



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0053906
(43) 공개일자 2020년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) GOIN 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/10 (2013.01)
C07K 16/1018 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0137394
(22) 출원일자 2018년11월09일
심사청구일자 2018년11월09일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
성백린
서울특별시 성북구 대사관로 46(성북동)
채원일
서울특별시 서대문구 연희로10길 83, 302호(연희동)
(74) 대리인
특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 10 항

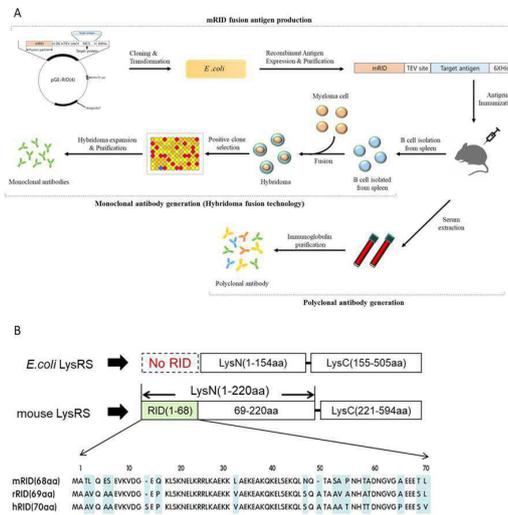
(54) 발명의 명칭 재조합 항원을 이용하여 목적 항원 특이적인 항체를 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 항체 생산 포유동물 유래 융합파트너; 및 목적 항원;으로 이루어진 재조합 항원을 이용하여 목적 항원 특이적인 항체를 제조하는 방법, 상기 방법으로 제조된 항체, 상기 항체를 포함하는 바이러스 감염 진단용 조성물 및 바이러스 검출방법에 관한 것이다.

본 발명에 의하면, 재조합 항원을 숙주세포에서 올바르게 접힌 형태로 수용성 발현시킬 수 있어 생산된 항체의 에피토프 인식 능력 및 항체의 결합력을 높일 수 있고, 융합파트너에 대한 교차면역을 최소화시킴으로써 목적 항원 특이적인 항체를 생산할 수 있으므로, 본 발명의 목적 항원 특이적인 항체는 진단 또는 치료 용도뿐 아니라 생명공학 연구를 비롯한 다양한 의학적 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

G01N 2333/11 (2013.01)

G01N 2333/165 (2013.01)

(72) 발명자

양승원

서울특별시 금천구 독산로84길 25, 301호(독산동)

김영석

서울특별시 마포구 독막로20나길 22, 102동 1102
호(상수동, 래미안 밤섬리베뉴 I)

명세서

청구범위

청구항 1

목적 항원의 발현 효율을 증진시키기 위한 융합파트너; 및 목적 항원으로 이루어지는 재조합 단백질을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 항체 제조방법에 있어서,

상기 융합파트너는 상기 포유동물로부터 유래된 아미노아실 tRNA 합성효소에서 분리한 RNA 결합 도메인 (Aminoacyl tRNA synthetase appended RNA interacting domain; RID)의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 RID는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 항체 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 목적 항원은 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 항체 제조방법.

청구항 4

서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 펩타이드를 특이적으로 인지하는 목적 항원 특이적 항체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 목적 항원 특이적 항체는 포유동물의 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 것인 항체.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 포유동물은 마우스, 토끼, 말, 개, 고양이, 닭, 오리로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 항체.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 항체는 다클론 항체 또는 단일클론 항체인 항체.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 대한 항체는 A/Brisbane/59/2007 (IVR-148)(H1N1), A/California/07/09 (NYMC-X181)(H1N1), A/Michigan/45/2015 (NYMC-X275)(H1N1), A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180)(H1N1), A/Singapore/01/57(H2N2), A/Anhui/01/05 (IBCDC-RG-6)(H5N1) 를 검출하는 것인 바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 10

샘플과 제4항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체를 접촉시키는 단계; 및

상기 항체와 샘플의 반응을 검출하는 단계를 포함하는, 대상체의 바이러스 감염 여부에 대한 정보제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항체 생산 숙주동물 유래 융합파트너; 및 목적 항원으로 이루어진 재조합 단백질을 이용하여 목적 항원 특이적인 항체를 제조하는 방법, 상기 방법으로 제조된 항체, 상기 항체를 포함하는 바이러스 감염 진단용 조성물 및 바이러스 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 항체는 현대 생명공학연구에 널리 사용되는 물질로 그 응용범위는 연구목적을 넘어 질병의 진단, 예방, 치료 등의 목적으로 광범위하게 사용되고 있다. 이러한 항체를 생산하는 가장 널리 알려진 방법은 항체 제작을 목적으로 하는 단백질 항원을 생산 숙주에 접종하여 숙주 내 면역시스템을 통해 항체를 생산하고 이 중 목적항원 특이적인 항체만을 스크리닝 하여 정제해 내는 방법이다. 따라서 집중하는 목적항원의 품질이 최종 생산품인 항체의 품질에도 커다란 영향을 주게 된다.

[0004] 단백질 항원의 품질을 결정하는 요소에는 크게 물속에서의 용해도(Solubility)와 올바른 구조의 형성여부(folding, 단백질 접힘)가 포함된다. 생명체 현상은 물속에서 진행되며 따라서 항원 단백질은 우선적으로 물에서 용해도가 높은 수용성 유지가 중요하다. 항원이 불수용성으로 발현된다는 것은 일반적으로 항원이 올바른 3차원 구조를 이루지 못하고 있음을 뜻하기 때문이다. 항원이 불용성일 경우 특히 항원의 3차원 구조에서 중요한 conformational epitope의 형성에 심각한 영향을 끼친다. 이를 해결하기 위해 일반적으로 불용성 침전을 리폴딩(refolding)이라는 단백질 수용화 추가 공정을 거치게 된다. 이에 막대한 생산 비용 증가와 더불어 목표항원의 최종 수율(yield) 감소 등 산업상 단점이 제기되고 있다(7). 이에 더하여 리폴딩 항원은 원래의 자연적 구조로의 전환 미비(8-10) 등 항원의 품질이 저하될 우려가 있으며 이를 사용하여 항체를 제작할 경우 항체의 결합력, conformational epitope 인식능력 저하 등 항체의 질에 문제를 야기할 수 있다.

[0005] 이러한 재조합 단백질항원의 불수용성 침전형성 문제와 구조 접힘 문제해결을 위한 일환으로 목표항원을 수용성이 높은 단백질(Soluble carrier)에 융합하여 발현시키는 방법이 개발되었다(12). 그러나 이러한 융합단백질을 항원으로 면역하여 항체 생산 시에 융합파트너 자체가 면역동물에 외래 단백질로 인식되어 융합파트너에 대한 항체가 크게 유도되는 문제가 생기게 된다. 경우에 따라서는 융합파트너에 대한 면역원성이 목표항원을 압도하게 되며 불필요한 융합파트너에 대한 항체가 더 많이 유도될 수 있다. 즉 목표항원 특이 (specific) 항체 외에

융합파트너에 교차반응(cross-reactive)이 높은 항원이 혼재하게 된다. 이러한 문제점을 피하기 위해 유전자재조합 방법으로 얻은 융합단백질을 프로테아제(protease) 등으로 처리하여 융합파트너를 제거할 수 있다(19, 20). 이 경우 고가의 단백질절단효소가 필요할 뿐 아니라 추가적인 정제공정이 요구되고, 융합파트너 제거 이후 목적항원의 수용성 및 구조가 유지되지 않아 재침전으로 형성되는 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 목적 항원의 올바른 발현을 유도하는 융합파트너를 포함하여 재조합 항원을 수용성으로 생성하고 이를 적절한 숙주 동물에 투여하여 목적 항원의 에피토프만 특이적으로 인식하는 항체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 목적 항원 특이적 항체, 이를 포함하는 바이러스 진단용 조성물 및 이를 이용하여 바이러스를 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 목적 항원의 발현 효율을 증진시키기 위한 융합파트너; 및 목적 항원으로 이루어지는 재조합 단백질을 항체 생산 숙주동물에 투여하는 단계를 포함하는 항체 제조방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 상기 제조방법에 의해 제조된, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 펩타이드를 특이적으로 인지하는 목적 항원 특이적 항체를 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 특이적으로 인지하는 목적 항원 특이적 항체를 포함하는 바이러스 감염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 샘플과 항체를 접촉시키는 단계; 및 상기 항체와 샘플의 반응을 검출하는 단계를 포함하는, 대상체의 바이러스 감염 여부에 대한 정보제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 항체 제조방법에 의하면, 융합파트너를 포함하여 재조합 항원을 숙주세포에서 올바르게 접힌 형태로 수용성 발현시킴으로써 항체의 에피토프 인식 능력 및 항체의 결합력을 높일 수 있다.
- [0016] 또한, 포유동물 유래 융합파트너를 사용하여 생성된 재조합 항원을 동일한 포유 동물에 투여하여 융합파트너에 대한 교차면역을 최소화함으로써 목적 항원 특이적인 항체를 생산할 수 있으며, 본 발명의 RID 융합파트너는 다양한 포유동물에 존재하는 단백질로 다양한 항체 생산 숙주동물에 알맞은 재조합 항원 생산에 사용될 수 있는 장점이 있다.
- [0017] 본 발명의 목적 항원 특이적인 항체는 진단 또는 치료 용도뿐 아니라 생명공학 연구를 비롯한 다양한 의학적 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 RID 융합을 통한 항원 및 항체 제작 방법에 대한 개략적 도면이다.
 도 1A는 쥐 유래 RID를 융합단백질로 이용하여 목적단백질에 대한 쥐 유래 단일클론항체 및 다클론항체 생산과정의 개략적 도식이다.
 도 1B는 Lysyl tRNA synthetase 중 RNA interaction domain(RID)의 위치에 대한 개략 도식과 더불어 쥐, 토끼, 인간 유래 RID의 아미노산 서열이다(24).

도 2는 본 발명을 통해 인플루엔자 재조합 헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA) 단백질의 stalk 도메인을 대장균 발현 시스템에서의 발현 결과에 대한 도면이다. 발현하고자 하는 목적 단백질은 인플루엔자 A 바이러스 그룹 1에 해당하는 여러 종의 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 서열 중 공통 아미노산 서열을 포함하도록 디자인한 유니버설 HA 단백질이다.

도 2A는 유니버설 HA 단백질 발현을 위한 mRID 융합 벡터, mRID 융합 유니버설 HA 단백질(mRID-uHAstalk), mRID를 융합하지 않은 유니버설 HA 단백질(uHA stalk)의 모식도이다.

도 2B는 mRID-uHAstalk 37° C 와 20° C 에서의 발현 양상을 보여주는 도면이다. M은 단백질 크기 마커, T는 전체 단백질 분획, S는 수용성 단백질 분획, P는 불수용성 단백질 분획을 나타낸다. IPTG(Isopropyl β-D -1-thiogalactopyranoside)를 첨가 여부는 (-) 와 (+) 로 표기하였다. 도 2C는 mRID를 융합하지 않은 유니버설 HA 단백질(uHA stalk)의 37° C 와 20° C 에서의 발현 양상을 보여주는 SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 결과이다.

도 3은 mRID-uHAstalk을 접종하여 쥐에서 생산된 하이브리도마 클론과 이중 정제된 단일클론항체 2종(1G5, 2C12)을 이용하여 융합단백질 mRID와 접종에 사용된 mRID-uHAstalk 대하여 ELISA를 진행한 결과이다.

도 3A는 항체가 포함된 하이브리도마 클론 15종을 이용한 ELSIA 결과이다.

도 3B는 1G5 항체를 이용한 ELISA 결과이며, 도 3C는 2C12 항체를 이용한 ELISA 결과이다.

도 4는 유니버설 HA 단백질에 대한 단일클론항체 1G5를 이용하여 실제 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질에 대해 ELISA를 진행한 결과이다. 위 ELISA에서 사용된 인플루엔자 바이러스 HA는 영국 NIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)에서 공급된 표준 HA 단백질 항원이다.

