



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월01일

(11) 등록번호 10-2609628

(24) 등록일자 2023년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/10 (2006.01) C07K 16/06 (2006.01)

G01N 33/569 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/10 (2023.08)

C07K 16/065 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0102775

(22) 출원일자 2020년08월14일

심사청구일자 2020년08월14일

(65) 공개번호 10-2022-0021791

(43) 공개일자 2022년02월22일

(56) 선행기술조사문헌

High neutralizing potency of swine glyco-humanized polyclonal antibodies against SARS CoV-2. (2020.07.25.bioRxiv preprint version)\*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 6 항

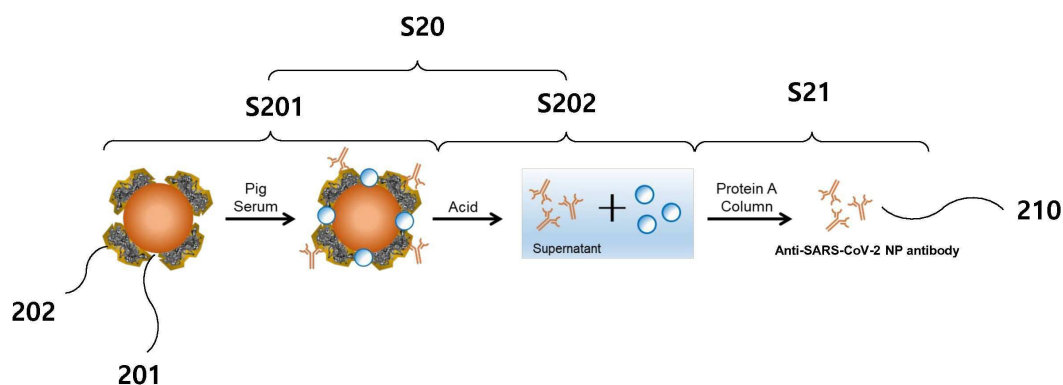
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 코비드-19 진단용 항체, 이의 제조 방법 및 응용

## (57) 요약

본 발명은 코비드19 진단용 항체, 이의 제조 방법 및 이의 응용에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 일단에 SARS-CoV-2의 핵단백질(nucleoprotein)을 항원으로 하는 항원 결합 부위(antigen binding site)를 가지는 돼지 면역글로불린의 Fab 분절(Fab fragment)을 포함하는 코비드-19 진단용 항체가 제공된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

**G01N 33/56983** (2013.01)

**G01N 33/6854** (2013.01)

**C07K 2317/53** (2013.01)

**C07K 2317/55** (2013.01)

**G01N 2333/165** (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Lancet Microbe. 2020. Vol.1, Issue 1,  
E14-E23.\*

대한진단면역학회 COVID-19 면역반응 Webinar.  
(2020.07.09. Online 발표)\*

CN111366729 A

WO2017042303 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

삭제

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

일단에 SARS-CoV-2의 핵단백질(nucleoprotein)을 항원으로 하여 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위(antigen binding site)를 가지는 돼지 면역글로불린 Fab 분질(Fab fragment)를 포함하고, 상기 돼지 면역글로불린은 돼지 IgG, IgM, IgD, IgA 및 IgE로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나이고, 상기 항원 결합 부위는 돼지 면역글로불린 중쇄의 가변 영역상의 제1 상보성 결정 영역 및 돼지 면역글로불린 경쇄의 가변 영역상의 제2 상보성 결정 영역을 포함하여, 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질 상에 존재하는 적어도 하나의 에피토프와 상보적 형상을 가지는, 코비드-19 진단용 항체의 제조방법에 있어서,

상기 SARS-CoV-2 핵단백질 항원을 주입함에 의한 면역화 과정을 진행하지 않은 돼지의 혈장으로부터 SARS-CoV-2의 핵단백질과 결합하는 혈장 내 단백질을 선별하는 제1 단계; 및

상기 제1 단계에서 선별된 상기 혈장 내 단백질을 필터링하여 항체를 분리해 내는 제2 단계를 포함하고,

상기 제1 단계는,

SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 비드(bead)를 상기 돼지 혈장 내에 인큐베이션(incubation)하여 혈장 내 단백질을 상기 비드와 결합시키는 단계; 및

상기 비드를 산성 용액으로 처리하여 상기 혈장 내 단백질을 상기 비드로부터 해리시키는 단계를 포함하는 코비드-19 진단용 항체의 제조방법.

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 비드는, 상기 비드 내부에 내포된 페리 자성, 강자성, 또는 초상자성을 가지는 자기 입자(magnetic particle); 및

상기 비드의 표면에 코팅된 카르복시기(carboxyl group), 아미노기(amino group) 히드록시기(Hydroxy group), 티올기(thiol group), 에폭시기(epoxy group; glycidyl ether group), 클로로메틸기(chloromethyl group) 또

는 토실기(tosyl group)를 포함하며,

상기 SARS-CoV-2의 핵단백질은 상기 작용기와 화학결합을 형성함으로써 상기 비드의 표면에 고정되는 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법.

#### 청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 제 2 단계는, 상기 제 1 단계에서 선별된 상기 혈장 내 단백질에 대하여, 항체를 선택적으로 흡착하는 크로마토그래피 컬럼에 통과시켜 항체를 분리하는 단계를 포함하는 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법.

#### 청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A(protein A), 단백질 G(protein G), 단백질 L(Protein L) 중 적어도 하나를 포함하는 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법.

#### 청구항 11

제 6 항에 있어서,

상기 제 2 단계 이후에, 상기 제 2 단계에서 분리된 항체로부터 항체 응집체(antibody aggregate)를 제거하는 단계를 더 포함하는 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법.

#### 청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 항체 응집체를 제거하는 단계는, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 사용하는 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법.

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 바이러스 감염 진단 기술에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는, 코비드-19 진단용 항체, 이의 제조 방법 및 이의 응용에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] SARS-CoV-2 바이러스에 의해 발생하는 급성 중증 호흡기 감염성 질환인 코비드-19(COVID-19)의 범유행

(pandemic)으로 인해, 바이러스 감염자를 신속하게 스크리닝(screening)하여 추가적인 감염의 발생을 차단하고, 환자에게 신속한 치료를 제공할 필요가 증가되었다. 이에 따라 바이러스 감염 여부를 신속하게 대규모로 진단할 필요가 증가되어, 피검자에서 채취된 검체로부터 바이러스 감염 여부를 진단하기 위한 다양한 방법이 연구되고 있다.

[0003] 피검자의 바이러스 감염 여부를 진단하는 방법으로는, 피검자로부터 채취된 검체로부터 바이러스 항원에 대응하는 항체(antibody)를 검출하는 방법, 바이러스 핵산(viral nucleic acid)을 탐지하는 방법 또는 바이러스 항원(viral antigen)을 탐지하는 방법이 존재한다. 상기 방법 중에서 항체를 검출하는 방법은, 감염자가 항체를 미생성한 경우 위음성(false negative)이 나타나는 문제점이 있으며, 코비드-19의 경우, 바이러스 감염 후 항체를 형성하기 전의 무증상 감염자도 전염력을 가지므로, 항체 검출 방법은 코비드-19 방역을 위한 신속한 감염자 스크리닝에 적합하지 아니하다. 또한, 바이러스 핵산을 탐지하는 방법, 예컨대 RT-PCR과 같은 방법은 높은 정확도를 가지는 장점이 있으나, 고가의 PCR 장비와 전문 인력을 필요로 하여 비용이 높고 현장 가용성이 떨어지며, 검사에 적어도 6시간이 소요되어 신속한 결과를 얻을 수 없는 단점이 있다.

[0004] 바이러스 항원을 탐지하는 방법은 특정 바이러스 항원에 특이적으로 결합하는 항체에 기반한다. 종래에는 상기 항체를 제조하기 위하여, 실험동물에 목적하는 항원을 주입하고, 상기 실험동물의 혈장을 채취하여 다클론 항체(polyclonal antibody)를 정제하는 방법 또는 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 면역세포를 불사화(immortalization)하여 이를 배양함으로써 단일클론 항체(monoclonal antibody)를 얻는 방법이 사용되었다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 교차반응성이 낮고 코비드-19를 낮은 비용으로 신속하게 진단할 수 있는 진단용 항체를 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 다른 기술적 과제는 진술한 이점을 가지는 항체를 낮은 비용으로 단기간에 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 코비드-19를 낮은 비용으로 신속하게 진단하기 위한 코비드-19 진단용 접합체(conjugate)를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는 코비드-19를 낮은 비용으로 신속하게 진단할 수 있는 코비드-19 진단 키트를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 코비드-19진단용 항체는, 일단에 SARS-CoV-2의 핵단백질(nucleoprotein)을 항원으로 하여 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위(antigen binding site)를 가지는 돼지 면역글로불린의 Fab 분절(Fab fragment)을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 돼지 면역글로불린은 돼지 IgG, IgM, IgD, IgA 및 IgE 중 어느 하나일 수 있다.

[0010] 일부 실시예에서, 상기 코비드-19 진단용 항체는 상기 Fab 분절의 C말단에 결합된 돼지 면역글로불린 중쇄(heavy chain)의 힌지 영역(hinge region)을 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 코비드-19 진단용 항체는 상기 Fab분절의 C말단과 결합되고, 이황화 결합으로 상호 연결되는 돼지 면역글로불린 중쇄의 힌지 영역(hinge region)을 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 코비드-19 진단용 항체는 상기 Fab 분절의 C말단에 결합된 돼지 면역글로불린의 Fc분절(Fc fragment)을 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 기술적 과제를 달성하기 위한 일 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법은, 돼지 혈장으로부터 SARS-CoV-2의 핵단백질과 결합하는 혈장 내 단백질을 선별하는 제 1 단계 및 상기 제 1 단계에서 선별된 상기 혈장 내 단백질을 필터링하여 항체를 분리해내는 제 2 단계를 포함할 수 있다.

