(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0122283
(43) 공개일자 2019년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) *G01N 33/532* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/10 (2013.01)
G01N 33/532 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0045651
(22) 출원일자 2018년04월19일
심사청구일자 2018년04월19일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
권형주
충청북도 청주시 상당구 월평로 189 103동 506호(용암동,용암현대1차아파트)
박병권
강원도 춘천시 후석로228번길 24 석사2지구아파트 209동 102호
(74) 대리인
구현서

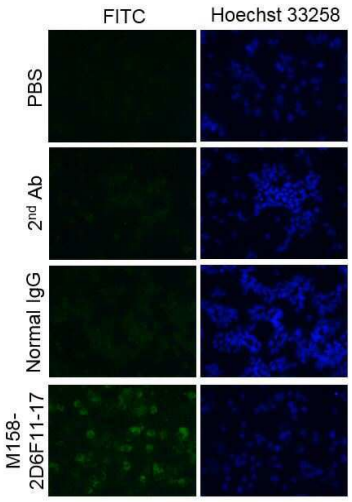
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **메르스 코로나바이러스 단백질에 특이적인 단클론 항체 및 그 용도**

(57) 요 약

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

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
G01N 33/56983 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
G01N 2333/165 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016M3A9B6916708
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 중동호흡기증후군 면역치료를 위한 타겟 발굴 및 후보물질 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2016.07.01 ~ 2021.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)의 단백질 또는 그 단백질의 일부를 특이적으로 인지하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편에 있어서,

상기 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편은 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편:

서열번호 1로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 및

서열번호 4로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 단클론 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 기능적 단편은 단일 측쇄 항체(scFv)인 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 기능적 단편은 항원결합 분절(Fab)인 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 기능적 단편은 제1항의 CDR부위를 포함하는 경쇄 또는 중쇄인 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 기능적 단편은 제1항의 CDR부위를 포함하는 가변 도메인(Variable domain)인 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 단클론 항체는 서열번호 7로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄인 것을 특징으로 하는 단클론 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)의 단백질는 M 단백질인 것을 특징으로 하는 단클론 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 M 단백질의 일부는 서열번호 9로 기재되는 펩타이드 서열인 것을 특징으로 하는 단클론 항체.

청구항 9

서열번호 9로 기재되는 펩타이드 서열을 에피토프로 인식하는 단클론 항체.

청구항 10

리포좀 내에 동시캡슐화된 메르스 코로나바이러스 유래 에피토프 펩타이드 및 CpG-DNA 복합체를 동물에 주사하

여 메르스 코로나바이러스를 인식하는 단클론 항체를 제조하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 메르스 코로나바이러스 유래 에피토프 펩타이드는 서열번호 9로 기재되는 펩타이드 서열인 것을 특징으로 하는 단클론 항체를 제조하는 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항의 제조방법에 의하여 제조된 단클론 항체.

청구항 13

제1항의 단클론 항체에 표지 물질을 접합한 컨쥬게이트를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 표지물질은 효소, 루시퍼레이즈, 자성입자, 형광물질 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

1) 샘플과 제1항, 제9항 또는 제12항의 단클론 항체를 접촉시키는 단계; 및

2) 상기 단클론 항체를 시료 샘플과 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는

대상체의 메르스 코로나바이러스 감염 여부에 대한 정보제공방법.

청구항 16

1) 제1항, 제9항 또는 제12항의 단클론 항체; 및

2) 용기를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 키트.

청구항 17

1) 제13항의 조성물; 및

2) 용기를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

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

배 경 기 술

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

[0003] 메르스(MERS, 중동호흡기증후군)는 잠복기가 1주일 가량이며 발열을 동반한 기침, 호흡곤란, 숨가쁨, 가래 등 호흡기 증상을 주로 보이며 그 이외에도 두통, 오한, 콧물, 근육통뿐만 아니라 식욕부진, 메스꺼움, 구토,복통, 설사 등 소화기 증상도 나타날 수 있다. 다만 사스와는 달리 급성 신부전증을 동반한다. 사스보다 치사율이 6배 가량 높다는 조사 결과가 나오기도 하는 등 더 치명적인 양상을 보이고 있다. 연령대에 따라 치사율은 50%가 넘는다. 현재까지 중동호흡기증후군 바이러스 치료를 위한 항바이러스제는 개발되지 않았고 증상에 대한 치료를 위주로 하게 되며 중증의 경우 인공호흡기나 인공혈액투석 등을 받아야 되는 경우도 있다.

[0004] 명확한 감염원과 감염경로는 확인되지 않았으나, 중동 지역의 낙타와의 접촉을 통해 감염될 가능성이 높고 사람

간 밀접접촉에 의한 전파가 가능하다고 보고되었다.

[0005] MERS-CoV는 코로나바이러스 중에서 베타코로나바이러스의 일종으로, 유전자 길이는 다양하지만 약 30 kb에 해당하며, 11개의 ORF(open reading frame)를 지닌다. MERS-CoV의 구조 단백질은 S(spike), E(envelope), M(membrane) 및 NP(nucleocapsid) 단백질이 존재한다.

[0006] MERS-CoV의 진단은 유전자 진단과 항원-항체 진단으로 분류되는데, 현재 WHO가 추천하는 표준 진단법은 콧물(nasal swap) 검체로부터의 바이러스 유전자 특이적 프라이머(primer)를 이용한 PCR이나 유전자 염기서열 분석에 의한 것이다. MERS-CoV의 항체 진단법은 NP 항원에 대한 항체 진단 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay, 효소면역흡착법)법이 시행되고 있으며, Euroimmun사(독일)에서 개발된 항체 진단 키트는 낙타의 MERSCoV를 진단하는 용도로 사용되고 있다. 그러나 아직까지 인간 항원-항체 진단 키트로 개발된 제품은 없다.

[0007] 한국등록특허 제1593641호에서는 '중동호흡기증후군 코로나바이러스 뉴클레오캡시드를 인식하는 항체 및 그의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0832870호에서는 '사스 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단클론항체 및 이것의 용도'가 개시되어 있으나, MERS-CoV의 M 단백질에 대한 항체는 개시되어 있지 않다.

[0008] [선행 특허 문헌]

[0009] 대한민국 공개특허 10-2016-0145813

발명의 내용

해결하려는 과제

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

[0012] 본 발명의 다른 목적은 MERS-CoV의 M 단백질에 대하여 특이적인 단클론 항체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)의 단백질 또는 그 단백질의 일부를 특이적으로 인지하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편에 있어서,

[0014] 상기 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편은 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편:

[0015] 서열번호 1로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 및

[0016] 서열번호 4로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 단클론 항체를 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 기능적 단편은 단일 측쇄 항체(scFv), 항원결합 분절(Fab), 본 발명의 CDR부위를 포함하는 경쇄 또는 중쇄인 것이 바람직하고, 상기 기능적 단편은 제1항의 CDR부위를 포함하는 가변도메인(Variable domain)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 단클론 항체는 서열번호 7로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)의 단백질는 M 단백질인 것이 바람직하고, 상기 M 단백질의 일부는 서열번호 9로 기재되는 펩타이드 서열인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0020] 또 본 발명은 서열번호 9로 기재되는 펩타이드 서열을 에피토프로 인식하는 단클론 항체를 제공한다.

[0021] 또한 본 발명은 리포좀 내에 동시캡슐화된 메르스 코로나바이러스 유래 에피토프 펩타이드 및 CpG-DNA 복합체를 동물에 주사하여 메르스 코로나바이러스를 인식하는 단클론 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 메르스 코로나바이러스 유래 에피토프 펩타이드는 서열번호 9로 기재되는

펩타이드 서열인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0023] 또 본 발명은 상기 본 발명의 제조방법에 의하여 제조된 단클론 항체를 제공한다.

[0024] 또 본 발명은 상기 본 발명의 단클론 항체에 표지 물질을 접합한 컨쥬게이트를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 표지물질은 효소, 루시퍼레이즈, 자성입자, 형광물질 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0026] 또 본 발명은 1) 샘플과 본 발명의 단클론 항체를 접촉시키는 단계; 및

[0027] 2) 상기 단클론 항체를 시료 샘플과 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는

[0028] 대상체의 메르스 코로나바이러스 감염 여부에 대한 정보제공방법을 제공한다.

[0029] 또 본 발명은 상기 본 발명의 단클론 항체; 및 용기를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 키트를 제공한다.

[0030] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 조성물; 및 용기를 포함하는 메르스 코로나바이러스 진단용 키트를 제공한다.

[0031] 본 발명은 상기 단클론항체를 시료 샘플과 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 메르스 코로나바이러스 검출방법을 제공한다.

[0032] 본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란, 시료 중의 MERS-CoV M 항원과 이를 인지하는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 절편의 결합물을 의미하며, 이러한 항원-항체 복합체는 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 군에서 선택되는 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 그러나 반드시 이들로만 제한되지 않고 다양한 응용과 적용이 가능하다.

[0033] 본 발명에서는 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러가지 표지체를 사용할 수 있다. 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 방사성 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있으며, 반드시 이들로만 한정되는 것은 아니다.

[0034] 검출 표지체로서 사용되는 바람직한 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β-D-갈락토시다제,호스래디쉬 퍼옥시다제 또는 β-락타마제가 있으며, 바람직한 형광물로는 플루오레세인, Eu3+, Eu3+ 킬레이트 또는 크립테이트가 있으며, 바람직한 리간드로는 바이오틴 유도체가 있고, 바람직한 발광물로는 아크리디늄 에스테르 또는 이소루미놀 유도체가 있으며, 바람직한 미소입자로는 콜로이드 금 또는 착색된 라텍스가 있고, 바람직한 방사성 동위원소로는 57Co,3H,125I 또는 125I-볼톤(Bolton) 헌터(Hunter) 시약이 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0035] 항원-항체 복합체를 검출하는 방법은 바람직하게는 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 효소면역흡착법은 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 이차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다.

[0036] 상기 단클론항체 또는 이의 절편은 검출 표지체를 가질 수 있으며, 검출 표지체를 가지지 않을 경우는 이들 단일클론 항체 또는 이의 절편을 포획할 수 있고, 검출 표지체를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 단클론항체를 포함하는 메르스 코로나바이러스 검출용 키트를 제공한다.

[0038] 본 발명의 검출용 키트는 상기 단클론항체, 기질과 반응하여 발색하는 표지체와 축합된 항체 및 발색기질을 포함한다 본 발명의 검출용 키트에서 상기 단클론항체는 기판에 흡착된 상태로 제공될 수 있다 상기 기판으로는 PVDF 막, 플레이트 및 슬라이드가 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다 표지체로는 HRP, 발색기질로는 TMB가 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다 또한, 상기 검출용 키트는 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그

이상의 다른 구성성분을 가진 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 메르스 코로나바이러스 M 항원에 특이적인 단클론 항체를 이용하여 사람에서 메르스를 진단하기 위한 검출용 키트를 제공한다 검출용 키트의 최종 검출방법으로는 면역크로마토그래피법 래피드 진단법, 효소면역흡착법(ELISA) 또는 웨스턴 블롯이 이용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 바람직하게는 본 발명의 검출용 키트에 사용되는 검출방법은 면역크로마토그래피법(immunochromatography) 및 효소면역흡착법일 수 있다.

