



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월28일
(11) 등록번호 10-1832201
(24) 등록일자 2018년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/12 (2006.01) A61K 39/40 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7003839
(22) 출원일자(국제) 2010년07월15일
심사청구일자 2015년07월15일
(85) 번역문제출일자 2012년02월14일
(65) 공개번호 10-2012-0065326
(43) 공개일자 2012년06월20일
(86) 국제출원번호 PCT/NL2010/050456
(87) 국제공개번호 WO 2011/008092
국제공개일자 2011년01월20일
(30) 우선권주장
09165558.9 2009년07월15일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/225,878 2009년07월15일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02002072600 A2
W01996023896 A1
W02007141274 A2
W02009045434 A2

(73) 특허권자
에임 켈라퓨틱스 비.브이.
네덜란드, 엔엘-1105 비에이 암스테르담 주이두스트, 마이베르그드리프 59
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
뷰몬트, 텀
네덜란드 엔엘-1191 지엠 오우더케크 안데 암스텔호거 암스텔란 27
콕켄보스, 마크 예로엔
네덜란드 엔엘-1091 에스티 암스테르담 솔렌브루그페드 32
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 70 항

심사관 : 이수정

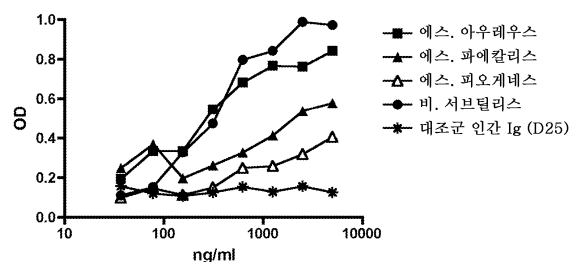
(54) 발명의 명칭 **그램-양성 박테리아 특이적 결합 화합물**

(57) 요약

본 발명은 그람-양성 박테리아에 특이적으로 결합할 수 있는 개선된 결합 화합물을 제공한다. 인간 개체에서 치료 용도로 사용될 수 있는, 완전 인간 화합물인 결합 화합물을 제공한다.

대표도 - 도2a

상이한 그람 양성 박테리아로부터의 LTA 제제의 rF1 인식



(72) 발명자

브라운, 에릭 제이.

미국 94123 캘리포니아 샌프란시스코 발레조 에스티 1921

모리사키, 존 히로시

미국 94114 캘리포니아 샌프란시스코 유닛 9 클레이튼 스트리트 1200

하젠보스, 보우터 엘.더블유.

미국 94127 캘리포니아 샌프란시스코 몰리모 드라이브 254

마리아타산, 산지브

미국 94030 캘리포니아 밀브래 엔시나 드라이브 1291

카지하라, 킴벌리

미국 94121 캘리포니아 샌프란시스코 33번 애비뉴 795

시아, 이

미국 95014 캘리포니아 쿠퍼티노 린덴브룩 엘렌 19911

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 중쇄 CDR1 서열 RFAMS (서열 1), 및

(b) 중쇄 CDR2 서열 SINNGNNPYARSVQY (서열 2) 또는 SINSGNNPYARSVQY (서열 60), 및

(c) 중쇄 CDR3 서열 DHPSSGWPTFDS (서열 3)

을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및

(d) 경쇄 CDR1 서열 RASENVGDWLA (서열 4), 및

(e) 경쇄 CDR2 서열 KTSILES (서열 5), 및

(f) 경쇄 CDR3 서열 QHYXRFPTY (서열 6; 여기서 X는 I 또는 M임)

을 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는, 스타필로코쿠스 (*Staphylococcus*) 종에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분으로,

여기서 스타필로코쿠스 종이 에스. 아우레우스 (*S. aureus*), 에스. 에피테르미디스 (*S. epidermidis*), 에스. 카프라에 (*S. caprae*), 에스. 사프로피티쿠스 (*S. saprophyticus*), 에스. 카피티스 (*S. capitis*), 또는 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA)인 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 2

제1항에 있어서, 경쇄 CDR3 서열이 QHYIRFPYT (서열 6)인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 3

제1항에 있어서, 경쇄 CDR3 서열이 QHYMRFPYT (서열 6)인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 4

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

(a) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열 38)에 적어도 90% 동일성을 갖는 프레임워크 1 (FW1),

(b) WVRQAPGRGLEWVA (서열 40)에 적어도 90% 동일성을 갖는 프레임워크 2 (FW2),

(c) RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK (서열 42)에 적어도 90% 동일성을 갖는 프레임워크 3 (FW3), 및

(d) WPGTLVTVSS (서열 44)에 적어도 90% 동일성을 갖는 프레임워크 4 (FW4)

를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 5

제4항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

(a) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열 38) 또는 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열 61)의 서열을 갖는 프레임워크 1 (FW1),

(b) WVRQAPGRGLEWVA (서열 40)의 서열을 갖는 프레임워크 2 (FW2),

(c) RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK (서열 42)의 서열을 갖는 프레임워크 3 (FW3), 및

(d) WPGTLVTVSS (서열 44)의 서열을 갖는 프레임워크 4 (FW4)

를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 6

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

서열

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNG
NNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTF
DSWGPGLTVTVSS (서열 7)

에 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 7

제6항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNG
NNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTF
DSWGPGLTVTVSS (서열 7)

의 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 8

제6항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINSGNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSS
GWPTFDSWGPGLTVTVSS

(서열 62)의 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 9

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

- (a) DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC (서열 48)에 적어도 90% 동일성을 갖는 프레임워크 1 (FW1),
- (b) WYRQKPGKAPNLLIY (서열 50)에 적어도 90% 동일성을 갖는 프레임워크 2 (FW2),
- (c) GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC (서열 52)에 적어도 90% 동일성을 갖는 프레임워크 3 (FW3), 및
- (d) FGQGTKLEIKRTV (서열 54)에 적어도 90% 동일성을 갖는 프레임워크 4 (FW4)

를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 10

제9항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

- (a) DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC (서열 48)의 서열을 갖는 프레임워크 1 (FW1),
- (b) WYRQKPGKAPNLLIY (서열 50)의 서열을 갖는 프레임워크 2 (FW2),
- (c) GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC (서열 52)의 서열을 갖는 프레임워크 3 (FW3), 및
- (d) FGQGTKLEIKRTV (서열 54)의 서열 또는 FGQGTKVEIKRTV (서열 59)의 서열을 갖는 프레임워크 4 (FW4)

를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 11

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

- (a) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열 38) 또는 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열 61)의 서열을 갖

는 프레임워크 1 (FW1),

(b) WVRQAPGRGLEWVA (서열 40)의 서열을 갖는 프레임워크 2 (FW2),

(c) RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK (서열 42)의 서열을 갖는 프레임워크 3 (FW3), 및

(d) WGPGLTVTVSS (서열 44)의 서열을 갖는 프레임워크 4 (FW4)

를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및

(e) DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC (서열 48)의 서열을 갖는 프레임워크 1 (FW1),

(f) WYRQKPGKAPNLLIY (서열 50)의 서열을 갖는 프레임워크 2 (FW2),

(g) GVPSPRFGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC (서열 52)의 서열을 갖는 프레임워크 3 (FW3), 및

(h) FGQGTKLEIKRTV (서열 54)의 서열 또는 FGQGTKVEIKRTV (서열 59)의 서열을 갖는 프레임워크 4 (FW4)

를 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 12

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

서열

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILE
SGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKVEIKRTV
(여기서, X 는 I 또는 M 임) (서열 11)

에 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 13

제12항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILE
SGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKVEIKRTV
(여기서, X 는 I 또는 M 임) (서열 11)

의 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 14

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

EVQLLESGLGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNG
NNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPFF
(a) DSWGPGTLTVTVSS (서열 7)

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILE
SGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKVEIKRTV
(b) (여기서, X 는 I 또는 M 임) (서열 11)

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 15

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINN
GNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGSGWPT
FDSWGPGLTVTVSS (서열 9)

(a)

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKLEIKRTV

(b) (여기서, X 는 I 또는 M 임) (서열 8)

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 16

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINN
GNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGSGWPT
FDSWGPGLTVTVSS (서열 9)

(a)

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKLEIKRA

(b) (여기서, X 는 I 또는 M 임) (서열 10)

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 17

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINN
GNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGSGWPT
FDSWGPGLTVTVSS (서열 9)

(a)

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKVEIKRTV

(b) (여기서, X 는 I 또는 M 임) (서열 11)

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 18

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNG
NNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGSGWPTF
DSWGPGLTVTVSS (서열 7)

(a)

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKLEIKRTV

(b) (여기서, X 는 I 또는 M 임) (서열 8)

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인
을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 19

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRL}SCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNG
NNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTF
(a) DSWGPGTLVTVSS (서열 7)

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및

DIQLTQSPSALPASVGD^{RV}SITCRASENVGDWLA^{WYRQKPGKAPNLLIYKTSILE}
SGVPSRFS^{SGSGTEFTLT}ISSLPDDFATYYCQHYXRF^{PYTFGQGTKLEIKRA}
(b) (여기서, X는 I 또는 M 임) (서열 10)

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인
을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 20

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이

(a)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINSGNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSS
GWPTFDSWGPGTLVTVSS (서열 62)의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및

(b)
DIQLTQSPSALPASVGD^{RV}SITCRASENVGDWLA^{WYRQKPGKAPNLLIYKTSILE}SGVPSRFS^{SGSGTEFTLT}ISSLPDDFATYYCQHYXRF^{PYTFGQGT}
KVEIKRTV (여기서, X는 I 또는 M 임) (서열 11)의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT^{SV}NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV^{PSS}SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK^{RVEPKS}
CDKTHTCP (서열 63)의 서열을 포함하는 중쇄 불변 도메인을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV^{VCL}LN^{FYP}REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS^{TYSL}SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP^{VT}KSFNRG
EC (서열 64)의 서열을 포함하는 경쇄 불변 도메인을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

(a)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT^{SV}NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV^{PSS}SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK^{RVEPKS}
CDKTHTCP (서열 63)의 서열을 포함하는 중쇄 불변 도메인, 및

(b)
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV^{VCL}LN^{FYP}REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS^{TYSL}SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP^{VT}KSFNRG
EC (서열 64)의 서열을 포함하는 경쇄 불변 도메인

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 24

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

(a)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS
CDKTHTCP (서열 63)의 서열을 포함하는 중쇄 불변 도메인, 및

(b)

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRG
EC (서열 65)의 서열을 포함하는 경쇄 불변 도메인

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 25

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

(a)

CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCP (서열 66)의 서열을 포함하는 중쇄 불변 도메인, 및

(b)

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRG
EC (서열 65)의 서열을 포함하는 경쇄 불변 도메인

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 26

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

(a)

CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCP (서열 66)의 서열을 포함하는 중쇄 불변 도메인, 및

(b)

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (서열 64)의 서열을 포함하는 경쇄 불변 도메인

으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 27

(a) 서열 55의 서열을 포함하는 중쇄 및

(b) 서열 57의 서열을 포함하는 경쇄

를 포함하는, 스태필로코쿠스 종에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분으로,

여기서 스태필로코쿠스 종이 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스, 에스. 카프라에, 에스. 사프로피티쿠스, 에스. 카피티스, 또는 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA)인 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 28

(a) 서열 56의 서열을 포함하는 중쇄 및

(b) 서열 58의 서열을 포함하는 경쇄

를 포함하는, 스태필로코쿠스 종에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분으로,

여기서 스태필로코쿠스 종이 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스, 에스. 카프라에, 에스. 사프로피티쿠스, 에스. 카피티스, 또는 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA)인 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 29

서열 55의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 57의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 스타필로코쿠스 종에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분으로,

여기서 중쇄의 위치 53에서의 아스파라긴이 세린으로 교체되고 아미노산 넘버링은 카바트 (Kabat) 넘버링에 따른 것이며,

스타필로코쿠스 종이 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스, 에스. 카프라에, 에스. 사프로피티쿠스, 에스. 카피티스, 또는 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA)인 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 30

서열 55의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 57의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 스타필로코쿠스 종에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분으로,

여기서 중쇄의 위치 53에서의 아스파라긴이 세린으로 교체되고 중쇄의 위치 114에서의 알라닌이 시스테인으로 교체되고 중쇄의 위치 222에서의 아르기닌이 리신으로 교체되고 아미노산 넘버링은 카바트 넘버링에 따른 것이며,

스타필로코쿠스 종이 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스, 에스. 카프라에, 에스. 사프로피티쿠스, 에스. 카피티스, 또는 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA)인 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 31

서열 57의 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 55의 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 스타필로코쿠스 종에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분으로,

여기서 경쇄 위치 205에서의 발린이 시스테인으로 교체되고 경쇄 위치 110에서의 알라닌이 발린으로 교체되고 경쇄 위치 104에서의 류신이 발린으로 교체되고 아미노산 넘버링은 카바트 넘버링에 따른 것이며,

스타필로코쿠스 종이 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스, 에스. 카프라에, 에스. 사프로피티쿠스, 에스. 카피티스, 또는 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA)인 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 32

제1항 내지 제20항 및 제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CDR이 결합 효능 또는 안정성을 개선하도록 최적화된 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 33

제1항 내지 제20항 및 제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 프레임워크 영역 내 하나 이상의 서열이 결합 효능 또는 안정성을 개선하도록 최적화된 하나 이상의 프레임워크 영역을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 34

제1항 내지 제20항 및 제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 프레임워크 영역 내 하나 이상의 서열이 면역원성을 최소화하도록 최적화된 하나 이상의 프레임워크 영역을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 35

제1항 내지 제20항 및 제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 항체인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 36

제1항 내지 제20항 및 제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이 재조합적으로 생산된 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 37

제1항 내지 제20항 및 제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이 세포독성제에 커플링된 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 38

제37항에 있어서, 세포독성제가 항생제인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 39

스타필로코쿠스 종에 의해 발현된 세린-아스파르테이트 (SD) 반복체 (SDR) 단백질 상의 SD 반복체-의존성 에피토프에 결합하는 항체 또는 그의 기능적 부분으로,

여기서 항체 또는 기능적 부분이 또 다른 모이어티에 커플링되어 항체-약물 접합체를 형성하고,

스타필로코쿠스 종이 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스, 에스. 카프라에, 에스. 사프로피티쿠스, 에스. 카피티스, 또는 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA)인 것인, 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 40

제39항에 있어서, 에피토프가 당 또는 당 잔기를 추가로 포함하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 41

제39항에 있어서, 상기 또 다른 모이어티가 세포독성제인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 42

제41항에 있어서, 세포독성제가 항생제인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 스태필로코쿠스 종이 에스. 아우레우스인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 44

제43항에 있어서, SDR 단백질이 ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD 및 SdrE로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 45

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 스태필로코쿠스 종이 에스. 에피테르미디스인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 46

제45항에 있어서, SDR 단백질이 SdrF, SdrG 및 SdrH로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 47

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 스태필로코쿠스 종이 에스. 카피티스인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 48

제47항에 있어서, SDR 단백질이 SdrX인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 49

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 스태필로코쿠스 종이 에스. 카프라에인 항체 또는 그의 기능적 부분.

분.

청구항 50

제49항에 있어서, SDR 단백질이 SdrY 및 SdrZ로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 51

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 기능적 부분이 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상으로부터의 세포벽 용해물에 결합하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 52

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, SDR 단백질이 스태필로코쿠스 종의 세포 표면에 위치하는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 53

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, SDR 단백질이 스태필로코쿠스 종의 펩티도글리칸 세포벽에 고정되는 것인 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 54

스타필로코쿠스 종에 결합하는데 있어서 제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분과 경쟁할 수 있는 항체 또는 그의 기능적 부분.

청구항 55

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 기능적 부분을 포함하는, 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 의해 감염된 것으로 진단된 개체에서 그람-양성 박테리아-관련 질병의 치료 또는 예방을 위한 의약 또는 예방제로서 사용하기 위한 조성물.

청구항 56

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체의 기능적 부분을 포함하는 조성물로, 여기서 항체의 기능적 부분은 단일 도메인 항체, 단일쇄 항체, 나노바디 (nanobody), 유니바디 (unibody), 단일쇄 가변 단편 (scFv), Fab 단편 및 F(ab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 의해 감염된 것으로 진단된 개체에서 그람-양성 박테리아-관련 질병의 치료 또는 예방을 위한 의약 또는 예방제로서 사용하기 위한 것인, 조성물.

청구항 57

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항체 또는 기능적 부분을 코딩하는 단리된, 합성 또는 재조합 핵산.

청구항 58

스타필로코쿠스 종에 의해 발현된 세린-아스파르트레이트 (SD) 반복체 (SDR) 단백질 상의 SD 반복체-의존성 에피토프에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 기능적 부분의 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 또는 경쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3을 코딩하는 단리된, 합성 또는 재조합 핵산이며, 여기서 핵산은 중쇄 CDR1 cgctttgccatgagc (서열 12), 중쇄 CDR2 서열 tcgatcaataatgggaataaccatactacgcacggctcggtacaatac (서열 13), 중쇄 CDR3 gatcacctagtagtggtggccacctttgactcc (서열 14), 경쇄 CDR1 cgggccagtgaaaacgttggtgactggttgccc (서열 15), 경쇄 CDR2 aagacatctattctagaaagt (서열 16) 및 경쇄 CDR3 서열 caacactatatacgtttcccgtaact (서열 17)로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 것인, 단리된, 합성 또는 재조합 핵산.

청구항 59

제57항에 따른 단리된, 합성 또는 재조합 핵산을 포함하는 생산자 세포.

청구항 60

제58항에 따른 단리된, 합성 또는 재조합 핵산을 포함하는 생산자 세포.

청구항 61

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 기능적 부분, 또는 제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항체 또는 기능적 부분을 코딩하는 단리된, 합성 또는 재조합 핵산을 포함하는, 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 의해 감염된 것으로 진단된 개체에서 그람-양성 박테리아-관련 질병의 치료 또는 예방을 위한 의약 또는 예방제로서 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 62

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 기능적 부분, 또는 제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항체 또는 기능적 부분을 코딩하는 단리된, 합성 또는 재조합 핵산을 포함하는, MRSA, 에스. 아우레우스, 및 에스. 에피테르미디스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 의해 감염된 것으로 진단된 개체에서 그람-양성 박테리아-관련 질병의 치료 또는 예방을 위한 의약 또는 예방제로서 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 63

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분, 또는 제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항체 또는 기능적 부분을 코딩하는 단리된, 합성 또는 재조합 핵산, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상에 의해 감염된 것으로 진단된 개체에서 그람-양성 박테리아-관련 질병의 치료 또는 예방을 위한 의약 또는 예방제로서 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 64

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 기능적 부분을 생산할 수 있는 단리된 또는 재조합 항체 생산자 세포.

