



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월22일
(11) 등록번호 10-1820987
(24) 등록일자 2018년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/12 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7029208
(22) 출원일자(국제) 2011년04월15일
심사청구일자 2016년04월14일
(85) 번역문제출일자 2012년11월07일
(65) 공개번호 10-2013-0062279
(43) 공개일자 2013년06월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/032713
(87) 국제공개번호 WO 2011/130650
국제공개일자 2011년10월20일
(30) 우선권주장
61/324,503 2010년04월15일 미국(US)
61/381,669 2010년09월10일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Infection and Immunity. 2006, 74, 6339-6347.*
W02006121422 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
프로제닉스 파머슈티컬스, 인코포레이티드
미국 뉴욕주 10591 테리타운 올드 쏘우 밀 리버
로드 777
(72) 발명자
마, 당쉬
미국 10546 뉴욕 밀우드 글렌우드 로드 49
나가시마, 커스텐
미국 10595 뉴욕 발할라 웨스트 캠프릿지 스트리트 22
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
양영준

전체 청구항 수 : 총 52 항

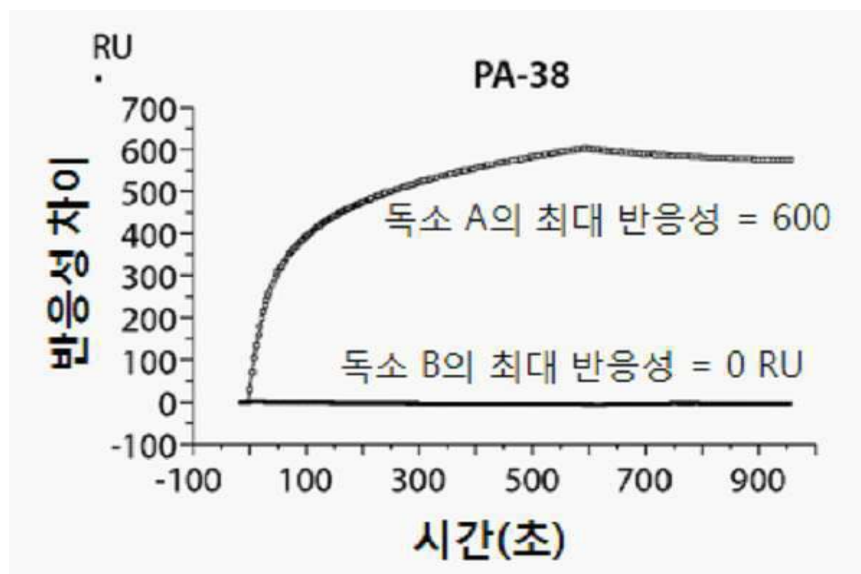
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 클로스트리듐 디피실리 관련 감염 및 질병의 치료를 위한 항체

(57) 요약

클로스트리듐 디피실리 박테리아 및 이들 박테리아에 의해 생산되는 장내독소에 의한 감염으로부터 야기되는 클로스트리듐 디피실리 감염 및 관련 질병 증상 및 병리, 예를 들어 클로스트리듐 디피실리 관련 설사를 치료하기 위한 시약, 조성물 및 치료방법이 제공된다. 특히, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B에 특이적으로 결합하고 이들 독소의 활성을 중화하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 이들 항체를 포함하는 조성물; 및 이 항체 및 조성물을 사용하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

케네디, 브라이언

미국 10598 뉴욕 요크타운 하이츠 아파트먼트 비
스트랭 불러바드 3601

도노반, 제랄드, 피.

미국 03904 메인 키티리 실버 레이크 드라이브 1

강, 윤

미국 07039 뉴저지 리빙스톤 펠스우드 드라이브 79

울손, 윌리엄, 씨.

미국 10598 뉴욕 요크타운 하이츠 로케 레인 815

쿠마르, 생카르

미국 94588 캘리포니아 플레잔톤 크랄 플레이스
3930

추루시타, 나오야

미국 94306 캘리포니아 팔로 알토 레드우드 서클
3719

마로즈산, 안드레, 제이.

미국 10571 뉴욕 포트 체스터 넘버113 웨스트체스
터 애비뉴 410

쿠포, 알버트

미국 06907 코네티컷 스탬포드 에텐 로드 361

명세서

청구범위

청구항 1

클로스트리듐 디피실리(*C. difficile*)의 독소 B와 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체 PA-41 또는 그의 항원 결합 단편, 키메라 단일클론 항체 PA-41 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 인간화 단일클론 항체 PA-41 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체가 ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체 PA-41인, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역(VL)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역(VH)이 서열번호 8 또는 서열번호 9의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역(VL)이 서열번호 10의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5

클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역(VH)이 서열번호 8의 아미노산 잔기 31 내지 36을 포함하는 CDR1, 서열번호 8의 아미노산 잔기 50 내지 66을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 8의 아미노산 잔기 99 내지 108을 포함하는 CDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역(VL)이 서열번호 10의 아미노산 잔기 24 내지 34를 포함하는 CDR1, 서열번호 10의 아미노산 잔기 50 내지 56을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 10의 아미노산 잔기 89 내지 97을 포함하는 CDR3을 포함하는, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄의 가변 영역이 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄의 가변 영역이 서열번호 8 또는 서열번호 9로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 8

제6항에 있어서, 중쇄의 가변 영역이 서열번호 8 또는 서열번호 9로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 9

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 키메라 항체 또는 인간화 항체인, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CH 영역이 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgE, 또는 IgM으로부터 선택되는 것인, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CL 영역이 카파(κ) 또는 람다(λ) 아이소타입(isotype)으로부터 선택되는 것인, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 12

제11항에 있어서, CH 영역이 IgG1인, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 분리된 항원 결합 단편이 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편 또는 Fv 단편으로부터 선택되는 것인, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주의 독소 B를 1.1^{-11} M 내지 6.5^{-10} M 범위의 EC₅₀ 값으로 중화시키는 것인 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 15

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 분리된 핵산.

청구항 16

제15항에 있어서, 서열번호 23 또는 서열번호 25에 기재된 서열을 갖는 분리된 핵산.

청구항 17

제15항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 18

제16항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 19

제15항의 핵산을 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포.

청구항 20

제16항의 핵산을 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포.

청구항 21

제17항의 벡터를 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포.

청구항 22

(i) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 항원 결합 부위; 및

(ii) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 항원 결합 부위

를 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 23

제22항에 있어서, 제2 항원 결합 부위가,

(a) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 경쇄 가변 영역(VL)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편;

(b) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9694로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 경쇄 가변 영역(VL)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 또는

(c) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 경쇄 가변 영역(VL)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것인, 이중특이성 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 24

ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주.

청구항 25

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 의한 세포에 대한 독성의 저해 또는 중화, 대상에서의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)의 치료, 또는 무증상이지만 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)에 걸리기 쉽거나 발병 위험이 있는 대상의 치료용 키트.

청구항 26

제15항의 핵산을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 의한 세포에 대한 독성의 저해 또는 중화, 대상에서의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)의 치료, 또는 무증상이지만 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)에 걸리기 쉽거나 발병 위험이 있는 대상의 치료용 키트.

청구항 27

제17항의 발현 벡터를 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 의한 세포에 대한 독성의 저해 또는 중화, 대상에서의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)의 치료, 또는 무증상이지만 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)에 걸리기 쉽거나 발병 위험이 있는 대상의 치료용 키트.

청구항 28

제19항의 숙주 세포를 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 의한 세포에 대한 독성의 저해 또는 중화, 대상에서의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)의 치료, 또는 무증상이지만 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)에 걸리기 쉽거나 발병 위험이 있는 대상의 치료용 키트.

청구항 29

제22항의 이중특이성 항체를 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 의한 세포에 대한 독성의 저해 또는 중화, 대상에서의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)의 치료, 또는 무증상이지만 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)에 걸리기 쉽거나 발병 위험이 있는 대상의 치료용 키트.

청구항 30

제23항의 이중특이성 항체를 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 의한 세포에 대한 독성의 저해 또는 중

화, 대상에서의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)의 치료, 또는 무증상이지만 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)에 걸리기 쉽거나 발병 위험이 있는 대상의 치료용 키트.

청구항 31

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 의한 세포에 대한 독성의 저해 또는 중화, 대상에서의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)의 치료, 또는 무증상이지만 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)에 걸리기 쉽거나 발병 위험이 있는 대상의 치료용 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이,

(a) ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 경쇄 가변 영역(VL)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하거나;

(b) ATCC 수탁번호 PTA-9694로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 경쇄 가변 영역(VL)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하거나; 또는

(c) ATCC 수탁번호 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 경쇄 가변 영역(VL)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이, 서열번호 5의 아미노산 잔기 31 내지 35를 포함하는 CDR1, 서열번호 5의 아미노산 잔기 50 내지 65를 포함하는 CDR2, 및 서열번호 5의 아미노산 잔기 95 내지 102를 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 7의 아미노산 잔기 24 내지 33을 포함하는 CDR1, 서열번호 7의 아미노산 잔기 49 내지 55를 포함하는 CDR2, 및 서열번호 7의 아미노산 잔기 88 내지 94를 포함하는 CDR3을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 35

제31항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 운반제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 36

제31항에 있어서, 1종 이상의 추가의 치료제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 1종 이상의 추가의 치료제가 메트로니다졸, 반코마이신, 피닥소마이신, 니타록사니드, 리팍시민, 라모플라닌, 또는 이들의 조합인 조성물.

청구항 38

제34항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 운반제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 39

제34항에 있어서, 1종 이상의 추가의 치료제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 1종 이상의 추가의 치료제가 메트로니다졸, 반코마이신, 피닥소마이신, 니타록사니드, 리팍시

민, 라모플라닌, 또는 이들의 조합인 조성물.

청구항 41

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 대상에서 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 42

제15항의 핵산을 포함하는, 대상에서 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 43

제19항의 숙주 세포를 포함하는, 대상에서 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 44

제22항의 이중특이성 항체를 포함하는, 대상에서 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 45

제23항의 이중특이성 항체를 포함하는, 대상에서 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 46

제41항에 있어서, 클로스트리듐 디피실리가 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주가 BI/NAP1/027, tcdA-/tcdB+, 외래 환자 분리체, 및 임상 분리체 중 하나 이상으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 48

제47항에 있어서, 임상 분리체가 CCL678, HMC553, Pitt45, CD196, montreal 5, montreal 7.1, MH5, Pitt2, CCL14137, UVA17, UVA30/TL42, 및 Pitt7 중 하나 이상으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 49

(a) 하나 이상의 인간이 아닌 수여 동물을 불활성 변성독소 A로 주기적 간격으로 면역화시키고;
 (b) 상기 동물을 증가된 양의 활성 독소 B로 주기적 간격으로 부스팅시키고;
 (c) 면역화되고 부스팅된 동물의 면역 세포로부터, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B를 중화시키는 항-독소 B 항체를 생산 및 분비하는, 적절히 불멸화된 세포주와 융합된 하이브리도마 세포를 얻는 것을 포함하는,
 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 대한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B-중화 단일클론 항체의 생성 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 추가로 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B-중화 단일클론 항체를 분리시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 51

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 클로스트리듐 디피실리 독소 B 저해 또는 중화에 유효한 양으로 세포를 처리하는 것을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 의한 세포에

대한 독성을 저해 또는 중화시키는 생체 외 방법.

청구항 52

제22항의 이중특이성 항체의 클로스트리듐 디피실리 독소 B 저해 또는 중화에 유효한 양으로 세포를 처리하는 것을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 의한 세포에 대한 독성을 저해 또는 중화시키는 생체 외 방법.

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

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

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2010년 4월 15일에 출원된 미국 가출원 제61/324503호 및 2010년 9월 10일에 출원된 미국 가출원 제 61/381669호로부터 35 U.S.C. § 119에 의한 우선권을 주장하고, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로서 포함된다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*) 박테리아에 의한 감염으로부터 야기될 수 있는 클로스트리듐 디피실리 감염 및 클로스트리듐 디피실리 관련 질병 상태 및 병리, 예를 들어, 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)를 치료하기 위해 사용될 수 있는 조성물 및 치료방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 이들 항체를 포함하는 조성물, 그리고 이 항체 또는 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 클로스트리듐 디피실리(또는 *C. diff.*)는 병원 감염(병원에서 얻는) 항생제-관련 설사 및 위막성(pseudomembranous) 결장염의 주요 원인을 나타내는 그람-양성의 포자-형성 혐기성 박테리아이다. 클로스트리듐 디피실리 감염은 미국에서 연간 총 750,000 건이 넘는 것으로 추정되고, 다른 모든 장내 감염을 합한 것보다 많은 사망의 원인이 된다(1). 많은 병원에서, 클로스트리듐 디피실리는 메티실린-내성 스타필로코쿠스 아우레우스(MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) 또는 어떤 다른 박테리아보다도 환자에게 큰 위협이 되고 있다(2). 클로스트리듐 디피실리 관련 질병(CDAD)의 관리를 위한 연간 비용은 미국에서 32억불이 넘는 것으로 추산된다(3). 증가된 병독성 또는 항생제 내성을 갖는 클로스트리듐 디피실리 균주의 최근 발생은 치료 실패, 보다 빈번한 재발 및 치사율 증가로 이어진다(4).

[0004] CDAD는 전형적으로 클린다마이신, 세팔로스포린 및 플루오로퀴놀론과 같은 항생제의 사용을 통한 결장 균총의 붕괴에 의해 유도된다(3, 8). 클로스트리듐 디피실리 포자에 대한 노출과 함께 결장 미소환경에서의 이러한 교란은 군집화로 이어진다. 군집화된 모든 환자의 약 1/3은 CDAD를 발현하는데(9), 이는 심한 설사, 결장의 천공, 결장 절제 및 사망을 야기할 수 있다(10). CDAD는 소화관에서 클로스트리듐 디피실리의 획득과 증식으로부터 야기되며, 여기에서 클로스트리듐 디피실리 박테리아는 CDAD의 두 가지 중요한 병독성 인자인 독소 A 및 독소 B를 생산한다. 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및 B는 상당한 서열 및 구조적 상동성을 보인다. 둘 다 다중 반복 서열을 포함하는 C-말단 수용체-결합 영역, 중앙의 소수성 영역 및 N-말단 글루코실트랜스페라제 영역을 갖는다. 수용체-결합 영역은 인간에서 거의 정의되지 않고 있는 숙주 수용체를 통해 장내 상피 세포에 대한 독소의 결합을 증대한다. 엔도솜 경로를 통한 내재화 이후, 중앙의 소수성 영역은 엔도솜 멤브레인으로 삽입된다. 엔도솜의 산성 pH는 포어 형성 및 독소의 아미노-말단 영역의 세포질로의 전좌를 촉발시킨다. 세포질 표적 Rho GTPase의 당화는 세포골격의 파괴 및 세포 사멸을 유도한다. 독소 A 및 B는 질병 원인에 있어서 잠재적 시너지를 갖는 다른 병리학적 프로파일을 나타낸다.

[0005] 병독성 클로스트리듐 디피실리 균주의 최근 발생은 중증 질병의 증가율, 보다 빈번한 재발 및 사망률 증가로 귀결되었다. 병독성 균주의 하나인 BI/NAP1/027 독소타입 III은 역사적으로 드물었지만 지금은 유행성이다. BI/NAP1/027과 같은 병독성 균주는 비-병독성 클로스트리듐 디피실리 균주보다 몇 배 더 많은 독소 A 및 독소 B를 생산하여, 이들 균주를 감염 이후 치료를 어렵게 만든다. 통상적으로 사용되는 항미생물제 및 항생제에 대한 병독성 균주의 내성은 이들 균주를 치료하고 억제하기 더욱 어렵게 만드는 점차 커지는 문제이므로, 병독성 클로스트리듐 디피실리 분리종과 관련된 질병의 재발 및 병독성과 싸우기 위해서는 추가적인 치료적 접근과 더욱 강력한 치료가 필요하다.

[0006] 클로스트리듐 디피실리 감염에 대한 근래의 항생제 치료는 반코마이신 및/또는 메트로니다졸의 사용을 포함하는데; 그러나 이들 항생제는 불완전한 반응률 및 증가하는 재감염 및 재발률에 의해 제한된다. 2000년 이후, 메트로니다졸 치료에서는 실질적으로 보다 높은 실패율이 보고되고 있다(23-25). 항생제 치료 이후의 높은 재발률은 정상 결장 균총의 계속적인 붕괴로 클로스트리듐 디피실리에 경쟁 없이 복구될 기회를 주는 것으로부터 야기될

수 있다(26-28). 재발 위험성은 이미 한번의 재발이 있었던 환자에서 증가하며, 초기 병력 후 약 20%에서부터 2 회 이상의 재발 후 60% 넘게 상승한다(29, 30). 이러한 증가되는 재발 위험은 적절한 항독소 항체 반응에 도달 하는 데 실패한 것과 관련된다(31). 실제로, 항미생물제 치료 종결시 최고 역가의 혈청 IgG 항독소를 갖는 환자는 감소된 재발률을 보였다(32). 별개의 연구에서, 혈청 항독소 B 항체 농도는 재발성 CDAD로부터의 보호와 상 관관계가 있었다(33).

[0007] 클로스트리듐 디피실리 감염의 유병률은 꾸준히 증가하고 있으며, 특히 종종 쇠약한 노인층에서 그러하다. 클로 스트리듐 디피실리 감염 환자의 약 1/3은 보통 최초 질병의 2개월 이내에 감염의 재발이 일어난다. 반복적인 감 염은 원래의 질병보다 더욱 심한 경향이 있으며; 종종 보다 치명적이다. 나이 든 성인 및 약화된 면역 체계를 갖는 사람들은 특히 재발되는 감염에 취약하다. 신속하고 적절하게 치료 받지 않을 경우, 탈수, 신부전, 장 천 공, 독성 거대결장증을 포함하는 클로스트리듐 디피실리 감염의 합병증은 결장 파열 및 사망으로 이어질 수 있 다.