[0040] 상기 면역크로마토그래피법을 이용한 메르스 코로나바이러스 검출용 키트는 시료를 주입하는 시료 주입부; 상기 시료 주입부로부터 일정 간격이 이격된 지점에 위치하는 메르스 코로나바이러스 M 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단클론항체가 결합된 금 축합체를 포함하는 결합부; 상기 결합부로부터 일정 간격이 이격된 위치에 메르스 코로나바이러스 M 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단클론항체가 고정된 검사선(test line); 및 항-마우스 IgG가 고정된 대조선(control line)이 순차적으로 구비되는 것이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 검출용 키트는 스트립 형태의 나이트로셀룰로오스 멤브레인에 유리섬유(glass fiber), 코튼(cotton) 또는 셀룰로오스 재질의 패드를 결합시켜서 시료를 투입할 수 있는 시료주입부이 구비되고, 상기 시료 주입부로부터 일정 간격을 유지하면서 콜로이드 골드(Colloidal gold)-메르스 코로나바이러스 항체가 축합된 복합체가 건조된 축합 패드, 상기 메르스 코로나바이러스 항체와 동일한 항원을 검출할 수 있는 다른 항체가 고정된 검사선 및 상기 축합 패드에 존재하는 단클론항체를 검출할 수 있는 이차 항체가 고정된 대조선이 순차적으로 구비된 면역스트립일 수 있다.

[0042] 상기 면역크로마토그래피법 진단법은 상기 메르스 코로나바이러스 검출용 건조 조성물을 적용한 키트를 제작하여 사용하는 것으로 안정하여 장기간 보관하는 것이 가능하다.

[0043] 상기 메르스 코로나바이러스 검출용 키트에 메르스 코로나바이러스를 함유하는 것으로 의심되는 시료를 투입하여 상기 테스트 스트립의 검사선과 대조선에 붉은 자주빛띠가 나타나면 메르스 코로나바이러스 감염을 양성으로 판정하고, 대조선에만 붉은 자주빛띠가 나타나면 메르스 코로나바이러스 감염을 음성으로 판정할 수 있다.

[0044] 또한, 교차반응(cross reaction) 검사에서 타호흡기바이러스 바이러스를 적용하여 검사결과가 음성으로 나오는 것을 판독하여, 검사가 타호흡기바이러스와 얼마나 교차성이 없는지를 확인할 수 있다.

[0045] 효소면역항체법을 이용한 키트의 경우, 본 발명의 단클론 항체가 코팅된 플레이트의 각 웰에 메르스 의심환자로부터 채취된 검체를 반응시키고, HRP(Horseradish peroxidase)-축합 MERS-CoV M 항원 특이 단클론항체를 첨가한 후, TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 기질용액을 각 웰에 처리하여 발색반응을 흡광도로 측정하는 것으로 구성된다 바람직하게는, 본 발명의 검출용 키트는 사람 코로나바이러스로부터 메르스의 감별진단을 위한 특이적인 단클론 항체를 이용하며 양성대조군 및 정량적 분석이 가능하도록 재조합 M 항원을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 상기 진단용 조성물은 본 발명의 단클론 항체 및 면역학적 분석에 사용되는 시약이 포함될 수 있다. 면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 항원-항체 결합을 원리로 하는 공지의 모든 정량분석방법에 사용되는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 상기 정량분석방법의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 면역블롯팅, 면역침전법, 효소면역분석법, 단백질 칩, 래피트 어세이 및 마이크로 어레이 방법 등이 있다.

[0047] 상기에서 적합한 담체로는 이에 한정되지는 않으나 가용성 담체, 예컨대 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액들 중 어느 한 가지(예를 들어, PBS) 또는 불용성 담체, 예컨대 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교덱스트란, 폴리사카라이드, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0048] 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지로는 효소, 형광물질, 발광물질 및 방사성 물질 등을 사용할 수 있다. 효소로는 과산화효소(peroxidase), 알카라인 포스파타제(alkaline phosphatase), β-D-갈락토시다아제, 글루코스 옥시다아제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을사용할 수 있으며, 형광물질로는 플루오르신 이소티옥시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 피코빌린(phycobilin) 단백질, 로다민(rhodamine), 피코에리트린(phycoerythrin), 피코시아닌(phycocyanin) 및 오르토프탈릭 알데히드(orthophthalic aldehyde)등을 사용할 수 있다. 발광물질로는 이소루미놀(isolumino), 루시게닌(lucigenin) 등을 사용할 수 있으며, 방사성 물질로는 131I, 14C, 3H 등을 사용할 수 있다. 그러나, 상기 예시된 것들 외에 면

역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명의 기능적 항체 단편으로는 경쇄, 중쇄, 가변 영역, Fab, Fab', F(ab') 2 , scFv, Diabody, Tribody, dsFv, CDR을 함유하는 펩타이드 등을 들 수 있다.

[0050] Fab는 IgG를 단백질 분해효소 파파인으로 처리하여 수득되는 단편중(H쇄의 224번째의 아미노산 잔기로 절단된다),H쇄의 N 말단측 약 절반과 L쇄 전체가 디설파이드 결합(S-S 결합)으로 결합된 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0051] 본 발명의 Fab는 본 발명의 항체를 단백질 분해효소 파파인으로 처리하여 수득할 수 있다. 또는 당해 항체의 Fab를 암호화하는 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하고, 당해 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 발현시켜 Fab를 제조할 수 있다.

[0052] F(ab')2 는 IgG를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 수득되는 단편중(H쇄의 234번째의 아미노산 잔기로 절단된다), Fab가 힌지영역의 S-S 결합을 개재하여 결합된 것보다 약간 큰 분자량 약 10만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0053] 본 발명의 F(ab') 2 는 본 발명의 항체를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 수득할 수 있다. 또는 하기의 Fab'를 티오에테르 결합 또는 S-S 결합시켜 작제할 수 있다.Fab'는 상기 F(ab') 2 의 힌지영역의 S-S 결합을 절단한 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0054] scFv는 1개의 VH와 1개의 VL을 12잔기 이상의 적당한 펩타이드 링커(P)를 사용하여 연결한 VH-P-VL 내지는 VL-P-VH 폴리펩타이드로, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0055] 본 발명의 scFv는 본 발명의 항체의 VH 및 VL을 암호화하는 cDNA를 수득하고, scFv를 암호화하는 DNA를 작제하며 당해 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하여 당해 발현 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.

[0056] Diabody는 항원 결합 특이성이 동일하거나 상이한 scFv가 이량체를 형성한 항체 단편이고, 동일한 항원에 대한 2가의 항원 결합 활성 또는 상이한 항원에 대한 2특이적인 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0057] 본 발명의 Diabody는 예를 들면, 본 발명의 항체의 VH 및 VL을 암호화하는 cDNA를 수득하고, 3 내지 15 잔기의 폴리펩타이드 링커를 갖는 scFv를 암호화하는 DNA를 작제하며 당해 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하여 당해 발현벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 Diabody를 발현시켜 제조할 수 있다.

[0058] 또한, linker P 길이가 3-10 일 때는 tribody가 형성되어, tribody로 포함할 수 있다.

[0059] dsFv는 VH 및 VL 중 각각 하나의 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 폴리펩타이드를 당해 시스테인 잔기간의 S-S 결합을 개재하여 결합시킨 것을 말한다. 시스테인 잔기로 치환되는 아미노산 잔기는 Reiter 등에 의해 기재된 방법[참조: Protein Engineering, 7, 697(1994)]에 따라서 항체의 입체구조 예측에 근거하여 선택할 수 있다.

발명의 효과

[0061] 본 발명자들은 펩타이드-에피토프 기반 면역화로 MERS-CoV M 단백질에 특이적인 단클론항체를 생산하는 하이브리도마 클론을 선택해서, 그 단클론 항체가 MERS-CoV M 단백질을 특이적으로 인지한다는 것을 확인하였고, MERS-CoV-감염된 세포를 관찰하였다. MERS 환자들 혈청에서 본 발명으 단클론항체를 사용하는 IFA는 진단에 중요할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 MERS-CoV M 단백질의 B 세포 에피토프 및 MERS-CoV M158 에피토프-특이적인 항체의 생산에 대한 그림.

(A) MERS-CoV M 단백질의 1차 구조를 나타낸 그림. MERS-M158은 MERS-CoV M 단백질에 대한 B 세포 에피토프 서열을 나타낸다. B 세포 에피토프는 에피토프 예측, 표면 접근성 및 항원성 지수에 기반하여 예측하였다. C, cytoplasmic 도메인. TM, transmembrane 도메인.

(B) 마우스에서 MERS-M158 에피토프-특이적인 항체의 생산을 나타낸 그림. BALB/c 마우스를 B-세포 에피토프 펩타이드(MERS-M158) 및 DOPE:CHEMS 복합체에 동시 캡슐화된 CpG-DNA로 면역화하였다. 3회 면역화 후, 혈청을 MERS-CoV M158 에피토프-특이적인 항체의 생산에 대하여 ELISA로 분석하였다.

도 2는 항- MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 클론의 스크리닝 그림.

(A) BALB/c 마우스 3마리를 10일 간격으로 DOPE:CHEMS 복합체에 동시캡슐화된 MB-ODN 4531(O) 및 MERS-M158 펩타이드로 i.p. 면역화하였다. MERS-M158 펩타이드 면역화된 마우스의 지라세포를 사용한 세포 융합 실험의 1차 스크리닝(HAT medium)의 ELISA 결과.

(B) 하이브리도마 클론을 HT 배지에서 리미팅 희석 방법에 의한 서브클로닝을 수반하는 단클론항체의 생산을 위하여 선택함.

도 3은 MERS-M158 에피토프-특이적인 단클론 항체의 정제 및 특성을 나타낸 그림.

(A) 복수(ascites)의 적정 곡선. 2D6F11 클론을 복수의 생산을 위하여 pristane-primed 마우스로 주사하였다. Production of MERS-M158 에피토프-특이적인 단클론 항체의 생산을 ELISA로 MERS-M158 에피토프 펩타이드-코팅된 플레이트를 사용하여 확인하였다.

(B) MERS-M158 에피토프-특이적인 단클론 항체의 정제. M158-2D6F11 단클론 항체를 단백질 agarose column 크로마토그래피로 복수로부터 정제하여서, SDS-PAGE로 분석하였다. R, 환원 조건. NR, 비환원 조건.

(C) isotype의 결정. ELISA를 MERS-M158 에피토프-특이적인 M158-2D6F11 단클론 항체의 아이소타입을 동정하기 위하여 수행하였다.

