) KR
- (71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 주식회사 이뮤셀 (IMMUCELL CO., LTD.) [KR/KR]; 13207 경기도 성남시 중원구 사기막골로 124, 비즈센터동 비123호, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 정태성 (JUNG, Tae Sung); 52677 경상남도 진주시 진양호로239번길 13, 203동 202호, Gyeongsangnam-do (KR). 김경동 (KIM, Gyung Dong); 05664 서울시 송파구 가락로 187, 3동 803호, Seoul (KR). 임세평 (IM, Se Pyung); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 이정석 (LEE, Jung Suk); 49460 부산시 사하구 감천항로 172, 3층, Busan (KR). 김영림 (KIM, Young Rim); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 김재성 (KIM, Jae-sung); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교 501동 201호, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,

(54) Title: FUSION PROTEIN, IN WHICH HAGFISH-DERIVED VLRB PROTEIN FROM WHICH HYDROPHOBIC TAIL DOMAIN HAS BEEN REMOVED AND C4BP OLIGOMERIZATION DOMAIN ARE BOUND, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 C4 b p 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a multivalent antibody having increased binding force to a target antigen and characterized in that a fusion protein, in which a hagfish-derived variable lymphocyte receptor B (VLRB) protein from which a hydrophobic tail domain is removed and a human-derived C4b-binding protein (C4bp) oligomerization domain are bound, is self-assembled and formed into a polymer.

(57) 요약서: 본 발명은 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질과 인간 유래 C4bp(C4b-binding protein) 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질이 자가조립에 의해 다량체로 이루어진 것을 특징으로 하는 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2018/199538 A1

ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (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, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 C4b p 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질과 인간 유래 C4bp(C4b-binding protein) 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질 및 상기 융합 단백질이 자가조립에 의해 다량체로 이루어진 것을 특징으로 하는 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 1970년대 단클론 항체 제작 기술이 도입된 이후, 포유동물의 항체는 바이오마커 개발, 질병의 진단 및 치료 분야에서 전 세계적으로 엄청난 각광을 받으며 성장해 왔다. 최근에는 항체-약물 복합체(antibody-drug conjugate) 시장이 매우 빠르게 성장하고 있으며, 시장 규모가 2013년에는 3억 9,600만 달러, 2018년에는 3조 달러에 이를 것으로 예측된다. 하지만 신규의 항체후보 발굴 분야는 이미 몇몇 선진국에 의해 독점되어 왔으며 국내 기업들은 주로 신규 항체후보의 발굴보다는 개량형 항체 개발이나 바이오시밀러 항체의약품 개발을 통한 원가 절감에 노력을 기울이고 있는 실정이다. 주로 마우스에서 유래되어 사용되는 일반적인 항체는 결합부위(epitope)의 제한성, 결합면적의 한계, 비교적 큰 분자량 및 복잡한 생산 공정에 따른 비용과다 등과 같은 문제점들이 계속적으로 지적되어왔다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 여러 가지 다른 형태의 항체 및 인공항체 개발에 대한 연구들이 이루어졌으나 경제적, 상업적으로 경쟁력 있는 후보물질은 아직 전무한 상태이므로, 기존 항체를 대신할 수 있는 비용적, 효능적 측면에서 보다 혁신적인 대체항체 개발이 시급한 실정이다.

- [3] 최근, 먹장어(hagfish)나 칠성장어(lamprey)의 획득면역체계를 이용하여 마우스 항체보다 훨씬 높은 항원결합력을 보이는 새로운 항체개발에 대한 가능성이 연구를 통해 제시되었다. 먹장어와 칠성장어는 진화론적으로 최하위 척추동물인 무악류(Jawless vertebrate)의 유일한 현존 생명체이다. 최근 이들의 선천면역과 획득면역은 유악류(Jawed vertebrate)와 유사한 기작으로 이루어진다는 사실이 밝혀졌으며, 이들의 임파구-유사 세포로부터 세가지 다른 형태의 VLR(variable lymphocyte receptor)-A, B 및 C가 발견되었다. VLR-A 및 VLR-C는 포유동물의 T-림프구와 같은 역할을, VLR-B는 임파구-유사 세포로부터 분비되는 B-림프구 타입과 같은 역할을 하는 것으로 알려졌다. 특히 포유류의 항체 역할을 주관하는 VLRB 단백질은 포유류의

면역글로불린(immunoglobulin)과 달리 유전자 조립(gene assembly)을 통해 다양성이 유도되지만, 훨씬 간단한 구조의 단일 폴리펩타이드로 발현되고, 그 다양성이 산술적으로 대략 10^{14} 개 이상의 조합이 형성 가능하며 pH, 온도 등과 같은 주변 환경의 변화에 훨씬 안정적인 장점이 있다. 따라서, 먹장어의 획득면역체계를 이용하면 원하는 특정 항원에 대한 맞춤형 항체를 보다 저렴하며, 쉽고, 빠르게 제작할 수 있어, 기존의 항체 시장에 맞설 수 있는 강력한 경쟁적 대체항체 후보물질이 될 것으로 예측되고 있다.

- [4] 항원-항체 결합을 기반으로 하는 단백질 검출 기술에 있어서 중요한 요소는 항체 단백질과 표적항원과의 특이적 결합을 높은 결합력으로 안정성 있게 유지하는 것이다. 가장 일반적으로 사용되는 마우스 항체를 예로 보면, 마우스 항체는 항원과의 결합부위를 두 개 가지면서 Y-형태의 구조를 가진다. 반면 먹장어의 항체는 단일체의 경우 U-형태의 말발굽 구조를 가지며 단일체로는 항체로서 작용하지 않는다. 칠성장어의 경우 유악 포유류의 IgM 형태와 유사한 오각형 모양의 다량체 구조를 이룬다. 본 발명자들의 이전 연구에서 발견한 먹장어 유래 VLRB 항체의 경우, 20~30개 정도의 단일체가 구 형태로 이루어진 특이한 형태의 구형 모양을 나타낸다. 하지만, 이 구 형태의 먹장어 항체의 경우 인체 세포주인 HEK 293과 같은 인위적인 환경에서 발현시키고자 할 때 야생형 VLRB의 C-말단(C-terminus)에 위치한 높은 소수성 부분으로 인해 발현율이 현저히 감소하고, 또한 자연적으로 존재하는 먹장어 항체의 구 형태와는 달리 항원과의 결합 능력을 ELISA 또는 immunoblotting 등으로 조사하기 어려운 단점이 있다.
- [5] 이에, 본 발명에서는 먹장어 항체 VLRB 단백질에서 항원과 결합할 수 있는 부위는 그대로 유지하면서 3 차원 구조를 결정하는 C-말단 부위의 유전자를 제거하고, 제거된 부위를 7합체를 형성할 수 있는 펩타이드 도메인을 도입하여 보다 높은 발현율과 보다 높은 항원 결합력을 부여하고자 하였다.
- [6] 한편, 미국등록특허 제9243047호에는 닭의 C4bp 올리고머화 도메인에 바이러스 항원을 연결한 'Influenza nucleoprotein vaccines'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2016-0147787호에는 '인간화 가변 림프구 수용체(VLR) 및 이와 관련된 조성물 및 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질 및 상기 융합 단백질의 다량체로 이루어진 다가 항체에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 먹장어 항체 VLRB 단백질을 코딩하는 유전자 중 항원과의 결합 부위는 유지하면서, C-말단의 소수성 테일 도메인 부위를 결실시키고 그 부위에 인간 유래 C4bp의

올리고머화 도메인을 연결시켜 융합 단백질을 제조하였다. 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터로 숙주 세포를 형질전환시킨 결과, 본 발명의 융합 단백질이 숙주 세포 내에서 7합체의 다량체 형태로 형성되는 것을 확인하였고, 상기 다량체 형태의 먹장어 항체가 동일한 항원 인식 부위를 가진 단일체(모노머) 먹장어 항체에 비해 표적 항원에 대한 결합능이 현저히 높음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질을 코딩하는 유전자의 3'-말단에 연결된 인간 유래 C4bp(C4b-binding protein) 올리고머화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 숙주 세포에 의해 생산된, 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 인간 유래 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질이 자가조립에 의해 7합체(heptamer)의 다량체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 융합 단백질의 7합체를 수득하는 단계를 포함하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가 항체의 제조방법을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가 항체를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 다가 항체를 표적 항원 함유 의심 시료에 처리하여 표적 항원을 검출하는 방법을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 다가 항체를 유효성분으로 함유하는 표적 항원 검출용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [16] 본 발명의 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 인간 유래 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질의 다량체로 이루어진 다가 항체는 항원과의 결합부위를 7개나 가짐으로써 항원-항체 결합력이 극대화되고, 소수성 테일 도메인의 제거로 숙주 세포 내에서 발현율이 증가되었으며, 항체 자체의 안정성 또한 증가되는 장점이 있다. 마우스 항체와는 달리 먹장어 항체는 단일 펩타이드로 이루어져 있어 유전자 조작이 자유로워 응용가능성이 무궁무진하므로, 본 발명의 융합 항체는 바이오마커 개발 및 진단 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 먹장어의 야생형 VLRB 단백질의 구조를 보여주는 그림이다. SP, 시그널 펩타이드; LRR, leucine-rich repeat; LRRNT, N-terminal capped LRR; LRRVs, variable LRR modules; CP, 연결 펩타이드; LRRCT, C-terminal capped LRR; HC, 소수성 테일 도메인. 아미노산 서열 중 박스 표시는 소수성 아미노산을 의미한다.
- [18] 도 2는 본 발명의 융합 단백질을 제조하기 위한 벡터 시스템 개발의 도식으로, 인간 유래 C4bp 올리고머화 도메인을 클로닝한 pShepta 벡터를 보여준다.
- [19] 도 3은 본 발명의 융합 단백질을 제조하기 위한 벡터 시스템 개발의 도식으로, 소수성의 C-말단이 결실된 먹장어 VLRB 단백질을 클로닝한 pShepta/VLRB 벡터를 보여준다.
- [20] 도 4는 C4bp 올리고머화 도메인이 연결되지 않은 형태의 VLRB 클론 74 단일체(m74)와 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 형태의 VLRB 클론 74(Shepta/74)의 웨스턴 블롯팅(Western blotting) 결과이다.
- [21] 도 5는 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 형태의 VLRB 클론 74(Shepta/74) 시료에 β -Mercaptoethanol(2-ME)을 다양한 농도별로 처리하고 웨스턴 블롯팅한 결과이다.
- [22] 도 6은 무작위로 선별한 또 다른 VLRB-C4bp 클론 43의 웨스턴 블롯팅 결과로, 2-ME 처리 농도 증가에 따라 중합체가 단일체로 분리되는 경향을 보여주는 결과이다.
- [23] 도 7은 조류인플루엔자 바이러스(AIV)에 특이적으로 결합하는 본 발명의 융합 단백질을 제작하는 과정의 모식도이다.
- [24] 도 8은 재조합 VLRB-C4bp의 AIV 항원에 대한 결합능을 ELISA로 확인한 결과이다.
- [25] 도 9는 AIV 항원 특이적 결합능을 가진 선별된 클론들(1-94, 2-61 및 3-43)의 비환원 조건 및 환원 조건에서의 웨스턴 블롯팅 결과이다.
- [26] 도 10은 AIV 항원 특이적 결합능을 가진 선별된 클론들의 농도별 항원 결합능을 ELISA로 확인한 결과이다.
- [27] 도 11은 AIV 항원 특이적 결합능을 가진 선별된 클론들의 다양한 종류의 항원에 대한 결합 반응을 닷 블롯팅(dot blotting)을 통해 확인한 결과이다. AIV, 조류인플루엔자 바이러스; VHSV, 바이러스성 출혈성패혈증 바이러스; HA, 헤마글루티닌; HEL, HEL 단백질.
- [28] 도 12는 다양한 아형의 AIV에 대한 VLRB-C4bp 클론 1-94의 결합능을 닷 블롯팅을 통해 확인한 결과이다. VHSV, 바이러스성 출혈성패혈증 바이러스; VNNV, 바이러스성 신경 괴사증 바이러스; 비활성화 H9N2, MS96 바이러스를 5분간 가열한 바이러스; MS96 H9N2, VI13 H9N2; ADL H9N2, H9N2형 AIV; 0084 H6N2, H6N2형 AIV; VI14 H4N2, H4N2형 AIV.
- [29] 도 13은 AIV 특이적 결합능을 가진 VLRB-C4bp 융합 단백질(1-94 클론)과 상기 단백질에서 C4bp 도메인이 결실된 mono VLRB 단백질을 생산하는 293-F 세포

