

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0135508
(43) 공개일자 2022년10월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) G01N 33/563 (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/1018 (2013.01)
G01N 33/563 (2019.05)
- (21) 출원번호 10-2021-0041269
(22) 출원일자 2021년03월30일
심사청구일자 2021년03월30일
- (71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
신현진
대전광역시 유성구 대덕대로541번길 68, 101동 601호 (도룡동, 대덕연구원현대아파트)
- 박재연
인천광역시 남동구 만수로 14-26, 102동 302호(만수동, 만수주공1단지아파트)
- (74) 대리인
리앤목특허법인

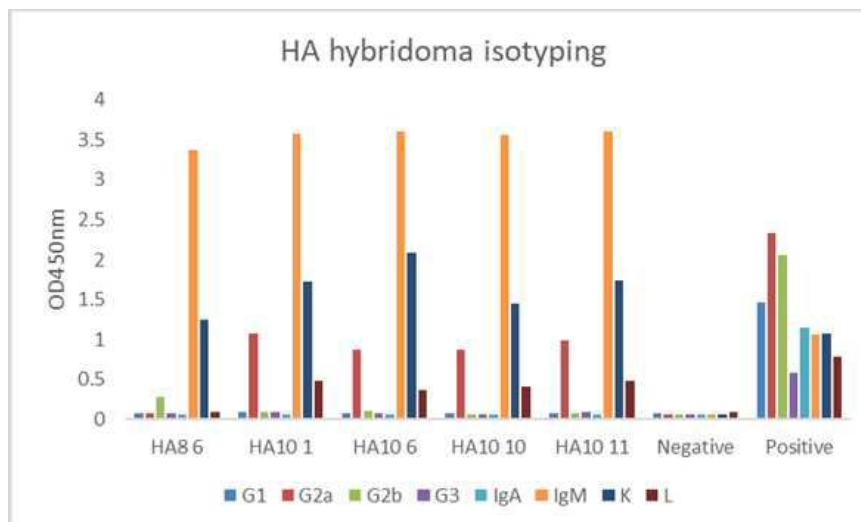
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 조류인플루엔자 바이러스의 HA 단백질에 특이적인 단클론항체, 및 이의 용도

(57) 요약

조류인플루엔자 바이러스(Avian influenza virus: AIV)의 HA 단백질에 특이적인 단클론항체, 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 진단용 조성물에 관한 것이다. 일 양상에 따른 조류인플루엔자 바이러스(Avian influenza virus: AIV)의 HA 단백질에 특이적인 단클론항체, 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 진단용 조성물을 사용하면, 기존 진단키트보다 간단한 단계만으로 특이적이고 향상된 민감도로 조류인플루엔자 바이러스를 신속하고 정확하게 검출할 수 있다. 따라서, 현장에서의 빠르고 정확한 진단을 통한 신속한 방역이 가능하여 가금농가의 피해를 줄이는 데에 기여할 것으로 기대된다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 33/56988 (2021.08)

G01N 33/6857 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

G01N 2333/11 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 것인, 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체는 조류인플루엔자 바이러스의 HA 단백질에 결합하는 것을 특징으로 하는, 단클론항체.

청구항 3

기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주는 조류인플루엔자 바이러스의 HA 단백질에 결합하는 단클론항체를 생산하는 것인, 하이브리도마 세포주.

청구항 5

기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스 진단용 조성물.

청구항 6

기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스 진단키트.

청구항 7

청구항 1의 단클론항체와 개체로부터 분리된 시료를 접촉시키는 단계; 및

상기 단클론항체 및 시료의 결합에 의해 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스의 감염여부를 진단하는 방법.

청구항 8

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역; 및

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체.

청구항 9

서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및

서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 중쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열로 이루어지고, 상기 경쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 조류인플루엔자 바이러스(Avian influenza virus: AIV)의 HA 단백질에 특이적인 단클론항체, 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조류인플루엔자 바이러스(Avian influenza virus: AIV)는 조류의 전염성 호흡기 질병을 야기하는 주요 원인체로서, 농가에서 발병하면 수백만 마리 이상의 폐사를 일으켜 심각한 경제적 손실을 입히는 바이러스이다. 특히 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 경우 전파속도가 매우 빠르고 한 번 발병이 되면 수일 내로 축산 농가에 치명적인 피해를 일으킨다. 이러한 조류인플루엔자 바이러스에 대한 방역대책은 정확하고 신속한 진단을 통해 바이러스의 확산을 억제하여 농가의 피해를 최소화하는 것이 최선의 방법이라 여겨지고 있다.

[0003] 기존의 조류인플루엔자 바이러스 진단법으로는 바이러스를 분리하여 증식시킨 후 면역학적 방법이나 분자생물학적 방법으로 진단하거나, 검체에서 바이러스 유전자를 분리한 후 증폭시키는 방법 등이 있다. 하지만 이러한 방법들은 현장에서는 진단할 수 없고, 진단까지 소요되는 시간이 적게는 6시간에서 길게는 5일까지 소요되며, 검사단계가 복잡하여 숙련된 전문검사인력들이 필요하다. 이러한 단점들을 보완하고자 현장 진단이 가능한 간이항원 진단키트들이 개발되어 왔으나, 진단까지 20분 내외의 시간밖에 걸리지 않는 신속성은 그 장점이나 바이러스 배출량이 적은 경우 사용이 어렵고, 진단 성능 면에서 부족함이 있으며, 사용 후 감염성 폐기물인 진단키트를 폐기하는 과정에도 신중함을 기해야 하는 어려움이 있다. 또한, 래피드 키트 형태로 시판되는 항원 진단키트의 경우 현장에서의 평가 시 정확도가 많이 떨어진다는 평가가 많다.

[0004] 따라서, 현장에서 신속하고 편리하게 사용할 수 있으면서도 민감도(sensitivity), 특이성(specificity), 및 정확도가 향상된 조류인플루엔자 바이러스 진단키트의 개발이 대두된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 조류인플루엔자 바이러스의 주요 표면 단백질인 HA(헤마글루티닌, hemagglutinin) 단백질에 특이적인 단클론항체를 제조하고, 상기 단클론항체의 조류인플루엔자 바이러스 특이적 결합능, 및 이소타이핑(isotyping) 결과 IgM 유형임을 확인하여 현장에서 신속하고 정확하게 바이러스를 조기진단 할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0006] 일 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 것인, 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주를 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 상기 단클론항체를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 상기 단클론항체를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스 진단키트를 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 상기 단클론항체와 개체로부터 분리된 시료를 접촉시키는 단계; 및 상기 단클론항체 및 시료의 결합에 의해 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스의 감염여부를 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 제공하는 것이다.