(D) EC50 값의 결정. M158-2D6F11단클론 항체의 MERS-M158 에피토프 펩타이드 결합 능력을 ELISA로 평가하였다.

도 4는 M158-2D6F11 단클론 항체의 특성화를 위한 웨스턴 블럿 및 면역침전을 나타낸 그림. Vero 세포 및 MERS-CoV-감염된 Vero 세포를 파쇄 버퍼로 추출한 후 그 파쇄액을 PBS (-) 또는 PNGase F (+)로 처리하였다.

(A) 파쇄액을 MERS-M158 에피토프-특이적인 M158-2D6F11 단클론 항체를 사용한 웨스턴 블럿팅으로 분석하였다.

(B) 파쇄액을 MERS-M158 에피토프-특이적인 M158-2D6F11단클론 항체로 면역침전하고, MERS-M158 에피토프-특이적인 M158-2D6F11단클론 항체로 웨스턴 블럿팅을 수행하였다.

(C) 파쇄액을 anti-β-actin 항체를 대조군으로 사용한 웨스턴 블럿팅으로 분석하였다.

도 5는 하이브리도마 세포 클론 M158-2D6F11으로부터 분리된 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인의 cDNA 서열.

(A) 중쇄 가변 도메인의 서열.

(B) 경쇄 가변 도메인의 서열.

예측된 아미노산 서열을 cDNA 서열 밑에 기재함.

도 6은 간접 면역형광 어세이를 나타낸 그림. Vero 세포를 MERS-CoV-감염된 Vero 세포와 혼합하고 슬라이드 글래스에 플레이팅하였다. 그 혼합된 세포를 고정한 후정상 마우스 IgG 또는 MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체와 배양하였다. 혼합된 세포를 Alexa Flour 488-부착된 goat anti-mouse IgG 항체로 배양하였다. 핵을 Hoechst 33258로 염색하였다. 이미지들을 형광 현미경으로 관찰하였다.

도 7은 MERS-CoV M 단백질의 Vero 세포에서 위치를 나타낸 그림.

Vero 세포를 커버 글래스 상에 배양하고 MERS-CoV (0.1 MOI)로 감염시켰다. MERS-CoV-감염된 Vero 세포를 4% paraformaldehyde로 고정화하고, 0.1% triton X-100으로 투과화하였다. 그 세포를 MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체로 배양한 후 Alexa488 부착된 goat anti-mouse IgG로 배양하였다. 핵을 Hoechst 33258로 염색하였다. 이미지들을 공초점 현미경으로 관찰하였다. 스케일 바, 10㎛.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0064] 본 발명의 African green monkey 신장 세포인, Vero 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. Vero 세포를 10% 우태아 혈청(FBS, Thermo Fisher Scientific), 25 mM HEPES, 100 U/ml penicillin 및 100μg/ml streptomycin이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 유지하였다. 그 세포들을 37°C, 95% air 및 5% CO_2에서 배양하였다. MERS-CoV는 박만성 교수 (Korea University)로부터 얻었다.

[0066] 실시예 1:B 세포 에피토프 펩타이드 제조

[0067] MERS-CoV M 단백질-특이적인 항체를 생산하기 위하여, 본 발명자들은 B 세포 에피토프를 에피토프 예측, 표면 접근성 및 항원성 지수에 기반하여 M 단백질을 분석하여 선택하였다. MERS-CoV M 단백질 (MERS-M158, ^{158}CDYDRLPNEVTVAKPNVLIALKMVK^{182}; 서열번호 9)에 대한 B 세포 에피토프 서열을 분석하고, 그 펩타이드를 자동화된 펩타이드 합성기(Peptron III-R24, Peptron, Daejeon, Korea)로 합성하였다. 그 펩타이드를 역상 HPLC (Prominence HPLC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)으로90% 이상의 순도로 정제하였다.

[0069] 실시예 2: 마우스 면역화

[0070] BALB/c (4 주령, 암컷, H-2^{b}) 마우스를 Nara-Biotec (Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. B-세포 에피토프 펩타이드 MERS-CoV M 단백질 (MERS-M158) 및 CpG-DNA (MB-ODN 4531(O), AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT;서열번호 14)를 phosphatidyl-β-oleoyl-γ-palmitoyl ethanolamine (DOPE):cholesterol hemisuccinate (CHEMS) 복합체(1:1의 몰비)에서 D. Kim, S. Kwon, J.W. Rhee et al., BMC Immunol., 12(2011), pp. 29에 기재된 것과 같이 동시캡슐화하였다. 마우스를 50 μg의 B-세포 에피토프 펩타이드 및 50 μg의 CpG-DNA을 포함하는 리포좀 복합체로 G. Wu, D. Kim, J.N. Kim, et al., Theranostics, 8(2018), pp. 78-91에 기재된 것과 같이 10일에 3회 복강내 (i.p.) 주사하였다. 동물 실험은 한림대 동물실험 윤리위원회(Permit number, Hallym2016-51)의 승인을 받았다.

[0071]

[0072] 실시예 3: 항원-특이적인 Ig ELISA Assay

[0073] 5 μg/웰의 펩타이드를 96-웰 면역플레이트(Thermo Fisher Scientific) 상에 코팅한 후, 1% BSA를 포함하는 PBST (0.05% Tween-20이 보충된 PBS)로 블러킹하였다 . 마우스 혈청을 안와 출혈(orbital bleeding)로 모아서 B-세포 에피토프 펩타이드-특이적인 항체 생산을 측정하였다. 마우스 혈청에서 B-세포 에피토프 펩타이드-특이적인 항체 레벨, 하이브리도마 배양 상등액, 복수 또는 정제된 단클론 항체는 B.K. Park, S.H. Choi, Y.E. Kim, et al., Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother., 34(2015), pp. 101-109에 기재된 것과 같이 정량화하였다. 단클론 항체의 아이소타입을 HRP-conjugated anti-mouse IgG (each isotype) 항체(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)로 동정하였다.

[0075] 실시예 4: 마우스 Anti-MERS-CoV M 단백질 단클론 항체의 생산

[0076] 표준 하이브리도마 기술에 따라서, 하이브리도마 세포를 s were selected to produce anti-MERS-M158-특이적인 단클론 항체 (M158-2D6F11) 생산하기 위하여 선택하였다[G. Wu, D. Kim, J.N. Kim, et al., A Theranostics, 8(2018), pp. 78-91;W.M. Yokoyama, M. Christensen, G.D. Santos, et al., Curr. Protoc. Immunol., Chapter 2(2006), Unit 2.5].

[0077] 10일 간격으로 3회, BALB/c 마우스에 i.p.로 DOPE:CHEMS 복합체에 동시캡슐화된 MERS-M158 펩타이드 (50μg) 및 MB-ODN 4531(O) (50μg)로 주사하였다.

[0078] 면역화된 마우스로부터 유래된 지라를 표준 하이브리도마 기술에 따라서 융합에 사용하였다. HAT 배지 및 HT 배지에서 하이브리도마 클론을 표준 리미팅 희석 프로토콜로 선택하여서 클론 세포 군을 얻었다. 복수를 얻기 위해서 그 선택된 하이브로도마 클론을 BALB/c 마우스의 복강에 주사하였다. Anti-MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 단백질-A column 크로마토그래피로 복수액으로부터 정제하였다.

[0079] anti-MERS-M158 펩타이드-특이적인단클론 항체의 아이소타입을 결정하기 위하여, isotyping 키트(Southern Biotechnology Associates Inc, Birmingham, USA)를 사용하였다.

[0081] 실시예 5: ELISA에 의한 친화 상수 측정

[0082] MERS-M158-특이적인단클론 항체의 결합 친화도를 결정하기 위하여, 5㎍/웰의 MERS-M158 에피토프 펩타이드를 96-웰 면역플레이트에 코팅한 후, 1% BSA를 포함하는 PBST로 블럭킹하였다. 그 단클론 항체를 PBST에서 1:5 계대 희석하여서 각 플레이트에 첨가한 후, 상온에서 2시간 배양하였다. PBST로 세척 후, horseradish peroxidase가 부착된 anti-IgG 항체를 각 플레이트에 첨가하였다. 플레이트에서 항체의 양을 tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase 기질(KPL, SeraCare, Milford, MA, USA)로 현상하였다.

[0083] 흡광도를 Spectra Max 250 microplate 리더(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 405 nm에서 측정하고, D.I. Kisiela, H. Avagyan, D. Friend, et al., PLoS Pathog., 11(2015), pp. e1004857에 기재된 것과 같이, SigmaPlot 프로그램으로 계산하여서 EC50 값을 결정하였다.

[0085] 실시예 6:웨스턴 블럿팅 및 면역침전법

[0086] MERS-M158 펩타이드-특이적인단클론 항체가 MERS-M 단백질을 검출하는지를 확인하기 위하여, 웨스턴 블럿팅을 수행하였다.

[0087] 요약하면, MERS-CoV-감염된 Vero 세포를 세포 파쇄 버퍼(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaF, 2 mM Na3VO4, protease 저해제 칵테일 및 10% NP-40)로 파쇄한 후, 15% SDS-PAGE 상에 로딩하였다. 그 분리된 단백질들을 nitrocellulose 막으로 옮긴 후 3% BSA를 포함한 PBST로 블럭킹하였다. MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 처리하고 상온에서 3 시간 배양하였다.

[0088] 배양 후, 막을 PBST로 3회 린스한 후, HRP 부착된 goat anti-mouse IgG 항체 (1:5000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA)를 가지는 5% 탈지분유를 포함한 PBST를 처리하였다. 막을 ECL 용액(SeraCare)으로 현상하였다.

[0089] 면역침전을 수행하기 위하여, MERS-CoV-감염된 Vero 세포 파쇄액을 MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체로 4°C에서 밤새 배양하였다. 그 샘플들을 단백질-A bead (Repligen, Waltham, MA, USA)로 1시간 배양한 후 그 면역침전된 단백질들을 SDS-샘플 버퍼로 혼합한 후, 그 샘플들을 MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체로 웨스턴 블럿으로 분석하였다.

[0091] 실시예 7:탈당화 어세이(Deglycosylation Assay)

[0092] 세포 파쇄액을 Vero 세포 및 MERS-CoV-감염된 Vero 세포로부터 파쇄 버퍼(0.5% SDS, 1% β-mercaptoethanol)로 얻어서 그 파쇄액을 100° C에서 10분간 가열하였다. 그 파쇄액을 펩타이드-N-glycosidase (PNGase) F (Elpis Biotech, Daejeon, Korea)로 37° C에서 2시간 처리한 후 100° C에서 10분간 가열하였다. 그 파쇄액을 MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체로 웨스턴 블럿으로 분석하였다.

[0093] 파쇄 버퍼로 그 파쇄액을 희석한 후, 면역침전법을 MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체로 수행하였다. 그 면역 복합체를 MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체로 웨스턴 블럿팅으로 분석하였다.