배양 상층액의 비환원 및 환원 조건에서의 웨스턴 블롯팅 결과이다.

- [30] 도 14는 AIV 특이적 결합능을 가진 VLRB-C4bp 융합 단백질(1-94 클론)과 상기 단백질에서 C4bp 도메인이 결실된 mono VLRB 단백질을 생산하는 293-F 세포 배양 상층액의 AIV 및 VHSV(음성 대조군) 항원에 대한 결합능을 ELISA로 분석한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질을 코딩하는 유전자의 3'-말단에 연결된 인간 유래 C4bp(C4b-binding protein) 올리고머화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [32] 본 발명의 재조합 발현 벡터에 있어서, 상기 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질은 N-말단(N-terminus)에서 C-말단(C-terminus)으로 시그널 펩타이드(SP), LRRNT(N-terminal capped LRR), LRR(leucine-rich repeat), LRRVs(variable LRR modules), CP(connecting peptide), LRRCT(C-terminal capped LRR) 및 Stalk 도메인으로 이루어진 단백질일 수 있으며, 항원 인식 부위인 LRRVs와 LRRCT 도메인을 포함하고 있어 표적 항원에 대한 결합능이 있는 VLRB 단백질이다. 다시 말하면, 본 발명의 먹장어 유래 VLRB 단백질은 야생형 VLRB 단백질의 구조에서 C-말단의 소수성 테일 도메인만 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질이다.
- [33] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 발현 벡터에 있어서, 상기 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질을 코딩하는 유전자는, 표적하는 항원에 대해 결합력이 가장 우수한 VLRB 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있으며, 표적 항원으로 면역화된 먹장어의 VLRB cDNA 라이브러리로부터 유래할 수 있다.
- [34] 본 발명의 재조합 발현 벡터에 있어서, 상기 인간 유래 C4bp의 올리고머화 도메인의 범위는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 이의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1로 표시되는 펩타이드와 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. "실질적으로 동질의 활성"이란 자가조립에 의해 7합체의 다량체를 형성하는 활성을 의미한다.
- [35] 인간 유래 C4bp(C4b-binding protein) 단백질은 고전적인 보체(complement)와 렉틴(lectin) 경로의 주요 저해제로 작용하는 단백질이다. 이 단백질은 7개 α 동형 단백질(isoform)이 올리고머화(oligomerization)를 이루어 구성된 것으로, 각 동형 단백질의 C-말단의 540~597번째 아미노산 서열 중 시스테인(Cys) 잔기들의 내부 이황화 결합을 통해 중합체를 형성하는 특성이 있다.

- [36] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [37] 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.
- [38] 본 발명의 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질을 코딩하는 유전자와 인간 유래 C4bp 올리고화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [39] 상기 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다.
- [40] 본 발명은 또한, 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [41] 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 대장균(*Escherichia coli*) Rosetta, 대장균 JM109, 대장균 BL21, 대장균 RR1, 대장균 LE392, 대장균 B, 대장균 X 1776, 대장균 D α , 대장균 W3110, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 쉼린젠시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [42] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 및 동물세포(예컨대, HEK(Human embryonic kidney) 293, CHO(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.
- [43] 본 발명은 또한, 상기 숙주 세포에 의해 생산된, 소수성 테일 도메인이 제거된

먹장어 유래 VLRB 단백질과 인간 유래 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질을 제공한다.

[44] 본 발명에 따른 융합 단백질은 먹장어 유래 VLRB 단백질의 stalk 도메인의 C-말단에 인간 유래 C4bp의 올리고머화 도메인의 N-말단이 연결된 융합 단백질이다.

[45] 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질이 자가조립에 의해 7합체(heptamer)의 다량체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체를 제공한다. 본 발명의 다가 항체는, 표적 항원에 대한 결합능은 유지하면서 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 인간 유래 C4bp의 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질이 7합체의 다량체 형태로 이루어진 것으로, 인간 유래 C4bp의 올리고머화 도메인이 중심부에 위치하고, 먹장어 유래 VLRB 단백질이 외부로 돌출되는 구조를 갖는 것을 특징으로 한다.

[46] 본 명세서에서 사용된 용어 다량체 또는 중합체는 서로 혼용되어 사용될 수 있다.

[47] 본 발명의 다가 항체는 먹장어 항체인 VLRB 단백질을 7개 포함하고 있어, 항원 결합능이 현저히 증가된 다가 항체이다.

[48] 본 발명은 또한,

[49] (a) 상기 재조합 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;

[50] (b) 상기 (a) 단계의 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[51] (c) 상기 (b) 단계의 배양한 숙주 세포 또는 이의 배양액으로부터 융합 단백질의 7합체(heptamer)를 수득하는 단계를 포함하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체의 제조방법을 제공한다.

[52] 본 발명의 상기 다가 항체의 제조방법은 구체적으로, 면역원 또는 항원을 먹장어에 주사하여 면역화시키고, 면역화된 먹장어의 혈액을 채취하여 림프구를 분리하고, 림프구의 총 RNA를 추출하여 이를 기반으로 성숙한 VLRBs의 mRNA를 확보한 후, 이를 주형으로 중합효소연쇄반응을 수행하여 C-말단의 소수성 부위를 제외한 VLRBs의 cDNA 풀(pool)을 준비하였다. 상기과 같이 준비된 cDNA의 각 클론들을 C4bp 올리고머화 도메인 염기서열을 포함하고 있는 pSHepta 벡터로 클로닝하여 각기 다른 항원 인식 서열을 가진 VLRBs와 인간 유래 C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터(도 3)를 제작하였다. 그 후, 각 재조합 발현 벡터로 293-F 세포를 형질전환시키고, 형질전환된 293-F 세포를 배양한 후, 배양액을 수득하여 면역원 또는 항원과 반응성을 ELISA 실험을 통해 확인하였다. 최종적으로 면역원 또는 항원과 결합력이 우수한 클론들을 선별하고, 선별된 클론들의 배양액을 비환원 및 환원 조건에서 웨스턴 블롯팅하여 다량체가 형성된 것을 확인하였다. 면역원 또는 항원은 바이러스, 미생물, 단백질 등 다양한 종류를 사용할 수 있다.

- [53] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가 항체를 제공한다.
- [54] 본 발명의 상기 다가 항체는 표적 항원에 대한 결합능은 유지하면서 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 인간 유래 C4bp의 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질이 7합체의 다량체 형태로 이루어진 것으로, 표적 항원과 결합할 수 있는 먹장어 VLRB 단백질을 7개 포함하고 있어, 항원 결합능이 현저히 증가된 다가 항체이다.
- [55] 본 발명은 또한, 상기 다가 항체를 표적 항원 함유 의심 시료에 처리하여 표적 항원을 검출하는 방법을 제공한다.
- [56] 본 발명의 표적 항원 검출 방법에서 상기 시료는 음식물, 물, 특정 또는 불특정 미생물을 포함하는 용액, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [57] 본 발명의 표적 항원 검출 방법은 항원-항체 반응 방식으로 실시될 수 있다. 이 경우, 검출하고자 하는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 본 발명의 다가 항체를 이용하여 실시될 수 있다. 본 발명은 통상적인 면역분석 방법에 따라 실시하여 표적 항원 존재 여부를 검출하는데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 방법에 따라 실시할 수 있다.
- [58] 본 발명의 다가 항체와 표적 항원과의 결합체 검출은 간접(indirect) ELISA(direct enzyme linked immunosorbent assay) 또는 샌드위치(sandwich) ELISA 방법을 통해 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 간접 ELISA 방법 및 샌드위치-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 본 발명의 다가 항체의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다.
- [59] 또한, 본 발명은 상기 다가 항체를 유효성분으로 함유하는 표적 항원 검출용 조성물 및 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 표적 항원 검출용 키트를 제공한다.
- [60] 본 발명의 표적 항원 검출용 조성물은 표적 항원에 대한 결합능은 유지하면서 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질과 인간 유래 C4bp의 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질이 7합체의 다량체 형태로 이루어진 다가 항체를 유효성분으로 포함하고 있으며, 상기 검출용 조성물을 포함하는 본 발명의 키트는 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는 면역분석용 키트이며, 상기 면역분석용 키트는 직접-ELISA, 간접-ELISA, 샌드위치-ELISA, 단백질 마이크로어레이, 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay) 등일 수 있다.
- [61]
- [62] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [63]
- [64] 실시예 1. 먹장어 항체 VLRB 단백질과 인간 유래 C4bp 올리고머화 도메인의

융합 단백질 제조

[65] 먹장어의 야생형 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질은 C-말단에 강한 소수성 부위를 포함하고 있어 인간 유래 세포주인 HEK 293-F를 통해 제조합 단백질을 발현시키고자 할 때 발현율과 세포 외부로의 분비율이 현저히 감소되는 문제점이 있다. 이에 본 발명에서는 먹장어 VLRB 단백질의 강한 소수성 부위를 결실시키고 다량체를 형성할 수 있는 인간 유래 C4bp의 올리고머화 도메인을 연결시켜 융합 단백질을 제조하고, 상기 제조된 융합 단백질이 다량체를 형성하는지 확인하였다.