도 5는 유니버설 HA 단백질에 대한 단일클론항체 2C12를 이용하여 실제 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질에 대해 ELISA를 진행한 결과이다. 위 ELISA에서 사용된 인플루엔자 바이러스 HA는 영국 NIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)에서 공급된 표준 HA단백질 항원이다.

도 6은 인플루엔자 A/Puerto Rico/08/34(H1N1) 바이러스의 HA 단백질의 globular head domain(HAgd)을 대장균 발현 시스템에서의 발현 결과에 대한 도면이다.

도 6A는 HAgd 단백질의 발현을 위해 사용된 플라스미드 벡터와 RID 융합 HAgd 단백질(RID-HAgd)의 모식도이다.

도 6B는 RID-HAgd 과 RID를 융합하지 않은 HAgd의 20° C에서 발현 양상을 보여주는 SDS-PAGE 결과이다. M은 단백질 크기 마커, T는 전체 단백질 분획, S는 수용성 단백질 분획, P는 불수용성 단백질 분획을 나타낸다. IPTG(Isopropyl β-D -1-thiogalactopyranoside)를 첨가 여부는 (-) 와 (+) 로 표기하였다.

도 7은 mRID-HAgd 와 rRID-HAgd 단백질의 접힘 적합성, 위 단백질을 통해 생산된 항혈청 내 항체의 반응성을 보여주는 도면이다.

도 7A는 야생형 인플루엔자 A/Puerto Rico/08/34(H1N1) 바이러스를 쥐에 접종 후 얻은 항혈청을 이용해 mRID-HAgd, mRID, HAgd에 대하여 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다.

도 7B는 야생형 인플루엔자 A/Puerto Rico/08/34(H1N1) 바이러스를 쥐에 접종 후 얻은 항혈청을 이용해 rRID-HAgd, rRID, HAgd에 대하여 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다.

도 7C는 여러 종류의 인플루엔자 바이러스를 접종하여 얻은 쥐 항혈청을 이용해 mRID-HAgd에 대하여 ELISA를 수행한 결과이다. A/Puerto Rico/08/34 (H1N1), X-31 기반 저온적응 A/New Caledonia/20/99 (H1N1), X-31 기반 저온적응 A/Panama/07/99 (H3N2), X-31 기반 저온적응 A/Indonesia/5/2005 (H5N1), X-31 기반 저온적응 A/Korea/01/09 (pandemic H1N1) 를 쥐에 접종하여 얻은 항혈청(26, 27)이 사용되었다.

도 7D는 mRID-HAgd를 쥐에 접종한 후 얻은 항혈청을 이용해 mRID-HAgd, mRID, HAgd에 대하여 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다.

도 7E는 rRID-HAgd를 토끼에 접종한 후 얻은 항혈청을 이용해 rRID-HAgd, rRID, HAgd에 대하여 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다.

도 7F는 대장균 유래 Lysyl tRNA synthetase (LysRS) 를 융합한 HAgd(LysRS-HAgd)를 쥐에 접종한 후 얻은 항혈청을 이용해 LysRS-HAgd, LysRS에 대하여 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다.

도 8은 mRID 및 rRID 융합 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein)의 발현과 이에 대한 쥐 항혈청 내 항체의 반응성을 보여주는 도면이다.

도 8A는 RID융합 EGFP (RID-EGFP) 발현을 위해 사용된 플라스미드 벡터와 RID-EGFP의 모식도이다. 사용된 융합 단백질은 mRID와 rRID이다.

도 8B는 mRID 융합 EGFP(mRID-EGFP), rRID 융합 EGFP(rRID-EGFP), 융합하지 않은 EGFP 단백질의 25° C에서의 발현양상을 보여주는 SDS-PAGE 결과이다. M은 단백질 크기 마커, T는 전체 단백질 분획, S는 수용성 단백질 분획, P는 불수용성 단백질 분획을 나타낸다. IPTG(Isopropyl β-D -1-thiogalactopyranoside)를 첨가 여부는 (-) 와 (+) 로 표기하였다.

도 8C는 mRID-EGFP 단백질을 쥐에 접종하여 얻은 항혈청을 이용해 mRID-EGFP, mRID, EGFP에 대하여 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다.

도 8D는 rRID-EGFP 단백질을 토끼에 접종하여 얻은 항혈청을 이용해 rRID-EGFP, rRID, EGFP에 대하여 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다.

도 9는 mRID 융합 MERS(Middle East respiratory syndrome coronavirus)의 S1 항원의 RBD(Receptor Binding Domain) 발현과 이에 대한 단일클론항체의 반응성을 보여주는 도면이다.

도 9A는 mRID융합 MERS RBD(mRID-MERS RBD) 발현을 위해 사용된 플라스미드 벡터와 mRID-MERS RBD의 모식도이다.

도 9B는 mRID를 융합하지 않은 MERS-RBD의 16° C에서의 발현 양상을 보여주는 SDS-PAGE 결과이다. M은 단백질 크기 마커, T는 전체 단백질 분획, S는 수용성 단백질 분획, P는 불수용성 단백질 분획을 나타낸다. IPTG(Isopropyl - D -1-thiogalactopyranoside)를 첨가 여부는 (-) 와 (+) 로 표기하였다.

도 9C는 mRID-MERS RBD)의 37° C, 30° C, 20° C, 16° C 에서의 발현 양상을 보여주는 SDS-PAGE 결과이다. M은 단백질 크기 마커, T는 전체 단백질 분획, S는 수용성 단백질 분획, P는 불수용성 단백질 분획을 나타낸다. IPTG(Isopropyl β-D -1-thiogalactopyranoside)를 첨가 여부는 (-) 와 (+) 로 표기하였다.

도 9D는 293T 세포에서 생산된 RBD단백질, mRID-MERS RBD 단백질, mRID 단백질과 hDPP4(human dipeptidyl peptidase4) 단백질 사이의 결합 여부와 정도를 ELISA를 통해 분석한 결과이다.

도 9E는 mRID-MERS RBD단백질을 쥐에 접종하여 생산한 단일클론항체 2종(mAb29, mAb38)을 이용하여 Baculovirus-insect cell에서 생산된 RBD 단백질항원에 대한 ELISA를 진행한 결과이다.

도 9F는 mRID-MERS RBD 단백질에 대한 단일클론항체 mAb29를 이용하여 mRID-MERS RBD, mRID, 대장균 수용성 세포(competent cell) 내재 단백질에 대한 Western blot을 진행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명에서는 목적 항원의 발현 효율을 증진시키기 위한 융합파트너를 특정 길이 및 특정 서열로 포함하여 융합파트너-목적 항원의 재조합 단백질을 올바르게 접힌 형태로 수용성 발현시키고, 이를 포유동물에 투여하여 항체를 제조함에 있어서, 동일한 포유동물 유래의 융합파트너를 사용함으로써 생성된 항체가 목적 항원에만 특이적으로 결합하고, 융합파트너에는 결합하지 않는 것을 확인하였으며, 재조합 항원 단백질을 면역적으로 가치 있는 구조로 제시하여 진단용 또는 치료용 항체의 특이도를 높이는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0022] 이에, 본 발명은 목적 항원의 발현 효율을 증진시키기 위한 융합파트너; 및 목적 항원으로 이루어지는 재조합 단백질을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 항체 제조방법에 있어서, 상기 융합파트너는 포유동물로부터 유래된 아미노아실 tRNA 합성효소에서 분리한 RNA 결합 도메인(Aminoacyl tRNA synthetase appended RNA interacting domain; RID)의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 제조방법을 제공한다.
- [0023] 하기 [도 1]은 마우스를 생산 숙주로 하여 마우스에서 유래된 RID를 융합 단백질로 이용하여 재조합 항원을 생산하는 과정 및 재조합 항원에 대한 단일클론항체 및 다클론항체를 제작하는 방법을 개략적으로 보여주는 개념도이다.
- [0024] 본 발명의 “목적 항원(target antigen)”은 당업자가 항체를 통해 검출하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현백

터에 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 숙주세포에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다. 본 발명에서 “목적 항원”은 숙주세포에서 융합파트너와 융합된 형태로 발현된다. 본 발명의 실시예에서는 “목적 항원”으로 인플루엔자바이러스 유래 uHAstalk(서열번호 4의 아미노산 서열로 표시됨)와 HAgd(서열번호 5의 아미노산 서열로 표시됨) 및 메르스 코로나 바이러스 유래 S1 단백질의 RBD(서열번호 6의 아미노산 서열로 표시됨)를 사용하였다.

[0025] 본 발명의 "목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 융합파트너"는 목적 단백질을 수용성 형태로 발현시킬 수 있다고 보고된 펩타이드로서, 예를 들어, 잘 알려진 융합파트너로서 GST, 말토스 결합 단백질, 유비퀴틴 등이 있으나 이들은 일반적인 포유동물에 접종 시 외래항원으로 인식되어 이에 대한 항체 유도가 발생된다. 본 발명에서 사용하고자 하는 융합 파트너는 일반적인 융합파트너와는 다르게 생산숙주 유래 단백질을 Aminoacyl tRNA 합성요소의 RNA interaction domain, 특히 라이실 tRNA 합성요소의 RNA interaction domain (RBD) 를 사용함으로써 융합파트너에 대한 면역유도를 최소화하며 목적항원에 대한 항체 생산을 최대화 할 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 용어 “RID(RNA interacting domain)”은 RNA와 기타 단백질 간의 상호작용에 관여하는 고유한 N-말단 연장부위(70 아미노산)를 의미하며, 라이실 tRNA 합성 효소로부터 분리한 것이다. 본 발명의 바람직한 일 실시예에서는, RID에 태그 서열을 결합한 tag-RID를 박테리아에서 목적 단백질의 수용성 발현을 위한 결합 파트너로 사용하였다.

[0027] 본 발명의 바람직한 일 실시예에서, 상기 RID는 RID-목적 항원을 도입하여 항체를 생산하기 위한 포유동물로부터 유래된 아미노아실 tRNA 합성효소에서 분리된 RNA 결합 도메인일 수 있고, 예를 들어 서열번호 1로 표시되는 마우스 유래 RID, 서열번호 2로 표시되는 토끼 유래 RID, 서열번호 3으로 표시되는 인간 유래 RID일 수 있다.

[0028] 본 발명의 항체의 제조방법에 있어서, 상기 언급된 융합단백질에 대한 항체 유도 문제를 해결하기 위해 항체 생산 숙주 동물로부터 유래한 자가항원(self-antigen)을 융합파트너로 사용할 수 있다. 이 경우 융합파트너가 자가항원('self' antigen)으로 인식되어 이에 대한 면역반응이 일어나지 않게 되고, 면역동물에는 이종항원('foreign' antigen)인 목적 항원에 대해서만 면역이 유도되게 된다. 이에, 면역 숙주 동물 유래 단백질을 융합파트너로 이용해 항원 단백질의 수용성 향상과 올바른 구조로의 접힘을 도모함과 동시에 융합파트너에 대한 면역 유도를 방지하여 목적항원에 대한 특이적인 항체 생산이 가능하도록 할 수 있다.

[0030] 다른 측면에서, 본 발명은 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 펩타이드를 특이적으로 인지하는 목적 항원 특이적 항체를 제공한다.

[0031] 상기 항체는 단일클론 항체 또는 다클론 항체 일 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 인플루엔자바이러스 유래 uHAstalk(서열번호 4의 아미노산 서열로 표시됨)와 HAgd(서열번호 5의 아미노산 서열로 표시됨) 및 메르스 코로나 바이러스 유래 S1 항원의 RBD(서열번호 6의 아미노산 서열로 표시됨)를 코딩하는 핵산을 벡터에 삽입하고, 이 벡터를 특정 대장균 균주로 접종하여 형질전환시킴으로써, 상기 단백질이 과도하게 발현된 균주로부터 수득한 제조용 단백질을 사용하여 생산 숙주 동물을 면역화하고 이로부터 적출한 비장세포와 골수종 세포를 융합하여 얻어진 하이브리도마 중에서 다양한 바이러스로부터 발현되는 상기 단백질을 항원으로 인식하여 이에 대해서만 특이적으로 반응하는 하이브리도마 세포주를 선별하였다.