청구항 65

세포에 제57항에 따른 핵산을 제공하고, 상기 세포가 상기 핵산을 번역하여 항체를 생산하도록 하는 것을 포함하는, 항체 또는 기능적 부분을 생산하는 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 기능적 부분을 수거, 정제 및 단리로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 67

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 기능적 부분, 또는 제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항체 또는 기능적 부분을 코딩하는 단리된, 합성 또는 재조합 핵산을 포함하는, 스타필로코쿠스 감염의 진단을 위한, 여기서 스타필로코쿠스 감염은 에스. 아우레우스 감염인 것인 제약 조성물.

청구항 68

제67항에 있어서, 에스. 아우레우스 감염이 MRSA 감염인 제약 조성물.

청구항 69

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 기능적 부분, 또는 제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항의 항체 또는 기능적 부분을 코딩하는 단리된, 합성 또는 재조합 핵산을 포함하는, 스타필로코쿠스 박테리아로 감염된 것으로 의심되는 개체 또는 임의의 다른 공급원으로부터 얻어진 샘플에서 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 검출하기 위한 제약 조성물.

청구항 70

제1항 내지 제20항, 제27항 내지 제31항 및 제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 기능적 부분을 사용하여 용액으로부터 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스 박테리아로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 단리하는 방법.

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물학, 면역학 및 의학 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 그람-양성 미생물은 대다수의 전신 감염을 일으킨다. 이들 그람-양성 병원체 중 하나의 중요한 구성원은 스타필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) (에스. 아우레우스 (*S. aureus*))이다. 인구 집단의 약 20%가 에스. 아우레우스의 장기 보균자이다. 에스. 아우레우스는 약한 피부 감염, 예를 들어 여드름, 농가진 (또한 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*))에 의해 유발될 수 있다), 종기, 연조직염, 모낭염, 부스

럼, 큰 종기 (carbuncle), 열상 피부 증후군 및 농양으로부터 생명을 위협하는 질병, 예를 들어 폐렴, 수막염, 골수염, 심내막염, 독성 쇼크 증후군 (TSS) 및 패혈증에 이르는 다양한 병을 일으킬 수 있다. 에스. 아우레우스는 모든 종류의 장기 및 조직을 감염시킬 수 있다. 에스. 아우레우스 감염은 면역이 손상된 사람뿐만 아니라 면역 능력이 있는 사람에서도 발생한다. 미국 중환자실의 감염의 약 50%는 상기 병원체에 의해 발생한다. 해마다 300,000건의 에스. 아우레우스 감염으로 12,000명이 사망한다고 미국에서 보고되고 있다 (또한, 문헌 [Moran et al., NEMJ 355, 666-674 (2006)] 참조).

[0003] 주요 문제는 에스. 아우레우스의 항생제 내성의 증가이다. 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA)는 1960년대에 나타났다. 처음에는 보건 의료 환경 (health care setting)에서 확인되었다. 그러나, MRSA는 입원하지 않은 공동체 내의 사람에 존재하는 것으로 보인다. MRSA의 치료는 항생제에 대한 MRSA의 제한된 감수성 때문에 어렵고 비용이 많이 소요된다. 그러나, 항생제의 매우 적은 수의 대체제가 이용가능하다. 반코마이신이 페니실린-내성 MRSA를 치료하기 위해 종종 사용된다. 미국 특허 6,939,543에서는 에스. 아우레우스에 결합할 수 있는 지질타이코산 (LTA)에 대한 쥐 항체를 설명하고 있다. 상기 쥐 항체를 기초로 하여, 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인을 함유하는 재조합 키메라 마우스/인간 항체가 생산되었다. 그러나, 상기 키메라 마우스/인간 항체는 인간에게 투여될 때 심각한 부작용이 발생할 위험을 수반하는 쥐 서열이 존재한다는 단점을 갖는다.

발명의 내용

[0004] 본 발명의 목적은 그람-양성 박테리아-관련 질병의 대처 및/또는 예방을 위한 수단 및 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 추가의 목적은 다양한 그람-양성 박테리아, 바람직하게는 스태필로코쿠스 종, 보다 바람직하게는 MRSA에 대항하는 대체물 및/또는 개선된 결합 화합물을 제공하는 것이다. 본 발명의 추가의 목적은 다양한 그람-양성 박테리아, 바람직하게는 스태필로코쿠스 종, 보다 바람직하게는 MRSA에 대항하는 인간 결합 화합물을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명은 그의 천연 배경에서 스태필로코쿠스 종에 특이적으로 결합할 수 있는 항체, 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물을 제공한다. 따라서, 이들은 스태필로코쿠스 종의 존재에 관련된 질환의 대처 및/또는 예방 및/또는 진단에 유용하다. 바람직하게는, 에스. 아우레우스가 대처된다. 특히 바람직한 실시양태에서, MRSA가 대처된다. 대처되는 또 다른 바람직한 스태필로코쿠스 종은 스태필로코쿠스 에피데르미디스 (*Staphylococcus epidermidis*)이다.

[0006] 스태필로코쿠스 에피데르미디스는 대체로 비-병원성이지만, 면역 시스템이 손상된 환자는 종종 감염이 발생할 위험이 있다. 감염은 병원과 지역사회 모두에서 발생할 수 있지만, 병원 환자에게 더 큰 위협이 되고 있다. 에스. 에피데르미디스 (*S. epidermidis*) 감염에 가장 취약한 대상은 정맥내 약물 사용자, 신생아, 노인 및 카테테르 또는 다른 인공 기구 사용자이다. 감염은 혈관내 장치 (인공 심장 판막, 셉트 (shunt) 등)와 연관되지만, 통상적으로 인공 관절, 카테테르 및 큰 상처에서도 발생한다. 증상은 발열, 두통, 피로, 식욕 감소 및 호흡곤란을 포함한다.

[0007] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 스태필로코쿠스 종에 특이적으로 결합할 수 있는 단리된 또는 재조합 인간 항체, 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물을 제공한다. 본 발명에 따른 인간 항체 및 기능적 부분은 그의 천연 배경에서 스태필로코쿠스 종에 결합하여, 상기 항체, 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물의 투여시에 다양한 스태필로코쿠스 종이 대처될 수 있다. 상기 인간 항체, 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물은 따라서 상기 스태필로코쿠스 종에 의한 감염의 치료 또는 예방에 특히 적합하다. 본 발명에 따른 상기 인간 항체, 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물은 비-인간 서열이 존재하지 않기 때문에 키메라 항체에 비해 인간 개체에 대한 치료 및/또는 예방 용도에 보다 적합하다. 이것은 유해한 부작용 위험을 유의하게 감소시킨다.

[0008] 본 발명에 따른 하나의 특히 바람직한 항체는 항체 "F1"로 지정된 항체로서, 도 1에 도시된 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열을 갖는다. 본원에서 사용되는 용어 "F1"은 모든 F1 항체, 예를 들어 단리된 또는 재조합 방식으로 생산된 F1을 포함한다. 재조합 방식으로 생산된 F1은 본원에서 또한 "rF1"로 칭한다. 특히 F1의 항원-결합 특성에 기여하는 F1의 CDR 서열도 도 1에 도시된다. 항체 F1은 완전 인간이고, 스태필로코쿠스 종, 예를 들어 에스. 아우레우스 및 에스. 에피데르미디스에 특이적으로 결합할 수 있고, 따라서 인간 개체에 대한 치료 용도에 바람직하다.

[0009] 중요한 사실은, 항체 F1이 시험관 내에서뿐만 아니라 생체 내에서도 전체 박테리아에 결합할 수 있다는 점이다. 따라서, 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피데르미디스에 특이적으로 결합할 수 있는 단리된 또는 재조합 인

간 항체 또는 그의 기능적 부분이 또한 제공된다. 또한, 항체 F1은 예를 들어 동물의 감염된 조직에서 성장한 박테리아에 결합할 수 있다. 따라서, 생체 내에서 성장한 에스. 아우레우스에 결합하는 단리된 항체가 제공되고, 여기서 "생체 내에서 성장한"은 에스. 아우레우스 감염 동안 동물의 감염된 조직에서 성장하는 것으로서 규정된다. 또한, 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스에 특이적인 인간 면역글로불린 가변 영역의 적어도 하나의 CDR 서열을 포함하는 단리된, 재조합 또는 합성 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물이 제공된다.

[0010] 항체의 기능적 부분은 반드시 양은 아니지만 종류에서 그 항체와 적어도 하나의 공유된 특성을 갖는 부분으로서 규정된다. 상기 기능적 부분은 반드시 동일한 정도는 아니지만, 상기 항체와 동일한 항원에 결합할 수 있다. 항체의 기능적 부분은 바람직하게는 단일 도메인 항체, 단일쇄 항체, 나노바디 (nanobody), 유니바디 (unibody), 단일쇄 가변 단편 (scFv), Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편을 포함한다.

[0011] 또한, 항체의 기능적 부분은 생성되는 화합물의 적어도 하나의 특성, 바람직하게는 항원-결합 특성이 반드시 양은 아니지만 종류에서 본질적으로 동일하도록 항체를 변경함으로써 생산된다. 이것은 많은 방식으로, 예를 들어 보존적 아미노산 치환 (전체 기능이 심각한 영향을 받지 않도록 아미노산 잔기가 일반적으로 유사한 특성 (크기, 소수성 등)을 갖는 또 다른 잔기로 교체됨)을 통해 수행된다.

[0012] 당업자에게 잘 알려져 있는 바와 같이, 항체의 중쇄는 면역글로불린 분자를 구성하는 2 종류의 사슬 중 더 큰 사슬이다. 중쇄는 불변 도메인 및 가변 도메인을 포함하고, 가변 도메인은 항원 결합에 관여한다. 항체의 경쇄는 면역글로불린 분자를 구성하는 2 종류의 사슬 중 더 작은 사슬이다. 경쇄는 불변 도메인 및 가변 도메인을 포함한다. 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 함께 항원 결합에 관여한다.

[0013] 상보성-결정 영역 (CDR)은 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인에 존재하는 초가변 영역이다. 항체의 중쇄 및 연결된 경쇄의 CDR은 함께 항원-결합 부위를 형성한다.

[0014] 면역글로불린 사슬의 기능적 동등물은 본원에서 면역글로불린 사슬의 적어도 하나의 CDR 서열을 포함하는 인공 결합 화합물로서 규정된다.

[0015] 본 발명이 도 1에 도시된 CDR 서열이 목적하는 결합 특성을 제공한다는 식견을 제공하기 때문에, 당업자는 적어도 하나의 변경된 CDR 서열을 포함하는 변이체를 잘 생성할 수 있다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환이 적용된다. 또한, F1에 비해 적어도 하나의 변경된 특성을 갖는 변이체 항체, 또는 그의 기능적 부분을 생성하기 위해 도 1에 도시된 적어도 하나의 CDR 서열을 변경할 수 있다. 바람직하게는, F1의 유리한 결합 특징이 적어도 부분적으로 유지되거나 또는 심지어 개선되도록 도 1에 도시된 CDR 서열에 적어도 70% 동일한 CDR 서열을 포함하는 항체 또는 기능적 부분이 제공된다. 도 1에 도시된 CDR 서열은 바람직하게는 생성되는 항체 또는 기능적 부분이 F1에 비해 적어도 하나의 개선된 특성, 예를 들어 개선된 결합 친화도, 선택성 및/또는 안정성을 포함하도록 변경된다. 따라서, 도 1에 도시된 CDR 서열에 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 변이체 항체 또는 그의 기능적 부분도 본 발명의 범위에 포함된다. 아미노산 서열을 변경하기 위한 다양한 방법이 이용가능하다. 예를 들어, 목적하는 CDR 서열을 갖는 중쇄 또는 경쇄 서열은 인공적으로 합성된다. 바람직하게는, CDR 서열을 코딩하는 핵산 서열은 예를 들어 무작위 또는 부위 지정 돌연변이 유발을 사용하여 돌연변이된다.

[0016] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 따라서 다음을 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물을 제공한다:

[0017] - 서열 RFAMS (서열 1) 에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 서열, 및/또는

[0018] - 서열 SINNGNNPPYARSVQY (서열 2) 에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 서열, 및/또는

[0019] - 서열 DHPSSGWPTFDS (서열 3) 에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 서열.

[0020] 또한, 다음을 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물이 제공된다:

[0021] - 서열 RASENVGDWLA (서열 4) 에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 서열, 및/또는

[0022] - 서열 KTSILES (서열 5) 에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 서열, 및/또는

[0023] - 서열 QHYXRFPTYT (여기서 X는 I 또는 M임) (서열 6) 에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 서

열.

- [0024] 상기 언급된 CDR 서열은 항체 F1의 CDR 서열; VH IgHV3-23 및 VL IgKV1-5, 및 그의 변이체이다. F1 CDR에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 CDR 서열을 포함하는 결합 화합물이 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스에 의한 감염(의 효과)의 대처 및/또는 예방에 특히 적합하다. 경쇄의 경쇄 CDR3의 이소류신이 메티오닌으로 변경된, VH IgHV3-23 및 VL IgKV1-5를 포함하는 F1의 변이체가 여전히 스태필로코쿠스 종, 예를 들어 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스에 특이적으로 결합할 수 있음이 밝혀졌다.
- [0025] 바람직하게는, 본 발명에 따른 결합 화합물은 도 1에 도시된 적어도 하나의 CDR 서열에 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 86%, 보다 바람직하게는 적어도 87%, 보다 바람직하게는 적어도 88%, 보다 바람직하게는 적어도 89%, 보다 바람직하게는 적어도 90% 동일한 CDR 서열을 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 따른 결합 화합물은 도 1에 도시된 적어도 하나의 CDR 서열에 적어도 91%, 보다 바람직하게는 적어도 92%, 보다 바람직하게는 적어도 93%, 보다 바람직하게는 적어도 94%, 보다 바람직하게는 적어도 95% 동일한 CDR 서열을 포함한다. 상기한 특히 바람직한 항체 F1은 도 1에 도시된 CDR 서열로 구성되는 CDR 서열을 포함한다. 따라서, 본 발명에 따른 특히 바람직한 실시양태는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스에 특이적으로 결합할 수 있고 다음을 포함하는 단리된, 합성 또는 재조합 항체 또는 그의 기능적 동등물을 제공한다:
- [0026] - 서열 RFAMS (서열 1) 을 포함하는 중쇄 CDR1 서열, 및/또는
- [0027] - 서열 SINNGNNPPYARSVQY (서열 2) 를 포함하는 중쇄 CDR2 서열, 및/또는
- [0028] - 서열 DHPSSGWPTFDS (서열 3) 을 포함하는 중쇄 CDR3 서열, 및/또는
- [0029] - 서열 RASENVGDWLA (서열 4) 를 포함하는 경쇄 CDR1 서열, 및/또는
- [0030] - 서열 KTSILES (서열 5) 를 포함하는 경쇄 CDR2 서열, 및/또는
- [0031] - 서열 QHYXRFPYT (여기서, X는 I 또는 M임) (서열 6) 을 포함하는 경쇄 CDR3 서열.
- [0032] 한 실시양태에서, 도 1에 도시된 중쇄 CDR1 및 CDR2 서열 및 경쇄 CDR1 및 CDR2 서열, 또는 이 서열에 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 81%, 보다 바람직하게는 적어도 82%, 보다 바람직하게는 적어도 83%, 보다 바람직하게는 적어도 84%, 보다 바람직하게는 적어도 85% 동일한 서열을 포함하는 결합 화합물이 제공된다. 따라서, 서열 RFAMS (서열 1)에 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 서열 및 서열 SINNGNNPPYARSVQY (서열 2)에 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 서열 및 서열 RASENVGDWLA (서열 4)에 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 서열 및 서열 KTSILES (서열 5)에 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 서열을 포함하는, 단리된, 합성 또는 재조합 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물이 제공된다. 상기 결합 화합물은 바람직하게는 상기 언급된 중쇄 CDR 서열 및 경쇄 CDR 서열에 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 86%, 보다 바람직하게는 적어도 87%, 보다 바람직하게는 적어도 88%, 보다 바람직하게는 적어도 89%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 91%, 보다 바람직하게는 적어도 92%, 보다 바람직하게는 적어도 93%, 보다 바람직하게는 적어도 94%, 가장 바람직하게는 적어도 95% 동일한 CDR 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 결합 화합물은 또한 서열 DHPSSGWPTFDS (서열 3)에 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 서열, 및/또는 서열 QHYXRFPYT (여기서, X는 I 또는 M임) (서열 6)에 적어도 70% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 서열을 포함한다. 상기 언급된 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 및 상기 언급된 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 결합 화합물도 제공된다.
- [0033] 스태필로코쿠스 종에 특이적으로 결합할 수 있는 인간 항체가 본 발명에서 제공되기 때문에, 스태필로코쿠스 종에 특이적인 인간 면역글로불린 가변 도메인의 적어도 하나의 CDR 서열을 포함하는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물을 생산하는 것이 가능해졌다. 또한, 스태필로코쿠스 종에 특이적인 인간 면역글로불린 가변 영역의 적어도 하나의 CDR 서열을 포함하는 단리된 재조합 또는 합성 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물이 제공된다. 바람직한 실시양태에서, 인간 항체가 제공된다. 임의로, 적어도 하나의 프레임워크 영역 내의

상기 적어도 하나의 인간 CDR 서열 또는 적어도 하나의 서열은 바람직하게는 결합 효능 또는 안정성을 개선하기 위해 최적화된다. 이것은 예를 들어 돌연변이 유발 실험에 의해 수행되고, 이후에 생성되는 화합물의 안정성 및/또는 결합 효능이 바람직하게 시험되고, 개선된 결합 화합물이 선택된다.

[0034] 결합 효능 또는 안정성을 개선하기 위한 CDR 서열의 최적화 이외에, 적어도 하나의 프레임워크 영역 내의 적어도 하나의 서열을 최적화하는 것이 종종 유리하다. 이것은 바람직하게는 결합 효능 또는 안정성을 개선하기 위해 수행된다. 프레임워크 서열은 예를 들어 상기 프레임워크 서열을 코딩하는 핵산 분자의 돌연변이에 의해 최적화되고, 이후에 생성되는 항체 또는 기능적 부분의 특성이 바람직하게 시험된다. 상기 방식으로, 개선된 항체 또는 기능적 부분을 얻는 것이 가능하다. 바람직한 실시양태에서, 인간 생식계열 (germline) 서열이 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물 내의 프레임워크 영역에 사용된다. 생식계열 서열의 사용은 바람직하게는 상기 항체, 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물 또는 부분의 면역원성 위험을 최소화하고, 그 이유는 이들 서열이, 그로부터 프레임워크 영역이 유래되는 개체에 특유하고 또 다른 인간 개체에게 적용될 경우에는 면역원 반응을 유발할 수 있는 체세포 변형을 함유할 가능성이 작기 때문이다.