[66] 먼저 인간 유래 C4bp 유전자의 올리고머화 도메인(GenBank ID: 416733, 540~597번째 아미노산)을 합성하기 위해 하기 표 1의 프라이머를 제작하였다.

[67] [표1]

C4bp 유전자 합성을 위한 PCR 프라이머 세트

프라이머명	염기서열(5'→3')
C4bp <i>Spe</i> I_2 <i>Sfi</i> I Fwd	cacactagtGGCCACCGGGGCCAATAATTGGCCTCTG GGGCCcaggtagttgggagacccccgaaggctgtg (서열번호 2)
C4bp con Rev	tcctctgggtttgggagacactgcatgagtctttgcctgtgagcacttgttcacagc cttcgggggtctcc (서열번호 3)
C4bp con Fwd	tgtctcccaaaccagaggatgtgaaatggccctggaggtatataagctgtctct ggaaattgaacaactg (서열번호 4)
C4bp con stop Rev	ttatagttctttatccaaagtggattgtcttgcgctgtctctctgtagttccagttgtca attccagag (서열번호 5)

[68] C4bp *Spe* I_2*Sfi* I Fwd(서열번호 2) 및 C4bp con Rev(서열번호 3), C4bp con Fwd(서열번호 4) 및 C4bp con stop Rev(서열번호 5) 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행한 후, 상기 PCR 산물을 혼합하고, 다시 C4bp *Spe* I_2*Sfi* I Fwd(서열번호 2) 및 C4bp con stop Rev(서열번호 5) 프라이머 세트에 2차 PCR을 수행하였다. 최종 220 bp 정도의 PCR 산물을 획득한 후, *Spe* I으로 가수분해하고, 구입한 pTracer EF/A 벡터(Invitrogen, 미국)의 *Spe* I/*Pme* I 부위에 클로닝하여 삽입시킨 후 DNA 염기서열 분석으로 재조합 벡터를 선별하여 pSHepta 벡터를 제작하였다(도 2). 먹장어 림프구로부터 총 RNA를 무작위로 획득하고, 이를 주형으로 하여 먹장어 항체 VLRB 단백질에서 시그널 펩타이드(SP)로부터 stalk까지를 PCR로 증폭하였다. 증폭된 산물 중 하나의 클론(VLRB 74)을 무작위로 선택하고, *Sfi* I으로 가수분해한 후, 상기 제작된 pSHepta 벡터의 *Sfi* I 부위에 클로닝하여 최종적으로 pSHepta/74 벡터를 제작하였다(도 3). 상기 재조합 벡터는 VLRB 유전자 중 C-말단의 소수성 부위(HC)가 결실되고 C4bp 올리고머화 도메인이 결합된 융합 단백질을 발현하며 올리고머화 도메인에 의해 최종적으로 7합체의 VLRB 중합체

단백질이 제작될 것으로 예상되었다. 제작된 pSHepta/74를 HEK 293-F 인간 세포주(Gibco, 미국)에 Lipofectamine 2000(Invitrogen)으로 4시간 동안 형질전환시키고 발현 배지로 재배양하였다. 형질전환 72시간 후, 배양 상층액을 회수하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

- [69] 그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이 C4bp 올리고머화 도메인이 결합되지 않은 VLRB 단백질만 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 세포의 배양액(m74)은 β -Mercaptoethanol(이하, 2-ME)를 처리하지 않은 비환원 조건 및 2-ME를 1% 처리한 환원 조건 결과에서 모두 단일체 형태로 VLRB 단백질이 세포 외로 분비되는 것으로 확인되었다. 반면, C4bp 올리고머화 도메인이 연결된 형태의 VLRB 융합 단백질을 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 세포의 배양액(SHepta/74)은 2-ME를 처리하지 않은 비환원 조건에서는 300~400 kDa 정도의 벌키(bulky)한 단백질 형태로 세포 밖으로 분비되는 것이 확인되었으며, 1%의 2-ME를 처리한 환원 조건에서는 단일체 형태로 분해되어지는 것이 확인되었다. 보다 면밀히 조사하기 위하여 2-ME를 농도별로 처리하였을 때에 2-ME 처리 농도 의존적으로 중합체(7합체)에서 단일체 형태로 분해되는 것을 확인할 수 있었다(도 5). 또한 74 클론 뿐만 아니라 무작위로 선별된 43 클론에서도 2-ME를 처리하지 않은 비환원 조건, 0.05% 2-ME 처리한 부분적 환원 조건 및 5% 2-ME 처리한 환원 조건에서 차례로 완전한 형태의 VLRB-C4bp 중합체(7합체), 사다리 형태로 순차적으로 분해된 형태 및 완전한 단일체 형태의 밴드가 관찰되었다(도 6).

[70]

- [71] 실시예 2. 조류인플루엔자 바이러스 특이적 융합 단백질 제조 및 융합 항체의 항원 결합능 분석

- [72] 표적 항원 특이적 먹장어 VLRB 항체를 생산하기 위해, 야생형 조류인플루엔자 바이러스(H9N2형)를 2주 간격으로 4회 먹장어에 면역시키고 림프구를 회수하여 총 RNA를 추출하고 이로부터 먹장어 VLRB cDNA 라이브러리를 제작하였다(도 7). 각각의 VLRB cDNA를 상기에서 제작한 pSHepta 벡터에 클로닝하였다(pSHepta/VLRB cDNA 라이브러리). 각기 다른 VLRB 클론들을 발현하는 약 1,000 여개 정도의 플라스미드 DNA를 HEK 293-F 세포에 형질전환시켰다. 형질전환 72시간 후 세포 배양의 상층액을 회수하여 야생형 조류인플루엔자 바이러스(H9N2형) 입자들(200 ng/웰)로 코팅된 96-웰 플레이트에 반응시켜 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하였다.

- [73] ELISA 분석은 각기 다른 항원 결합 부위를 가진 VLRB 클론과 C4bp의 올리고머화 도메인이 융합된 융합 단백질이 중합체의 형태로 포함되어 있는 상기 형질전환 세포의 배양 상층액을 처리한 96-웰 플레이트에 먹장어 VLRB 단백질의 stalk 부위를 인식하는 마우스 11G5 항체, HRP가 결합된 항-마우스 IgG 항체를 순차적으로 처리한 후 TMB/H₂O₂로 발색시키고 흡광도를 측정하여 항원과의 결합능을 조사하였다.

- [74] 그 결과, 조류인플루엔자 바이러스 특이적 ELISA 실험을 통해 항원 결합능이 우수한 것으로 선별된 VLRB-C4bp 클론들은 1-94, 2-79, 2-61, 3-43, 3-89 및 6-62 클론이었다(도 8). 이들 클론들은 바이러스성 출혈성패혈증 바이러스(VHSV, Viral Hemorrhagic Septicemia Virus)에는 반응성을 전혀 보이지 않았다(도 11). 조류인플루엔자 바이러스에 상대적으로 높은 반응성을 나타낸 클론들은 1-94, 2-61 및 3-43 클론이었으며 나머지는 동일 항원에 대해 낮은 반응성을 보였다. 선별된 1-94, 2-61, 3-43 클론의 융합 단백질들이 C4bp 올리고머화 도메인으로 인해 중합체를 형성하였는지 확인하기 위해 각 클론들로부터 회수한 플라스미드 DNA로 형질전환된 HEK 293-F 세포주의 배양 상층액을 회수하여 2-ME가 처리되었거나 처리되지 않은 조건에서 SDS-PAGE를 수행하였고, 먹장어 VLRB의 stalk를 인식할 수 있는 11G5 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 그 결과, 도 9에서 관찰된 바와 같이 세 개의 클론 모두에서 2-ME를 처리하지 않았을 때(비환원 조건), 중합체가 성공적으로 이루어져 분비된다는 결과를 확인할 수 있었다. 1-94, 2-61, 3-43 클론의 LRRV 모듈의 개수는 각각 5개, 4개 및 5개로 확인되었다. 또한, 1-94, 2-61, 2-79, 3-43, 3-89 및 6-62 클론들로부터 회수한 플라스미드 DNA로 형질전환된 293-F 세포로부터 회수한 배양 상층액을 5배, 25배 및 125배 희석하여 조류인플루엔자 바이러스와의 특이적 반응성을 관찰한 결과 도 10과 같이 배양 상층액의 농도 의존적으로 결합능이 증가됨이 관찰되었다.
- [75] 선별된 먹장어 항체들의 결합능을 닷 블롯팅(dot blotting)으로 다시 검증하였다. 먼저 PVDF 멤브레인에 바이러스(AIV 200 ng, VHSV 200 ng) 및 단일 단백질(HA 20 ng, HEL 20 ng)을 각각 코팅하였다. 특히 조류인플루엔자 바이러스의 주 외피 단백질로 잘 알려진 헤마글루티닌(HA)과의 결합능을 확인해보고자 하였다(도 11). 음성대조군으로 사용된 VLR18 클론은 모든 항원들에 대해 전혀 반응성을 나타내지 않은 반면, 선별된 각각의 융합 항체들은 ELISA 결과와 마찬가지로 조류인플루엔자 바이러스에 반응성을 나타내었다. 하지만, 헤마글루티닌과 전혀 반응성을 보이지 않았다. 또한, 선별된 항체들 중 가장 높은 반응성을 보인 1-94 클론을 이용하여 항원으로 주입한 MS96(H9N2형) 균주에 대해 특이적인 결합능을 나타낸다는 사실을 확인하였다(도 12). 특이하게도 1-94 클론은 5분간 끓인 H9N2형 조류인플루엔자바이러스에 대해서는 전혀 반응성을 보이지 않았다. 따라서, 선별된 먹장어 융합 항체는 조류인플루엔자 바이러스의 표면과 결합은 하지만, 변성된 바이러스와는 결합하지 않는다는 사실을 확인할 수 있었다.
- [76]
- [77] 실시예 3. VLRB 단일체와 VLRB-C4bp 중합체의 항원 결합능 분석
- [78] 본 발명자들은 동일한 항원 결합 부위를 가진 먹장어 유래 항체 VLRB 단백질 단일체가 올리고머화 도메인을 연결시켜 다량체를 형성한 중합체와 항원 결합능에서 어떠한 차이를 보이는지를 분석하고자 하였다. 먼저, 상기 실시예

