



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2019년02월13일  
 (11) 등록번호 10-1946779  
 (24) 등록일자 2019년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C07K 16/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
 C12N 5/16 (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
 C07K 16/1253 (2013.01)  
 C12N 5/163 (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2017-0092492  
 (22) 출원일자 2017년07월21일  
 심사청구일자 2017년07월21일  
 (65) 공개번호 10-2018-0092254  
 (43) 공개일자 2018년08월17일  
 (30) 우선권주장  
 1020170016136 2017년02월06일 대한민국(KR)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020150106310 A\*  
 WO2015137686 A1  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 세종대학교산학협력단  
 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)  
 (72) 발명자  
 류춘제  
 서울특별시 강남구 선릉로 221 도곡렉슬아파트  
 204-203  
 김민규  
 서울특별시 성동구 돌레21길 21-17 (성수동2가)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 11 항

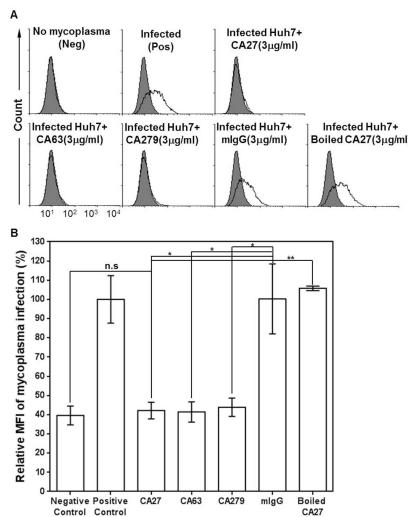
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **마이코플라스마 중화 에피토프 및 이에 대한 항체**

**(57) 요약**

본 발명은 마이코플라스마 중화 에피토프 및 이에 대한 항체에 관한 것으로서, 마이코플라스마 효라이니스 p37 단백질의 226 내지 246번째 아미노산을 특이적으로 인식하는 항체를 처리함으로써 세포에 대한 마이코플라스마의 감염을 효과적으로 억제할 수 있었는바, 본 발명은 세포 배양시 수반되는 마이코플라스마 오염을 근본적으로 차단할 수 있을 것이다.

**대표도** - 도15



- (52) CPC특허분류  
A61K 2039/505 (2013.01)  
C07K 2317/56 (2013.01)  
C07K 2317/76 (2013.01)

**조유라**

인천광역시 부평구 부영로 165 105동 706호 (산곡동, 우성아파트)

- (72) 발명자  
**최홍서**  
서울특별시 광진구 능동로27가길 20 (군자동)  
**이현민**  
경기도 포천시 소흘읍 무림3길 16 (무림리)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 216918220  
부처명 미래창조과학부  
연구관리전문기관 한국연구재단  
연구사업명 바이오·의료기술개발사업  
연구과제명 신규 전환인자 발굴을 통한 순수 인간만능줄기세포 유도 및 기전규명  
기여율 60/100  
주관기관 세종대학교 산학협력단  
연구기간 2016.07.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016008610  
부처명 미래창조과학부  
연구관리전문기관 한국연구재단  
연구사업명 기초연구사업  
연구과제명 암세포에서 표면 발현하는 HNRPUL1의 기능분석 및 암 치료 표적으로써 평가  
기여율 40/100  
주관기관 세종대학교 산학협력단  
연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

마이코플라스마 효라이니스(*Mycoplasma hyorhinis*) p37 단백질의 226 내지 246번째 아미노산으로 이루어진, 서열번호 1의 에피토프.

#### 청구항 2

제1항의 에피토프를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 3

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터.

#### 청구항 4

제3항의 제조합 벡터로 형질전환된 인간을 제외한 형질전환체.

#### 청구항 5

마이코플라스마 효라이니스 P37 단백질의 226 내지 246번째 아미노산으로 이루어진, 서열번호 1의 에피토프와 특이적으로 결합하는 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 항체로서,

상기 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2, 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 ( $V_H$ ); 및

서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2, 및 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변영역 ( $V_L$ )을 포함하는 것을 특징으로 하거나. 또는

상기 항체는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2, 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 ( $V_H$ ); 및

서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2, 및 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변영역 ( $V_L$ )을 포함하는 것을 특징으로 하는, 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 항체.

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

제5항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역( $V_H$ )과 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역( $V_L$ )을 포함하는 것을 특징으로 하는, 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 항체.

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

제5항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역(V<sub>H</sub>)과 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역(V<sub>L</sub>)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 항체.

**청구항 10**

제5항에 있어서,

상기 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는, 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 항체.

**청구항 11**

제5항, 제7항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항의 항체를 생산하는 하이브리도마.

**청구항 12**

제5항, 제7항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항의 항체를 유효성분으로 포함하는 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 조성물.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

상기 조성물은 세포 배양용 배지에 함유되는 것을 특징으로 하는 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 마이코플라스마 중화 에피토프 및 이에 대한 항체에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 사람에게서 마이코플라스마는 흔히 감염되는 미생물로서, 일부를 제외하고는 크게 문제가 되지는 않는다. 암 발생에서 박테리아 감염은 크게 상관관계가 없는 것으로 알려져 왔지만, 최근 연구에서는 박테리아의 지속적 감염은 많은 암을 유발한다고 보고된 바 있다. 발암성으로 주목을 받고 있는 박테리아 중 하나가 마이코플라스마이며, 마이코플라스마는 독립적인 복제를 할 수 있는 가장 작은 박테리아 중 하나이다.

[0003] 한편, 마이코플라스마는 세포벽이 없는 원핵생물로서, 배양 중인 세포에서 많이 감염되며, 특히, 제약 회사, 병원, 및 연구실에서는 마이코플라스마 효라이니스(*Mycoplasma hyorhinis*), 마이코플라스마 퍼덴탄스(*Mycoplasma fermentans*), 마이코플라스마 오라레(*Mycoplasma orale*) 등의 마이코플라스마가 주로 세포 배양시 감염되어 오염을 유발하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로, 마이코플라스마는 세포주의 원 생명체에 감염된 후, 세포주 수

립시 오염되며, 혈청, 그리고 연구실 내에서의 부주의에 의해 세포주간 전파된다.

- [0004] 이렇게 마이코플라스마에 의한 오염이 증가하는 이유는 마이코플라스마가 다른 감염원, 즉, 세포벽이 있는 박테리아나 곰팡이와 같이 배지의 혼탁도가 증가하거나, 바이러스와 같이 세포의 사멸 등 가시적인 변화가 없으므로 실험자가 그 오염을 인지하지 못하고 오염을 확대시키기 때문이다. 더욱이, 마이코플라스마는 세포벽이 없기 때문에, 세포 배양에 주로 사용하는 페니실린 및 다른 베타-락탐계 항생제가 마이코플라스마에 영향을 미치지 못하는 것, 또한 주요 원인 중 하나로 지적되고 있다.
- [0005] 한편, 세포 배양에 있어서 마이코플라스마의 오염은 가시적 변화는 거의 없으나 세포 배양에 많은 영향을 미치는데, 가장 대표적인 현상은 감염된 세포주의 물질대사를 변화시켜 세포주의 비정상적인 사이토카인 발현을 유도하는 것이다. 이러한 이유로, 수많은 실험과 연구가 마이코플라스마의 오염으로 인하여 비정상적인 결과를 초래하고 있다. 또한, 마이코플라스마는 세포의 형태도 변화시킬 수 있으며, 이와 함께 DNA, RNA 합성에 필요한 대사물을 소모하여 핵산 대사에 영향을 미친다. 이러한 영향은 세포막 외부의 수용체나 막 단백질의 구성을 변화시켜, 세포의 면역성이나 신호전달체계를 교란시키게 되며, 세포 성장 속도가 변하여 성장 실험이나 세포독성 실험의 결과에 영향을 미치게 된다. 또한, 핵산 대사 및 물질대사에 영향을 주기 때문에 세포주를 이용한 바이러스 생산이 감소하게 된다. 특히, 단일클론 항체의 생산시 하이브리도마 세포의 융합 성공률이 떨어질 뿐만 아니라, 항체 생산도 크게 저하되어 실험에 실패하는 경우가 자주 발생하고 있다. 이러한 현상은 백신을 비롯한 생물학적 제제의 생산과정에 매우 치명적인 실패를 가져올 수 있어서, 마이코플라스마의 오염은 경제적으로도 심각한 문제를 야기하고 있다.
- [0006] 상기와 같이, 세포 배양시 수반되는 심각한 마이코플라스마 오염에 따른 문제에도 불구하고, 만족할 만한 수준의 마이코플라스마 오염의 제거 방법은 아직까지 보고되지 않고 있는 실정이다(한국공개특허 제2010-0087202호).

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은, 세포 배양시 수반되는 마이코플라스마의 감염을 억제시키기 위하여 예의 노력한 결과, 마이코플라스마 효라이니스 p37 단백질의 특정 아미노산 잔기와 결합하는 항체를 이용하여, 마이코플라스마의 감염을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 이에, 본 발명의 목적은, 마이코플라스마 효라이니스의 감염을 억제할 수 있는, 에피토프를 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은, 상기 에피토프와 특이적으로 결합하는 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 항체를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 항체를 유효성분으로 포함하는 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 조성물을 체내로부터 분리된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 세포에 대한 마이코플라스마 효라이니스 감염을 억제하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 마이코플라스마 효라이니스(*Mycoplasma hyorhinis*) P37 단백질의 226 내지 246번째 아미노산으로 이루어진, 에피토프를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 에피토프를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 에피토프와 특이적으로 결합하는, 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 항체를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 3의 아미노산

서열로 이루어진 HCDR2, 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 ( $V_H$ ); 및 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2, 및 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변영역 ( $V_L$ )을 포함할 수 있고; 또는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역( $V_H$ )과 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역( $V_L$ )을 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 항체는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2, 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 ( $V_H$ ); 및 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2, 및 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변영역 ( $V_L$ )을 포함할 수 있고; 또는 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역( $V_H$ )과 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역( $V_L$ )을 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 항체는 단일클론 항체일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 항체를 유효성분으로 포함하는 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 조성물은 세포 배양용 배지에 함유될 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 체내로부터 분리된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 세포에 대한 마이코플라스마 효라이니스 감염을 억제하는 방법을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은, CA27 항체의 마이코플라스마 감염 억제 효과를 확인한 것으로서, 도 1A는 Huh7 세포에 결합하는 마이코플라스마 p37 단백질을 플로우 사이토메트리로 분석한 결과이고; 도 1B는 상기 결과를 평균 형광 강도 (MFI)를 통해 정량적으로 분석한 결과이고; 및 도 1C는 Huh7 세포에 감염된 마이코플라스마를 PCR을 통해 확인한 결과이다.