[0012] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의

하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

- [0014] 일 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 것인, 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 제공한다.
- [0015] 본 명세서에서 용어 "조류인플루엔자"는 조류인플루엔자 바이러스(Avian Influenza Virus: AIV) 감염에 의하여 발생하는 조류의 급성 전염병으로서 닭, 칠면조, 오리, 메추리 등의 가금류와 야생조류 등에서 감염이 보고되어 있다. AIV는 병원성에 따라 고병원성 조류인플루엔자(Highly pathogenic avian influenza: HPAI)와 저병원성 조류인플루엔자(Low pathogenic avian influenza: LPAI)로 분류한다. AIV는 피막이 있는 바이러스로 직경이 80-120nm의 구형 구조를 가지고 있으며 바이러스의 핵산은 서로 다른 8개의 분절로 된 단일가닥 RNA로 되어있다. 이들은 HA(헤마글루티닌, hemagglutinin), 및 NA(뉴라미니다제, neuraminidase)인 2개의 표면 단백질과 NP(뉴클레오프로틴, Nucleoprotein), M1(Matrix 1), PB1 폴리머라제(polymerase), PB2 폴리머라제, PA 폴리머라제, NS1(비구조 단백질 1, Non-Structural protein 1), 및 NS2(비구조 단백질 2, Non-Structural protein 2) 등 6개의 내부유전자로 구분된다. AIV는 A형 인플루엔자(Influenza) 속으로 분류되며 바이러스 표면의 HA, NA 단백질에 따라 아형(subtype)이 결정된다.
- [0016] 본 발명에서 용어 "진단"은 시료 또는 실험 샘플 내에 화학종이나 미생물 따위의 존재 유무를 알아내는 것을 의미하며, 본 발명에서의 진단 또는 검출은 바람직하게 조류인플루엔자 바이러스의 존재 유무를 알아내는 것을 의미한다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 "단클론항체(monoclonal antibody)"는 상기 항체 분자가 단일 분자로 구성되도록 제조된 것을 의미한다. 단클론항체는 동일한 에피토프를 갖는 항원에 대해서만 반응하는 특이성을 가지며, 또한 특정 에피토프에 대해서만 친화성을 나타낸다.
- [0018] 일 양상에 따른 단클론항체는 조류인플루엔자 바이러스의 주요 표면 단백질인 HA(헤마글루티닌, hemagglutinin) 단백질에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0019] 조류인플루엔자 바이러스는 표면 단백질인 HA 단백질이 동물세포의 표면 수용체와 결합함으로써 감염이 시작된다. 즉, HA 단백질은 조류인플루엔자 바이러스의 감염에 가장 중요한 숙주세포 결합 특이성과 관련된다.
- [0020] AIV가 속하는 A형 인플루엔자는 HA와 NA 표면 단백질의 혈청학적 반응을 바탕으로 아형(Subtype)이 나뉜다. HA의 16가지 아형과 NA의 9가지 아형이 있다. HA의 아형은 혈구 응집소 억제반응(HI)을 통하여 H1부터 H16까지 16종이 있으며, NA의 아형은 뉴라민산분해효소 억제반응(NI)을 통하여 N1부터 N9까지 9종이 있다.
- [0021] 일 구체예에 있어서, 상기 HA 단백질은 바람직하게는 H9일 수 있다.
- [0022] 일 구체예에 있어서, 상기 조류인플루엔자 바이러스는 혈청형이 H9N2인 것일 수 있다.
- [0023] 상기 AIV의 HA 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 AIV의 HA 단백질은 서열번호 2의 유전자 염기서열로부터 암호화되는 것일 수 있다. 상기 서열번호 1 및 2에 해당하는 아미노산 서열 및 뉴클레오타이드 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0024]

구분	서열	서열번호
HA	MEIIALAILVVTKTSNADKICIGYQSTNSTETVDTLVENNVPVTHAKELLHTEHNGMLCATNLGHPLILDCTIEGL VYGNPSCDLLGGKEWSYIVERSSAVNGMCYPGKVENLEELQSFSSARSYKRLLLFPDRTWNVTYTGTSKACNSFY RSMRWLTHKNGSYPIQDAQYTNDWGKNILFMWGIHHPPTDTEQINLYKKADTTTSITTEDINRTFKPVI GPRPLVNGP TGRIDYYWSVLKPGQTLRVRNNGNL IAPWYGHILSGESHGRILKTDLSSGNCVVQCQTEKGGLNTTL PFHNVSKYAFG NCPKYVGVKSLKLAVGLRNVPAASYRGLFGAIAAGFIEGGWPGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRESTQEAVDKITSKV NNI IDKMNKQYEI IDHEFSEIEARLNMNNKIDQIQDIWAYNAELLVLENQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNA IEDGKGCFELYHKDDQCMETIRNGTYDRLKYEEESKLERQKIEGVKLESEETYKILT IYSTVASSLVLAVGFAAFMF WAMNSGSCRCNICI	1
	atggaaataa tagcactaat agctatactg gtagtgacaa aaacaagcaa tgcagataaa atttgcatg gctaccagtc acaaaactcc acagaaactg ttgatacact agtagaaaac aatgtccctg tgacacatgc caaagaattg ctccacacag agcacaatgg aatgctatgt gcaacaaacc tggggcacc tctcatccta gacacctgca ccatcgaagg gttggtgtac ggcaaccctt cctgtgattt gctactggga gggaaagaat ggtcttacat tgtcgaaaga tcatcagctg tcaatgggat gtgtaccct ggaaaggtag agaacctgga agaactccag tcatttttca gctccgctcg ctctacaaa agactcctgc tctttccaga cagaacttgg aatgtgactt aactgggac aagcaaagca tgttcaaact cattctacag aagtatgaga tggtgtgacac acaagaacgg ttcttaccct attcaagacg cccaatatac caacgattgg gggaagaata ttcttctcat gtggggcata caccaccac ctaccgatac agagcaaata aatctataca aaaaagccga tacaacaaca agtataacaa cggaagatat caatcgaact ttcaaaccag tgatagggcc aaggcctctt gtcaatgggtc caacagggag aattgattat tattggtcag tactaaagcc aggcagaca ctgagagtga gatccaatgg gaatctaatt gccccatggt atggacacat tctttcagga gaaagccatg gaagaatcct gaagaccgat ttgagtagtg gcaactgcgt agtacaatgc caaactgaga aaggtggttt gaacacgacc ttgccattcc acaatgtcag caagtatgca tttgggaact gcccacaaata tgttggagt aagagtctca aactggcagt tgggtctaagg aatgttctg ctgcatacata tagagggtc ttcggtgcca tagctggatt catagaagcg ggttggccag gactagtgc aggtggtac gggtttcagc attcaaatga tcaagggtt ggaatggccg cagataggga atcaactcaa gaagcagttg acaagataac atccaaagta aataacataa tcgacaaaat gaacaagcag tatgaaatca ttgatcatga gttcagtga attgaagcca gactcaatat gatcaacaat aagattgatg accaaatata ggacatctgg gcgtacaatg cagaattact ggtactgctt gaaaatcaga aaacactcga tgagcatgat gcaaatgtga ataactctga taataaggtg aagagagcat tgggttcaaa tgcaatagag gatggaaagg gatgcttcga gttgtatcac aatgtgatg atcaatgcat ggaacaatt agaaacggga cttatgacag gctaaagtat gaagaagaat caaaactaga aaggcagaaa atagaagggg tgaactgga gtctgaagaa acttacaaga tccttaccat ttattcgact gtgcctcat ctctgtgtct tgcagtgggg tttgtcgtct tcatgttctg ggccatgtcc aatggatctt gcagatgcaa catttgtata taa	2