2에서 AIV 항원에 대한 가장 우수한 결합능을 보여준 VLRB-C4bp 1-94 클론의 VLRB 부분만을 다시 클로닝하였다. 293-F 세포에서 각각 발현시킨 올리고머화 도메인이 결실된 VLRB 단일체(mono VLRB 1-94)와 VLRB-C4bp 1-94 클론을 환원 및 비환원 조건에서 웨스턴 블롯팅하여 중합체 형성 유무를 확인하였고(도 13), 야생형 조류인플루엔자 바이러스(H9N2형)에 대한 결합능을 ELISA로 확인한 결과, 중합체 형태의 VLRB-C4bp 1-94 융합 항체가 표적 항원인 조류인플루엔자 바이러스에 대해서 VLRB 단일체 대비 현저히 우수한 항원-특이적 결합능을 보여주었다(도 14).

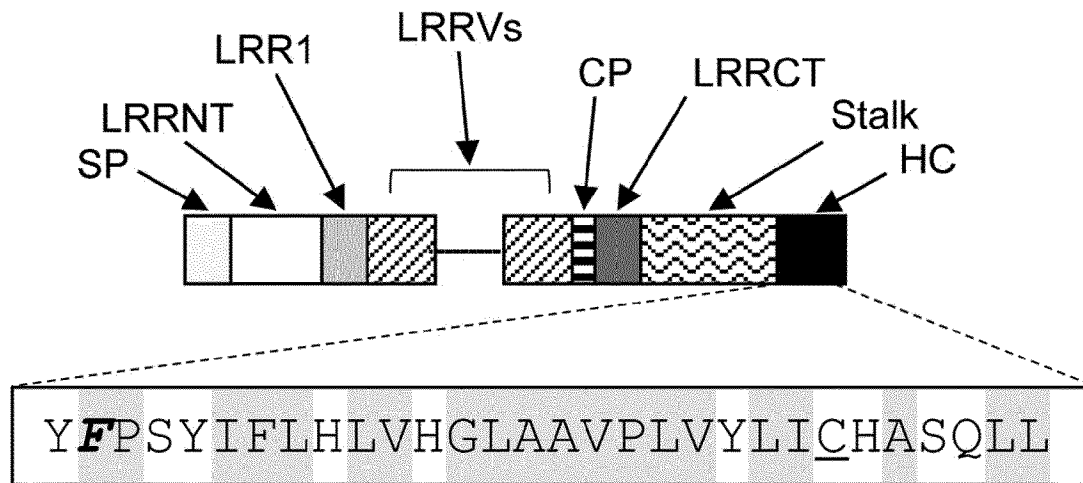
- [79] 상기 결과를 통해, 단일체의 형태에서는 표적 항원에 대한 결합력이 낮았으나, 올리고머화 도메인과 융합되어 중합체 형태로 형성된 경우에 표적 항원에 대한 결합력이 수십 배 이상 증가될 수 있음을 알 수 있었다.

청구범위

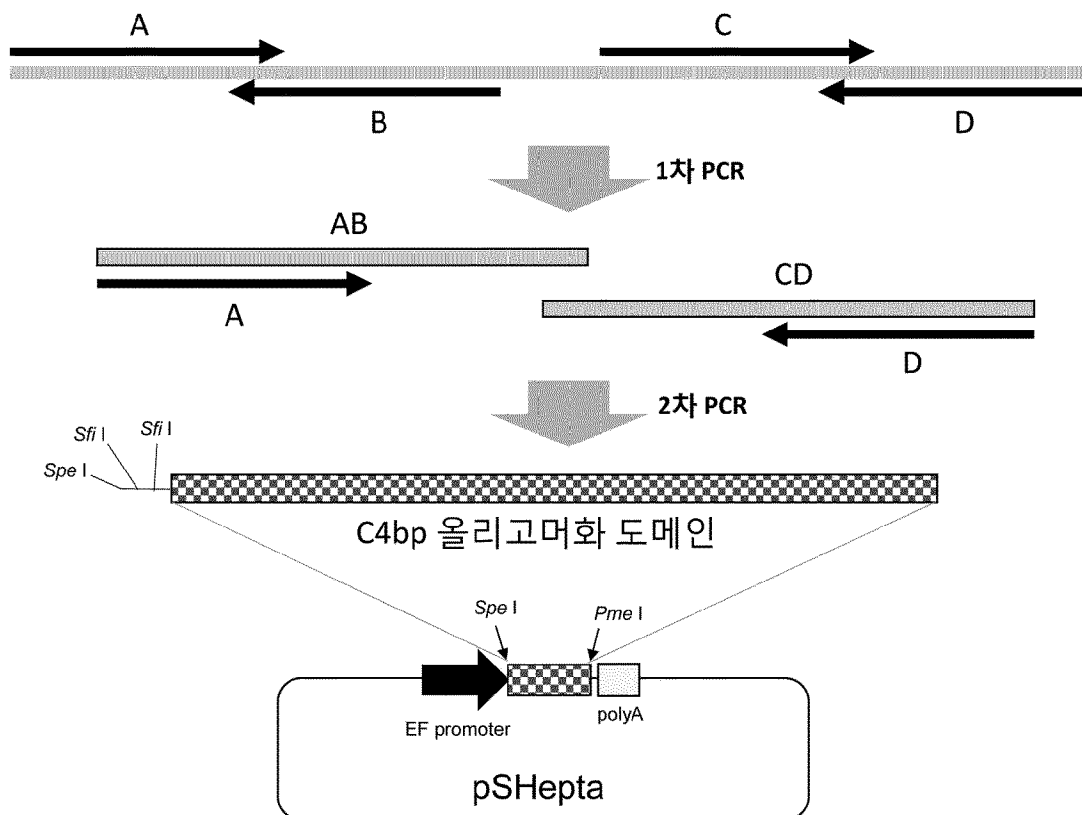
- [청구항 1] 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질을 코딩하는 유전자의 3'-말단에 연결된 인간 유래 C4bp(C4b-binding protein) 올리고머화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB 단백질은 N-말단에서 C-말단으로 시그널 펩타이드(SP), LRRNT(N-terminal capped LRR), LRR(leucine-rich repeat), LRRVs(variable LRR modules), CP(connecting peptide), LRRCT(C-terminal capped LRR) 및 Stalk 도메인으로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 발현 벡터.
- [청구항 3] 제1항의 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포.
- [청구항 4] 제3항의 숙주 세포에 의해 생산된, 소수성 테일 도메인이 제거된 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질과 인간 유래 C4bp(C4b-binding protein) 올리고머화 도메인이 연결된 융합 단백질.
- [청구항 5] 제4항의 융합 단백질이 자가조립에 의해 7합체(heptamer)의 다량체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체.
- [청구항 6] (a) 제1항의 재조합 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;
(b) 상기 (a) 단계의 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
(c) 상기 (b) 단계의 배양한 숙주 세포 또는 이의 배양액으로부터 융합 단백질의 7합체(heptamer)를 수득하는 단계를 포함하는, 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가(multivalent) 항체의 제조방법.
- [청구항 7] 제6항의 방법에 의해 제조된 표적 항원에 대한 결합력이 증가된 다가 항체.
- [청구항 8] 제5항 또는 제7항의 다가 항체를 표적 항원 함유 의심 시료에 처리하여 표적 항원을 검출하는 방법.
- [청구항 9] 제5항 또는 제7항의 다가 항체를 유효성분으로 함유하는 표적 항원 검출용 조성물.