[0033] 본 발명은 대다수의 항체 생산에 일반적으로 사용하는 마우스 면역을 중심으로 기술되었다. 그러나 이는 용이하게 마우스 이외의 숙주 동물, 예를 들어 토끼, 말, 개, 고양이와 같은 포유류 동물, 닭, 오리 등과 같은 조류 등 다양한 숙주 동물로 확대 적용될 수 있다. 예를 들어 토끼를 생산 숙주로 하여 제조용 항원에 대한 토끼 유래 항체 제작 시 목적 항원에 토끼 유래 RID를 융합, 사용함으로써 목적항원 특이적 항체 생산의 효율성을 증가시킬 수 있다.

[0034] 본 발명의 단일클론항체는 본 기술분야에서 잘 알려져 있는 융합 방법에 의하여 제작될 수 있다. 주지한 것처럼 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마 세포는 항원을 주사하여 면역시킨 마우스의 면역 세포와 적절한 암 세포주를 융합하는 방법으로 제작할 수 있다. 마우스의 면역 세포와 암 세포주의 세포 융합은 폴리에틸렌글리콜(PEG)와 같이 잘 알려진 방법을 이용할 수 있으며, 항체 생산 세포 역시 일반적인 배양 방법으로 증식시킨다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 용어 '단일클론 항체'란 당해 분야에 공지된 용어로서 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도의 특이적인 항체를 의미한다. 단일클론 항체는 단세포군 항체라고 불리기도 한다. 통상적으로, 상이한

에피토프(항원결정기)들에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론 항체와는 다르게, 단일클론항체는 항원상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 단일클론 항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 또한 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 또 다른 장점을 갖는다.

- [0036] 상기 하이브리도마가 생산하는 단일클론 항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토 그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액으로부터 분리될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 단일클론 항체는 인플루엔자 바이러스의 mRID-uHAstalk 항원을 사용하여 면역된 마우스 비장세포로부터 세포융합기술에 의해 획득한 하이브리도마 세포들로부터 생산되는 항체를 제작하였으며, 이를 1G5 및 2C12로 명명하였다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, 본 발명의 단일클론 항체는 메르스 코로나 바이러스의 mRID-MERS RBD 항원을 사용하여 면역된 마우스 비장세포로부터 세포융합기술에 의해 획득한 하이브리도마 세포들로부터 생산되는 항체를 제작하였으며, 이를 각각 mAb29 및 mAb38로 명명하였다.
- [0039] 본 발명은 또한, 상기 단일클론 항체 및/또는 다클론 항체를 포함하는 바이러스 감염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0040] 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 uHAstalk에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 HA_gd에 특이적으로 결합하는 다클론 항체, 또는 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 MERS-RBD에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 포함하며, 상기 항체를 이용하여 인플루엔자 바이러스 항원 또는 메르스 코로나 바이러스 항원에 대해 형성된 항원-항체 복합체를 검출함으로써 인플루엔자 바이러스를 면역학적으로 검출할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 의하면, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 대한 항체는 A/Brisbane/59/2007 (IVR-148)(H1N1), A/California/07/09 (NYMC-X181)(H1N1), A/Michigan/45/2015 (NYMC-X275)(H1N1), A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180)(H1N1), A/Singapore/01/57(H2N2), A/Anhui/01/05 (IBCDC-RG-6)(H5N1)등 인플루엔자 A 바이러스 그룹1 내 다양한 바이러스를 검출할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 항체를 시료 샘플과 접촉시켜 형성된 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 바이러스 검출방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란, 시료 중의 바이러스 항원과 이를 인지하는 본 발명에 따른 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.
- [0044] 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.
- [0045] 본 발명의 바이러스 검출방법에 있어서, 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.
- [0046] 상기 단일클론항체 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 있

다.

[0048] 이하의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위해 제시한 것으로 하기 내용이 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

실시예 1

[0050] 생산 숙주 유래 RID 융합 항원에 대한 항체 생산

[0051] 본 발명에서 소개된 RID를 이용하여 항원을 생산하고 최종적인 항체를 생산하는 방법의 전체적 흐름은 도1A에 나타나 있다. 도 1은 마우스를 생산 숙주로 하여 마우스에서 유래된 RID를 융합 단백질로 이용한 재조합 항원의 생산과 이에 대한 단일클론항체 및 다클론항체를 제작하는 순서를 보여주고 있다. RID는 생산 숙주에 따라 적절한 종류로 선택하여 사용한다. RID는 다양한 생산 숙주에 널리 존재하고 있으며 그 중 도1B에서 쥐, 토끼, 인간의 RID 부분의 서열을 보여주고 있다. 항체의 생산은 기존에 알려진 hybridoma fusion 방법 이외 phage-display 등 다양한 방법이 적용될 수 있다.

[0052] 서열번호 4의 유니버설 HA stalk 항원은 기존에 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 Influenza virus resource 데이터 베이스 내 존재하는 수천 개의 헤마글루티닌(HA) 단백질 서열정보를 분석하여 각 아미노산 서열 위치에 가장 여러 바이러스 주에서 빈번히 관찰되는 아미노산을 특정하여 이들을 모아 디자인한 새로운 형태의 인플루엔자 유니버설 항원이다. 디자인된 아미노산 서열은 이에 맞는 DNA 서열로 변환한 후 *In vitro* 에서의 핵산 합성을 통해 DNA를 제작하였다.

[0053] 서열번호 5의 인플루엔자 HA_gd 항원은 인플루엔자 A/Puerto Rico/08/1934 바이러스의 헤마글루티닌 항원 중 구조상 globular domain으로 예측되는 부분만 선정하여 *In vitro* 에서의 핵산 합성을 통해 DNA를 제작하였다.

[0054] 서열번호 6의 MERS S1 항원 RBD는 MERS 바이러스의 S1 항원 중 구조상 Receptor binding domain 으로 예측되는 부분만 선정하여 *In vitro* 에서의 핵산 합성을 통해 DNA를 제작하였다.

실시예 2

[0056] 유전자 클로닝-재조합 벡터의 제작

[0057] 본 발명에 사용된 발현벡터는 pGE-RID(4) 벡터이다. RID 융합 벡터는 T7 프로모터의 조절을 받으며 N-말단에 RID가 위치하고 이어 아스파르트산(Asp, D) 6개가 반복된 연결부분, TEV 프로테아제 인식서열, 다중 클로닝 부위(MCS; KpnI, BamHI, EcoRI, SalI, HindIII), 마지막으로 C-말단에 정제를 위한 6X 히스티딘(Histidine, His) tag 를 가지고 있다. 클로닝하고자 하는 목적단백질의 유전자는 다중 클로닝 부위(MCS; KpnI, BamHI, EcoRI, SalI, HindIII) 내 적절한 제한효소 2종의 절단 자리 사이에 삽입한다. 도2A, 도6A, 도8A, 도9A에서 각 목적 단백질의 유전자들은 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통해 증폭된 이후 다중 클로닝 부위의 절단 자리에 삽입되었다.

실시예 3

[0059] 대장균 세포 내에서 RID융합 재조합 단백질의 수용성 발현 확인

[0060] 재조합 단백질의 발현 양상을 보기 위한 실험은 15ml LB(Lysogeny broth)배지 에서의 배양된 대장균 내 단백질을 분석함으로써 이루어진다. 재조합 단백질은 대장균 숙주 BL21*(DE3)pLysS (Thermo Fisher)에서 과발현한다. 최초 배양은 암피실린 50 µg/ml과 클로로암페니콜 30 µg/ml 이 포함된 3ml LB에서 37°C로 12시간 이상 배양 후 이중 500 µl를 새 15ml LB배지에 옮겨 적정하여 OD_{600nm} 가 0.5-0.7에 도달할 때까지 37°C에서 배양한다. 적정 OD_{600nm} 값에 도달하면 다양한 온도 (예를 들어, 20°C, 16°C) 에서 1mM IPTG 를 첨가 후 적정 시간 배양한다. 배양이 끝난 배지는 3000g에서 원심분리를 통해 대장균 세포를 채취하며 이를 초음파 분해를 통해 세포 용해물을 얻어낸다. 얻어진 최초 세포 용해물내 전체 단백질을 T(Total)로 분류하며 세포용해물을 12,000g에서 원심분리를 통해 상등액과 침전된 부분으로 분리한다. 상등액 내 수용성 단백질은 S(Soluble)로 분류하며 침전된 부분내

불수용성 단백질은 P(Pellet)으로 분류한다(도2B, 도6B, 도8B, 도9B, 도9C).

- [0061] 도 2B에서 발현된 목적단백질 mRID-uHAstalk은 37℃ 발현 시 20℃ 보다 발현량이 더 높았으나 전체 목적 단백질 중 수용성으로 발현된 정도는 20℃에서 더 높았다. 37℃에서는 전체 목적단백질 중 약 20%가 수용성이었으나 20℃에서는 전체 중 약 40%가 수용성이었다. 하지만 도 2C에서 RID를 융합하지 않은 uHAstalk 단백질의 발현 결과를 보았을 때 37℃와 20℃에서 모두 매우 미미한 발현량을 보였으며 대부분이 불수용성으로 발현되었다.
- [0062] 도 6B에서는 인플루엔자 A/Puerto Rico/08/34(H1N1) HA_gd에 대한 발현 양상을 보여주었다. 20℃ 발현 시 RID를 융합하지 않은 HA_gd는 대부분 불수용성으로 발현되었으나 세 종의 RID를 융합한 HA_gd는 모두 증가한 수용성 정도를 보였다. 전체 발현된 목적단백질 중 mRID-HA_gd의 경우 약 40%, rRID-HA_gd의 경우 약 45%, hRID-HA_gd의 경우 약 35%의 단백질이 수용성으로 발현되었다.
- [0063] 도 8B에서는 EGFP 단백질의 발현 양상을 보여주었다. RID를 융합하지 않은 EGFP는 전체 단백질 중 약 40%가 수용성으로 발현이 되었다. mRID-EGFP의 경우 전체 중 약 47%가 수용성으로 발현되어 그 수용성 정도는 RID융합에도 크게 변하지는 않았으나 mRID 융합 시 발현량이 증가하는 모습을 보였다.
- [0064] 도9B, C에서는 MERS 바이러스의 RBD 발현양상을 보여주었다. RID 융합하지 않은 RBD의 경우 대부분 불수용성으로 발현됨을 볼 수 있었으나 mRID-MERS RBD의 경우 다양한 온도에서 발현 결과 증가된 수용성을 보였다. 37℃ 발현 시 약 58%, 30℃ 발현 시 약 67%, 20℃ 발현 시 약 68%, 16℃ 발현 시 거의 100%가 수용성으로 발현되었다.

실시예 4

[0066] **RID융합 재조합단백질의 정제**

[0067] RID 융합 재조합단백질들은 니켈 친화성 크로마토그래피를 이용해 정제하였다. 각각의 이미다졸(Imidazole)의 농도 조절을 위해 A 버퍼 [50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 300 mM 염화 나트륨, 10% 글리세롤, 2mM 2-머캅토에탄올, Tween-20 0.05%, and 10mM 이미다졸] 과 B 버퍼 [50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 300 mM 염화 나트륨, 10% 글리세롤, 2mM 2-머캅토에탄올, Tween-20 0.05%, and 300mM 이미다졸]을 적절한 비율로 섞으며 직선형으로 이미다졸 농도를 점차적으로 증가시켜 Ni-NTA 컬럼 레진(GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)에 넣음으로써 RID융합 단백질을 정제한다.

실시예 5

[0069] **mRID 융합 유니버설 헤마글루티닌 stalk 도메인(mRID-uHAstalk)에 대한 단일클론항체 생산 및 평가**

[0070] 정제된 mRID-uHAstalk 단백질은 쥐에 접종된 후 기존에 알려진 하이브리도마 융합 방법(28, 29)을 통하여 접종된 단백질에 특이적인 클론을 선정하여 항체 정제를 진행하였다. 6주령 BALB/c 쥐에 mRID-uHAstalk 항원을 2주간격으로 2회 접종하며 면역보강제(Adjuvant)로 프로이드 어주번트(Freund's adjuvant)를 사용한다. 2차 접종 3일 후 비장 세포를 채취하며 널리 하이브리도마 융합 방법(28, 29)을 이용하여 하이브리도마 세포를 제작한다. 면역된 항원에 대한 포지티브 클론(positive clone)은 해당 항원에 대한 ELISA를 통해 스크리닝 한다.