[0035] 도 1에 도시된 중쇄 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물이 또한 제공된다. 그러한 중쇄 서열은 항체 F1에 의해 명시되는 목적하는 결합 특성을 제공한다. 또한, 도 1에 도시된 경쇄 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 경쇄 아미노산 서열, 및 CDR3 내의 이소류신이 메티오닌으로 변경된 경쇄 서열도 항체 F1 및 상기 변형을 포함하는 항체 F1의 변이체에 의해 명시되는 목적하는 결합 특성을 제공한다. 따라서,

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN
NPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPFTFDS
WGPGTLVTVSS (서열 7)
```

[0036] 에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 서열 및/또는 서열

```
DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGGTKLEIKRTV
(여기서, X는 I 또는 M임) (서열 8)
```

[0038] 에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 경쇄 서열

[0039] 을 갖는, 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물이 또한 제공된다.

[0040] 경쇄 CDR3 내의 이소류신이 메티오닌으로 변경된 상기 본원에서 나타난 변이체 이외에 F1 항체의 몇몇의 변이체가 개발되었다. 상기 변이체는 스타필로코쿠스 종에 결합할 수 있다. 그러한 항체 변이체의 예는 서열

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN
NPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPFTFDS
WGPGTLVTVSS (서열 9)
```

[0042] 및/또는 서열

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN
NPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPFTFDS
WGPGTLVTVSS (서열 7)
```

[0044] 을 포함하는 중쇄 서열, 및

[0045] 서열