[도1]

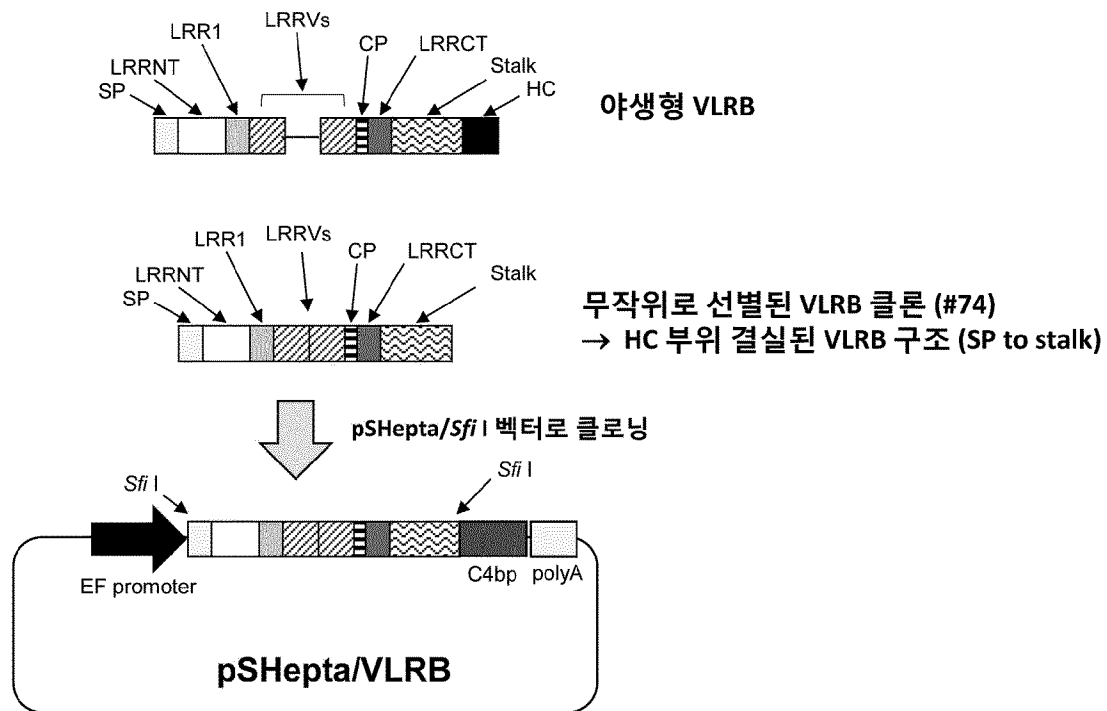
먹장어(Hagfish) VLRB 구조



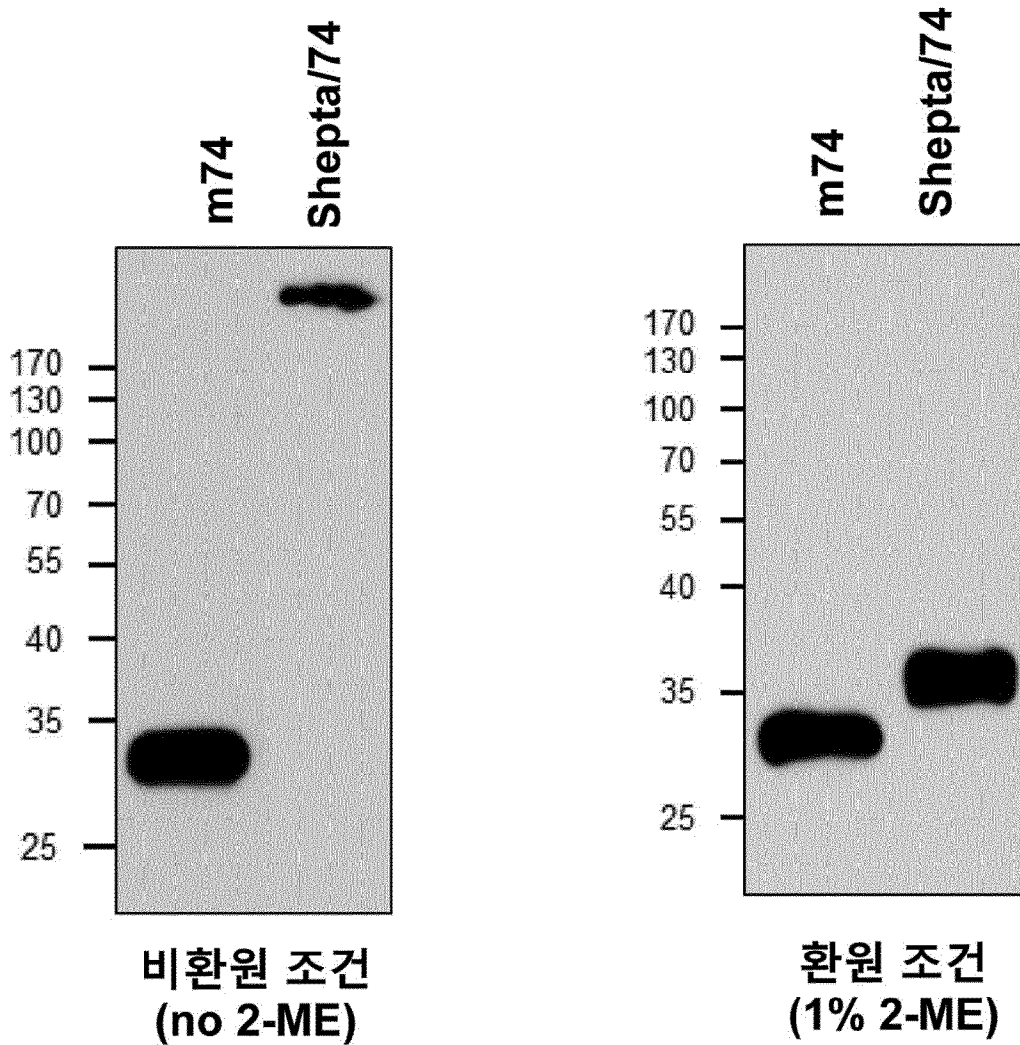
[도2]



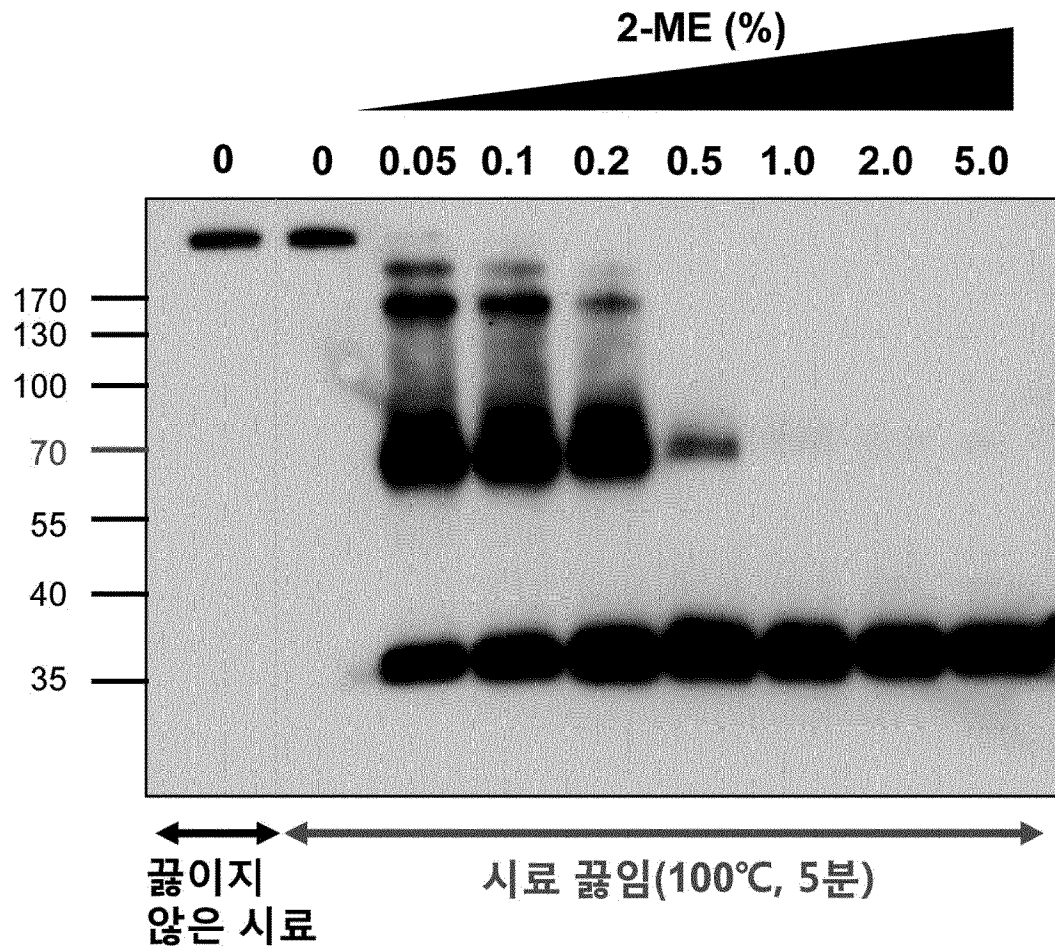
[도3]



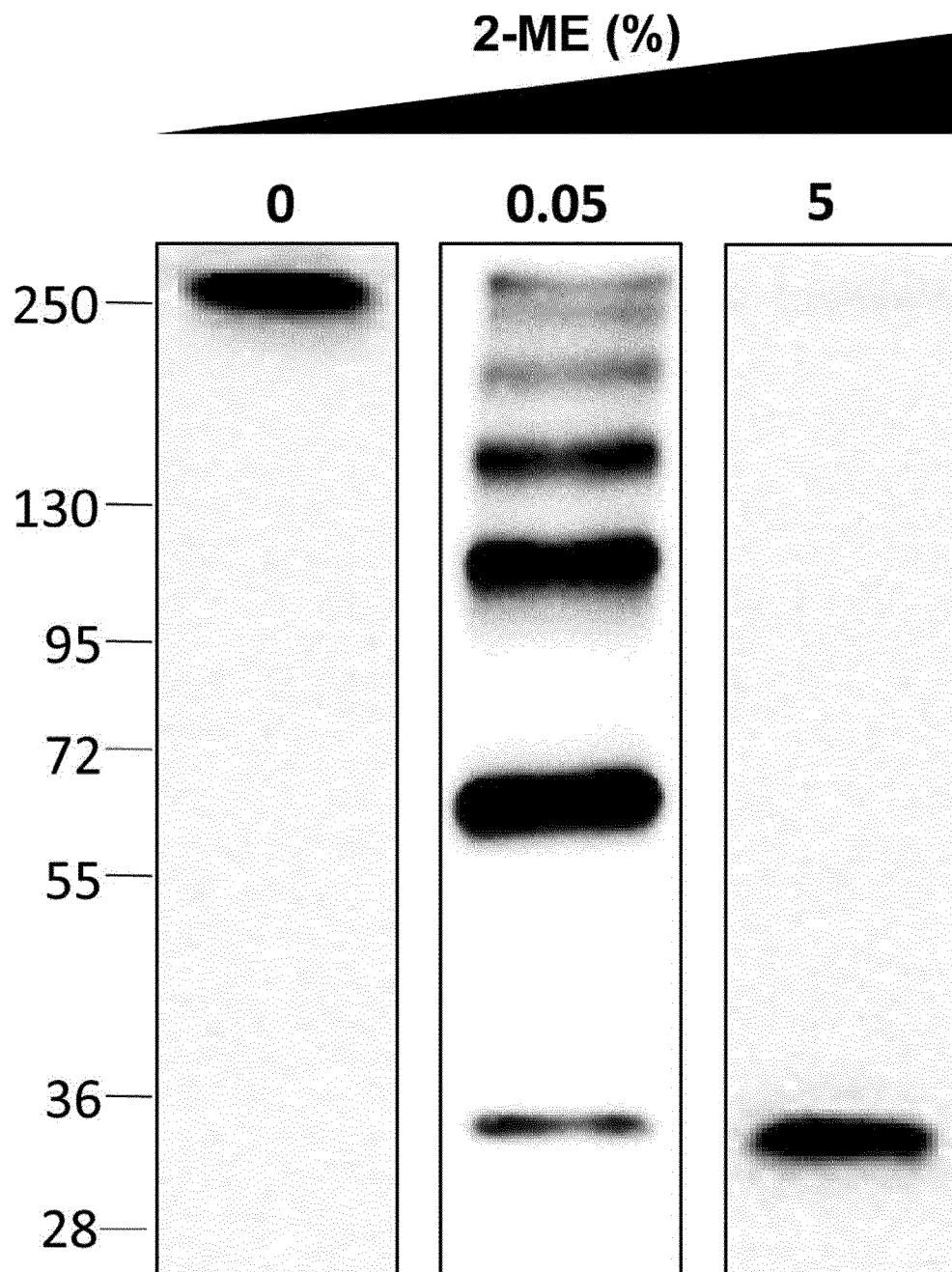
[도4]