[0012] 일부 실시예에서, 상기 제 1 단계는 SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 비드(bead)를 상기 돼지 혈장 내에 인큐베이션(incubation)하여 상기 혈장 내 단백질을 상기 비드와 결합시키는 단계 및 상기 비드를 산성 용액으로 처리하여 상기 혈장 내 단백질을 상기 비드로부터 해리시키는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 제 2 단계는, 상기 제 1 단계에서 선별된 상기 혈장 내 단백질에 대하여, 항체를 선택적으로 흡착하는 크로마토그

래피 컬럼에 통과시킴으로써 항체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A(protein A), 단백질 G(protein G), 단백질 L(Protein L) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0013] 일부 실시예에서, 상기 비드는 상기 비드 내부에 내포된 페리 자성, 강자성, 또는 초상자성을 가지는 자기 입자(magnetic particle)를 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 비드는 상기 비드의 표면에 코팅된 카복시기(carboxyl group), 아미노기(amino group) 히드록시기(Hydroxy group), 티올기(thiol group), 에폭시기(epoxy group; glycidyl ether group), 클로로메틸기(chloromethyl group) 및 토실기(tosyl group)로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 포함하며, 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질은 상기 작용기와 화학결합을 형성함으로써 상기 비드의 표면에 고정될 수 있다.

[0014] 일부 실시예에서, 상기 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법은, 상기 제 2 단계 이후에, 상기 제 2 단계에서 분리된 항체로부터 항체 응집체(antibody aggregate)를 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 항체 응집체를 제거하는 단계는, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 기술적 과제를 달성하기 위한 일 실시예에 따른 코비드-19 진단용 접합체(conjugate)는, 상기 코비드-19 진단용 항체 및 탐지가능한 신호를 발생시키고 상기 코비드-19 진단용 항체와 직접 또는 링커(linker)에 의해 접합된(conjugated) 레이블(label)을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 탐지가능한 신호는 화학 반응, 색상 변화, 방사선, 형광(fluorescence), 인광(phosphorescence), 화학발광(chemiluminescence), 전기화학발광(electro-chemiluminescence) 중 적어도 하나일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 기술적 과제를 해결하기 위한 일 실시예에 따르면, 전술한 코비드-19 진단용 항체를 이용한 코비드-19 진단 키트가 제공될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 진단 키트는 면역염색법(immunostaining), 면역형광법(immunofluorescence) 또는 면역흡착 검사(immunosorbent assay)를 위한 진단 키트일 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 진단 키트는 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance; SPR) 또는 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS)을 위한 진단 키트일 수 있다.

### 발명의 효과

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 저렴하고 용이하게 입수가 가능한 돼지 혈장으로부터 제조됨으로써 교차반응성이 낮고 낮은 비용으로 제조 가능하며, 전문인력과 고가의 장비를 요하지 아니하고 신속한 검사가 가능한 항원-항체 반응 기반 검사 키트에 응용되는 코비드-19 진단용 항체가 제공될 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 돼지를 면역동물로 사용함으로써 혈장을 다량으로 용이하게 입수가 가능하고, 면역동물의 지속적인 면역화 과정 및/또는 면역세포의 합성, 변형, 선별 및 배양 과정을 필요로 하지 않으므로 단기간에 저렴한 비용으로 상술한 이점을 가지는 코비드-19 진단용 항체를 제조하는 방법이 제공될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상술한 이점을 가진 항체를 응용함으로써 오진율이 낮고 낮은 비용으로 제조 가능하며 전문인력과 고가의 장비를 요하지 아니하며 신속한 검사가 가능한 항원-항체 반응 검사 키트에 응용되는 코비드-19 진단용 접합체(conjugate)가 제공될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는 상술한 이점을 가진 항체를 응용함으로써 오진율이 낮고 낮은 비용으로 제조 가능하며 전문인력과 고가의 장비를 요하지 아니하며 신속한 검사가 가능한 코비드-19 진단 키트가 제공될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a 내지 도 1d는 본 발명의 일 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 다른 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법을 나타낸 개략도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체의 전기영동 분석 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체의 특이적 결합능을 ELISA의 450nm 가시광선 흡수량으로 분석한 결과이다.

도 5는 SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 마그네틱 비드 및 BSA(Bovine Serum Albumin)가 고정된 대조군 마그네

틱 비드에 대해 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체를 이용한 면역염색법을 실시하여 형광을 촬영한 결과이다.

도 6은 SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 마그네틱 비드 및 BSA(Bovine Serum Albumin)가 고정된 대조군 마그네틱 비드에 대하여 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체를 이용한 FACS 분석을 실시한 결과의 히스토그램이다.

도 7a 및 도 7b는 각 바이러스 배양액의 1/10 희석액 및 1/100 희석액을 에 대하여 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체를 이용한 경쟁적 ELISA의 450nm 가시광선 흡수량을 나타낸 그래프이다.

도 8a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체를 이용한 표면 플라스몬 공명(Surface Plasmon Resonance) 분석의 결과를 나타낸 센서그램 그래프이며, 도 8b는 상기 표면 플라스몬 공명 분석 결과 SARS-CoV-2 핵단백질 샘플 용액의 각 농도별  $\Delta RU$  값을 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0023] 본 발명의 실시예들은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위하여 제공되는 것이며, 하기 실시예는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 오히려, 이들 실시예는 본 개시를 더욱 충실하고 완전하게 하고, 당업자에게 본 발명의 사상을 완전하게 전달하기 위하여 제공되는 것이다.
- [0024] 도면에서 동일 부호는 동일한 요소를 지칭한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 해당 열거된 항목 중 어느 하나 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.
- [0025] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 또한, 본 명세서에서 단수로 기재되어 있다 하더라도, 문맥상 단수를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprise)" 및/또는 "포함하는(comprising)"이란 용어는 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.
- [0026] 본 명세서에서 기관 또는 다른 층 "상에(on)" 형성된 층에 대한 언급은 상기 기관 또는 다른 층의 바로 위에 형성된 층을 지칭하거나, 상기 기관 또는 다른 층 상에 형성된 중간 층 또는 중간 층들 상에 형성된 층을 지칭할 수도 있다. 또한, 당해 기술 분야에서 숙련된 자들에게 있어서, 다른 형상에 "인접하여(adjacent)" 배치된 구조 또는 형상은 상기 인접하는 형상에 중첩되거나 하부에 배치되는 부분을 가질 수도 있다.
- [0027] 본 명세서에서, "아래로(below)", "위로(above)", "상부의(upper)", "하부의(lower)", "수평의(horizontal)" 또는 "수직의(vertical)"와 같은 상대적 용어들은, 도면들 상에 도시된 바와 같이, 일 구성 부재, 층 또는 영역들이 다른 구성 부재, 층 또는 영역과 갖는 관계를 기술하기 위하여 사용될 수 있다. 이들 용어들은 도면들에 표시된 방향뿐만 아니라 소자의 다른 방향들도 포괄하는 것임을 이해하여야 한다.
- [0028] 이하에서, 본 발명의 실시예들은 본 발명의 이상적인 실시예들(및 중간 구조들)을 개략적으로 도시하는 단면도들을 참조하여 설명될 것이다. 이들 도면들에 있어서, 예를 들면, 부재들의 크기와 형상은 설명의 편의와 명확성을 위하여 과장될 수 있으며, 실제 구현 시, 도시된 형상의 변형들이 예상될 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시예는 본 명세서에 도시된 영역의 특정 형상에 제한된 것으로 해석되어서는 아니 된다. 또한, 도면의 부재들의 참조 부호는 도면 전체에 걸쳐 동일한 부재를 지칭한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Da" 및 "kDa"는 분자의 크기를 나타내는 단위이다. Da는 Dalton의 약자로서, 1Da는 결합이 없고 핵과 전자가 바닥상태이며 정지상태인 탄소 원자 질량의 1/12로 정의하며, 이는 약  $1.6605390666 \times 10^{-27}$  kg에 해당하는 값으로서, 1g/mol과 거의 일치하는 값이다. 또한, "kDa"는 1,000Da이다.
- [0030] 본 명세서 상의 용어 "항체"에는 항체, 항체 유도체 또는 이의 분절(fragment)이 포함될 수 있고, 항체에 관한 상세한 설명은 본 발명의 항체에도 적용된다. 항체는 다른 폴리펩타이드에 융합된 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 키메라 분자 또는 그의 등가물을 포함할 수 있다. 상기 항체들은 온전한(intact) 면역글로불린 분자일 수 있고, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc 및 F(v) 및 N-글리칸 구조 및 파라토프와 같은 상기 항체의 구성 부분들 및 상기 구성 부분들 중 적어도 일부를 포함할 수도 있다.