[0095] 실시예 8:anti-MERS CoV M 단백질단클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 클로닝

[0096] anti-MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 생산하는 Hybridoma 세포(M158-2D6F11)를 배양하고 마우스 단클론 항체 isotyping 키트(Dipstick format, Bibco BRL or Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 아이소타이핑하였다. 총 RNAs를 하이브리도마 세포(M158-2D6F11)로부터 RNeasy Mini Kit (Qiagen)로 추출하고, cDNAs를 생성하였다.

[0097] anti-MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 도메인(V_H 및 V_L)에 대한 서열을 클로닝하

기 위하여, 그 cDNAs를 Vent polymerase (NEB)를 사용하여 하기 프라이머 세트를 이용하여 증폭하였다. 중쇄 프라이머를 위하여, IGG2A (5'- GGA AGA TCT CTT GAC CAG GCA TCC TAG AGT CA-3';서열번호 10) 및 5'MH2 (5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3';서열번호 11)를 사용하였다. kappa 체인 프라이머를 위하여, 3'Kc (5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3';서열번호 12) 및 5'Mk (5'-GG GAG CTC GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3';서열번호 13)를 사용하였다. 표준 PCR 반응을 25 주기 동안 수행하였다. 그 PCR 산물들을 직접적으로 pGEM-T easy vector (Promega)에 라이게이션하였다. 클론된 mouse Ig 삽입체를 DNA 시퀀싱으로 분석하였다.

[0099] 실시예 9: 간접 면역형광 어세이 및 공초점 이미지들

[0100] 간접 면역형광 어세이(indirect immunofluorescence assay:IFA)를 수행하기 위하여, Vero 세포들을 MERS-CoV 감염된 Vero 세포(ratio 1:3)로 혼합하고 슬라이드 글래스 상에 플레이팅하였다. 그 혼합된 세포들을 아세톤으로 고정화하고 증류수로 세척하고, normal mouse IgG, MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체로 on 37 °C에서 배양하였다. 2시간 배양한 후, 그 슬라이드들을 PBS 및 DW로 세척한 후, Alexa Flour 488-부착된 goat anti-mouse IgG 항체 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 배양하였다. 샘플들을 마운팅한 후 형광 현미경(IX70, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

[0101] 공초점 이미지들을 관찰하기 위하여, Vero 세포들 (5 X 10^4 세포)를 12-웰 배양 플레이트 내의 커버 글라스 상에 플레이팅하고 MERS-CoV (0.1 MOI)로 2일간 감염시켰다.

[0102] 그 세포들을 4% paraformaldehyde로 고정화하고 1% BSA 및 0.1% triton X-100을 포함하는 PBS로 30분간 블럭킹하였다. MERS-M158 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 플레이트에 첨가하고 2시간 배양한 후, Alexa488 부착된 goat anti-mouse IgG로 1시간 동안 배양하였다. 핵을 Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific)로 염색하였다. 샘플들을 Carl Zeiss LSM710 (Carl Zeiss, Oberkochen, DE)으로 관찰하였다.

[0104] 상기 실시예의 결과는 하기와 같다.

[0106] 에피토프 선택 및 MERS-CoV M 에피토프-특이적인 항체의 생산

[0107] MERS-CoV M 단백질의 B 세포 에피토프를 선택하기 위하여, 본 발명자들은 컴퓨터 프로그램에 의한 에피토프 예측, 표면 접근성, 및 항원성과 같은 MERS-CoV M 단백질의 아미노산 서열을 분석하였고, 리포좀(DOPE;CHEMS) 내에 동시캡슐화된 MERS-M158 에피토프 펩타이드 및 CpG-DNA 복합체를 제조하여서 그 복합체를 i.p.로 BALB/c 마우스에 면역화하였다. MERS-M158 에피토프 펩타이드-특이적인 항체의 생성은 도 1B에 나타낸 것과 같이 ELISA로 확인하였다.

[0109] MERS-CoV M 에피토프-특이적인단클론 항체의 생산

[0110] MERS-CoV M 단백질 에피토프-특이적인단클론 항체를 생산하기 위하여, 지라세포를 리포좀(DOPE;CHEMS)내에 동시캡슐화된 MERS-M158 에피토프 펩타이드 및 CpG-DNA 복합체 면역화된 마우스로부터 모았다. 마우스 지라세포를 SP2/0와 융합하고, MERS-M158 에피토프 펩타이드-특이적인 항체를 생산하는 M158-2D6F11 클론을 HAT 및 HT 보충물로 선택하였다(도 2).

[0111] M158-2D6F11 클론을 복수 생산을 위하여 마우스 복강내로 주사하고(도 3A), 그 다음에 MERS-M158 에피토프 펩타이드-특이적인 단클론 항체 (M158-2D6F11)를 정제하였다(도 3B). 단클론 항체 아이소타입을 IgG2a로서 ELISA로 확인하였다(도 3C). ELISA에 의한 MERS-M158 에피토프 펩타이드 결합 분석은 M158-2D6F11 클론이 ~ 56 pM의 EC50 값을 가지고 측정되었다는 것을 나타내었다(도 3D).

[0113] M158-2D6F11단클론 항체로 면역침전법 및 웨스턴 블럿

[0114] M158-2D6F11단클론 항체의 특성을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 웨스턴 블럿 및 면역침전을 조사하였다(도

4). 도 4A에 나타낸 것과 같이, M158-2D6F11 단클론 항체는 두 타입의 M-단백질 (약 20 및 25 kDa)을 인지한다는 것을 확인하였고, 또한 면역침전에 의하여도 확인하였다(도 4B).

[0115] 단백질 변형에 의한 두 타입의 M-단백질인지 아닌지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 M-단백질에 PNGase F를 처리한 다음에 웨스턴 블럿 및 면역침전을 조사하였다. 도 3A 및 B에 나타낸 것과 같이, M-단백질은 25 kDa 크기의 단백질로 검출되었고, PNGase F에 의하여 탈당화되어서 20 kDa 크기의 단백질로 되었다.

[0116] 또한, M-단백질의 정상 형태 및 탈당화된 형태는 M158-2D6F11단클론 항체로 검출되었다.

[0118] anti-M158-2D6F11 펩타이드-특이적인 단클론 항체의 가변 도메인의 클로닝

[0119] 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(V_H 및 V_L)을 코딩하는 cDNA 서열을 anti-MERS M158 펩타이드-특이적인단 클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포(M158-2D6F11)로부터 통상의 중쇄 및 경쇄 프라이머를 사용하여 클로닝하였다.

[0120] DNA 시퀀싱에 의하여 확인한 그 서열들을 도 5에 나타내었다. 그 서열들을 단백질 BLAST 프로그램으로 공지된 서열과의 호모로지를 분석하였다.

[0121] M158-2D6F11 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 코딩하는 cDNA은 각각 보고된 면역글로블린 가변 중쇄 및 경쇄 도메인과 약 80 ~ 95% 및 93 ~ 98% 호모로지를 나타내었다.

[0123] M158-2D6F11단클론 항체로 세포에서 MERS-CoV M 단백질의 검출

[0124] 본 발명자들은 M158-2D6F11단클론 항체가 MERS-CoV-감염된 세포들을 인지하는지를 확인하기 위하여 IFA를 수행하였다. Vero 세포 및 MERS-CoV-감염된 세포들을 포함하는 슬라이드를 M158-2D6F11 단클론 항체로 처리하고, 대조군으로 정상 마우스 IgG를 처리하였다.

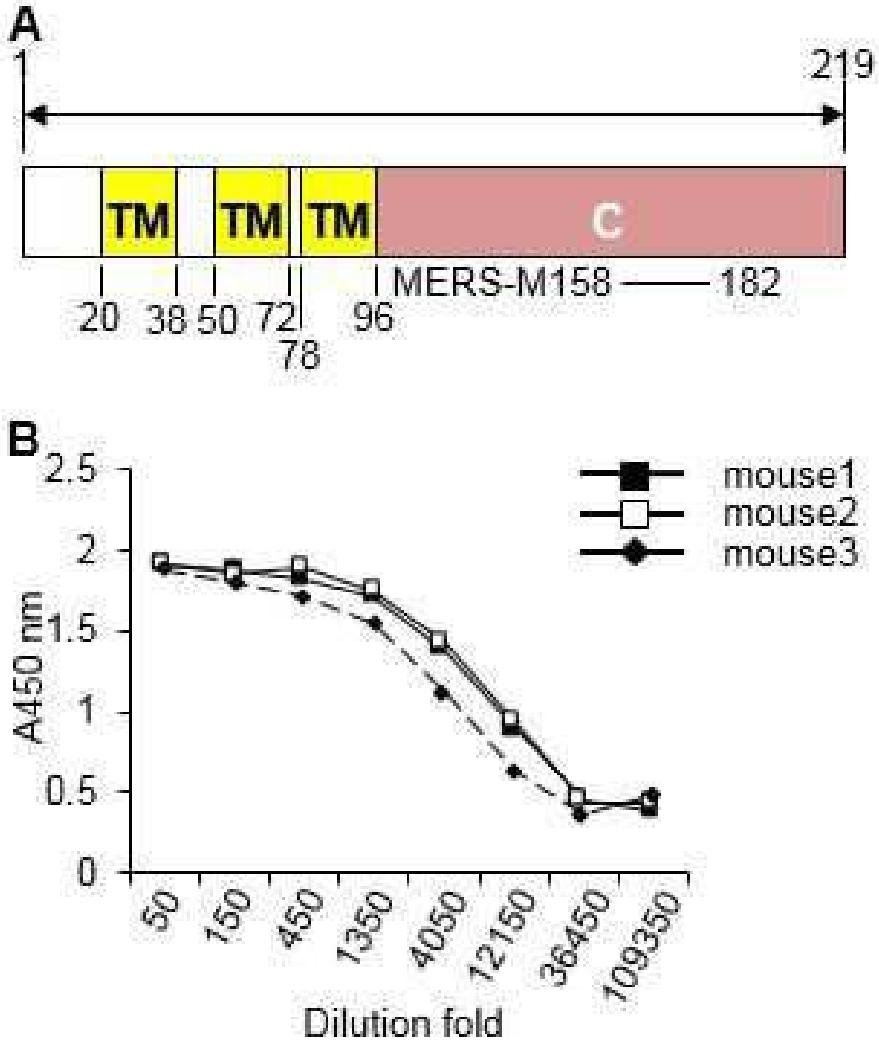
[0125] MERS-CoV는 정상 마우스 IgG로 검출되지 않는 반면에, M158-2D6F11 단클론 항체는 감염된 세포에 존재하는 MERS-CoV를 인지하였다(도 6).