[0025]

상기 HA 단백질은 에피토프(epitope)를 포함할 수 있다.

[0026]

본 명세서에서 용어 "특이적으로 결합(specifically binding)" 또는 "특이적으로 인식(specifically recognizing)"은 당업자에게 통상적으로 알려진 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 항원-항체 복합체를 형성할 수 있으며, 또한 면역학적 반응을 하는 것을 의미할 수 있다.

[0027]

완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합(disulfide bond, SS-bond)으로 결합한다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가질 수 있다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가질 수 있다.

[0028]

상기 하이브리도마(hybridoma) 세포는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 바람직하게는, 상기 하이브리도마 세포는 heterologous injection 방법으로 면역화시킨 동물로부터 유래한 세포를 이용하여 제조할 수 있다. Heterologous injection은 하나의 항원만을 접종하여 항체를 유도하는 것이 아니라, 다른 항원을 1차

적으로 접종하여 마지막에 원하는 항원을 접종하는 방식으로, 단클론항체를 보다 안정적으로(stable) 제조할 수 있는 이점이 있다.

[0029] 일 구체예에 있어서, 상기 하이브리도마 세포는 heterologous injection 방법을 통해 전 바이러스(whole virus)인 AIV 표준 균주를 동물에 면역시키고, 상기 피면역 동물로부터 유래된 항체 생산세포인 비장 세포를 골수종 세포와 융합시켜서 하이브리도마를 제조한 다음, 그 중에서 AIV의 HA 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마를 선택하는 방법으로 제조할 수 있다. 상기 피면역 동물은 실시예에서 사용된 마우스뿐만 아니라 염소, 양, 모르모트, 래트 또는 토끼와 같은 동물을 사용할 수 있다.

[0030] 상기 피면역 동물을 면역시키는 방법으로서의 당업계에서 이미 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 마우스를 면역시키는 경우 1회에 1 내지 100 μ g의 면역원을 동량의 생리 식염수 및/또는 프로인드 어주번트(Freund's adjuvant) 등의 항원 보조제로 유화시켜, 상기 피면역원 동물의 복부의 피하 또는 복강 내에 2-5주마다 2-6회 접종시키는 방법으로 수행될 수 있다. 피면역 동물을 면역시킨 후에는 최종 면역 3-5일 후 비장 또는 림프절을 적출하여 당업계에서 이미 공지되어 있는 세포 융합법에 따라서, 융합 촉진제의 존재 하에 이들의 조직에 포함되어 있는 B 세포를 골수종세포와 융합시키게 된다. 상기 융합 촉진제는 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 물질을 사용할 수 있다. 상기 골수종세포는 예를 들어, P3U1, NS-1, P3x63, Ag 8.653, Sp2/0-Ag14와 같은 마우스 유래 세포, AG1, AG2와 같은 래트 유래 세포를 사용할 수 있다. 또한 상기 당업계에 공지된 세포 융합법은 예를 들어, B 세포와 골수종세포를 1:1-10:1의 비율로 혼합시켜, 이에 분자량 1,000-6,000의 PEG를 10-80%의 농도로 첨가하여, 30-37°C에서 1-10분 동안 배양하는 방법으로 수행될 수 있다. 또한, 상기 AIV의 NA, HA 및 M1 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마는 예를 들어, 하이브리도마만이 생존 가능한 HAT 배지 등의 선택 배지에서 배양하고, 하이브리도마 배양 상층액 중의 항체 활성을 ELISA 등의 방법을 이용하여 측정하여 선택할 수 있다. 최종적으로, AIV의 NA, HA 및 M1 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마는 예를 들어, AIV의 NA, HA 및 M1 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마에 대하여, 한계 희석 등의 방법에 의해 클로닝을 반복함으로써 선별될 수 있다.

[0031] 상기 단클론항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE, IgA1, IgA5, 또는 IgD 타입일 수 있다. 일 구체예에 있어서, IgG를 많이 분비하는 하이브리도마 세포주를 1차적으로 선별 후, 선별된 하이브리도마 세포주에 대하여 이소타이핑(isotyping)을 실시하였다. 그 결과, 선별된 하이브리도마 세포주 모두 IgG2a 서브클래스 및 IgM을 분비하고, 특히, 조류인플루엔자 바이러스 특이적인 초기항체 IgM을 다량으로 분비하여 AIV의 초기 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0032] 다른 양상은 상술한 단클론항체에 따른 항원 결합 단편을 제공한다.