```
DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGGTKLEIKRA
(여기서, X는 I 또는 M임) (서열 10)
```

[0047]

- [0048] 및/또는 서열
- DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKVEIKRTV
(여기서, X는 I 또는 M임) (서열 11)
- [0049]
- [0050] 및/또는 서열
- DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKVEIKRTV
(여기서, X는 I 또는 M임) (서열 8)
- [0051]
- [0052] 을 포함하는 경쇄 서열
- [0053] 을 갖는, 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물을 포함한다.
- [0054] 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물은 세린-아스파르트레이트 (SD) 반복체를 포함하는 단백질에 특이적으로 결합한다. SD 반복체 (Sdr) 단백질은 몇몇 박테리아, 예를 들어 스태필로코쿠스 종에 존재하는 세포 표면 결합 단백질이다. Sdr 단백질은 일반적으로 아미노-말단 신호 서열, A 영역으로 불리는 기능성 도메인, SD 반복체 영역, 세포벽-스패닝 (spanning) 영역, LPXTG 모티프, 소수성 막-스패닝 도메인, 및 일련의 양전하를 띤 잔기를 포함한다. LPXTG 모티프는 트레오닌과 글리신 잔기 사이의 모티프를 절단하는 트랜스펩티다제의 표적이고 단백질을 그람-양성 박테리아의 세포벽의 펩티도글리칸에 고정한다. Sdr 단백질은 숙주 분자와 상호작용하는 것으로 생각된다. 공지의 Sdr 단백질은 에스. 아우레우스의 ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD 및 SdrE, 에스. 에피테르미디스의 SdrF, SdrG 및 SdrH, 에스. 사프로피티쿠스 (*S. saprophyticus*)의 SdrI, 에스. 카피티스 (*S. capitis*)의 SdrX, 및 에스. 카프라에 (*S. caprae*)의 SdrY 및 SdrZ를 포함한다.
- [0055] 따라서, 본 발명에 따른 바람직한 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물은 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스, 에스. 사프로피티쿠스, 에스. 카피티스, 및 에스. 카프라에에 특이적으로 결합한다. 상기 항체, 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 부분은 에스. 아우레우스의 ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD 및 SdrE, 에스. 에피테르미디스의 SdrF, SdrG 및 SdrH, 에스. 사프로피티쿠스의 SdrI, 에스. 카피티스의 SdrX, 및 에스. 카프라에의 SdrY 및 SdrZ에 결합하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 항체, 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 부분의 에피토프는 Sdr 단백질 내의 SD 반복체-의존성 에피토프, 예를 들어 에스. 아우레우스 ClfA, ClfB, SdrC, SdrD 및 SdrE에 존재하는 SD 반복체-의존성 에피토프를 포함한다. SD 반복체-의존성 에피토프는 본원에서 에스. 아우레우스 ClfA, ClfB, SdrC, SdrD 및 SdrE 및 에스. 에피테르미디스 SdrF, SdrG 및 SdrH (이로 제한되지 않음)에 존재하는 SD 반복체 영역의 적어도 일부의 존재를 필요로 하는, 항체 F1에 의해 인식되는 에피토프로서 규정된다. 한 실시양태에서, 상기 에피토프는 Sdr 단백질에 결합하거나 이 단백질과 회합하는 분자의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 상기 분자의 예는 아미노산, 펩티드, 단백질, 당 및 당 잔기를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 에피토프는 SD 반복체 영역의 변형을 포함한다. 상기 변형은 예를 들어 글리코실화, 아미드화 및/또는 인산화를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 이들 두 실시양태의 조합도 가능함은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0056] 따라서, 본 발명은 SD 반복체-의존성 에피토프에 결합할 수 있는 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물을 제공한다. 또한, 에스. 아우레우스 ClfA, ClfB, SdrC, SdrD 및 SdrE에 결합할 수 있는 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물이 제공된다. 또한, 스태필로코쿠스 종, 바람직하게는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스 및/또는 에스. 사프로피티쿠스 및/또는 에스. 카피티스 및/또는 에스. 카프라에, 보다 바람직하게는 MRSA에 결합하기 위해 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물과 경쟁할 수 있는 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물이 제공된다.
- [0057] 항체의 단점은 그의 안정성이 예를 들어 가혹한 조건 하에서 저하될 수 있다는 것이다. 예를 들어, 관능성 아미드기의 제거인 탈아미드화가 발생할 수 있다. 탈아미드화는 단백질의 생물학적 기능에 영향을 줄 수 있고, 주로 아스파라긴 잔기에서, 및 보다 낮은 정도로 글루타민 잔기에서 발생하는 단백질 분해 경로이다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물의 탈아미드화는 아스파라긴 또는 글루타민을 또 다른 아미노산으로 교체함으로써 억제된다. 아스파라긴은 바람직하게는 글루타민 이외의 다른 아미노산으로 교체되고, 그 이유는 탈아미드화가 글루타민 잔기에서도 발생

할 수 있기 때문이다. 아스파라긴의 교체는 바람직하게는 본 발명에 따른 항체의 항원에 대한 결합 친화도에 실질적으로 영향을 주지 않는다. 한 실시양태에서, 중쇄의 위치 53 (카바트 (Kabat, 1991)에 따른 넘버링 (numbering))에서의 아스파라긴의 탈아미드화는 상기 아스파라긴을 또 다른 아미노산으로 교체함으로써 억제된다. 위치 53에서 아스파라긴의 탈아미드화를 억제함으로써 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물의 안정성은 바람직하게는 증가한다. 실시예에서 제시되는 바와 같이, 상기 아스파라긴이 CDR에 위치한다는 사실에도 불구하고, 상기 위치에서 아스파라긴의 교체는 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물의 항원에 대한 결합 친화도에 실질적으로 영향을 주지 않는다. 중쇄의 위치 53의 아스파라긴은 바람직하게는 글루타민 이외의 다른 아미노산으로 교체되고, 보다 바람직하게는 상기 위치의 아스파라긴은 세린으로 교체된다. 따라서, 본 발명에서 또한 아스파라긴, 바람직하게는 중쇄의 위치 53의 아스파라긴이 또 다른 아미노산, 바람직하게는 세린으로 교체된, 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물이 제공된다.

[0058] 하나의 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물은 항체-약물 접합체를 형성하기 위해 또 다른 모이어티에 연결된다. 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물은 예를 들어 세포독성제, 예를 들어 항생제에 연결된다. 본원에서 사용되는 용어 "세포독성제"는 박테리아의 기능, 또는 성장을 저하시키거나 차단하고/하거나 박테리아의 파괴를 유발하는 물질을 나타낸다. 상기 다른 모이어티, 예를 들어 세포독성제는 바람직하게는 티올기를 통해 상기 항체 또는 그의 기능적 부분에 연결된다. 따라서, 바람직하게는 하나 이상의 시스테인이 상기 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 내로 통합된다. 시스테인은 티올기를 함유하고, 따라서, 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 내로의 하나 이상의 시스테인의 통합 또는 하나 이상의 시스테인에 의한 하나 이상의 아미노산의 교체에 의해 항체가 또 다른 모이어티에 연결될 수 있다. 상기 하나 이상의 시스테인은 바람직하게는 상기 항체 또는 기능적 동등물의 폴딩 (folding)에 영향을 주지 않고 항원 결합 또는 효과기 기능을 변경하지 않는 위치에서 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 동등물 내로 도입된다. 따라서, 본 발명은 시스테인 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산이 시스테인으로 교체된, 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물을 제공한다. 바람직하게는, 시스테인 이외의 다른 적어도 2개의 아미노산이 시스테인으로 교체된다. 바람직한 실시양태에서, 상기 시스테인 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산은 경쇄 위치 15의 발린, 및/또는 경쇄 위치 144의 알라닌, 및/또는 경쇄 위치 168의 세린, 및/또는 경쇄 위치 205의 발린 및/또는 경쇄 위치 110의 발린, 및/또는 중쇄 위치 84의 알라닌, 및/또는 중쇄 위치 114의 알라닌, 및/또는 중쇄 위치 168의 알라닌, 및/또는 중쇄 위치 172의 세린, 보다 바람직하게는 경쇄 위치 205의 발린 및/또는 경쇄 위치 110의 발린, 및/또는 중쇄 위치 114의 알라닌이다 (카바트 (Kabat, 1991)에 따른 넘버링). 당업자는 대안으로서 또는 추가로, 교체가 상기 항체 또는 기능적 동등물의 폴딩에 영향을 주지 않고, 항원 결합 또는 효과기 기능을 변경하지 않는다면, 중쇄 및/또는 경쇄의 하나 이상의 다른 아미노산이 시스테인으로 교체될 수 있음을 이해할 것이다.

[0059] 국제 특허 출원 W02006/034488, W02008/141044, W02009/052249, W02009/012256, W02009/012268 및 W02009/099728에, 항체를 반응성 시스테인 잔기로 조작하는 방법 및 시스테인 조작을 위해 적합한 아미노산 위치가 기재되어 있다.

[0060] 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물은 바람직하게는 도 1에 도시된 중쇄 서열 및/또는 경쇄 서열, 또는 CDR3 내의 이소류신이 메티오닌으로 변경된 도 1에 도시된 경쇄 서열에 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95% 동일한 가변 중쇄 서열 및/또는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 동일성이 높을수록 상기 결합 화합물이 보다 근접하게 항체 F1과 유사하다. 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물은 바람직하게는 F1의 중쇄 및 경쇄와 유사한 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 따라서, 도 1에 도시된 중쇄 서열 및 경쇄 서열, 또는 CDR3 내의 이소류신이 메티오닌으로 변경된 도 1에 도시된 경쇄 서열에 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95% 동일한 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물이 또한 제공된다. 한 실시양태에서, 도 1에 도시된 중쇄 서열 및 도 1에 도시된 경쇄 서열 또는 CDR3 내의 이소류신이 메티오닌으로 변경된 도 1에 도시된 경쇄 서열을 갖는 항체 또는 기능적 부분이 제공된다.

[0061] 한 실시양태는 도 1에 도시된 중쇄 서열로 구성된 중쇄 서열, 및/또는 도 1에 도시된 경쇄 서열로 구성된 경쇄 서열 또는 CDR3 내의 이소류신이 메티오닌으로 변경된 도 1에 도시된 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 그의 기

능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물을 제공한다. 별법으로, 당업자가 잘 알고 있는 바와 같이, 관심 있는 결합 특성을 유지하면서 단축된 중쇄 또는 경쇄 서열을 생성하는 것이 가능하다. 바람직하게는, 본래의 중쇄 또는 경쇄에 비해 보다 짧은 불변 영역을 갖는 상기 단축된 중쇄 또는 경쇄가 생성된다. 가변 도메인은 바람직하게는 유지된다. 예를 들어, 도 1에 도시된 중쇄 서열 또는 경쇄 서열을 기초로 한 Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편 또는 단일 도메인 항체 또는 단일쇄 항체 또는 나노바디 또는 유니바디 또는 scFv 단편이 생산된다. 따라서, 도 1에 도시된 서열, 또는 CDR3 내의 이소류신이 메티오닌으로 변경된 도 1에 도시된 경쇄 서열의 적어도 기능적 부분을 포함하는 항체의 기능적 부분도 제공된다. 상기 기능적 부분은 적어도 20개 아미노산의 길이를 갖고, 도 1에 도시된 중쇄 CDR1 서열에 적어도 70% 동일한 서열 및 도 1에 도시된 중쇄 CDR2 서열에 적어도 70% 동일한 서열 및 도 1에 도시된 중쇄 CDR3 서열에 적어도 70% 동일한 서열 및 도 1에 도시된 경쇄 CDR1 서열에 적어도 70% 동일한 서열 및 도 1에 도시된 경쇄 CDR2 서열에 적어도 70% 동일한 서열 및 도 1에 도시된 경쇄 CDR3 서열, 또는 이소류신이 메티오닌으로 변경된 도 1에 도시된 경쇄 CDR3 서열에 적어도 70% 동일한 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 서열을 포함한다.

[0062] 본 발명은 본 발명에 따른 결합 화합물을 코딩하는, 길이가 적어도 15개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 적어도 30개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 50개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 75개의 뉴클레오타이드인, 단리된, 합성 또는 재조합 핵산 서열 또는 그의 기능적 동등물을 추가로 제공한다. 그러한 핵산은 예를 들어 본 발명에 따른 항체를 생산할 수 있는 B-세포로부터 단리된다. 바람직한 실시양태는 도 1에 도시된 핵산 서열의 적어도 15개의 뉴클레오타이드에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 핵산 서열을 제공한다. 본 발명에 따른 핵산 서열은 바람직하게는 도 1에 도시된 핵산 서열의 적어도 15개의 뉴클레오타이드에 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 바람직하게는, 도 1에 도시된 상기 핵산 서열은 적어도 하나의 CDR 코딩 서열을 포함한다.

[0063] 하나의 바람직한 실시양태는 본 발명에 따른 항체 또는 면역글로불린 사슬의 적어도 하나의 CDR 서열을 코딩하는, 길이가 적어도 15개의 뉴클레오타이드인 단리된, 합성 또는 재조합 핵산 서열 또는 그의 기능적 동등물을 제공한다. 상기 핵산 서열은 바람직하게는 항체 F1의 CDR 영역에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 적어도 하나의 CDR 서열을 코딩한다. F1 CDR 영역을 코딩하는 핵산 서열은 도 1에 도시되어 있다. 따라서, 다음으로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 단리된, 합성 또는 재조합 핵산 서열, 또는 그의 기능적 동등물이 추가로 제공된다:

cgctttgccatgagc (서열 12),
 tggatcaataatgggaataaccatactacgcacggctcggtacaatac (서열 13),
 gatcacctagtagtggtggccacctttgactcc (서열 14),
 cgggcagtgaaaacgttggtgactggttgccc (서열 15), aagacatctattctagaagt (서열
 16) 및 caacactatatacgtttcccgtaact (서열 17)

[0064] 상기 핵산 서열 또는 기능적 동등물은 바람직하게는 임의의 상기 언급된 서열에 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 또한, 도 1에 도시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열의 적어도 일부에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 핵산 서열 또는 그의 기능적 동등물이 제공되고, 상기 일부는 적어도 15개의 뉴클레오타이드를 갖고 적어도 하나의 CDR 영역을 코딩한다.

[0065] 본 발명에 따른 핵산 서열 또는 그의 기능적 동등물은 바람직하게는 F1 CDR 영역, F1 중쇄 및/또는 F1 경쇄에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 영역을 코딩한다. 따라서, 한 실시양태는 서열 RFAMS (서열 1)에 적어도 70% 서열 동일성, 및/또는 서열 SINNGNNPPYARSVQY (서열 2)에 적어도 70% 서열 동일성, 및/또는 서열 DHPSSGWPTFDS (서열 3)에 적어도 70% 서열 동일성, 및/또는 서열 RASENVGDWLA (서열 4)에 적어도 70% 서열 동일성, 및/또는 서열 KTSILES (서열 5)에 적어도 70% 서열 동일성, 및/또는 서열 QHYXRFPYT (여기서, X는 I 또는 M임) (서열 6)에 적어도 70% 서열 동일성, 및/또는 서열

EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN
 NPPYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDS
 WPGGTLVTVSS (서열 7)

[0067]

- [0068] 에 적어도 70% 서열 동일성, 및/또는 서열
- DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGGGTTKLEIKRTV
- [0069] (여기서, X는 I 또는 M임) (서열 8)
- [0070] 에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함하는, 단리된, 합성 또는 재조합 핵산 서열, 또는 그의 기능적 동등물을 제공한다. 또한, 본 발명에 따른 F1 항체의 변이체를 코딩하는 핵산 서열 또는 그의 기능적 동등물이 제공된다. 본 발명에서 예를 들어 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN
NPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGSGWPTFDS
WGPGTLTVSS (서열 9)
- [0071]
- [0072] 및/또는 서열
- EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN
NPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGSGWPTFDS
WGPGTLTVSS (서열 7)
- [0073]
- [0074] 을 포함하는 중쇄 서열, 및 서열
- DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGGGTTKLEIKRA
- [0075] (여기서, X는 I 또는 M임) (서열 10)
- [0076] 및/또는 서열
- DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGGGTTKVEIKRTV
- [0077] (여기서, X는 I 또는 M임) (서열 11)
- [0078] 및/또는 서열
- DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGGGTTKLEIKRTV
- [0079] (여기서, X는 I 또는 M임) (서열 8)
- [0080] 을 포함하는 경쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열이 제공된다.
- [0081] 한 실시양태에서, 중쇄의 위치 53 (카바트 (Kabat, 1991)에 따른 넘버링)의 아스파라긴은 상기 위치의 아스파라긴의 탈아미드화를 방지하기 위해 글루타민 이외의 또 다른 아미노산으로 교체된다. 바람직하게는, 상기 아스파라긴은 세린으로 교체된다.
- [0082] 용어 "% 서열 동일성"은 2개의 서열을 정렬하고 최대 % 동일성을 달성하기 위해서 갭 (gap)을 도입한 후에, 참조 서열 내의 잔기와 동일한 핵산 서열의 후보 아미노산 내의 잔기의 비율로서 본원에서 규정된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 잘 공지되어 있다.
- [0083] 본원에서 사용되는 바와 같이, 본 발명의 핵산 분자 또는 핵산 서열은 바람직하게는 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 DNA 및/또는 RNA의 사슬을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산 분자 또는 핵산 서열은 다른 종류의 핵산 구조, 예를 들어 예를 들어 DNA/RNA 나선, 펩티드 핵산 (PNA), 잠금형 (locked) 핵산 (LNA) 및/또는 리보자임을 포함한다. 그러한 다른 핵산 구조는 핵산 서열의 기능적 동등물로서 언급된다. 또한, 용어 "핵산 서열의 기능적 동등물"은 천연 뉴클레오타이드와 동일한 기능을 보이는 비-천연 뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 비-뉴클레오타이드 빌딩 블록 (building block)을 포함하는 사슬을 포함한다.
- [0084] 본 발명에 따른 핵산 서열은 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스에 특이적인 결합 화합물의 생성에 특히 유용하다. 이것은 예를 들어 세포의 핵산 번역 기구가 코딩된 결합 화합물을 생성하도록 그러한 핵산 서열을 세포 내로 도입함으로써 수행된다. 하나의 실시양태에서, 본 발명에 따른 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 유전자는 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 (CHO)의 세포, NSO (마우스 골수종) 또는 293(T) 세포주와 같은 소위 생산자 (producer) 세포에서 발현되고, 상기 세포 중의 일부는 상업적인 항체 생산을 위해 변경된다. 상기 생

산자 세포의 증식은 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분을 생산할 수 있는 생산자 세포주를 생성한다. 바람직하게는, 상기 생산자 세포주는 인간에서 사용하기 위한 화합물의 생산에 적합하다. 따라서, 상기 생산자 세포주에는 바람직하게는 병원성 물질, 예를 들어 병원성 미생물이 존재하지 않는다. 가장 바람직하게는, 인간 서열로 구성된 결합 화합물은 본 발명에 따른 핵산 서열을 사용하여 생성된다.

[0085] 따라서, 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물을 생산할 수 있는 단리된 또는 재조합 항체 생산 세포, 및 세포에 본 발명에 따른 핵산 서열 또는 기능적 동등물을 제공하고 상기 세포가 본 발명에 따른 상기 핵산 서열 또는 기능적 동등물을 번역하여 본 발명에 따른 상기 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물을 생산하도록 하는 것을 포함하는, 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물의 생산 방법이 또한 제공된다.

[0086] 항체 생산 세포는 본원에서 항체 또는 그의 기능적 부분을 생산 및/또는 분비할 수 있는 세포, 및/또는 항체 또는 그의 기능적 부분을 생산 및/또는 분비할 수 있는 세포로 발달할 수 있는 세포로 규정된다. 본 발명에 따른 항체 생산 세포는 바람직하게는 상업적인 항체 생산을 위해 변형된 생산자 세포이다. 바람직하게는, 상기 생산자 세포는 인간에서 사용하기 위한 화합물의 생산에 적합하다.

[0087] 본 발명에 따른 방법은 바람직하게는 본 발명에 따른 상기 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물을 수거, 정제 및/또는 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 이렇게 얻어진 본 발명에 따른 결합 화합물은 바람직하게는 스태필로코쿠스 감염의 진단, 스태필로코쿠스 박테리아의 단리 또는 검출, 스태필로코쿠스 종과 다른 그람-양성 박테리아의 구분, 및 임의로 추가의 정제, 단리 및/또는 다른 처리 단계 후에 인간 요법에 사용된다.