[0071] 도 3A는 쥐에 면역 후 제작한 포지티브 클론 15종에 대하여 접종 항원인 mRID-uHA stalk과 융합단백질인 mRID에 대한 ELISA 결과 놀랍게도 15개의 모든 클론에서 접종항원에 대해서만 반응성을 보이며 반대로 융합파트너인 mRID에 대해서는 반응을 보이지 않았다. 이는 mRID가 쥐에는 자가항원으로서 항원성을 보이지 않음을 보여준다. 따라서 RID를 이용한 융합항원 생산방법은 융합파트너를 제거하지 않고 융합단백질의 형태로 접종하여도 높은 효율로 목적단백질 특이적 클론 생산이 가능함을 보여준다.

[0072] 최종 선정된 클론은 Protein G resin (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)을 통해 정제한다. 상기 실시예에서는 mRID-uHAstalk에 대한 단일클론항체 1G5와 2C12를 최종 생산하였다. 위 항체 생산은 에이티젠(경기도 성남, 대한민국)에서 이루어졌다. 1G5와 2C12는 접종된 단백질(mRID-uHAstalk)과 융합단백질(mRID)에 대한 ELISA를 통해 유니버설 HA stalk domain 특이적 항체인지 검증하였다. 도 3B는 1G5를 이용한 ELISA 결과이며 도 3C는 2C12를 이용한 ELISA 결과이다. 위 결과 두 단일클론항체는 융합파트너인 mRID에는 결합하지 않았으나 mRID-uHAstalk에는 결합하였다. 따라서 두 단일클론항체는 uHAstalk 항원에 특이적인 항체임을 알 수 있었으며

mRID는 쥐에 접종되어 항체를 유도하지 않음을 다시 한번 보여주었다.

[0073] 생산된 단일클론항체는 여러 종류의 인플루엔자 바이러스 HA 단백질에 대한 ELISA를 수행함으로써 항체가 실제 타겟과 잘 결합하는지를 평가하였다. 본 ELISA에 사용된 HA 단백질은 영국 NIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)에서 공급된 인플루엔자 표준 HA 항원이며 사용된 바이러스 종은 A/Brisbane/59/2007 (IVR-148)(H1N1), A/California/07/09 (NYMC-X181)(H1N1), A/Michigan/45/2015 (NYMC-X275)(H1N1), A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180)(H1N1), A/Singapore/01/57(H2N2), A/Anhui/01/05 (IBCDC-RG-6)(H5N1) 이다. ELISA 과정 중 HA stalk domain에 결합하는 항체인 1G5, 2C12의 항원 접근성 향상을 위하여 DTT(Dithiothreitol)처리를 통하여 HA의 head domain 과 stalk domain 사이의 disulfide bond를 제거하여 head domain을 제거하며 low pH 버퍼를 통해 단백질 구조를 약간 loose하게 해주는 항원 전처리를 진행하였다. 도 4A-G, 도 5A-G의 결과에 따르면 두 단일클론항체 1G5 및 2C12는 실제 야생형 인플루엔자 바이러스의 HA에 잘 결합하는 것으로 보인다. 따라서 두 단일클론항체는 실제 HA 단백질 항원에 결합할 수 있음을 확인하였다. 또한 위 결과를 통해 단일클론항체 생산에 사용된 mRID-uHastalk 단백질이 올바른 구조를 이루었다고 생각 할 수 있다.

실시예 6

[0075] mRID 융합 HA globular domain (mRID-HAgd)의 단백질 접힘 적합성 확인

[0076] 본 실시예는 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34 바이러스의 HA 단백질이 mRID 융합을 통해 적절한 구조를 잘 이루어 생산되었는지 검증하기 위한 실험에 대한 내용이다. 실제 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34 바이러스를 쥐에 접종하여 항혈청을 얻었다. 얻어진 항혈청에는 해당 바이러스의 HA단백질 항원에 대한 항체들이 포함되어 있다. 이러한 쥐의 항혈청을 1차 항체로 사용하여 mRID-HAgd, rRID-HAgd 단백질에 대한 ELISA와 Western blot을 수행하였다. 이러한 결과는 도 7A 및 도 7B에 나타나 있다. 도 7A 에서의 ELISA 결과는 바이러스를 접종한 항혈청 내 항체가 mRID-HAgd에는 잘 결합하나 mRID, mRID가 융합되지 않은 HAgd에 대해서는 잘 결합하지 않는 모습을 보인다. 또한 HAgd는 RID 융합 없이는 대장균 내에서 올바른 구조로 생산되지 않음을 보여주었다. 이에 더해 Western blot 결과에서는 상기 ELISA 결과와 일맥상통하는 결과를 보이며 이에 더해 TEV 프로테아제를 통해 mRID-HAgd에서 mRID를 잘라낸 HAgd에도 항체에 잘 결합하는 것으로 보인다. 이를 통해 mRID 융합을 통해 일단 HAgd가 생산되면 이후에 mRID를 잘라내도 HAgd의 올바른 구조가 유지되는 것을 확인할 수 있다. 도 7B 에서는 쥐의 항혈청 내 항체가 rRID-HAgd에는 잘 결합하나 rRID, rRID가 융합되지 않은 HAgd에 대해서는 잘 결합하지 않는 것으로 보였다. 이를 통해 rRID의 융합으로 HAgd가 올바른 구조를 이루어 생산되었음을 알 수 있다. 또한 Western blot 결과에서도 위 ELISA와 유사한 결과를 보임과 더하여 TEV 프로테아제를 통해 rRID-HAgd에서 rRID를 잘라낸 HAgd에도 항체 잘 결합하는 것으로 보인다. 따라서 RID-HAgd의 구조가 실제 바이러스의 HAgd의 구조와 유사함을 확인할 수 있었다. 또한 도 7C 에서는 다양한 바이러스를 쥐에 접종하여 얻은 혈청을 이용하여 mRID-HAgd에 대한 ELISA를 진행한 결과 A/Puerto Rico/8/34 접종 한 쥐의 항혈청에서만 특이적 반응이 있는 것으로 보인다. 이를 통해 mRID-HAgd의 구조가 종(strain) 특이적 항원을 구분 가능할 수 있게 그 본래의 구조를 완벽히 이루고 있음을 보여준다.

실시예 7

[0078] mRID 및 rRID 융합 HA globular domain (mRID-HAgd)에 대한 다클론항체를 포함한 항혈청의 생산 및 평가

[0079] mRID-HAgd에 대한 쥐 항혈청은 상기 항원을 6주령 BALB/c 쥐에 접종하였다. 20 µg의 mRID-HAgd 단백질은 50 µg의 백반 보충제(Thermo Fisher)을 섞어 접종하며 2주 간격으로 총 3회 복강내로 접종된다. 실험에 사용된 항혈청은 3차 접종 후 2주 뒤에 안와채혈을 통해 얻어졌다.

[0080] rRID-HAgd에 대한 토끼 항혈청은 상기 항원 1mg을 프로이드 어주번트(Freund's adjuvant)와 함께 섞어 피내 주사로 접종하였다. 최초 접종 4주 후 2주 간격으로 2번 추가 접종하였으며 최종 접종 일주일 후 혈청을 채취하였다. 본 실험은 영인프론티어(서울시 가산동, 대한민국)에서 수행되었다.

[0081] 도 7D는 mRID-HAgd에 대한 쥐 항혈청을 이용하여 융합파트너 mRID, mRID-HAgd에 대한 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다. ELISA 결과는 항혈청 내 항체가 mRID-HAgd에는 잘 결합하나 mRID에는 상대적으로 잘 결합하지

않는 모습을 보인다. 이에 더해 Western blot 결과에서는 mRID-HAgd와 TEV 프로테아제를 통해 mRID-HAgd에서 mRID를 잘라낸 HAgd에는 항체가 잘 결합하는 것으로 보였다. 하지만 mRID에는 결합하지 않았다. 이를 통해 혈청 내 mRID-HAgd 항체들은 HAgd에만 특이적이며 융합파트너 mRID에는 잘 결합하지 않는 것으로 보인다.

[0082] 도 7E는 rRID-HAgd에 대한 토끼 혈청을 이용하여 융합파트너 rRID, rRID-HAgd에 대한 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다. ELISA 결과는 항혈청 내 항체가 rRID-HAgd에는 잘 결합하나 rRID에는 상대적으로 잘 결합하지 않는 모습을 보인다. 이에 더해 Western blot 결과에서는 rRID-HAgd와 TEV 프로테아제를 통해 rRID-HAgd에서 rRID를 잘라낸 HAgd에는 항체가 잘 결합하는 것으로 보였다. 하지만 rRID에는 결합하지 않았다. 이를 통해 항혈청 내 rRID-HAgd 항체들은 HAgd에만 특이적이며 융합파트너 rRID에는 잘 결합하지 않는 것으로 보인다.

[0083] 도 7F는 *E. coli*의 LysRS-HAgd에 대한 쥐 항혈청을 이용하여 융합단백질 LysRS, LysRS-HAgd에 대한 ELISA를 수행한 결과이다. 그 결과 해당 항혈청은 LysRS와 LysRS-HAgd에 모두 반응하는 것으로 보였다. 이는 융합 단백질인 LysRS에 대한 면역반응이 목적단백질에 대한 면역반응을 압도하여 융합단백질에 대한 항체만 생산되었음을 보여준다. 따라서 LysRS가 융합파트너로서 목적항원의 수용성 생산에는 좋은 기능을 할 수는 있으나 이에 대한 항체 생산의 경우에는 적합하지 않음을 보여주고 있다.

실시예 8

[0085] **mRID 및 rRID 융합 EGFP (mRID-EGFP)에 대한 다클론항체를 포함한 항혈청의 생산과 평가**

[0086] mRID-EGFP에 대한 쥐 항혈청은 상기 항원을 6주령 BALB/c 쥐에 접종하였다. mRID-EGFP 단백질은 백반 보충제 (Thermo Fisher)을 섞어 접종하며 2주 간격으로 총 3회 복강 내로 접종된다. 실험에 사용된 항혈청은 3차 접종 후 2주 뒤에 안와채혈을 통해 얻어졌다.

[0087] rRID-EGFP에 대한 토끼 항혈청은 상기 항원 1mg을 프로이드 어주번트(Freund's adjuvant)와 함께 섞어 피내 주사로 접종하였다. 최초 접종 4주 후 2주 간격으로 2번 추가 접종하였으며 최종 접종 일주일 후 혈청을 채취하였다. 본 실험은 영인프론티어(서울시 가산동, 대한민국)에서 수행되었다.

[0088] 도 8C는 mRID-EGFP에 대한 쥐 항혈청을 이용하여 융합파트너 mRID, mRID-EGFP에 대한 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다. ELISA 결과는 항혈청 내 항체가 mRID-EGFP에는 잘 결합하나 mRID에는 상대적으로 잘 결합하지 않는 모습을 보인다. 이에 더해 Western blot 결과에서는 mRID-EGFP와 TEV 프로테아제를 통해 mRID-EGFP에서 mRID를 잘라낸 EGFP에는 항체가 잘 결합하는 것으로 보였다. 하지만 mRID에는 결합하지 않았다. 이를 통해 항혈청 내 mRID-EGFP 항체들은 EGFP에만 특이적이며 융합파트너 mRID에는 잘 결합하지 않는 것으로 보인다.

[0089] 도 8D는 rRID-EGFP에 대한 토끼 혈청을 이용하여 융합파트너 rRID, rRID-EGFP에 대한 ELISA와 Western blot을 수행한 결과이다. ELISA 결과는 항혈청내 항체가 rRID-EGFP에는 잘 결합하나 rRID에는 상대적으로 잘 결합하지 않는 모습을 보인다. 이에 더해 Western blot 결과에서는 rRID-EGFP와 TEV 프로테아제를 통해 rRID-EGFP에서 rRID를 잘라낸 EGFP에는 항체가 잘 결합하는 것으로 보였다. 하지만 rRID에는 결합하지 않았다. 이를 통해 혈청 내 rRID-EGFP 항체들은 EGFP에만 특이적이며 융합파트너 rRID에는 잘 결합하지 않는 것으로 보인다.