[0033] 용어 "항체(antibody)"는 조류인플루엔자 바이러스에 대한 특이 항체로서, AIV의 HA 단백질에 대해 특이적으로 결합하며, 완전한 항체, 항체 분자의 항원 결합 단편, 합성 항체, 재조합 항체, 또는 항체 하이브리드(antibody hybrid)를 포함할 수 있다. 완전한 항체에 대한 설명은 상기 언급한 바와 같다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "항원 결합 단편(antigen binding fragment)"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩티드의 일부를 의미한다. 예를 들어, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 또는 scFv일 수 있다. 상기 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있다(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다). 또한 상기 항원 결합 단편은 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0035] 상기 항체는 단클론항체, 이특이적 항체, 비-인간 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fv(scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fv(sdFv) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0036] 본 명세서의 에피토프, 항체, 또는 항체 단편은 본 명세서에 기재된 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물들도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0037] 또 다른 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주를 제공한다.
- [0038] 상기 하이브리도마 세포의 제조 방법은 상기한 바와 같다. 또한, 하기 실시예에 따라 제조된 상기 하이브리도마 세포는 2021년 02월 02일자로 부다페스트 조약 하의 국제 기탁기관인 한국세포주연구재단 (KCLRF)에 기탁하였다. 한편, 기탁된 하이브리도마 세포는 미생물 기탁에 대한 부다페스트 조약의 규정에 따라 보관되고 상기 수탁 번호를 참조하여 일반인들에게 분양이 가능하다.
- [0039] 또 다른 양상은 상기 기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스 진단용 조성물을 제공한다.
- [0040] 상기 조성물은 조류인플루엔자 바이러스의 표면 단백질인 HA 유전자를 이용하여 제조된 단클론항체를 포함하여, 조류인플루엔자 바이러스의 민감하고 정확한 진단이 가능하다.
- [0041] 상기 조성물은 항체를 액체 중에서 포함하는 액체 조성물일 수 있다. 상기 액체는 상기 항체를 용해시킬 수 있고 유지시킬 수 있는 것일 수 있다. 예를 들면, 물, 또는 PBS와 같은 버퍼 용액일 수 있다. 상기 조성물은 상기 항체를 안정하게 유지하는 물질을 더 포함할 수 있다.
- [0042] 또 다른 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00508인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스 진단키트를 제공한다.
- [0043] 상기 진단키트는 액체 시료가 가해지는 샘플 패드, 일 양상에 따른 단클론항체가 고정된 멤브레인 및 액체 시료를 흡수할 수 있는 흡수 패드를 포함한다. 구체적으로, 상기 멤브레인은 AIV의 HA 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체가 고정된 3개의 시험선(test line) 및 시료가 전개되었다는 것을 확인하기 위한 대조선(control line)을 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 대조선에는 시료가 전개되었다는 것을 확인하기 위해 액체 시료에 포함되는 대조군 항체에 특이적으로 결합하는 항체가 고정될 수 있다.
- [0045] 구체적으로, 상기 대조군 항체로는 마우스 IgG, 토끼 IgG 등을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 키트에 적용되는 상기 "시료"는 조류인플루엔자 바이러스 항체의 유무 및 정도를 측정하고자 하는 동물 유래의 혈청일 수 있다. 상기 동물로는 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나 오리, 칠면조, 돼지, 닭, 거위, 기니아필, 캐일, 그레이파트리지, 레드파트리지, 꿩, 백조 및 말로 이루어진 군 중 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0047] 상기 키트는 검출가능한 모이어티를 더 포함할 수 있다. 검출가능한 모이어티(detectable moiety)는 모이어티의 존재, 상대적 양 및/또는 위치(예를 들면, 어레이상의 위치)가 직접적으로 또는 간접적으로 결정될 수 있는 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 검출가능한 모이어티는 해당 기술분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, 검출가능한 모이어티는 특정 조건에 노출될 경우, 검출될 수 있는 것으로, 형광성 모이어티, 발광성 모이어티, 화학발광성 모이어티, 방사성 모이어티(예, 방사성 원자), 및 효소 모이어티로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 예를 들면, 형광 모이어티는 형광성 모이어티의 여기(excitation)를 야기하는 특정 파장 및 강도에서 방사선(radiation)에 노출될 필요가 있을 수 있고, 이에 의해 검출될 수 있는 특정 파장(wavelength)에서 검출가능한 형광을 발산하게 할 수 있다.
- [0048] 상기 키트는 항원 또는 항체와 같은 면역화학 성분의 고상 담체로서 다공성 물질을 이용하는 면역분석 키트일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서 사용되는 검체패드, 저장 패드, 크로마토그래피 막 물질 및 흡습 패드는 분석될 액체 시료를 수용하고 포함하기 충분한 다공성(porosity)과 부피를 가진 물질이며, 예를 들면 마이크로다공성 막 물질일 수 있다. 상기 마이크로다공성 막 물질의 예에는 나일론, 셀룰로즈 물질, 폴리술폰, 폴리비닐리

덴 디플루오라이드, 폴리에스테르 및 유리 섬유가 포함된다. 상기 마이크로다공성 막 물질의 바람직한 예는, 니트로셀룰로스 막이다. 상기 분석 장치는 스트립의 형태를 가질 수 있다.

[0049] 또 다른 양상은 일 양상에 따른 단클론항체를 사용하여 조류인플루엔자 바이러스를 진단하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 AIV의 정량적 또는 정성적 검출 또는 진단하는데 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 진단 방법은 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액, 혈청, 세포 또는 조직)로부터 또는 AIV를 앓고 있거나 발생할 위험이 있는 대상으로부터 분변이나 장기 시료에서의 조류인플루엔자 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있다. 본 명세서에 있어서, 검출은 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것, 즉 존재, 부존재의 검출 및 바이러스 양(titer)의 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있다.

[0050] 또 다른 양상은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 제공한다.

[0051] 바람직하게는, 상기 중쇄가변영역은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄가변영역은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 중쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 경쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6으로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 서열번호 3 내지 6에 해당하는 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

구분	서열	서열번호
VH	VG YTFRNYWIRWVKRPAHGLEWIGHIYPGGDDTDYNEKFEGKVTVSADTTSSTVYMQISSLTSDDSAIYYCARFRYYRFDYWGQGTILTVSS	3
VL	DIVMTQTAIMSASLGERVTMTCTASSVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPMTFGGGTKLEIKRADAAPTVS	4
VH	GTTGGATACACCTTCCCTAATATTGGATAGGTTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACATATTACCTGGAGGTGGTGACACTGACTACAATGAGAAGTTCGAGGGCAAGGTCACAGTGACTGCAGACACGACCTCCAGCACAGTCTACATGCAGATCAGCAGCCTAACATCTGATGACTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGATTCCGCTACTATAGGTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	5
VL	GATATTGTGATGACACAGACTACAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGGGTCACCATGACCTGCAGTCCAGCTCAAGTGTAAAGTCCAGTTACTTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAACTCTGGATTATAGCACA TCCAACTGGCTTCTGGAGTCCAGCTCGCTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCACTATCATCGTTCCTCCACCATGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCACTGTATCC	6

[0053] 본 명세서에서, 용어 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오티드의 유사체를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다.