[0126] MERS-CoV-감염된 세포들의 명확한 검출을 위하여, 본 발명자들은 공초점 이미지로 확인하였다. Vero 세포 또는 MERS-CoV-감염된 Vero 세포들을 커버 글라스 상에서 배양한 후에, 정상 마우스 IgG 또는 M158-2D6F11 단클론 항체로 면역염색을 수반된 것과 같은 공초점 현미경 어세이로 분석하였다. M158-2D6F11 단클론 항체는 특이적으로 감염된 세포에서 MERS-CoV를 인지하였다.

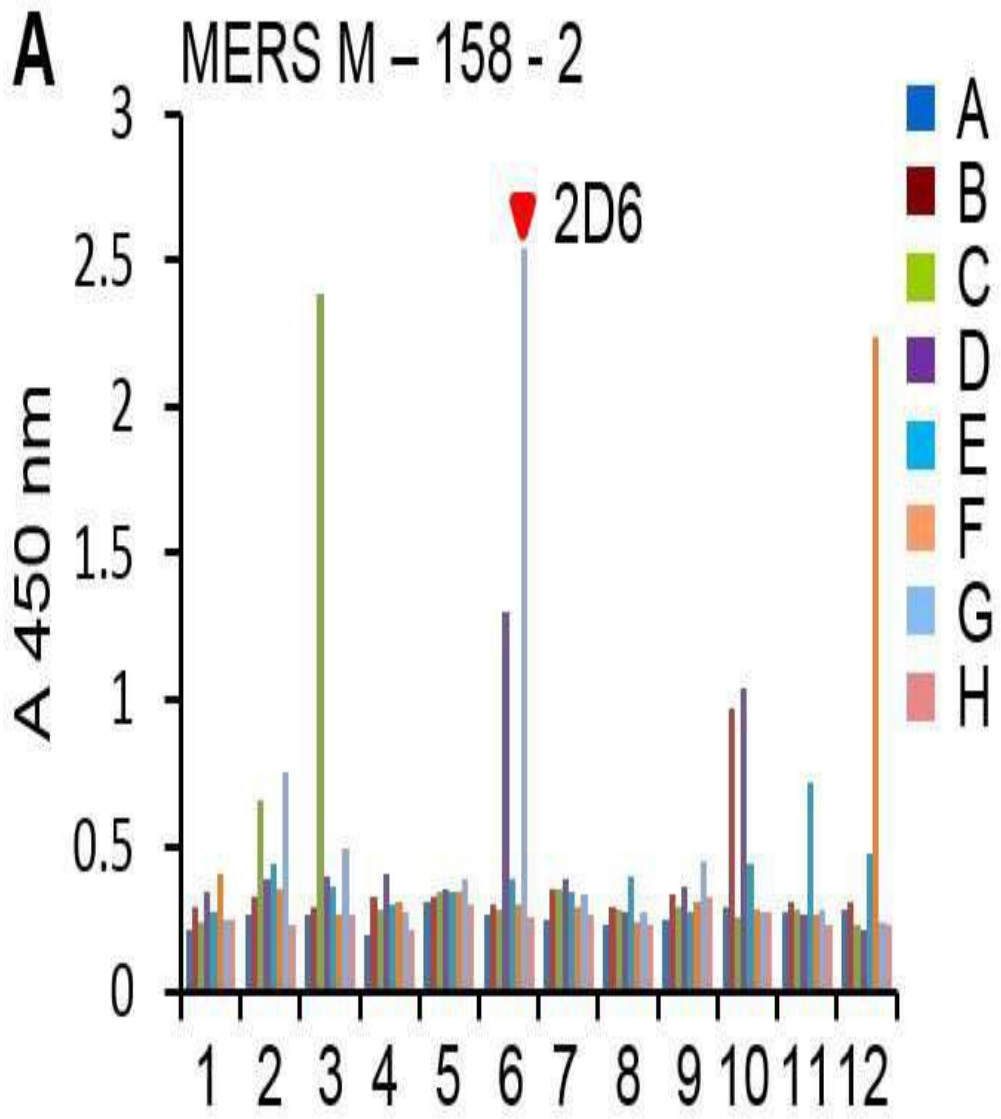
[0127] 그러나, 정상 마우스 IgG는 MERS-CoV를 인지하지 않았다(도 7). 이 결과들로부터, M158-2D6F11 단클론 항체는 MERS-CoV의 특이적인 인지를 가지고 MERS-CoV 감염된 세포들을 구별할 수 있다는 것을 시사한다.

도면

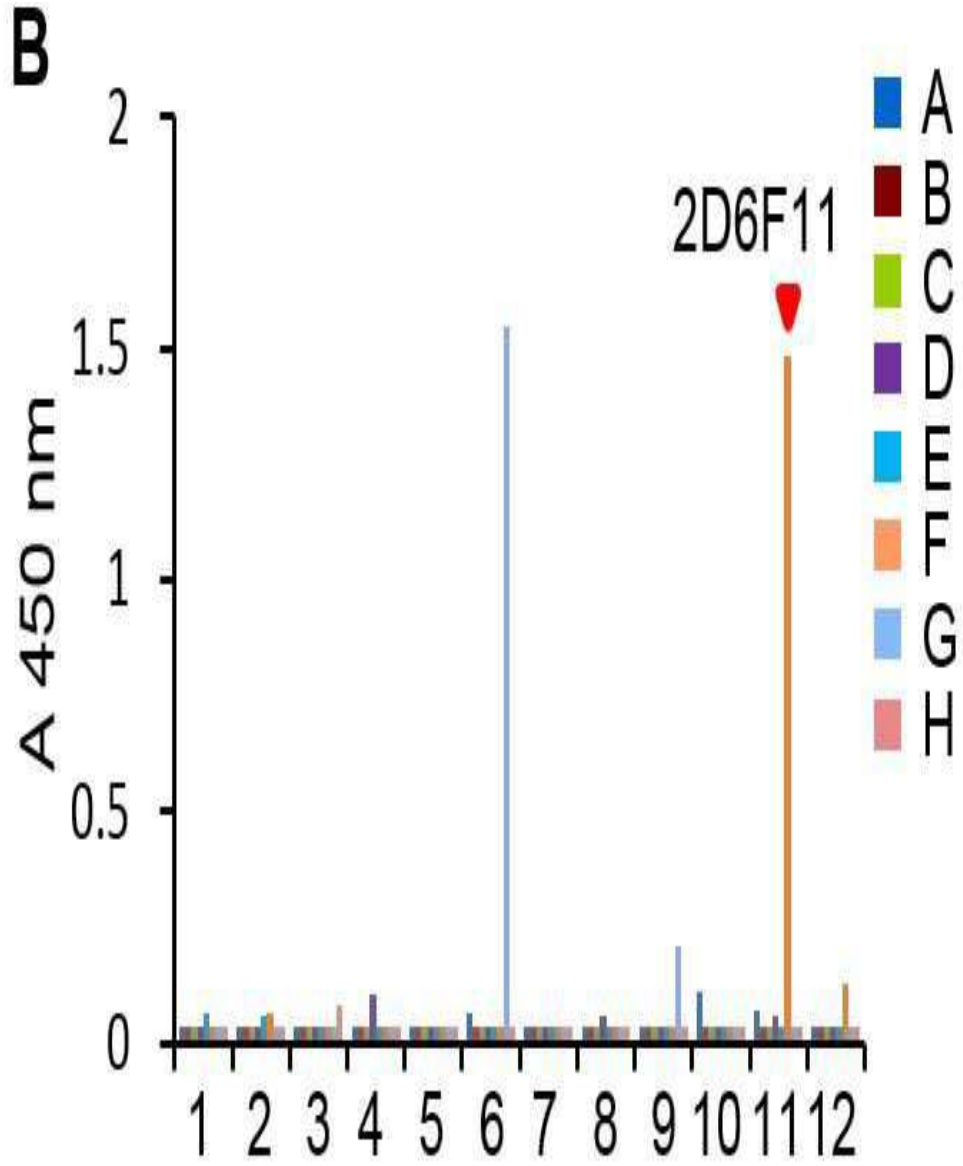
도면1


A
1
219
TM
TM
TM
C
MERS-M158
182
20
38
50
72
78
96
B
2.5
2
1.5
1
0.5
0
A450 nm
mouse1
mouse2
mouse3
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
Dilution fold

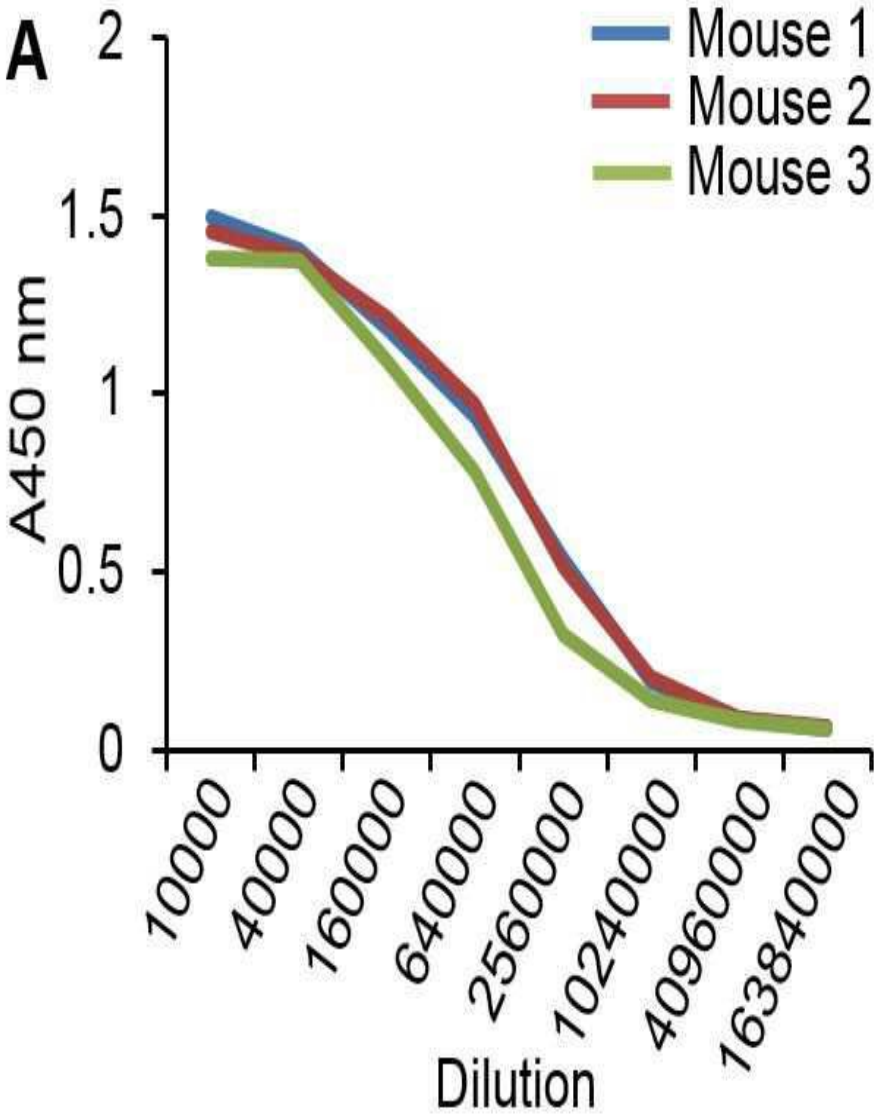
도면2a


A
MERS M – 158 - 2
2D6
A 450 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A
B
C
D
E
F
G
H