[0008] 비록 미국에서는 클로스트리듐 디피실리 감염이 입원 중인 환자에 의해 얻어지는 가장 통상적인 감염이라 하더 라도, 병원 외부의 지역사회에서 얻어질 수도 있다. 미국에서는 매년 지역사회에서 20,000 건의 클로스트리듐 디피실리 감염이 일어난다고 추정된다. 국제적으로, 발생 정도는 매우 다양하고, 진단을 분명히 하기 위해 사용 되는 내시경의 빈도, 항미생물제 사용 패턴 및 역학적 패턴을 포함하는 복합적인 요인에 의존한다.

[0009] 따라서, 클로스트리듐 디피실리 감염에 의해 야기되는 질병이 병원과 전체 지역사회 양쪽에서 모든 연령층의 사 람들의 생명을 위협하는 것은 명백하다. 오늘날 세상에는, 입원에 직면하거나 장기간 병원 치료를 받는 사람들 에게 클로스트리듐 디피실리 감염의 위험이 항상 존재한다. 병원 환경 외부에서 클로스트리듐 디피실리 감염에 걸릴 가능성도 있기 때문에, 소아 및 유아가 이 질병에 걸릴 가능성은 크다. 또한, 클로스트리듐 디피실리를 치 료하기 위해 사용되는 현재의 항생제 요법은 최적 효과에 미치지 않을 가능성이 있다. 클로스트리듐 디피실리 관련 질병이 있는 환자들은 집중적인 입원 치료와 장기간의 병원 입원을 필요로 한다. 클로스트리듐 디피실리 관련 질병자에 필요한 고도의 지원을 받는 병원 처치 및 치료와 관련된 비용은 막대하고, 많은 수의 의사 및 간 호사, 실험실 시험 및 모니터링, 수반되는 치료 및 추가의 보조 수단과 같은 비싼 자원을 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 결과적으로, 클로스트리듐 디피실리에 의해 야기되는 생명을 위협하는 질병, 그리고 특히 클로스트리듐 디피실 리에 의해 생산되는 강력한 독소를 표적으로 하는 예방 및 치료적 이익을 위한 보다 효과적인 치료, 약물 및 처 치에 대한 요구가 있다. 내성을 일으킬 가능성이 더 낮고 성공적인 환자 반응 및 질병 해결 가능성이 높아 질병 박멸로 유도하는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병에 대한 성공적이고 지속적인 치료에 대한 충족되지 않은 의 학적 요구가 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 적어도 부분적으로, 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및/또는 독소 B 항체를 포함하는 새로운 항체 시약 및 조성물을 제공한다. 본 시약 및 조성물은 클로스트리듐 디피실리 관련 감염 및 질병에 이환된 증가된 숫자의 대상을 치료하고, 개선된 삶의 질을 제공하고 CDAD 및 클로스트리듐 디피실리 감염을 해결하고 이들 감 염된 개개인의 생존을 돕는 데 유익할 수 있다.

[0012] 일 양태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하고 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체와 클로스트리듐 디피실리의 독소 A의 결 합에 대하여 교차 경쟁하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁되어 있다. 일 실시형태에서, 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9694로 기탁되어 있다. 일 실시형태에서, 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9888로 기탁되어 있다. 일 실시형태에서, 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 키메라 또는 인간화 형태이다.

[0013] 다른 양태에서, ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산 된 단일클론 항체에 의해 정의되는 클로스트리듐 디피실리 독소 A 에피토프와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기 탁되어 있다. 일 실시형태에서, 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9694로 기탁되어 있다. 일 실시형태 에서, 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9888로 기탁되어 있다. 일 실시형태에서, 단일클론 항체, 또는

그의 항원 결합 단편은 키메라 또는 인간화 형태이다.

- [0014] 다른 양태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하고 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체와 클로스트리듐 디피실리의 독소 B의 결합에 대하여 교차 경쟁하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 이 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁되어 있다. 일 실시형태에서, 이 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁되어 있다. 일 실시형태에서, 이 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 키메라 또는 인간화 형태이다.
- [0015] 다른 양태에서, ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 클로스트리듐 디피실리 독소 B 에피토프와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 이 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁되어 있다. 일 실시형태에서, 이 하이브리도마 세포주는 ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁되어 있다. 일 실시형태에서, 이 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 키메라 또는 인간화 형태이다. 일 실시형태에서, 분리된 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리의 독소 B의 생체 내 독성을 중화한다. 일 실시형태에서, 이 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 0.1~1000 μg 의 양에서 클로스트리듐 디피실리의 독소 B의 생체 내 독성을 중화한다.
- [0016] 다른 양태에서, 단일클론 항체 PA-39(ATCC 수탁번호 PTA-9692), 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 다른 양태에서, 단일클론 항체 PA-50(ATCC 수탁번호 PTA-9694), 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 다른 양태에서, 단일클론 항체 PA-38(ATCC 수탁번호 PTA-9888), 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 다른 양태에서, 단일클론 항체 PA-41(ATCC 수탁번호 PTA-9693), 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 이 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 키메라 또는 인간화 형태이다.
- [0017] 또 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 또 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 또는 그의 부분을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 또 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 또는 그의 부분을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 또 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 또는 그의 부분, 및 경쇄 또는 그의 부분을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다.
- [0018] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 발현 벡터의 어느 하나에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포가 제공된다. 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 어느 하나를 코딩하는 플라스미드가 제공된다.
- [0019] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 분리된 항-클로스트리듐 디피실리의 독소 A 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리의 독소 A의 생체 내 독성을 중화한다. 일 실시형태에서, 이 항체 또는 항원 결합 단편은 0.1 μg 내지 1000 μg 또는 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 범위의 양에서 클로스트리듐 디피실리의 독소 A의 생체 내 독성을 중화한다. 다른 실시형태에서, 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 0.5 μg ~1000 μg , 또는 5 μg ~250 μg , 또는 10 mg/kg~50 mg/kg으로부터 선택된 용량에서 클로스트리듐 디피실리의 독소 A의 생체 내 독성을 중화한다. 일 실시형태에서, 이 항체는 단일클론 항체 PA-39(ATCC 수탁번호 9692), 또는 그의 항원 결합 단편이다. 일 실시형태에서, 이 항체는 단일클론 항체 PA-50(ATCC 수탁번호 9694), 또는 그의 항원 결합 단편이다. 일 실시형태에서, 이 항체는 단일클론 항체 PA-38(ATCC 수탁번호 9888), 또는 그의 항원 결합 단편이다. 일 실시형태에서, 이 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 키메라 또는 인간화 형태이다.
- [0020] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 분리된 항-클로스트리듐 디피실리의 독소 B 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리의 독소 B의 생체 내 독성을 중화한다. 일 실시형태에서, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 0.5 μg ~1000 μg , 0.5 μg , 5 μg , 40 μg , 50 μg , 100 μg , 200 μg , 1000 μg , 또는 10 mg/kg~50 mg/kg으로부터 선택된 용량에서 클로스트리듐 디피실리의 독소 B의 생체 내 독성을 중화한다. 일 실시형태에서, 이 항체는 단일클론 항체 PA-39(ATCC 수탁번호 9692), 또는 그의 항원 결합 단편이다. 일 실시형태에서, 이 항체는 단일클론 항체 PA-41(ATCC 수탁번호 9693), 또는 그의 항원 결합 단편이다. 일 실시형태에서, 이 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 키메라 또는 인간화 형태이다.

- [0021] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 분리된 항-클로스트리듐 디피실리의 독소 A 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하고/하거나 중화하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여, 클로스트리듐 디피실리-감염된 대상에 투여될 때, CDAD를 치료하고/하거나 대상의 생존가능성을 증가시킨다. 일 실시형태에서 이 항-독소 A 및 항-독소 B 항체 또는 그의 단편은 동시에 투여된다. 일 실시형태에서 이 항-독소 A 및 항-독소 B 항체 또는 그의 단편은 다른 시간에 투여된다. 일 실시형태에서 이 항-독소 A 및 항-독소 B 항체 또는 그의 단편은 연속적으로 투여된다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 A와 결합하는 데 있어서 교차-반응하는 단일클론 항체이다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 B와 결합하는 데 있어서 교차-반응하는 단일클론 항체이다.
- [0022] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 분리된 항-클로스트리듐 디피실리의 독소 B 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하고/하거나 중화하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여, 클로스트리듐 디피실리-감염된 대상에 투여될 때, CDAD를 치료하고/하거나 대상의 생존가능성을 증가시킨다. 일 실시형태에서 이 항-독소 A 및 항-독소 B 항체 또는 그의 단편은 동시에 투여된다. 일 실시형태에서 이 항-독소 A 및 항-독소 B 항체 또는 그의 단편은 다른 시간에 투여된다. 일 실시형태에서 이 항-독소 A 및 항-독소 B 항체 또는 그의 단편은 연속적으로 투여된다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 A와 결합하는 데 있어서 교차-반응하는 단일클론 항체이다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 B와 결합하는 데 있어서 교차-반응하는 단일클론 항체이다.
- [0023] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 분리된 항-클로스트리듐 디피실리의 독소 A 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여, 클로스트리듐 디피실리-감염된 대상에 투여될 때, CDAD를 치료하고/하거나 대상의 생존가능성을 개선한다. 일 실시형태에서 이 항-독소 A 항체 또는 그의 단편은 1 μg ~1000 μg , 또는 1 μg ~250 μg 또는 5 μg ~100 μg 의 양으로 투여되고 항-독소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 양은 0.1 μg ~1000 μg 또는 1 μg ~250 μg 또는 5 μg ~100 μg 의 양으로 투여된다. 일 실시형태에서 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 A와 결합하는 데 있어서 교차-반응하는 단일클론 항체이다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 B와 결합하는 데 있어서 교차-반응하는 단일클론 항체이다.
- [0024] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 분리된 항-클로스트리듐 디피실리의 독소 A 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여, 클로스트리듐 디피실리-감염된 대상에 투여될 때, CDAD를 치료하고/하거나 대상의 생존가능성을 개선한다. 일 실시형태에서 이 항-독소 A 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 50 mg/kg의 양으로 투여되고, 항-독소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 50 mg/kg의 양으로 투여된다. 일 실시형태에서 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 A와 결합하는 데 있어서 교차-반응하는 단일클론 항체이다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 B와 결합하는 데 있어서 교차-반응하는 단일클론 항체이다.
- [0025] 다른 양태는 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 분리된 항-클로스트리듐 디피실리의 독소 A 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하는데, 여기에서 항체 또는 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합

하는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여, 클로스트리듐 디피실리-감염된 대상에 투여될 때, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%의 치료율 또는 생존가능성을 달성한다. 일 실시형태에서, 이 항체 또는 항원 결합 단편은 40~50 mg/kg의 양으로 q2d×4 투여된다. 일 실시형태에서 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 A와 결합하는 데 있어서 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하나 이상의 단일클론 항체와 교차-경쟁하는 단일클론 항체이다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 인간화 형태, 또는 독소 B와 결합하는 데 있어서 ATCC 수탁번호 PTA-9692 또는 PTA-9693로 기탁된 하나 이상의 단일클론 항체와 교차-경쟁하는 단일클론 항체이다.

[0026] 다른 양태에서는 본원에 기재된 분리된 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 또는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 하나 이상의 단일클론 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 또는 키메라 항체의 형태이거나 이로부터 유래된다.

[0027] 다른 양태에서는 본원에 기재된 분리된 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 또는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 이중특이성 또는 이중기능성 항체의 형태이거나 이중특이성 또는 이중기능성 항체로 이루어진다.

[0028] 다른 양태는 (i) ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체, 그의 항원 결합 단편, 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 인간화된 버전, 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역, 및/또는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역; 그리고 (ii) ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체, 그의 항원 결합 단편, 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 인간화된 버전, 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역, 및/또는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0029] 다른 양태는 이중특이성 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는데, 여기에서 항체는 (i) ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 항체 또는 항원 결합 단편의 인간화된 버전, 그의 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역, 및/또는 그의 항체 또는 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역; 그리고 (ii) ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 분리된 단일클론 항체, 그의 항원 결합 단편, 그의 항체 또는 항원 결합 단편의 인간화된 버전, 그의 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역, 및/또는 그의 항체 또는 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0030] 다양한 실시형태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항원 결합 단편은 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 및 Fv 단편으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 단쇄 항체이거나 단쇄 항체를 포함한다.

[0031] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 운반제 또는 희석제를 포함하는 조성물이 제공된다. 일 실시형태에서, 조성물은 본 발명의 적어도 하나의 항-독소 A 항체, 예를 들어 mAb PTA-9692, mAb PTA-9694, mAb PTA-9888, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태, 및 본 발명의 적어도 하나의 항-독소 B 항체, 예를 들어 mAb PTA-9692, mAb PTA-9693, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태를 포함한다. 일 실시형태에서, 조성물은 본 발명의 하나의 항-독소 A 항체, 예를 들어 mAb PTA-9888, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태, 및 본 발명의 하나의 항-독소 B 항체, 예를 들어 mAb PTA-9693, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태를 포함한다. 일 실시형태에서, 조성물은 본 발명의 하나의 항-독소 A 항체, 예를 들어 mAb PTA-9694, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태, 및 본 발명의 하나의 항-독소 B 항체, 예를 들어 mAb PTA-9693, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태를 포함한다. 일 실시형태에서 각각의 mAb는 같은 양으로 조성물에 존재한다. 일 실시형태에서 각각의 mAb는 각각에 대하여 1:1 중량비로 조성물에 존재한다. 일 실시형태에서 각각의 mAb는 다른 양으로 조성물에 존재한다. 일 실시형태에서 각각의 mAb는 각각에 대하여 1:1과 다른 중량비로 조성물에 존재하는데, 비율은 본원에 제공된 바와 같다. 일 실시형태에서, 조성물은 추가의 치료제를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 추가의 치료제는 항생제, 항균제, 살균제, 정균제 또는 이들의 혼합물이다. 일 양태에서, 추가의 치료제는 메트로니

다졸, 반코마이신, 피닥소마이신 또는 이들의 조합이다.

- [0032] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 본 발명의 발현 벡터 및 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 운반제 또는 희석제를 포함하는 조성물이 제공된다. 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 운반제 또는 희석제를 포함하는 조성물이 제공된다. 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 본 발명의 플라스미드 및 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 운반제 또는 희석제를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0033] 다른 양태에서 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및 독소 B에 결합하기 위한 결합 부위를 포함하는 적어도 2개의 폴리펩티드쇄를 포함하는 결합 단백질이 제공되는데, 여기에서 적어도 하나의 폴리펩티드쇄는 제1 중쇄 가변 영역, 제2 중쇄 가변 영역, 및 중쇄 불변 영역 또는 그의 일부를 포함하고; 그리고 적어도 하나의 폴리펩티드쇄는 제1 경쇄 가변 영역, 제2 경쇄 가변 영역, 및 경쇄 불변 영역 또는 그의 일부를 포함하고, 폴리펩티드쇄를 포함하는 가변 영역은 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및 독소 B에 대한 기능적 결합 부위를 형성한다. 일 양태에서, 결합 단백질의 제1 중쇄 가변 영역 및 제1 경쇄 가변 영역은 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 대한 기능적 결합 부위를 형성하고 결합 단백질의 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역은 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 대한 기능적 결합 부위를 형성한다. 일 실시형태에서, 결합 단백질의 제1 중쇄 가변 영역 및 제1 경쇄 가변 영역이 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 대한 기능적 결합 부위를 형성하고 결합 단백질의 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역은 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 대한 기능적 결합 부위를 형성한다. 일 실시형태에서, 결합 단백질은 Fc 영역을 포함한다. 일 실시형태에서, 결합 단백질은 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및 독소 B의 독성을 중화한다. 다양한 실시형태에서, 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는, 적어도 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 또는 적어도 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 으로부터 선택된 독소 A 또는 독소 B에 대한 정반응 속도상수(on rate K_{on})를 갖는다. 다양한 실시형태에서, 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는, 최대 10^{-3} s^{-1} , 최대 10^{-4} s^{-1} , 최대 10^{-5} s^{-1} , 또는 최대 10^{-6} s^{-1} 으로부터 선택된 독소 A 또는 독소 B에 대한 역반응 속도상수(off rate K_{off})를 갖는다. 다양한 실시형태에서, 결합 단백질은 최대 10^{-7} M , 최대 10^{-8} M , 최대 10^{-9} M , 최대 10^{-10} M , 최대 10^{-11} M , 최대 10^{-12} M , 또는 최대 10^{-13} M 으로부터 선택된 독소 A 또는 독소 B에 대한 해리 상수(K_D)를 갖는다.
- [0034] 다른 양태에서, 상기 및 본원에 기재된 것과 같은 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 운반제, 또는 희석제를 포함하는 조성물이 제공된다. 일 실시형태에서, 조성물은 추가의 치료제를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 조성물의 추가의 치료제는 항생제, 항균제, 살균제, 정균제, 또는 이들의 조합이다. 일 실시형태에서, 조성물의 추가의 치료제는 메트로니다졸, 반코마이신, 피닥소마이신, 니타록사니드, 리팍시민, 라모플라닌, 또는 이들의 조합이다.
- [0035] 일 양태에서, ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9693, PTA-9494, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주가 제공된다.
- [0036] 다른 양태는 여기에 기재된 적어도 하나의 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병에 걸린 대상의 치료 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 본 발명의 항체를, 바람직하게는 인간화 형태로 포함한다. 일 실시형태에서, 조성물은 인간화 형태의 여기에서 제공되는 적어도 하나의 항-독소 A 항체, 또는 그의 항원 결합 단편, 및 인간화 형태의 본 발명의 적어도 하나의 항-독소 B 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 추가의 치료제, 약물, 화합물, 또는 성분이 조성물에 포함될 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 운반제, 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 조성물은 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병, 예를 들어 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD)의 치료에 유효한 양으로 투여된다. 일 실시형태에서, 두 개의 조성물이 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 치료에 유효한 양으로 대상에게 투여된다. 일 실시형태에서, 두 개의 조성물은 동시에 투여된다. 일 실시형태에서, 두 개의 조성물은 다른 시간에 투여된다.
- [0037] 다른 양태는, 본 발명의 항-독소 A 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 클로스트리듐 디피실리 독소 A 저해 또는 중화에 유효한 양, 및 본 발명의 항-독소 B 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 클로스트리듐 디피실리 독소 B 저해 또는 중화에 유효한 양으로 세포를 처리하는 것을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B에 의한 세포에 대한 독성의 저해 또는 중화 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 항-독소 A 항체 및

항-독소 B 항체는 인간화 형태이다. 일 실시형태에서, 항-독소 A 항체 및 항-독소 B 항체는 키메라 형태이다. 일 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 동시에 투여된다. 일 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 다른 시간에 투여된다. 본 방법의 한 실시형태에서, 세포는 대상에 존재하고 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B의 저해 또는 중화에 유효한 양으로 대상에게 투여된다.