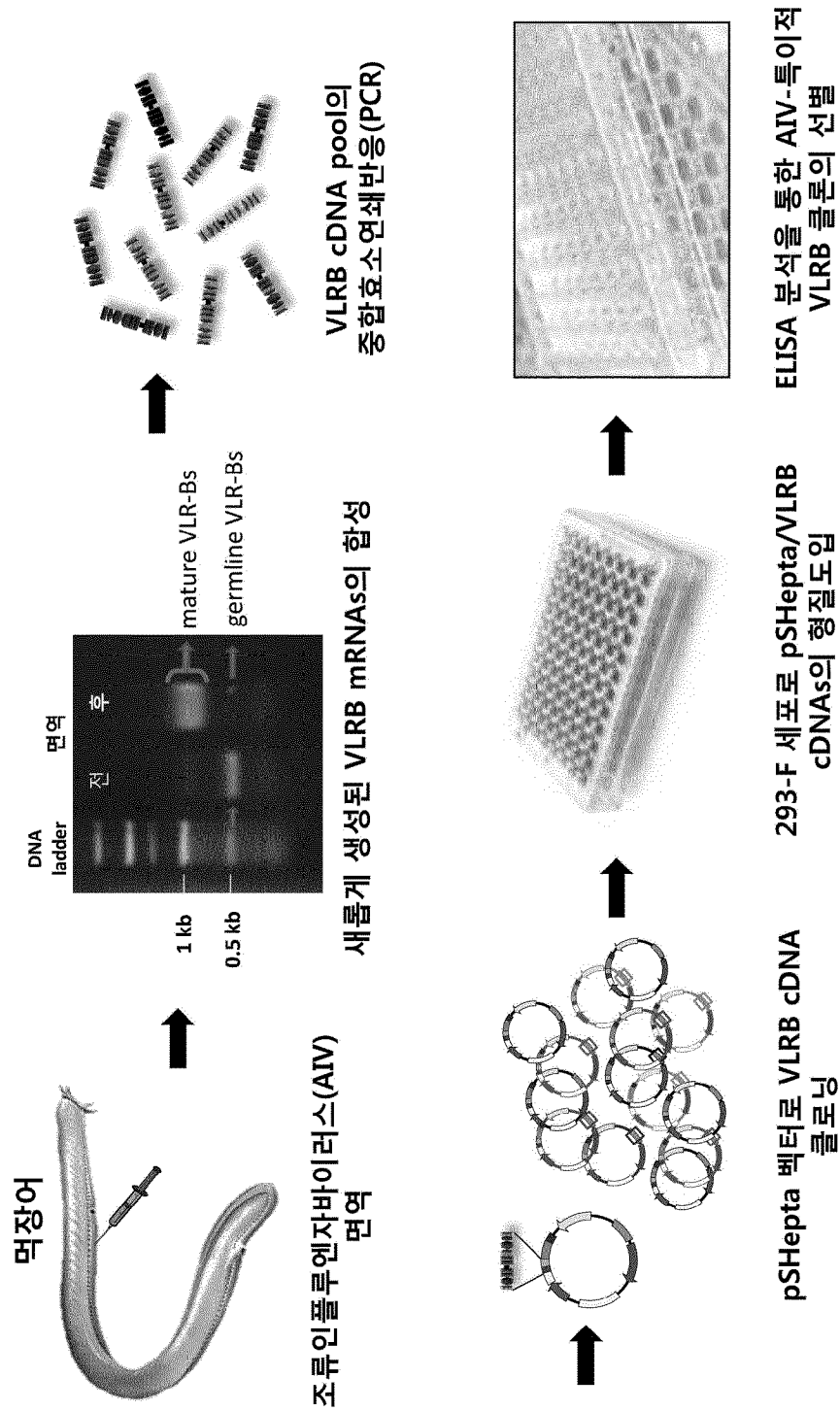
[도5]



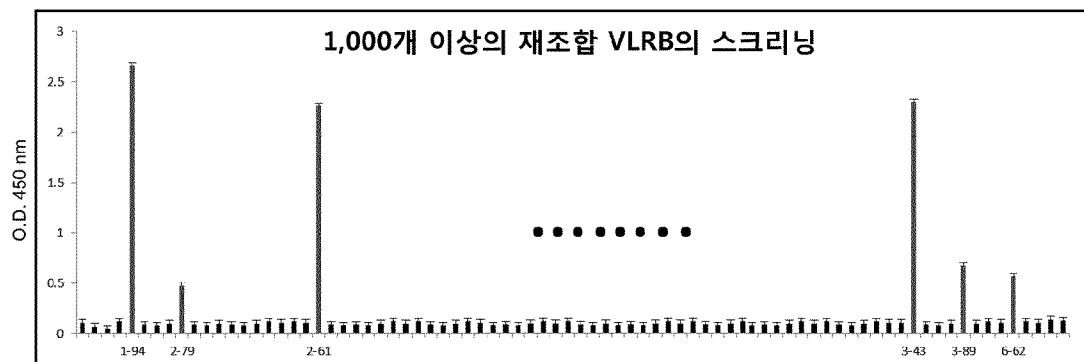
[도6]



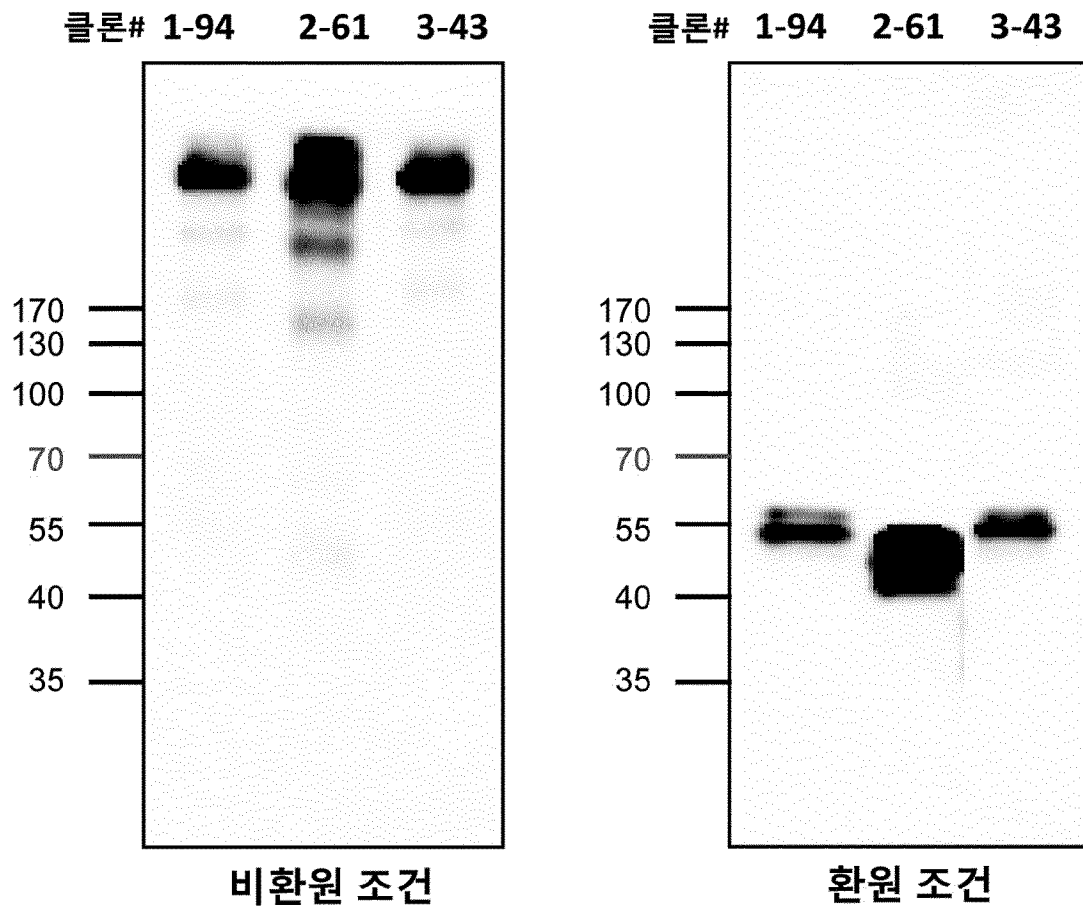
[도7]