도 2는, 마이코플라스마 p37 단백질의 소수성 분석 결과를 나타낸 것으로서, 연속적으로 절단된 마이코플라스마 p37 단백질 단편 (아미노산 잔기 42-190, 183-246, 241-313, 315-403)은 단백질 내 모든 친수성 부위가 포함되어 있음을 보여준다.

도 3은, GST와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 42-190, 183-246, 241-313, 315-403로 이루어진 절편을 융합시킨 단백질에 대한 것으로서, 도 3A는 상기 융합 단백질을 개략적으로 나타낸 모식도이고; 및 도 3B는 SDS-PAGE 후, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 이들을 염색한 결과이다.

도 4는, CA27 항체와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 42-190, 183-246, 241-313, 315-403로 이루어진 절편간 결합을 확인한 것으로서, 도 4A는 GST 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이고; 및 도 4B는 CA27 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이다.

도 5는, GST와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 183-246, 183-219, 216-246, 216-240으로 이루어진 절편을 융합시킨 단백질에 대한 것으로서, 도 5A는 상기 융합 단백질을 개략적으로 나타낸 모식도이고; 및 도 5B는 SDS-PAGE 후, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 이들을 염색한 결과이다.

도 6은, CA27 항체와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 183-246, 183-219, 216-246, 216-240으로 이루어진 절편간 결합을 확인한 것으로서, 도 6A는 GST 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이고; 및 도 6B는 CA27 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이다.

도 7은, 마이코플라스마 p37 단백질의 3차 구조를 확인한 것으로서, 상기 단백질 내 아미노산 잔기 225-245는 알파-나선 구조로서 표면에 노출되어 있음을 보여준다.

도 8은, GST와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 216-246, 226-246, 216-240으로 이루어진 절편을 융합시킨 단백질에 대한 것으로서, 도 8A는 상기 융합 단백질을 개략적으로 나타낸 모식도이고; 및 도 8B는 SDS-

PAGE 후, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 이들을 염색한 결과이다.

도 9는, CA27 항체와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 216-246, 226-246, 216-240으로 이루어진 절편간 결합을 확인한 것으로서, 도 9A는 GST 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이고; 및 도 9B는 CA27 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이다.

도 10은, 요소의 처리에 따른 CA27 항체와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 216-246, 226-246, 216-240으로 이루어진 절편간 결합을 확인한 것으로서, 도 10A는 GST 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이고; 및 도 10B는 CA27 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이다.

도 11은, 총 6종의 항체(CA27, CA30, CA63, CA193, CA149, CA279 항체)와 마이코플라스마 p37 단백질간의 결합을 확인하기 위하여 면역침강법(Immunoprecipitation)을 한 후, 웨스턴 블롯을 실시한 결과다.

도 12는, GST와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 216-246, 226-246, 216-240으로 이루어진 절편을 융합시킨 단백질에 대한 것으로서, 도 12A는 상기 융합 단백질을 개략적으로 나타낸 모식도이고; 및 도 12B는 SDS-PAGE 후, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 이들을 염색한 결과이다.

도 13은, CA63 항체와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 216-246, 226-246, 216-240으로 이루어진 절편간 결합을 확인한 것으로서, 도 13A는 GST 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이고; 및 도 13B는 CA63 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이다.

도 14는, CA279 항체와 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 216-246, 226-246, 216-240으로 이루어진 절편간 결합을 확인한 것으로서, 도 14A는 GST 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이고; 및 도 14B는 CA279 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과이다.

도 15는, CA63 및 CA279 항체의 마이코플라스마 감염 억제 효과를 확인한 것으로서, 도 15A는 Huh7 세포에 결합하는 마이코플라스마 p37 단백질을 플로우 사이토메트리로 분석한 결과이고; 및 도 15B는 상기 결과를 평균 형광 강도 (MFI)를 통해 정량적으로 분석한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0025] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [0027] 본 발명은 마이코플라스마 효라이니스(*Mycoplasma hyorhinis*) p37 단백질의 226 내지 246번째 아미노산 잔기로 이루어진, 에피토프를 제공한다.
- [0028] 본 발명에서, 마이코플라스마 효라이니스는 돼지의 호흡기관에서 공생하는 흔한 박테리아이며, 지속적인 노출은 암 발생에 필요한 발암 유전자의 변형을 유발한다는 보고가 있다. 이 뿐만 아니라, 세포 배양에 기반을 둔 생명공학 및 의료 분야에서, 상기 마이코플라스마는 세포에 감염 및 전파되어 큰 피해를 일으키고 있는 실정이다. 실제로, 미국의 경우, 약 15%에 이르는 세포주들이 상기 마이코플라스마의 한 종 또는 그 이상의 마이코플라스마로 오염되어 있는 것으로 보고되고 있으며, 따라서 세포 배양시 수반되는 마이코플라스마 오염을 근본적으로 차단할 수 있는 기술의 개발이 절실하다.
- [0029] 한편, 마이코플라스마 효라이니스 p37 단백질은 고친화성 수송 시스템의 일부로서 많은 마이코플라스마에서 발견되고 있으며, 몇몇의 연구결과에서는 상기 단백질만으로도 암세포의 침입성과 전이를 촉진하기에 충분함을 보여준 바 있다. 특히, 마이코플라스마가 숙주세포에 감염될 때, 마이코플라스마 p37 단백질의 N-terminal 부위(2-23)가 직접적으로 관여하며, 상기 부위를 억제함으로써 마이코플라스마의 감염을 억제할 수 있는 것으로 알려져 왔다. 그러나 본 발명의 이러한 종전의 연구와 달리, 마이코플라스마의 감염을 억제할 수 있는 에피토프로서, p37 단백질의 226 내지 246번째 아미노산 잔기를 새롭게 규명하였다는 점에 기술적 의의가 있다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 용어, "에피토프(Epitope)"는 특정 항체에 의한 인식과 관련된 아미노산 잔기 세트, 보다 구체적으로, 항원 특이성을 부여하는 특정한 입체구조를 지닌 단백질 내 단편 또는 절편을 의미한다. 본 명세서의 내용 전반에 걸쳐 에피토프는 펩타이드 또는 항원결정부위(antigen determinant)와 종종 서로 바꾸어 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 에피토프보다 크며, 본 발명의 에피토프를 포함하는 단리 또는 정제된 단백질 또는 펩타이드가 여전히 본 발명의 범위에 포함된다. 본 발명의 목적상, 상기 에피토프는 항원 특이성을 부여하는 단백질의 3차원적 구조가 지니고 있어, 특이적인 항체와의 결합을 통해 마이코플라스마 효라이니스의 감염을 중화시키는 기능을 발휘할 수 있는, 마이코플라스마 효라이니스 P37 단백질의 226 내지 246번째 아미노산 잔기로 이루어진, 단백질 내 단편 또는 절편을 의미한다.



- [0031] 본 발명의 에피토프는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 각각 75% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0033] 한편, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은, 상기 에피토프를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 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. 본 발명의 목적상, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 에피토프를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다. 예를 들어, 상기 에피토프를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 각각 75% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어, "상동성"은 야생형 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 이러한 상동성의 비교는 당업계에서 널리 알려진 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있으며, 2개 이상의 서열간 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서, 벡터는 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 벡터는 통상의 클로닝 벡터 또는 발현벡터일 수 있으며, 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서(촉진 유전자) 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 이러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 또한 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우 복제기원을 포함한다.
- [0037] 상기 벡터로 형질전환하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환 기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충격유전자전달법(electroporation), 인산 칼슘(CaPO<sub>4</sub>) 침전, 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>) 침전, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection) 및 리포솜 매개법(liposome-mediated method)을 이용할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어, "형질전환"은 본래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 외래 유전자가 있는 DNA사슬 조각 또는 플라스미드가 세포들 사이에 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합함으로써 세포의 유전형질을 변화시키는 분자생물학적 기술을 의미하며, 본 발명의 목적상, 상기 형질전환은 서열번호 1의 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 생산 균주 내로 도입되는 것을 의미한다.
- [0039] 상기 용어 "형질전환체"는 "숙주세포" 등과 호환성 있게 사용될 수 있으며, 임의의 수단(예: 전기충격법, 칼슘 포스파타제 침전법, 미세주입법, 형질전환법, 바이러스 감염 등)에 의해 세포 내로 도입된 이종성 DNA를 포함하는 원핵 또는 진핵 세포를 의미한다.
- [0040] 본 발명에서 상기 형질전환체는 클로닝 분야에서 통상적으로 사용되는 모든 종류의 단세포 유기체, 예컨대 각종 박테리아(예컨대, Clostridia속, 대장균, 등) 등의 원핵세포 미생물, 효모 등의 하등 진핵세포 미생물과 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 당업자가 목적하는 바에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용할 수 있다. 일례로 본 발명에서 형질전환체로 이용되는 미생물은 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속 미생물(*Streptomyces spp.*), 슈도모나스 속 미생물(*Pseudomonas spp.*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 스타필로코쿠스 속 미생물(*Staphylococcus spp.*), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)