[0088] 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물은 진단 용도에 특히 적합하다. 예를 들어, 샘플, 예를 들어 조직 또는 혈액 샘플은 스태필로코쿠스 박테리아, 바람직하게는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스, 보다 바람직하게는 MRSA로 감염된 것으로 의심되는 개체 또는 임의의 다른 공급원으로부터 얻을 수 있다. 후속적으로, 상기 샘플은 본 발명에 따른 항체 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 부분과 혼합될 수 있다. 상기 항체, 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물 또는 부분은 스태필로코쿠스 박테리아, 바람직하게는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스에 특이적으로 결합할 것이다. 항체, 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물 또는 부분에 결합된 박테리아는 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 자기 비드, 스트렙타비딘-코팅 비드를 사용한 단리, 또는 컬럼 상에 고정된 2차 항체를 사용한 단리 (이로 제한되지 않음)를 사용하여 샘플로부터 단리될 수 있다. 결합된 박테리아 및 항체, 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 부분의 세척 후에, 박테리아는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 상기 항체, 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물 또는 부분으로부터 용출될 수 있다. 예를 들어, 박테리아 및 항체, 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물 또는 부분 사이의 결합은 염 농도의 증가 및/또는 pH의 저하 또는 증가, 및/또는 과량의 에피토프의 첨가에 의해 붕괴될 수 있다.

[0089] 스태필로코쿠스 박테리아, 바람직하게는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스의 단리는 다양한 용도를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 상이한 그람-양성 박테리아의 감염은 개체에서 중복되는 증상을 야기할 수 있다. 상기 경우에, 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스와 다른 그람-양성 박테리아의 구별이 곤란할 수 있다. 이때, 본 발명에 따른 항체, 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 부분은 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스의 존재를 검출하기 위해, 또는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스와 다른 박테리아를 구별하기 위해 사용될 수 있다. 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스 감염으로 고통받는 것으로 의심되는 개체의 샘플로부터 또는 임의의 다른 공급원, 예를 들어 박테리아 배양액으로부터 박테리아의 단리는 상기 스태필로코쿠스 박테리아의 검출을 용이하게 할 수 있고, 그 이유는 단리가 상기 스태필로코쿠스 박테리아의 증가된 농도 및/또는 보다 높은 순도를 제공하기 때문이다.

[0090] 스태필로코쿠스 중, 바람직하게는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스, 보다 바람직하게는 MRSA의 단리는 예를 들어 샘플에서 특이적 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스 균주, 바람직하게는 MRSA 균주를 확인하기 위해 추가로 사용될 수 있다. 상기 균주의 확인은 예를 들어 박테리아 DNA의 서열을 결정함으로써 수행될 수 있다. 이 경우에, 먼저 단리된 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스를 얻는 것이 바람직하다.

[0091] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체, 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 부분은 상기 항체, 면역글로불린 사슬, 또는 기능적 동등물 또는 부분을 검출할 수 있도록 표지, 예를 들어 형광 표지, 또는 방사성 표지된다 (이로 제한되지 않음). 별법으로, 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면

역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물은 본 발명에 따른 상기 항체, 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 부분에 대해 작용하는 표지된 2차 항체를 사용하여 검출된다. 상기 항체, 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 부분이 검출되면, 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스가 존재하는 것이다.

[0092] 따라서, 스탕필로코쿠스 감염, 바람직하게는 에스. 아우레우스 감염, 보다 바람직하게는 MRSA 감염의 진단을 위한, 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스, 바람직하게는 MRSA의 검출을 위한, 및 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스, 바람직하게는 MRSA와 다른 그람-양성 박테리아를 구별하기 위한 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물의 용도가 본 발명에서 제공된다. 또한, 스탕필로코쿠스 감염, 바람직하게는 에스. 아우레우스 감염, 보다 바람직하게는 MRSA 감염의 진단에 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물이 제공된다.

[0093] 또한, 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물을 사용하여 용액으로부터 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스 박테리아를 분리하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 바람직하게는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스, 바람직하게는 MRSA 감염으로 고통받는 것으로 의심되는 개체로부터의 샘플, 또는 임의의 다른 공급원, 예를 들어 박테리아 배양액을 제공하고, 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물을 상기 샘플에 첨가하고, 상기 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물이, 존재하는 경우의 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스 박테리아에 대해 결합하도록 허용하고, 상기 샘플로부터 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물에 결합된 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스 박테리아를 분리하는 것을 포함한다.

[0094] 인간 결합 화합물을 비롯하여 본 발명에 따른 그람-양성 박테리아-특이적 결합 화합물 및 그의 코딩 핵산 서열이 제공되기 때문에, 개선된 치료 용도가 이용가능하게 되었다. 그람-양성 박테리아, 예를 들어 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스는 본 발명에 따른 결합 화합물에 의해 대처된다. 본 발명에 따른 결합 화합물은 따라서 의약 또는 예방제로서 사용하기에 특히 적합하다. 바람직하게는, 인간 개체가 치료될 때 유해한 부작용이 발생할 가능성을 감소시키기 위해 인간 서열로 구성되거나 또는 최대 5%의 비-인간 서열을 갖는 결합 화합물이 사용된다. 따라서, 의약 및/또는 예방제로서 사용하기 위한, 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 핵산 서열 또는 그의 기능적 동등물이 또한 본원에서 제공된다. 본 발명에 따른 핵산 또는 기능적 동등물이 투여될 때, 이는 계내에서 본 발명에 따른 결합 화합물로 번역될 것이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 상기 항체는 항체 F1, 또는 그의 기능적 부분을 포함한다. 상기 의약 또는 예방제는 바람직하게는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스에 의한 감염을 대처하거나 적어도 부분적으로는 예방하기 위해 또는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스 감염의 유해한 효과를 대처하거나 적어도 부분적으로는 예방하기 위해 사용된다. 따라서, 적어도 부분적으로는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스에 관련된 병태의 치료 및/또는 예방을 위한 의약 및/또는 예방제로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 핵산 서열 또는 그의 기능적 동등물이 추가로 제공된다. 그러한 병태의 비제한적인 예는 피부 감염, 여드름, 농가진, 종기, 연조직염 모낭염, 부스럼, 큰 종기, 열상 피부 증후군, 농양, 폐렴, 수막염, 골수염, 심내막염, 독성 쇼크 증후군 및 패혈증이다. 바람직하게는, 에스. 아우레우스 감염이 대처되거나 또는 적어도 부분적으로는 예방된다. 가장 바람직하게는, MRSA-관련된 병태가 대처, 완화 및/또는 적어도 부분적으로는 예방된다. 따라서, 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스를 적어도 부분적으로는 치료 및/또는 예방하기 위한 의약 및/또는 예방제의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 핵산 서열 또는 그의 기능적 동등물, 및 그를 필요로 하는 개체에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 기능적 동등물을, 바람직하게는 그를 필요로 하는 개체에 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스에 의해 감염된 것으로 진단된 후에 투여하는 것을 포함하는, 적어도 부분적으로는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스에 관련된 병태의 치료 또는 예방 방법이 또한 제공된다. 상기 병태는 바람직하게는 적어도 하나의 상기 나열된 에스. 아우레우스 관련 병태, 가장 바람직하게는 MRSA 관련 병태를 포함한다. 상기 항체는 바람직하게는 항체 F1 또는 그의 기능적 부분을 포함한다.

[0095] 그람-양성 박테리아에 대처하기 위해, 본 발명에 따른 결합 화합물은 바람직하게는 감염이 발생하기 전에 개체에 투여된다. 별법으로, 본 발명에 따른 결합 화합물은 개체가 이미 감염된 후에 투여된다. 상기 결합 화합물은 바람직하게는 합병증의 위험이 증가한 개체, 예를 들어 입원한 개체 및/또는 면역성이 손상된 개체에게 투여

된다. 또한, 노인도 박테리아 병태의 발생 위험성이 높다. 본 발명에 따른 결합 화합물은 바람직하게는 1회 이상의 주사에 의해 투여된다. 상기 본원에서 설명한 치료 용도에 사용되는 본 발명에 따른 결합 화합물의 용량 범위는 엄격한 프로토콜 요건이 존재하는 임상 시험에서 진료소에서의 증가하는 용량 연구를 기초로 하여 설계된다. 일반적인 용량은 0.1 내지 10 mg/kg (체중)이다. 치료 용도를 위해, 본 발명에 따른 결합 화합물은 일반적으로 제약상 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제와 조합된다. 적합한 담체의 예는 예를 들어 키텔 림펫 해모시아닌 (KLH), 혈청 알부민 (예를 들어 BSA 또는 RSA) 및 난백 알부민을 포함한다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 상기 적합한 담체는 예를 들어 염수와 같은 용액을 포함한다.

[0096] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 결합 화합물을 코딩하는 핵산이 사용된다. 이미 설명한 바와 같이, 그러한 핵산의 투여 시에, 결합 화합물은 숙주의 기구에 의해 생산된다. 생산된 결합 화합물은 그람-양성 박테리아 감염 및/또는 상기 감염의 유해한 효과를 억제 및/또는 대처할 수 있다. 따라서, 의약 및/또는 예방제로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 핵산 서열 또는 기능적 동등물이 또한 본원에서 제공된다. 상기 핵산은 바람직하게는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피테르미디스, 보다 바람직하게는 에스. 아우레우스, 가장 바람직하게는 MRSA에 대처하기 위해 사용된다. 따라서, 적어도 부분적으로는 그람-양성 박테리아-관련 병태의 치료 및/또는 예방을 위한 의약 및/또는 예방제의 제조를 위한 본 발명에 따른 핵산 서열 또는 기능적 동등물의 용도가 제공된다. 상기 그람-양성 박테리아-관련 병태는 바람직하게는 에스. 아우레우스 또는 에스. 에피테르미디스에 의한 감염, 보다 바람직하게는 에스. 아우레우스 감염, 가장 바람직하게는 MRSA 감염을 포함한다.

[0097] 또한, 본 발명에 따른 항체 또는 기능적 부분 또는 면역글로불린 사슬 또는 그의 기능적 동등물 또는 핵산 서열 또는 그의 기능적 동등물 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 상기 제약 조성물은 바람직하게는 인간 용도를 위해 적합하다.

[0098] 본 발명은 다음 실시예에서 추가로 설명된다. 이들 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니라, 단지 본 발명을 명료하게 하기 위해 제시된다.

[0099] 상세한 설명에서 인용되는 모든 특허 문헌 및 다른 간행물은 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0100] 실시예 1

[0101] 방법

[0102] B 세포 분리

[0103] B-세포를 성인의 신선한 혈액으로부터 피콜 (Ficoll) 분리 및 제조자 (밀테니 바이오테크 (Miltenyi Biotech))가 설명하는 바와 같이 MACS 마이크로비드를 사용한 CD4/CD8 음성 선택에 의해 얻었다. 기억 B 세포를 얻기 위해, 세포를 FACSaria (벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson)) 상에서 $CD19^{+}CD3^{-}CD27^{+}IgD^{-}IgA^{-}$ 에 대해 분류하였다. 이들 조직의 사용은 연구소의 의료 윤리 위원회에 의해 승인되었고, 사전 동의를 조건으로 하였다. 공여자는 유전자형 클러스터 109 및 16을 갖는 병원 획득 MRSA 균주의 보유를 기초로 하여 선택하였다.

[0104] 세포 배양

[0105] IMDM (깁코 (Gibco)), 8% FBS (하이클론 (HyClone)) 및 페니실린/스트렙토마이신 (로슈 (Roche))을 함유하는 표준 배양 배지에서 유지된 B-세포를 CD40L (CD40L-L 세포, 10^5 세포/ml) 및 재조합 마우스 IL-21 (25 ng/ml, R&D 시스템즈 (R&D systems))을 안정적으로 발현하는 γ -조사된 (50 Gy) 마우스 L 세포 섬유모세포 상에서 동시 배양하였다. rhIL-4 (R&D)를 50 ng/ml로 사용하였다. 세포를 PCR에 의해 통상적으로 시험하였고, 피코플라스마 및 EBV의 존재에 대해 음성인 것으로 밝혀졌다 (데이터 미제시).

[0106] NGFR 및 GFP에 대해 이중 양성인 대량 형질도입된 인간 기억 B 세포를 FACS 세포 분류에 의해 정제하고, 96웰 플레이트에서 500 세포/웰의 세포 밀도로 배양하였다. 배양 상등액을 뉴먼 (Newman) 및 SH1000 균주의 박테리아 용해물을 사용하여 ELISA로 시험하였다. 양성 배양액을 96웰 플레이트에서 10 세포/웰 세포 밀도로 서브클로닝하고, 다시 ELISA로 시험하였다. 후속적으로 양성 배양액을 1 세포/웰로 접종하고, 다시 에스. 아우레우스 균주 뉴먼 및 SH1000에 대한 반응성에 대해 ELISA로 시험하였다.

[0107] 레트로바이러스 형질도입

[0108] BCL6 레트로바이러스 구성체는 문헌에 기재되어 있다 (Shvarts A. et al., Genes Dev 16, 681-686 (2002)).

인간 Bcl-xL을 코딩하는 cDNA는 스탠리 코스메이어 박사 (Dr. Stanley Korsmeyer)로부터 제공받았다. BCL6 및 Bcl-xL은 BCL6-NGFR 및 BclxL-GFP 구성체로 별개로 클로닝되었다. 이들 구성체는 문헌에 기재된 LZRS 레트로바이러스 패키징 (packaging) 세포 피닉스 (phoenix) ([Jaleco A.C. et al., Blood 94, 2637-2646 (1999)]; [Scheeren F.A. et al., Nat Immunol 6, 303-313 (2005)]) 내로 형질감염되었다. 기억 B-세포는 문헌에 기재된 바와 같이 rmIL-21의 존재 하에 36 hr 동안 CD40L-L 세포 상에서 활성화 후에 BCL6 및 Bcl-xL 함유 레트로바이러스에 의해 이중으로 형질도입되었다 ([Diehl S.A. et al., J Immunol 180, 4805-4815 (2008)]; [Kwakkenbos M. et al., Nat Med in press (2009)]). 형질도입된 세포는 rmIL-21과 함께 CD40L-L 세포 상에서 유지되었다.

[0109] ELISA

[0110] 항체 함량을 결정하기 위해서, ELISA 플레이트를 PBS 내의 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치 래보라토리스 (Jackson ImmunoResearch Laboratories))로 37°C에서 1시간 또는 4°C에서 철야 코팅하고, ELISA 세척 버퍼 (PBS, 0.5% Tween-20)로 세척하였다. PBS 내의 4% 우유를 차단제로 사용한 후, 세포 배양 상등액의 연속 희석액 및 효소-접합된 검출 항체를 첨가하였다 (HRP-접합 항-IgG (잭슨)에 대해 희석액 1:2500). TMB 기질/정지용액 (바이오소스 (Biosource))을 ELISA의 개발을 위해 사용하였다.

[0111] 스크리닝을 위해, 본 발명자들은 뉴먼 및 SH1000 균주로부터의 용해물을 사용하였다. 둘 모두 PBS 내에서 만들고, B 세포 배양 상등액을 시험하거나 또는 1:2 희석 전에 5 내지 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 로 직접 코팅하였다.

[0112] 인간 IgG1 클론 F1의 항원 특이성을 조사하기 위해, LTA 검출 ELISA를 개발하였다. 에스. 아우레우스, 비. 서브틸리스 (*B. subtilis*), 에스. 파에칼리스 (*S. faecalis*) 및 에스. 피오게네스 (*S. pyogenes*) (시그마 (Sigma))로부터의 정제된 LTA 제제를 폴리클로날 IgG 정제된 마우스 항-LTA (1/200 원액 1 mg ml^{-1} , QED 바이오사이언스 (Bioscience))로 코팅된 ELISA 플레이트에 첨가한 후, 2차 항체를 첨가하였다.

[0113] 추가로, 본 발명자들은 피셔 (W. Fischer, 독일 유니버시티 오브 에달랑겐 인스티튜트 푸어 비오케미에)에 의해 개발된 라이브러리로부터 유래되고 아펠멜크 (B. Appelmelk, 네덜란드 암스테르담 VU)로부터 제공된 몇몇 LTA 제제를 시험하고 (보다 상세한 내용에 대해서는 문헌 [Keller R. et al., Infect Immun 60, 3664-3672 (1992)], [Polotsky V.Y. et al., Infection and Immunity 64, 380-383 (1996)] 및 [Greenberg J.W. et al., Infection and Immunity 64, 3318-3325 (1996)] 참조), 직접 ELISA로 검토하였다 (Weidenmaier C. et al., Nat Rev Microbiol 6, 276-287 (2008)). LTA 제제를 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 로 코팅한 후, rF1 (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) 또는 대조군 항체 (하이드리도마 상등액의 1:5 희석액)를 첨가하고, 접합된 항-인간 또는 마우스 항체로 추가로 검출하였다. 정제된 LTA 제제의 패넬은 다음을 포함하였다: 비. 서브틸리스, 에스. 아우레우스, 엘. 락티스 (*L. lactis*), 엘. 가르비에아에 (*L. garvieae*), 비. 비피둠 (*B. bifidum*), 엠. 루테우스 (*M. luteus*), 엘. 카세이 (*L. casei*), 엘. 메센테로이데스 (*L. mesenteroides*), 비. 리케니포르미스 (*B. licheniformis*), 엘. 웰시메리 (*L. welshimeri*), 이. 히래 (*E. hirae*), 엘. 라피노락티스 (*L. raffinolactis*), 에스. 뮤탄스 (*S. mutans*), 에스. 뉴모니아에 (*S. pneumoniae*). 몇몇의 변이체는 알라닌 잔기 및/또는 지질 앵커 (본원에 도시되지 않음)를 함유하거나 포함하지 않는다.

[0114] F1 항체의 박테리아 배양액에 대한 결합

[0115] 뉴먼 에스. 아우레우스 및 에스. 뉴모니아에 균주 (혈청형 3)를 사용하였다. 뉴먼을 TSH 50 ml 내에서 철야 배양한 후, 1 ml을 100 ml에 2 내지 2.5 hr 동안 OD가 1이 될 때까지 재현탁하고, 박테리아를 수거하였다. 에스. 뉴모니아에를 효모 배지와 혼합된 토드 휴이트 (Todd Hewitt) 배지에서 배양하였다. 박테리아를 F1 항체, 대조군 IgG (D25, 인간 항-RSV 항체) 또는 2차 항체 단독 (IgG-PE 단독)과 인큐베이팅하기 전에, 세포를 배경 염색을 방지하기 위해 100% 중 마우스 혈청으로 전처리하였다. 세척 후에 2차 항체를 첨가하였다 (IgG-PE). 항체 인큐베이션은 20분 동안 얼음 상에서 수행하였다.

[0116] F1 서열 결정 및 발현 클로닝

[0117] 본 발명자들은 트리졸 (Trizol) (인비트로젠 (Invitrogen))을 사용하여 총 RNA를 단리하고, 수퍼스크립트 (Superscript) RT를 사용하여 cDNA를 생성하고, PCR을 수행하고, 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 pCR2.1 TA 클로닝 벡터 (인비트로젠) 내로 클로닝하였다. 역전사효소 또는 DNA 중합효소 유발 돌연변이를 배제하기 위해, 본 발명자들은 몇몇의 독립적인 클로닝 실험을 수행하였다. 재조합 F1 mAb를 생산하기 위해, 본 발명자들은 F1 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 인간 IgG1 및 카파 불변 영역과 인 프레임 (in frame)으로 pcDNA3.1 (인비트로젠) 기반 백

터 내로 클로닝하고, 293T 세포를 일시적으로 형질감염시켰다. 본 발명자들은 단백질 A를 사용하여 배양 상등액으로부터 제조합 F1를 정제하였다.

[0118] 결과

[0119] F1 클론의 생성

[0120] MRSA 양성으로 시험되었지만 아프지는 않은 3명의 대상체로부터, 50-60 ml의 헤파린 혈액을 수거하고, 말초 B-세포를 피콜 정제 단계 후에 분리하였다. 몇몇 B-세포 집단으로부터의 B-세포를 BCL6-NGFR 및 Bcl-xL-GFP를 함유하는 레트로바이러스로 이중 형질도입하였다 (Diehl et al. and Kwakkenbos et al.). IgG, CD27 양성 집단, 폴리클로날 미니-배양액으로부터 500 세포/웰의 세포 밀도로 B-세포 배양을 96웰 플레이트에서 개시하였다. 이들 미니-배양액의 상등액을 수거하고, 에스. 아우레우스-특이적 IgG 항체의 존재에 대해 스크리닝하기 위해 ELISA에서 사용하였다 (상기 ELISA에서 코팅은 2가지 에스. 아우레우스 균주, 즉 SH1000 및 뉴먼의 세포 용해물이었다). SH1000 및 뉴먼 에스. 아우레우스 모두에서 양성으로 스크리닝된 미니-배양액을 10 세포/웰의 밀도로 새로운 미니-배양액에 접종하였다. 다시, 상기 미니-배양액의 상등액을 수거하고, SH1000 및 뉴먼 ELISA에서 스크리닝하였다. 두 ELISA 모두에서 양성으로 스크리닝된 클론을 모노클로날 배양 (즉, 1 세포/웰)으로 접종하였다. 이들 모노클로날 배양액의 상등액의 시험 후에, 하나의 클론 (F1)은 에스. 아우레우스 특이적 모노클로날 IgG 항체를 생산하는 것으로 밝혀졌다.

[0121] F1 클론의 상등액 내의 항체는 에스. 아우레우스로부터의 LTA 제제에 결합한다.

[0122] F1 클론을 생성할 때, 본 발명자들은 이미 F1의 상등액이 2가지 에스. 아우레우스 균주, 즉 SH1000 및 뉴먼의 박테리아 세포 용해물에 결합함을 밝혀내었다. 그람-양성 박테리아의 주요 세포벽 화합물은 LTA이고, 따라서 본 발명자들은 F1 상등액의 에스. 아우레우스 LTA 제제에 대한 결합을 ELISA로 시험하기로 결정하였다. 표 1에 제시된 바와 같이, F1 클론의 상등액은 SH1000 및 뉴먼 에스. 아우레우스 균주의 박테리아 세포 용해물에 결합하지만, 시판되는 것을 구입한 정제된 에스. 아우레우스 LTA 제제에도 결합한다. 그러나, 본 발명자들은 LTA 제제에 대한 결합이 전체 박테리아에서 관찰된 것보다 유의하게 더 낮다는 사실을 주목하였다.

표 1

F1 클론의 상등액은 에스. 아우레우스 LTA 제제에 결합한다.

음성 대조군으로서, 항-마우스-HRP 접합 2차 항체가 사용되었다.

또 다른 대조군은 인플루엔자 H3 단백질만을 검출하는 항-인플루엔자 바이러스 항체였다.

	F1 클론	마우스 항-LTA	항-flu 대조군
SH1000	1.004	-0.010	-0.007
뉴먼	0.753	-0.007	0.007
SA LTA (시그마)	0.176	-0.005	-0.009
Flu H3	0.003	-0.002	1.523
비코팅	-0.013	-0.014	-0.015

[0123]

[0124] 제조합 생산된 F1 항체는 여러 공급원으로부터의 LTA 제제에 결합한다.