[0038] 다른 양태는, 여기 기재된 본 발명의 적어도 하나의 조성물의 클로스트리듐 디피실리 독소 저해 또는 중화에 유효한 양으로 세포를 처리하는 것을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 독소에 의한 세포의 독성의 저해 또는 중화 방법을 제공한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 세포는 두 조성물의 클로스트리듐 디피실리 독소 저해 또는 중화에 유효한 양으로 처리되는데, 조성물의 하나는 항-독소 A 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하고, 조성물의 하나는 항-독소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 항체는 인간화된다. 일 실시형태에서, 항체는 키메라이다. 일 실시형태에서, 두 조성물은 동시에 또는 다른 시간에 투여된다. 일 실시형태에서, 세포는 대상에 존재하고 적어도 하나의 조성물은 클로스트리듐 디피실리 독소의 저해 또는 중화에 유효한 양으로 대상에게 투여된다.

[0039] 다른 양태는, (i) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 결합하고 중화시키는 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 (ii) 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 결합하고 중화시키는 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 맹독성 균주에 의해 생산된 독소의 중화에 유효한 양으로 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주에 의해 생산된 독소의 중화 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, (i) 및 (ii)의 항체는 인간화된 항체이다. 일 실시형태에서, (i) 및 (ii)의 항체는 키메라 항체이다. 일 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 동시에 또는 다른 시간에 투여된다. 일 실시형태에서, 맹독성 균주의 독소는 독소 A 및 독소 B이다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주는 BI/NAP1/027, CCL676, HMC553, Pitt45, CD196, montreal 5, 또는 montreal 7.1의 하나 이상이다. 일 실시형태에서, 항-독소 A 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 2.6^{-12} M 내지 7.7^{-11} M 또는 7.7^{-12} M 내지 4.8^{-8} M의 EC_{50} 값으로 결정되는 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주에 의해 생산되는 독소 A에 대한 중화 활성을 갖는다. 일 실시형태에서, 항-독소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 1.1^{-11} M 내지 6.5^{-10} M의 EC_{50} 값으로 결정되는 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주에 의해 생산되는 독소 B에 대한 중화 활성을 갖는다.

[0040] 다른 양태에서, 본원에 기재된 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 특히 인간화 형태, 및 사용 설명서를 포함하는 키트가 제공된다. 일 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 키트 내의 동일 용기에 포함된다. 일 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 키트 내의 분리된 용기에 포함된다. 일 실시형태에서, 키트는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 결합시키기 위한 링커를 포함한다. 일 실시형태에서, 키트는 추가의 치료제를 포함하고, 이는 항생제, 항균제, 살균제 또는 정균제일 수 있다. 일 실시형태에서, 추가의 치료제는 메트로니다졸, 반코마이신, 피탁소마이신, 니타록사니드, 리팍시민, 라모플라닌, 또는 이들의 조합이다.

[0041] 다른 양태에서, 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주의 독소 A 또는 독소 B를 중화시키는 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 특히 인간화 형태가 제공된다. 일 실시형태에서, 단일클론 항체는 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, PTA-9888, 또는 PTA-9693에 의해 기탁되고, 각각 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, PTA-9888, 또는 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된다. 일 실시형태에서, ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, PTA-9888, PTA-9693, 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체는 인간화된 또는 키메라 형태이다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주는 BI/NAP1/027, CCL676, HMC553, Pitt45, CD196, montreal 5, 및 montreal 7.1 중 하나 이상이다.

[0042] 다른 양태에서, 무증상이지만 클로스트리듐 디피실리 감염에 걸리기 쉽거나 발병 위험이 있는 대상의 치료 방법이 제공되고, 이 방법은 (i) 본원에 제공되고 기재된 것과 같은 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 (ii) 본원에 제공되고 기재된 것과 같은 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 대상을 치료하기 위한 유효한 양으로 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대상은 입원환자이다.

[0043] 다른 양태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 대하여 생성된 인간화된 단일클론항체가 제공된다. 일 실시형태에서, 이러한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 항체는, 각각의 중쇄가 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다. 일 실시형태에서, 이러한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 항체는, 각각의 중쇄가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는

VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다. 일 실시형태에서, 이러한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 항체는, 각각의 중쇄가 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다. 일 실시형태에서, 이러한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 항체는, 각각의 중쇄가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다. 일 실시형태에서, 이러한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 항체는, 각각의 중쇄가 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다. 일 실시형태에서, 이러한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 항체는, 각각의 중쇄가 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다.

[0044] 다른 양태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 대하여 생성된 인간화된 단일클론항체가 제공된다. 일 실시형태에서, 이러한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 항체는, 각각의 중쇄가 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다. 일 실시형태에서, 이러한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 항체는, 각각의 중쇄가 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다.

[0045] 다른 양태에서, 클로스트리듐 디피실리 독소 A에 대하여 생성된 단일클론 항체 또는 그의 단편이 제공되는데, 여기에서 항체는, 각각의 중쇄가 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다. 서열번호 14의 항체 중쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)은 서열번호 15로 나타내고(도 38b), 서열번호 16의 항체 경쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)은 서열번호 17로 나타낸다(도 38a).

[0046] 다른 양태에서, 클로스트리듐 디피실리 독소 A에 대하여 생성된 단일클론 항체 또는 그의 단편이 제공되는데, 여기에서 항체는, 각각의 중쇄가 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다. 서열번호 18의 항체 중쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)은 서열번호 19로 나타내고(도 39b), 서열번호 20의 항체 경쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)은 서열번호 21로 나타낸다(도 39a).

[0047] 다른 양태에서, 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 대하여 생성된 단일클론 항체 또는 그의 단편이 제공되는데, 여기에서 항체는, 각각의 중쇄가 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드, 그리고 각각의 경쇄가 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성된다. 서열번호 22의 항체 중쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)은 서열번호 23으로 나타내고(도 40b), 서열번호 24의 항체 경쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)은 서열번호 25로 나타낸다(도 40a).

[0048] 본 발명의 상기 인간화된 단일클론 항체의 어느 하나에 관한 다양한 양태에서, 단일클론 항체의 CH 영역은 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgE, 또는 IgM으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, CH 영역은 IgG1이다. 일 실시형태에서, CL 영역은 카파(κ) 또는 람다(λ) 아이소타입(isotype)으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, CL 영역은 카파 아이소타입(isotype)이다. 다른 실시형태에서, 여기에 기재된 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편의 CDRs, 즉, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3은 본 발명에 따른 산물 및 방법에서 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B와 결합 및/또는 중화하도록 수용된다.

[0049] 다른 양태에서, 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 항체 또는 그의 단편이 제공되는데, 여기에서 L 쇄의 V 영역은 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 7 중 하나 이상으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 또한, 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 항체 또는 그의 단편이 제공되는데, 여기에서 L 쇄의 V 영역은 서열번호 10으로 나타낸 서열을 포함한다. 또한, 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 항체 또는 그의 단편이 제공되는데, 여기에서 H 쇄의 V 영역은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 5 및 서열번호 6 중 하나 이상으로부터 선택되는 서열을 포함한다.

또한, 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 항체 또는 그의 단편이 제공되는데, 여기에서 H 쇄의 V 영역은 서열번호 8 또는 서열번호 9 중 하나 이상으로부터 선택되는 서열을 포함한다.

[0050] 다른 양태에서, (i) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체와 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와의 결합에 대하여 교차 경쟁하거나, 또는 (ii) ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 클로스트리듐 디피실리 독소 A 에피토프에 특이적으로 결합하되, 여기에서, ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 에피토프는 클로스트리듐 디피실리 독소 A의 수용체 결합 영역의 외부 영역, 예를 들어 전좌 영역을 포함하는, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 항체는 인간화 형태이다. 일 실시형태에서, 항체는 키메라 형태이다.

[0051] 다른 양태에서, (i) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9694로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체와 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와의 결합에 대하여 교차 경쟁하거나, 또는 (ii) ATCC 수탁번호 PTA-9694로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 클로스트리듐 디피실리 독소 A 에피토프에 특이적으로 결합하되, 여기에서, ATCC 수탁번호 PTA-9694로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 에피토프는 클로스트리듐 디피실리 독소 A의 수용체 결합 영역, 예를 들어 C-말단 수용체 결합 에피토프에서 적어도 2개 부위를 포함하는, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 항체는 인간화 형태이다. 일 실시형태에서, 항체는 키메라 형태이다.

[0052] 다른 양태에서, (i) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체와 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와의 결합에 대하여 교차 경쟁하거나, 또는 (ii) ATCC 수탁번호 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 클로스트리듐 디피실리 독소 A 에피토프에 특이적으로 결합하되, 여기에서, ATCC 수탁번호 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 에피토프는 클로스트리듐 디피실리 독소 A의 C-말단 수용체 결합 에피토프를 포함하는, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 항체는 인간화 형태이다. 일 실시형태에서, 항체는 키메라 형태이다.

[0053] 다른 양태에서, (i) 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체와 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와의 결합에 대하여 교차 경쟁하거나, 또는 (ii) ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 클로스트리듐 디피실리 독소 B 에피토프에 특이적으로 결합하되, 여기에서, ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 에피토프는 클로스트리듐 디피실리 독소 B의 N-말단 효소 영역을 포함하는, 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, ATCC 수탁번호 PTA-9693으로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 에피토프는 클로스트리듐 디피실리 독소 B의 N-말단 효소 영역을 포함하는 독소 B의 카스파아제1-처리에 의해 생성되는 63 kDa 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 에피토프는 클로스트리듐 디피실리 독소 B의 전좌 영역을 포함한다.

[0054] 일 양태에서, ATCC 수탁번호 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체에 의해 정의되는 에피토프는 미처리된 독소 B를 포함하는 63 kDa 단백질 및 독소 B의 카스파아제1-처리에 의해 생성되는 167 kDa 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 항체는 인간화 형태이다. 일 실시형태에서, 항체는 키메라 형태이다.

[0055] 다른 양태에서, 하나 이상의 대상 동물을 불활성 변성독소 A로 주기적 간격으로 면역화시키고; 이 동물을 증가된 양의 활성 독소 A 또는 활성 독소 B로 주기적 간격으로 부스팅시키고; 면역화되고 부스팅된 동물의 면역 세포로부터 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 결합하고 중화시키는 항-독소 A 항체 또는 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 결합하고 중화시키는 항-독소 B 항체를 생산 및 분비하는, 적절한 불멸화된 세포주와 융합된 하이브리도마 세포를 얻는 것을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 또는 독소 B와 결합하고 중화시키는 단일클론 항체의 생산 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A-중화 단일클론 항체 및/또는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B-중화 단일클론 항체가 분리된다. 본 발명의 실시형태에서, 면역화 및 부스팅 단계는 보조제(adjuvant)를 포함한다. 일 실시형태에서, 보조제는 퀴 A(Quil A)이다. 본 방법의 다른 실시형태에서, 면역화 및 부스팅 단계는 매 3 주의 주기적 간격으로 수행된다. 다른 실시형태에서, 대상 동물은 2

또는 3 용량의 변성독소 A로 면역화된 다음, 3 내지 5 증가 용량의 활성 독소 A 또는 활성 독소 B로 부스팅된다.

[0056] 다른 양태에서, 독소 A 내재화 및 세포(cytoplasmic) 독성을 저해, 차단, 또는 방지하는 것에 의해 클로스트리듐 디피실리 독소 A 독성을 저해, 차단, 또는 방지하는, 분리된 항체, 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 항체는 단일클론 항체이다. 일 실시형태에서, 항체는 인간화 또는 키메라 항체이다. 일 실시형태에서, 항체는 PA-39(ATCC 수탁번호 PTA-9692) 또는 인간화된 PA-39이다. 일 실시형태에서, 항체는 PA-50(ATCC 수탁번호 PTA-964) 또는 인간화된 PA-50이다. 다른 실시형태에서, 항체는 독소 A의 결합에 있어서 PA-39, 인간화된 PA-39, PA-50, 또는 인간화된 PA-50과 경쟁한다. 일 실시형태에서, 항체는 독소 A의 수용체 결합 영역의 독소 A 외부 영역에서 단일 부위에 결합한다. 일 실시형태에서, 항체는 독소 A의 수용체 결합 영역의 독소 A 외부 영역에서 단일 부위에 결합하는 것에 의해 PA-39 또는 그의 인간화 형태와 경쟁한다. 일 실시형태에서, 항체는 독소 A의 수용체 결합 영역에서 적어도 2개 부위에 결합한다. 일 실시형태에서, 항체는 독소 A의 수용체 결합 영역에서 적어도 2개 부위에 결합하는 것에 의해 PA-50 또는 그의 인간화 형태와 경쟁한다. 일 실시형태에서, 항체는 혼합된-경쟁적 작용 기전을 통해 독소 A 독성을 저해한다. 일 실시형태에서, 항체는 경쟁적 작용 기전을 통해 독소 A 독성을 저해한다. 상기 실시형태 모두는 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 것으로 여겨진다.

[0057] 다른 양태에서, 독소 B의 N-말단 효소 영역에서 에피토프 부위에 결합하는 것에 의해 클로스트리듐 디피실리 독소 B 독성을 저해, 차단, 또는 방지하는, 분리된 항체, 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일 실시형태에서, 항체는 단일클론 항체이다. 일 실시형태에서, 항체는 인간화 또는 키메라 항체이다. 일 실시형태에서, 항체는 PA-41(ATCC 수탁번호 PTA-9693) 또는 PA-41의 인간화 형태이다. 일 실시형태에서, 항체는 클로스트리듐 디피실리의 독소 B의 N-말단 효소 영역에의 결합에 있어서 PA-41 또는 인간화된 PA-41과 경쟁한다. 일 실시형태에서, 항체는 클로스트리듐 디피실리의 독소 B의 N-말단 효소 영역에서 단일 부위에의 결합에 있어서 PA-41 또는 인간화된 PA-41과 경쟁한다. 일 실시형태에서, 항체는 혼합된-경쟁적 작용 기전을 통해 독소 B 독성을 저해한다.

[0058] 다른 양태는, 하나 이상의 단일클론 항체 PA-39(ATCC 수탁번호 PTA-9692), PA-39의 인간화 형태, 단일클론 항체 PA-50(ATCC 수탁번호 PTA-9694), PA-51의 인간화 형태, 단일클론 항체 PA-41(ATCC 수탁번호 PTA-9693); PA-41의 인간화 형태, 독소 A의 결합에서 단일클론 항체 PA-39 또는 그의 인간화 형태와 경쟁하는 항체, 독소 A의 결합에서 단일클론 항체 PA-50 또는 그의 인간화 형태와 경쟁하는 항체, 또는 독소 B의 결합에서 단일클론 항체 PA-41 또는 그의 인간화 형태와 경쟁하는 항체에 의해 인식 및/또는 결합된 에피토프 영역을 포함하는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B의 부분, 단편, 또는 펩티드를 포함하는 백신 또는 면역원이 제공된다. 일 실시형태에서, 백신 또는 면역원은 하나 이상의 단일클론 항체 PA-39(ATCC 수탁번호 PTA-9692), PA-39의 인간화 형태, 또는 독소 A 및 B의 결합에서 단일클론 항체 PA-39 또는 그의 인간화 형태와 경쟁하는 항체에 의해 인식 및/또는 결합된 에피토프 영역을 포함하는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및 독소 B의 부분, 단편, 또는 펩티드를 포함한다. 일 실시형태에서, 백신 또는 면역원의 독소 A 및/또는 독소 B의 에피토프-포함 부분, 단편, 또는 펩티드는 단백질 가수분해 분열(proteolytic cleavage)에 의해 독소 A 또는 독소 B 단백질로부터 유래된다. 일 실시형태에서, 백신 또는 면역원의 독소 A 단편, 부분, 또는 펩티드는 엔테로키나제에 의한 단백질 가수분해 분열에 의해 생산된다. 일 실시형태에서, 백신 또는 면역원의 독소 B 단편, 부분, 또는 펩티드는 카스파아제(caspase 1)에 의한 단백질 가수분해 분열에 의해 생산된다. 일 실시형태에서, 백신 또는 면역원의 에피토프-포함 부분 또는 단편은 독소 A 또는 독소 B 단백질의 화학적 또는 재조합으로 합성된 펩티드이다. 일 실시형태에서, 항체에 의해 인식 및 결합된 독소 A 및/또는 독소 B의 하나 이상의 에피토프 영역을 포함하는 백신 또는 면역원의 단편, 부분 또는 펩티드는, 하나 이상의 독소 A의 아미노 말단; 독소 B의 아미노 말단; 독소 A의 카복시 말단; 독소 B의 카복시 말단; 독소 A의 수용체 결합 영역; 독소 A의 수용체 결합 영역의 외부 영역; 독소 B의 수용체 결합 영역; 독소 B의 N-말단 효소 영역; 독소 A의 글루코실트랜스페라제 영역; 독소 B의 글루코실트랜스페라제 영역; 독소 A의 단백질 가수분해 영역; 독소 B의 단백질 가수분해 영역; 독소 A의 소수성, 포어-형성 영역; 또는 독소 B의 소수성, 포어-형성 영역 으로부터 유래된다. 일 실시형태에서, 독소 A 또는 독소 B의 에피토프-포함 단편 또는 부분은 크기가 <300 kDa, 약 158~160 kDa, 약 100~105 kDa, 예를 들어 103 kDa, 약 90~95 kDa, 예를 들어 91 kDa, 및/또는 약 63~68 kDa, 예를 들어 63 kDa, 또는 68 kDa이다. 일 실시형태에서, 독소 A의 에피토프-포함 단편 또는 부분은 크기가 약 158~160 kDa, 약 90~95 kDa, 예를 들어 91 kDa, 및/또는 약 63~68 kDa, 예를 들어 68 kDa이다. 일 실시형태에서, 독소 B의 에피토프-포함 단편 또는 부분은 크기가 약 100~105 kDa, 예를 들어 103 kDa, 및/또는 약 63~68 kDa, 예를 들어 63 kDa이다. 백신 또는 면역원의 실시형태 중 어느 것에서도, 독소 A 또는 독소 B, 그의 단편, 부분 또는 펩티드는 본원에 제공된 모든 균주의 것이

다.