등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0042] 한편, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 에피토프와 특이적으로 결합하는 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 항체 및 상기 항체의 생산을 위한 하이브리도마를 제공한다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 결합 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 다클론(polyclonal) 항체 및 단일클론(monoclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 항체, 항체 단편, 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무린 항체) 및 이종결합 항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의하여 생산된 형태를 포함한다.
- [0044] 전형적으로 항체는 중쇄(Heavy chain) 및 경쇄(Light chain)를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변영역 및 가변영역(상기 부위는 “도메인”으로 또한 알려져 있음)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변영역은 “상보성 결정영역”(complementarity-determining region, 이하, ‘CDR’)라고 불리우는 3개의 다변가능한 영역 및 4개의 “구조영역”(framework region)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리우고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.
- [0045] 한 구체예로서, 본 발명에 따른 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2, 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 ( $V_H$ )과 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2, 및 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변영역 ( $V_L$ ); 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2, 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 ( $V_H$ )과 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2, 및 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변영역 ( $V_L$ )을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 한 구체예로서, 본 발명에 따른 항체는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역( $V_H$ )과 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역( $V_L$ ); 또는 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역( $V_H$ )과 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역( $V_L$ )을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 명세서에서 사용되는 용어, “하이브리도마”는 2 개의 다른 종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 세포를 의미한다. 상기 하이브리도마는 폴리에틸렌글리콜 등 세포 융합을 일으키게 하는 물질이나 특정 종의 바이러스를 사용하여 둘 이상의 동종 세포나 이종 세포를 융합시킴으로써 제조된다. 본 발명의 목적상, 상기 하이브리도마는 상기 에피토프와 특이적으로 결합하는 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 단일클론항체를 생산한다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에서는, 마이코플라스마 p37 단백질과 Huh7 세포간 결합을 억제하는 CA27 항체를 확인하였으며, 마이코플라스마 효라이니스의 감염을 억제시킬 수 있는 에피토프 (p37 단백질의 226 내지 246번째 아미노산 잔기)를 최초로 규명하였다 (실시예 2 및 3 참조).
- [0050] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기와 동일한 에피토프를 인식하는 CA63 및 CA279 항체 역시 CA27 항체와 마찬가지로, 마이코플라스마의 감염을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였는바, 상기 에피토프가 마이코플라스마의 감염을 중화시킬 수 있는 결정적인 부위임을 재차 검증하였고, 이들의 구체적인 서열을 도출하였다 (실시예 4 및 5 참조).
- [0051] 이에, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 유효성분으로 포함하는, 마이코플라스마 효라이니스의 감염 억제용 조성물, 및 상기 조성물을 체내로부터 분리된 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 세포에 대한 마이코플라스마 효라이니스 감염을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0052] 한 구체예로서, 상기 조성물은 세포 배양용 배지에 함유되어 실시될 수 있다. 상기 세포 배양용 배지는 상기 항체뿐만 아니라, 마이코플라스마 억제 활성이 있는 것으로 알려져 있는 항생제 혹은 리포펩타이드를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 독시사이클린(Doxycyclin), 리팜피신(Rifampicin), 크로람페니콜(Chloramphenicol), 프라스모신(Plasmocin), 클린다마이신 (Clindamycin), 아지스로마이신 (Azithromycin), 클라리슬로마이신(Clarithromycin), 테트라사이클린(Tetracyclin), 티아몰린(Tiamulin) 등의

항생제, 서팩틴(Surfactin), 아라메티신(Alamethicin), 세클로핀 에이, 피원(Cecropin A, P1), 글로보마이신(Globomycin), 그라미시딘 에스(Gramicidin S), 마게이닌 투(Magainin 2), 멜리틴(Mellitin), 폴리믹신 비(Polymixin B), 발리노마이신(Valinomycin) 등의 리포펩타이드를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명에서, 상기 세포는 마이코플라스마에 감염될 수 있는 모든 종류의 세포를 포함하며, 예를 들어, A549 세포주, Huh7 세포주, NIH3T3 세포주, HepG2 세포주, 및 Raw 264.7 세포주 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명에서, 상기 조성물을 세포에 처리하는 단계는 통상의 세포 배양 시간 동안 배양함으로써 수행할 수 있으며, 필요할 경우, 상기 항체를 함유한 배지 중에서의 계대배양을 통하여 수행할 수 있다. 이렇게 배양된 세포에서는 마이코플라스마가 검출되지 않고 효과적으로 제거되므로, 마이코플라스마 감염이 없는 정상적인 세포를 수득하는 것이 가능하다.

[0056] 다른 구체예로서, 상기 조성물은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다.

[0057] 본 발명의 조성물에 의한 예방 또는 치료 대상 질병인, "암(cancer)"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적 (aggressive) 특성, 주의 조직에 침투하는 침투적 (invasive) 특성, 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적 (metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭한다. 본 발명에서 암의 종류는, 췌장암, 위암, 간암, 대장암, 뇌암, 유방암, 갑상선암, 방광암, 식도암, 자궁암, 및 폐암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 해당할 수 있으나, 혈중암세포에 의해 암의 전이가 진행될 수 있는 암이라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0058] 본 발명에서 사용되는 용어, "혈중암세포(circulating tumor cell)"는 원발성 상피성 암세포가 이동성의 중간엽성 암세포로 전이하는 현상을 통해 혈액으로 이동하는 암세포를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 조성물은 마이코플라스마의 혈중암세포에 대한 감염을 억제하여 암세포의 전이를 억제할 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제시 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아, 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0061] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0062] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 100 내지 500 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0064] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0066] [실시예]

[0067] **실시예 1. 실험 준비 및 방법**

[0068] **1-1. 세포 배양 및 마이코플라스마 효라이니스의 감염**

[0069] 사람 폐암세포주(A549)와 간암세포주(Huh7)를 한국 세포주 은행에서 구입하였으며, 상기 세포는 RPMI1640 배지 (WelGene, Daegu, Korea)에 10% 소태아혈청(WelGene)과 antibiotic-antimycotic 용액(Life Technologies, Seoul, Korea)을 사용하여 배양하였다.

[0070] 마이코플라스마 효라이니스-비감염 Huh7 세포(Mycoplasma-free Huh7 cells)를 마이코플라스마 효라이니스-감염 A549 세포로부터 유래한 마이코플라스마로 감염시켰다. 상기 감염된 Huh7 세포를 계대배양하여 수득하고, 이를 -80℃에서 보관하였다(이하, 실시예에서는, 마이코플라스마 효라이니스를 마이코플라스마로 명명함.).

[0072] **1-2. 마이코플라스마의 감염 억제 효과 확인**

[0073] 마이코플라스마 ( $1 \times 10^5$  CFU/ml)를 포함하는 RPMI 1640 배지를 열 처리된 CA27 항체, CA63 항체, CA279 항체( $3 \mu\text{g/ml}$ ), 또는 CA27 항체( $1-3 \mu\text{g/ml}$ )와 함께 37℃에서 3시간 동안 전-배양하고, 12-웰 플레이트 내 마이코플라스마-비감염된 Huh7 세포를 첨가한 후, 추가로 37℃에서 2일 동안 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 이를 인산염 완충 식염수(PBS, pH 7.4)로 3회 세척한 후, 0.25% Trypsin-EDTA (Welgene)를 처리하여 세포를 떼어내었다. 상기 세포( $1 \times 10^4$  세포)를 PBA(PBS + 0.1% 소 혈청 알부민)로 세척하고, 플로우 사이트미트리(Flow cytometry) 분석을 실시한 다음, 필요에 따라, 항 마우스 IgG-FITC(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 실온(RT)에서 30분간 반응시켰다. Huh7 세포와 마이코플라스마 p37 단백질간 결합은 플로우 사이트미트리에 의해 측정되었으며, 평균 형광 강도(mean fluorescence intensity, MFI)로 나타내었다.

[0074] 한편, 감염된 마이코플라스마를 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 통해 검출하기 위하여, 감염된 Huh7 세포( $2 \times 10^5$  세포)를 수득한 후, 이를 증류수에 현탁시켰다. 현탁된 세포를 100℃로 열 처리하고, 그 상층액을 대상으로 e-Myco™ VALID-Q 마이코플라스마 qPCR 검출 키트(Intron, Seoul, Korea)를 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 아가로오스 겔 전기 영동 분석을 통해 가시화시켰다.

[0076] **1-3. GST-p37 융합 단백질의 제조 및 유도**

[0077] 연속적으로 절단된 마이코플라스마 p37 단백질(아미노산 잔기 42-190, 183-246, 241-313, 315-403, 183-219, 216-246, 216-240)들은 GST 단백질과의 융합 단백질의 형태로 발현되었다. 연속적으로 절단된 p37 유전자의 코딩 서열은 다양한 5'- 프라이머 및 3'- 프라이머를 사용하여 마이코플라스마 감염된 A549 세포로부터 PCR을 통해 합성되었고, pGEX4T-2(GE Healthcare, Seoul, Korea)의 EcoRI / SalI 부위에 서브 클로닝되어 발현 플라스미드를 제조하였다.

[0078] 본 실험에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다. 한편, 마이코플라스마 효라이니스에서 TGA는 종결 코돈이 아니라, 트립토판을 코딩하는 역할을 한다. 따라서 상기 TGA 서열을 종래 널리 알려져 있는 트립토판의 코돈인 TGG로 변형시켜 돌연변이성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 합성하였다.