- [0031] 상기 항체는 혈청의 기본 구성요소이며, 상기 항체들, 면역글로불린 분자들 또는 이의 단편들의 집합체일 수 있고, 항체 또는 면역글로불린의 단일 분자일 수 있다. 상기 항체 분자는 항원 또는 상기 항원의 에피토프(epitope)와 같은 특이적인 항원 결정기에 결합되거나 상기 항원 결정기와 반응함으로써 면역학적 이펙터 메카니즘을 유도할 수 있다. 상기 항체는 단일특이(monospecific)적일 수 있으며, 상기 항체들의 조성물은 동일한 항체들로 구성되어 단일클론(monoclonal)일 수 있고, 동일한 항원의 다른 에피토프들 또는 다른 항원들의 에피토프들과 반응하는 다른 종류의 항체들을 포함하여 다클론(polyclonal)일 수 있다. 각 항체는 상기 항체의 대응하는 항원에 대한 특이적인 결합을 가능케 해주는 독특한 구조를 가질 수 모든 천연 항체 분자들은 경쇄와 중쇄라는 기본 구조를 가질 수 있다. 상기 중쇄 또는 경쇄는 각각 가변 영역(variable region) 및 불변 영역(constant region)을 포함할 수 있다. 상기 중쇄와 경쇄의 가변 영역이 합쳐져 항원 결합 부위(antigen binding site)를 형성할 수 있다. 상기 항원 결합 부위는 상기 항체의 Fab(antibody binding fragment)에 포함될 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서, 용어 "코비드-19"(COVID-19)는 SARS-CoV-2(구 2019-nCoV) 바이러스에 감염된 상태 일반을 가리키는 용어로 사용된다. 즉, "코비드-19"는 SARS-CoV-2의 감염에 의해 발생하는 급성 중증 호흡기 증상을 포함하는 다양한 증상을 나타내는 바이러스 감염증 및 무증상 상태의 감염을 가리킬 수 있다.
- [0033] 도 1a 내지 도 1d는 본 발명의 일 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체의 모식도이다.
- [0034] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체는, 일단에 SARS-CoV-2의 핵단백질(nucleoprotein)과 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위(antigen binding site, 106)가 형성된 돼지 면역글로불린의 Fab 분절(Fab fragment, 10)을 포함할 수 있다. 상기 Fab 분절(10)은 돼지 면역글로불린의 경쇄(light chain)의 가변 도메인( $V_L$  domain, 101)과 경쇄의 가변 도메인(101)의 C말단에 결합된 경쇄의 불변 도메인( $C_L$  domain, 102) 및 돼지 면역글로불린 중쇄(heavy chain)의 가변 도메인( $V_H$  domain, 103) 및 상기 중쇄의 가변 도메인(103)의 C말단에 결합되고, 상기 경쇄의 불변 도메인(102)과 이황화 결합(disulfide bond, 105)를 형성하여 결합된 제 1 불변 도메인( $C_H1$  domain, 104)을 포함할 수 있다. 경쇄의 가변 도메인(101)과 중쇄의 가변 도메인(103)은 각각 제 1 및 제 2 상보성 결정 영역(complementary determining region, 1011, 1031) 및 프레임워크 영역(framework region, 1012, 1032)을 가지며, 경쇄의 가변 도메인(101) 및 중쇄의 가변 도메인(103)에 각각 형성된 제 1 및 제 2 상보성 결정 영역들(1011, 1031)은 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질 상에 존재하는 적어도 하나의 에피토프(epitope)와 상보적인 형상을 가지는 항원 결합 부위(106)를 구성할 수 있다.
- [0035] 항원-항체 결합은 런던력(London force; 분산력)에 의존하며, 런던력을 발생시키는 유발 쌍극자(induced dipole) 사이의 힘의 크기는 두 분자간의 접촉 면적에 의해 좌우되므로, 상기 에피토프와 상기 항원 결합 부위의 상기 상보적인 형상의 일치 정도가 항원-항체 결합의 특이성과 강도를 결정하는 인자일 수 있다. 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체는 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질 상에 존재하는 적어도 하나의 상기 에피토프와 상보적인 형상을 가지는 상기 항원 결합 부위를 가짐으로써, 상기 SARS-CoV-2 핵단백질과 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0036] 도 1b 내지 도 1d를 참조하면, 일 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체는 상기 Fab 분절의 C말단에 결합된 돼지 면역글로불린 중쇄(heavy chain)의 힌지 영역(hinge region, 107)을 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 복수 개의 힌지 영역(107)은 이황화 결합(105)으로 상호 결합되고, 각각 Fab분절(10)의 C말단과 결합될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 코비드-19 진단용 항체는 상기 Fab 분절의 C말단에 결합된 돼지 면역글로불린의 Fc분절(Fc fragment, 20)을 포함할 수 있다. Fc 분절(20)은 본 발명의 일 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체를 진단 용도로 사용하는 경우에, 항-돼지 면역글로불린 2차 항체가 결합하기 위한 에피토프가 되거나, 후술하는 바와 같이 탐지가능한 신호를 발생시키는 레이블(label)이 접합될 수 있다.
- [0037] 일부 실시예에서, 상기 돼지 면역글로불린은 돼지 IgG, IgM, IgD, IgA 및 IgE 중 어느 하나일 수 있으며, 다른 실시예에서, 상기 돼지 면역글로불린의 경쇄는 카파( $\kappa$ ) 또는 람다( $\lambda$ ) 사슬일 수 있고, 상기 돼지 면역글로불린의 중쇄는 감마( $\gamma$ ), 델타( $\delta$ ), 알파( $\alpha$ ), 뮤( $\mu$ ) 및 입실론( $\epsilon$ ) 사슬 중 어느 하나일 수 있다.
- [0038] 도 2는 본 발명의 다른 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법을 나타낸 개략도이다.
- [0039] 도 2를 참조하면, 본 발명의 다른 기술적 과제를 달성하기 위한 본 발명의 다른 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법은, 돼지 혈장(pig serum)으로부터 SARS-CoV-2의 핵단백질(202)과 결합하는 혈장 내 단백질을 선별하는 제 1 단계(S20) 및 제 1 단계에서 선별된 상기 혈장 내 단백질을 필터링하여 코비드-19 진단용 항



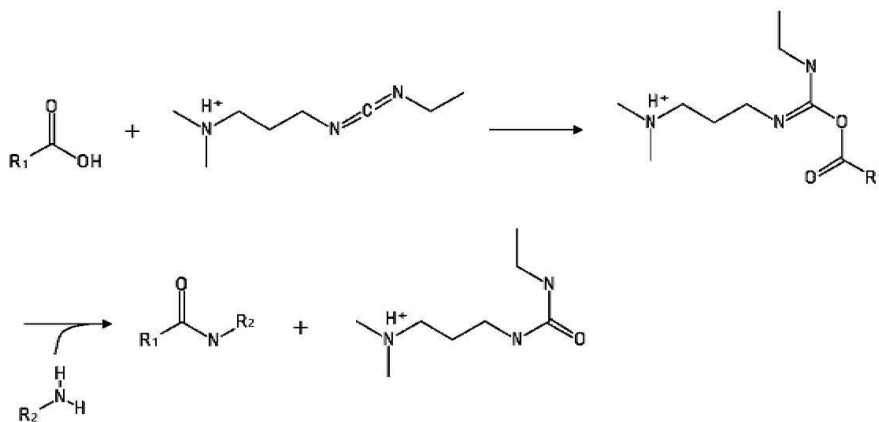
체(210)를 분리해내는 제 2 단계(S21)를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 제 1 단계(S20)는 상기 선별을 위한 친화성 물질(affinity material)로 SARS-CoV-2의 핵단백질(202)을 사용할 수 있다.

[0040] 일부 실시예에서, 제 1 단계(S20)는 SARS-CoV-2의 핵단백질(202)이 고정된 비드(bead, 201)를 상기 패지 혈장 내에 인큐베이션(incubation)하여 혈장 내 단백질을 상기 비드와 결합시키는 단계(S201) 및 상기 비드를 산성 용액으로 처리하여 상기 혈장 내 단백질을 상기 비드로부터 해리시키는 단계(S202)를 포함할 수 있다. SARS-CoV-2의 핵단백질(202)은 생산 및 정제의 용이성을 위해 N말단 또는 C말단에 부착된 적어도 6개의 히스티딘(Histidine)으로 이루어진 아미노산 서열인 His-Tag를 포함할 수 있다.

[0041] 일부 실시예에서, 비드(201)는 내부에 페리자성(ferrimagnetic), 강자성 (ferromagnetic), 또는 초상자성(superparamagnetic)을 가지는 자기 입자(magnetic particle)를 포함할 수 있다. 자기 입자를 포함하는 마그네틱 비드(magnetic bead)는 자기장을 인가하는 경우 용액으로부터 용이하게 분리될 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 자기 입자는 초상자성을 띌 수 있고, 이 경우, 상기 자기 입자에 잔류 자기(residual magnetism)가 발생되지 않음으로 인해 상기 마그네틱 비드 간의 자기력이 최소화된다는 장점이 있다.