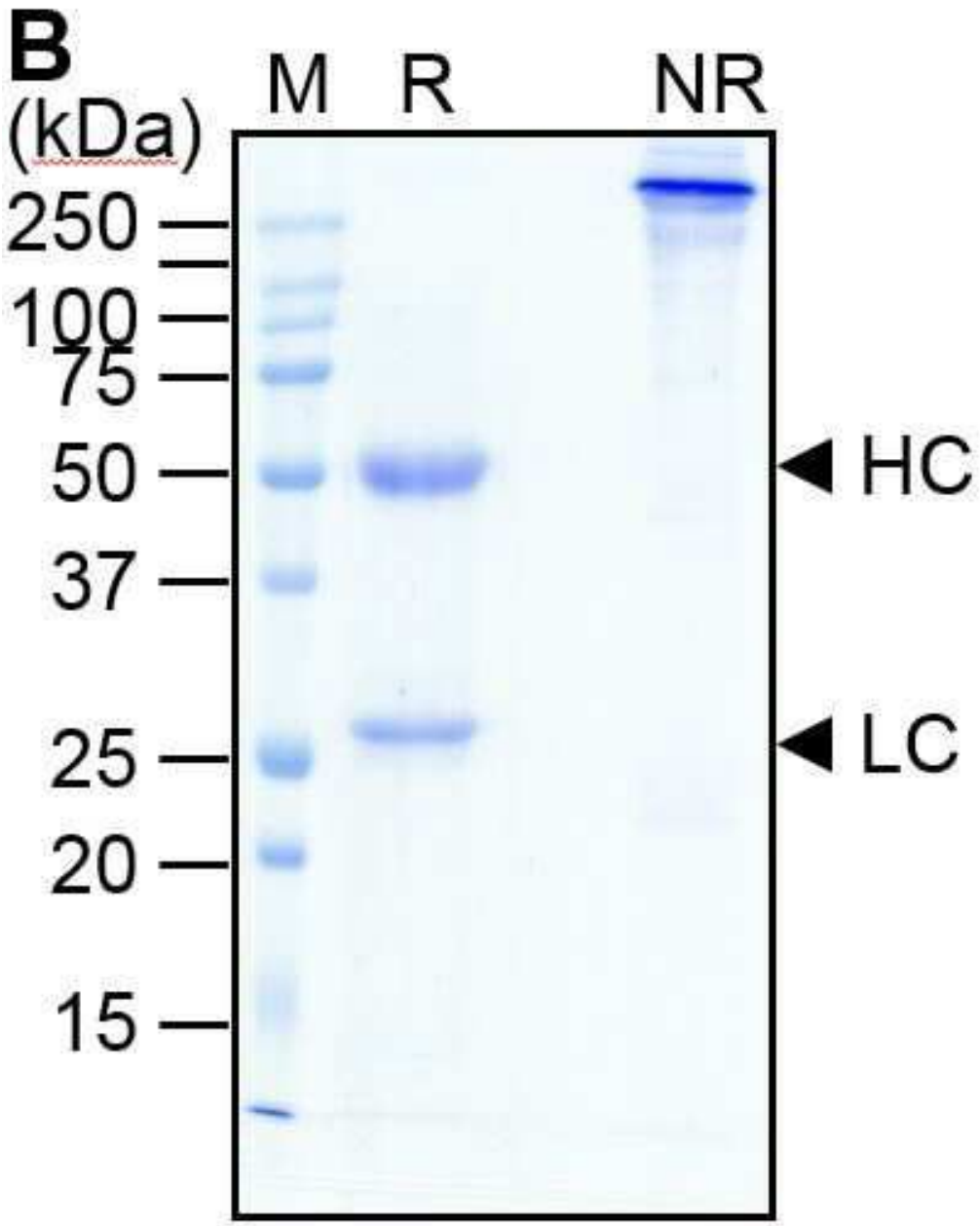
도면2b



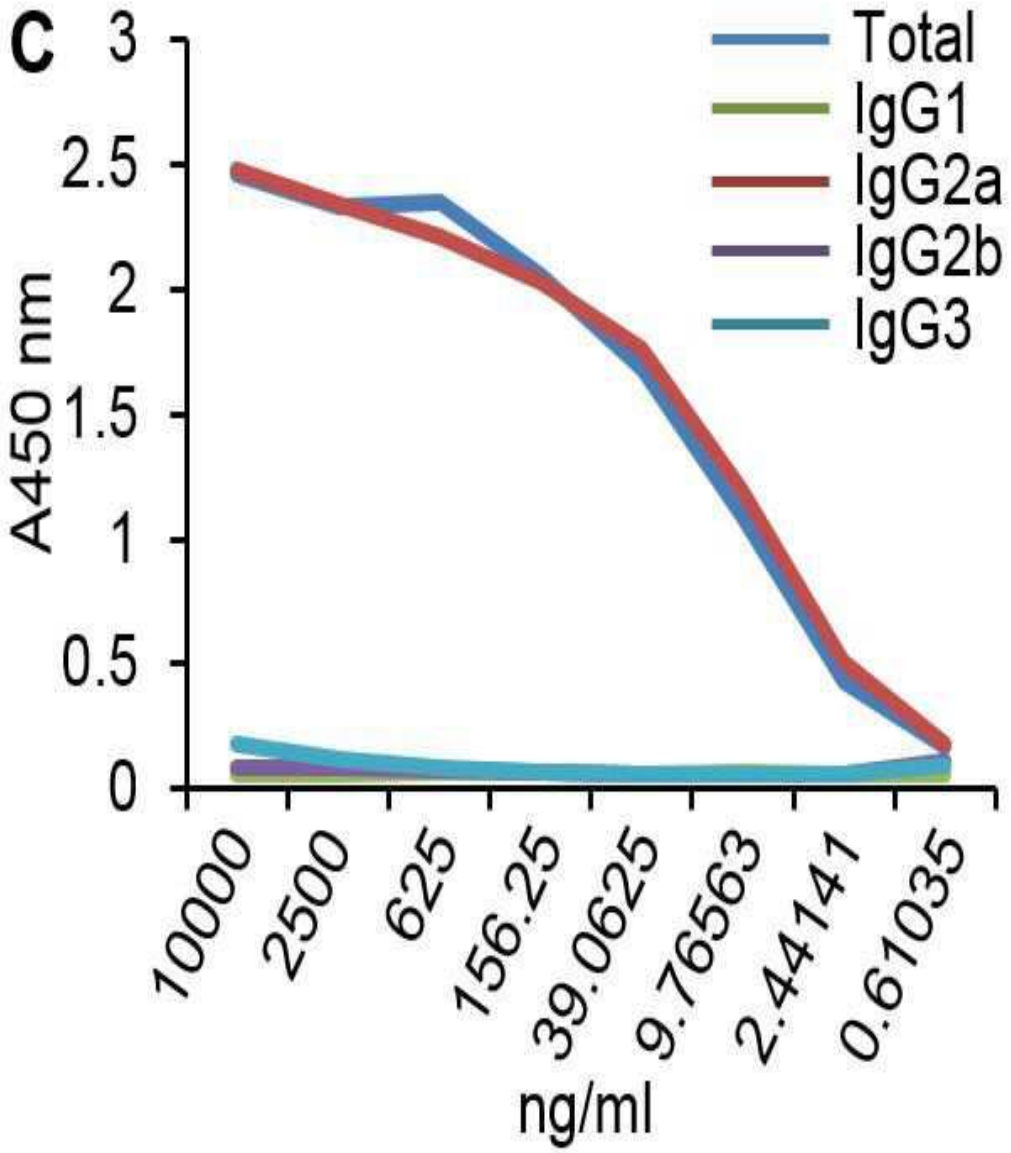
도면3a


A
Mouse 1
Mouse 2
Mouse 3
A450 nm
2
1.5
1
0.5
0
10000
40000
160000
640000
2560000
10240000
40960000
163840000
Dilution