[0125] 항체 유전자를 발현 벡터 내로 클로닝하고 제조합 F1 (rF1) 항체를 발현 시스템에서 생산한 후, rF1 항체를 몇몇 박테리아로부터의 정제된 LTA 제제에 대해 시험하였다. 도 2a에 도시된 바와 같이, rF1 항체는 에스. 아우레우스 및 비. 서브틸리스로부터 얻은 시판되는 LTA 샘플에 잘 결합하고, 에스. 파에칼리스 및 에스. 피오게네스로부터의 LTA 샘플에는 약간 덜 강하게 결합한다. rF1 항체는 에스. 뉴모니아에로부터의 LTA 샘플에는 결합하지 않았다 (테이타 미제시). 또한, rF1은 비. 서브틸리스, 비. 리케니포르미스 및 에스. 아우레우스의 2개의 단일물로부터의 고도로 정제된 LTA 샘플을 인식하였다 (도 2b). rF1은 에스. 뮤탄스 (도 2b) 또는 엘. 락티스, 엘. 가르비에아에, 비. 비피둠, 엠. 루테우스, 엘. 카세이, 엘. 메센테로이데스, 엘. 웰시메리, 이. 히래, 엘. 라피노락티스, 에스. 뮤탄스 및 에스. 뉴모니아에 (결과 미제시)로부터의 LTA 제제에 결합하지 않았다.

[0126] 제조합 F1 항체는 살아있는 에스. 아우레우스 박테리아에 결합한다.

- [0127] rF1 항체가 살아있는 그람-양성 박테리아도 인식하는지를 연구하기 위해, rF1 항체의 에스. 아우레우스 및 에스. 뉴모니아에에 대한 결합을 유동 세포 분석을 사용하여 시험하였다. 도 3a에 도시된 바와 같이, rF1 항체는 살아있는 에스. 아우레우스 박테리아 (뉴먼 균주)에는 결합하지만, 에스. 뉴모니아에에는 결합하지 않는다. 또한, 본 발명자들은 rF1이 6개의 임상 에스. 아우레우스 단리물을 인식함을 밝혀내었고, 여기서 하나의 단리물은 PVL 양성인 병원성 균주이고, 3개는 보통의 균주이고, 2개는 MRSA 균주이다 (도 3b).
- [0128] 실시예 2
- [0129] 방법
- [0130] 박테리아 균주 및 배양액
- [0131] 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA) 균주 USA300 (1114), USA400, N315, USA100, USA1000, COL, MRSA252, 및 메티실린-감수성 에스. 아우레우스 (MSSA) 균주 레이놀즈 (Reynolds), 베커 (Becker), 스미스 디퓨즈 (Smith Diffuse), MN8, 및 반코마이신 중간 감수성 (VISA) 균주 Mu50을 모두 NARSA (Network on Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*)로부터 얻고; MSSA 균주 뉴먼 및 로젠바흐 (Rosenbach)는 ATCC로부터 얻었다. 스타필로코쿠스 에피데르미디스, 바실루스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 엔테로코쿠스 파에칼리스 (*Enterococcus faecalis*), 및 스트렙토코쿠스 피오케네스는 워즈 내처럴 사이언스 (Ward's Natural Science)로부터; 리스테리아 모노시토크네스 (*Listeria monocytogenes*)는 ATCC로부터 얻었다. 박테리아를 5% 양 혈액으로 보충된 트립틱 대두 아가 (TSA) 플레이트에서 18 h 동안 37°C에서 성장시켰다. 액체 배양을 위해, TSA 플레이트로부터의 단일 콜로니를 트립틱 대두 브로쓰 (TSB)에서 인큐베이팅하고, 200 rpm에서 18 h 동안 진탕하면서 37°C에서 인큐베이팅하였다. 이들 배양액의 신선한 TSB 내의 신선한 100배 희석액을 추가로 다양한 시간 동안 계대배양하였다.
- [0132] 시험관 내에서 성장한 전체 박테리아에 대한 rF1 결합의 FACS 분석
- [0133] 전체 세포의 항체 염색을 위해, 박테리아를 TSA 플레이트 또는 TSB 배양액으로부터 수거하고, 1700 x g에서 20 min 동안 원심분리에 의해, 0.1% BSA (IgG 미함유; 시그마) 및 10 mM Hepes, pH 7.4 (HB 버퍼)로 보충된, 페놀 레드가 없는 헵크 완충 염 용액 (HBSS)으로 세척하였다. 박테리아 농도는 630 nm에서 광학 밀도를 관독함으로써 추정하였다. HB 버퍼 내의 20×10^8 CFU/mL의 박테리아 현탁액을 등부피의 300 μ g/mL의 토끼 IgG (시그마)와 혼합하고, 비특이적 IgG 결합을 차단하기 위해 1 h 동안 실온 (RT)에서 인큐베이팅하였다. rF1 및 인간 IgG1 이소형 대조군을 포함하는 1차 항체를 2 μ g/mL의 최종 농도로 첨가하고, 이 혼합물을 15 min 동안 RT에서 인큐베이팅하였다. HB로 2회 세척한 후, 박테리아 펠렛을 형광 항-인간 IgG 2차 항체 (잭슨 이뮤노리서치)의 용액에 재현탁하고, 15 min 동안 RT에서 인큐베이팅하였다. 박테리아를 PBS로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드와 함께 PBS에 재현탁하고, 유동 세포 분석으로 분석하였다.
- [0134] 감염된 조직으로부터의 전체 박테리아에 대한 rF1 결합의 FACS 분석.
- [0135] 감염된 조직으로부터의 박테리아에 대한 항체 결합의 분석을 위해, TSB 내의 USA300의 4 h 계대배양액을 PBS로 세척하였다. 10×10^8 CFU/mL의 추정 농도로 PBS 내의 USA300 현탁액 100 μ L을 마우스에게 정맥내 주사하였다. 3일 후에, 신장, 간 및 폐를 수거하고, 원추형 조직 분쇄 튜브 (VWR)를 사용하여 균질화하였다. 표시된 때에, 장기를 상이한 감염 시점에서 수거하였다. 마우스 세포를 용해하기 위해, 균질액을 0.1% 트리톤 (Triton)-X100 (써모 (Thermo)), 10 μ g/mL의 DNaseI (로슈) 및 완전 미니 프로테아제 억제제 콕테일 (cocktail) (로슈)을 함유하는 PBS 내에서 10 min 동안 RT에서 인큐베이팅하고, 40 μ m 필터 (팔콘 (Falcon))에 통과시켰다. 세포 현탁액을 PBS로 2회 세척하고, HB 버퍼에 재현탁하고, 등부피의 600 μ g/mL의 인간 IgG (시그마)와 혼합하고, 1 h 동안 RT에서 인큐베이팅하였다. rF1 및 인간 IgG1 이소형 대조군의 1차 Ab를 2 μ g/mL의 최종 농도로 첨가하였다. 마우스 장기 파쇄물로부터 박테리아를 구별하기 위해, 토끼 IgG 항-에스. 아우레우스 (앱캠 (Abcam))를 20 μ g/mL의 최종 농도로 첨가하였다. 15 min 동안 RT에서 인큐베이션한 후, 세포를 HB 버퍼 2회 세척하고, 각각 상이한 형광색소 (잭슨 이뮤노리서치)로 표지된 항-인간 IgG 및 항-토끼 IgG 2차 항체의 혼합물에 재현탁하였다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 2% 파라포름알데히드와 함께 PBS에 재현탁하고, 유동 세포 분석으로 분석하였다. 토끼 IgG 항-에스. 아우레우스를 사용한 양성 염색에 대해 게이팅함으로써 이중 형광 도표로부터 박테리아를 선택한 후, rF1 및 이소형 대조군의 형광 강도의 오버레이 (overlay) 막대 그래프를 생성하였다.
- [0136] 결과

- [0137] rF1은 14개의 에스. 아우레우스 균주 및 에스. 에피테르미디스에 강하게 결합한다.
- [0138] 7개의 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA) 균주, 6개의 메티실린-감수성 에스. 아우레우스 (MSSA) 균주, 1개의 반코마이신 중간 감수성 에스. 아우레우스 (VISA) 균주, 에스. 에피테르미디스 및 몇몇의 다른 그람-양성 종을 rF1 항체 결합에 대해 시험하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, rF1은 14개의 모든 에스. 아우레우스 균주에 (도 4a) 및 에스. 에피테르미디스 (도 4b)에 강하게 결합하지만, 다른 시험된 그람-양성 종에는 결합하지 않는다 (도 4b).
- [0139] rF1은 상이한 성장 단계로부터의 및 생체 내 감염으로부터의 MRSA에 결합한다.
- [0140] 본 발명자들은 상이한 조직에서 및 감염 과정에 걸쳐 mAb rF1이 박테리아에 결합하는 능력을 시험하였다. 본 발명자들은 감염 2일 후에 쥐 신장, 간 및 폐 조직으로부터 단리된 박테리아에 rF1이 결합하고, 감염된 신장으로부터 단리된 박테리아에 대한 결합이 안정하고, 감염 2, 3 및 8일 후에 박테리아에 결합함을 밝혀내었다.
- [0141] rF1 항체의 MRSA (균주 USA300)의 상이한 성장 단계, 즉 TSB 배양액 내에서의 초기 대수 성장 (2시간) 및 후기 지수 성장 (8시간), 및 TSA 플레이트 상에서의 고체 콜로니의 성장에 대한 결합을 시험하였다. rF1은 시험된 모든 성장 단계에 강하게 결합한다 (도 5A).
- [0142] 감염된 조직으로부터의 전체 박테리아에 대한 MRSA (균주 USA300)에 대한 rF1 항체의 결합을 마우스가 MRSA로 전신 감염된 지 3일 후에 마우스로부터 얻은 균질화된 신장에서 시험하였다. 도 5B에 도시된 바와 같이, rF1은 감염된 조직으로부터 얻은 MRSA에 결합한다.
- [0143] 실시예 3
- [0144] 항체 rF1에 의해 결합되는 에피토프를 확인하기 위해 추가의 실험을 수행하였다. LTA 제제에 대한 결합이 관찰되었지만 (예를 들어, 실시예 1 참조), 이 결합은 전체 박테리아에 대한 결합만큼 강하지 않았고, 이것은 또 다른 에피토프가 rF1 결합에 관련될 수 있음을 시사한다.
- [0145] 방법
- [0146] 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스의 세포벽 용해물 및 시판되는 WTA 제제의 면역침전, 웨스턴 블로팅 (Western blotting) 및 질량 분광법
- [0147] Wood46 에스. 아우레우스 균주 (바이오디자인 (Bioscience)/메리디언 라이프 사이언스 (Meridian Life Sciences, 미국 메인주)로부터의 40 μ g의 시판되는 세포벽 타이코산 (WTA) 제제를 2 부분으로 나누고, 1 μ g/ml의 rF1 또는 이소형 대조군 인간 항체로 면역침전시켰다. 항체를 단백질 A/G 울트라링크 레진 (Ultralink Resin) (피어스 (Pierce))으로 포획하였다. 이어서, 샘플을 50 mM 디티오프레이톨, 10 mM 2-요오도아세트아미드로 처리하고, 8% Tris-글리신 겔 상에서 이동시키고, 후속적으로 rF1로 웨스턴 블로팅하였다.
- [0148] USA300 에스. 아우레우스 균주의 20 ml 철야 배양액의 세포벽 제제는 30% 라피노스 버퍼 내의 100 mg/ml의 리소스타핀으로 37°C에서 30분 동안 배양액 (40 mg 세포 펠렛/ml)을 처리하여 제조하였다. 전체 세포벽 제제를 여과하고, NP40 용해 버퍼로 10 ml까지 희석하고, 세포벽 제제로부터 가능한 한 많은 단백질을 고갈시키기 위해 항-Flag M2 아가로스 (시그마)와 함께 2회 인큐베이팅하였다. 최종 세포벽 제제를 2 부분으로 나누고, 1 μ g/ml의 rF1 또는 이소형 대조군 인간 항체로 면역침전시켰다. 항체를 단백질 A/G 울트라링크 레진 (피어스)으로 포획하였다. 이어서, 샘플을 50 mM 디티오프레이톨, 10 mM 2-요오도아세트아미드로 처리하고, 8% Tris-글리신 겔 상에서 이동시키고, 후속적으로 은 염색하거나 rF1로 웨스턴 블로팅하였다.
- [0149] 스탕필로코쿠스 에피테르미디스의 20 ml 철야 배양액으로부터의 용해물은 NP40 용해 버퍼 내에서 비드로 두드려 제조하였다. 생성되는 용해물 제제를 NP40 용해 버퍼를 사용하여 10 ml로 희석하고, 2 부분으로 나누고, 1 μ g/ml의 rF1 또는 대조군 항체로 면역침전시켰다. 항체를 단백질 A/G 울트라링크 레진 (피어스)으로 포획하였다. 이어서, 샘플을 50 mM 디티오프레이톨, 10 mM 2-요오도아세트아미드로 처리하고, 8% Tris-글리신 겔 상에서 이동시키고, 후속적으로 은 염색하거나 rF1로 웨스턴 블로팅하였다.
- [0150] 단백질체 (proteomic) 분석을 위해, 샘플을 프리캐스트 (precast) SDS PAGE 미니 겔에 적용하고, 분리된 단백질을 쿠마시 블루 (Coomassie Blue)로 염색하였다. rF1 웨스턴 블롯에 의해 가시화된 밴드에 대응하는 겔의 영역으로부터의 겔 슬라이스를 절제하고 환원하고, 요오도아세트아미드로 환원하고, 트립신으로 계내 소화하였다. 생성되는 트립신 분해 펩티드는 데이터 의존적 실험에서 미세모세관 역상 액체 크로마토그래피-하이브리드 선형 이온 트랩 (hybrid linear ion trap) 푸리에 (Fourier) 변환 이온 사이클로트론 공명 질량 분광기 (LTQ-FT; 써

모 피셔 (Thermo Fisher))에 기반한 나노 전기분무 직렬 질량 분광법에 의해 분석하였다. 직렬 질량 스펙트럼 결과는 마스코트 (Mascot) 소프트웨어 (매트릭스 사이언스 (Matrix Science))를 사용한 데이터베이스 검색을 위해 제출되었다.

[0151] 에스. 아우레우스 및 이. 콜라이 (*E. coli*)에서 발현되는 외인성 ClfA의 발현

[0152] *His-태깅된 ClfA의 에스. 아우레우스 발현*: 응괴 인자-A (ClfA) 유전자를 신호 서열을 코딩하는 서열로부터 USA300 계놈 DNA로부터 LPXTG 모티프 내의 글리신을 코딩하는 서열까지 PCR 증폭하였다. c-말단 His 태그는 LPXTG 모티프의 말단에서 조작되었고, pTet 에스. 아우레우스 발현 벡터 (제넨테크 (Genentech)의 pSAS10) 내로 라이게이션되었다. 이어서, 생성되는 구성체를 에스. 아우레우스 WT RN4220 내로 전기천공하였다. 전기천공된 RN4220 또는 전기천공되지 않은 (empty) RN4220 (pTet 발현 벡터를 함유하지 않는)의 20 ml 배양액을 철야 배양액으로부터 접종하고 (0.15의 OD₆₀₀에서 출발), 1 hr 동안 트립티카제 대두 브로쓰 (TSB)에서 성장시킨 후, 안히드로테트라사이클린 (200 ng/ml)으로 단백질 발현을 2 hr 동안 유도하였다. 유도 기간 종료시에, 에스. 아우레우스 배양액을 리소스타핀 (50 µg/ml)으로 미리 용해시킨 후, 추가로 용해 버퍼 (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 1% 트리톤-X, 및 로슈 프로테아제 억제제 EDTA-미함유 정제)에서 비드로 두드려 용해시켰다. 이어서, 투명한 용해물을 재조합 ClfA 단백질을 침전시키기 위해 10 mM 이미다졸의 존재 하에 1 hr 동안 4°C에서 NiNta 수지 (키아젠 (Qiagen))와 함께 인큐베이팅하였다.

[0153] *His-태깅된 ClfA의 이. 콜라이 발현*: 응괴 인자-A (ClfA) 유전자를 N-말단 신호 서열 (개시 메티오닌과 함께)을 코딩하는 서열로부터 USA300 계놈 DNA로부터 C-말단 LPXTG 모티프 내의 글리신을 코딩하는 서열까지 PCR 증폭하였다. 이어서, 증폭된 PCR 생성물을 pET 21b(+) 이. 콜라이 발현 벡터 (노바젠) 내로 c-말단 His 태그와 인 프레임으로 라이게이션하였다. 생성되는 구성체를 이. 콜라이 BL21-골드 (DE3) 적격 세포 (스트라타젠 (Stratagene)) 내로 형질전환시키고, 제조자의 지시에 따라 3.5 hr 동안 IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 유도된 이. 콜라이 배양액을 용해 버퍼 (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 1% 트리톤-X, 및 로슈 프로테아제 억제제 EDTA-미함유 정제)에서 비드로 두드려 용해시켰다. 이어서, 투명한 용해물을 재조합 ClfA 단백질을 침전시키기 위해 10 mM 이미다졸의 존재 하에 1 hr 동안 4°C에서 NiNta 수지 (키아젠)와 함께 인큐베이팅하였다.

[0154] 이. 콜라이에서 발현되는 외인성 ClfA의 발현 및 에스. 아우레우스 용해물과의 인큐베이션.

[0155] *이. 콜라이에서 에스. 아우레우스 세포 표면 SDR 단백질 ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE의 발현 및 정제*: ClfA, ClfB, SdrC, SdrD 및 SdrE 유전자를 단백질의 성숙 개시를 코딩하는 서열로부터 USA300 계놈 DNA로부터의 LPXTG 모티프 내의 글리신을 코딩하는 서열까지 PCR 증폭하고, ST239 벡터 (제넨테크) 내로 N-말단 유니자임 (Unizyme) 태그와 인 프레임으로 라이게이션하였다. 구성체를 이. 콜라이 58F3 (제넨테크) 내로 형질전환시키고, 단백질 발현을 유도한 후, 정제하였다.

[0156] *NT 유니자임 태깅된 SDR 단백질의 NiNta 포획*: 500 µg의 정제된 N-말단 유니자임 태깅된 SDR 단백질 (ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE)을 프로테아제 억제제 함유 PBS (EDTA-미함유)에 희석하고, NiNta 수지 (키아젠)와 함께 1.5 hr 동안 4°C에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 포획된 유니자임 태깅된 SDR 단백질이 존재하는 NiNta 수지를 세척 버퍼 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl; pH 8.0)로 1회 세척하였다.

[0157] *에스. 아우레우스 용해물에 의한 이. 콜라이 생산 SDR 단백질의 변형*: 25 ml 배양은 ΔPan Sdr 돌연변이체 (ClfA-ClfB-SdrCDE-null; 팀 포스터 (Tim Foster, 트리니티 칼리지 더블린)의 기증) 뉴먼 에스. 아우레우스의 철야 배양액 (0.15의 출발 OD₆₀₀)으로부터 출발하고, TSB 내에서 3 hr 동안 (지수기) 37°C, 200 rpm에서 성장시켰다. 이어서, 지수기 배양액을 1 ml의 PBS에 재현탁하고, 250 단위의 벤조나제 뉴클레아제 (노바젠)의 존재 하에 37°C에서 30분 동안 200 µg/ml 리소스타핀으로 용해시켰다. 용해물을 10분 동안 4°C에서 미세원심분리기에서 최대 속도로 침강시켜 파쇄물을 제거하였다. NiNta 포획된 이. 콜라이 SDR 단백질의 변형은 투명한 ΔPan Sdr 돌연변이체 에스. 아우레우스 용해물과 함께 1 hr 동안 37°C에서 인큐베이팅함으로써 수행되었다.

[0158] *변형된 이. 콜라이 SDR 단백질의 웨스턴 블로팅*: 비-변형된 또는 변형된 NiNta 포획된 이. 콜라이 SDR 단백질 샘플을 이어서 세척 버퍼 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸; pH 8.0)로 3x 세척하고, 웨스턴 블로팅을 위해 준비하고, 8% Tris 글리신 겔 (인비트로젠) 상에서 이동시켰다. 웨스턴 블롯을 rF1 항체 또는 항-유니자임 항체 (제넨테크)로 블로팅하였다.

[0159] rF1의 항원으로서 SDR 도메인의 확인

[0160] MBP-SD 구성체의 에스. 아우레우스 발현: 말토스 결합 단백질 (MBP) 유전자를 성숙 단백질의 출발을 코딩하는

서열로부터 인자 Xa 절단 부위의 종료를 코딩하는 서열까지 pMAL-c5x 벡터 (뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England BioLabs) [NEB], 미국 매사추세츠주 업스위치)로부터 PCR 증폭하였다. 상이한 길이의 c-말단 His 태깅된 SD (SD, SDS, DSD, SDSD, SDSDS, SDSDSD)를 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드로서 합성하고, 함께 어닐링하여 이중 가닥 DNA를 만들었다. ClfA 유전자의 Sdr 영역을, Sdr 영역의 출발 (560D)을 코딩하는 서열 및 SD 영역의 618A 또는 709S를 코딩하는 서열 및 His 태그를 코딩하는 DNA 서열까지 각각의 플라스미드 pTet.ClfA.SD618A 또는 pTet.ClfA.SD709S (제넨테크)로부터 PCR 증폭하였다. 대조군으로서, 성숙 단백질의 출발로부터 A 도메인 (538G)의 종료를 코딩하는 서열 및 His 태그를 코딩하는 서열까지 ClfA 유전자의 A 도메인을 코딩하는 서열을 플라스미드 pTet.ClfA.Adom.538G (제넨테크)로부터 PCR 증폭하였다. 다양한 SD 삽입체 중의 하나 또는 ClfA A 도메인과 함께 MBP 삽입체는 pTet 에스. 아우레우스 발현 벡터 (제넨테크의 pSAS10) 내로 라이게이션되었다. 이어서, 생성되는 구성체를 에스. 아우레우스 RN4220 Δ 소르타제 (RN4220 배경 내의 소르타제 결실 돌연변이체 균주) 내로 전기천공시켰다.

[0161] 전기천공된 RN4220 Δ 소르타제 또는 비전기천공된 RN4220 Δ 소르타제 (pTet 발현 벡터 미함유)의 20 ml 배양액을 철야 배양액 (0.15의 출발 OD₆₀₀)으로부터 집중하고, 글루코스 (2 g/L)로 보충된 트립티카제 대두 브로쓰 (TSB)에서 1 hr 동안 성장시킨 후, 2 hr 동안 안히드로테트라사이클린 (200 ng/ml)으로 단백질 발현을 유도하였다. 유도 시간 종료시에, 에스. 아우레우스 배양액을 컬럼 버퍼 (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5 및 로슈 프로테아제 억제제 EDTA-미함유 정제)에 재현탁하고, 250 단위의 벤조나제 뉴클레아제 (노바젠)의 존재 하에 37℃에서 30분 동안 200 μg/ml 리소스타핀으로 용해시켰다. 용해물을 10분 동안 4℃에서 미세원심분리기에서 최대 속도로 침강시켜 과재물을 제거하였다. 발현된 MBP-SD 단백질을 포획하기 위해서 투명해진 용해물을 1.5 hr 동안 4℃에서 1 mM의 최종 EDTA 농도에서 아밀로스 수지 (NEB)와 함께 인큐베이팅하였다.

[0162] 에스. 아우레우스 발현 MBP-SD 구성체의 웨스턴 블로팅: 포획된 MBP-SD 단백질이 존재하는 아밀로스 수지를 컬럼 버퍼로 3회 세척하고, 웨스턴 블로팅 분석을 위해 추가로 준비하고, 8% Tris-글리신 겔 상에서 이동시켰다. 웨스턴 블롯을 rF1 항체, 항-펜타 His 항체 (퀴아젠) 또는 항-MBP 항체 (NEB)로 블로팅하였다.

[0163] 결과

[0164] rF1은 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스 내의 SDR (Ser-Asp-반복체) 단백질의 특유한 패밀리에 반응한다.

[0165] 시판되는 타이코산 제제 및 에스. 아우레우스 (USA300 균주)의 세포벽 용해물 (WTA)을 면역침전 후에 rF1에 대한 결합에 대해 시험하였다. rF1은 시판되는 타이코산 제제 (도 6a, 좌측 패널) 및 에스. 아우레우스의 세포벽 용해물 (도 6b, 좌측 패널)의 몇몇 성분에 결합한다. 질량 분광법을 이용하여, WTA 제제 및 세포벽 용해물의 이들 성분은 ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD 및 SdrE로서 확인되었다 (도 6a, 우측 패널 및 도 6b, 우측 패널).

[0166] 에스. 에피테르미디스의 세포벽 용해물을 면역침전 후에 rF1에 대한 결합에 대해 시험하였다. 도 6c (좌측 패널)는 에스. 에피테르미디스의 세포벽 용해물의 몇몇 성분에 대한 rF1의 결합을 보여준다. 이들 성분은 대조군 항체에서는 확인되지 않았다. 질량 분광법을 이용하여, 이들 세포벽 성분은 SdrF, SdrG 및 SdrH로 확인되었다 (도 6c, 우측 패널).

[0167] 에스. 아우레우스 및 이. 콜라이에서 외인성 ClfA 발현

[0168] 에스. 아우레우스에서 발현된 외인성 ClfA는 rF1에 반응성인 반면에, 이. 콜라이에서 발현된 ClfA는 그렇지 않았다 (도 7a). 그러나, 이. 콜라이 발현 Sdr 단백질 ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD 및 SdrE와 에스. 아우레우스 용해물을 인큐베이션하면 rF1 반응성이 다시 확보되었다 (도 7b).

[0169] rF1은 에스. 아우레우스에서 발현된 SDR 도메인에 결합한다.

[0170] rF1 항체는 에스. 아우레우스에서 발현되는 ClfA 560D-618S 및 ClfA 560D-709S로 구성되는 ClfA Sdr 영역 (도 8)에 결합한다. rF1은 ClfA의 A-도메인에 또는 3개 이하의 SD 반복체로 구성되는 작은 펩티드 서열에는 결합하지 않는다.

[0171] 실시예 4

[0172] 방법

[0173] rF1의 가변 영역의 pRK 벡터 내로의 클로닝

- [0174] 퓨전 (Phusion) DNA 중합효소, 제한 효소 EcoRV, KpnI, PvuII, ApaI, AgeI, 및 AhdI, T4 DNA 리가제를 뉴 잉글랜드 바이오랩스 (미국 매사추세츠주 입스위치)로부터 구입하였다. Pfu DNA 중합효소, 퀵 체인지 (Quick change) II 부위 지정 돌연변이 유발 키트는 스트라타젠/애질런트 테크놀로지스 (Agilent Technologies, 미국 캘리포니아주 산타 클라라)로부터 구입하였다. 2% 아가로스 겔은 인비트로젠 (미국 캘리포니아주 칼스바드)으로부터 구입하였다. pRK 벡터 pRK.LPG3.HuKappa 및 pRK.LPG4.HumanHC는 제넨테크/로슈 (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 입수하였다.
- [0175] pCPEO 벡터로부터의 rF1 Mab의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 pRK 포유동물 발현 벡터 내로 도입하였다. 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)을 표준 PCR 절차를 따라 Pfu DNA 중합효소를 사용하여 50 μ l의 총 부피에서 수행하였다. V_H 는 프라이머
- YiHCF) 5'-
ATG GCT GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT G-3' (서열 18) 및 YiHCR2 5'-
GAA CAC GCT GGG GCC CTT GGT GCT GGC ACT CGA GAC TGT GAC CAG GGT
GCC AGG T*CC CCA G-3' (서열 19)
- [0176]
- [0177] (PvuII 및 ApaI의 제한 부위는 밑줄로 표시하고, *은 내부 ApaI 부위를 제거하기 위한 단일 뉴클레오티드 G에서 T로의 변화를 나타낸다)를 사용하여 증폭하였고, V_L 은 프라이머
- YiLCF 5'-CGG CTC
GAC CGA TAT CCA GCT GAC CCA GAG-3' (서열 20) 및 YiLCR 5'-GAT TTC