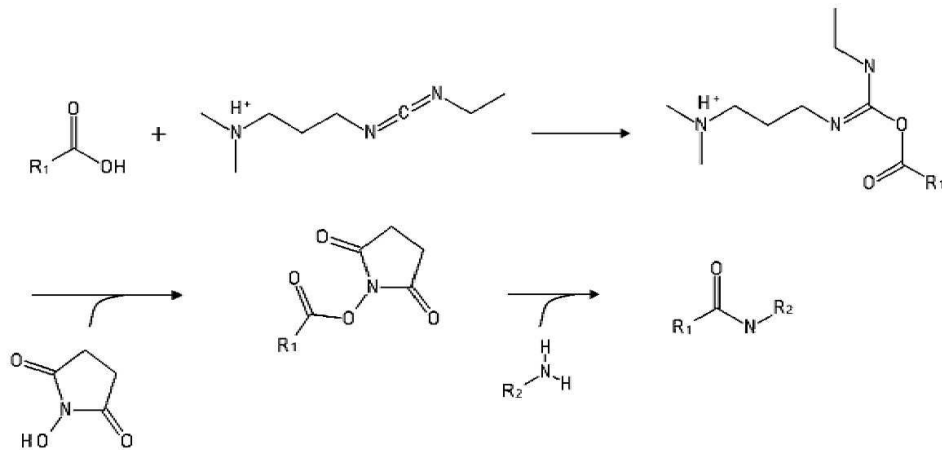
[0042] 다른 실시예에서, 비드(201)는 표면에 코팅된 카르복시기(carboxyl group), 아미노기(amino group) 히드록시기(Hydroxy group), 티올기(thiol group), 에폭시기(epoxy group; glycidyl ether group), 클로로메틸기(chloromethyl group) 또는 토실기(tosyl group)와 같은 활성화 작용기를 포함하며, SARS-CoV-2의 핵단백질(202)은 상기 작용기와 화학 결합을 형성함으로써 상기 비드의 표면에 고정될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 작용기가 카르복시기 또는 아미노기인 경우, 상기 혈장 내 단백질을 비드(201)와 결합시키는 단계는 EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) 및 NHS (N-Hydroxysuccinimide) 또는 Sulfo-NHS 중 적어도 하나를 포함하는 크로스링커(crosslinker)를 가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 카르복시기 또는 아미노기는 SARS-CoV-2의 핵단백질(202)에 존재하는 아미노기 또는 카르복시기와 하기 반응식 1 또는 반응식 2의 화학 반응을 통해 아마이드 결합(amide bond)을 형성할 수 있다.

[0043] [반응식 1]



[0044]

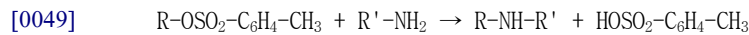
[0045] [반응식 2]



[0046]

[0047] 다른 실시예에서, 상기 작용기가 토실기(tosyl group)인 경우, 상기 토실기는 SARS-CoV-2의 핵단백질에 존재하는 아미노기와 하기 반응식 3의 화학 반응을 통해 화학 결합을 형성할 수 있다.

[0048] [반응식 3]



[0050] 상기와 같은 반응을 통해 SARS-CoV-2의 핵단백질(202)이 비드의 표면에 화학적으로 결합되어 고정됨에 따라, SARS-CoV-2의 핵단백질(202)을 친화성 물질로 하여 결합되는 항체를 포함한 혈장 내 단백질을 돼지 혈청으로부터 선별할 수 있다.

[0051] 다른 실시예에서, 제 2 단계(S21)는, 제 1 단계(S20)에서 선별된 상기 혈장 내 단백질에 대하여, 항체를 선택적으로 흡착하는 크로마토그래피 컬럼에 통과시킴으로써 코비드-19 진단용 항체(210)를 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 크로마토그래피 컬럼은 특정한 단백질 간의 친화성 결합을 이용하여 정제하고자 하는 단백질의 통과 속도를 저하시킴으로써 단백질을 분리하는 친화성 크로마토그래피 컬럼일 수 있다.

[0052] 또 다른 실시예에서, 상기 크로마토그래피 컬럼은 레진 비드(resin bead) 또는 다공성 멤브레인(porous membrane)을 포함하고, 상기 레진 비드 또는 다공성 멤브레인 표면에 고정된 단백질 A(protein A), 단백질 G(protein G), 단백질 L(Protein L) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 단백질 A 및 단백질 G는 포유류 면역글로불린의 Fc 분절에 결합하며, 단백질 G는 Fab 분절에 결합함으로써, 상기 돼지 혈장에서 선별된 단백질 중 항체만을 정제할 수 있다.

[0053] 일부 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법은, 제 2 단계(S21) 이후에, 제 2 단계(S21)에서 분리된 항체로부터 항체 응집체(antibody aggregate)를 제거하는 제 3 단계(미도시)를 더 포함할 수 있다. 항체 응집체는 복수 개의 항체가 상호 간의 결합에 의해 응집된 상태의 입자로서, 항체 단량체(antibody monomer)와 달리 생활성(bioactivity)이 없으며, 따라서 진단용 접합체(conjugate) 및 진단 키트에 사용하기에 부적합할 수 있다. 상기 제 3 단계를 거침으로써, 상술한 방법으로 생산된 코비드-19 진단용 항체를 진단용 접합체 및 진단 키트에 사용하는 경우 오진율 및 불량률을 낮게 할 수 있다.

[0054] 다른 실시예에서, 상기 제 3 단계는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 사용할 수 있다. 상기 크기 배제 크로마토그래피는 컬럼 및 상기 컬럼 내부에 충전된 일정한 크기의 기공을 가지는 레진 비드를 사용하며, 상기 기공의 크기(cutoff)는 정제하고자 하는 단백질의 최대 크기를 기준으로 결정될 수 있다. 예컨대, 항체 단량체는 150kDa 내지 200kDa의 분자량을 가지므로, 상기 기공의 크기(cutoff)는 200kDa일 수 있다. 제 2 단계에서 분리된 상기 항체를 상기 컬럼에 통과시키는 경우, 상기 항체 단량체는 상기 기공과의 상호작용으로 인하여 상기 컬럼을 통과하는 속도가 느려질 수 있으며, 상기 기공보다 크기가 큰 상기 항체 응집체는 상기 기공에 의한 방해 받지 않음으로 인해 상기 항체 단량체보다 단시간에 상기 컬럼을 통과함으로써 상기 항체 단량체로부터 분리되어 제거될 수 있다.

[0055] 본 발명의 일부 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법은, 전술한 단계들을 통하여 제조된 항체를 소화 효소로 절단하여 항체 분절(antibody fragments)을 얻는 단계를 더 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기

소화 효소는 파파인(Papain)일 수 있다. 파파인에 의한 절단의 결과로 일단에 SARS-CoV-2의 핵단백질과 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위(106)가 형성된 돼지 면역글로불린의 Fab 분절(10)로 구성된 코비드-19 진단용 항체를 제조할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 소화 효소는 펩신이며, 펩신에 의한 절단의 결과로 2개의 Fab 분절(10) 및 Fab 분절(10)의 C말단에 결합되고 이황화 결합(105)으로 상호 결합되는 2개의 돼지 면역글로불린 중쇄의 힌지 영역(107)을 가지는 돼지 면역글로불린의 F(ab')<sub>2</sub> 분절로 구성된 코비드-19 진단용 항체를 제조할 수 있다.

[0056] 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 코비드-19 진단용 접합체(conjugate)는, 상기 코비드-19 진단용 항체 및 탐지 가능한 신호를 발생시키고 상기 코비드-19 진단용 항체와 직접 또는 링커(linker)에 의해 접합된(conjugated) 레이블(label)을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 탐지 가능한 신호는 화학 반응, 색상 변화, 방사선, 형광(fluorescence), 인광(phosphorescence), 화학발광(chemiluminescence), 전기화학발광(electrochemiluminescence) 중 적어도 하나일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 탐지 가능한 신호가 화학 반응 또는 색상 변화인 경우에, 상기 레이블은 비오틴(biotin)과 같은 표적 친화성 물질(target affinity material) 또는 HRP(Horseradish Peroxidase)와 같은 효소일 수 있고, 상기 탐지 가능한 신호가 방사선인 경우, 상기 레이블은 방사성 물질일 수 있고, 상기 탐지 가능한 신호가 형광인 경우에, 상기 레이블은 플루오레세인(fluorescein)과 같은 형광 물질일 수 있으며, 상기 탐지 가능한 신호가 화학발광 또는 전기화학발광인 경우, 상기 레이블은 아크리디늄 에스테르(acridinium ester)와 같은 화학발광 물질 또는 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>와 같은 전기화학발광 물질일 수 있다.

[0057] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 전술한 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체를 이용한 코비드-19 진단 키트가 제공될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 진단 키트는 면역염색법(immunostaining), 면역형광법(immunofluorescence) 또는 면역흡착 검사(immunosorbent assay)와 같은 면역검사(immunoassay) 기법을 위한 진단 키트일 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 진단 키트는 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance; SPR) 또는 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS)와 같은 면역검사 기법을 위한 진단 키트일 수 있다.

[0058] 일 실시예에서, 상기 진단 키트는 피검자로부터 채취한 검체에 포함된 항원이 결합할 수 있도록 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체가 표면에 고정된 기판을 포함할 수 있다. 상기 기판 표면은 카르복시기(carboxyl group), 아미노기(amino group) 히드록시기(Hydroxy group), 티올기(thiol group), 에폭시기(epoxy group; glycidyl ether group), 클로로메틸기(chloromethyl group) 또는 토실기(tosyl group)와 같은 활성화 작용기로 코팅됨으로써, 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체가 표면에 고정될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 진단 키트가 측면 유동 면역검사 키트(lateral flow immunoassay kit)인 경우, 상기 기판은 측면 유동을 위한 모세관 현상을 유발할 수 있도록 섬유상 물질로 구성된 심지(wick)를 포함할 수 있다.

[0059] 일부 실시예에서, 상기 진단 키트가 직접 탐지(direct detection) 면역검사 키트인 경우, 상기 심지는 상술한 본 발명의 다른 실시예에 따른 접합체(conjugate)를 포함할 수 있으며, 상기 접합체는 피검자로부터 채취된 검체에 SARS-CoV-2의 핵단백질이 포함된 경우, 이와 항원-항체 결합을 형성할 수 있으며, 상기 항원-항체 결합을 형성한 상태로 상기 기판 표면에 고정된 코비드-19 진단용 항체와 결합할 수 있다. 이 경우, 상기 접합체에 포함된 상기 레이블이 발생시키는 탐지 가능한 신호를 통해 SARS-CoV-2의 핵단백질 항원의 존재가 탐지될 수 있다.