[0059] 다른 양태는, 대상에게 상기 백신 또는 면역원의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 필요한 대상에서 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 중화, 저해, 차단, 경감, 완화, 치료, 또는 처치 방법을 제공한다. 이 방법의 일 실시형태에서, 백신 또는 면역원의 투여에 따라 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B에 대한 체액성 반응이 대상에서 유도되고, 이에 의해 대상에서 경증 내지 중증의 설사를 포함하고 일부 경우 위막성 결장염, 독성 거대결장, 장 천공, 패혈증 및 사망과 같은 중증의 생명을 위협하는 합병증과 관련된 클로스트리듐 디피실리 관련 질병 또는 CDAD를 특이적으로 중화, 저해, 차단, 경감, 완화, 치료, 또는 처치할 수 있는 항-독소 A 및/또는 항-독소 B 항체를 생산한다. 이 방법의 일 실시형태에서, 대상의 체액성 반응을 통해 유도된 항체는 본 발명의 mAb와 유사하거나 동일한 작용 기전 및 특이성을 갖는 항체, 또는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B를 중화하는 데 있어서 본 발명의 mAb와 경쟁하거나, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B를 중화하는 데 포함되는 작용 기전에서 본 발명의 mAb와 경쟁하는 항체를 포함한다.

[0060] 다른 양태에서, 세포를 본 발명에 따라 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 감염에 감수성이 있는 세포에서 또는 세포에 대하여 독소 A 및/또는 독소 B 활성을 중화, 저해, 또는 차단하는 방법이 제공되는데, 여기에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 경쟁적 또는 혼합된 경쟁적 작용 기전에 의해 세포에서 또는 세포에 대하여 독소 A 및/또는 독소 B 활성을 중화, 저해, 또는 차단한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 항체는 하나 이상의 단일클론 항체, 인간화된 항체, 또는 키메라 항체이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 세포, 예를 들어 장 상피 세포는 대상에 존재하고, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 대상에게 유효량으로 투여된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 독소는 독소 A이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 독소는 독소 B이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 독소는 독소 A이고, 작용 기전은 경쟁적 저해 작용 기전이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 PA-50(ATCC 수탁번호 PTA-9694), 그의 인간화 형태, 또는 독소 A 활성을 중화하는 데 있어서 PA-50과 경쟁하는 항체, 또는 그의 단편이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 독소는 독소 A이고, 작용 기전은 혼합된-경쟁적 저해 작용 기전이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 PA-39(ATCC 수탁번호 PTA-9692), 그의 인간화 형태, 또는 독소 A 활성을 중화하는 데 있어서 PA-39와 경쟁하는 항체, 또는 그의 단편이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 독소는 독소 B이고, 작용 기전은 혼합된 경쟁적 저해 작용 기전이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 PA-41(ATCC 수탁번호 PTA-9693), 그의 인간화 형태, 또는 독소 B 활성을 중화하는 데 있어서 PA-41과 경쟁하는 항체, 또는 그의 단편이다.

[0061] 본 발명의 이들 및 다른 양태는 발명의 상세한 설명과 관련하여 더욱 구체적으로 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1a 내지 1c는 ELISA를 통해 독소 A 및/또는 독소 B에 대한 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 mAb의 특이성을 보여준다. ELISA 플레이트는 4℃에서 하룻밤 독소 A(검은 원) 또는 독소 B(흰 사각형)로 코팅되었다. 플레이트를 세척 및 차단한 후, 쥐과 동물(murine) mAb PA-38(A), PA-39(B), 또는 PA-41(C)를 적정하고 플레이트에 가하였다. 단일클론 항체 결합은 HRP 결합된 염소 항-마우스 IgG-Fc로 검출하였다. OD는 SpectraMax M5 플레이트 판독기(Molecular Devices) 상에서 측정하였다.

도 2a 내지 2d는 쥐과 동물 mAb PA-38, PA-39, PA-41 및 PA-50을 사용한 비아코어(Biacore) 결합 특성 분석으로부터의 결과를 제공한다. 결합 특이성은 비아코어 3000 기기(GE Healthcare)를 사용하여 측정하였다. mAb(PA-38(2a), PA-39(2b), PA-50(2c), PA-41(2d), 또는 대조군으로서 비특이성 mAb)를 아민 커플링을 위한 제조자의 지침에 따라 약 10,000 공명 유닛(RU)에서 CM5 센서 칩(GE Healthcare) 표면에 공유결합으로 고정시켰다. 결합 실험은 PBS 중 25℃에서 수행하였다. 30 nM의 정제된 독소 A 또는 독소 B(List Biological Laboratories)를 결합 페이스(PA-38, PA-39 및 PA-41에서는 600s; 그리고 PA-50에서는 300s) 및 분리 페이스(PA-38, PA-39 및 PA-41에서는 300s; 그리고 PA-50에서는 600s)로 5 μL/분의 유속으로 대조군(비특이성 mAb) 및 시험 유동 세포 위로 통과시켰다. 그래프는 시간 대 RU로 나타낸다.

도 3a 내지 3e 및 3f 내지 3h는 비아코어에 의하여 측정된 항체-독소 결합 운동의 결과를 보여준다. 도 3a 내지 3e에서, 쥐과 동물 mAb는 비아코어 마우스 항체 포획 키트로 제조한 CM5 센서 칩을 사용하여 포획하였다. 다음에 독소를 30 μL/분의 유속으로 다양한 농도(0.4~100 nM, 2배씩 증가)에서 유동 세포로 통과시켰다. 모든 mAb 농도는 이중 시험하였고 칩 표면은 키트에 특정된 조건을 사용하여 각 운전 후 재생시켰다. 독소에 대한 mAb의

K_D 를 계산한 Bia Evaluation Software 1:1(Langmuir) 결합 모델을 사용하여 RU에서의 변화를 기록하고 분석하였다. **도 3a**: 독소 A에 대한 PA-38의 결합; **도 3b**: 독소 A에 대한 PA-50의 결합; **도 3c**: 독소 A에 대한 PA-39의 결합; **도 3d**: 독소 B에 대한 PA-39의 결합; 및 **도 3e**: 독소 B에 대한 PA-41의 결합. **도 3f 내지 3h**에서는 위와 같이 쥐과 동물 mAb, 즉, mPA-50, mPA-41, 또는 mPA-39를 아민 커플링 방법에 의해 CM5 센서 칩에 공유결합으로 연결시켰다. 30 nM에서 독소 A("red"로 표시한 선) 및 독소 B("blue"로 표시한 선)를 5 μ L/분의 유속으로 시험 유동 세포(mPA-50, mPA-41, 또는 mPA-39) 위로 통과시켰다. 결과는 mPA-50이 선택적으로 독소 A에 결합하고(**도 3f**), mPA-41은 선택적으로 독소 B에 결합하는 것(**도 3g**)을 보여준다. mPA-39는 독소 A에의 결합을 선호하지만, 또한 독소 B와 교차-반응성을 나타낸다(**도 3h**).

도 4는 CHO-K1 세포에서 정제된 쥐과 동물 mAb PA-39를 사용한 독소 A의 생체 외 중화 활성을 보여준다. 세포독성 측정을 위해, 독소 A를 37°C에서 1 시간 동안 다양한 농도의 PA-39와 인큐베이션하였다(실시예 3A). 다음에 mAb-독소 혼합물을 2,000 세포/웰로 96-웰 플레이트에 도말된 CHO-K1 세포에 가하고 72 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 생존을 처리 및 비처리 배양에서 비교하고 세포독성의 50% 중화에 요구되는 mAb의 농도(EC_{50})를 계산하였다. 세포 생존능력은 CellTiter-Blue를 통해 측정하고; 원자료를 비처리 대조군 웰에 대하여 정상화하였다. 이 값을 Prism을 사용하여 플롯팅하고 S자형 용량 반응(가변 경사) 모델을 사용하여 곡선을 계산하였다. 다음에 이 곡선을 사용하여 mAb EC_{50} 을 결정하였다. 데이터 점은 동일 플레이트에서 3 웰의 평균을 나타낸다.

도 5는 CHO-K1 세포에서 정제된 쥐과 동물 mAb PA-41을 사용한 독소 B의 생체 외 중화 활성을 보여준다. 세포독성 측정을 위해, 독소 B를 37°C에서 1 시간 동안 다양한 농도의 PA-41과 인큐베이션하였다(실시예 3B). 다음에 mAb-독소 혼합물을 2,000 세포/웰로 96-웰 플레이트에 도말된 CHO-K1 세포에 가하고 72 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 생존을 처리 및 비처리 배양에서 비교하고 세포독성의 50% 중화에 요구되는 mAb의 농도(EC_{50})를 계산하였다. 세포 생존능력은 CellTiter-Blue를 통해 측정하고; 원자료를 비처리 대조군 웰에 대하여 정상화하였다. 이 값을 Prism을 사용하여 플롯팅하고 S자형 용량 반응(가변 경사) 모델을 사용하여 곡선을 계산하였다. 다음에 이 곡선을 사용하여 mAb EC_{50} 을 결정하였다. 데이터 점은 동일 플레이트에서 3 웰의 평균을 나타낸다.

도 6은 T-84 세포에서 정제된 쥐과 동물 mAb PA-38 및 PA-50을 사용한 독소 A의 생체 외 중화 활성을 보여준다(실시예 3C). T-84 세포를 96 웰 플레이트에 접종하고(15,000 세포/웰) 적정된 mAb(PA-38(■) 또는 PA-50(▲)) 및 독소 A(60 μ g/mL)의 조합으로 처리하였다. 인큐베이션(72 시간) 후, 세포 생존을 처리 및 비처리 배양에서 비교하고 세포독성의 50% 중화에 요구되는 mAb의 농도(EC_{50})를 계산하였다. 세포 생존능력은 CellTiter-Blue를 통해 측정하고; 원자료를 비처리 대조군 웰에 대하여 정상화하였다. 이 값을 Prism을 사용하여 플롯팅하고 S자형 용량 반응(가변 경사) 모델을 사용하여 곡선을 계산하였다. 다음에 이 곡선을 사용하여 mAb EC_{50} 을 결정하였다. 데이터 점은 동일 플레이트에서 3 웰의 평균을 나타낸다.

도 7은 토끼 적혈구(RBCs)의 독소 A 유도된 적혈구응집반응을 차단 또는 방지하는 쥐과 동물 mAb PA-38(■) 또는 PA-50(▲)의 능력을 시험한 결과를 보여준다. 독소 A(2 μ g/mL)를 다양한 희석도의 PA-38 또는 PA-50과 조합하고 혼합물을 50 μ L 토끼 적혈구를 포함하는 플레이트에 가하였다. 플레이트를 4°C에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 적혈구응집반응을 ImageQuant 400(GE Healthcare) 도트 배열 분석을 사용하여 색 강도로서 정량화하였다. 적혈구응집반응을 나타내지 않는 것을 100%로 하여 데이터를 % 대조로 하였다. 데이터 점은 동일 플레이트에서 분석된 3 웰의 평균을 나타낸다.

도 8은 독소 A에 의한 Caco-2 세포 단층의 붕괴를 방지하는 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 mAb의 활성을 보여준다. Caco-2 세포를 96-웰 Multiscreen Caco-2 분석 플레이트(Millipore)의 상부 챔버에 접종하였다(25,000 세포/웰). 10~14일의 인큐베이션 후, 상피 볼트옴미터(World Precision Instruments)를 사용한 상피 전기 저항(TEER, transepithelial electrical resistance)을 측정하는 것에 의해 치밀한 단층의 형성을 확인하였다. 단층의 온전성을 확립하고 측정한 후, 독소 A(25 ng/mL) 및 일련의 희석된 쥐과 동물 mAb(PA-38(■) 또는 PA-50(▲))를 분석 플레이트의 상부 챔버에 가하였다. 플레이트를 18~24 시간 동안 인큐베이션하고, 볼트옴미터를 사용하여 TEER 값을 측정하였다. 단층 온전성을 비처리 및 독소 처리 웰에서 비교하였다. 50% 독소 저해에 요구되는 mAb의 농도(EC_{50})를 결정하기 위해, GraphPad Prism software를 사용하여 저해 데이터를 비-선형 회귀, S자형 용량-반응 곡선에 맞추었다.

도 9a 내지 9c는 독소 A 활성을 생체 내 중화시키는 항-독소 A mAb PA-38(**9a**) 및 PA-50(**9b**)의 능력을 보여준다. 암컷 스위스 웹스터 마우스(6~8 주령, 5 마리/그룹)에 표시된 양의 쥐과 동물 mAb PA-38 또는 쥐과

동물 mAb PA-50, 또는 PBS(200 μ l)를 0일에 주사(i.p.)하였다. 여기에서 CDA-1으로 지칭하는 비교 항-독소 A 단일클론 항체의 중화 활성을 표시된 항체량에서 평가하였다(9c). 전장 인간 IgG1 발현 벡터(pCON-감마1 및 pCON-kappa)로 클로닝된 3D8(W02006/121422 및 US2005/0287150)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산을 합성하는 것(DNA2.0)에 의해 항-독소 A 비교 mAb CDA-1을 생산하였다. 본원의 실시예 항목에 기재된 바와 같이, CDA-1 비교 mAb를 CHO-KSV1 세포에서 발현 및 생산하고 정제하였다. 다음에 독소 A 100 ng(200 μ l)을 1일에 마우스에 주사하고 첫 72 시간은 매일, 그 후 매주마다 모니터링하였다. 결과는 PA-38 및 PA-50 mAb 모두 단일 용량의 2 μ g mAb/동물 투여 후 독소 A-관련된 독성을 충분히 저해할 수 있지만, 비교 CDA-1 mAb(5 μ g/동물)는 클로스트리듐 디피실리 독소 A-관련 독성을 충분히 저해하는데 실패했음을 보여준다.

도 10은 독소 B 활성을 생체 내 중화시키는 mAb PA-41의 능력을 보여준다. 암컷 스위스 웹스터 마우스(6~8 주령, 5 마리/그룹)에 표시된 양의 쥐과 동물 mAb PA-41 또는 PBS(200 μ l)를 0일에 주사(i.p.)하였다. 다음에 독소 B 100 ng(200 μ l)을 1일에 마우스에 주사하고 첫 72 시간은 매일, 그 후 매주마다 모니터링하였다. 이 실험의 결과는 PA-41 mAb가 단일 용량의 5 μ g mAb/동물 투여 후 클로스트리듐 디피실리 독소 B-관련된 독성을 완전히 저해하는 것을 보여준다. 유사한 실험을 본원에서 CDB-1 비교 mAb로 지칭하는 비교 항-독소 B 단일클론 항체를 사용하여 수행하였다. 항-독소 B 비교 mAb CDB-1은 전장 인간 IgG1 발현 벡터(pCON-감마1 및 pCON-카파)로 클로닝된 124(W02006/121422 및 US2005/0287150)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산을 합성하는 것(DNA2.0)에 의해 생산하였다. 본원의 실시예 항목에 기재된 바와 같이, CDB-1 비교 mAb를 CHO-KSV1 세포에서 발현 및 생산하고 정제하였다. 이들 실험의 결과는, 250 μ g의 양에서도, 비교 CDB-1 mAb에 의한 어떠한 독소 B 중화 활성도 보여주지 않았다.

도 11은 독소 A 및 독소 B 활성을 생체 내 중화시키는 본 발명의 쥐과 동물 mAb PA-38 및 PA-41의 조합(PA-38 + PA-41)의 능력을 보여준다. 암컷 스위스 웹스터 마우스(6~8 주령, 5 마리/그룹)에 PA-38 + PA-41 mAb 조합, 또는 PBS(200 μ l)를 0일에 주사(i.p.)하였다. 다음에 독소 A 및 독소 B의 조합 100 ng(200 μ l)을 1일에 마우스에 주사하고 첫 72 시간은 매일, 그 후 매주마다 모니터링하였다. 독소, PA-38 단독(흰 원) 및 PA-41 단독(검은 마름모)의 플롯은 그래프에서 겹친다. 결과는 PA-38 mAb(흰 원)과 PA-41 mAb(검은 마름모) 단독으로는 어느 것도 양 독소의 작용을 저해하는 데 충분하지 않았고 클로스트리듐 디피실리 감염에 대하여 동물을 보호하지 못했다. 대조적으로, 각각 50 μ g의 PA-38과 PA-41의 조합(PA-38 + PA-41)(흰색 역삼각형)은 감염된 동물을 보호하고 5 마리 실험동물 중 4 마리에서 독소-관련된 사망을 방지할 수 있었다. 각각 5 μ g의 PA-38과 PA-41의 조합(PA-38 + PA-41)(검은 원)은 감염된 실험동물에서 클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B의 독성에 대한 어느 정도의 보호를 제공하였다.

도 12a 및 12b는 쥐과 동물 mAb PA-38 및 PA-41의 햄스터에서의 약물동력학(PK) 결과를 보여준다. 햄스터에 2 mg/kg(○) 또는 10 mg/kg(■)의 mAb PA-38(12a) 또는 PA-41(12b)를 i.p. 투여하였다. 동물들을 정해진 간격으로 채혈하고 검출을 위해 HRP 결합된 염소 항-마우스 IgG 및 독소 코팅된 플레이트가 구비된 ELISA를 사용하여 혈청을 분석하였다. 결과로 얻은 곡선은 각 항체의 2 mg/kg 및 10 mg/kg 집단에서 용량 의존적 반응을 나타낸다. WinNonLin 분석을 각 곡선이 수행하였다. 두 단일클론 항체는 6일보다 큰 터미널 반감기를 갖는다.