CAG CTT GGT ACC CTG GCC G-3' (서열 21)
- [0178]
- [0179] (EcoRV 및 KpnI 부위는 밑줄로 표시한다)를 사용하여 증폭하였다. 각각 393 (V_H) 및 328 (V_L) bp의 특유한 PCR 생성물을 V_H 에 대해 PvuII 및 ApaI에 의해, V_L 에 대해 EcoRV 및 KpnI에 의해 직접 소화한 후, 겔 정제 (인비트로젠, Catalog# K2100-12)를 수행하였다. V_H 및 V_L 을 T4 DNA 리가제를 사용하여 중쇄에 대해 pRK/PvuII, ApaI 및 경쇄에 대해 pRK/EcoRV, KpnI의 pRK 벡터 단편 내로 개별적으로 라이게이팅하였다. DNA 플라스미드는 제한 효소 소화 패턴에 의해 확인되었다. 즉, rF1 V_H 는 AgeI에 의한 ~300 bp 및 5.8 kb 밴드를 방출하고, rF1 V_L 은 2% 아가로스 겔 상에 AhdI에 의한 2.3 및 3.1 kb 밴드를 보였다.
- [0180] 화학적 스트레스 시험
- [0181] 항체 1차 서열 데이터를 실험에서 관찰된 분해 사건과 비교함으로써, 특정 서열 모티프가 분해 (즉, DD, DG, 및 DS 서열에서의 아스파르트레이트 이성체화 및 NG 서열에서의 아스파라긴 탈아미드화)되기 쉬울 수 있음이 분명해졌다. 그러한 분해 "다발 부위 (hot spot)"가 항체의 CDR에서 나타날 경우, 결합 및 효능은 부정적인 영향을 받을 수 있다. 다발 부위를 함유하는 분자에 대해, 화학적 스트레스 시험은 항체를 플랫폼 (platform) 제형 버퍼 내에 넣고 대조군 샘플을 40°C에서 2주 동안 스트레스 하에 둔 것과 비교함으로써 이들 모티프의 분해에 대한 취약성을 평가하는 방법을 제공한다. 분해가 관찰되면, 1차 서열은 다발 부위를 제거하도록 재조작될 수 있다.
- [0182] 샘플을 2주 동안 40°C에서 스트레스 하에 둔 후에, 분해가 발생하는 부위와 양을 평가하기 위해 다양한 분석 방법을 수행한다. 전하 변이체를 조사하기 위해 영상화 모세관 등전 포커싱 (imaged capillary isoelectric focusing (icIEF)) 분석을 수행하고, 무손상 및 감소된 항체 질량을 질량 분광법을 사용하여 확인하였고, 부위-특이적 분해 정보를 얻기 위해 LC-MS/MS 펩티드 지도를 수행하였다.
- [0183] 돌연변이 유발
- [0184] rF1 pRK 플라스미드는 퀵 체인지 II 부위-지정 키트를 통해
- FHV 5'-
GGT GGC CAG CAT CAA CAG CGG CAA CAA CCC CTA CTA CG-3' (서열 22)
및 RHV 5'-CGT AGT AGG GGT TGT TGC CGC TGT TGA TGC TGG CCA
CC-3' (서열 23)
- [0185]
- [0186] (돌연변이 유발 부위는 밑줄로 표시한다)을 사용하여 중쇄 CDR2 내의 N (AAC) 53S (AGC)에 의해 rF1 Mab를 안정

화하기 위해 일련의 부위-지정 돌연변이 유발을 겪었다. 돌연변이 유발 변이체의 서열을 결정하였다.

[0187] 결과

[0188] 항체 rF1의 1차 서열은 경쇄 CDR2 내에 하나의 잠재적인 아스파라긴 탈아미드화 부위를 함유하였다: NNGNN (서열 24) 스트레스 시험은 N53 (카바트 (Kabat, 1991)에 따른 넘버링)에서 스트레스 하에 둔 샘플의 탈아미드화 증가를 보여주었다. 중쇄 CDR2에서 N (AAC, (서열 25))의 53S (AGC, (서열 26)) 치환에 의해 rF1 Mab를 안정화하기 위해 부위 지정 돌연변이 유발을 수행하였다. 돌연변이 유발 변이체의 서열 결정을 통해 N53S 돌연변이를 확인하였다.

[0189] 실시예 5

[0190] 항체-약물 접합체 (ADC) 용도를 위한 Cys 변이체의 개발

[0191] rF1 pRK 플라스미드는 스트라타젠의 부위 지정 방법을 통해 rF1 thioMab의 경쇄 링커를 생성하기 위해

rF1pRK.LC(205/210)VCF (468075) 5'-GGG CCT GAG CTC GCC CTG CAC
AAA GAG CTT CAA CAG-3' (서열 27) 및 rF1pRK.LC(205/210)VCR
(468076) 5'-CTG TTG AAG CTC TTT GTC CAG GGC GAG CTC AGG CCC-3' (서열 28)

[0192]

[0193] (Cys 돌연변이체는 밑줄로 표시한다), 및 rF1 thioMab의 중쇄 링커를 제조하기 위해

rF1pRK.HCN53S.A121CF (468464) 5'-CTG GTC ACA GTC TCG ACT
TGC AGC ACC AAG GGC CCA TC-3' (서열 29) 및
rF1pRK.HCN53S.A121CR (468465) 5'-GAT GGG CCC TTG GTG CTG CAA CTC GAG
ACT GTG ACC AG-3' (서열 30)

[0194]

[0195] (Cys 돌연변이체는 밑줄로 표시한다)의 올리고뉴클레오타이드를 사용한 일련의 부위 지정 돌연변이 유발을 겪었다. 경쇄 V205C 및 중쇄 A114C는 변이체의 서열 결정에 의해 확인되었다 (도 9).

[0196] 도면의 간단한 설명

[0197] 도 1: 항체 F1의 중쇄 및 경쇄 서열

[0198] 도 2: F1 항체는 몇몇 그람-양성 박테리아로부터의 LTA 제제에 결합한다. (a) LTA 제제는 시그마사의 것이고, 마우스 폴리클로날 항-LTA를 사용한 포획 ELISA에서 시험됨, (b) 피셔 (W. Fischer)의 고도로 정제된 LTA 제제 세트. D25 (인간 항-RSV 항체)는 비-특이적 음성 대조군으로서, 마우스 모노클로날 항-LTA 항체는 양성 대조군으로서 사용되었다.

[0199] 도 3: 재조합 F1 항체는 에스. 아우레우스에는 결합하지만, 에스. 뉴모니아에는 결합하지 않는다. (a) 박테리아를 F1 항체, 또는 대조군 IgG (D25, 인간 항-RSV 항체)와 함께 또는 제1 항체의 부재 하에 (IgG-PE 단독) 인큐베이션하였다. 세척 후에 2차 항체를 첨가하였다 (IgG-PE). (b) 6개의 임상 단리물을 F1의 결합에 대해 2개의 별개의 실험에서 시험하였다. PVL+ 균주 (SA-1), 3개의 보통의 균주 (SA-2, SA-3 및 SA-4), 및 2개의 MRSA 균주 (SA-5 및 SA-6)가 시험되었다.

[0200] 도 4: (a) rF1 항체의 14 에스. 아우레우스 균주에 대한 결합. (b) rF1 항체는 에스. 에피테르미디스에는 결합하지만, 바실루스 서브틸리스, 엔테로코쿠스 파에칼리스 (*Enterococcus faecalis*), 리스테리아 모노시토게네스 및 스트렙토코쿠스 피오게네스에는 결합하지 않는다.

[0201] 도 5: (a) rF1 항체는 상이한 성장 단계에서 MRSA에 결합한다, Iso C: 이소형 대조군, Med: 배지 대조군, (b) rF1 항체는 감염된 조직으로부터 단리된 MRSA에 결합한다.

[0202] 도 6: rF1 항체는 SDR 단백질에 결합한다. (a) 에스. 아우레우스 (Wood 46 균주)의 시판되는 타이코산 제제와 rF1 또는 이소형 대조군 항체의 면역침전 (IP), 이어서 rF1 항체를 사용한 웨스턴 블로팅 (좌측) 및 rF1 항체에 의해 결합된 WTA 제제로부터의 단편의 질량 분광 분석 (우측), (b) 에스. 아우레우스 (USA300 균주)의 세포벽 용해물과 rF1 또는 대조군 항체의 면역침전 (IP), 이어서 rF1 항체를 사용한 웨스턴 블로팅 (WB) (좌측) 및 rF1 항체에 의해 결합된 세포벽 단편 (USA300 균주)의 질량 분광 분석 (우측), (c) 에스. 에피테르미디스의 세포벽 용해물과 rF1 또는 이소형 대조군 항체의 면역침전, 이어서 rF1 항체를 사용한 웨스턴 블로팅 (좌측), rF1 항체에 의해 결합된 세포벽 단편의 질량 분광 분석 (우측).

- [0203] 도 7: 에스. 아우레우스 및 이. 콜라이에서 발현된 SDR 단백질에 대한 rF1의 결합. (a) 항-His (좌측) 및 rF1 (우측) 항체를 사용하여 과다발현된 His-태깅된 ClfA를 함유하는 에스. 아우레우스 및 이. 콜라이 용해물의 웨스턴 블로팅. (b) His-태깅된 ClfA, ClfB, SdrC, SdrD 및 SdrE를 함유하는 이. 콜라이 세포 용해물의 웨스턴 블로팅, 이어서 에스. 아우레우스 용해물과 rF1 (상부) 또는 항-His (하부) 항체의 인큐베이션.
- [0204] 도 8: rF1은 에스. 아우레우스에 의해 발현된 SDR 도메인에 결합한다. 에스. 아우레우스에 의해 발현되고 rF1에 대한 결합에 대해 시험된 구성체 (좌측), 항-MBP (말토스 결합 단백질), 항-His 및 rF1 항체를 사용한, 발현된 구성체를 함유하는 에스. 아우레우스 용해물의 웨스턴 블롯 (우측).
- [0205] 도 9: 항체 rF1의 중쇄 A114C (a) 및 경쇄 V205C (b) 변이체의 서열. 카바트 (Kabat (1991))에 따른 넘버링, 박스: CDR.
- [0206] <참고문헌>
- Diehl S.A. et al. J Immunol 180, 4805-4815 (2008)
- Greenberg J.W. et al. Infection and Immunity 64, 3318-3325 (1996)
- Jaleco A.C. et al. Blood 94, 2637-2646 (1999)
- Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)
- Keller R. et al. Infect Immun 60, 3664-3672 (1992)
- Kwakkenbos M et al. Nat Med accepted for publication (2009)
- Moran et al. NEMJ 355, 666-674 (2006)
- Polotsky V.Y. et al. Infection and Immunity 64, 380-383 (1996)
- Scheeren F.A. et al. Nat Immunol 6, 303-313 (2005)
- Shvarts A. et al. Genes Dev 16, 681-686 (2002)
- Weidenmaier C. et al. Nat Rev Microbiol 6, 276-287 (2008)
- [0207]

도면

도면1a

MRSA F1 클론

NB: 카바트 등 (Kabat et al., 1991)에 따른 CDR 넘버링

중쇄

유전자 분절로부터 재조합됨:

IGHV3-23*01

IGHD6-19*01

IGHJ4*02

아미노산:

Fw1 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS

CDR1 RFAMS

Fw2 WVRQAPGRGLEWVA

CDR2 SINNGNNPYYARSVQY

Fw3 RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK

CDR3 DHPSSGWPTFDS

Fw4 WPGTTLVTVSS

뉴클레오타드:

Fw1 gag gtg caa ctg ttg gag tcg ggg ggg ggc ttg gtg cag ccg ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc

tgt gca gcc tct gga ttc acc ctt agc

CDR1 cgc ttt gcc atg agc

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca gga agg gga ctg gaa tgg gtc gca

CDR2 tcg atc aat aat ggg aat aac cca tac tac gca cgg tcg gta caa tac

도면1b

Fw3 cgc ttc acc gtc tcc cgg gac gtc tcc cag aac act gtg tct ctg cag atg aac aac ctg aga gcc
gaa gac tcg gcc aca tat ttc tgt gct aaa

CDR3 gat cac cct agt agt ggc tgg ccc acc ttt gac tcc

Fw4 tgg ggc ccg gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg

경쇄

유전자 분절로부터 재조합됨:

IGKV1-5*03

IGKJ2*01

아미노산:

Fw1 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC

CDR1 RASENVGDWLA

Fw2 WYRQKPGKAPNLLIY

CDR2 KTSILES

Fw3 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC

CDR3 QHYIRFPYT

Fw4 FGQGTKLEIKRTV

뉴클레오타드:

Fw1 gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc gcc ctg cct gca tct gtg gga gac aga gtc agc atc act
tgt

CDR1 cgg gcc agt gaa aac gtt ggt gac tgg ttg gcc

Fw2 tgg tat cgg cag aaa ccg ggg aaa gcc cct aat ctt ctc atc tat

CDR2 aag aca tct att cta gaa agt

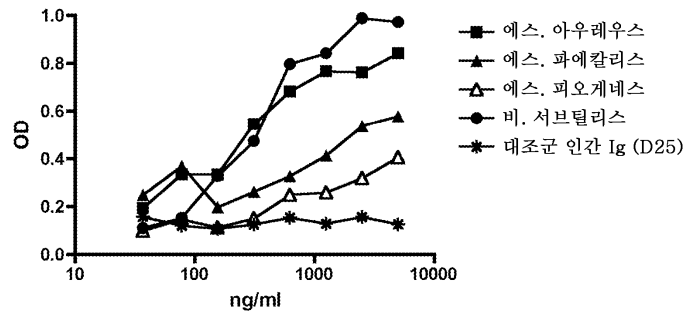
Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc
ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 caa cac tat ata cgt ttc ccg tac act

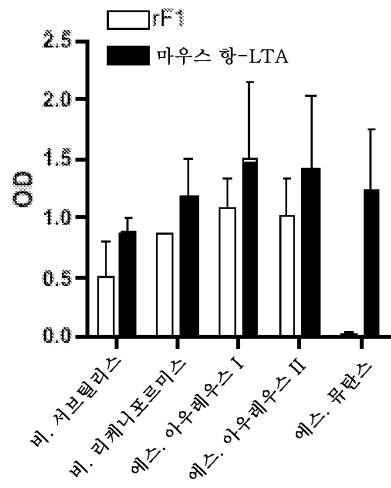
Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg

도면2a

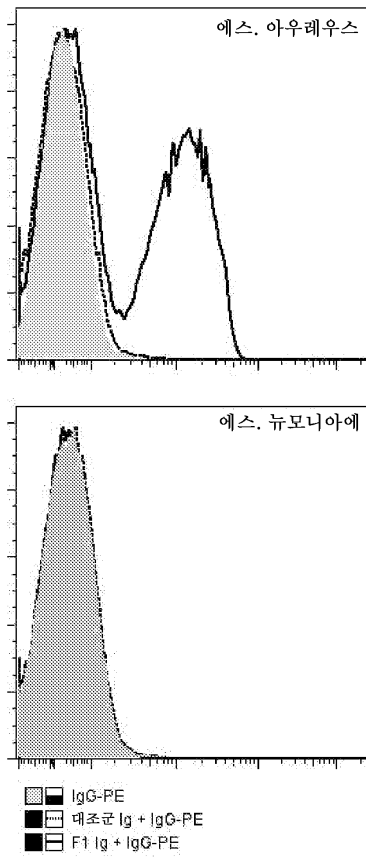
상이한 그람 양성 박테리아로부터의 LTA 제제의 rF1 인식



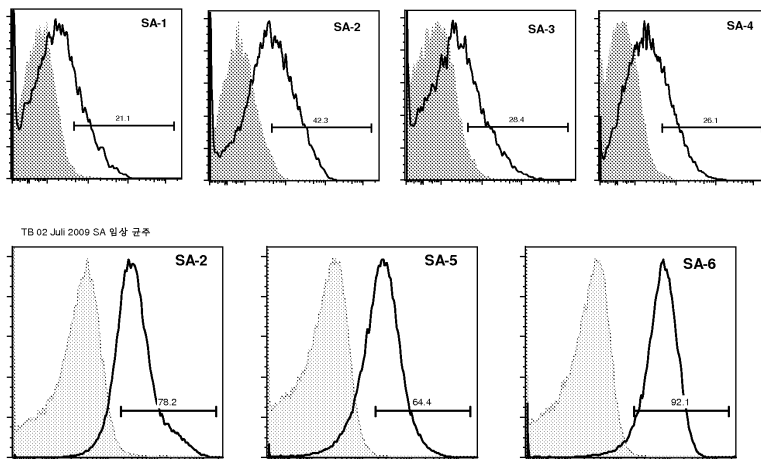
도면2b



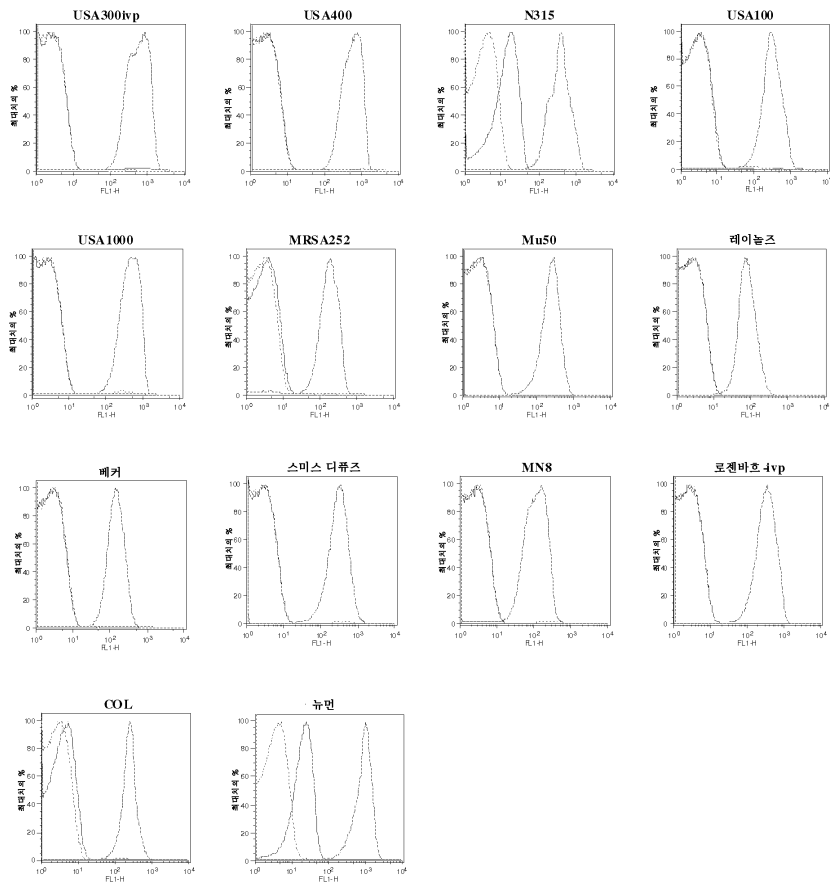
도면3a



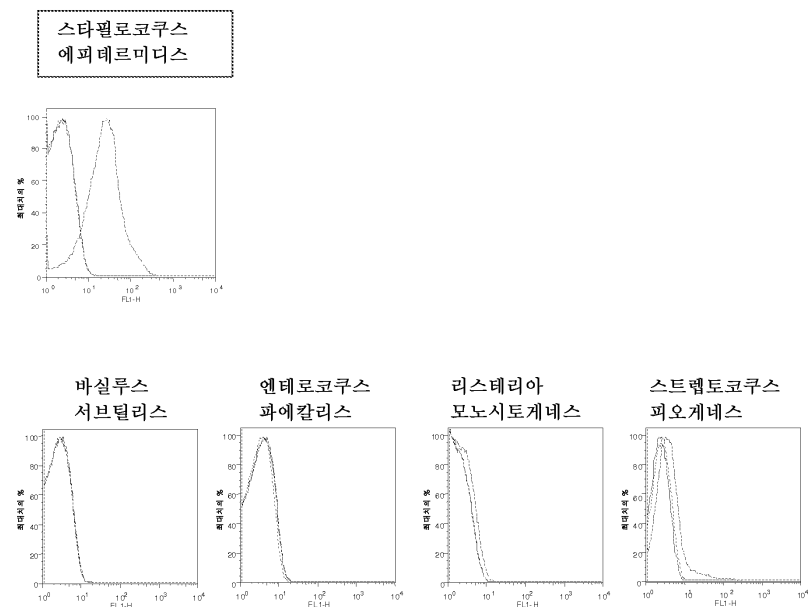
도면3b



도면4a



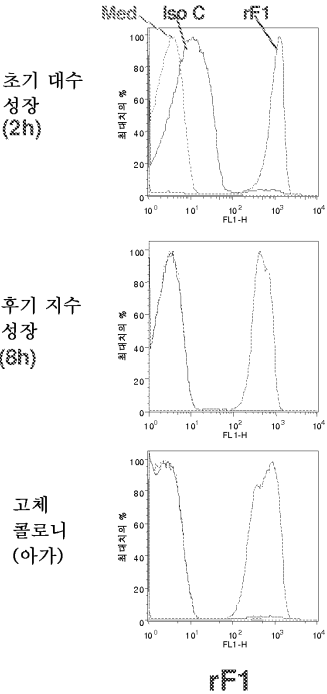
도면4b



도면5

A

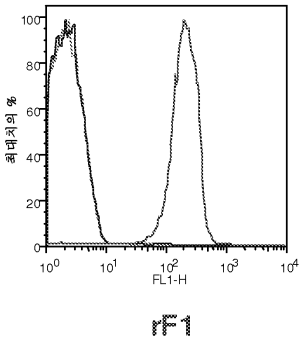
시험관내 MRSA



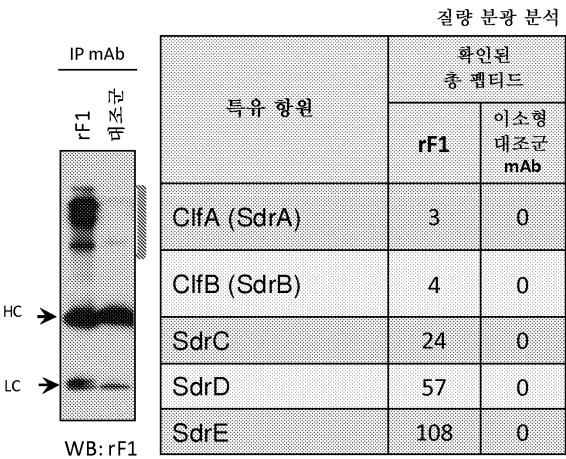
B

생체내 MRSA

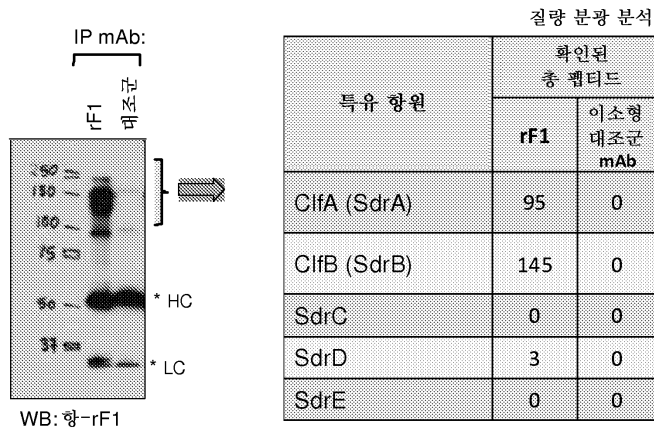
마우스의 전신 감염;
신장 균질화;
FACS 분석



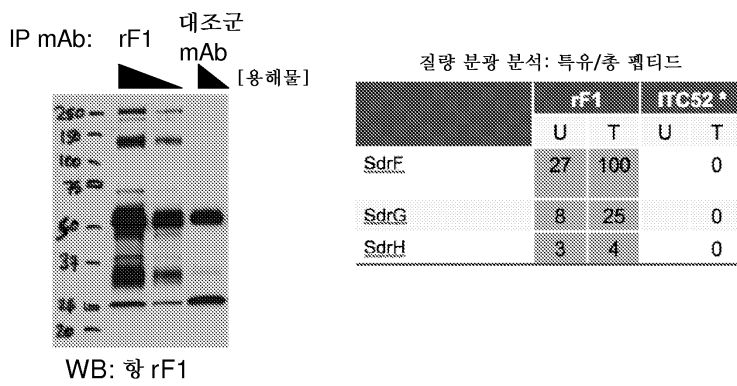
도면6a



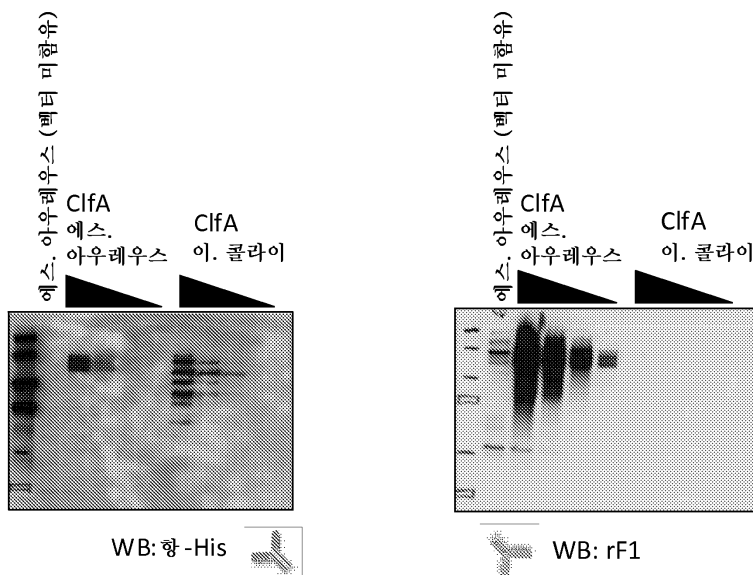
도면6b



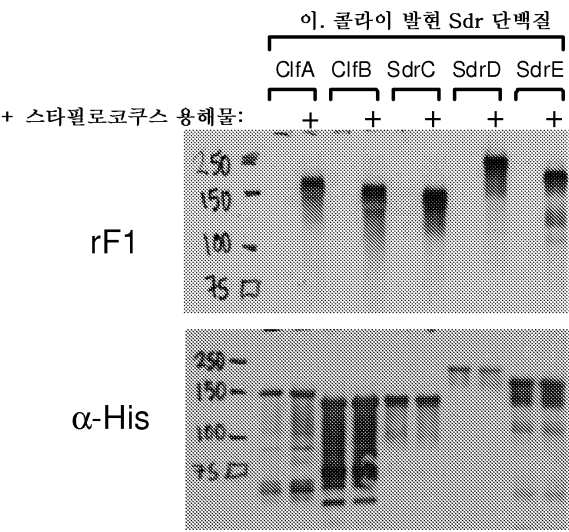
도면6c



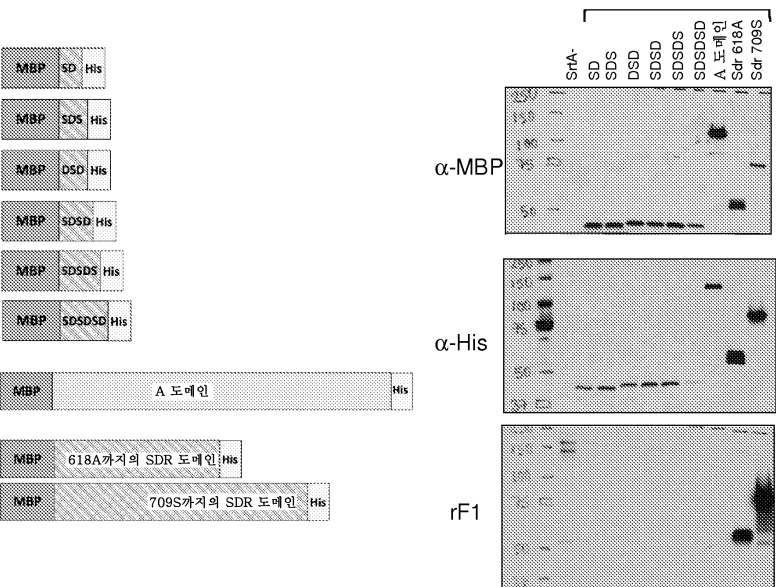
도면7a



도면7b



도면8



도면9a

rf1 중세 rf1 A114C	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T L S R F A M																															
	rf1 A114C																															
rf1 중세 rf1 A114C	35 A B 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 S . . W V R Q A P G R G L E W V A S I N N G N N P Y Y A R S V																															
	rf1 A114C																															
rf1 중세 rf1 A114C	64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 Q Y R F T V S R D V S Q N T V S L Q M N N L R A E D S A T Y F C A K																															
	rf1 A114C																															
rf1 중세 rf1 A114C	95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 A B C D E D H P S S G W P T F D S W G P G T L V T V S S																															
	rf1 A114C																															
rf1 중세 rf1 A114C	114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 A S T K G P S V F P L A P S S K S . . T S G G T A A L G C L V K D Y																															
	rf1 A114C																															
rf1 중세 rf1 A114C	148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 F P E P V T V . S W N S G A L T S G . V H T F P A V L Q S .																															
	rf1 A114C																															
rf1 중세 rf1 A114C	182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T . . Q . T Y I C N V N H K P S																															
	rf1 A114C																															
rf1 중세 rf1 A114C	216 217 218 219 A 220 221 222 223 A B C 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 N T K V . D K R V E P K S C . D . . K T H T C P																															
	rf1 A114C																															

도면9b

F1 9號	F1 V205C	1	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	A	L	P	A	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	R	A	S	E	N	V	G	D	W
		2	I	Q	L	T	Q	S	P	S	A	L	P	A	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	R	A	S	E	N	V	G	D	W	
F1 9號	F1 V205C	33	L	A	W	Y	R	Q	K	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	K	T	S	I	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E
		34	L	A	W	Y	R	Q	K	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	K	T	S	I	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E
F1 9號	F1 V205C	71	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	H	Y	M	R	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T
		72	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	H	Y	M	R	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T
F1 9號	F1 V205C	103	K	V	E	I	K	.	R	T	.	A	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	
		104	K	V	E	I	K	.	R	T	.	A	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	
F1 9號	F1 V205C	138	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L
		139	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L
F1 9號	F1 V205C	176	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	.	K	S	F	N	R	G
		177	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	.	K	S	F	N	R	G
F1 9號	F1 V205C	213	E	C	
		214	E	C	
F1 9號	F1 V205C	215	E	C	
		216	E	C	

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BEAUMONT, Tim
KWAKKENBOS, Mark Jeroen
BROWN, Eric J.
MORISAKI, John Hiroshi
HAZENBOS, Wouter L.W.
MARIATHASAN, Sanjeev
KAJIHARA, Kimberly
XIA, Yi

<120> GRAM-POSITIVE BACTERIA SPECIFIC BINDING

COMPOUNDS

<130> 146392008240

<150> PCT/NL2010/050456

<151> 2010-07-15

<150> US 61/225,878

<151> 2009-07-15

<150> EP 091655589

<151> 2009-07-15

<160> 66

<170>

FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> CDR1 Heavy Chain

<400> 1

Arg Phe Ala Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> CDR2 Heavy Chain

<400> 2

Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln Tyr

1 5 10 15

<210> 3

<211> 12

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> CDR3 Heavy Chain

<400> 3

Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> CDR1 Light Chain

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> CDR2 Light Chain

<400> 5

Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> CDR3 Light Chain

<220><221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = M or I

<400> 6

Gln His Tyr Xaa Arg Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Anitbody Variant Heavy Chain

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln

50 55 60

Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Antibody Variant Light Chain

<220><221> VARIANT

<222> 92

<223> Xaa = M or I

<400> 8

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Xaa Arg Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Antibody Variant Heavy Chain

<400> 9

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

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
 50 55 60
 Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Antibody Variant Light Chain

<220><221> VARIANT

<222> 92

<223> Xaa = M or I

<400> 10

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Xaa Arg Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Antibody Variant Light Chain

<220><221> VARIANT

<222> 92

<223> Xaa = M or I

<400> 11

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100	105	110
<210> 12		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic construct		
<220><223> F1 Heavy Chain CDR1		
<400> 12		
cgctttgccg tgagc		15
<210> 13		
<211> 48		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic construct		
<220><223> F1 Heavy Chain CDR2		
<400> 13		
tcatgaata atgggaataa cccatactac gcacggctcg tacaatac		48
<210> 14		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic construct		
<220><223> F1 Heavy Chain CDR3		
<400> 14		
gacacaccta gtagtggtg gccacacccc gactcc		36
<210> 15		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic construct		

<220><223> F1 Light Chain CDR1

<400> 15