[0060] 다른 실시예에서, 상기 진단 키트가 간접 탐지(indirect detection) 면역검사 키트인 경우, 상기 심지는 본 발명의 일 실시예에 따른 코비드-19 진단용 항체 및 탐지 가능한 신호를 발생시키는 레이블이 접합된 항-돼지 면역글로불린 2차 항체 접합체(conjugate)를 포함할 수 있다. 피검자로부터 채취된 검체에 SARS-CoV-2의 핵단백질이 포함된 경우, 코비드-19 진단용 항체는 이와 항원-항체 결합을 형성할 수 있으며, 상기 항원-항체 결합을 형성한 상태로 상기 기판 표면에 고정된 코비드-19 진단용 항체와 결합할 수 있다. 상기 2차 항체 접합체는 상기 코비드-19 진단용 항체와 항원-항체 결합을 형성할 수 있으며, 결합된 상기 2차 항체 접합체에 포함된 상기 레이블이 발생시키는 탐지 가능한 신호를 통해 SARS-CoV-2의 핵단백질 항원의 존재가 탐지될 수 있다.

[0061] 또 다른 실시예에서, 상기 진단 키트가 표면 플라즈몬 공명 또는 전기화학 임피던스 분광법을 위한 진단 키트인 경우, 상기 기판은 유리 표면에 금속 박막을 증착 또는 스퍼터링(sputtering)한 뒤 상기 금속 박막에 상기 활성화 작용기를 코팅함으로써 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체가 고정된 것일 수 있다.

[0062] 이하에서는 실시예를 들어, 본 발명에 관하여 더욱 상세하게 설명할 것이다. 하기의 개시 사항은 단지 설명을 목적으로 하는 것일 뿐 본 발명이 이에 제한되는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[0063] 본 발명의 발명자들은 돼지 면역글로불린을 코비드-19 진단에 활용할 수 있는지 여부를 평가하기 위하여, 돼지를 자연 숙주로 하고 코로나바이러스과 (Coronaviridae)에 속하는 바이러스인 PEDV(Porcine Epidemic Diarrhea Virus), TGEV(Transmissible Gastro-Enteritis Virus) 및 PHEV(Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus)의 각 핵단백질의 핵산서열을 SARS-CoV-2의 핵단백질의 핵산서열과 비교하는 작업을 수행하였다. 비교 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

Virus Name	Natural Host	Genus	Identity	Similarity
SARS-CoV-2	Human	Betacoronavirus	-	-
PEDV	Pig	Alphacoronavirus	27%	40%
TGEV	Pig	Alphacoronavirus	28%	48%
PHEV	Pig	Betacoronavirus	40%	55%

[0065] 표 1에서, 각 단백질의 동일성(identity) 및 유사성(similarity)은 SARS-CoV-2 핵단백질을 기준으로, 각 바이러스의 핵단백질의 아미노산 서열에 대하여 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 알고리즘을 이용하여 측정하였다. 동일성은 동일한 아미노산으로 이루어진 서열의 비율을 의미하며, 유사성은 잔기의 성질(예컨대 전하, 극성, 분지 유무와 같은 특징)이 유사한 서로 다른 아미노산으로 이루어진 서열의 비율 의미한다.

[0066] 표 1을 참조하면, 돼지는 코로나바이러스과(Coronaviridae)에 속하는 알파 및 베타코로나바이러스의 자연 숙주로서, 특히 베타코로나바이러스인 PHEV의 핵단백질은 SARS-CoV-2의 핵단백질과 높은 동일성 및 유사성을 나타낼 수 있다. 이러한 성질은 돼지가 자연상태에서 노출되고 있는 코로나바이러스에 대하여 자연 상태에서 형성하고 있는 항체가 SARS-CoV-2의 핵단백질과 특이적으로 결합할 수 있음을 나타낸다. 따라서 돼지 혈장으로부터 코비드-19 진단용 항체를 제조하는 경우, 종래의 다클론 항체 제조 기술과 대비하면, 통상 2주 이상이 소요되는 면역동물을 항원으로 면역화 하는 단계를 생략하고 항체를 얻을 수 있어 신속하고 저렴하게 제조 가능하다는 장점이 존재한다. 또한, 돼지 혈장은 통상 다클론 항체를 제작하기 위하여 사용되는 면역동물인 마우스, 모르모트, 토끼, 염소 등과 대비하여 다량의 혈장을 저렴하게 얻을 수 있어 원료의 원가 측면에서도 장점이 존재한다. 이에 따라 본 발명의 발명자들은 하기와 같은 실시예로 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체 및 그 제조 방법을 검증하였다.

[0067] [실시예 1]

[0068] 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체는 전술한 일 실시예에 따라 다음과 같이 제조되었다. 토실활성화(tosyl-activated) 마그네틱 비드 10mg을 SARS-CoV-2 핵단백질 농도 800  $\mu$ g/mL 용액에 16시간동안 37℃로 인큐베이션하여 고정하였다. 이어서 돼지 혈장 1mL에 상기 마그네틱 비드를 첨가한 후 1시간동안 wheel rotating mixer에서 15rpm의 속도로 회전시켜 교반하였다. 이후 마그네틱 비드에 부착된 단백질을 pH2.7인 0.1 M glycine-HCl 버퍼 용액 1mL에 10초간 처리하여 해리 시킨 뒤, pH10.5인 1 M Tris-HCl 버퍼 용액 50  $\mu$ L를 첨가하여 반응을 중화하였다.

[0069] 이후, 상기 해리의 결과물을 단백질 A컬럼에 충전하여 여과한 뒤, 컬럼을 10mL PBS (Phosphate-buffered saline) 용액으로 세척하여, 단백질 A에 부착되지 아니한 단백질을 제거하였다. 상기 단백질 A에 부착된 항체는 pH2.7인 0.1M glycine-HCl 버퍼 용액 2mL을 가하여 용리시켰으며, 용리된 항체는 중화를 위해 pH10.5인 1M Tris-HCl 버퍼 용액 100  $\mu$ L을 넣은 원심분리관으로 투입하였다.

[0070] 이후, 3kDa의 cutoff를 가지는 원심분리 필터를 사용하여 상기 용리된 항체를 농축하였다. 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체의 최종적인 수율(yield)은 돼지 혈장 1mL 당 143.4  $\pm$  25ng으로써, 0.26  $\pm$  0.05%로 확인되었다.

[0071] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체의 전기영동 분석 결과이다. 코비드-19 진단용 항체에 DTT(Dithiothreitol)를 첨가한 것과 첨가하지 아니한 것이 각각 SDS-PAGE 전기영동에 의해 분석되었다.

[0072] 도 3을 참조하면, DTT를 첨가한 뒤 전기영동을 실시한 결과, 25kDa 밴드가 미약하게 나타나고, 55kDa 밴드가 강하게 나타나는 것을 알 수 있으며, 이는 각각 돼지 면역글로불린의 경쇄(light chain) 및 돼지 면역글로불린의 중쇄 감마(heavy chain gamma)에 해당된다. DTT에 의해 이황화 결합이 분해됨으로써, 돼지 IgG가 경쇄 및 중쇄로 해리되어 특징적인 밴드를 나타낸 것으로 볼 수 있다. 또한, DTT를 첨가하지 아니한 경우 상기 25kDa 및 상



기 55kDa 밴드가 나타나지 아니하고, SDS 젤의 측정 한계를 초과한 영역에서 밴드가 나타난 것을 알 수 있다. 이상의 결과를 통해 상술한 방법에 따라 제조된 물질이 주로 IgG로 이루어진 항체임이 확인되었다.

[0073] [실시예 2]

[0074] 상술한 방법에 따라 제조된 상기 코비드-19 진단용 항체의 특이적 결합능을 확인하기 위하여 SARS-CoV-2, 인플루엔자 A(New Caledonia/20/99), 인플루엔자 B(Florida/07/04 및 Tokio/53/99) 및 B형간염 바이러스 핵단백질 항원이 코팅된 마이크로플레이트(microplate)를 사용하여 대하여 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)를 수행하였다. 상기 항원들은 10 µg/mL 농도의 상기 단백질 용액 100 µL를 96-well 마이크로플레이트의 well에 담아 37°C에서 2시간동안 인큐베이션하였다. 이후, 농도 1 µg/mL인 상기 코비드-19 진단용 항체 용액 100 µL를 상기 마이크로플레이트의 각 well에 첨가하여 1시간동안 인큐베이션하였다. 이후, HRP(Horseradish Peroxidase)로 표지되고 돼지 IgG에 결합하는 2차 항체 용액 (농도 0.5 µg/mL) 100 µL를 첨가한 뒤 1시간동안 인큐베이션하였다. 상기 각 단계를 수행한 뒤 과량의 PBST용액(0.1% Tween®20 이 함유된 PBS 용액을 말한다. 이하 같다.)을 사용하여 세척하는 단계를 각각 수행하였다.

[0075] 이후, HRP 표지에 반응하는 TMB(Tetramethylbenzidine) 용액을 가하여 30분간 유지한 뒤, 2M 황산 용액 100 µL로 반응을 ?청(quenching)하였다. 이어서 각 well에 대해 과장 450nm 가시광선의 흡수량(OD; Optical Density)을 측정하였다. 측정 결과를 도 4에 도시하였다.

[0076] 도 4를 참조하면, 인플루엔자 B(Florida 및 Tokio) 및 B형 간염 항원은 본 발명의 코비드-19 진단용 항체와 30% 수준으로만 결합하였으며, 인플루엔자 A와는 결합하지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해 본 발명의 코비드-19 진단용 항체가 SARS-CoV-2의 핵단백질에 특이적으로 결합함을 알 수 있다.