도 13은 실시예 5B에 기재된 햄스터 연구의 생존 결과를 보여준다. 이 연구에서는, 햄스터를 클린다마이신으로 처리하고, 클로스트리듐 디피실리로 접종하고(■ 감염된 대조군, 그룹 3), 반코마이신(◆ 20 mg/kg, 그룹 4), 쥐과 동물 mAb PA-38 + PA-41 조합(△ 50, 50 mg/kg, 그룹 6), 또는 mAb PA-39 + PA-41 조합(○ 50, 40 mg/kg, 그룹 7)으로 처리하였다. 비감염 대조군(그룹 1) 및 염소 다클론 Ab 처리된 대조군(그룹 5)에서는 모든 동물들이 생존하였다. 본 발명의 항-독소 A 및 항-독소 B mAb로 처리된 동물들은 연구 기간 동안 생존하였고 클로스트리듐 디피실리 독성에 대하여 보호되었다.

도 14는 실시예 5B에 기재된 연구에서 햄스터의 평균 체중(그램)을 보여준다. 동물 처리 그룹은 다음과 같다: 비감염 대조군(◆, 그룹 1); 반코마이신-처리 대조군(■, 그룹 4); PA-38 + PA-41 쥐과 동물 mAb 조합-처리된 그룹(x, 그룹 6), 또는 PA-39 + PA-41 쥐과 동물 mAb 조합-처리된 그룹(●, 그룹 7). 감염된 대조군(그룹 3)의 동물들은 5 일 동안 생존하지 못하였다; 따라서, 그룹 3에서는 감염-후 체중 측정을 할 수 없었다.

도 15a 내지 15d는 실시예 5B에 기재된 햄스터 연구의 사후 검시 결과를 보여준다. 이 연구의 관련 그룹 각각으로부터 대표 동물들을 평가하였다: (A) 그룹 1, 비감염 대조군; (B) 그룹 3, 감염된 대조군; (C) 그룹 6, PA-38 + PA-41 쥐과 동물 mAb 조합-처리된 그룹; 및 (D) 그룹 7, PA-39 + PA-41 쥐과 동물 mAb 조합-처리된 그룹. 화살표는 각 햄스터의 맹장을 나타낸다. 감염된 대조군 그룹 3(B)에서는 맹장이 눈에 띄게 적색이고 염증이 생겼다. 대조적으로, 그룹 6(C)과 그룹 7(D)에서 햄스터의 맹장은 건강한 비감염 대조군 그룹 1(A)의 동물에서의 맹

장과 유사하였다.

도 16a 및 16b-1 및 16b-2. 도 16a는 실시예 5C에 기재된 햄스터 연구의 생존 결과를 나타낸다. 이 연구에서는 햄스터를 클린다마이신으로 처리하고, 클로스트리듐 디피실리로 접종하고(■ 감염된 대조군, 그룹 1), 다음에 다른 그룹의 동물들을 반코마이신(◆ 20 mg/kg, 그룹 2), 쥐과 동물 mAb PA-39 + PA-41 조합(▲ 50 + 50 mg/kg, 그룹 3), 쥐과 동물 mAb PA-41 단독(○ 50 mg/kg, 그룹 4), 쥐과 동물 mAb PA-38 단독(▽ 50 mg/kg, 그룹 5), 쥐과 동물 mAb PA-39 단독(□ 50 mg/kg, 그룹 6), 또는 쥐과 동물 mAb PA-50 단독(◇ 50 mg/kg, 그룹 7)으로 처리하였다. 비감염 대조군(그룹 1)에서는 모든 동물들이 연구 과정 동안 생존하였다. **도 16b-1**은 실시예 5E에 기재된 햄스터 연구의 동물 생존 결과를 나타낸다. Kaplan-Meier 생존 곡선은 클린다마이신으로 처리하고, 클로스트리듐 디피실리로 접종하고(■ 감염된 대조군, 그룹 2), 반코마이신 처리(◇ 20 mg/kg, 그룹 3); 인간화된 PA-50 + PA-41 mAb 1:1 조합으로 처리((hPA-50 + hPA-41), △, 50 + 50 mg/kg, 그룹 4); 인간화된 PA-50 + PA-41 mAb 1:1 조합으로 처리((hPA-50 + hPA-41), ○, 20 + 20 mg/kg, 그룹 5); 비교 mAb CDA-1 + CDB-1 1:1 조합으로 처리((CDA-1+CDB-1), ▽, 50 + 50 mg/kg, 그룹 6); 또는 비교 mAb CDA-1 + CDB-1 1:1 조합으로 처리((CDA-1+CDB-1), □, 20 + 20 mg/kg, 그룹 7)하였다. **도 16b-2**는 실시예 5E에 기재된 햄스터 연구의 체중 변화 결과를 나타낸다. **도 16b-1**에서 기술한 다른 처리 그룹에서 시간 경과에 따른 동물의 평균(±SD) 체중을 비감염 대조군 동물과 비교하였다.

도 17a 내지 17C는 클로스트리듐 디피실리 독소 B의 카스파아제1 처리를 보여준다. (A): 전장 클로스트리듐 디피실리 독소 B 및 그의 영역. (B): 독소 B(TcdB) 및 카스파아제1 처리된 독소 B의 3~8% 트리스-아세테이트 SDS-PAGE(환원) 분석. 4개의 독소 단편이 관찰되었다: 193, 167, 103 및 63 kDa. (C): 독소 B의 카스파아제1 처리 후 생성된 가능한 단편.

도 18a 내지 18c는 항-독소 B mAb를 사용한 클로스트리듐 디피실리 독소 B 단편의 SDS-PAGE(A) 및 웨스턴 블랏(B, C) 검출을 보여준다. (A): 카스파아제1 처리에 의해 생성된 독소 B 단편의 SDS-PAGE 분석(**도 17b**와 동일); (B): mAb PA-41을 사용한 독소 B 단편의 웨스턴 블랏 검출. (C) 쥐과 동물 mAb PA-39를 사용한 독소 B 단편의 웨스턴 블랏 검출.

도 19a 내지 19e는 비아코어 결합에 의한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 쥐과 동물 mAb의 특성 분석을 보여준다. 항-독소 mAb의 경쟁적 결합을 평가하였다. (A): mAb PA-41은 독소 B에서 단일 에피토프에 결합한다. (B): mAb PA-39는 독소 A에서 단일 에피토프에 결합한다. (C): mAb PA-39 및 PA-41은 독소 B에서 다른 에피토프에 결합한다. mAb PA-41의 독소 B에 대한 결합은 비교 CDB-1 항-독소 B 항체의 독소 B에 대한 결합과 에피토프에서 다르다. (D) CM5 칩에 고정된 mPA-41은 독소 B를 포획하지만, 추가의 mAb-41과 결합할 수 없어서, mPA-41의 단 하나의 결합 에피토프가 있는 것을 나타낸다. 비교 mAb CDB-1의 첨가는 증가된 신호를 내서, mPA-41과 비교 mAb CDB-1은 독소 B에서 다른 에피토프에 결합하는 것을 나타낸다. (E) 카스파아제1 처리 또는 비처리된 독소 B의 웨스턴 블랏 분석은 mPA-41과 비교 mAb CDB-1은 다른 결합 패턴을 갖고 독소 B에서 다른 에피토프에 결합하는 것을 나타낸다.

도 20a 내지 20c는 엔테로키나제(EK)를 사용한 클로스트리듐 디피실리 독소 A 분열을 보여준다. (A): 전장 클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 그의 영역. (B): 독소 A(TcdA) 및 EK-처리된 독소 A의 3~8% 트리스-아세테이트 SDS-PAGE(환원) 분석. (C): 25℃에서 48 시간 동안 독소 A의 EK 처리 후 생성된 가능한 단편.

도 21a 내지 21c는 항-독소 A 쥐과 동물 mAb를 사용한 클로스트리듐 디피실리 독소 A 단편의 쿠마시 블루 염색(SDS-PAGE)(A), 및 웨스턴 블랏(B, C) 검출. (A): EK 처리에 의해 생성된 독소 A 단편의 SDS-PAGE 분석(**도 20b**와 동일). (B): mAb PA-50을 사용한 독소 A 단편의 웨스턴 블랏 검출. (C): mAb PA-39를 사용한 독소 A 단편의 웨스턴 블랏 검출. **도 21b 및 21c**에서, kDa 밴드는 약 158 kDa이고 약 158~160 kDa으로 볼 수 있다.

도 22a-1 및 22a-2 내지 22f. 도 22a-1 및 22a-2 내지 22d는 비아코어 결합 분석을 사용한 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 대한 쥐과 동물 항-독소 A mAb 결합의 특성 분석을 보여준다. **도 22a-1:** PA-50 mAb는 독소 A에서 다중 부위에 결합하는 것이 관찰되었다. **도 22a-2:** PA-50 mAb는 센서 칩에 고정되고 정제된 독소 A, 추가의 PA-50 및 비교 mAb CDA-1(WO/2006/121422; US2005/0287150)에 순차적으로 접촉하였다. **도 22b:** 비아코어 칩에서 비교 mAb CDA-1에 의해 포획된 독소 A는 추가의 CDA-1 및 PA-50 mAb와 추가로 결합하여, 항체에 의해 결합된 독소 A 에피토프에서 차이를 보인다. **도 22c:** 독소 A에서의 PA-39 mAb 결합 에피토프는 독소 A에서의 비교 mAb CDA-1 결합 에피토프와 다르다. **도 22d:** 독소 A에 대한 쥐과 동물 mAb PA-50 및 PA-39의 경쟁적 결합은 비아코어를 사용하여 수행되었다. CM5 칩에 고정된 mAb PA-50은 독소 A를 포획하는데, 이는 추가의 mPA-50 및 mPA-39와도 결합할 수 있어서, 독소 A에 mPA-50 에피토프의 다중 카피가 존재하고 mPA-50과 mPA-39는 독소 A에 이질

적인 에피토프에 결합하는 것을 나타낸다. **도 22e 및 22f**: 비아코어 결과는 효소 엔테로키나제(EK)로 처리 또는 비처리된 독소 A를 활용한 웨스턴 블랏 분석에 의해 확인되었다. (**E**): mPA-39와 비교 mAb CDA-1은 EK-처리된 독소 A(레인: TcdA/EK)에 대한 다른 결합 패턴을 보여주며, 따라서 독소 A에서 다른 결합 영역 및 에피토프를 나타낸다. (**F**): mPA-50과 비교 mAb CDA-1은 독소 A의 동일 영역이지만 다른 에피토프에 결합한다.

도 23a 및 23b는 6개의 BI/NAP1/027 분리물, 3개의 참고 균주(VPI 10463, ATCC 43596, 및 630), 2개의 독소 A-음성/독소 B-양성(toxA-/tox B+) 분리물, 3개의 외래환자 분리물, 및 6개의 다른 보통의 임상 분리물을 포함하는, 다양한 패년의 20개 클로스트리듐 디피실리 독소생성 임상 분리물에 대한 PA-41의 생체 외 중화 활성을 보여준다. **도 23a**는 실시예 8, 표 6에 나타난 다른 클로스트리듐 디피실리 임상 분리물 배양물로부터 생성된 상청액에 대한 CHO-K1 세포에서의 쥐과 동물 mAb PA-41의 중화 활성을 보여준다. 정제된 mAb PA-41을 연속적으로 희석하고 >90% 세포 사멸을 야기할 수 있는 미리 정의된 희석 인자로 상청액과 혼합하였다. 혼합물을 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션하고 CHO-K1 세포에 가하였다. 세포를 72 시간 동안 인큐베이션하고, Cell-Titer Blue를 사용하여 세포 생존능력을 측정하였다. **도 23b**는 2개의 클로스트리듐 디피실리 참고 균주(VPI 10463 및 ATCC 43596)와 6개의 클로스트리듐 디피실리 BI/027/027 균주(CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 및 Montreal 7.1)에 대한 비교 mAb CDB-1 및 인간화된 mAb hPA-41의 중화 활성을 나타낸다. 참고 균주(VPI 10483 및 ATCC 43596)와 BI/NAP1/027 균주(CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 및 Montreal 7.1)로부터의 상청액에 대한 CHO-K1 세포에서의 hPA-41 mAb(검은 사각형) 및 비교 mAb CDB-1(검은 삼각형)의 중화 활성이 보여진다.

도 24a 및 24b는 도 23a 및 23b에 기술한 클로스트리듐 디피실리 독소생성 임상 분리물에 대한 mAb PA-50의 생체 외 중화 활성을 나타낸다. **도 24a**는 실시예 8, 표 6에 나타난 다른 클로스트리듐 디피실리 임상 분리물 배양물로부터 생성된 상청액에 대한 T-84 세포에서의 쥐과 동물 mAb PA-50의 중화 활성을 보여준다. 정제된 mAb PA-50을 연속적으로 희석하고 >90% 세포 사멸을 야기할 수 있는 미리 정의된 희석 인자로 상청액과 혼합하였다. 혼합물을 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션하고 T-84 세포에 가하였다. 세포를 72 시간 동안 인큐베이션하고, Cell-Titer Blue를 사용하여 세포 생존능력을 측정하였다. **도 24b**는 T-84 세포에서 인간화된 mAb hPA-50 및 비교 mAb CDA-1을 사용한 유사한 실험의 결과를 보여준다. 6개의 BI/NAP1/027 균주(CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 및 Montreal 7.1)로부터 생성된 상청액에 대한 T-84 세포에서의 hPA-50(검은 사각형) 및 CDA-1 비교(검은 삼각형)의 중화 활성이 보여진다. *: N/A: 적용 불가능; 독소 A-/독소 B+ 균주 F1470, 8864, CCL13820 및 CCL14402로부터 독소 A가 생산되지 않았다; ": 독소 A 역가가 매우 낮았다; 상청액을 사용한 T-84 세포에서의 측정 가능한 세포독성 없음; ^: 적용 불가능; 독소 A-/독소 B+ 균주로부터 독소 A가 생산되지 않거나 농도가 매우 낮았다.

도 25a 내지 25d는 클로스트리듐 디피실리의 다양한 균주에 의해 생산된 독소의 중화를 보여준다. **도 25a 및 25b**는 실시예 8, 표 6에 나타난 다른 클로스트리듐 디피실리 임상 분리물 배양물로부터 생성된 상청액에 대한 T-84 세포에서의 쥐과 동물 mAb PA-39의 중화 활성을 보여준다. mAb PA-39(하이브리도마 상청액)을 연속적으로 희석하고 각 상청액의 희석 인자를 보여준다. **도 25b**는 T-84 세포에서 쥐과 동물 mAb PA-39 및 비교 CDA-1 mAb를 사용한 유사한 실험의 결과를 보여준다. 6개의 BI/NAP1/027 균주(CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 및 Montreal 7.1)로부터 생성된 상청액에 대한 T-84 세포에서의 PA-39(검은 사각형) 및 비교 CDA-1 mAb(검은 삼각형)의 중화 활성이 보여진다. **도 25a**에서: *: N/A: 적용 불가능; 독소 A-/독소 B+ 균주 F1470, 8864, CCL13820 및 CCL14402로부터 독소 A가 생산되지 않았다; ": 독소 A 역가가 매우 낮았다; 상청액을 사용한 T-84 세포에서의 측정 가능한 세포독성 없음; ^: 적용 불가능; 독소 A-/독소 B+ 균주로부터 독소 A가 생산되지 않거나 농도가 매우 낮았다. **도 25c**에서는, 인간화된 항-독소 A mAb PA-50 및 비교 항-독소 A mAb CDA-1의 T-84 세포에 대한 클로스트리듐 디피실리 배양물 상청액의 세포 독성의 중화를 시험하였다(실시예 8, 표 7). **도 25d**에서는, 인간화된 항-독소 B mAb PA-41 및 비교 항-독소 A mAb CDB-1의 T-84 세포에 대한 클로스트리듐 디피실리 배양물 상청액의 세포 독성의 중화를 시험하였다(실시예 8, 표 7).

도 26은 키메라 mAb PA-41(cPA-41 mAb)가 대응하는 쥐과 동물 mAb PA-41과 비교하여 CHO-K1에서 클로스트리듐 디피실리 독소 B의 독성을 효과적으로 중화시키는 것을 보여준다. 두 개의 키메라 PA-41 mAb를 생성하였다; 도면에서 VL 영역에 글리코실화 부위가 제거된 하나는 cPA-41(NG)로 지칭하고, 글리코실화 부위 제거가 없는 하나는 cPA-41(G)로 지칭하였다. cPA-41(NG)와 cPA-41(G)는 모두 CHO-K1 세포에서 독소 B에 대한 유사한 중화 수준을 보여주었고(2 pg/mL, TechLab), 두 개의 키메라 mAb는 모체 쥐과 동물 mAb(mPA-41)의 것과 유사한 농도에서 독소 B를 중화시켰다.

도 27은 키메라 PA-39(cPA-39) mAb가 모체 쥐과 동물 PA-39(mPA-39) mAb와 비교하여 CHO-K1 세포에서 클로스트리듐 디피실리 독소 A(1 μ g/mL, Listlab)의 독성을 효과적으로 중화시키는 것을 보여준다.

도 28은 키메라 PA-50(cPA-50) mAb가 모체 쥐과 동물 PA-50(mPA-50) mAb와 비교하여 T-84 세포에서 클로스트리듐 디피실리 독소 A(60 ng/mL, TechLab)의 독성을 효과적으로 중화시키는 것을 보여준다.

도 29는 쥐과 동물 PA-41(mPA-41) 및 인간화된 PA-41(hPA-41) mAb의 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 대한 생체 외 중화 활성을 보여준다. 대조군과 비교한 % 세포 생존을 CellTiter Blue를 사용하여 측정하였다. hPA-41 mAb는 CHO-K1 세포에서 6 pM의 EC₅₀으로 독소 B(2 pg/mL, Techlab)의 독성을 효과적으로 중화시켰으며 모체 쥐과 동물 단일클론 항체(mPA-41)와 사실상 동등하였다.

도 30은 쥐과 동물 PA-39(mPA-39) 및 인간화된 PA-39(hPA-39) mAb의 클로스트리듐 디피실리 독소 A에 대한 생체 외 중화 활성을 보여준다. hPA-39 mAb는 CHO-K1 세포에서 50 pM의 EC₅₀으로 독소 A(20 ng/mL, TechLab)의 독성을 효과적으로 중화시켰으며 모체 쥐과 동물 단일클론 항체(mPA-39)와 사실상 동등하였다.