실시예 9

[0091] **mRID 융합 MERS S1 항원 RBD 접힘 적합성 확인**

[0092] 본 실시예는 MERS S1 RBD단백질은 mRID 융합을 통해 생산하고 상기 단백질이 올바른 구조를 이루고 있는지 검증하기 위한 실험이다. 실제 MERS 바이러스의 RBD 단백질은 hDPP4(Human dipeptidyl peptidase4) 단백질과 결합한다고 알려져 있다(30, 31). 따라서 mRID-MERS RBD 단백질이 올바른 구조를 이루었는지 확인하기 위해 hDPP4와의 결합 여부를 확인해 보았다. 이를 위해 mRID-MERS RBD에 결합할 수 있는 Anti-6xHis tag antibody(Thermo Fisher)를 이용하여 Western blot과 ELISA를 통한 상호 면역 침전 법 분석(Co-immunoprecipitation analysis)을 진행하였다. 도 9D는 ELISA 결과로 mRID-MERS RBD는 293T 세포에서 생산된 RBD단백질과 유사한 정도로 hDPP4와 잘 결합하는 것으로 확인되었다. 따라서 위 결과에서도 mRID-MERS RBD가 올바른 구조를 이루고 있음을 보여주었다.

실시예 10

[0094] mRID 융합 MERS RBD (mRID-MERS RBD)에 대한 단일클론항체 생산 및 평가

[0095] 정제된 mRID-MERS RBD 단백질은 쥐에 접종된 후 기존에 알려진 하이브리도마 융합 방법(28, 29)을 통하여 접종된 단백질에 특이적인 클론을 선정하여 항체 정제를 진행하였다. 6주령 BALB/c 쥐에 mRID-MERS RBD 항원을 2주간격으로 2회 접종하며 면역보강제(Adjuvant)로 프로이드 어주번트(Freund's adjuvant)를 사용한다. 2차 접종 3일 후 비장 세포를 채취하며 널리 알려진 하이브리도마 융합 방법(28, 29)을 이용하여 하이브리도마 세포를 제작한다. 면역된 항원에 대한 포지티브 클론(positive clone)은 해당 항원에 대한 ELISA를 통해 스크리닝 한다. 최종 선정된 클론은 Protein G resin (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)을 통해 정제한다. 상기 실시예에서는 mRID-MERS RBD에 대한 단일클론항체 mAb29와 mAb38을 생산하였다. 위 항원 생산은 에이티젠(경기도 성남, 대한민국)에서 이루어졌다.

[0096] 도 9E에서는 mRID-MERS RBD에 대한 두 단일클론항체를 이용해 Sino Biological (베이징, 중국)에서 공급된 Baculo-insect expression에서 생산된 RBD 단백질에 대하여 ELISA를 수행한 결과이다. 상기 단백질에는 어떠한 융합단백질도 포함 되어있지 않다. ELISA 결과 두 단일클론항체는 RBD단백질과 결합할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 두 단일클론항체는 RBD 특이적 항체라고 할 수 있다.

[0097] 도 9F는 mRID-MERS RBD, mRID, 대장균 BL21*(DE3)pLysS (Thermo Fisher)competent cell 내재 단백질에 대하여 mAb29를 이용해 Western blot을 수행한 결과이다. 위 결과 mRID-MERS RBD에만 단일클론항체가 결합하였으며 mRID와 대장균 내재 단백질에 대해서는 결합하지 않는 것으로 보인다. 따라서 mRID는 쥐 내에서 면역을 유도하지 않는 융합파트너로 사용될 수 있음을 보였다.

[0099] <참고문헌>

[0100] 1. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.

[0101] 2. Singh S, Kumar N, Dwiwedi P, Charan J, Kaur R, Sidhu P, et al. Monoclonal Antibodies: A Review. *Current clinical pharmacology*. 2017.

[0102] 3. Nahta R, Esteva FJ. Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene*. 2007;26(25):3637-43.

[0103] 4. Luger A, Schmidt M, Luger N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology*. 2001;121(5):1145-57.

[0104] 5. Gurcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *International immunopharmacology*. 2009;9(1):10-25.

[0105] 6. Keating GM. Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer. *Drugs*. 2014;74(16):1891-925.

[0106] 7. Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*. 2014;4(1):235-51.

[0107] 8. Yang Z, Zhang L, Zhang Y, Zhang T, Feng Y, Lu X, et al. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PloS one*. 2011;6(7):e22981.

[0108] 9. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005;99(4):303-10.

[0109] 10. Basu A, Li X, Leong SS. Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;92(2):241-51.

[0110] 11. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*. 1999;10(5):411-21.

[0111] 12. Esposito D, Chatterjee DK. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion

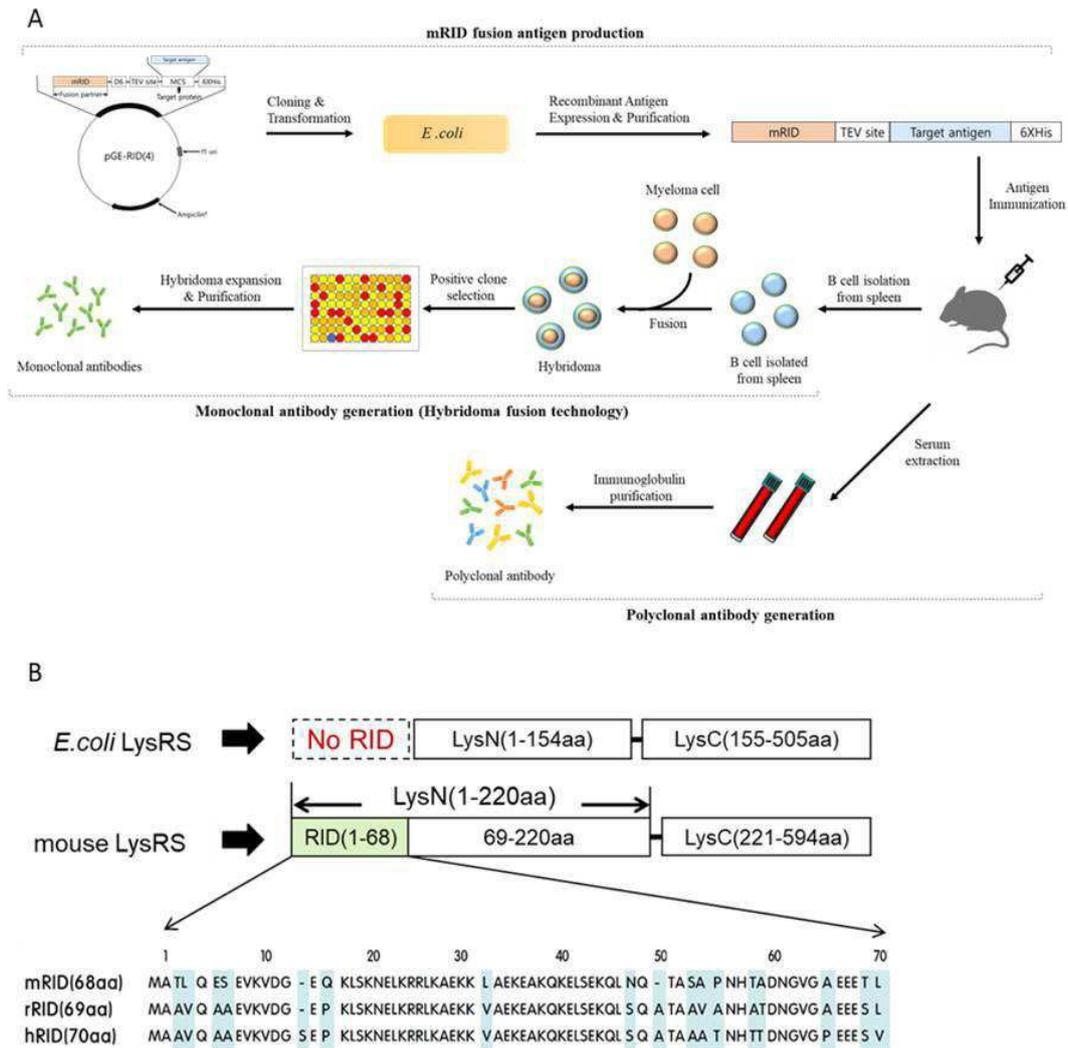
tags. *Current opinion in biotechnology*. 2006;17(4):353-8.

- [0112] 13. Pryor KD, Leiting B. High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. *Protein expression and purification*. 1997;10(3):309-19.
- [0113] 14. Fox JD, Routzahn KM, Bucher MH, Waugh DS. Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. *FEBS letters*. 2003;537(1-3):53-7.
- [0114] 15. De Marco V, Stier G, Blandin S, de Marco A. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;322(3):766-71.
- [0115] 16. Kuo D, Nie M, Courey AJ. SUMO as a solubility tag and in vivo cleavage of SUMO fusion proteins with Ulp1. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2014;1177:71-80.
- [0116] 17. Peroutka Iii RJ, Orcutt SJ, Strickler JE, Butt TR. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2011;705:15-30.
- [0117] 18. Schafer F, Seip N, Maertens B, Block H, Kubicek J. Purification of GST-Tagged Proteins. *Methods in enzymology*. 2015;559:127-39.
- [0118] 19. Kuhnel B, Alcantara J, Boothe J, van Rooijen G, Moloney M. Precise and efficient cleavage of recombinant fusion proteins using mammalian aspartic proteases. *Protein engineering*. 2003;16(10):777-83.
- [0119] 20. Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of structural and functional genomics*. 2004;5(1-2):75-86.
- [0120] 21. Choi SI, Han KS, Kim CW, Ryu KS, Kim BH, Kim KH, et al. Protein solubility and folding enhancement by interaction with RNA. *PLoS one*. 2008;3(7):e2677.
- [0121] 22. Choi SI, Ryu K, Seong BL. RNA-mediated chaperone type for de novo protein folding. *RNA biology*. 2009;6(1):21-4.
- [0122] 23. Son A, Choi SI, Han G, Seong BL. M1 RNA is important for the in-cell solubility of its cognate C5 protein: Implications for RNA-mediated protein folding. *RNA biology*. 2015;12(11):1198-208.
- [0123] 24. Yang SW, Jang YH, Kwon SB, Lee YJ, Chae W, Byun YH, et al. Harnessing an RNA-mediated chaperone for the assembly of influenza hemagglutinin in an immunologically relevant conformation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2018;32(5):2658-75.
- [0124] 25. Kim YS, Son A, Kim J, Kwon SB, Kim MH, Kim P, et al. Chaperone-Mediated Assembly of Ferritin-Based Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus Nanoparticles. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1093.
- [0125] 26. Lee KH, Seo SU, Song JM, Lee CM, Kim HA, Seong BL. Characterization of live influenza vaccine donor strain derived from cold-adaptation of X-31 virus. *Vaccine*. 2006;24(11):1966-74.
- [0126] 27. Jang YH, Jung EJ, Lee KH, Byun YH, Yang SW, Seong BL. Genetic analysis of attenuation markers of cold-adapted X-31 influenza live vaccine donor strain. *Vaccine*. 2016;34(11):1343-9.
- [0127] 28. National Research Council Committee on Methods of Producing Monoclonal A. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. *Monoclonal Antibody Production*. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences.; 1999.
- [0128] 29. Holzlohner P, Hanack K. Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2017(119).