[도8]

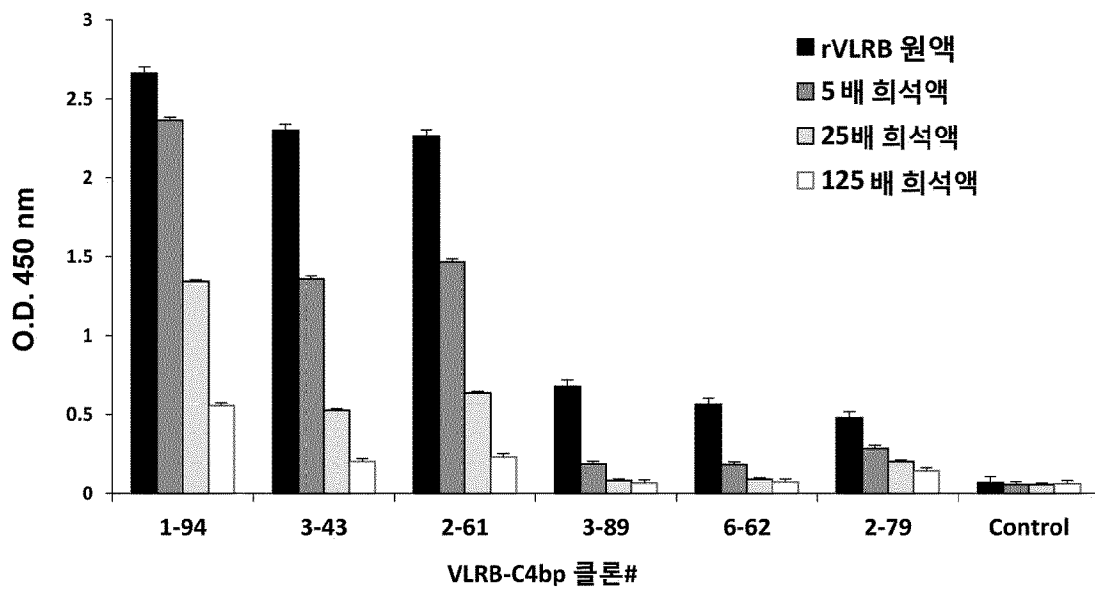


[도9]

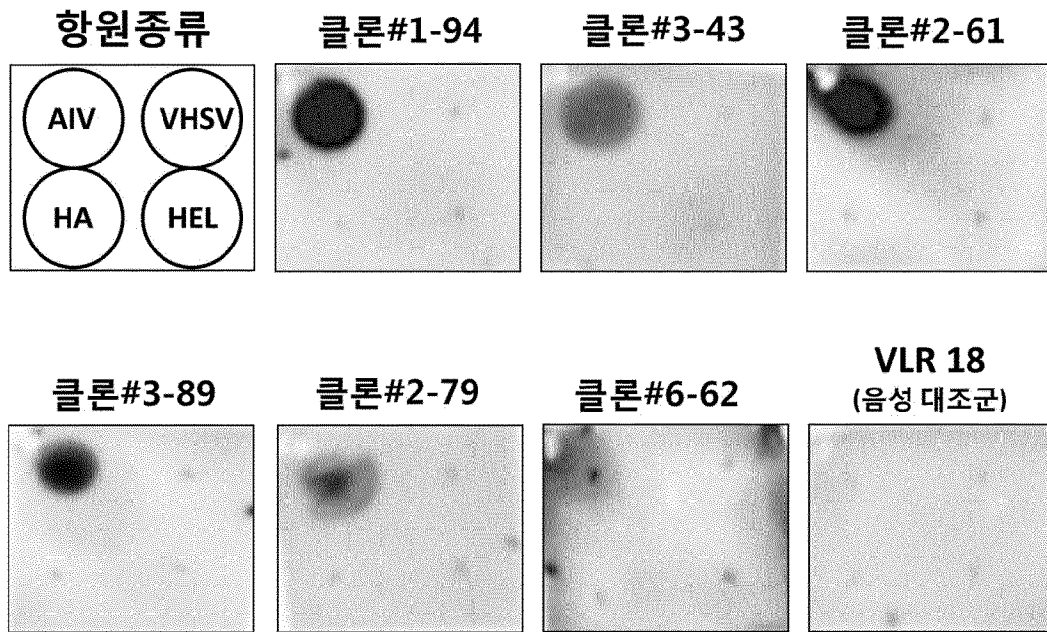


[도10]

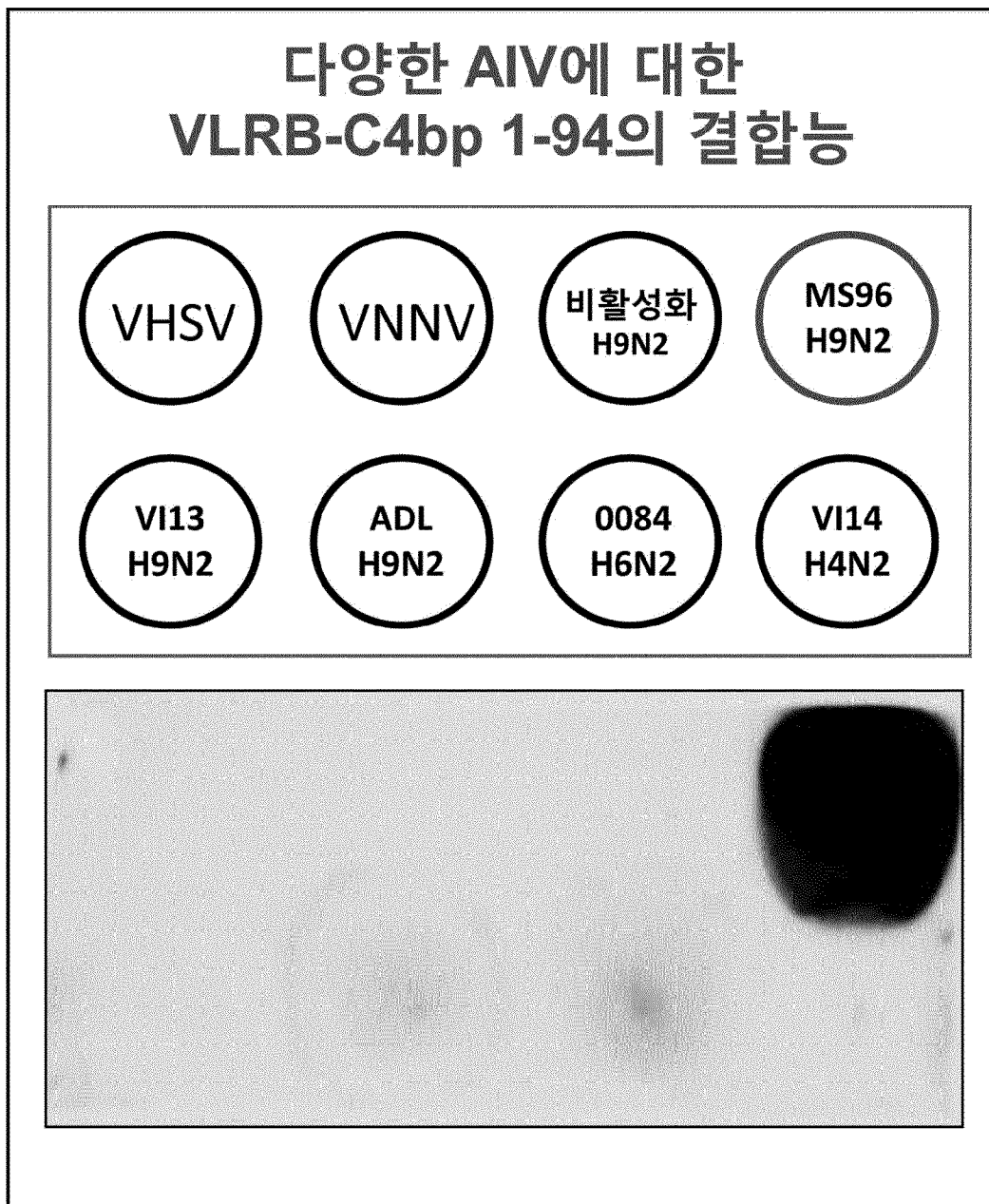
AIV-특이적 VLRB-C4bp 클론의 항원 결합능



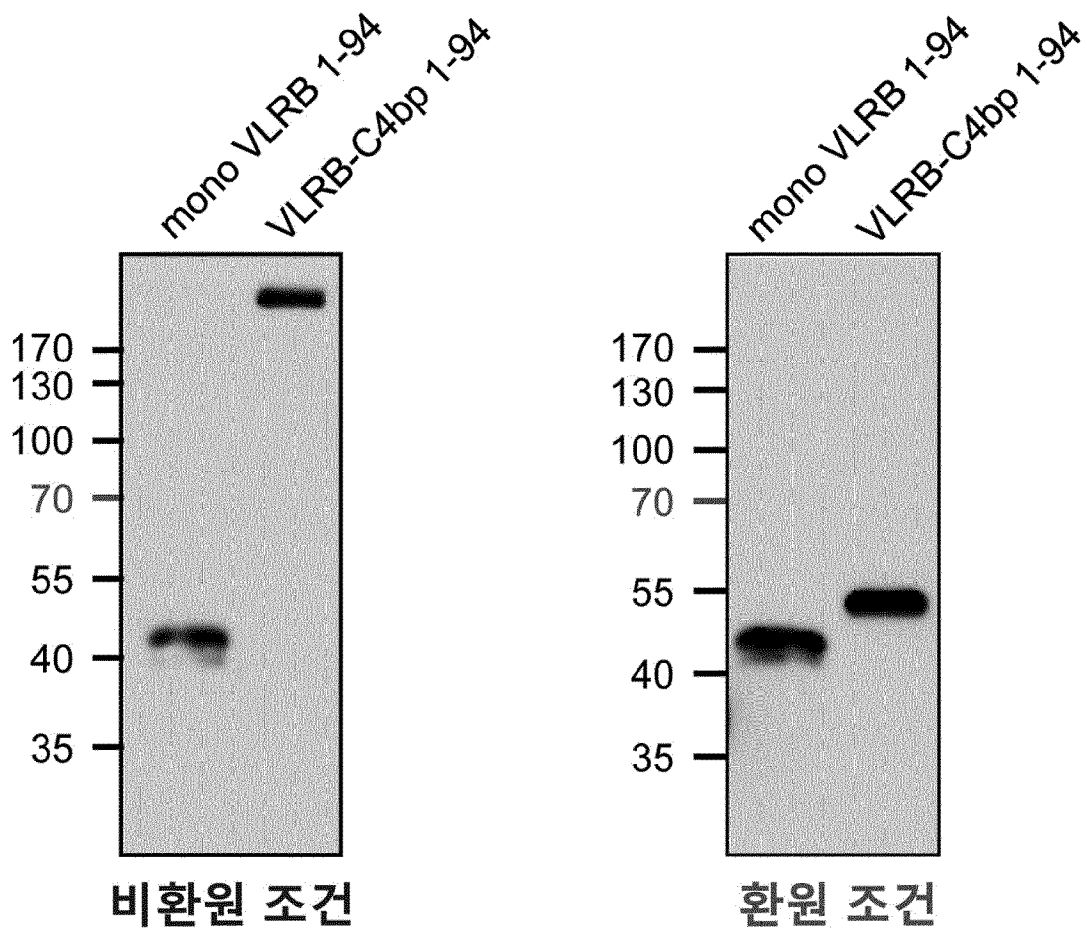
[도11]