cgggccagtg aaaacgttgg tgactggttg gcc 33

<210>

> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Light Chain CDR2

<400> 16

aagacatcta ttctagaaag t 21

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Light Chain CDR3

<400> 17

caacactata tacgtttccc gtacact 27

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> Primer

<400> 18

atggctgagg tgcagctggt ggagtcctg 28

<210> 19

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic construct
 <220><223> Primer
 <400> 19
 gaacacgctg gggcccttgg tgctggcact cgagactgtg accagggtgc caggtcccca 60
 g 61
 <210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic construct
 <220><223> Primer
 <400> 20
 cggctcgacc gatatccagc tgacccagag 30
 <210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic construct
 <220><223> Primer
 <400> 21
 gatttccagc ttggtaccct ggccg 25
 <210> 22
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic construct
 <220><223> Primer
 <400> 22
 ggtggccagc atcaacagcg gcaacaaccc ctactacg 38

<210> 23

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> Primer

<400> 23

cgtagtaggg gttgttgccg ctgttgatgc tggccacc

38

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> Part of CDR2 Heavy Chain to Show Amidation

<220><221> MOD_RES

<222> 2

<223> Amidation

<400> 24

Asn Asn Gly Asn Asn

1

5

<210> 25

<211> 3

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> Codon for N

<400> 25

aac

3

<210> 26

<211> 3

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<220><223> Codon for S	
<400> 26	
agc	3
<210> 27	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<220><223> Oligo	
<400> 27	
gggcctgagc tcgccctgca caaagagctt caacag	36
<210> 28	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<220><223>	
Oligo	
<400> 28	
ctgttgaagc tctttgtgca gggcgagctc aggccc	36
<210> 29	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<220><223> Oligo	
<400> 29	
ctggtcacag tctcgagttg cagcaccaag ggcccatc	38

<210> 30

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> Oligo

<400> 30

gatgggccct tgggtgctgca actcgagact gtgaccag

38

<210> 31

<211> 5

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> Motif

<220><221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 31

Leu Pro Xaa Thr Gly

1 5

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> His-tagged SD insert

<400> 32

Ser Asp Ser Asp

1

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> His-tagged SD insert

<400> 33

Ser Asp Ser Asp Ser

1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> His-tagged SD insert

<400> 34

Ser Asp Ser Asp Ser Asp

1 5

<210> 35

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Heavy Chain

<220><221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 35

gag gtg caa ctg ttg gag tcg ggg ggg ggc ttg gtg cag ccg ggg ggg 48

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

1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ctt agc cgc ttt 96

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

20	25	30	
gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca gga agg gga ctg gaa tgg gtc			144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
gca tcg atc aat aat ggg aat aac cca tac tac gca cgg tcg gta caa			192
Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln			
50	55	60	
tac cgc ttc acc gtc tcc cgg gac gtc tcc cag aac act gtg tct ctg			240
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu			
65	70	75	80
cag atg aac aac ctg aga gcc gaa gac tcg gcc aca tat ttc tgt gct			288
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala			
85	90	95	
aaa gat cac cct agt agt ggc tgg ccc acc ttt gac tcc tgg ggc ccg			336
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro			
100	105	110	
gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg			360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210> 36			
<211> 120			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic construct			
<400> 36			
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe			
20	25	30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val			

35 40 45
Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
50 55 60
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro

100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Heavy Chain FW1

<220><221> CDS

<222> (1)..(90)

<400> 37

gag gtg caa ctg ttg gag tcg ggg ggg ggc ttg gtg cag ccg ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ctt agc 90
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser
20 25 30

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Heavy Chain FW2

<220><221> CDS

<222> (1)..(42)

<400> 39

tgg gtc cgc cag gct cca gga agg gga ctg gaa tgg gtc gca 42

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 40

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 41

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Heavy Chain FW3

<220><221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 41

cgc ttc acc gtc tcc cgg gac gtc tcc cag aac act gtg tct ctg cag 48

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu Gln

1 5 10 15

atg aac aac ctg aga gcc gaa gac tcg gcc aca tat ttc tgt gct aaa 96

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys

20 25 30

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 42

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys

20 25 30

<210> 43

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Heavy Chain FW4

<220><221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 43

tgg ggc ccg gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 33

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 44

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 45

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Light Chain

<220><221> CDS

<222> (1)..(330)

<400> 45

gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc gcc ctg cct gca tct gtg gga 48

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

1 5 10 15

gac aga gtc agc atc act tgt cgg gcc agt gaa aac gtt ggt gac tgg 96

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp

20 25 30

ttg gcc tgg tat cgg cag aaa ccg ggg aaa gcc cct aat ctt ctc atc 144

Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

tat aag aca tct att cta gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192

Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gat gat ttt gca act tat tac tgt caa cac tat ata cgt ttc ccg tac 288
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Arg Phe Pro Tyr

85 90 95
 act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg 330
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

<210> 46

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 46

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Arg Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

<210> 47

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Light Chain FW1

<220><221> CDS

<222> (1)..(69)

<400> 47

gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc gcc ctg cct gca tct gtg gga 48

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

1 5 10 15

gac aga gtc agc atc act tgt 69

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys

20

<210> 48

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 48

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys

20

<210> 49

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Light Chain FW2

<220><221> CDS

<222> (1)..(45)

<400> 49

tgg tat cgg cag aaa ccg ggg aaa gcc cct aat ctt ctc atc tat 45

Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 50

Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 51

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Light Chain FW3

<220><221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 51

ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act 48

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

1 5 10 15

ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgt 96

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 52

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 53

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> F1 Light Chain FW4

<220><221> CDS

<222> (1)..(39)

<400> 53

ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg 39

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val

1 5 10

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 54

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val

1 5 10

<210> 55

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> rF1 Heavy Chain

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln

50 55 60

Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

	165	170	175												
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
	180	185	190												
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
	195	200	205												
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
	210	215	220												
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro										
225		230													

<210> 57

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> rF1 Light Chain

<400> 57

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Val	Gly
1		5						10					15		
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Asp	Trp
	20						25						30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Arg	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile
	35						40						45		

Tyr	Lys	Thr	Ser	Ile	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50				55								60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70						75				80	
Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Met	Arg	Phe	Pro	Tyr
				85						90				95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Pro

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

 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 58
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic construct
 <220><223> rF1 V205C
 <400> 58
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65						70						75						80
Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Met	Arg	Phe	Pro	Tyr			
					85						90						95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala			
					100						105						110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly			
					115						120						125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala			
					130						135						140	

Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Thr	Lys	Ser
		195					200					205			

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic construct

<400> 59

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

1

5

10

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> rF1 A114C

<400> 60

Ser Ile Asn Ser Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln Tyr

1 5 10 15

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> rF1 Heavy Chain

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> rF1 A114C

<

400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln

50											55											60																									
Tyr	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Val	Ser	Gln	Asn	Thr	Val	Ser	Leu																																
65											70											75											80														
Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala																																
															85											90											95										
Lys	Asp	His	Pro	Ser	Ser	Gly	Trp	Pro	Thr	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Pro																																
															100											105											110										
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser																																								
															115											120																					
<210> 63																																															
<211> 110																																															
<212> PRT																																															
<213> Artificial Sequence																																															

<220>
<223> Synthetic construct
<220><223> rF1 Heavy Chain
<400> 63

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10						15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35						40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

100 105 110

<210> 64

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220>

<223> Synthetic construct

<220><223> rF1 Light Chain

<400> 64

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

35 40 45

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

65 70 75 80

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

85 90 95

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

<210> 65

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> rF1 Light Chain

<400> 65

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

1 5 10 15

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

20 25 30
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 35 40 45
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 65 70 75 80
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr
 85 90 95
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100

<210> 66

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220><223> rF1 Heavy Chain

<400> 66

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

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

65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

100

105

110