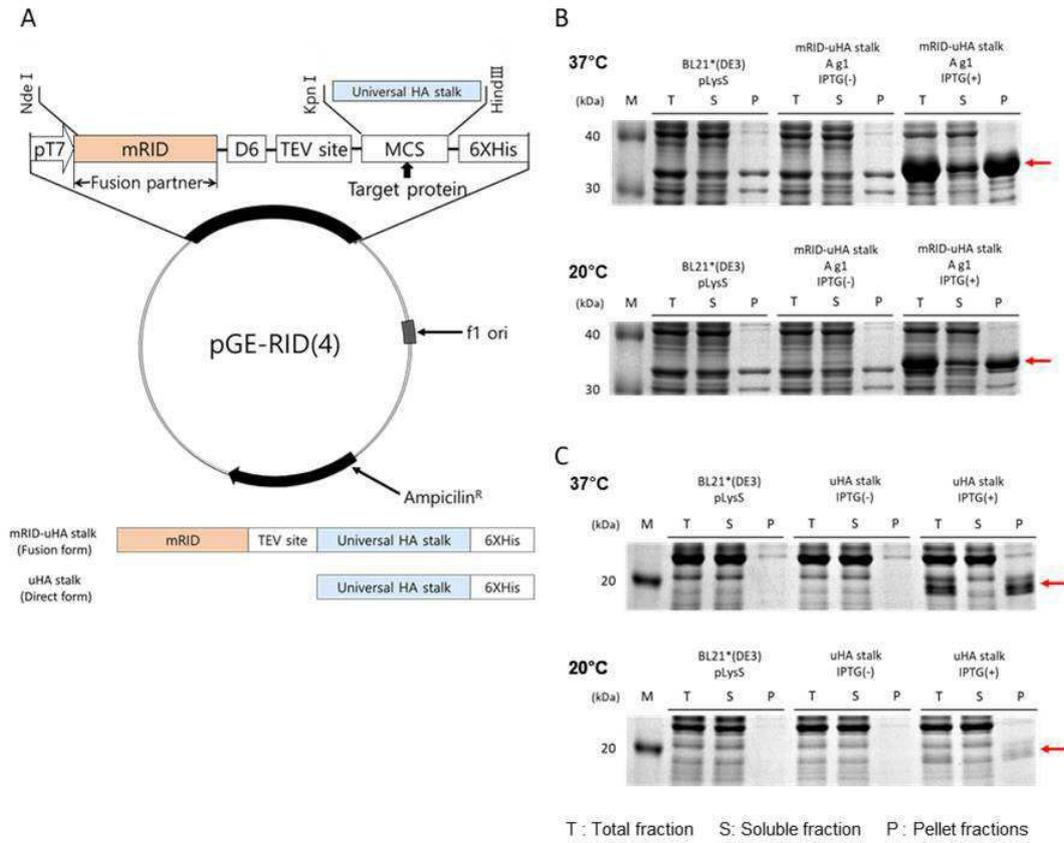
- [0129] 30. Du L, Kou Z, Ma C, Tao X, Wang L, Zhao G, et al. A truncated receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein potently inhibits MERS-CoV infection and induces strong neutralizing antibody responses: implication for developing therapeutics and vaccines. PloS one. 2013;8(12):e81587.
- [0130] 31. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Muller MA, Dijkman R, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. Nature. 2013;495(7440):251-4.

도면

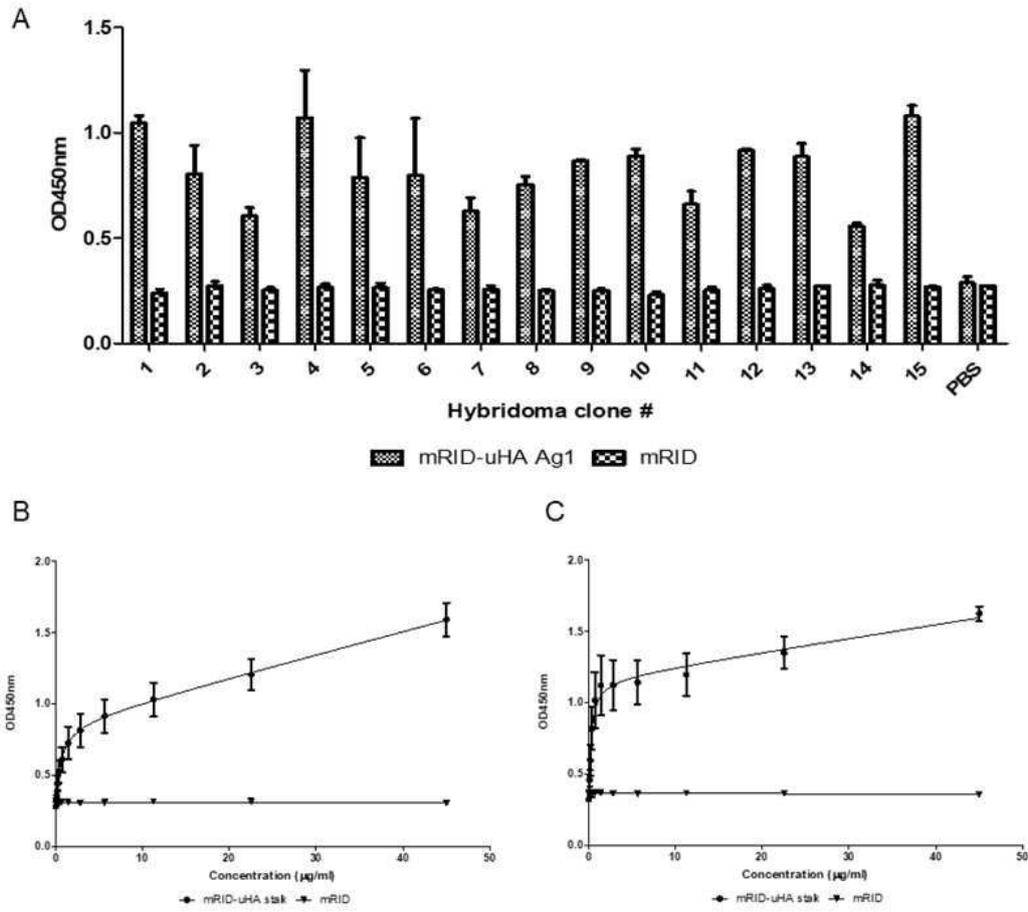
도면1



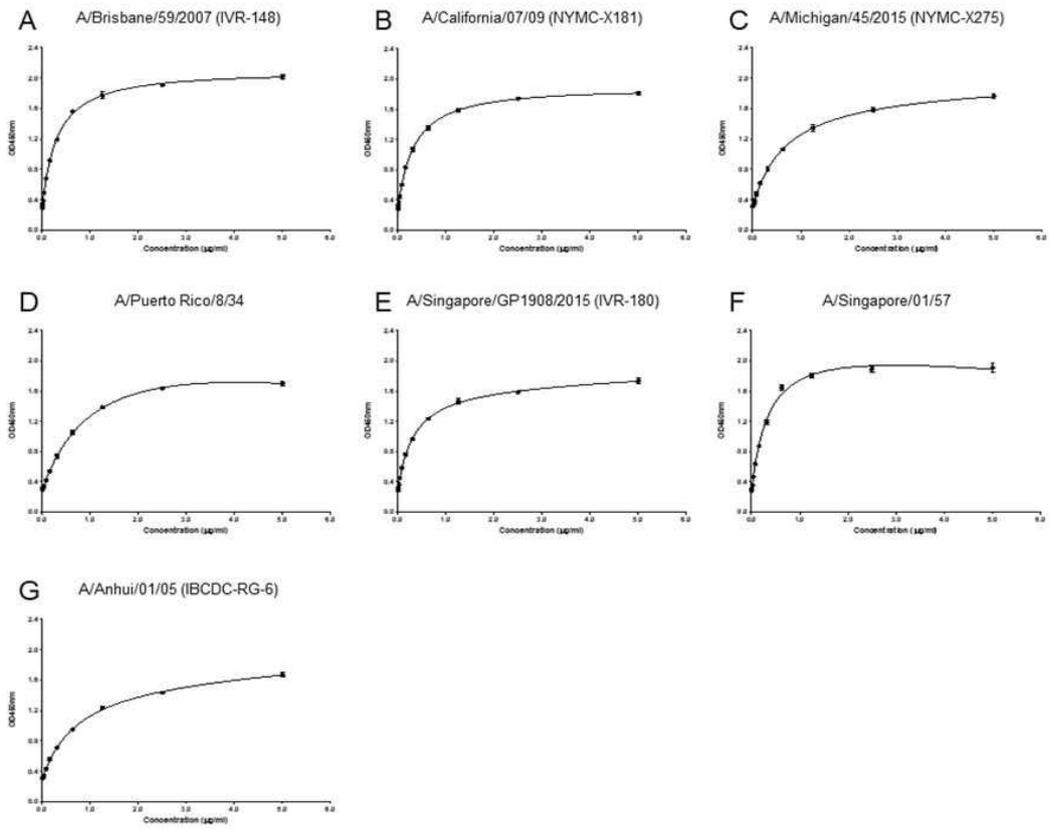
도면2



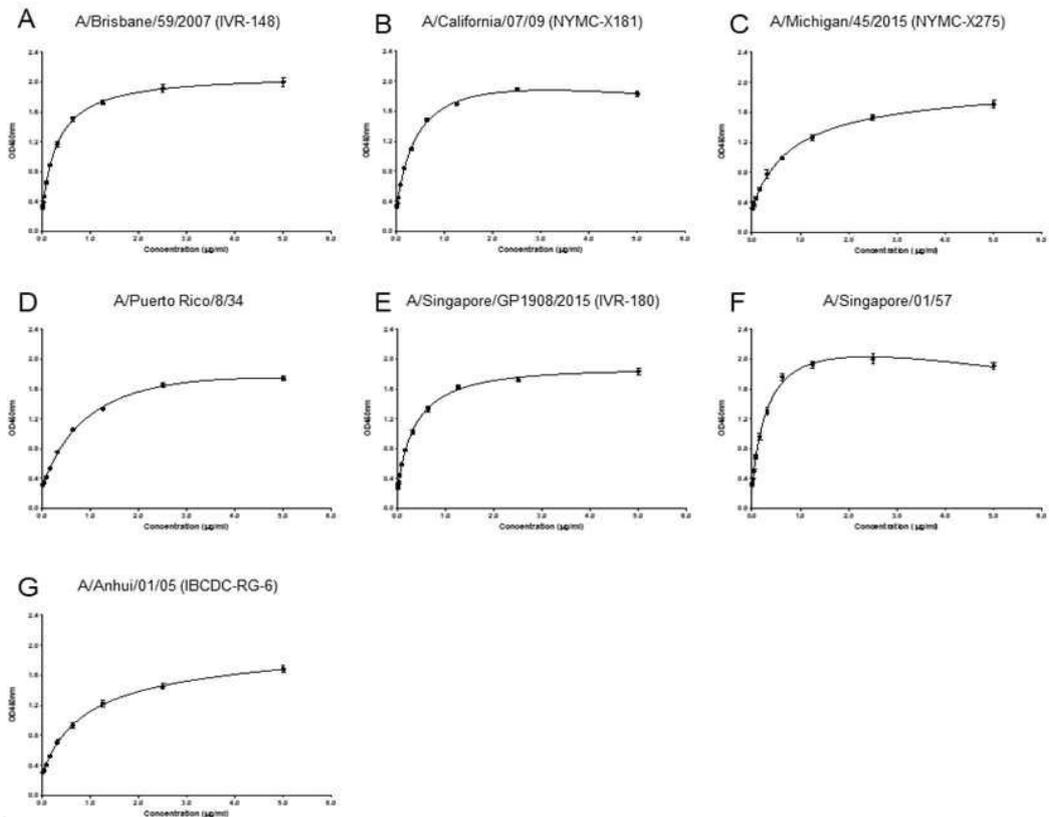
도면3



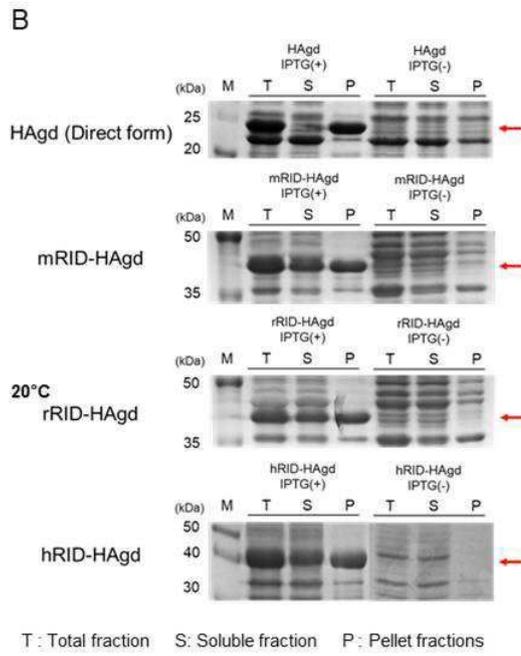
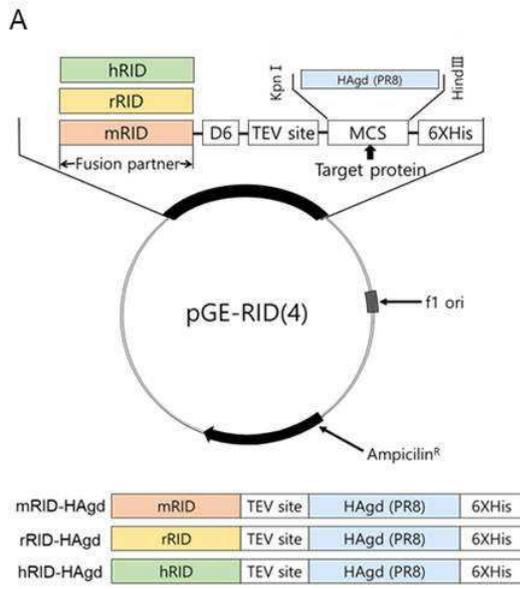
도면4