[0054] 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함하며, 이는 당업계에 공지된 엄격 조건(stringent conditions) 하에서, 예를 들어, 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄가변영역 또는 경쇄가변영역의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 서열과 혼성화될 수 있는 서열을 의미한다.

[0055] 또한, 상기 중쇄가변영역 및/또는 경쇄가변영역의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

[0056] 상기 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄가변영역 및/또는 경쇄가변영역의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다.

[0057] 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인(align)하

고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얻어진 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 95%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.

- [0058] 또 다른 양상은 조류인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체의 중쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 경쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0059] 본 명세서에서, 용어 "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHCT9, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0060] 상기 재조합 벡터에서 상기 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 따라서, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.
- [0061] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0062] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, pL λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 또한, 포유동물 세포의 계능으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0064] 한편, 상기 항체의 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 발현할 수 있는 벡터는 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역이 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환 (co-transformation) 및 표적 형질전환 (targeted transformation)을 통하여 숙주세포로 도입될 수 있다.
- [0065] 또 다른 양상은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0066] 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO (Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주 등이 이용될 수 있다.
- [0067] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주세포 내로의 운반은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0068] 상기 형질전환된 숙주세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

[0069] 일 구체예에 따른 조류인플루엔자 바이러스의 HA 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체 및 이를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스 진단용 조성물 및 키트, 및 이를 사용한 조류인플루엔자 바이러스의 진단 방법에 따르면, 조류인플루엔자 바이러스 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있다.

발명의 효과

[0070] 조류인플루엔자 바이러스(Avian influenza virus: AIV)의 HA 단백질에 특이적인 단클론항체, 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 진단용 조성물을 사용하면, 기존 진단키트보다 간단한 단계만으로 특이적이고 향상된 민감도로 조류인플루엔자 바이러스를 신속하고 정확하게 검출할 수 있다. 따라서, 현장에서의 빠르고 정확한 진단을 통한 신속한 방역이 가능하여 가금농가의 피해를 줄이는 데에 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 조류인플루엔자 바이러스 구조 단백질인 HA 단백질을 암호화하는 유전자의 합성 및 단백질 발현 모식도이다.

도 2는 웨스턴 블롯(western blotting)을 통해 HA 단백질 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 마우스에서의 단클론항체 생산을 위한 heterologous injection 접종 스케줄을 나타낸 도이다.

도 4는 ELISA를 통해 조류인플루엔자 바이러스 HA 단백질 항원에 대한 항체 생성능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 heterologous injection 방법을 이용한 조류인플루엔자 바이러스 단클론항체 생산 모식도이다.

도 6은 조류인플루엔자 바이러스 HA 단백질에 대한 단클론항체 생산 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 Direct ELISA를 통해 일 양상에 따른 단클론항체의 조류인플루엔자 바이러스 특이적 IgG 생산능을 확인한 도이다.

도 8은 IgG 생산능 기준으로 선별한 대표적인 8개 하이브리도마 세포주에서 단클론항체의 이소타이핑(isotyping) 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 이하 일 양상을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 일 양상을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 일 양상의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니며, 일 양상의 실시예 및 실험예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 일 양상을 보다 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다.

[0073] **실시예 1: 조류인플루엔자 바이러스(AIV) HA 단백질을 암호화하는 유전자의 합성 및 발현**

[0074] 조류인플루엔자 바이러스의 구조 단백질인 HA(HA9) 단백질을 암호화하는 유전자를 합성하였다. 상기 유전자(HA)는 국내에서 발생한 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 A/chicken/Korea/01310/2001(H9N2)로부터 확보하였다. 유전자 합성 시, 이들 유전자의 진행세포 내에서의 발현율을 높이기 위해 코작(Kozak) 서열을 시작 코돈 바로 전에 삽입하고 코돈 최적화(codon optimization)를 수행하였다. 합성 후 유전자를 pcDNA myc-His 3.1(-) 벡터에 클로닝하는 과정을 도 1에 나타내었다.

[0075] 293T 세포는 ATCC에서 구매하여 사용 전까지 37℃, 5% CO₂ 조건의 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)을 포함하는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)에서 유지하였다. 상기 벡터를 293T 세포에 형질도입(transfection)한 후, 웨스턴 블롯(western blotting)을 수행하여 pcDNA myc-His 3.1(-) 벡터에 의해 발현된 HA 단백질을 확인하였다(도 2).

[0076] **실시예 2: 단클론항체 생산**

[0077] **2-1: Heterologous injection**

[0078] 단클론항체 생산을 위하여 heterologous injection 방법을 사용하였다. Heterologous injection은 하나의 항원만을 접종하여 항체를 유도하는 것이 아니라, 다른 항원을 1차적으로 접종하고 마지막에 원하는 항원을 접종하는 방식이다. 구체적으로, 전 바이러스(whole virus)인 조류인플루엔자 바이러스 H9N2 표준 균주를 12일 간격으

로 1차, 2차 접종하였으며, 마지막인 3차, 4차 접종 시 HA 단백질을 접종하여 Balb/c 마우스를 면역화하였다. 상기 접종 스케줄을 도 3에 나타내었다.

[0079] **2-2: 항체 생성능 확인**

[0080] 이후 면역된 마우스의 안와정맥에서 소량 채혈을 하여 혈청을 분리한 후, HA 각각에 대한 항체 생성능을 ELISA를 통해 검증하였다. 마우스 혈청은 PBS-T(Phosphate Buffered Saline with 0.05% Tween 20 containing 5% skim milk)으로 1:1000으로 희석하여 ELISA에 이용하였다. ELISA 실시 후 파장 450 nm에서 결과를 확인하고, 흡광도 결과치(OD)를 통해 HA 각각에 대한 항체 생성능을 확인하였다. 그 결과 HA(HA9) 각각에 대한 항체가 생성된 것을 확인하였다(도 4)

[0081] **2-3: 단클론항체 생산**

[0082] 3차 접종으로부터 3일 후, 마우스의 비장을 적출하고 비장 세포를 분리하여 골수종 세포(myeloma)와 융합(fusion)시켜 조류인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 항원에 대한 단클론항체를 분비하는 잡종세포인 하이브리도마(hybridoma)를 생산하였다. 이어서, 생산한 하이브리도마를 ELISA 방법으로 선별하고 하이브리도마 콜로니(colony)를 지속적으로 성숙, 및 번식시켜 단클론 유도를 실시하였으며(single cell expansion), 총 192개의 단세포 클론(single cell clone)을 확보하였다. 상기 단클론항체 생산 모식도를 도 5에, 생산된 HA에 대한 단세포 클론 일부를 도 6에 나타내었다.