[0077] [실시예 3]

[0078] 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체의 SARS-CoV-2의 핵단백질에 대한 결합능을 정성적으로 확인하기 위하여 면역염색법 (immunostaining)을 사용하였다. 토실활성화(tosyl-activated)된 마그네틱 비드를 농도 800 µg/mL인 SARS-CoV-2의 핵단백질 용액에 침지하여 16시간동안 인큐베이션하여, SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 마그네틱 비드를 제조하였다. 이후, 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 마그네틱 비드 1mg을 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체를 1 µg/mL로 함유한 용액 500 µL에 1시간동안 침지하였다. 이어서, 플루오레세인(fluorescein)으로 표지되고 돼지 IgG에 결합하는 2차 항체 용액 (농도 0.5 µg/mL) 100 µL를 첨가한 뒤 1시간동안 인큐베이션하였다. 상기 각 단계를 수행한 뒤에는 과량의 PBST용액을 사용하여 상기 마그네틱 비드를 세척하는 단계를 각각 수행하였다.

[0079] 도5 는 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 마그네틱 비드 및 대조군으로 BSA(Bovine Serum Albumin)가 고정된 마그네틱 비드에 대하여 형광을 촬영한 결과이다.

[0080] 도5 를 참조하면, 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 마그네틱 비드는 대조군과 비교하면 모든 비드가 현저히 강한 형광을 내는 것을 알 수 있다. 이는 본 발명의 코비드-19 진단용 항체가 상기 마그네틱 비드 표면의 SARS-CoV-2의 핵단백질과 결합하였으며, 이에 따라 플루오레세인으로 표지된 항-돼지IgG 항체가 결합함으로써 상기 마그네틱 비드가 형광을 낼 수 있었음을 의미한다. 따라서 본 발명의 코비드-19 진단용 항체는 SARS-CoV-2의 핵단백질에 대해 결합능이 있음을 알 수 있다.

[0081] [실시예 4]

[0082] 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체의 SARS-CoV-2의 핵단백질에 대한 결합능을 정량적으로 분석하기 위하여 유세포분석법(flow cytometry)을 실시하였다. 유세포분석법에는 상술한 면역염색법에 사용한 것과 동일한 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 마그네틱 비드 및 BSA가 고정된 대조군 마그네틱 비드가 사용되었다. 상기 각 마그네틱 비드를 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체 용액으로 처리한 뒤, 형광 분석을 위하여 여기 및 방출 파장이 각각 488nm, 525nm인 FITC(Fluorescein isothiocyanate)로 표지된 항-돼지 IgG 항체 용액을 첨가하였다. 상기 각 마그네틱 비드에 대하여 FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting)를 실시하였으며, 그 결과를 도 6 에 히스토그램으로 나타내었다.

[0083] 도 6의 x축은 형광 강도를 로그 스케일의 임의 단위(a.u.; arbitrary unit)로 나타낸 것이며, y축은 각 형광 강도를 나타내는 비드의 숫자이다.

[0084] 도 6을 참조하면, 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 마그네틱 비드는 6.9 a.u.에서 113개를 피크값으로 기록하여, 형광 강도 6.9 a.u.에서 3개가 카운트된 대조군 비드 대비 1.5배 강한 형광 강도를 나타낸다. 이를 통

해 본 발명의 코비드-19 진단용 항체는 SARS-CoV-2의 핵단백질에 대해 특이적으로 결합됨을 알 수 있다.

[0085] [실시예 5]

[0086] 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체의 교차반응성을 확인하기 위하여 코로나바이러스과 (coronaviridae)에 속하는 복수의 바이러스에 대하여 ELISA를 수행하였다. SARS-CoV-2, HCoV-229E, MERS-CoV 및 SARS-CoV를 African green monkey kidney cell을 사용하여 배양한 뒤 92° C 에서 15분간 가열하여 비활성화 하여 바이러스 배양액을 제조하였다.

[0087] 이후, PBS 용액 200  $\mu$ L가 담긴 시험관에 상기 각 바이러스 배양액의 1/10 또는 1/100 희석액 2  $\mu$ L를 각각 첨가 하고, 상술한 면역염색법에 사용한 것과 동일한 SARS-CoV-2의 핵단백질이 고정된 마그네틱 비드 2mg 및 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체 250  $\mu$ g/mL 용액 5  $\mu$ L를 첨가하여 1시간동안 20rpm으로 교반하였다. 후속하여 각 시험관에 HRP(Horseradish Peroxidase)로 표지되고 항-돼지 IgG 2차 항체 용액을 첨가한 뒤 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 각 시험관에 TMB(Tetramethylbenzidine) 용액을 가하여 30분간 유지한 뒤, 2M 황산 용액 100  $\mu$ L로 반응을 ?칭(quenching)하고, 각 시험관에 대한 파장 450nm 가시광선의 흡수량(O.D.; Optical Density)을 측정하였다.

[0088] 도 7a 및 도 7b는 각 바이러스 배양액의 1/10 희석액 및 1/100 희석액을 사용한 ELISA의 450nm 가시광선 흡수량을 나타낸 그래프이다.

[0089] 도 7a를 참조하면, 상기 바이러스 배양액 1/10 희석액을 첨가한 경우, 인간에게 급성 중증 호흡기 질환을 일으키는 SARS-CoV-2, SARS-CoV 및 MERS-CoV의 경우, O.D.가 0.22 내지 0.25로 낮게 나타나고, HCoV-229E 및 배양액을 첨가하지 아니한 대조군은 O.D.가 0.35 내지 0.375로 낮게 나타나는 것을 알 수 있다. 또한, 도 7b를 참조하면, 상기 바이러스 배양액 1/100 희석액을 첨가한 경우, SARS-CoV-2, SARS-CoV 및 MERS-CoV와 HCoV-229E 및 대조군 간의 O.D. 차이가 감소한 것을 알 수 있다.

[0090] 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체가 상기 바이러스 배양액에 함유된 바이러스 항원과 결합하는 경우, 상기 바이러스 항원과 상기 마그네틱 비드에 고정된 SARS-CoV-2의 핵단백질이 결합하게 되므로, 상기 마그네틱 비드에 결합하는 항체의 양이 감소함으로써, 대조군과 대비하여 OD가 낮게 나타나게 된다. 상술한 측정 결과에서, 중증 급성 호흡기 증상을 유발하는 SARS-CoV-2, SARS-CoV 및 MERS-CoV의 OD 감소폭이 상기 바이러스 배양액의 희석도에 따라 감소한 반면, 일반적인 감기 원인 바이러스인 HCoV-229E에서는 그러한 사실이 발생하지 아니한 점을 통하여, 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체가 HCoV-229E와 같은 다른 코로나바이러스에 의한 교차반응 및 위양성을 나타낼 가능성이 매우 낮음을 알 수 있다.

[0091] [실시예 6]

[0092] 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체를 이용한 코비드-19 진단 키트의 제작 가능성을 확인하고, 상기 코비드-19 진단용 항체와 SARS-CoV-2의 핵단백질과의 해리상수( $K_D$ )를 정량적으로 측정하기 위하여 SPR(Surface Plasmon Resonance) 용 바이오칩(biochip)을 제작하였다. 바이오칩의 기판은 10mm×10mm BK-7유리 기판 위에 2nm 두께의 티타늄(Ti) 증착층 및 48nm 두께의 골드(Au)층을 스퍼터링 (sputtering)하여 제작하였다. 상기 기판의 골드층에 대하여, 1mM 농도인 mercaptoundecanoic acid ( $\text{SH}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$ )를 가한 뒤 24시간 동안 인큐베이션 함으로써 상기 기판 표면을 카르복시기( $\text{COOH}$ )로 코팅하였다. 이후, 상기 기판 표면을 0.4M EDC 및 0.1M NHS용액을 첨가하여 10분간 상기 카르복시기를 활성화한 뒤, 상술한 방법에 따라 제조된 코비드-19 진단용 항체 10  $\mu$ g/mL 용액을 첨가하였다. 상기 카르복시기와 상기 코비드-19 진단용 항체의 아미노기( $\text{NH}_2$ ) 사이에 아미드 결합(amide bond)이 형성되어, 상기 코비드-19 진단용 항체가 상기 기판의 골드 층 위에 부착됨으로써 바이오칩이 제작되었다.

[0093] 이후, 상기 바이오칩을 플로우 셀(flow cell)을 가지는 바이오센서에 설치한 뒤, 상기 바이오칩에 대하여 SARS-CoV-2의 핵단백질 샘플 용액과 PBST 세척 용액을 주기적으로 교대로 흘려보내어 SPR을 측정하였다. 상기 각 주기마다 상기 SARS-CoV-2 바이러스 샘플을 인큐베이션하는 단계에서는 플로우를 중지시키는 단계를 수행하였다. 각 주기별 상기 SARS-CoV-2의 핵단백질 샘플 용액의 농도는 각각 100pg/mL, 1, 10, 100ng/mL, 1, 10  $\mu$ g/mL의 순서로 설정하였다. SPR 신호의 베이스라인은 상기 PBST세척액을 3회 흘려보내어 세척과정을 거친 뒤의 평균 신호로 하였다.

[0094] 도 8a는 상기 SPR 분석의 결과를 나타낸 센서그램 그래프이다. X축은 시간, Y축은 SPR 공명 각도 변화를 통해 산출된 RU(Resonance Unit)값을 나타낸다. 상기 각 농도별 SARS-CoV-2 핵단백질 샘플 용액을 흘려 보낸 시점은



적색 화살표로 나타내었다. 도 8b는 상기 SPR 분석 결과 SARS-CoV-2 핵단백질 샘플 용액의 각 농도별  $\Delta RU$  값을 나타낸 그래프이다.