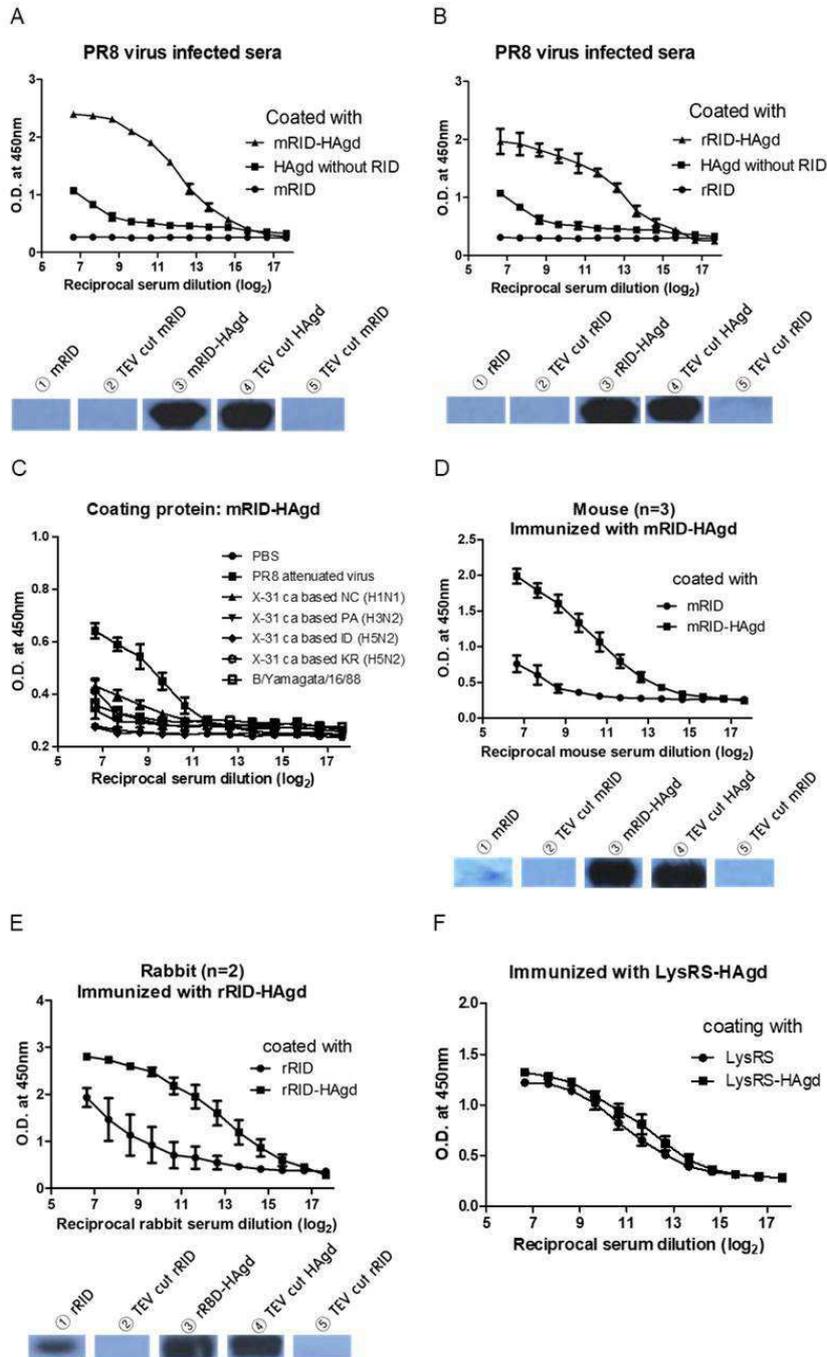
도면5



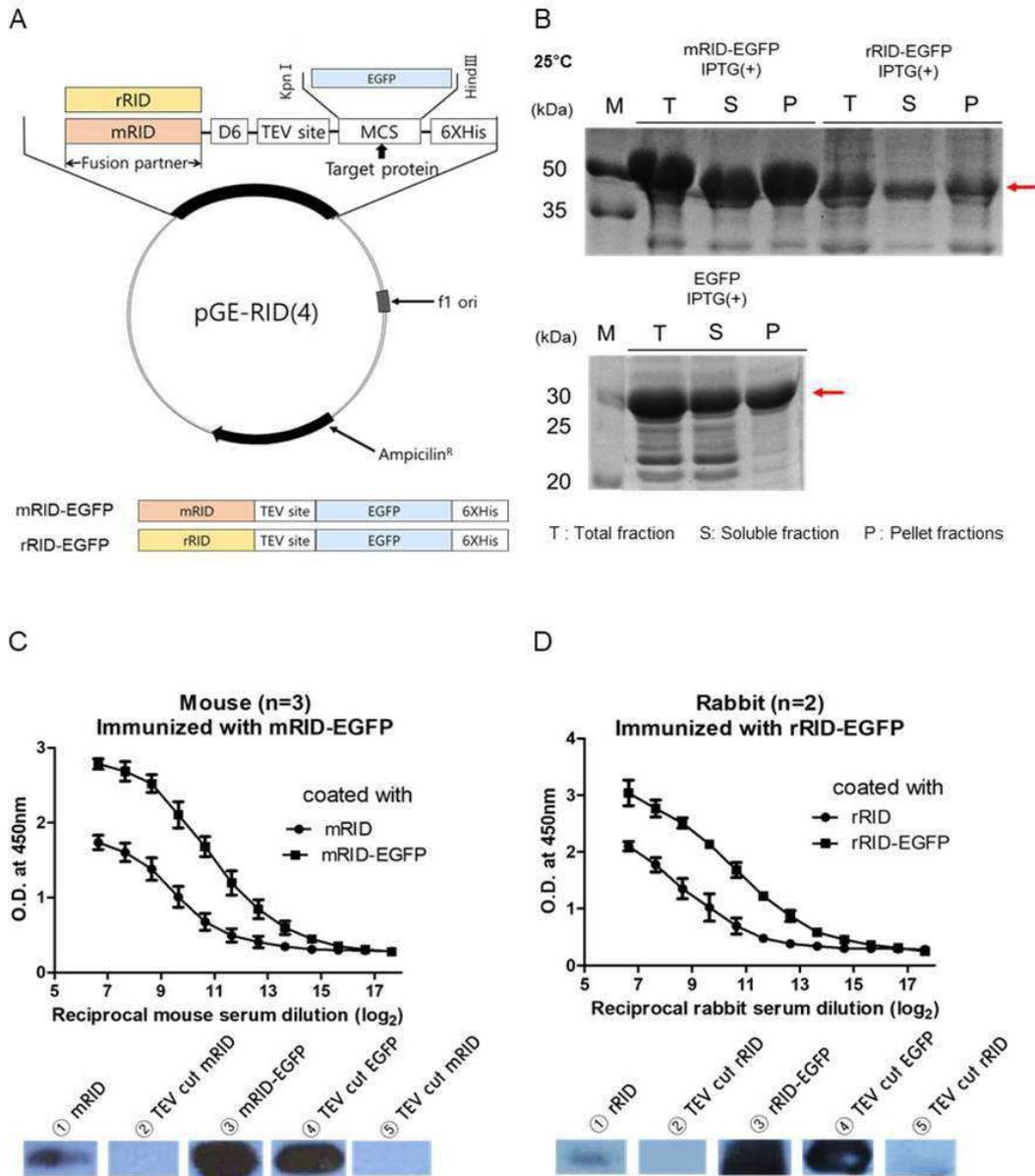
도면6



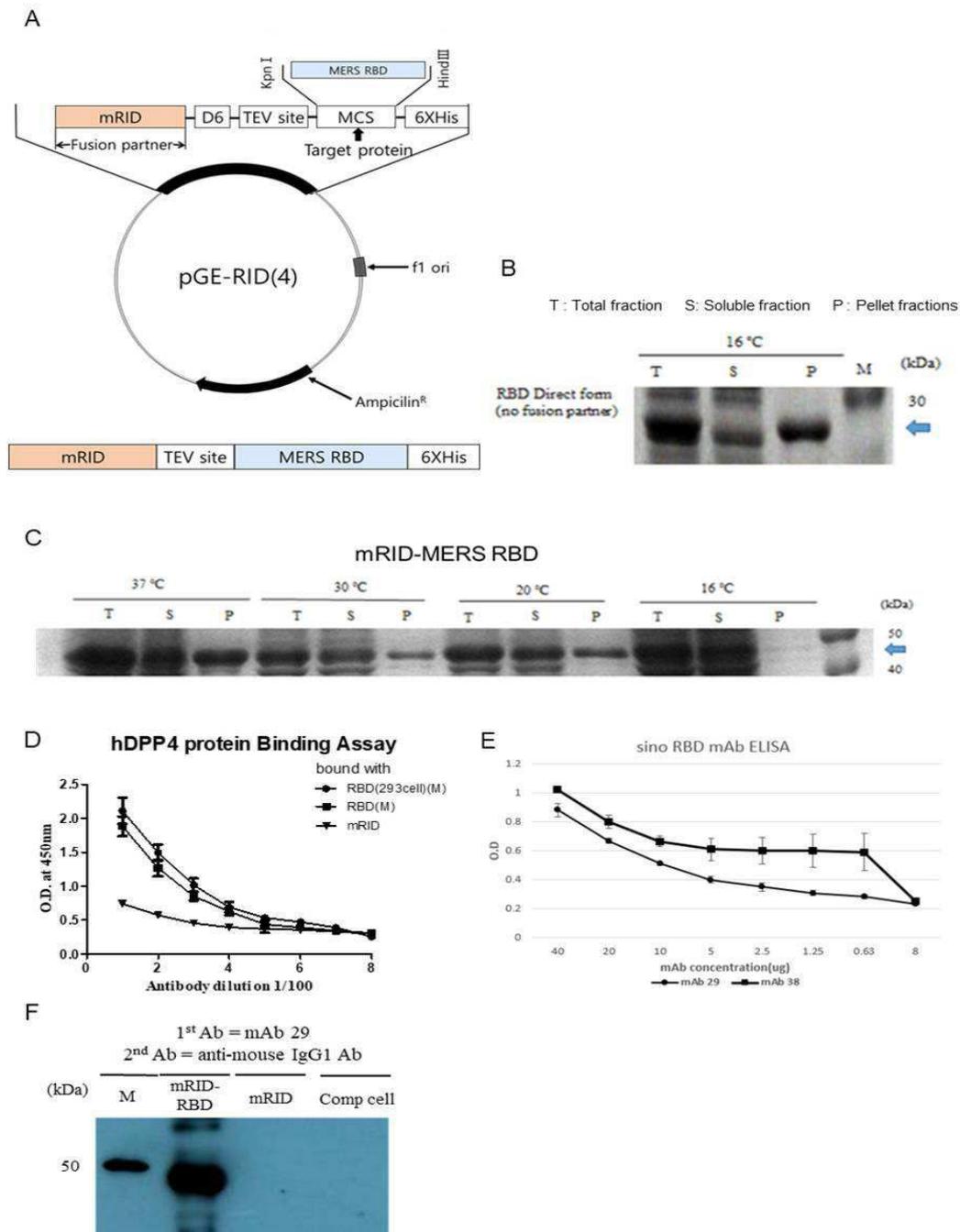
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Method for producing target antigen-specific antibody using recombinant antigen
- <130> 1064587
- <160> 11
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1