[0079] [표 1]

Residues	Primer	Sequence
42-190	Forward	CCG AAT TCC CGA TAA AAG TAT AAC AT
	Reverse	CCG TCG ACT CAA CTT GCA TAT GGA G
183-246	Forward	CCG AAT TCC CGT TGA AAC TCC ATA TGC AAG TTG GAC TGA TGA AAA TCA TAA GTG GAA TGG TAA TGT T
	Forward '	ATG ATT TGG ATA AAA GGT AAT GAT
	Reverse	TTT TAT CCA AAT CAT TCC TCT ATA
	Reverse '	GGG TCG ACAA AAT TTC TAA ATG TAT TCC AAT CTT TAT CAT TCC AAG CTT TTT TAA TTT T
241-313	Forward	CCG AAT TCC CAA TAC ATT TAG AAA TTT TG
	Reverse	CCG TCG ACT CAA GCA AAA GAA CCT TCT
315-403	Forward	CCG AAT TCC CAC ACA TAA CAA ATC AGC A
	Reverse	CCG TCG ACA ATT TAT TTA ATG GCT TTT TC
183-219	Forward	CCG AAT TCC CGT TGA AAC TCC ATA TGC AAG TTG GAC TGA TGA AAA TCA TAA GTG GAA TGG TAA TGT T
	Reverse	GGG TCG ACT CAA ATC ATT CCT CTA TAA AA
216-246	Forward	CCG AAT TCC CTA TAG AGG AAT GAT TTG GAT AAA AGG TAA TGA T
	Reverse	GGG TCG ACA AAA TTT CTA AAT GTA TT CCA ATC TTT ATC ATT CCA AGC TTT TTT AAT TTT
226-246	Forward	CCG AAT TCC CGA AAC TCT AGC TAA AAT TAA AA
	Reverse	GGG TCG ACA AAA TTT CTA AAT GTA TT CCA ATC TTT ATC ATT CCA AGC TTT TTT AAT TTT
216-240	Forward	CCG AAT TCG AGG AAT GAT TTG GAT T
	Reverse	CCG TCG ACT AGA GTT TCA TCA TTA CC

[0080]

[0082]

한편, 각각의 발현 플라스미드는 DNA 염기서열 분석을 통해 확인하였고, GST-p37 융합 단백질의 발현을 위해, 상기 발현 플라스미드는 대장균 DH5  $\alpha$  세포에 도입되었다. 융합 단백질의 발현은 0.1mM IPTG(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)에 의해 32 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 유도되었다. 상기 유도된 박테리아를 미리 냉각된 PBS (pH 7.4)로 세척하고, 아이스에서 아세톤과 함께 5분 동안 배양하였으며, 이후, 실온에서 2분 동안 PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 100  $\mu$ g/ml가 첨가된 1% SDS(sodium dodecyl sulfate)에서 상기 세포를 용해시켰다. 세포 용해물은 원심 분리를 통해 정제하였고, 샘플의 단백질 농도는 bicinchoninic assay (Thermo Scientific, Seoul, Korea)을 통해 측정하였다. 세포 용해물을 대상으로 12.5% SDS-PAGE를 실시하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하고, 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 정제된 GST-p37 융합 단백질에 대한 웨스턴 블롯을 실시하기 위해, 제조사(GE Healthcare)의 지침에 따라 재조합 단백질을 글루타티온 아가로스 비드 상의 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)로 정제하였다.

[0084]

1-4. 웨스턴 블롯

[0085]

마이코플라스마 감염된 A549 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 ice-cold 면역침전 완충액 (150mM NaCl, 1% NP 40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 100  $\mu$ g/ml PMSF, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1mM NaF and 1mM NaVO<sub>3</sub>)에서 용해시켰다. 상기 세포 용해물과 GST-p37 융합 단백질을 SDS-PAGE 샘플 완충액과 함께 10분간 가열하였다. 한편, 필요에 따라, 정제된 GST-p37 융합 단백질은 SDS 샘플 완충액의 처리 전, 실온에서 10분 동안 4M Urea를 처리하였다. 상기 세포 용해물 및 GST-p37 단백질을 12% SDS-PAGE를 이용하여 분리하고, 이를 니트로셀룰로스 막으로 옮겨 웨스턴 블롯을 실시하였다. 상기 막을 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹하고,  $\alpha$ -GST 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 및 각각의 항체와 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 다시 실온에서 1시간 동안 항-마우스 IgG-HRP와 반응시켰다. 상기 단백질들은 ECL검출 키트(Advansta, Menlo Park, CA, USA)로 확인하였다.

[0087]

1-5. 소수성 분석



[0088] 아미노산 잔기의 상대적인 소수성을 나타내는 값을 얻기 위해, ProtScale (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl>)을 사용하여 마이코플라스마 p37 단백질의 소수성 프로파일을 확인하고, 이를 분석하였다.

[0090] **실시예 2. CA27 항체의 마이코플라스마 감염 억제 효과 확인**

[0091] 종전 연구에서, 본 발명자들은 마이코플라스마 p37 단백질을 특이적으로 인식하는 CA27 항체를 처리함으로써, 마이코플라스마가 감염된 혈중암세포를 검출할 수 있음을 밝힌 바 있다.

[0092] 한편, 본 실시예에서는 마이코플라스마 p37 단백질이 마이코플라스마 감염에 필수적인 역할을 수행한다는 전체 하에서, CA27 항체가 마이코플라스마의 감염을 억제할 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다. 전술한 바와 같이, 마이코플라스마 ( $1 \times 10^5$  CFU/ml)를 CA27 항체( $1-3 \mu\text{g/ml}$ )와 함께 배양하고, 여기에 Huh7 세포에 첨가하였으며, 이후, 마이코플라스마의 감염은 플로우 사이트메트리 분석 및 qPCR을 통해 확인하였다. 한편, 양성 대조군으로 마이코플라스마를 PBS와 함께 배양한 군, 음성 대조군으로 마이코플라스마를 열 처리한 CA27 항체와 함께 배양한 군을 이용하였다.

[0093] 그 결과, 도 1A 및 도 1B에 나타낸 바와 같이, 상기 양성 및 음성 대조군에서는, 마이코플라스마 p37 단백질과 Huh7 세포간 높은 결합을 확인할 수 있었던 반면, CA27 항체를 처리한 경우, 이러한 결합의 형성이 현저하게 억제됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과에 기초하여, 실제 Huh7 세포에 감염된 마이코플라스마 (250bp)를 qPCR을 통해 검출한 결과, 도 1C에 나타낸 바와 같이, 열 처리한 CA27 항체를 처리한 경우, Huh7 세포 내 마이코플라스마가 여전히 검출되었으나, CA27 항체를 처리한 경우, 감염된 마이코플라스마의 양이 현격하게 감소하여 마이코플라스마 비감염된 Huh7 세포와도 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

[0094] 이러한 결과는, 본 발명에 따른 CA27 항체는 마이코플라스마의 p37 단백질과의 특이적인 결합을 통해 마이코플라스마의 감염을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0096] **실시예 3. CA 27 항체의 항원결정부위 분석**

[0097] 본 실시예에서는, 상기 마이코플라스마의 감염을 중화시킬 수 있는 CA27 항체에 대한 마이코플라스마 p37 단백질 내 존재하는 항원결정부위 (에피토프)를 도출하고자 하였다. 전술한 바와 같이, 연속적으로 절단된 마이코플라스마 p37 단백질을 이용하여 GST-p37 융합 단백질의 제조한 후, 웨스턴 블롯을 통해 CA27 항체와 결합 여부를 확인하였다.

[0099] **3-1. 42 내지 403번째 아미노산 잔기에 대한 항원결정부위 분석**

[0100] 도 3A 및 3B에 나타낸 바와 같이, 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 42-190, 183-246, 241-313, 315-403로 이루어진 절편을 GST 단백질과의 융합 단백질의 형태로 제조 및 유도하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 이들을 확인하였다. 한편, 상기 마이코플라스마 p37 단백질의 절편들은 마이코플라스마 p37 단백질의 모든 친수성 부위가 포함되도록 설계되었고 (도 2 참조), 대조군으로는 전장의 마이코플라스마 p37 단백질을 이용하였다.

[0101] GST 항체 또는 CA27 항체와의 결합을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과, 도 4A 및 4B에 나타낸 바와 같이, 모든 GST-p37 융합 단백질은 정상적으로 발현되었으며, CA27 항체는 아미노산 잔기 42-190, 241-313, 315-403과 결합을 형성하지 못한 반면, 아미노산 잔기 183-246은 특이적으로 인식함을 알 수 있었다.

[0103] **3-2. 183 내지 246번째 아미노산 잔기에 대한 항원결정부위 분석**

[0104] 상기의 결과에 기초하여, 도 5A 및 5B에 나타낸 바와 같이, 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 183-246, 183-219, 216-246, 216-240으로 이루어진 절편을 GST 단백질과의 융합 단백질의 형태로 제조 및 유도하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 이들을 확인하였다. 한편, 대조군으로는 전장의 마이코플라스마 p37 단백질을 이용하였다.

[0105] GST 항체 또는 CA 27 항체와의 결합을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과, 도 6A 및 도 6B에 나타낸 바와 같이, 모든 GST-p37 융합 단백질은 정상적으로 발현되었으며, CA27 항체는 종전과 마찬가지로 아미노산 잔기 183-246과 특이적으로 결합하였고, 상기의 아미노산 잔기의 범위 내에서는, 아미노산 잔기 183-219, 216-240과 결합을 형성하지 못한 반면, 아미노산 잔기 216-246은 특이적으로 인식함을 알 수 있었다.