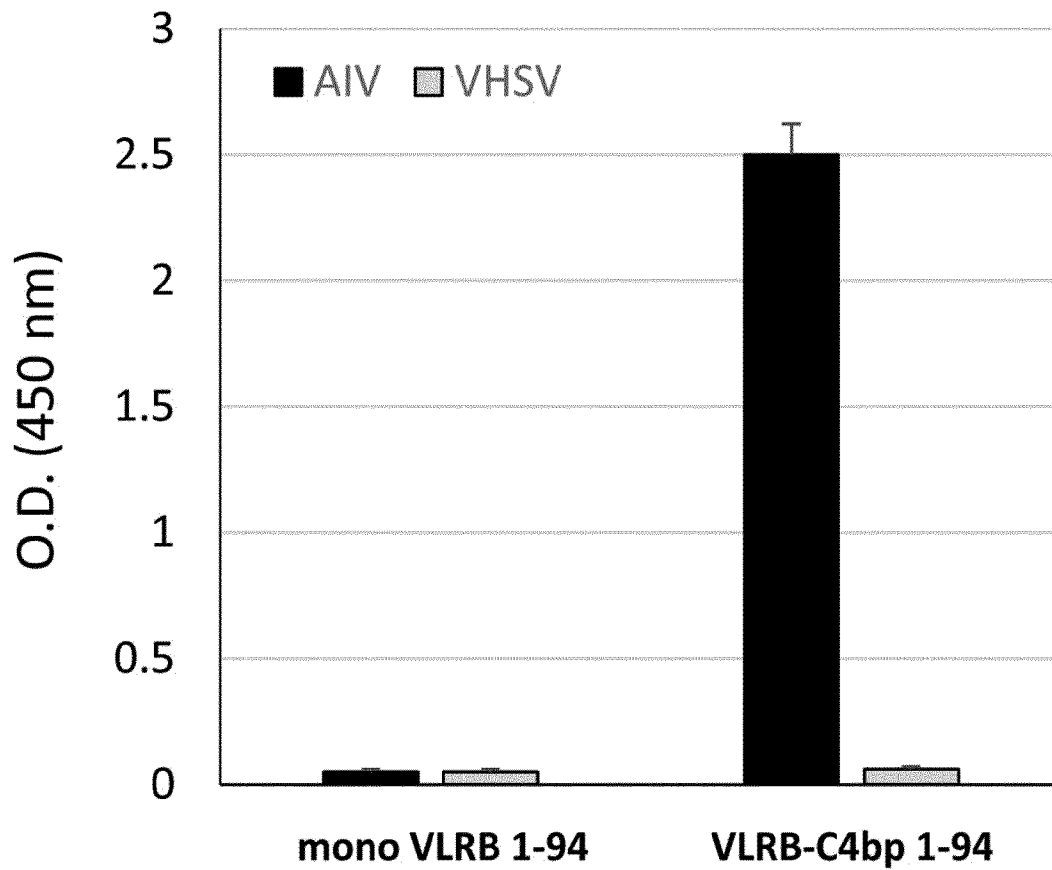
[도12]



[도13]



[도14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/004463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/725(2006.01)i, C07K 14/47(2006.01)i, C07K 16/46(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/725; C07K 16/10; A61K 49/00; C07K 14/705; C07K 14/195; C07K 16/12; C12Q 1/68; C07K 14/47; C07K 16/46; G01N 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: hydrophobic tail domain, inshore hagfish-derived VLRB, C4bp, multivalent antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, Jungseok et al., "Generation of Hagfish VLRB Antibody against Glycoprotein of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV)", In: Advanced Veterinary Medicine from Bench to Clinical Applications, The Korean Society of Veterinary Science 2016 Spring Symposium, vol. 56, supplement no. 1, pages 1-147 See page 133.	1-9
A	US 2016-0376348 A1 (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 29 December 2016 See the entire document.	1-9
A	HERRIN, Brantley R. et al., "Alternative Adaptive Immunity in Jawless Vertebrates", The Journal of Immunology, 2010, vol. 185, pages 1367-1374 See the entire document.	1-9
A	US 2014-0088292 A1 (KIM, Hak Sung et al.) 27 March 2014 See the entire document.	1-9
A	US 2011-0165584 A1 (PANCER, Zeev et al.) 07 July 2011 See the entire document.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 AUGUST 2018 (06.08.2018)

Date of mailing of the international search report

06 AUGUST 2018 (06.08.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/004463

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2016-0376348 A1	29/12/2016	AU 2013-242811 A1	31/10/2013
		AU 2016-203994 A1	30/06/2016
		CA 2659574 A1	07/02/2008
		CA 2659574 C	25/04/2017
		EP 2049564 A2	22/04/2009
		EP 2049564 B1	17/05/2017
		JP 2009-545322 A	24/12/2009
		US 2012-0189640 A1	26/07/2012
		WO 2008-016854 A2	07/02/2008
		WO 2008-016854 A3	20/03/2008
US 2014-0088292 A1	27/03/2014	KR 10-2012-0107741 A	04/10/2012
		US 9441017 B2	13/09/2016
		WO 2012-128577 A2	27/09/2012
		WO 2012-128577 A3	24/01/2013
		WO 2012-128580 A1	27/09/2012
US 2011-0165584 A1	07/07/2011	AU 2005-326817 A1	10/08/2006
		AU 2005-326817 B2	19/04/2012
		CA 2564251 A1	10/08/2006
		CA 2564251 C	10/04/2018
		EP 1773872 A2	18/04/2007
		EP 1773872 B1	15/03/2017
		EP 3225633 A1	04/10/2017
		JP 2008-500064 A	10/01/2008
		JP 2011-206060 A	20/10/2011
		US 2012-0107929 A1	03/05/2012
		US 8039588 B2	18/10/2011
		US 8212018 B2	03/07/2012
		WO 2006-083275 A2	10/08/2006
		WO 2006-083275 A3	28/12/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/725(2006.01)i, C07K 14/47(2006.01)i, C07K 16/46(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/725; C07K 16/10; A61K 49/00; C07K 14/705; C07K 14/195; C07K 16/12; C12Q 1/68; C07K 14/47; C07K 16/46; G01N 33/53

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 소수성 테일 도메인, 먹장어 유래 VLRB, C4bp, 다가 항체

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LEE, JUNGSEOK 등, 'Generation of hagfish VLRB antibody against glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)' In: 최신 수의학의 기초에서 임상으로의 적용, (사)대한수의학회 2016년도 춘계학술심포지움, 56권, 1호 부록, 페이지 1-147 페이지 133 참조.	1-9
A	US 2016-0376348 A1 (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 2016.12.29 전체 문헌 참조.	1-9
A	HERRIN, BRANTLEY R. 등, 'Alternative adaptive immunity in jawless vertebrates' The Journal of Immunology, 2010, 185권, 페이지 1367-1374 전체 문헌 참조.	1-9
A	US 2014-0088292 A1 (KIM, HAK SUNG 등) 2014.03.27 전체 문헌 참조.	1-9
A	US 2011-0165584 A1 (PANCER, ZEEV 등) 2011.07.07 전체 문헌 참조.	1-9

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 08월 06일 (06.08.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 08월 06일 (06.08.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

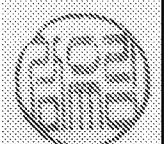
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2016-0376348 A1	2016/12/29	AU 2013-242811 A1 AU 2016-203994 A1 CA 2659574 A1 CA 2659574 C EP 2049564 A2 EP 2049564 B1 JP 2009-545322 A US 2012-0189640 A1 WO 2008-016854 A2 WO 2008-016854 A3	2013/10/31 2016/06/30 2008/02/07 2017/04/25 2009/04/22 2017/05/17 2009/12/24 2012/07/26 2008/02/07 2008/03/20
US 2014-0088292 A1	2014/03/27	KR 10-2012-0107741 A US 9441017 B2 WO 2012-128577 A2 WO 2012-128577 A3 WO 2012-128580 A1	2012/10/04 2016/09/13 2012/09/27 2013/01/24 2012/09/27
US 2011-0165584 A1	2011/07/07	AU 2005-326817 A1 AU 2005-326817 B2 CA 2564251 A1 CA 2564251 C EP 1773872 A2 EP 1773872 B1 EP 3225633 A1 JP 2008-500064 A JP 2011-206060 A US 2012-0107929 A1 US 8039588 B2 US 8212018 B2 WO 2006-083275 A2 WO 2006-083275 A3	2006/08/10 2012/04/19 2006/08/10 2018/04/10 2007/04/18 2017/03/15 2017/10/04 2008/01/10 2011/10/20 2012/05/03 2011/10/18 2012/07/03 2006/08/10 2006/12/28