<211> 69
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mRID
 <400> 1
 Met Ala Thr Leu Gln Glu Ser Glu Val Lys Val Asp Gly Glu Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Lys Asn Glu Leu Lys Arg Arg Leu Lys Ala Glu Lys Lys Leu
 20 25 30
 Ala Glu Lys Glu Ala Lys Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Gln Leu Asn
 35 40 45
 Gln Thr Ala Ser Ala Pro Asn His Thr Ala Asp Asn Gly Val Gly Ala
 50 55 60
 Glu Glu Glu Thr Leu

65
 <210> 2
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rRID
 <400> 2
 Met Ala Ala Val Gln Ala Ala Glu Val Lys Val Asp Gly Glu Pro Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Lys Asn Glu Leu Lys Arg Arg Leu Lys Ala Glu Lys Lys Val
 20 25 30
 Ala Glu Lys Glu Ala Lys Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Gln Leu Ser
 35 40 45
 Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Asn His Ala Thr Asp Asn Gly Val Gly
 50 55 60
 Ala Glu Glu Glu Ser Leu
 65 70

<210> 3
 <211> 71

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hRID
 <400> 3

Met Ala Ala Val Gln Ala Ala Glu Val Lys Val Asp Gly Ser Glu Pro
 1 5 10 15
 Lys Leu Ser Lys Asn Glu Leu Lys Arg Arg Leu Lys Ala Glu Lys Lys
 20 25 30
 Val Ala Glu Lys Glu Ala Lys Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Gln Leu
 35 40 45
 Ser Gln Ala Thr Ala Ala Ala Thr Asn His Thr Thr Asp Asn Gly Val
 50 55 60
 Gly Pro Glu Glu Glu Ser Val

65 70

<210> 4
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> uHA stalk
 <400> 4

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Glu Gly
 1 5 10 15
 Leu Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Val
 20 25 30
 Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asp Lys Ile
 35 40 45
 Thr Asn Lys Val Asn Ile Val Ile Glu Lys Leu Asn Lys Gln Phe Glu
 50 55 60
 Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu
 65 70 75 80
 Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Ala Tyr Asn Ala
 85 90 95

Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp
 100 105 110
 Ala Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Arg Leu Gln Leu Lys Asn
 115 120 125
 Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys
 130 135 140
 Asp Asn Glu Cys Leu Glu Ser Tyr Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro
 145 150 155 160
 Lys Tyr Glu Glu Glu Ala Lys Leu Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val
 165 170 175
 Lys Leu Glu Leu Gly Val Tyr Gly Ile Leu
 180 185

<210> 5
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HAgd
 <400> 5

Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser
 20 25 30
 Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly
 35 40 45
 Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser
 50 55 60
 Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn
 65 70 75 80
 His Asn Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly Lys Ser
 85 90 95
 Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr
 100 105 110

Pro Lys Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu
 115 120 125

Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Pro Asn Ser Lys Glu Gln Gln Asn
 130 135 140

Leu Tyr Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr
 145 150 155 160

Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp
 165 170 175

Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp
 180 185 190

Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Met Tyr Ala
 195 200 205

Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala
 210 215 220

<210> 6
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MERS S1 RBD
 <400> 6

Glu Ala Lys Pro Ser Gly Ser Val Val Glu Gln Ala Glu Gly Val Glu
 1 5 10 15

Cys Asp Phe Ser Pro Leu Leu Ser Gly Thr Pro Pro Gln Val Tyr Asn
 20 25 30

Phe Lys Arg Leu Val Phe Thr Asn Cys Asn Tyr Asn Leu Thr Lys Leu
 35 40 45

Leu Ser Leu Phe Ser Val Asn Asp Phe Thr Cys Ser Gln Ile Ser Pro
 50 55 60

Ala Ala Ile Ala Ser Asn Cys Tyr Ser Ser Leu Ile Leu Asp Tyr Phe
 65 70 75 80

Ser Tyr Pro Leu Ser Met Lys Ser Asp Leu Ser Val Ser Ser Ala Gly
 85 90 95

Pro Ile Ser Gln Phe Asn Tyr Lys Gln Ser Phe Ser Asn Pro Thr Cys

100 105 110

Leu Ile Leu Ala Thr Val Pro His Asn Leu Thr Thr Ile Thr Lys Pro

115 120 125

Leu Lys Tyr Ser Tyr Ile Asn Lys Cys Ser Arg Leu Leu Ser Asp Asp

130 135 140

Arg Thr Glu Val Pro Gln Leu Val Asn Ala Asn Gln Tyr Ser Pro Cys

145 150 155 160

Val Ser Ile Val Pro Ser Thr Val Trp Glu Asp Gly Asp Tyr Tyr Arg

165 170 175

Lys Gln Leu Ser Pro Leu Glu Gly Gly Gly Trp Leu Val Ala Ser Gly

180 185 190

Ser Thr Val Ala Met Thr Glu Gln Leu Gln Met Gly Phe Gly Ile Thr

195 200 205

Val Gln Tyr Gly Thr Asp Thr Asn Ser Val Cys Pro Lys Leu Glu Phe

210 215 220

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

225 230 235 240

<210> 7

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mRID-uHAstalk

<400> 7

Met Ser Glu Gln Ala Thr Leu Gln Glu Ser Glu Val Lys Val Asp Gly

1 5 10 15

Glu Gln Lys Leu Ser Lys Asn Glu Leu Lys Arg Arg Leu Lys Ala Glu

20 25 30

Lys Lys Leu Ala Glu Lys Glu Ala Lys Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys

35 40 45

Gln Leu Asn Gln Thr Ala Ser Ala Pro Asn His Thr Ala Asp Asn Gly

<213> Artificial Sequence

<220><223> mRID-HAgd

<400> 8

Met Ser Glu Gln Ala Thr Leu Gln Glu Ser Glu Val Lys Val Asp Gly

1 5 10 15

Glu Gln Lys Leu Ser Lys Asn Glu Leu Lys Arg Arg Leu Lys Ala Glu

20 25 30

Lys Lys Leu Ala Glu Lys Glu Ala Lys Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys

35 40 45

Gln Leu Asn Gln Thr Ala Ser Ala Pro Asn His Thr Ala Asp Asn Gly

50 55 60

Val Gly Ala Glu Glu Glu Thr Leu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Ser Gly

65 70 75 80

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Thr Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly

85 90 95

Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Pro

100 105 110

Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser

115 120 125

Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu

130 135 140

Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe

145 150 155 160

Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn Thr Thr Lys Gly Val Thr

165 170 175

Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu

180 185 190

Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys Leu Lys Asn Ser Tyr

195 200 205

Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His His

210 215 220

Pro Ser Asn Ser Lys Asp Gln Gln Asn Ile Tyr Gln Asn Glu Asn Ala

225 230 235 240
 Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu
 245 250 255

Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr
 260 265 270

Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn
 275 280 285

Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe
 290 295 300

Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Lys Leu His His His His His
 305 310 315 320

His

<210> 9

<211> 322

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rRID-HAgd

<400> 9

Met Ser Glu Gln Ala Ala Val Gln Ala Ala Glu Val Lys Val Asp Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Lys Leu Ser Lys Asn Glu Leu Lys Arg Arg Leu Lys Ala Glu
 20 25 30

Lys Lys Val Ala Glu Lys Glu Ala Lys Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys
 35 40 45

Gln Leu Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Asn His Ala Thr Asp Asn

50 55 60

Gly Val Gly Ala Glu Glu Glu Ser Leu Asp Asp Asp Asp Asp Ser
 65 70 75 80

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Thr Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu
 85 90 95

Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp

<213> Artificial Sequence

<220><223> hRID-HAgd

<400> 10

Met Ser Glu Gln His Ala Gln Ala Ala Val Gln Ala Ala Glu Val Lys

1 5 10 15
Val Asp Gly Ser Glu Pro Lys Leu Ser Lys Asn Glu Leu Lys Arg Arg

20 25 30
Leu Lys Ala Glu Lys Lys Val Ala Glu Lys Glu Ala Lys Gln Lys Glu

35 40 45
Leu Ser Glu Lys Gln Leu Ser Gln Ala Thr Ala Ala Ala Thr Asn His

50 55 60
Thr Thr Asp Asn Gly Val Gly Pro Glu Glu Glu Ser Val Asp Asp Asp

65 70 75 80

Asp Asp Asp Ser Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Thr Gly Ile Ala
85 90 95

Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
100 105 110

Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile Val
115 120 125

Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile
130 135 140

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu

145 150 155 160
Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn Thr

165 170 175
Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser Phe

180 185 190
Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys

195 200 205
Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu

210 215 220

Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Asp Gln Gln Asn Ile Tyr
 225 230 235 240
 Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg
 245 250 255
 Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala
 260 265 270
 Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile
 275 280 285
 Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala

 290 295 300
 Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Lys Leu
 305 310 315 320
 His His His His His His
 325
 <210> 11
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mRID-MERS S1 RBD
 <400> 11
 Met Ser Glu Gln Ala Thr Leu Gln Glu Ser Glu Val Lys Val Asp Gly
 1 5 10 15
 Glu Gln Lys Leu Ser Lys Asn Glu Leu Lys Arg Arg Leu Lys Ala Glu

 20 25 30
 Lys Lys Leu Ala Glu Lys Glu Ala Lys Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys
 35 40 45
 Gln Leu Asn Gln Thr Ala Ser Ala Pro Asn His Thr Ala Asp Asn Gly
 50 55 60
 Val Gly Ala Glu Glu Glu Thr Leu Asp Asp Asp Asp Asp Ser Gly
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Thr Glu Ala Lys Pro Ser Gly Ser Val
 85 90 95

Val Glu Gln Ala Glu Gly Val Glu Cys Asp Phe Ser Pro Leu Leu Ser
 100 105 110

Gly Thr Pro Pro Gln Val Tyr Asn Phe Lys Arg Leu Val Phe Thr Asn
 115 120 125

Cys Asn Tyr Asn Leu Thr Lys Leu Leu Ser Leu Phe Ser Val Asn Asp
 130 135 140

Phe Thr Cys Ser Gln Ile Ser Pro Ala Ala Ile Ala Ser Asn Cys Tyr
 145 150 155 160

Ser Ser Leu Ile Leu Asp Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Ser Met Lys Ser
 165 170 175

Asp Leu Ser Val Ser Ser Ala Gly Pro Ile Ser Gln Phe Asn Tyr Lys
 180 185 190

Gln Ser Phe Ser Asn Pro Thr Cys Leu Ile Leu Ala Thr Val Pro His
 195 200 205

Asn Leu Thr Thr Ile Thr Lys Pro Leu Lys Tyr Ser Tyr Ile Asn Lys
 210 215 220

Cys Ser Arg Leu Leu Ser Asp Asp Arg Thr Glu Val Pro Gln Leu Val
 225 230 235 240

Asn Ala Asn Gln Tyr Ser Pro Cys Val Ser Ile Val Pro Ser Thr Val
 245 250 255

Trp Glu Asp Gly Asp Tyr Tyr Arg Lys Gln Leu Ser Pro Leu Glu Gly
 260 265 270

Gly Gly Trp Leu Val Ala Ser Gly Ser Thr Val Ala Met Thr Glu Gln
 275 280 285

Leu Gln Met Gly Phe Gly Ile Thr Val Gln Tyr Gly Thr Asp Thr Asn
 290 295 300

Ser Val Cys Pro Lys Leu Glu Phe Ala Asn Asp Thr Lys Ile Ala Ser
 305 310 315 320

Gln Leu Gly Asn Cys Val Glu Tyr Val Asp Lys Leu His His His His
 325 330 335

His His