[0107] **3-3. 216 내지 246번째 아미노산 잔기에 대한 항원결정부위 분석**

- [0108] CA27 항체의 항원결정부위를 보다 구체적으로 확인하고자 하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, 마이코플라스마 p37 단백질 내 아미노산 잔기 225-245는 알파-나선 구조로서 도메인은 표면에 노출되는 반면, 아미노산 217-223은 베타 병풍 구조로서 내부에 위치하므로 주변의 아미노산 잔기 216-225는 CA27 항체의 특이적 결합에 큰 영향을 미치지 못할 것으로 예상하였다 (도 7 참조). 따라서, 본 발명자들은 도 8A 및 8B에 나타난 바와 같이, 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 216-246, 226-246, 216-240으로 이루어진 절편을 GST 단백질과의 융합 단백질의 형태로 제조 및 유도하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 이들을 확인하였다. 한편, 대조군으로는 전장의 마이코플라스마 p37 단백질을 이용하였다.
- [0109] GST 항체 또는 CA27 항체와의 결합을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과, 도 9A 및 도 9B에 나타난 바와 같이, 모든 GST-p37 융합 단백질은 정상적으로 발현되었으며, CA27 항체는 종전과 마찬가지로 아미노산 잔기 216-246과 특이적으로 결합하였고, 상기의 아미노산 잔기의 범위 내에서는, 아미노산 잔기 216-240과 결합을 형성하지 못한 반면, 아미노산 잔기 226-246은 특이적으로 인식함을 알 수 있었다.
- [0110] 또한, CA27 항체의 특이적 결합이 항원결정부위의 국소적인 3차원 구조(ex. 알파 나선)에 의존적인지 여부를 확인하고자, 상기 GST-p37 융합 단백질(아미노산 잔기 216-246, 226-246)을 SDS 샘플 완충액에 처리하기 전, 요소(Urea)를 처리하여 이에 따른 결합의 변화를 비교하였다. 그 결과, 도 10A 및 도 10B에 나타난 바와 같이, CA27 항체는 아미노산 잔기 216-246 및 아미노산 잔기 226-246을 특이적으로 인식하였으나, 요소를 처리하여 단백질 고유의 구조를 파괴한 경우, CA27 항체가 상기의 아미노산의 잔기를 인식하지 못함을 확인할 수 있었다.
- [0111] 이러한 결과는, 마이코플라스마 p37 단백질 내 아미노산 잔기 226-246은 마이코플라스마의 감염을 억제 또는 중화시키는데 핵심적인 역할을 하는 항원결정부위임을 나타내는 것이다.
- [0113] **실시예 4. CA 63 및 CA 279 항체의 마이코플라스마 감염 억제 효과 확인**
- [0114] 종전 연구에서, 본 발명자들은 마이코플라스마 감염된 A549 암세포를 생쥐에 면역 주사하여 총 75종의 항체를 제조한 바 있으며, 이들 중에서 총 6종의 항체 (CA27, CA30, CA63, CA193, CA149, CA279 항체)가 마이코플라스마 p37 단백질을 인식하였고, 도 11에 나타난 바와 같이, 상기 6개의 항체 중에서 오직 3개의 항체 (CA27, CA63, CA279 항체)만이 웨스턴 블롯 분석을 통해 마이코플라스마 p37 단백질과 결합함을 확인할 수 있었다.
- [0115] 이에, 본 실시예에서는, 마이코플라스마 p37 단백질과 결합하는 또 다른 항체인 CA63 및 CA279 항체를 대상으로, 상기와 동일한 방법으로 항원결정부위를 분석하고, 이들의 마이코플라스마 감염 억제 효과를 확인하고자 하였다.
- [0117] **4-1. CA 63 및 CA279 항체의 항원결정부위 분석**
- [0118] CA27 항체와 마찬가지로, CA63 및 CA279 항체는 아미노산 잔기 42-190, 241-313, 315-403과 결합을 형성하지 못한 반면, 아미노산 잔기 183-246은 특이적으로 인식함을 알 수 있었다 (미도시). 따라서, 도 12에 나타난 바와 같이, 마이코플라스마 p37 단백질의 아미노산 잔기 216-246, 226-246, 216-240, 216-240으로 이루어진 절편을 GST 단백질과의 융합 단백질의 형태로 제조 및 유도하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 이들을 확인하였다. 한편, 대조군으로는 전장의 마이코플라스마 p37 단백질을 이용하였다.
- [0119] GST 항체 또는 CA63/CA279 항체와의 결합을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과, 도 13A-B 내지 14A-B에 나타난 바와 같이, 모든 GST-p37 융합 단백질은 정상적으로 발현되었으며, CA63 및 CA279 항체 모두는 아미노산 잔기 216-246과 특이적으로 결합하였고, 상기의 아미노산 잔기의 범위 내에서는, 아미노산 잔기 216-240과 결합을 형성하지 못한 반면, 아미노산 잔기 226-246은 특이적으로 인식함을 알 수 있었다.
- [0120] 이러한 결과는, 본 발명에 따른 CA63 및 CA279 항체는 종전 CA27 항체와 마찬가지로, 마이코플라스마 p37 단백질 내 아미노산 잔기 226-246을 항원결정부위로 가짐을 나타내는 것이다.
- [0122] **4-2. 마이코플라스마 감염 억제 효과 확인**
- [0123] 상기 결과에 기초하여, CA27 항체와 동일한 항원결정부위를 갖는 CA63 및 CA279 항체 역시 마이코플라스마의 감염을 억제할 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다. 전술한 바와 같이, 마이코플라스마 ( $1 \times 10^5$  CFU/ml)를 CA27, CA63, 또는 CA279 항체( $3 \mu\text{g/ml}$ )와 함께 배양하고, 여기에 Huh7 세포에 첨가하였으며, 이후, 마이코플라스마의 감염은 플로우 사이트메트리 분석을 통해 확인하였다. 한편, 양성 대조군으로 마이코플라스마를 PBS와 함께 배양한 군, 음성 대조군으로 마이코플라스마를 열 처리한 CA27 항체 또는 항-마우스 IgG와 함께 배양한 군을 이용하였다.



[0124] 그 결과, 도 15A 및 도 15B에 나타난 바와 같이, 상기 양성 및 음성 대조군에서는, 마이코플라스마 p37 단백질과 Huh7 세포간 높은 결합을 확인할 수 있었던 반면, CA63 및 CA279 항체를 처리한 경우, 이러한 결합의 형성이 현저하게 억제됨을 확인할 수 있었고, 이러한 효과는 CA27 항체를 처리한 경우와 큰 차이가 없었다.

[0125] 이러한 결과는, 마이코플라스마 p37 단백질 내 아미노산 잔기 226-246는 마이코플라스마의 감염을 억제 또는 중화시키는데 핵심적인 역할을 하는 항원결정부위를 재차 검증하는 것이며, 상기 항원결정부위를 인식하는 항체들은 마이코플라스마의 감염 억제에 유용하게 활용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[0127] **실시예 5. CA63 및 CA279 항체의 클로닝 및 서열 분석**

[0128] 본 실시예에서는, 마이코플라스마의 감염 억제와 관련된 CA63 및 CA279 항체의 서열을 도출하고자 하였다. 우선, 하이브리도마 CA63, CA279 세포에서 항체 유전자를 클로닝하였다. 이를 위하여, 각각의 세포  $5 \times 10^6$  개를 원심 분리하여 수득한 후, 차가운 인산 완충식염수(Phosphate buffer saline, PBS(pH 7.4))로 세척하고 400 $\mu$ l의 RNA-iso plus (TAKARA, 일본)를 넣고 격렬히 섞었다. 실온에서 5분간 반응시키고, 80 $\mu$ l 클로포포름을 넣고 실온에서 5분 보관한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 xg의 속도로 15분 동안 원심 분리하여 상층 액을 회수하였다. 상층 액과 동일한 양의 이소프로판올을 넣은 후, 실온에서 10분 동안 방치 후 실온에서 12,000 xg의 속도로 10분 동안 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 75% 에탄올로 RNA를 세척하고 수분을 제거한 후 공기 중에서 RNA 침전물을 건조시켰다. 이후, 디에틸피로카보네이트 (Diethyl Pyrocarbonate, Sigma사, 미국) 처리된 증류수 50 $\mu$ l에 녹인 다음, A260을 측정하여 RNA 양을 정량하였다. cDNA를 합성하기 위해 500ng의 CA63 또는 CA279 RNA 4 $\mu$ l 와 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit 6 $\mu$ l (TAKARA, 일본)를 충분히 혼합하여 섞은 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 역전사 증합 효소 연쇄 반응을 하여 cDNA를 합성하였다. CA63과 CA279 항체 유전자를 클로닝하기 위해서 알려진 증합효소연쇄반응 프라이머를 변형한 후 사용하였다 (Wang, et al J. Immunol. Methods 233, 167-177, 2000). 구체적으로, 50ng의 CA63과 CA279의 cDNA를 이용한 중쇄의 클로닝을 위해, IgG2b 불변영역에 해당하는 증합효소연쇄반응 프라이머인 염기서열 5'-GGA GTC GAC AGG GGC CAG TGG ATA GAC TGA TGG-3'인 올리고뉴클레오타이드 16 pmole과 중쇄항체 가변영역 N말단에 해당하는 프라이머인 염기서열 5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC-3', 5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3'인 올리고뉴클레오타이드를 각 8 pmole을 혼합하여 전체 볼륨 3.2 $\mu$ l로 맞춘 혼합액에 Biofact<sup>TM</sup> e-Taq DNA 증합효소(DNA polymerase) 0.2 $\mu$ l, 10mM dNTP 0.4 $\mu$ l, 10 x e-taq 완충제 2 $\mu$ l (Biofact, 대한민국)와 3차 멸균 증류수를 혼합한 혼합액 6.8 $\mu$ l를 넣어 전사증합효소 연쇄반응 혼합액을 만들었다. 또한, 경쇄의 클로닝을 위해서는 카파사슬 불변영역에 해당하는 프라이머인 5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3' 올리고뉴클레오타이드 24 pmole과 카파사슬 가변영역 N 말단에 해당하는 프라이머인 5'-GG GAG CTC GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3' 와 5'-GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT-3', 5'-GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA-3' 올리고뉴클레오타이드 각각 0.8 pmole씩을 혼합하여 전체 볼륨 4.8 $\mu$ l로 맞춘 혼합액에, Biofact<sup>TM</sup> e-Taq DNA 증합효소(DNA polymerase) 0.2 $\mu$ l, 10mM dNTP 0.4 $\mu$ l, 10 x e-taq 완충제 2 $\mu$ l (Biofact, 대한민국)와 3차 멸균증류수를 혼합한 혼합액 5.2 $\mu$ l를 넣어 전사증합효소 연쇄반응 혼합액을 만들었다. 증합효소 연쇄반응 생산물의 효율적인 클로닝을 위하여, 경쇄의 경우는 3'-프라이머 말단에 SalI 제한효소 자리를 부여하였고, 5-프라이머 경우 HindIII 제한효소자리를 부여하였다. 중쇄의 경우에는 5-프라이머에는 EcoRI, 3' 프라이머에는 SalI 제한효소 자리를 부여하였다. 각각의 중쇄 및 경쇄 전사증합효소 연쇄반응혼합액을 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 45 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분으로 30회 반응시켰다. 그 결과 중쇄 불변영역에 해당하는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 400bp, 경쇄 불변영역 해당되는 DNA절편으로 추정되는 길이인 약 390bp에 해당되는 위치에서 증폭된 DNA를 얻을 수 있었다.