도 31a 내지 31h는 상기 mAb를 사용한 생체 외 중화 활성 및 작용 기전(MOA) 연구의 결과를 보여준다. CHO-K1 세포 및 T-84 세포를 사용한 세포-베이스의 분석을 실시해 1, 3 및 7에서 기술한 바와 같이 실시하였다. **도 31a**는 인간화된 PA-50(hPA-50) mAb가 모체 쥐과 동물 PA-50 mAb(mPA-50)와 비교하여 T-84 세포에서 독소 A(60 ng/mL, TechLab)의 독성을 효과적으로 중화시키는 것을 보여준다. **도 31b-31d**는 비교 항-독소 A mAb CDA-1와 비교하여 항-독소 A mAb PA-39 및 PA-50의 중화 활성을 보여준다. EC₅₀ 및 최대 % 저해값은 실시해 7C의 표 A에 나타낸다. **도 31e 및 31f**는 비교 항-독소 B mAb CDB-1와 비교하여 항-독소 B mAb PA-41의 중화 활성을 보여준다. EC₅₀ 및 최대 % 저해값은 실시해 7C의 표 B에 나타낸다. **도 31g 및 31h**는 세포로의 독소 A 내재화를 차단하는 항-독소 A mAb의 능력을 평가하고 독소 A 내재화를 저해하는 이들 mAb의 활성을 다클론 염소 항-독소 A 항체 대조군 및 항체가 없는 대조군과 비교하여 평가하기 위한 ELISA 방법 및 결과를 보여준다.

도 32a 및 32b는 인간화된 PA-39(hPA-39) VH 영역의 아미노산 서열인 서열번호 1 및 서열번호 2를 나타낸다. 아미노산 잔기는 단일 문자 코드로 나타낸다. 서열 위의 숫자는 Kabat 등에 따른 위치를 나타낸다. CDR의 위치는 밑줄로 표시한다.

도 33a 및 33b는 인간화된 PA-39(hPA-39) VL 영역의 아미노산 서열인 서열번호 3 및 서열번호 4를 나타낸다. 아미노산 잔기는 단일 문자 코드로 나타낸다. 서열 위의 숫자는 Kabat 등에 따른 위치를 나타낸다. CDR의 위치는 밑줄로 표시한다.

도 34a 및 34b는 인간화된 PA-50(hPA-50) VH 영역의 아미노산 서열인 서열번호 5 및 서열번호 6을 나타낸다. 아미노산 잔기는 단일 문자 코드로 나타낸다. 서열 위의 숫자는 Kabat 등에 따른 위치를 나타낸다. CDR의 위치는 밑줄로 표시한다.

도 35는 인간화된 PA-50 VL 영역의 아미노산 서열인 서열번호 7을 나타낸다. 아미노산 잔기는 단일 문자 코드로 나타낸다. 서열 위의 숫자는 Kabat 등에 따른 위치를 나타낸다. CDR의 위치는 밑줄로 표시한다.

도 36a 및 36b는 인간화된 PA-41(hPA-41) VH 영역의 아미노산 서열인 서열번호 8 및 서열번호 9를 나타낸다. 아미노산 잔기는 단일 문자 코드로 나타낸다. 서열 위의 숫자는 Kabat 등에 따른 위치를 나타낸다. CDR의 위치는 밑줄로 표시한다.

도 37은 인간화된 PA-41 VL 영역의 아미노산 서열인 서열번호 10을 나타낸다. 아미노산 잔기는 단일 문자 코드로 나타낸다. 서열 위의 숫자는 Kabat 등에 따른 위치를 나타낸다. CDR의 위치는 밑줄로 표시한다.

도 38a 및 38b는 인간화된 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일클론 항체의 핵산 서열 및 코딩된 아미노산 서열을 보여준다. **도 38a**는 서열번호 16으로 나타낸 인간화된 항-독소 A 단일클론 항체의 경쇄의 아미노산 서열을 나타내고, 이는 서열번호 17로 나타낸 핵산 서열로 코딩된다. **도 38b**는 서열번호 14로 나타낸 인간화된 단일클론 항체의 중쇄의 아미노산 서열을 나타내고, 이는 서열번호 15로 나타낸 핵산 서열로 코딩된다.

도 39a 및 39b는 인간화된 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일클론 항체의 핵산 서열 및 코딩된 아미노산 서열을 보여준다. **도 39a**는 서열번호 20으로 나타낸 인간화된 항-독소 A 단일클론 항체의 경쇄의 아미노산 서열을 나타내고, 이는 서열번호 21로 나타낸 핵산 서열로 코딩된다. **도 39b**는 서열번호 18로 나타낸 인간화된 항-독소 A 단일클론 항체의 중쇄의 아미노산 서열을 나타내고, 이는 서열번호 19로 나타낸 핵산 서열로 코딩된다.

도 40a 및 40b는 인간화된 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 단일클론 항체의 핵산 서열 및 코딩된 아미노산 서열을 보여준다. 도 40a는 서열번호 24로 나타낸 인간화된 항-독소 B 단일클론 항체의 경쇄의 아미노산 서열을 나타내고, 이는 서열번호 25로 나타낸 핵산 서열로 코딩된다. 도 40b는 서열번호 22로 나타낸 인간화된 항-독소 B 단일클론 항체의 중쇄의 아미노산 서열을 나타내고, 이는 서열번호 23으로 나타낸 핵산 서열로 코딩된다.

도 41a 내지 41c는 쥐과 동물 mAb의 Fab 단편의 클로스트리듐 디피실리 독소 A 또는 독소 B에 대한 생체 외 중화 활성을 대응하는 전체 항체의 효력과 비교하여 나타낸다. (A): CHO-K1 세포에서의 쥐과 동물 mAb PA-39 및 PA-39 Fab 중화 활성; 독소 A(Techlab, 60 ng/mL); (B): CHO-K1 세포에서 쥐과 동물 mAb PA-41 및 PA-41 Fab 중화 활성; 독소 B(Techlab, 2 pg/mL); (C): T-84 세포에서 쥐과 동물 mAb PA-50 및 PA-50 Fab 중화 활성; 독소 A(Techlab, 60 ng/mL).

도 42a 및 42b는 본원의 실시예 13에 기술된 약물동력학(PK) 연구로부터 얻어진 항체 농도 프로파일을 보여준다. 도 42a는 단일 용량의 정제되고 인간화된 항-독소 A mAb PA-50을 0일에 1 mg/kg(▲) 또는 5 mg/kg(■)의 용량으로 받은 동물로부터의 29일에 걸친 PK 결과(혈청 항체 농도는 $\mu\text{g/mL}$)를 보여준다. 도 42b는 단일 용량의 정제되고 인간화된 항-독소 B mAb PA-41을 0일에 1 mg/kg(▲) 또는 5 mg/kg(■)의 농도로 받은 동물로부터의 29 일에 걸친 PK 결과(혈청 항체 농도는 $\mu\text{g/mL}$)를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 본 발명은 클로스트리듐 디피실리 감염의 발병 효과를 차단하며, 바람직하게는 결장을 치유할 시간 및/또는 위 장관, 예를 들어, 결장, 대장, 소장 등의 정상적인 미생물이 회복될 시간을 제공하는 비 항생제적 치료방법 및 처치방법을 제공하는 항체 및 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 본원에 기술한 바와 같은 단일 클론 항체, 그의 인간화 또는 키메라 형태와 같은 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리 감염 및 클로스트리듐 디피실리 관련 설사 환자가 추가 질병 또는 더욱 심각한 질병이나 증상으로 악화되지 않고 질병을 해소할 수 있도록 활동성 질병 치료 및 재발성 질병 예방 모두를 위한 비 항생제적 치료법 및 의약품을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 클로스트리듐 디피실리에 의하거나 클로스트리듐 디피실리와 관련이 있는 활동성 질병과 클로스트리듐 디피실리에 의한 대상자 감염에 대해 치료 활성을 나타낸다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 클로스트리듐 디피실리에 의하거나 클로스트리듐 디피실리와 관련이 있는 활동성 질병과 클로스트리듐 디피실리에 의한 대상자 감염을 해소한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 클로스트리듐 디피실리에 의하거나 클로스트리듐 디피실리와 관련이 있는 활동성 질병과 대상자의 클로스트리듐 디피실리 감염의 지속성 및/또는 중증도를 감소시키는 데 치료적 효과를 나타낸다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 일부분 또는 단편은 항생제적 치료법과 조합하여 제공할 수 있다.

[0064] 클로스트리듐 디피실리 독소 A와 독소 B에 대한 단일 클론 항체는 본원에 기술한 바와 같이 생성되었다. 항독소 단일 클론 항체는 생체 외 분석 및 생체 내 클로스트리듐 디피실리 감염의 전임상 동물 모델 모두에서 강력한 활성을 나타낸다. 더욱 상세하게는, 본 발명의 단일 클론 항체는 클로스트리듐 디피실리 감염의 유의미하고 엄격한 햄스터 모델에서 강력하게 그리고 지속적으로 햄스터를 사망으로부터 보호한다.

[0065] 상기 항체는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사의 치료를 위한 비 항생제적 접근법을 제공하며, 항생제 중단을 가능하게 할 수 있고 클로스트리듐 디피실리 독소의 발병 효과를 차단할 수 있고, 그럼으로써 결장을 치유할 시간 및 정상적인 대장 미생물이 회복될 수 있는 시간을 제공한다. 본원에 기술한 단일 클론 항체는 클로스트리듐 디피실리 독소를 중화시키는 능력에 의한 치료적 이익을 제공할 수 있고, 여러 차례 클로스트리듐 디피실리의 재발을 겪는 환자를 치료하기 위한 소극적 또는 적극적인 전략에 이용할 수 있다. 특히, 상기 단일 클론 항체는 감염 재발 예방, 심각하고 활동적인 형태의 질병 치료 및 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 여러 차례 재발을 겪는 환자의 치료를 위해 이용할 수 있다. 본원에 기술한 바와 같은 단일 클론 항체는 감염의 재발 및/또는 상기 질병의 심각하고 활동적인 형태와 여러 차례의 재발을 예방, 차단 또는 억제하기 위해 클로스트리듐 디피실리 독소 A와 독소 B를 중화시키는 효과적인 수단을 제공할 수 있다.

[0066] 본원에 사용한 "독소 A"와 "독소 B"는 미생물 클로스트리듐 디피실리에 의해 생산되는 세포독성을 나타내는 장내 독소를 나타낸다. 독소 A와 독소 B는 클로스트리듐 디피실리의 가장 중요한 독성인자이고, 독소 음성 균주는 비 병원성이다. 독소 A와 독소 B는 독소 유전자 *tcdA*(독소 A)와 *tcdB*(독소 B), 그리고 세 개의 조절 유전자를 포함하는 병원성 유전자좌로부터 전사되며, 세 조절 유전자 중 하나(*tcdC*)는 독소 전사의 음성 조절자로 추정되는 단백질을 코딩한다. *TcdC* 단백질은 상기 균의 생애주기의 초기 대수증식기 동안 독소의 전사를 저해하는 것으로 보인다. 독소 B의 경우, 543번째 류신과 544번째 글리신 사이의 자가 촉매적 절단 위치가 기술된 바 있다.

절단은 숙주의 세포질 이노시톨 포스페이트에 의한 아스파틸 프로테아제 영역 활성화에 의해 일어나며, 활성 글루코실 트랜스페라아제 영역을 방출한다.

[0067] 본 발명은 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B에 특이적으로 결합하는 항체와 그 항원 결합 단편, 그러한 항체 또는 그 항원 결합 단편 중 하나 이상을 함유하는 조성물, 상기 항체 또는 그 항원 결합 단편을 코팅하는 염기서열을 함유하는 벡터, 상기 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주 및 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 치료 또는 예방을 위한 상기 항체 또는 그 항원 결합 단편의 이용방법을 제공한다.

[0068] "항체" 또는 "면역 글로불린"이라는 용어가 본원에서 본 발명 및 그의 다양한 측면과 실시형태를 기술하면서 언급될 때, 이 용어는 "항체" 또는 "면역 글로불린"이라는 용어가 언급될 때마다 관련된 구절인 "항원 결합 단편"의 과도한 반복을 피하기 위해 일반적으로 그러한 항체 또는 면역 글로불린의 항원 결합 단편을 포함하는 것으로도 여겨져야 함을 이해하여야 한다. 그러므로 본 발명은 본원에 추가로 기술한 바와 같이, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 독소 B, 즉 독소 A와 독소 B 항원을 대상으로 하는 항체뿐만 아니라, 클로스트리듐 디피실리 독소 A와 독소 B 항원에 결합하는 그러한 항체의 단편도 포함한다. 일 실시형태에서, 그러한 항원 결합 단편은 온전한 항체와 비슷한 방식으로 독소 A 및/또는 독소 B의 독성을 중화할 수 있다.

[0069] 본 발명에 의해 포함되는 항체는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 특이적으로 결합하며 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와의 특이적 결합을 경쟁적으로 저해하거나, 또는 이러한 특이적 결합에 대해 교차 경쟁하는 분리된 항체를 포함한다. 또한, 상기 항체는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 특이적으로 결합하며 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 결합으로 정의되는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A의 에피토프에 특이적으로 결합하는 분리된 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 에피토프는 tcdA의 C 말단 수용체 결합 영역에 있다. 이러한 실시형태 중 일부에서, 상기 항체는 PA-50의 tcdA에 대한 결합을 경쟁적으로 저해하거나 PA-50의 tcdA 결합에 대하여 교차 경쟁한다. 다른 실시형태에서, 상기 에피토프는 tcdA의 전좌 영역에 있다. 이러한 실시형태 중 일부에서, 상기 항체는 PA-39의 tcdA에 대한 결합을 경쟁적으로 저해하거나 PA-39의 tcdA 결합에 대해 교차 경쟁한다. 그러한 분리된 항체는 단일 클론 항체, 다중 클론 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 인간화 항체 및 그의 항원 결합 단편 또는 일부분을 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일 클론 항체의 특이성을 평가하기 위해 실시예 6에 기재한 바와 같이 독소 A의 효소적(엔테로키나아제) 단백질 분해를 이용하는 실험을 하였다. 단일 클론 항체 PA-39가 인식하고 결합하는 독소 A의 에피토프는 독소 A의 수용체 결합 영역과는 다른 영역, 즉, 독소 A 수용체 결합 영역 이외의 영역이자 독소 A의 C 말단 수용체 결합 영역에 결합한다고 보고된 인간 항-독소 A 항체가 결합하는 에피토프와는 다른 영역에 있다(7). 본원에서 실시예 6 및 실시예 7에 기술하고 도 22와 도 31에 나타난 바와 같이, 비아코어 분석 결과는 PA-39에 대한 독소 A 상의 단일 결합 부위를 뒷받침한다. 효소적으로 분해한 독소 A의 웨스턴 블랏 검출 결과는 PA-39가 독소 A 상의 PA-50과 CDA-1 비교 단일 클론 항체가 결합되는 영역과는 다른 영역에 결합함을 보여준다. 독소 역가 시험에서 더 많은 독소 A가 배양액에 첨가됨에 따라 PA-39의 생체 외 활성은 EC₅₀ 및 최대 저해 백분율 변화를 보이며, 이는 PA-39에 대한 혼합 경쟁적 저해 기전을 의미한다. 100배 초과 PA-39로 보호한 후의 독소 A의 ELISA 검출 결과는 독소의 내재화 및 부정적인 세포 독소 효과, 예를 들어 세포 독성을 방지하여 PA-39에 의한 독소 저해가 일어남을 확인시켜 주었다.

[0071] 뿐만 아니라, 본원에서 실시예 6 및 실시예 7에 기술하고 도 22와 도 31에 나타난 바와 같이, 비아코어 분석 결과는 PA-50에 대한 독소 A 상의 적어도 두 개의 결합 부위를 뒷받침한다. 효소적으로 분해한 독소 A의 웨스턴 블랏 검출 결과는 PA-50이 비교 단일 클론 항체 CDA-1이 결합되는 영역과 유사한 독소 A 상의 영역에 결합함을 보여준다. 독소 역가 시험에서 더 많은 독소 A가 배양액에 첨가됨에 따라 PA-50의 생체 외 활성은 EC₅₀의 변화를 보이며, 이는 PA-50에 대한 경쟁적 저해 기전을 의미한다. 100배 초과 PA-50으로 보호한 후의 독소 A의 ELISA 검출 결과는 독소의 내재화 및 그에 따른 세포 독성 방지에 의해 PA-50에 의한 독소 저해가 일어남을 확인시켜 주었다.

[0072] 또한, 본 발명의 항체는 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 특이적으로 결합하며 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 대한 특이적 결합을 경쟁적으로 저해하거나 이러한 특이적 결합에 대해 교차 경쟁하는 분리된 항체를 포함한다. 또한, 상기 항체는 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 특이적으로 결합하며 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-

9692로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 결합으로 정의되는 클로스트리듐 디피실리의 독소 B의 에피토프에 특이적으로 결합하는 분리된 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 에피토프는 tcdB의 N 말단 효소 영역에 있다. 이러한 실시형태 중 일부에서, 상기 항체는 PA-41의 tcdB에 대한 결합을 경쟁적으로 저해하거나 PA-41의 tcdB 결합에 대해 교차 경쟁한다. 다른 실시형태에서, 상기 에피토프는 tcdB의 전좌 영역, 예를 들어, 850 내지 1330번째 아미노산에 있다. 이러한 실시형태 중 일부에서, 상기 항체는 PA-39의 tcdB에 대한 결합을 경쟁적으로 저해하거나 PA-39의 tcdB 결합에 대해 교차 경쟁한다.