[0083] **실시예 3: 고반응성 하이브리도마 세포주의 선별**

[0084] 조류인플루엔자 바이러스의 HA 단백질과 높은 반응성을 보이는 하이브리도마 세포주를 선별하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0085] 구체적으로, 상기 실시예 2를 통해 융합된 세포를 7일 이상 배양하고, 육안이나 현미경을 통해 융합세포가 군락을 형성하여 자라는 것을 확인한 다음, 96-웰 플레이트(96-well plate)의 각각의 웰에 있던 기존 배지를 교체하여 상기 실시예 2와 동일한 조건에서 3일간 추가적으로 배양하였다. 이후 96-웰 플레이트 내 각각의 웰에 존재하는 배지를 취하여 direct ELISA를 수행하였다. 그 결과 조류인플루엔자 바이러스 특이적 IgG를 비교적 많이 분비하는 하이브리도마 세포주를 선별하였으며 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0086] **실시예 4: 단클론항체 이소타이핑(isotyping) 분석**

[0087] 실시예 3에서 IgG를 많이 분비하는 하이브리도마 세포주를 선별한 결과, 최종적으로 HA에 대한 세포주 5개를 선별하였다. 각 하이브리도마 세포주의 배양 상층액을 취하여 단클론항체의 면역글로불린(immunoglobulin) 이소타입(isotype)을 ELISA 방법으로 분석하였다.

[0088] 구체적으로, 마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM에 각각 특이적으로 결합하는 염소(Goat)의 항체를 PBS(pH 7.4) 용액을 이용하여 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석시키고, 효소면역흡착검사용 플레이트에 100 μL 씩 분주한 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그 다음 0.1% PBS/T 용액을 이용하여 각각의 웰(Well)을 3회 세척하고, 블로킹(Blocking)을 위해 1% 소혈청알부민(Bovine serum albumin, BSA)이 포함된 PBS/T 용액을 각각의 웰에 200 μL 씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 PBS/T 용액을 이용하여 같은 방법으로 세척해 주었다. 그 다음 상기 실시예 2의 단클론항체를 100 μL 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰으며, 반응이 끝난 후 0.1% PBS/T 용액을 이용하여 각각의 웰을 3회 세척해 주었다. 그 다음 HRP 효소가 연결된 염소의 항-마우스 IgG (Goat anti-mouse IgG, HRP conjugated)를 각각의 웰에 분주하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 같은 방법으로 세척하였다. 이후 HRP의 기질인 TMB 용액 100 μL 씩을 각각의 웰에 분주하여 상온에서 15분 동안 반응시켜 발색반응을 확인하였다. 그 다음 반응종결용액(Stop solution)인 0.5 N H₂SO₄ 용액 100 μL 씩을 각각의 웰에 분주하여 반응을 종결시켰다. 각각의 이소타입 반응성에 대한 수치화를 위해 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0089] 도 8에 나타난 바와 같이, 5개 세포주 모두 조류인플루엔자 바이러스 특이적인 항체 IgG2a 서브클래스와 초기항체 IgM을 다량으로 분비하는 것을 확인하였다. 이들 중에서 조류인플루엔자 바이러스의 HA 단백질과 가장 높은 반응성을 보이는 HA10 1 하이브리도마 세포주를 한국세포주연구재단(Korean Cell Line Research Foundation: KCLRF)에 기탁하여 기탁번호 KCLRF-BP-00508를 부여받았다.

[0090] 상기 결과를 통해, 상기 하이브리도마 세포주로부터 수득한 단클론항체는 IgG2a 및 IgM 유형의 조류인플루엔자 바이러스 특이적 단클론항체를 분비하여, 감염 초기에 신속하고 정확한 바이러스 진단이 가능함을 확인하였다.