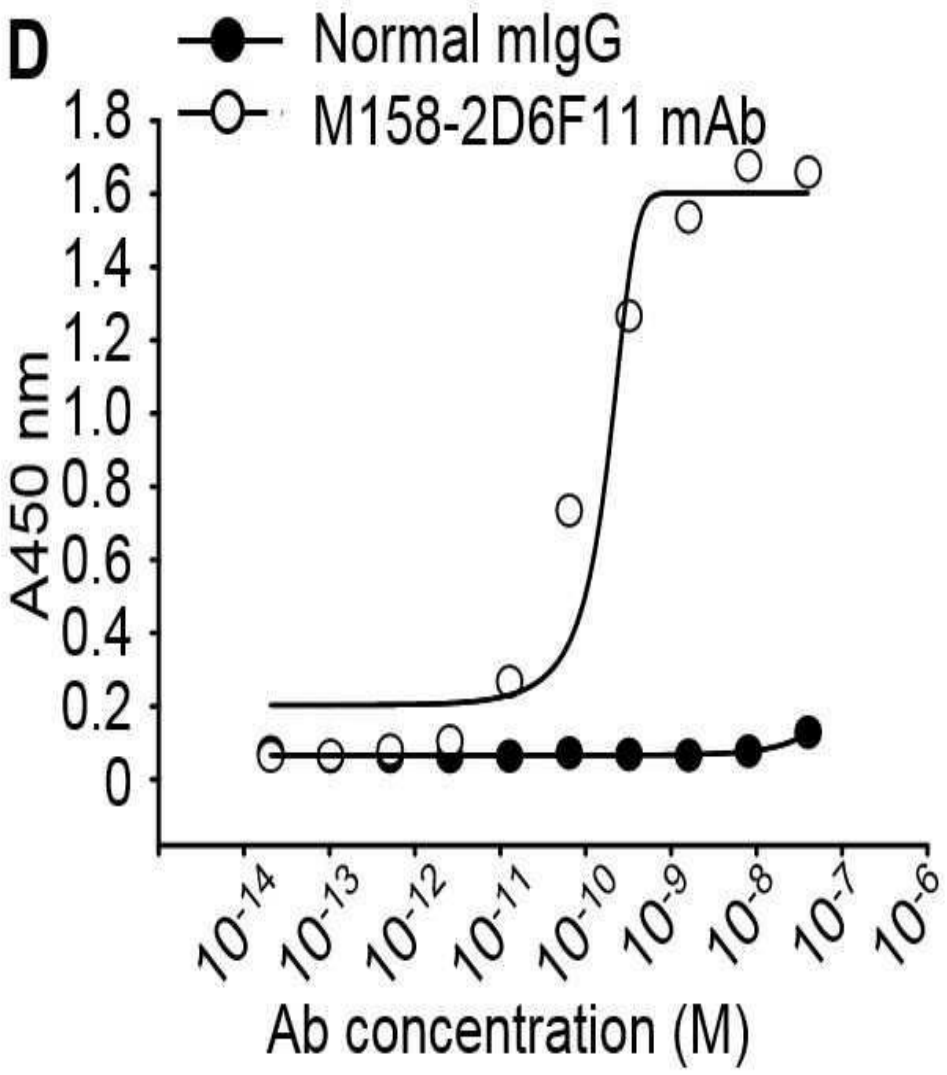
도면3b



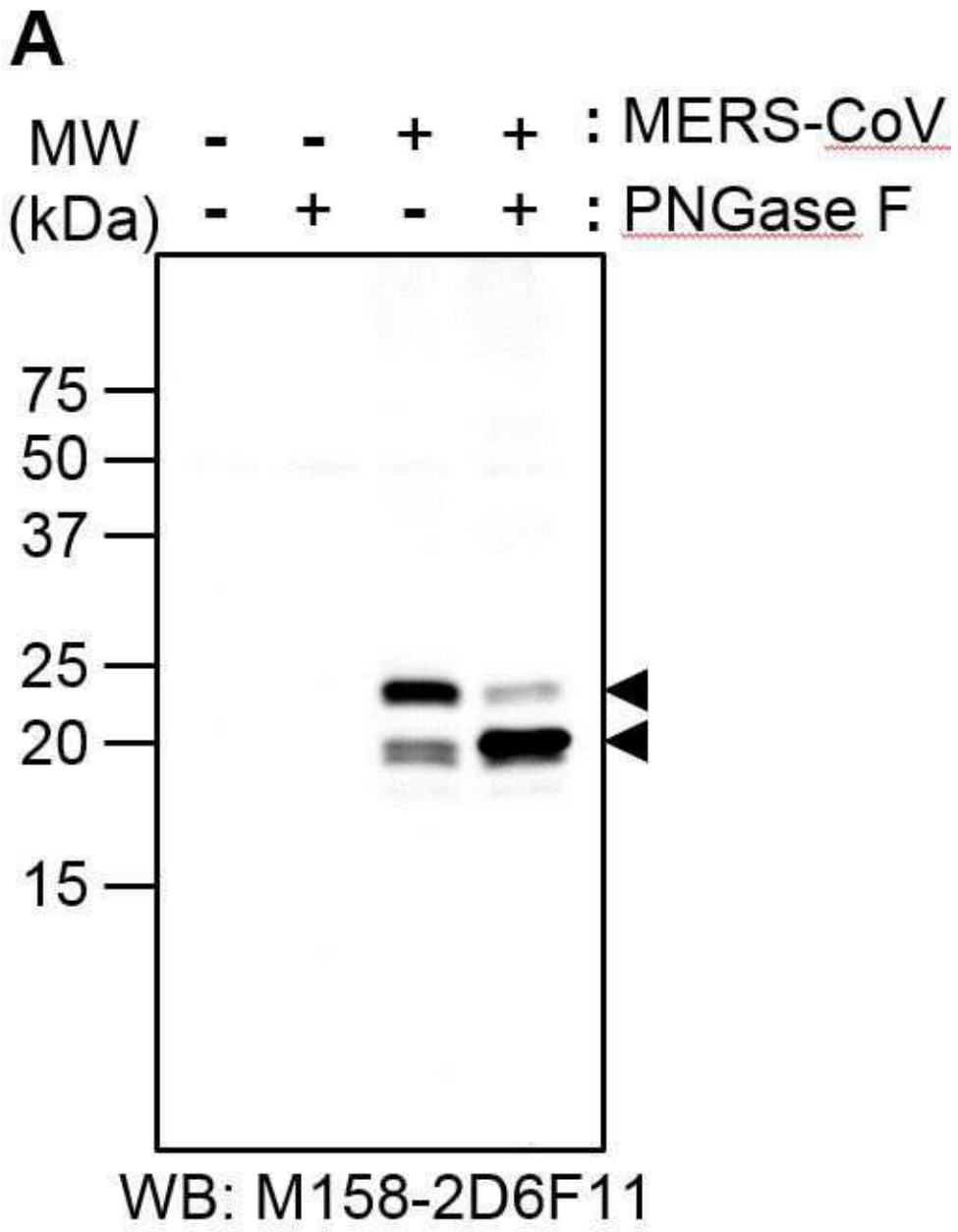
도면3c


C
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
A450 nm
Total
IgG1
IgG2a
IgG2b
IgG3
10000
2500
625
156.25
39.0625
9.76563
2.44141
0.61035
ng/ml

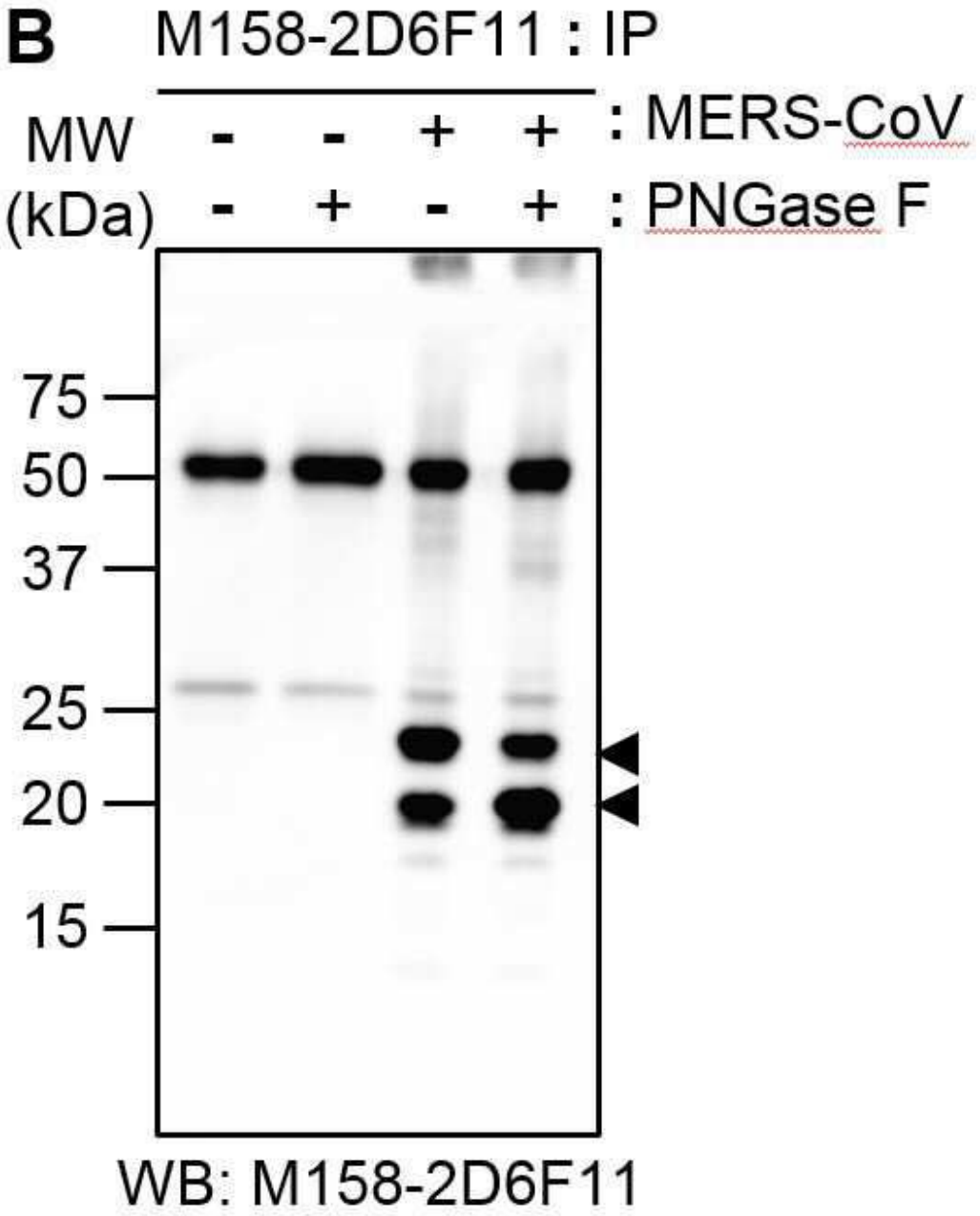
도면3d


D
Normal mIgG
M158-2D6F11 mAb
A450 nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
Ab concentration (M)