[0073] 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 단일 클론 항체의 특이성을 평가하기 위해 독소 B의 효소적(카스파아제1) 단백질 분해를 이용하는 실험을 실시예 6에 기재한 바와 같이 하였다. 단일 클론 항체 PA-41(PTA-9693)은 독소 B의 N 말단 효소 영역에서 유래하는 약 103kDa 및 63kDa의 단편들을 인식하는 것으로 나타났다. 중요한 분해 단편들에 대한 N 말단 분석 결과는 이러한 분석 결과를 확인시켜 주었다. 단일 클론 항체 PA-41은 인간 항-독소 B 항체가 결합되는 독소 B의 C 말단 수용체 결합 영역과는 다른, 독소 B의 N 말단 효소 영역 내의 독특한 에피토프에 결합하는 것으로 나타났다(7). 본원에서 실시예 6 및 실시예 7에 기술하고 도 19와 도 31e 및 도 31f에 나타낸 바와 같이, 비아코어 분석 결과는 PA-41에 대한 독소 B 상의 단일 결합 부위를 뒷받침한다. 효소적으로 분해한 독소 B의 웨스턴 블랏 검출 결과는 PA-41이 비교 단일 클론 항체 CDB-1이 결합되는 영역과는 다른, 독소 B 상의 다른 영역에 결합함을 보여준다. 독소 역가 시험에서 더 많은 독소 B가 배양액에 첨가됨에 따라 PA-41의 생체 외 활성은 EC₅₀ 및 최대 저해 백분율 변화를 보이며, 이는 PA-41에 대한 혼합 경쟁적 저해 기전을 의미한다.

[0074] 본원에 제공된 항체는 기탁하여 다음과 같은 특허 수탁번호를 부여 받은 하이브리도마가 생산하는 단일 클론 항체를 포함한다: PTA-9692(PA-39에 대해), PTA-9693(PA-41에 대해), PTA-9694(PA-50에 대해) 및 PTA-9888(PA-38에 대해). 이들 하이브리도마는 특허절차상 미생물기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약 요건에 따라 그리고 상기 요건을 충족하여, 국제기탁기관인 American Type Culture Collection("ATCC", P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA)에 2009년 1월 6일(PTA-9692, PTA-9693, PTA-9694에 대해)과 2009년 3월 24일(PTA-9888)에 기탁되었으며, 상술한 특허 수탁번호를 부여 받았다. 본원에 사용한 기탁된 하이브리도마와 상기 하이브리도마가 생산한 단일 클론 항체는 동일한 ATCC 수탁번호로 또는 상기 ATCC 수탁번호에 있는 숫자로 언급될 수 있다. 예를 들어, PTA-9888 또는 9888을 기탁된 하이브리도마 또는 상기 하이브리도마가 생산한 단일 클론 항체를 언급하는 데 사용할 수 있다. 따라서, 본원에 기술한 단일 클론 항체의 명칭은 그것을 생산하는 하이브리도마의 명칭과 상호교환적으로 이용될 수 있다. 당업자라면 이러한 명칭이 항체 또는 그 항체를 생산하는 하이브리도마를 언급하도록 의도되는 경우를 명백히 알 것이다. 본원에 제공한 항원 결합 단편은 앞서 서술한 기탁된 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0075] 본 발명의 항체는 여러 가지 이로운 특징들을 나타낸다. 예를 들어, 항-독소 A 항체는 생체 외 및 생체 내에서 독소 A의 독성을 중화시키거나 저해한다. IMR-90 세포를 이용한 생체 외 중화 연구에서, 인간화 PA-39 및 인간화 PA-41은 각각 이러한 세포들 상에서 독소 A에 대해 46pM, 그리고 독소 B에 대해 5pM의 중화 효능(즉, EC₅₀값)을 나타냈다. 문헌(WO/2006/121422; US2005/0287150; Babcock et al., *Infect. Immun.*, 2006), (7)에 보고된 인간 항-독소 A 및 항-독소 B 단일 클론 항체에 의한 중화가와 비교할 때, hPA-39의 46pM EC₅₀ 중화가는 보고된 인간 항-독소 A 단일 클론 항체의 중화가보다 더 높고, hPA-41의 5pM EC₅₀ 중화가는 보고된 인간 항-독소 B 단일 클론 항체의 중화가보다 더 높은 것으로 나타났다. 따라서, 본원에 기술한 연구에서, 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A와 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 단일 클론 항체, 특히 이들 단일 클론 항체의 인간화된 형태는 보고되었던 기타 항-독소 항체들보다 증가된 항-독소 중화 특성을 나타낸다.

[0076] 일 실시형태에서, 본 발명의 항-독소 A 항체는 유효량에서 클로스트리듐 디피실리 독소 A의 생체 내 독성을 중화시키거나 저해한다. 다른 실시형태에서 항-독소 B 항체는 독소 B의 생체 내 독성을 중화시키거나 저해한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 항-독소 A 항체 유효량을 클로스트리듐 디피실리 감염 대상자에게 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 항-독소 A 항체 유효량을 본 발명의 하나 이상의 항-독소 B 항체 유효량과 함께 클로스트리듐 디피실리 감염 대상자에게 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항-독소 A 항체와 본 발명의 항-독소 B 항체를 1:1로 조합하여 클로스트리듐 디피실리 감염 대상자에게 유효량으로 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항-독소 A 항체와 항-독소 B 항체의 유효량은 항체들을 예를 들어, 1/2:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 등의 조합 비율로 클로스트리듐 디피실리 감염 대상자에게 제공할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 항체는 인간화된 항체이다. 일 실시형태에서, 상기 항체는 조성물에 포함된다. 설명적으로, 항-독소 A 및/또는 항-독소 B 항체의 유효량은 0.1μg 내지 1000밀리그램(mg)의 범위일 수 있다. 항-독소 A 항체 및 항-독

소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 대상자에게 예를 들어, 0.1mg/kg 내지 150mg/kg, 0.5mg/kg 내지 75mg/kg, 1mg/kg 내지 100mg/kg, 1mg/kg 내지 50mg/kg, 2mg/kg 내지 40mg/kg, 2mg/kg 내지 50mg/kg, 5mg/kg 내지 50mg/kg, 5mg/kg 내지 25mg/kg, 10mg/kg 내지 40mg/kg, 10mg/kg 내지 50mg/kg, 10mg/kg 내지 25mg/kg, 또는 15mg/kg 내지 50mg/kg의 양으로 투여할 수 있다. 일 실시형태에서, 상술한 양은 여러 가지 비율로 조합하여 제공된 항-독소 A 항체와 항-독소 B 항체를 포함할 수 있다.

[0077] 본원에 사용한 용어 "중화한다"는 상기 항체가 특이적으로 결합하는 독소의 부작용을 감소, 저해, 차단, 개선 또는 제거함을 나타낸다. 상기 독소의 부작용 중화는 1) 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사 또는 질병 발병 또는 진행의 지연, 감소, 저해 또는 예방, 2) 상기 항체로 치료한 적이 없으며, 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병에 걸린 대상자들의 중간 생존율과 비교할 때, 대상자의 생존율을 증가, 3) 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사 또는 질병과 관련된 하나 이상의 증상 또는 부작용 제거 또는 하나 이상의 증상 또는 부작용의 중증도 감소, 4) 클로스트리듐 디피실리로 감염이 되었거나 과거에 감염된 적이 있었던 대상자들의 위장관에 정상적인 미생물의 재상주를 가능케 함, 5) 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병을 앓았던 대상자들의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 재발 방지, 6) 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병을 앓는 대상자에서 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 치유율 달성 및/또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사로 말미암은 사망 또는 클로스트리듐 디피실리 감염과 관련된 기타 부작용 예방을 포함한다.

[0078] 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A와 독소 B 항체는 인간과 기타 비 인간(포유류) 동물을 포함하는 여러 종의 대상자를 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 치료할 수 있는 대상자는 인간, 비 인간 영장류, 개, 고양이, 마우스, 쥐, 햄스터, 기니피그, 소, 염소, 양, 돼지, 말 등을 포함한다. 인간 대상자는 본원에서 환자 또는 개체로도 언급될 수 있다. 특히, 대상자는 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병을 겪고 있는 인간 환자를 포함한다. 그러한 인간 환자는 노인 또는 면역력이 약한 환자들을 포함한다.

[0079] 본 발명에 따라, 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A와 독소 B 항체는 클로스트리듐 디피실리 질병을 해소하고, 대상자의 생존율을 증가시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 항-독소 A 항체 및/또는 하나 이상의 항-독소 B 항체를 대상자에게 투여할 경우, 상기 항체로 치료한 적이 없으며 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병에 걸린 대상자들의 중간 생존율과 비교하여, 상기 대상자의 생존율이 향상된다.

[0080] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 항-독소 A 또는 항-독소 B 항체의 양은 예를 들어 생체 내 마우스 실험을 기초로 할 경우, 예를 들어, 0.2 μ g 내지 250 μ g, 또는 2 μ g 내지 50 μ g, 또는 5 μ g 내지 50 μ g의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 항-독소 A 또는 항-독소 B 항체의 양, 그리고 특히, 항-독소 A 항체와 항-독소 B 항체 조합의 양은 예를 들어, 생체 내 햄스터 실험을 기초로 할 경우, 예를 들어, 2mg/kg 내지 40mg/kg, 2mg/kg 내지 50mg/kg, 5mg/kg 내지 40mg/kg, 5mg/kg 내지 50mg/kg, 10mg/kg 내지 40mg/kg, 또는 10mg/kg 내지 50mg/kg의 범위일 수 있다.

[0081] 또 다른 예로서, 본 발명의 항체는 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99%의 치유율 또는 생존율을 달성할 수 있다. 또 다른 예로서, 상기 항체는 100%의 치유율 또는 생존율을 달성할 수 있다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 항-독소 A 항체를 하나 이상의 항-독소 B 항체와 함께 대상자에게 투여할 경우, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%의 치유율 또는 생존율을 달성한다. 본원에 사용한 "치유율"이란 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 그의 하나 이상의 조성물을 투여한 감염 또는 질병 대상자 집단 가운데 임상이가 더 이상 감염 또는 질병을 앓지 않는다고 결정하는 대상자들의 백분율을 나타낸다. 본원에 사용한 "생존율"은 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 그의 하나 이상의 조성물을 투여한 대상자 집단 가운데 원하는 기간 동안 생존하는 대상자들의 백분율을 나타낸다. 이러한 원하는 기간의 예는 본 명세서의 다른 곳에서 제공된다.

[0082] 본 발명이 제공한 항-독소 A 및 항-독소 B 항체는 클로스트리듐 디피실리에 감염된 대상자에서 정상적인 소화관 내 미생물의 회복을 가능하게 할 수 있다. 이러한 방식으로, 상기 항체는 치료 중인 환자들의 질병을 해소할 수 있다. 또한, 본 발명의 항-독소 A 및 항-독소 B 항체는 이로운 생체 내 약물 동력학을 보여줄 수 있다. 또한, 본 발명의 항-독소 A 및 항-독소 B 항체는 클로스트리듐 디피실리에 감염되었던 대상자를 위하여 장기적인 또는 오래 지속되는 치료법을 제공할 수 있다. 본원에 사용한 "오래 지속되는"의 의미는 치료를 중단한지 1개월 또는 그 이상이 되어도 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 부재를 가져오는 치료

법을 나타낸다. 바람직하게는, 상기 치료법은 2개월 이상의 기간 동안 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 부재를 가져온다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일 클론 항체를 이용한 치료법은 활성 클로스트리듐 디피실리 감염의 치료 또는 억제, 그리고 감염의 강건성 감소 또는 감퇴를 가져온다. 다른 실시형태에서, 본 발명이 제공하는 치료법은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개월 동안 대상자에서 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 부재를 가져온다. 다른 실시형태에서, 본 발명이 제공하는 치료법은 6개월보다 오랫동안 대상자에서 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 부재를 가져온다. 본 발명의 항-독소 A 및 항-독소 B 항체는 클로스트리듐 디피실리 감염 및/또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 재발을 예방할 수 있다.

[0083] 클로스트리듐 디피실리 관련 설사의 재발 특성은 최후 수단인 두 가지 새로운 항생제 레보플록사신과 목시플록사신에 대해 저항성을 나타낸다는 사실이 밝혀진 맹독성 BI/NAP1/027 균주의 출현으로 악화된다. 이러한 균주는 미국, 캐나다 및 서유럽에서 더욱 더 빈번한 발병을 촉발했다. 맹독성 균주는 총칭하여 BI/NAP1/027로 알려진 북아메리카 펄스필드 1형(North American Pulsed Field Type 1, NAP1), 제한효소 분석 "BI"형(restriction enzyme analysis type "BI") 및 PCR 리보타입 027을 특징으로 하는 밀접하게 관련 있는 일군의 분리균을 포함한다(5). BI/NAP1/027 균주의 맹독성은 적어도 부분적으로는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사의 두 독성 인자인 독소 A와 독소 B의 생산량 증가 탓으로 돌려졌다(6). BI/NAP1/027 분리균은 기타 균주보다 독소 A와 독소 B를 16 내지 23배나 더 높은 수준으로 생산한다(6). 이들 균주의 명백한 적합성은 클로스트리듐 디피실리 관련 설사의 재발율과 중증도 증가뿐만 아니라, 기타 질병을 위한 항생제 치료 가능성을 위태롭게 하는 위협의 전 세계적인 확산을 발생시킨다. 니타족사나이드, 리팍시민, 라모플라닌 및 피닥소마이신과 같은 클로스트리듐 디피실리 관련 설사 치료를 위해 개발 중인 항생제가 있지만, 리팍시민에 저항성을 나타내는 클로스트리듐 디피실리의 임상적이 분리균이 보고된 바 있다. 최근에 완료된 제3상 시험(91)에서, 피닥소마이신은 반코마이신에 비해 전체적인 클로스트리듐 디피실리 관련 설사 재발율을 상당히 감소시켰으나, BI/NAP1/027 균주에 대해서는 그렇지 않았다. 맹독성 BI/NAP1/027 균주 발생은 입원, 치료 실패, 빈번한 재발과 사망률 증가로 이어졌다(3). 본원에서 개발하여 기술한 신규 단일 클론 항체는 점차 늘어나는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사 발생 및 중증도 방지를 위한 새로운 치료법을 제공한다.

[0084] 일 실시형태에서, 본 발명의 단일 클론 항체는 클로스트리듐 디피실리의 여러 가지 균주들로 말미암은 감염의 치료에 이용된다. 일 실시형태에서, 상기 클로스트리듐 디피실리 균주는 감염성이 높으며, 그 독소는 본 발명의 단일 클론 항체에 의해 중화된다. 일 실시형태에서, BI/NAP1/027를 포함하는 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주의 독소는 본 발명의 단일 클론 항체에 의해 중화된다. 일 실시형태에서, 본 발명의 단일 클론 항체는 외래 환자 분리주에서 유래한 균주를 포함한 광범위한 독소 생산성 임상 분리주의 독소를 중화시키는 데 치료 효과를 제공한다. 바람직하게는, 상기 단일 클론 항체는 BI/NAP1/027과 같은 맹독성 분리주와 적어도 90% 이상의 클로스트리듐 디피실리의 다른 임상적으로 유의미한 분리주의 독소를 중화시킨다. 특히, 그리고 본원에서 실시예 8에 나타난 바와 같이, 본 발명의 단일 클론 항체는 BI/NAP1/027 및 기타 맹독성 클로스트리듐 디피실리 균주, 예를 들어, CCL676, HMC553, Pitt45, CD196, 몬트리올 5 및 몬트리올 7.1을 포함하는 19종의 클로스트리듐 디피실리의 서로 다른 임상 분리주의 독성/활성을 상당히 중화시키는 것으로 나타났다. 본 발명에 따르면, 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주의 독소 A와 독소 B를 중화시키는 항체가, 제한 없이 예를 들면, 항-독소 A 단일 클론 항체의 경우 7.7×10^{-12} M 내지 4.8×10^{-8} M 범위의 EC_{50} 값으로, 그리고 항-독소 B 단일 클론 항체의 경우 1.1×10^{-11} M 내지 6.5×10^{-10} M 범위의 EC_{50} 값으로 확인되는 항체가 제공된다. 또한, 본 발명의 단일 클론 항체는 클로스트리듐 디피실리 감염 및 이와 관련된 질병을 위한 치료로서 병원 및 비 병원에서 유래된 분리주를 포함하는 클로스트리듐 디피실리의 맹독성 균주를 중화시키는 용도에 제공된다.

[0085] 다른 실시형태에서, 그리고 비 제한적인 예에 의해, 본 발명의 단일 클론 항체는 이용된 생체 외 세포를 기초로 하는 분석법에 따라 독소 A를 중화시키기 위해 93pM 내지 30nM 범위의 EC_{50} 중화가 또는 46pM의 EC_{50} 과 독소 B를 중화시키기 위해 4pM 내지 9.5pM 범위의 EC_{50} 중화가 또는 5pM의 EC_{50} 을 나타낸다. 본원에서 실시예 3에 기술한 바와 같이, $8 \mu\text{g/mL}$ 의 독소 A를 이용한, CHO-K1 세포를 포함하는 분석에서, 본 발명의 항-독소 A 단일 클론 항체는 93pM의 EC_{50} 값을 나타냈다. 8pg/mL 의 독소 B를 이용한, CHO-K1 세포를 포함하는 분석에서, 본 발명의 항-독소 B 단일 클론 항체는 9.2pM의 EC_{50} 값을 나타냈다. 240ng/mL 의 독소 A를 이용한, T-84 세포를 포함하는 분석에서, 본 발명의 항-독소 A 단일 클론 항체는 146pM 및 175pM의 EC_{50} 값을 나타냈다. Caco-2 세포를 기초로 한 분석에서, 본 발명의 항-독소 A 단일 클론 항체는 196pM과 485pM의 EC_{50} 수준에서 독소 A의 독성을 중화시켰다. 8

$\mu\text{g/mL}$ 의 독소 A를 이용한, 적혈구 응집반응 분석에서, 본 발명의 항-독소 A 단일 클론 항체는 적혈구 응집반응을 방지하는 데 1.8nM과 30nM의 EC_{50} 중화가를 나타냈다.

[0086] 본 발명의 상기 항체는 상술한 속성들 가운데 어느 하나, 상술한 속성들의 조합, 또는 상술한 속성들 전부를 나타낼 수 있다.