수탁번호

수탁번호 : KCLRFBP00508

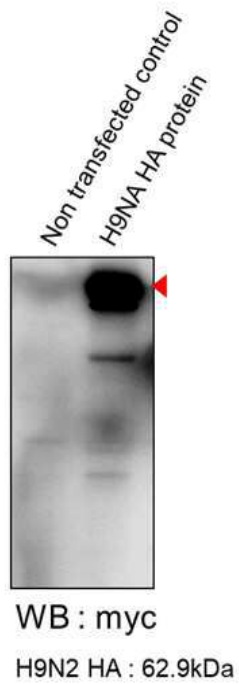
수탁일자 : 20210202

도면

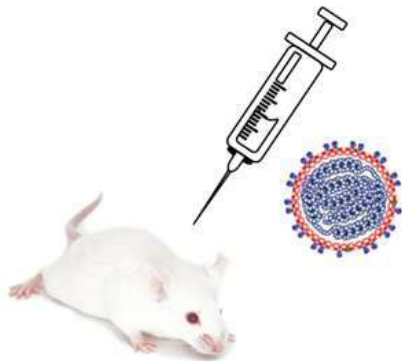
도면1



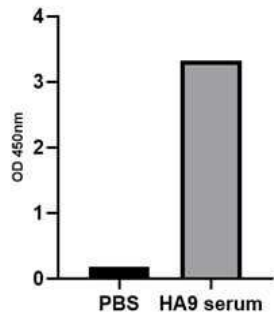
도면2



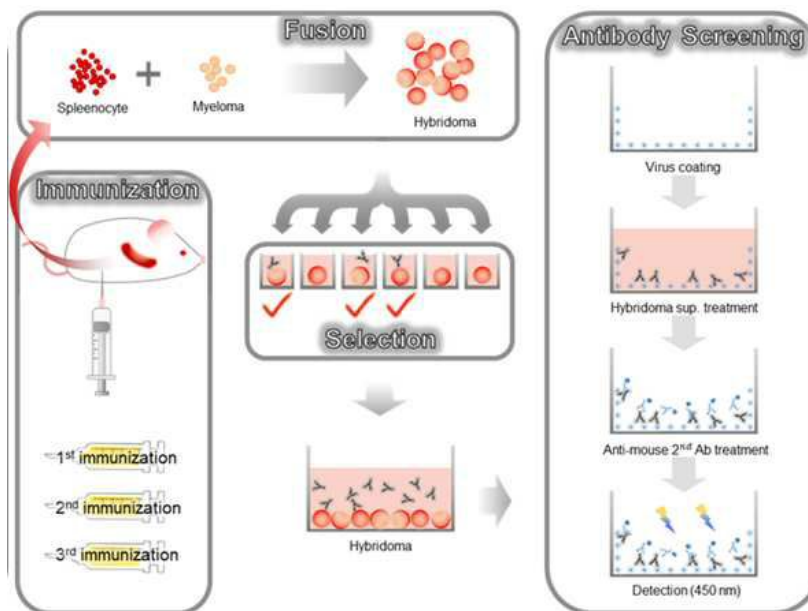
도면3



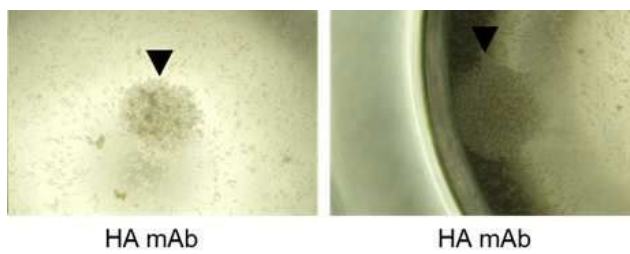
도면4



도면5

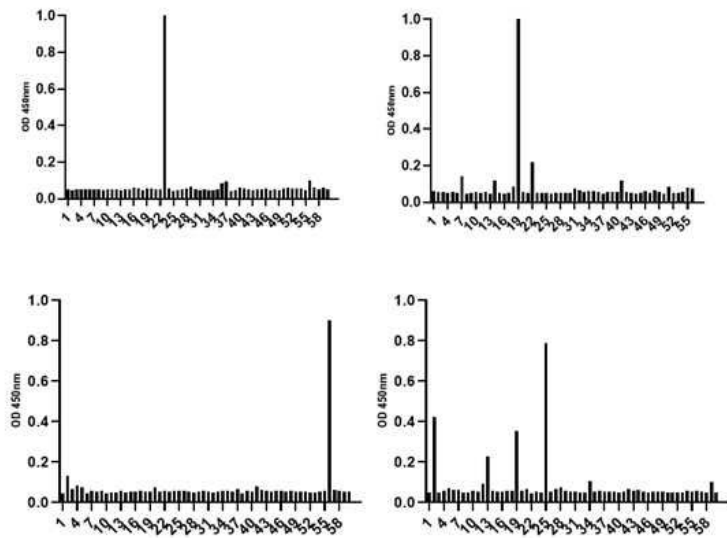


도면6

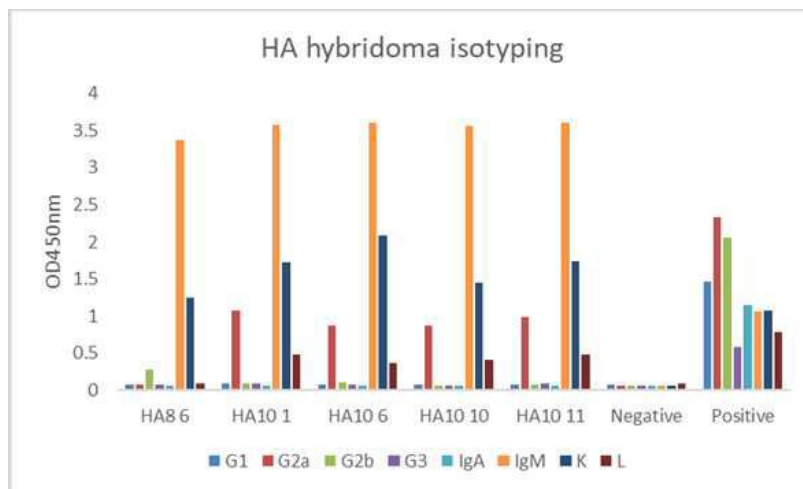


도면7

mAb screening (HA) 결과



도면8



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Monoclonal antibody specific to HA of avian influenza virus and
use thereof
- <130> PN132968KR
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 560

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIV HA protein

<400> 1

Met Glu Ile Ile Ala Leu Ile Ala Ile Leu Val Val Thr Lys Thr Ser

1 5 10 15

Asn Ala Asp Lys Ile Cys Ile Gly Tyr Gln Ser Thr Asn Ser Thr Glu

20 25 30

Thr Val Asp Thr Leu Val Glu Asn Asn Val Pro Val Thr His Ala Lys

35 40 45

Glu Leu Leu His Thr Glu His Asn Gly Met Leu Cys Ala Thr Asn Leu

50 55 60

Gly His Pro Leu Ile Leu Asp Thr Cys Thr Ile Glu Gly Leu Val Tyr

65 70 75 80

Gly Asn Pro Ser Cys Asp Leu Leu Leu Gly Gly Lys Glu Trp Ser Tyr

85 90 95

Ile Val Glu Arg Ser Ser Ala Val Asn Gly Met Cys Tyr Pro Gly Lys

100 105 110

Val Glu Asn Leu Glu Glu Leu Gln Ser Phe Phe Ser Ser Ala Arg Ser

115 120 125

Tyr Lys Arg Leu Leu Leu Phe Pro Asp Arg Thr Trp Asn Val Thr Tyr

130 135 140

Thr Gly Thr Ser Lys Ala Cys Ser Asn Ser Phe Tyr Arg Ser Met Arg

145 150 155 160

Trp Leu Thr His Lys Asn Gly Ser Tyr Pro Ile Gln Asp Ala Gln Tyr

165 170 175

Thr Asn Asp Trp Gly Lys Asn Ile Leu Phe Met Trp Gly Ile His His

180 185 190

Pro Pro Thr Asp Thr Glu Gln Ile Asn Leu Tyr Lys Lys Ala Asp Thr

195 200 205

Thr Thr Ser Ile Thr Thr Glu Asp Ile Asn Arg Thr Phe Lys Pro Val

210 215 220

Ile Gly Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Pro Thr Gly Arg Ile Asp Tyr
225 230 235 240

Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Gln Thr Leu Arg Val Arg Ser Asn
245 250 255

Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Gly His Ile Leu Ser Gly Glu Ser
260 265 270

His Gly Arg Ile Leu Lys Thr Asp Leu Ser Ser Gly Asn Cys Val Val
275 280 285

Gln Cys Gln Thr Glu Lys Gly Gly Leu Asn Thr Thr Leu Pro Phe His
290 295 300

Asn Val Ser Lys Tyr Ala Phe Gly Asn Cys Pro Lys Tyr Val Gly Val

305 310 315 320

Lys Ser Leu Lys Leu Ala Val Gly Leu Arg Asn Val Pro Ala Ala Ser
325 330 335

Tyr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp
340 345 350

Pro Gly Leu Val Ala Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Ser Asn Asp Gln
355 360 365