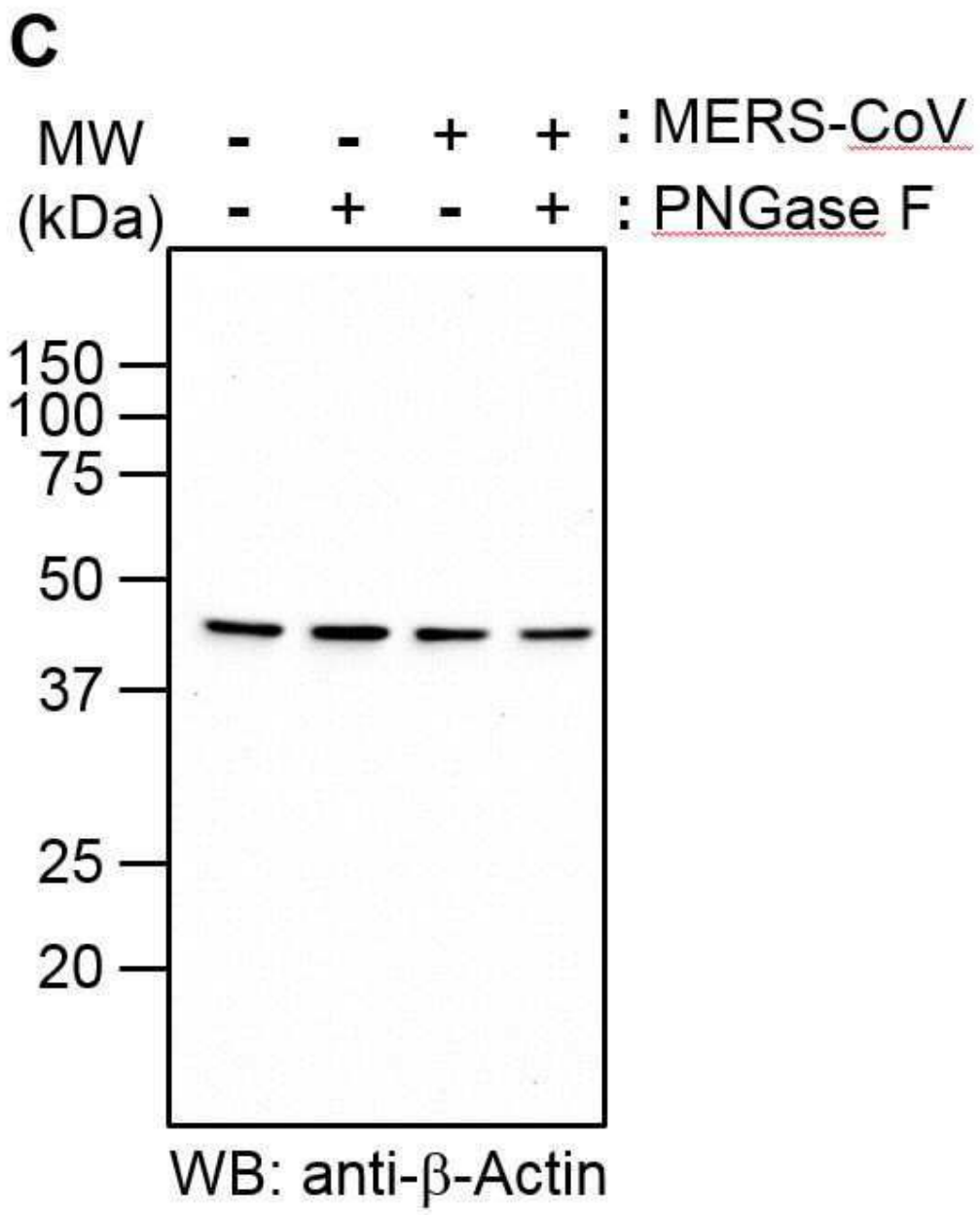
도면4a



도면4b


B
M158-2D6F11 : IP
MW
(kDa)
- - + + : MERS-CoV
- + - + : PNGase F
75
50
37
25
20
15
WB: M158-2D6F11

도면4c



도면5

A M158-2D6F11 Heavy chain

```
CTTCCG GAATTC
CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCAGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTC
AATATCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAGTGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTAT
GCAACATATTGTGCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTCACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAACAAC
TTGAACACTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGAGATACTACGGGGGATATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC
TCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGC
TCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAG AGATCT TCC
```

```
                                CDR1                    CDR2
kabat                              <--->                <---------------->
AbM                             <-------->              <------>
Chothia                         <---->                    <--->
LPEFQVQLQQSGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNIYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYCADSVKDRFTISRDDSQSMLYL

                        CDR3
kabat                   <------>
AbM                     <------>
Chothia                 <------>
QMNNLNTEDTAMYYCVRYYGGYYYAMDYWGQGTSVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKRSS
```

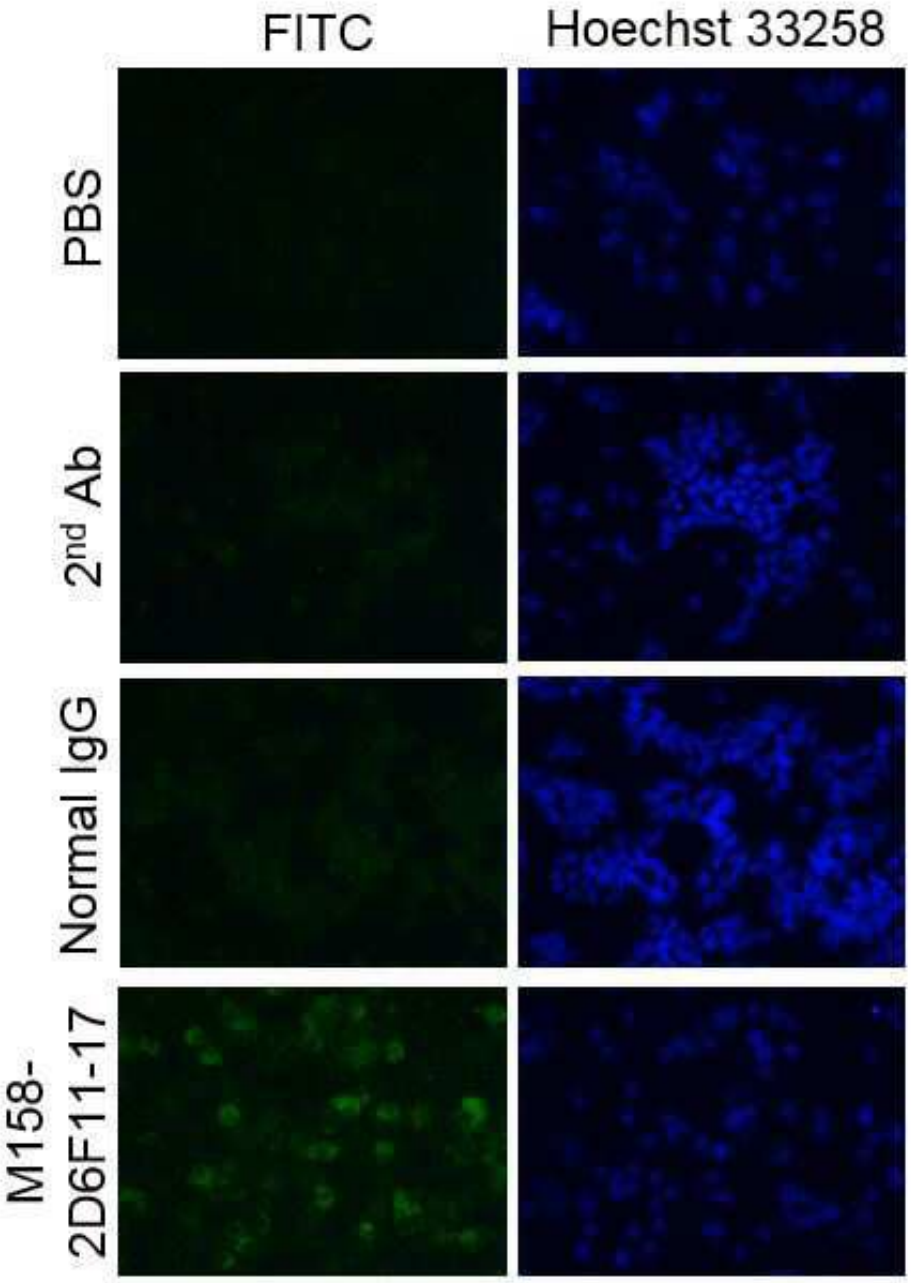
B M158-2D6F11 kappa chain

```
GG GAGCTC
GATATTGTGATGACCCAGTCTACAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTAAAAGTGTT
AATAATTTTGGCAATAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTA
GAATCTGGGATCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTCACCATTAATCCTGTGGAGGCTGATGATCTT
GCAACCTATTACTGTCATCAAAATTATGAGGATCCGTGGACGTTCGGTGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCA
CCAACTGTATCC GCATGC ACC
```

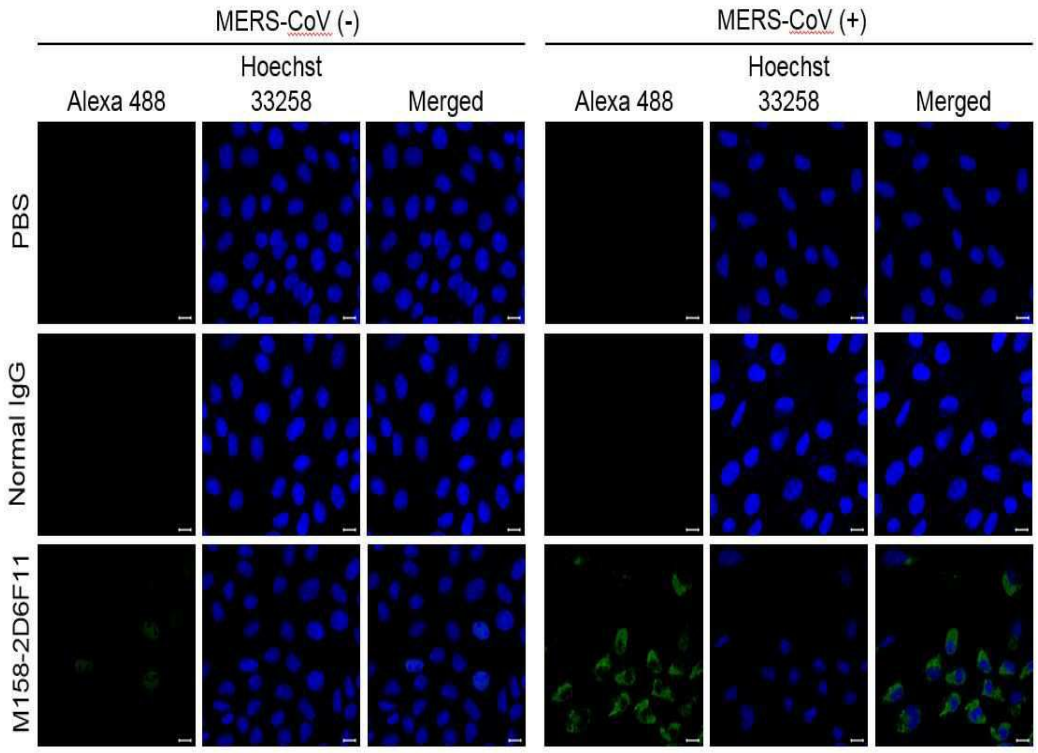
```
                                CDR1                    CDR2
                            <---------------->          <------>
ELDIVMTQSTASLAVSLGQRATISCRASKSVNNFGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAD

        CDR3
      <-------->
DLATYYCHQNYEDPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSACT
```

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> An anti-MERS-CoV monoclonal antibody and use of the same

<130> P18-0061HS

<160> 14

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VH

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr Ala Met Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VH

<400> 2

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Cys Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VH

<400> 3

Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of VL

<400> 4

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asn Asn Phe Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of VL

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of VL

<400> 6

His Gln Asn Tyr Glu Asp Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 7

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

1 5 10 15

Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

20 25 30

Phe Asn Ile Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

35 40 45

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr

50 55 60

Tyr Cys Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp

65 70 75 80

Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Asn Thr Glu Asp

85 90 95

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala

100 105 110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys

115 120 125

Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr

130 135 140

Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Arg Ser Ser

145 150 155

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 8

Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Thr Ala Ser Leu Ala Val Ser

1 5 10 15

Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asn

20 25 30

Asn Phe Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

Asn Tyr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

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

115 120 125

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

<213> Middle East respiratory syndrome coronavirus

<400> 9

Cys Asp Tyr Asp Arg Leu Pro Asn Glu Val Thr Val Ala Lys Pro Asn

1 5 10 15

Val Leu Ile Ala Leu Lys Met Val Lys

20 25

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

ggaagatctc ttgaccaggc atcctagagt ca 32

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 12

ggtgcatgcg gatacagttg gtgcagcatc 30

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 13

gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca 32

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG-DNA

<400> 14

agcagcgttc gtgtcggcct 20