[0095] 도 8a 및 도 8b를 참조하면,  $1ng/mL$  이상의 농도의 SARS-CoV-2 핵단백질 샘플 용액을 흘려 보낸 경우 RU 베이스라인 값의 변화를 확인할 수 있으며, 이는 상술한 방법에 따라 제작된 상기 바이오칩 상에 SARS-CoV-2의 핵단백질이 부착됨으로써, SPR 공명 각도의 변화가 측정되었음을 나타낸다. 도 8b에 나타낸 측정치를 바탕으로 상술한 방법에 따라 제작된 코비드-19 진단용 항체와 SARS-CoV-2의 핵단백질 사이의 해리상수( $K_D$ )를 추산하기 위하여 하기 방정식의 랑뮈어 등온흡착 모형(Langmuir isotherm model)에 curve fitting 하였다.

[0096] [방정식4]

[0097]  $R = R_{max} \cdot [Ag] / (K_D + [Ag])$

[0098] (R: SPR 신호값  $R_{max}$ : 최대 SPR 신호값,  $K_D$ : 해리상수, [Ag]: 항원 농도)

[0100] 상기 모형에 fitting 한 결과에 의하면, 상술한 방법에 따라 제작된 코비드-19 진단용 항체와 SARS-CoV-2의 핵단백질 사이의 해리상수( $K_D$ )는  $0.19nM$ 으로 계산되었다. 상기 계산결과를 통해 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체가 SARS-CoV-2의 핵단백질에 대해 특이적 결합능이 있음을 알 수 있다.

[0101] 이상의 실시예들을 종합하면, 본 발명에 따른 코비드-19 진단용 항체는 면역동물에 대한 별도의 면역화 과정 없이 돼지 혈장으로부터 추출될 수 있으며, 면역동물로부터 면역세포를 추출, 합성, 선별 및 배양하는 과정도 생략됨으로써, 종래의 다클론(polyclonal) 또는 단일클론(monoclonal) 항체와 대비하여 단기간 내에 낮은 비용으로 제조될 수 있으며, 면역검사법을 활용한 신속하고 저렴한 코비드-19 진단용 접합체 및 진단 키트에 활용될 수 있다.