[0129] 상기와 같이 증폭한 CA63과 CA279 항체 유전자를 클로닝하기 위하여, 먼저 증합효소 연쇄반응 산물의 중쇄는 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄는 HindIII와 SalI으로 처리한 후 0.7 % 아가로스 젤에 전개시켜서 젤/PCR 산물 정제 키트(Gel/PCR purification Mini kit, FAVORGEN사, 호주)로 약 400bp과 390bp에 해당하는 DNA를 분리하였다. 중쇄 유전자를 클로닝할 벡터로 사용할 pBluescript KS+를 EcoRI과 SalI으로 처리하고 경쇄 유전자 클로닝 벡터로는 pBluescript KS+를 HindIII와 SalI으로 처리한 다음, 젤/PCR 산물 정제 키트(Gel/PCR purification Mini kit, FAVORGEN사, 호주)로 정제하였다. 이 두 DNA를 T4 DNA 연결효소(New England Biolab사, 미국)로 연결하고 대장균 DH5 $\alpha$ 에 CaCl<sub>2</sub>방법으로 형질 전환 한 다음, 중쇄의 경우 약 400bp 크기의 DNA삽입물을 가진 클론, 경쇄의 경우 약 390bp 크기를 가진 대장균 클론들을 선발하였다.

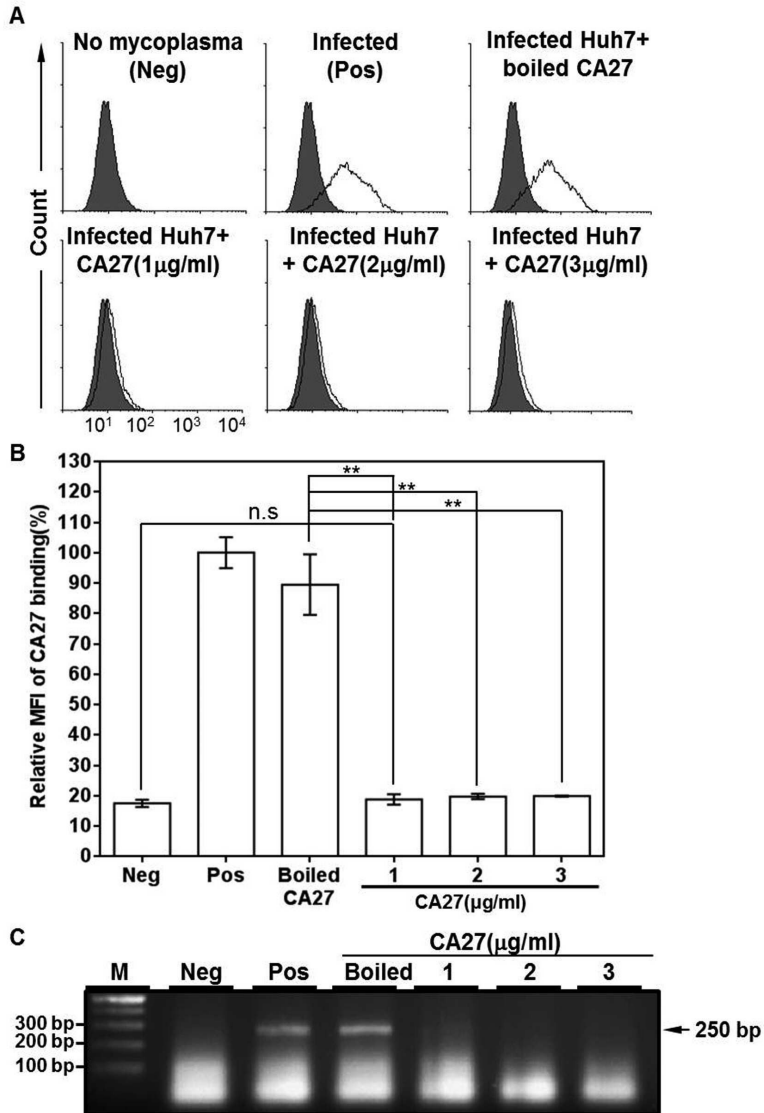
[0130] 항체 유전자들의 DNA 염기서열분석을 위하여 상기의 클론들을 50  $\mu$ g/ml의 암피실린이 함유된 5 ml의 LB 배지에서 하룻밤 동안 배양한 후 알칼라인 라이시스(Alkaline lysis)방법을 통해 플라스미드 DNA를 분리하고 각각의 DNA 삽입물의 염기서열을 결정하였다. 중쇄 및 경쇄 cDNA의 염기서열을 아미노산으로 바꾼 후 각 아미노산 배열

을 카바트 데이터베이스(Kabat database)를 이용하여 분석하였다(Johnson G. and Wu, T.T. Nucleic Acids Res. 29: 205-206, 2001). 서열 2,3,4,5 위의 숫자는 카바트 넘버링(Kabat numbering)에 따라 정하였다.

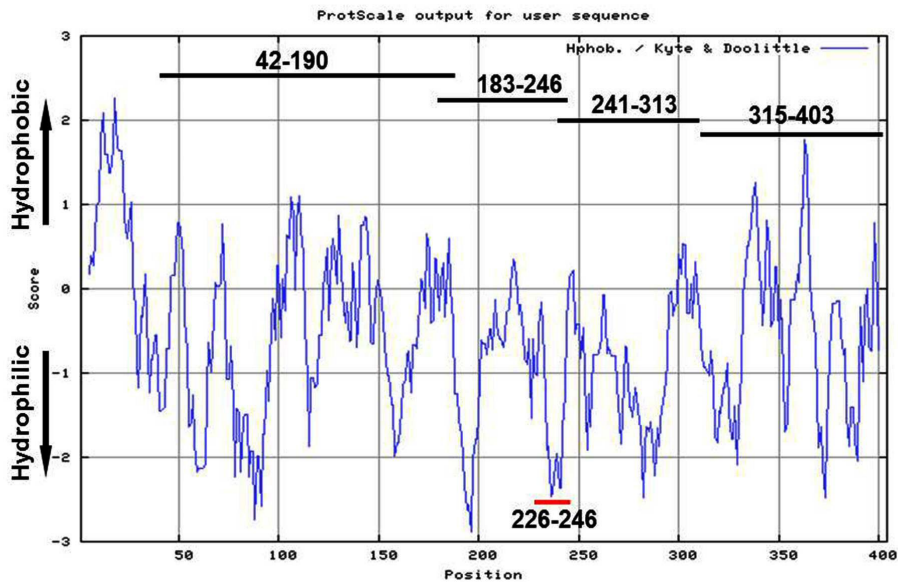
- [0131] 그 결과, 이 면역유전자들은 항체구조에 특징적인 잔기와 배열을 완벽하게 갖추고 있으며, 구체적으로, 면역글로블린 여러 그룹 가운데서 CA63 항체의 중쇄는 서브그룹 II(B)에 속하고 경쇄는 서브그룹 V에 속한다는 것을 확인하였으며, CA279항체의 중쇄는 서브그룹 II(B)에 속하고 경쇄는 서브그룹 V에 속한다는 것을 확인하였다.
- [0132] 한편, 항원을 인식하는 CDR 잔기로는, CA63 항체 중쇄의 경우, HCDR1은 31-35, HCDR2는 50-65, HCDR3는 95-102이며, CA63 항체 경쇄의 경우 LCDR1은 24-34, LCDR2는 50-56, LCDR3는 89-97에 해당하였고, 구조상 필수적인 디설피드 결합은 중쇄의 경우 22번과 92번 시스테인이, 경쇄의 경우 23번과 88번 시스테인이 관여하였다. 또한, CA279 항체 중쇄의 경우, HCDR1은 31-35, HCDR2는 50-65, HCDR3는 95-102이며, CA279 항체 경쇄의 경우 LCDR1은 24-34, LCDR2는 50-56, LCDR3는 89-97에 해당하였고, 구조상 필수적인 디설피드 결합은 중쇄의 경우 22번과 92번 시스테인이, 경쇄의 경우 23번과 88번 시스테인이 관여하였다. 이러한 유전자의 분석 결과로부터, 마이크로플라스마의 감염 억제와 관련된, 상기 CA63 및 CA279 항체의 기능적 부위를 구체적으로 도출하였다.
- [0134] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