Gly Val Gly Met Ala Ala Asp Arg Glu Ser Thr Gln Glu Ala Val Asp
370 375 380

Lys Ile Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Ile Asp Lys Met Asn Lys Gln
385 390 395 400

Tyr Glu Ile Ile Asp His Glu Phe Ser Glu Ile Glu Ala Arg Leu Asn
405 410 415

Met Ile Asn Asn Lys Ile Asp Asp Gln Ile Gln Asp Ile Trp Ala Tyr
420 425 430

Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gln Lys Thr Leu Asp Glu
435 440 445

His Asp Ala Asn Val Asn Asn Leu Tyr Asn Lys Val Lys Arg Ala Leu

450 455 460

Gly Ser Asn Ala Ile Glu Asp Gly Lys Gly Cys Phe Glu Leu Tyr His

465 470 475 480
 Lys Cys Asp Asp Gln Cys Met Glu Thr Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp
 485 490 495
 Arg Leu Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Lys Leu Glu Arg Gln Lys Ile Glu
 500 505 510
 Gly Val Lys Leu Glu Ser Glu Glu Thr Tyr Lys Ile Leu Thr Ile Tyr
 515 520 525

Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Ala Val Gly Phe Ala Ala Phe
 530 535 540
 Met Phe Trp Ala Met Ser Asn Gly Ser Cys Arg Cys Asn Ile Cys Ile
 545 550 555 560

<210> 2

<211> 1683

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIV HA protein coding sequence

<400> 2

atggaaataa tagcactaat agctatactg gtagtgacaa aaacaagcaa tgcagataaa 60

atttgattg gctaccagtc aacaaactcc acagaaactg ttgatacact agtagaaaac 120

aatgtccctg tgacacatgc caaagaattg ctccacacag agcacaatgg aatgctatgt 180

gcaacaaacc tggggcacc tctcactcta gacacctgca ccatcgaagg gttggtgtac 240

ggcaaccctt cctgtgattt gctactggga gggaaagaat ggtcttacat tgtcgaaga 300

tcatcagctg tcaatgggat gtgttaccct ggaaggttag agaacctgga agaactccag 360

tcatTTTTCA gctccgctcg ctctacaaa agactcctgc tctttccaga cagaacttgg 420

aatgtgactt aactgggac aagcaaagca tgttcaaact cattctacag aagtatgaga 480

tggtgacac acaagaacgg ttcttaccct attcaagacg cccaatatac caacgattgg 540

gggaagaata ttctttcat gtggggcata caccacccac ctaccgatac agagcaaata 600

aatctataca aaaaagccga tacaacaaca agtataacaa cggaagatat caatcgaact 660

ttcaaaccag tgatagggcc aaggcctctt gtcaatggtc caacaggag aattgattat 720

tattggtcag tactaaagcc aggccagaca ctgcgagtga gatccaatgg gaatctaatt 780

gccccatggt atggacacat tctttcagga gaaagccatg gaagaatcct gaagaccgat 840

ttgagtagtg gcaactgcgt agtacaatgc caaactgaga aagggtggtt gaacacgacc 900

ttgccattcc acaatgtcag caagtatgca ttgggaact gcccaaata tttggagtg 960

aagagtctca aactggcagt tggcttaagg aatgttctg ctgcatcata tagagggtc 1020

ttcggtgcca tagctggatt catagaaggc ggttggccag gactagtgc aggttggtac 1080

gggtttcagc attcaaatga tcaaggggtt ggaatggccg cagataggga atcaactcaa 1140

gaagcagttg acaagataac atccaaagta aataacataa tcgacaaaat gaacaagcag 1200

tatgaaatca ttgatcatga gttcagtga attgaagcca gactcaatat gatcaacaat 1260

aagattgatg accaaataca ggacatctgg gcgtacaatg cagaattact ggtactgctt 1320

gaaaatcaga aaacactcga tgagcatgat gcaaatgtga ataactgtga taataaggtg 1380

aagagagcat tgggttcaaa tgcaatagag gatggaaagg gatgcttcga gttgtatcac 1440

aatgtgatg atcaatgcat ggaaacaatt agaaacggga cttatgacag gctaaagtat 1500

gaagaagaat caaaactaga aaggcagaaa atagaagggg tgaaactgga gtctgaagaa 1560

acttacaaga tccttaccat ttattcgact gtcgcctcat ctcttgtgct tgcagtgggg 1620

tttgctgcct tcatgttctg ggccatgtcc aatggatctt gcagatgcaa catttgtata 1680

taa 1683

<210> 3

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIV specific mAb_VH

<400> 3

Val Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr Trp Ile Arg Trp Val Lys Gln Arg

1 5 10 15

Pro Ala His Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Pro Gly Gly Gly

20 25 30

Asp Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Glu Gly Lys Val Thr Val Ser Ala

35 40 45

Asp Thr Thr Ser Ser Thr Val Tyr Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser

50 55 60

Asp Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Arg Tyr Tyr Arg Phe

65 70 75 80

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

85 90

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIV specific mAb_VL

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro

85 90 95

Pro Met Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp

100 105 110

Ala Ala Pro Thr Val Ser

115

<210> 5

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIV specific mAb_VH coding sequence

<400> 5

gttggataca ccttcctaa ctattggata ggttgggtaa agcagaggcc tggacatggc 60

cttgagtgga ttggacatat ttaccctgga ggtggtgaca ctgactacaa tgagaagttc 120

gagggcaagg tcacagtgc tgcagacacg acctccagca cagtctacat gcagatcagc 180

agcctaacat ctgatgactc tgccatctat tactgtgcaa gattccgcta ctataggttt	240
gactactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctca	279
<210> 6	
<211> 354	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AIV specific mAb_VL coding sequence	
<400> 6	
gatattgtga tgacacagac tacagcaatc atgtctgcat ctctagggga acgggtcacc	60
atgacctgca ctgccagctc aagtgttaagt tccagttact tgcactggta ccagcagaag	120
ccaggatcct cccccaaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtccca	180
gtctgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag	240
gctgaagatg ctgccactta ttactgccac cagtatcacc gttccccacc catgacgttc	300
ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacgg gctgatgctg caccaactgt atcc	354