[0102] 이상에서 설명한 본 발명이 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

## 부호의 설명

[0103] 10: 돼지 면역글로불린의 Fab 분절

101: 경쇄의 가변 도메인

102: 경쇄의 불변 도메인

103: 중쇄의 가변 도메인

104: 중쇄의 제 1 불변 도메인

1011: 제 1 상보성 결정 영역

1031: 제 2 상보성 결정 영역

1012, 1032: 프레임워크 영역

105: 이황화 결합

106: 항원 결합 부위

107: 힌지 영역

20: Fc 분절

201: 비드

202: SARS-CoV-2의 핵단백질

S20: 제 1 단계

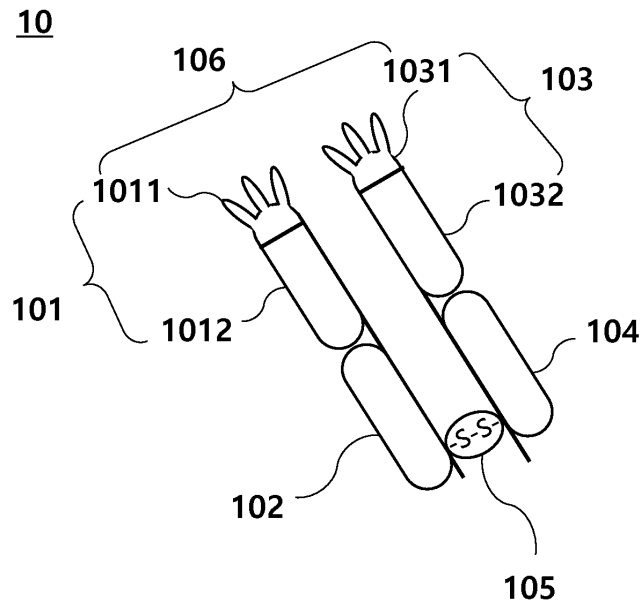
S21: 제 2 단계

S201: 혈장 내 단백질을 비드와 결합시키는 단계

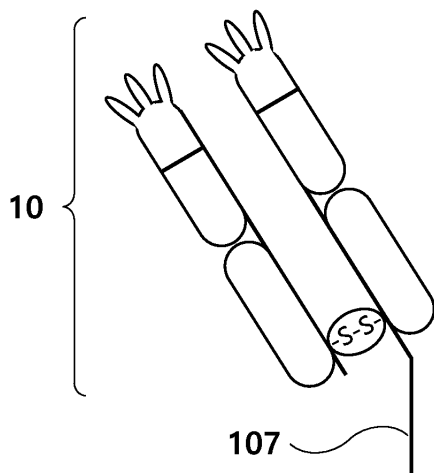
S202: 혈장 내 단백질을 비드로부터 해리시키는 단계

도면

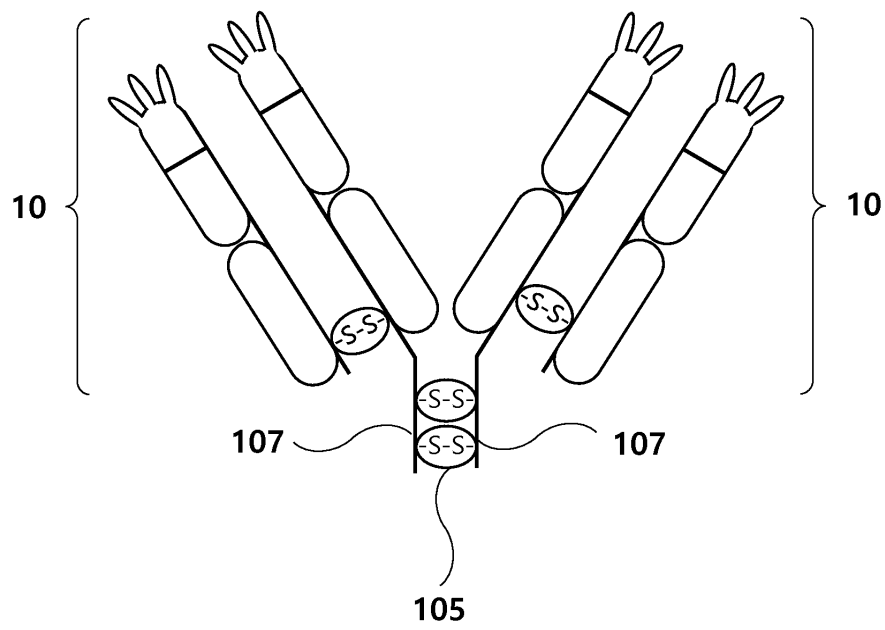
도면1a



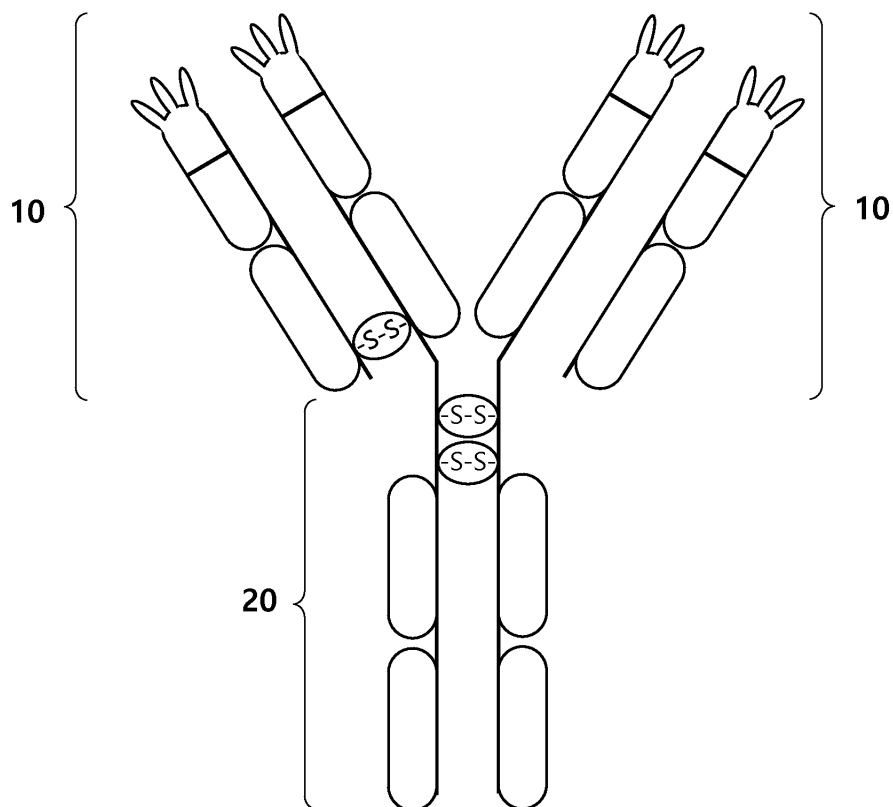
도면1b



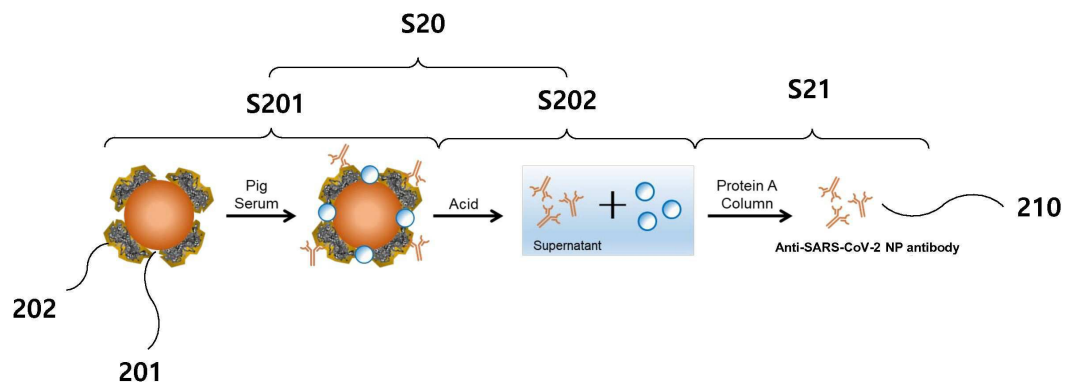
도면1c



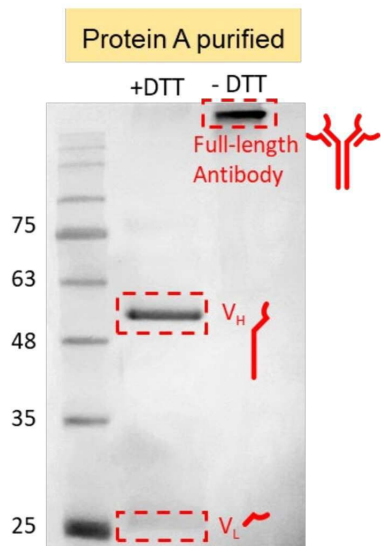
도면1d



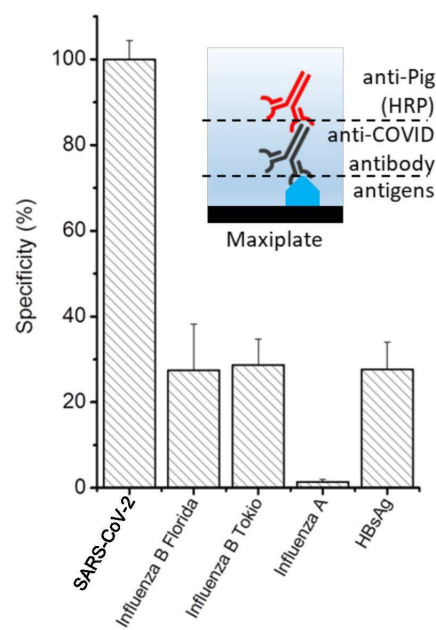
도면2



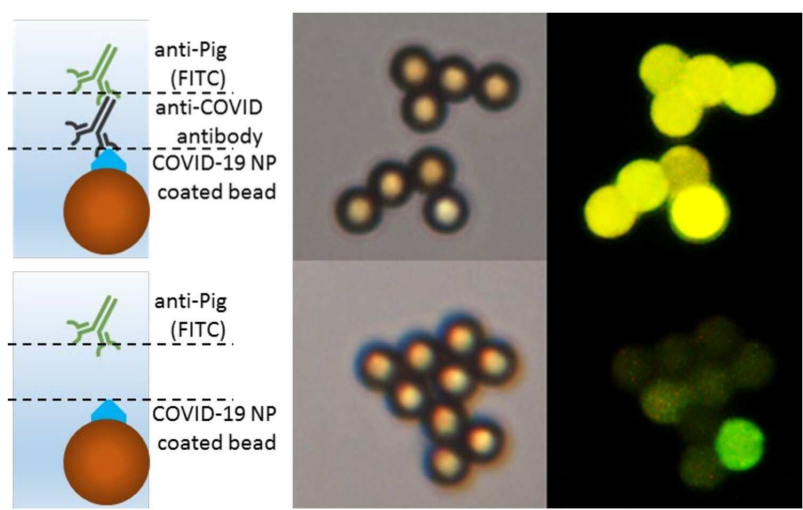
도면3



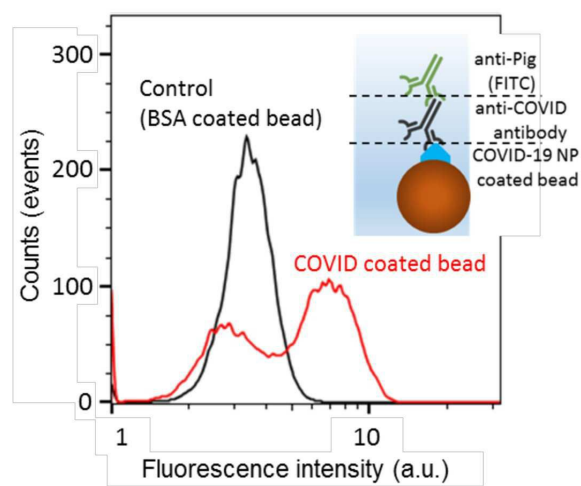
도면4



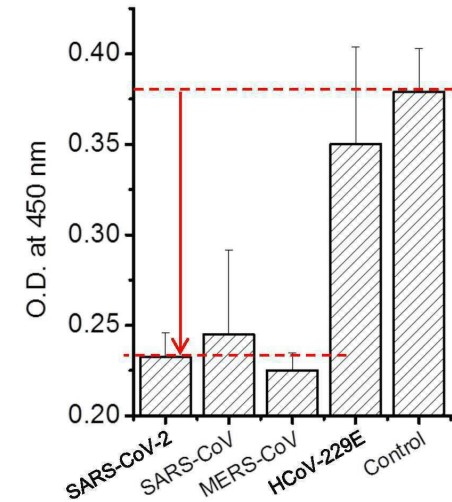
도면5



도면6



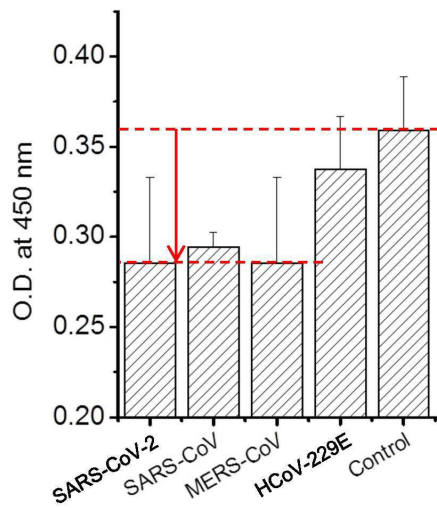
도면7a



\*Control: without culture fluid

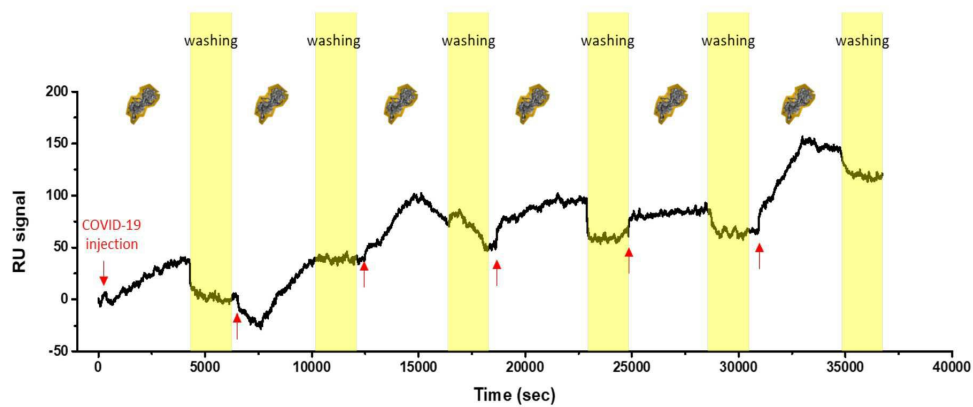


도면7b

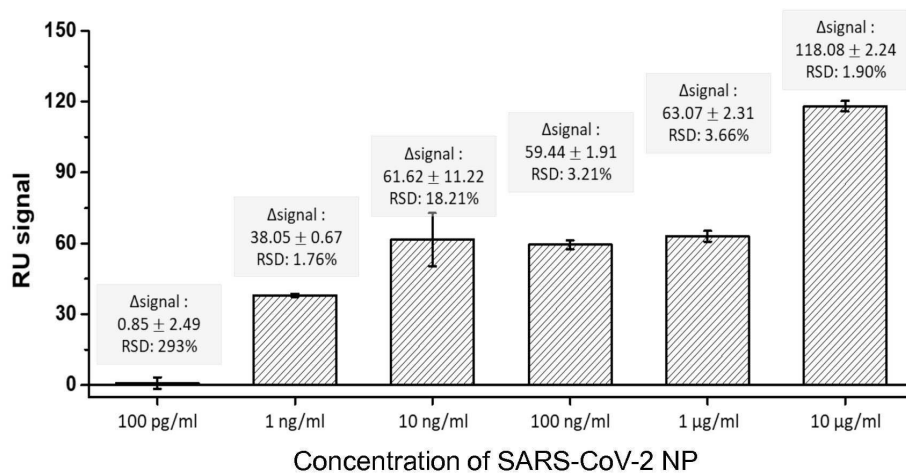


\*Control: without culture fluid

도면8a



도면8b



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 10

【변경전】

제 9 항에 있어서,

상기 제크로마토그래피 컬럼은 단백질 A(protein A), 단백질 G(protein G), 단백질 L(Protein L) 중 적어도 하나를 포함하는 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법.

【변경후】

제 9 항에 있어서,

상기 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A(protein A), 단백질 G(protein G), 단백질 L(Protein L) 중 적어도 하나를 포함하는 코비드-19 진단용 항체의 제조 방법.