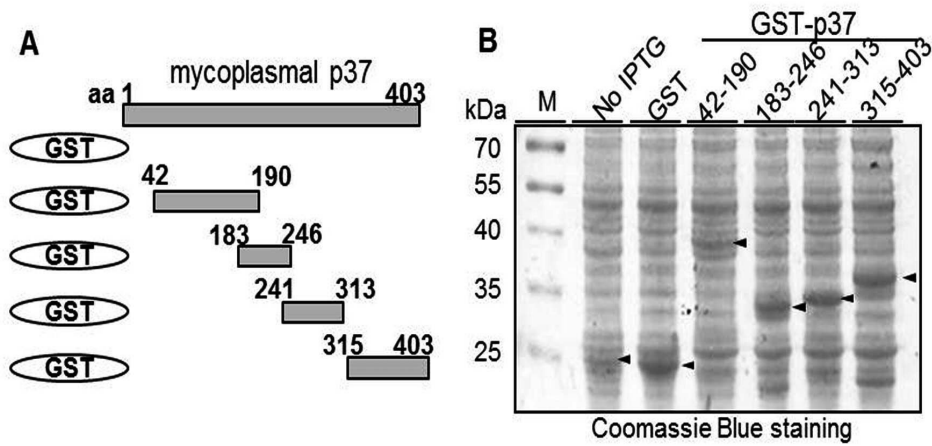
도면1



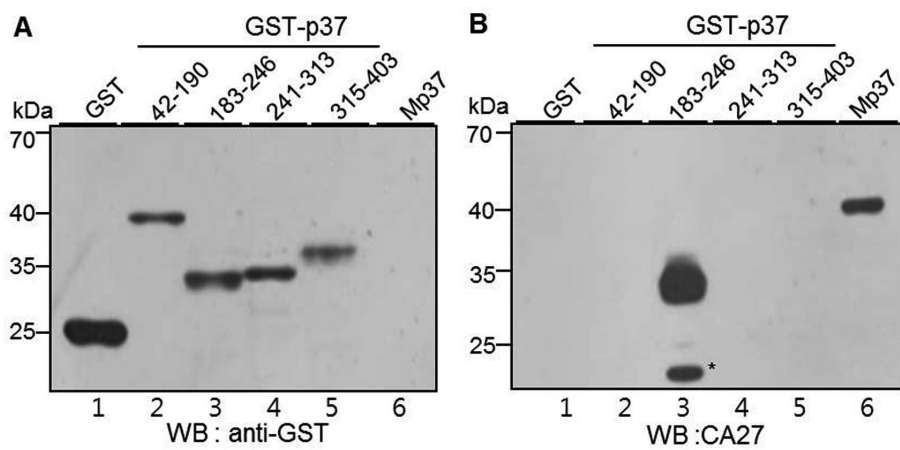
도면2



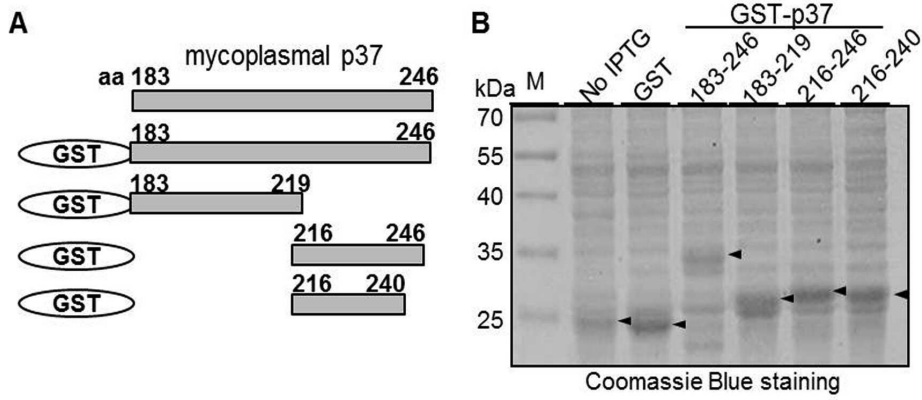
도면3



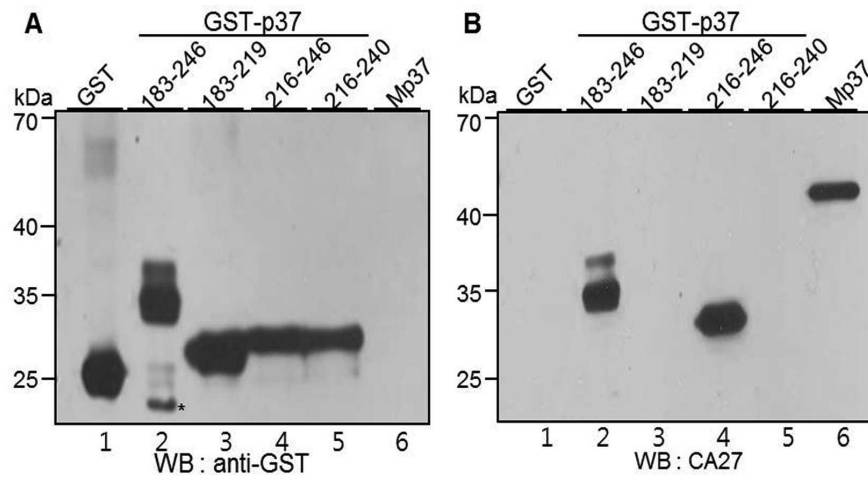
도면4



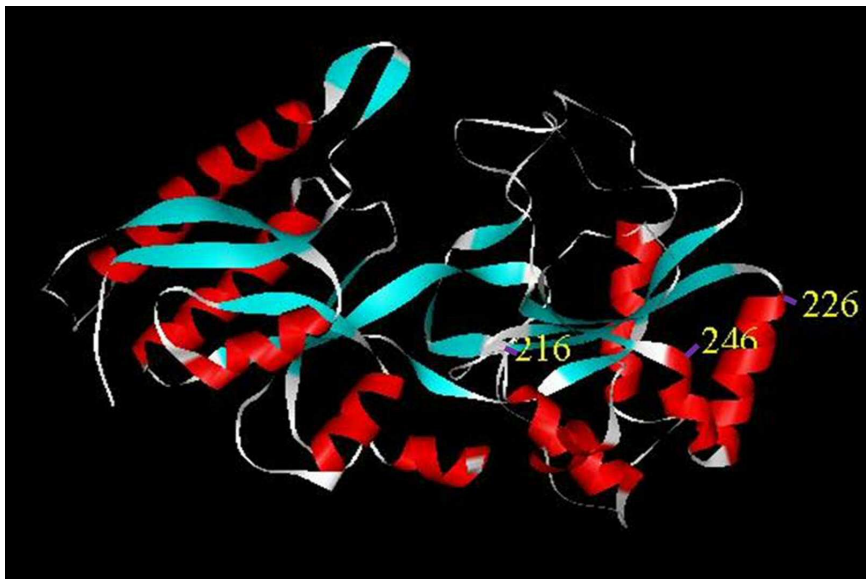
도면5



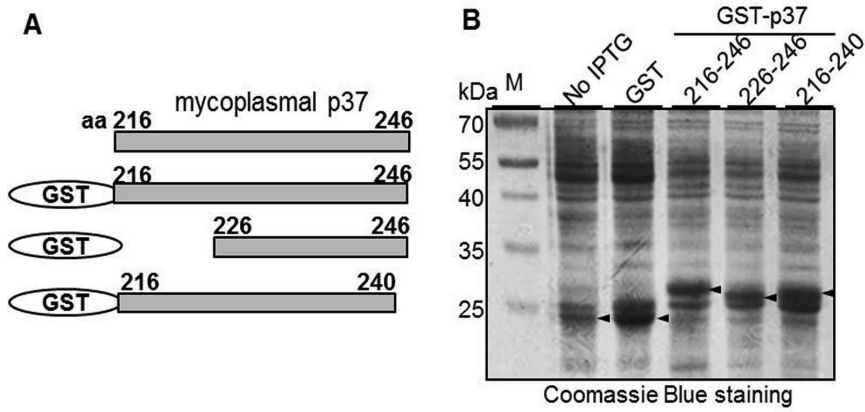
도면6



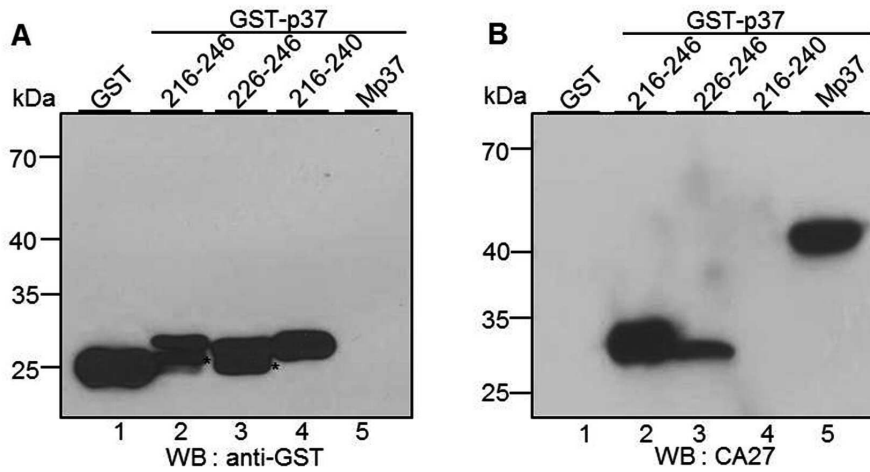
도면7



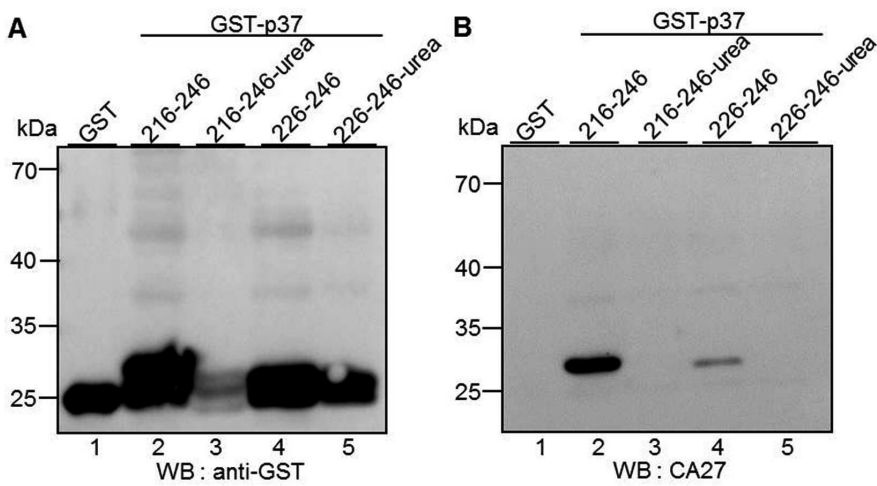
도면8



도면9

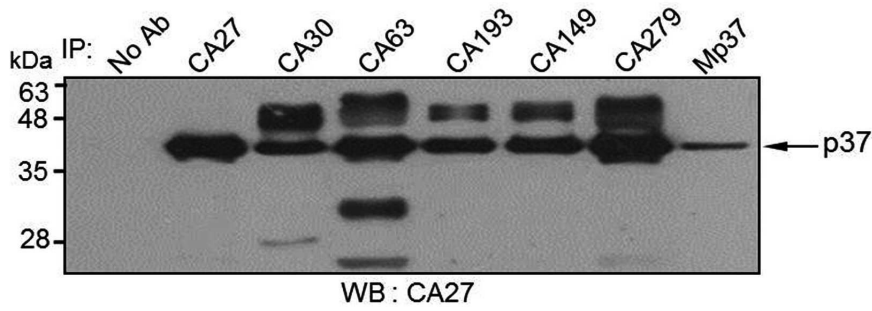


도면10

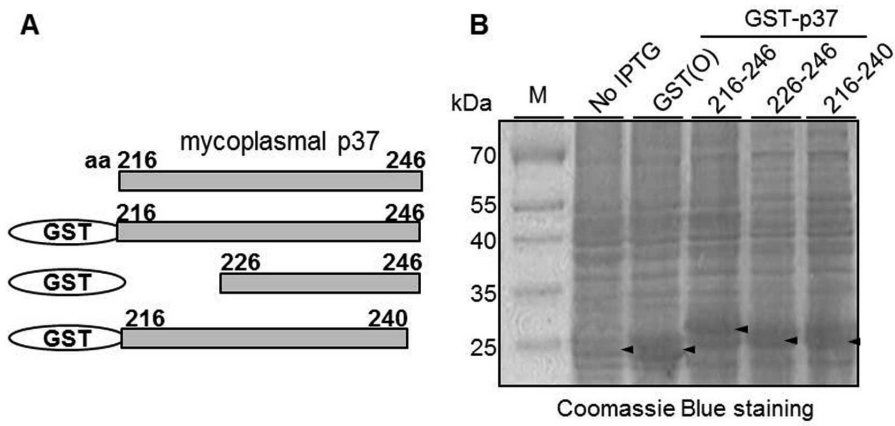




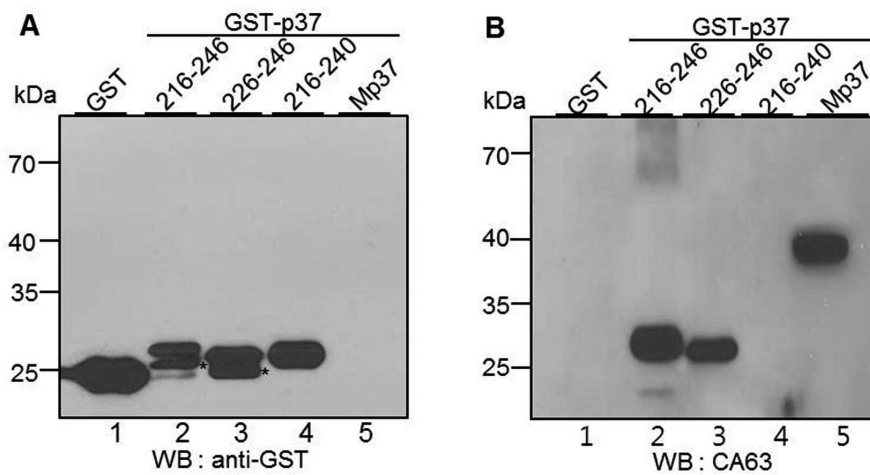
도면11



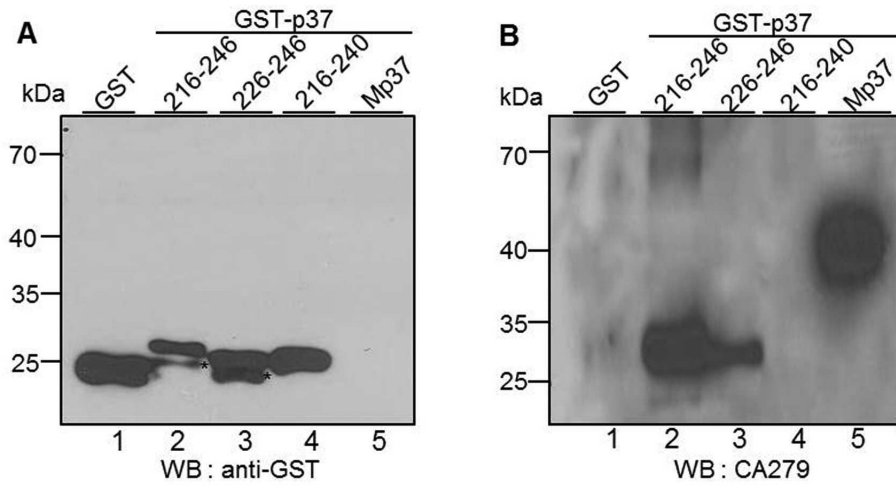
도면12



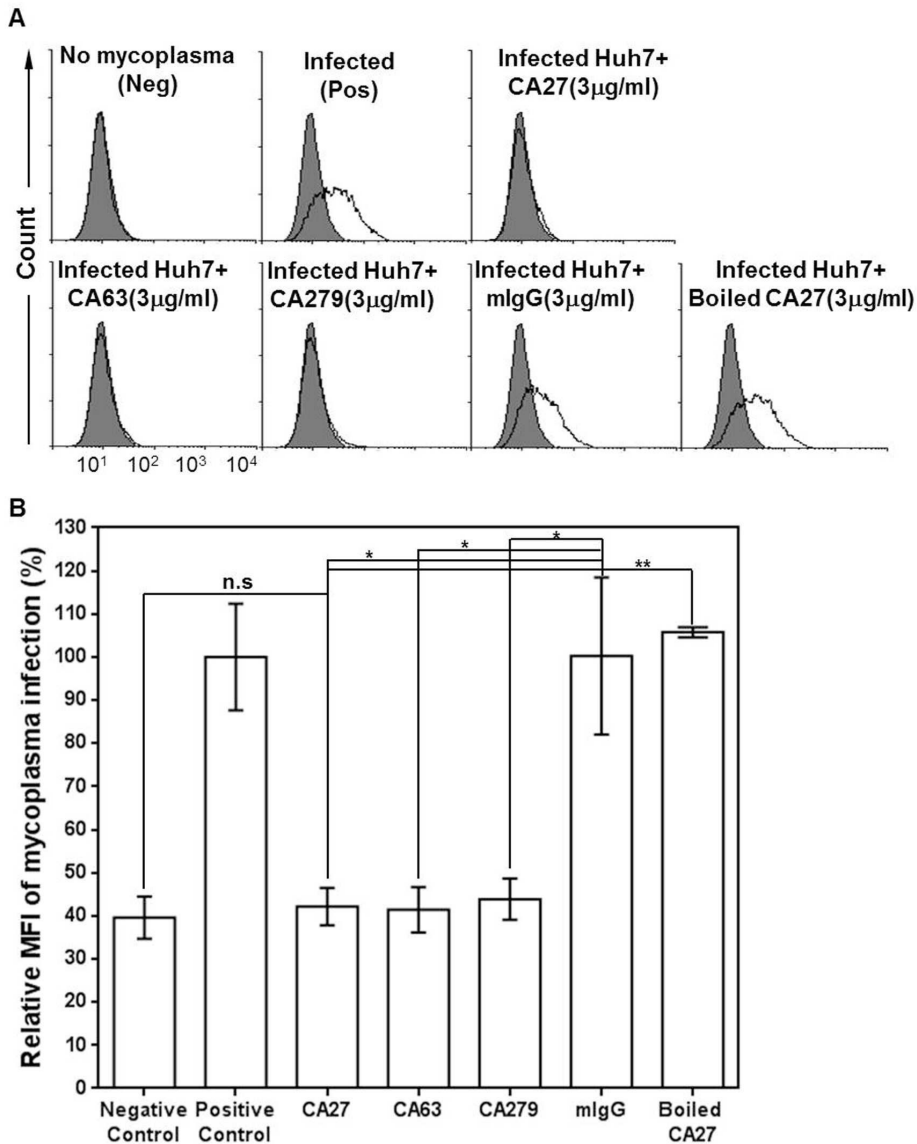
도면13



도면14



도면15



서열 목록

<110> Sejong Industry-Academy Cooperation Foundation  
 <120> Mycoplasma-neutralizing epitope and antibodies against the same  
 <130> P17U10C0624  
 <150> KR 10-2017-0016136  
 <151> 2017-02-06  
 <160> 17  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> mycoplasma-neutralizing epitope  
 <400> 1  
 Asp Glu Thr Leu Ala Lys Ile Lys Lys Ala Trp Asn Asp Lys Asp Trp  
 1 5 10 15  
 Asn Thr Phe Arg Asn  
 20  
 <210> 2  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CA63 HCDR1  
 <400> 2  
 Ser Phe Gly Met His  
 1 5  
 <210> 3  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CA63 HCDR2  
 <400> 3  
 Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Thr Asp Thr Met Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210>    4

<211>    11

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220><223

>    CA63 HCDR3

<400>    4

Asp Tyr Ser Gly Arg Asn Trp Phe Phe Asp Val

1                    5                    10

<210>    5

<211>    11

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220><223>    CA63 LCDR1

<400>    5

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1                    5                    10

<210>    6

<211>    7

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220><223>    CA63 LCDR2

<400>    6

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1                    5

<210>    7

<211>    9

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220><223>    CA63 LCDR3

<400>    7

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 8

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CA63 heavy chain

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Thr Asp Thr Met

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Ser Gly Arg Asn Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val

115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro

130

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CA63 light chain

<400> 9

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Leu Val Gly

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

Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
                   100                    105                    110

Pro Thr Val Ser

115  
<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CA279 HCDR1

<400> 10

Ser Phe Ala Met Ser

1                    5  
<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CA279 HCDR2

<400> 11

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly

1                    5                    10                    15

<210> 12



<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CA279 HCDR3  
 <400> 12  
 Ala Tyr Gly Gly Ser Asn Trp Phe Phe Asp Val  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CA279 LCDR1  
 <400> 13  
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn Val Val  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CA279 LCDR2

<400> 14  
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
 1 5  
 <210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CA279 LCDR3  
 <400> 15

Gln Gln Tyr Asn Gly Phe Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 16  
 <211> 132  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CA279 heavy chain

<400> 16

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Gly Ser Asn Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro  
 130

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CA279 light chain

<400> 17

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn  
 20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Leu Ser Pro Lys Ala Leu Ile