[0087] 본원에서 실시예에 기술한 바와 같이, 본 발명의 단일 클론 항체는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사에 대한 최적의 가용 전임상 모델에서 생체 내 및 생체 외 모두에서 우수한 독소 중화 효능을 보여준다. 또한, 본 발명의 단일 클론 항체는 여러 가지 BI/NAP1/027 균주에서 유래하는 독소를 유례없이 광범위하고 강력하게 중화시킨다. 나아가, 이러한 단일 클론 항체는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사의 매우 엄격한 햄스터 모델에서 완벽하고 지속 가능하게 사망으로부터 보호하였다. 이러한 결과들은 본 발명의 단일 클론 항체가 결장이 치유될 수 있게 하고, 정상적인 장 미생물이 회복 가능하며, 클로스트리듐 디피실리 관련 설사 질병 및/또는 클로스트리듐 디피실리 감염이 해소될 수 있는 방식으로 클로스트리듐 디피실리 독소의 발병 효과를 효율적으로 그리고 효과적으로 차단하는 능력을 뒷받침한다.

[0088] 일 실시형태에서, 독소 A에 대한 항체는 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 클로스트리듐 디피실리 독소 A에 대한 특이적 결합을 경쟁적으로 저해하거나 이러한 특이적 결합에 대해 교차 경쟁하는 항체를 포함한다. 바람직한 독소 B에 대한 항체는 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 클로스트리듐 디피실리 독소 B에 대한 특이적 결합을 경쟁적으로 저해하거나 이러한 특이적 결합에 대해 교차 경쟁하는 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 클로스트리듐 디피실리 독소 A에 대한 특이적 결합을 경쟁적으로 저해하거나 이러한 특이적 결합에 대해 교차 경쟁하고, 이러한 특이적 결합에 대해 교차 경쟁하는 항체를 포함한다. 또한, 모든 실시형태는 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, PTA-9888 또는 PTA-9693로 기탁된 상술한 항체의 인간화된 형태를 포함한다.

[0089] 결합의 경쟁적 저해 또는 교차 경쟁을 측정하기 위해 당해 분야의 당업자에게 알려진 여러 가지 분석법이 이용될 수 있다. 예를 들어, 항체가 다른 항체의 독소 A 및/또는 독소 B와의 결합을 경쟁적으로 저해하는지를 확인하기 위해 교차 경쟁 분석법이 이용될 수 있다. 이러한 방법은 유동 세포분석법 또는 고체상 결합 분석법을 이용하는 세포를 기초로 한 방법일 수 있다. 항체가 고체상 또는 용액 상에서 독소 A 및/또는 독소 B와의 결합에 대해 교차 경쟁하는 능력을 평가하는 다른 분석법들도 이용될 수 있다. 본 발명이 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 예로는 상기 특이적인 결합을 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%까지 경쟁적으로 저해하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 들 수 있다. 저해 정도는 여러 가지 몰 비율 또는 질량 비율에서 평가할 수 있다. 예를 들어, 경쟁적 결합 실험은 2차 항체에 대해 2배, 3배, 4배, 5배, 7배, 10배 또는 그 이상의 몰 비율의 1차 항체로 할 수 있다.

[0090] 본 발명이 포함하는 기타 항체는 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 결합으로 정의되는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 본 발명이 포함하는 또 다른 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 결합으로 정의되는 클로스트리듐 디피실리의 독소 B 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 본 발명이 포함하는 또 다른 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-9692, PTA-9694, 또는 PTA-9888로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 결합으로 정의되는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 상의 에피토프에 특이적으로 결합하고, ATCC 수탁번호 PTA-9693 또는 PTA-9692로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 분리된 단일 클론 항체의 결합으로 정의되는 클로스트리듐 디피실리의 독소 B 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다.

[0091] 에피토프를 확인하기 위해, 당해 분야에 알려진 표준 에피토프 지도작성법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 후보 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 같은 에피토프에 결합하는지를 확인하기 위해, 항체에 결합하는 상기 독소(바람직하게는 합성 펩티드)의 단편(펩티드)을 사용할 수 있다. 선형 에피토프를 위해서는, 일정한 길이(예를 들어, 8개 이상의 아미노산)의 중첩 펩티드를 합성시킨다. 상기 펩티드는 바람직하게는 1개의 아미노산으로 오프셋(offset)시켜 상기 독소 염기서열의 모든 8개 아미노산 단편을 포함하는 일련의 펩티드가 제조될 수 있도록 한다. 더 큰 오프셋, 예를 들어 2 내지 3개의 아미노산을 이용하여 더 적은 수의 펩티드를 제조할 수 있다. 또한, 길이가 더 긴 펩티드(예를 들어, 9량체, 10량체 또는 11량체)가 합성될 수 있다. 펩티드와 항체의 결합은

표면 플라즈몬 공명(예를 들어, 비아코어)과 ELISA 분석법을 포함한 표준 방법론을 이용하여 확인할 수 있다. 본원에 제공한 상기 항체가 일부 실시형태에서 결합할 수 있는 입체구조적 에피토프 시험을 위해서는 더 큰 펩티드 단편을 사용할 수 있다. 입체구조적 에피토프 규명을 위해 질량분석을 이용하는 다른 방법들이 기술된 바 있고, 이러한 방법들을 사용할 수 있다(예를 들어, Baerga-Ortiz et al., *Protein Science* 11:1300-1308, 2002 와 이에 인용된 참고문헌 참조). 에피토프 결정을 위한 또 다른 방법은 *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., eds., John Wiley & Sons의 6.8단원("Phage Display Selection and Analysis of B-cell Epitopes")과 9.8단원("Identification of Antigenic Determinants Using Synthetic Peptide Combinatorial Libraries")과 같은 표준 실험실 참고서에 제공되어 있다. 알려진 에피토프에 하나 이상의 점 돌연변이 또는 결실을 도입한 다음, 하나 이상의 항체와의 결합을 시험하여 어떤 돌연변이가 항체의 결합을 감소시키는지 밝혀냄으로써 에피토프를 확인할 수 있다.

[0092] 본 발명이 제공하는 항체 또는 항원 결합 단편은 서브나노몰(sub-nanomolar) 단위의 친화도로 독소 A 및/또는 독소 B에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 약 1×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 또는 약 1×10^{-11} M 이하의 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 특정 실시형태에서, 결합 친화도는 약 5×10^{-10} M 미만이다.

[0093] 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 표면 플라즈몬 공명으로 측정된 바와 같이, 독소 A 또는 독소 B에 대한 정반응 속도상수(on rate constant, K_{on})가 적어도 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 또는 적어도 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 일 수 있다. 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 표면 플라즈몬 공명으로 측정된 바와 같이, 독소 A 또는 독소 B에 대한 역반응 속도상수(off rate constant, K_{off})는 최대 10^{-3} s^{-1} , 최대 10^{-4} s^{-1} , 최대 10^{-5} s^{-1} , 또는 최대 10^{-6} s^{-1} 일 수 있다. 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 독소 A 또는 독소 B에 대한 해리상수(K_D)가 최대한 10^{-7} M, 최대한 10^{-8} M, 최대한 10^{-9} M, 최대한 10^{-10} M, 최대한 10^{-11} M, 최대한 10^{-12} M, 또는 최대한 10^{-13} M일 수 있다.

[0094] 본원에 사용한 "항체" 또는 "면역 글로불린"이라는 용어는 이항화 결합으로 상호 연결된 적어도 두 개의 중쇄(H) 폴리펩티드와 두 개의 경쇄(L) 폴리펩티드를 포함하는 당단백질을 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변영역(본원에서 HCVR 또는 V_H 로 약칭함)과 중쇄 불변영역(C_H)으로 이루어진다. 중쇄 불변영역은 세 영역 CH1, CH2 및 CH3로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변영역(본원에서 LCVR 또는 V_L 로 약칭함)과 경쇄 불변영역(C_L)으로 이루어진다. 경쇄 불변영역은 하나의 영역 C_L 로 이루어진다. V_H 와 V_L 영역은 프레임워크 영역(FR)이라는 더 보존된 영역이 섞여 있는 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 극가변(hypervariability) 영역으로 더 세분할 수 있다. 각각의 V_H 와 V_L 은 세 개의 CDR과 네 개의 FR로 이루어지며, 아미노 말단에서 카르복시 말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된다. 동시에, 중쇄 폴리펩티드와 경쇄 폴리펩티드의 가변영역은 항원과 상호작용/결합하는 결합 영역을 함유하거나 형성한다. 상기 항체의 불변영역은 면역 글로불린이 면역 체계의 다양한 세포(예를 들어, 효과기 세포)와 고전 보체계의 제1성분(C1q)을 포함한 숙주의 조직 또는 인자에 결합하는 것을 매개할 수 있다.

[0095] 또한, 본 발명은 본원에 더 기술한 바와 같이, 단쇄 항체, 재조합으로 생산된 항체, 이중특이적, 이종특이적, 또는 다량체 항체, 디아바디(diabody) 등과 같은 다른 항체 유형을 더 제공한다.

[0096] 항체의 "항원 결합 단편"이라는 용어는 본원에 사용한 항체에서 항원(예를 들어, 독소 A, 독소 B, 독소 A와 독소 B 등) 또는 항원의 에피토프 영역에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 하나 이상의 부분을 나타낸다. 전장(full length) 항체의 단편이 항체의 항원 결합 기능을 달성할 수 있음이 밝혀진 바 있다. 일 실시형태에서, 상기 단일 클론 항체 단편은 상응하는 온전한 단일 클론 항체와 비슷한 방식으로 작용한다. 일 실시형태에서, 상기 단일 클론 항체 단편은 상응하는 온전한 단일 클론 항체와 교차 반응한다. 일 실시형태에서, 상기 단일 클론 항체 단편은 상응하는 온전한 단일 클론 항체와 상호 교환적으로 이용할 수 있다. 항체의 "항원 결합 단편"이라는 용어 내에 포함된 결합 단편의 예로 (i) V_L , V_H , C_L , 및 C_H1 영역으로 이루어지는 1가 단편인 Fab 단편, (ii) 경첩 영역에서 이항화 다리로 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편, (iii) V_H 와 CH1 영역으로 이루어지는 Fd 단편, (iv) 항체 한 팔의 V_L 과 V_H 영역으로 이루어지는 Fv 단편, (v) V_H 영역으로 이루어지는 dAb 단편(Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546) 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함

한다. 나아가, Fv 단편의 두 영역 V_L 과 V_H 가 별개의 유전자에 의해 코딩되어 있지만, 두 영역은 재조합 방법으로 V_L 과 V_H 영역이 짝을 지어 1가 분자를 형성하는 하나의 단백질 사슬(단일 사슬 Fv(scFv)로 알려짐; 예를 들어, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 참조)로 만들어질 수 있도록 하는 합성 링커에 의해 연결할 수 있다. 이러한 단쇄 항체도 항체의 "항원 결합 단편"라는 용어 내에 포함되도록 의도하였다. 이러한 항체 단편은 당해 분야의 당업자에 알려진 기타 기법뿐만 아니라, 본원에 참조로서 포함된 J. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp 98-118 (N.Y. Academic Press 1983)에 기술한 바와 같은 단백질 분해 단편화 과정과 같은 종래의 과정들을 이용하여 얻어진다. 상기 단편의 활성 또는 유용성은 온전한 항체와 마찬가지로 방식으로 확인한다.

[0097] 일 실시형태에서, 본 발명의 단일 클론 항체의 Fab 단편은 본원에서 실시예 10에 기술한 바와 같이 생성한 후, 세포를 기초로 한 분석에서 그의 중화 활성을 시험하였다. 따라서, 본 발명의 단일 클론 항체의 Fab 단편과 같은 항체 단편도 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B에 결합시켜 중화시키는 데 이용할 수 있다.

[0098] 본원에 사용한 "분리된 항체"는 서로 다른 항원 특이성을 나타내는 다른 항체가 대체로 없는 항체를 나타내고자 의도한 것이다(예를 들어, 독소 A에 특이적으로 결합하는 분리된 항체에는 독소 A 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 대체로 없다). 그러나 독소 A 또는 독소 B의 에피토프, 이소형 단백질 또는 이형에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 예를 들어, 다른 클로스트리듐 디피실리 균주에서 유래한 다른 관련된 항원에 대해 교차 반응성을 나타낸다. 게다가, 독소 A의 에피토프, 이소형 단백질 또는 이형에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 독소 B와도 특이적으로 결합할 수 있고, 독소 B의 에피토프, 이소형 단백질 또는 이형에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 독소 A와도 특이적으로 결합할 수 있다. 그러나 일부 실시형태에서, 독소 A의 에피토프, 이소형 단백질 또는 이형에 특이적으로 결합하는 상기 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 또한 독소 B와 특이적으로 결합하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 독소 B의 에피토프, 이소형 단백질 또는 이형에 특이적으로 결합하는 상기 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 또한 독소 A와 특이적으로 결합하지 않는다. 나아가, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 대체로 없을 수 있다. 서로 다른 항원 특이성을 나타내는 다른 항체, 또는 다른 물질 및/또는 화학물질 및/또는 단백질이 대체로 없는 항체는 분리 및/또는 정제된 항체일 수 있다. 항체는 당해 분야의 당업자가 일반적으로 수행하는 방법, 예를 들어 친화 크로마토그래피, 단백질 A 크로마토그래피 등으로 정제할 수 있다. 본원에 사용한 "특이적 결합"은 항체가 소정의 또는 관련이 있는 항원에 결합하는 것을 나타낸다. 일반적으로, 상기 항체는 상기 소정의 항원 또는 밀접하게 관련 있는 항원 이외의 비 특이적인 항원(예를 들어, BSA, 카제인)에의 결합에 대한 친화도보다 적어도 두 배 더 큰 친화도로 결합한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 목표 항원, 예를 들어, 독소 A 및/또는 독소 B의 선형 에피토프에 결합할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 목표 항원, 예를 들어, 독소 A 및/또는 독소 B의 입체 구조적 에피토프에 결합할 수 있다.

[0099] 본 발명의 상기 분리된 항체는 중쇄류 또는 이소 타입 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE 및 그의 아형, 예를 들어, IgG2a, IgG2b, 그리고 경쇄 이소 타입 카파와 람다, 및 그의 아형과 같은 다양한 항체(면역 글로불린)의 중쇄 및 경쇄 이소 타입을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 분리된 항체는 IgG2a 또는 IgG1 카파 이소 타입이다. 본원에 사용한 "이소 타입"은 중쇄와 경쇄의 불변영역 유전자에 의해 코딩되는 항체류(예를 들어, IgM 또는 IgG1 또는 $\lambda 1$)를 나타낸다. 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 전장일 수 있거나, 상기 항체의 불변 및/또는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, 또는 IgE 가변 영역과 같이 항원 결합 단편만을 포함할 수 있거나, Fab 단편, F(ab')₂ 단편 및 Fv 단편으로 이루어질 수 있다.

[0100] 본 발명의 상기 항체는 다중 클론 항체, 단일 클론 항체, 또는 다중 클론 항체와 단일 클론 항체의 혼합물일 수 있다. 상기 항체는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 기법에 의해 생산할 수 있다. 다중 클론 항체를 형성하는 과정은 잘 알려져 있다. 비 제한적인 예로, 다중 클론 항체는 먼저 면역전 혈청을 얻기 위해 혈액을 채취한 뉴질랜드 흰 토끼에 독소 A 및/또는 독소 B 단백질을 피하로 투여하여 형성시킨다. 독소 A 및/또는 독소 B는 여섯 개 위치에 위치마다 총 100 μ l 부피로, 일반적으로 하나 이상의 보조제와 함께 주사할 수 있다. 그런 다음, 최초 주사 2주 후에 토끼에서 채혈하고, 매 6주마다 3회씩 같은 항원으로 주기적으로 추가 면역을 해주었다. 각 면역으로부터 10일 후에 혈청 시료를 수집하였다. 상기 혈청으로부터 상기 항체를 포획하기 위해 바람직하게는 독소 A 및/또는 독소 B를 이용하는 친화 크로마토그래피로 다중 클론 항체를 회수한다. 다중 클론 항체를 형성하는 이 방법 및 다른 방법이 "Harlow, E. and Lane, D., Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY"에 기술되어 있으며, 기술된 내용은 본원에 참조로서 포함된다.

- [0101] 단일 클론 항체 생산은 당해 분야에서 또한 잘 알려진 기법에 의해 달성할 수 있다. 본원에 사용한 용어 "단일 클론 항체"는 단일 분자 조성물의 항체 분자 제제를 의미한다. 단일 클론 항체는 주어진 항원 또는 면역원의 특정 에피토프에 대해 단일의 결합 특이성과 친화성을 나타낸다. 단일 클론 항체 생산 공정은 항체 생산 잠재력이 있는 면역 체세포, 특히 원하는 항원으로 이전에 생체 내 또는 생체 외 또는 모두에서 면역화시켜 B세포 골수종 세포주와 융합하기에 적합한 B 림프구를 얻는 단계를 수반한다. 단일 클론 항체는 아래에서 더 서술한 바와 같이, 마우스와 인간 세포 및 세포주, 또는 예를 들어, 인간의 면역체계를 포함하도록 유전자 조작한 마우스 균주에서와 같이, 서로 다른 종에서 유래한 면역 세포와 골수 세포를 이용하여 생산할 수 있다.
- [0102] 일반적으로 변성독소(독소 A와 독소 B의 비활성형)로 및/또는 이들 독소의 비활성형 단편으로 동물에 면역력을 갖게 함으로써 독소 A 및 독소 B를 겨냥한 단일 클론 항체를 생산하였지만, 본 발명의 단일 클론 항체는 새로운 면역 전략을 고안하고 활용하여 생성하였다. 본 발명에 따르면, 본원에 기술하고 기탁한 상기 단일 클론 항체는 변성독소로 동물에 면역력을 갖게 한 다음, 독소 A 및/또는 독소 B의 활성형(비 변성독소)으로 상기 동물을 추가 면역시켜서 생산하였다(실시예 1 참조). 독소 A 또는 독소 B의 활성형으로 한 추가 면역은 신규 면역 계획 덕분에 독특하게 보호하는 항체를 발달시킨 면역화된 동물을 식별하는 역할을 했다. 이론에 얽매이지 않은 상태에서, 활성형 독소 A 및/또는 독소 B 추가 면역 요법은 수여 동물에 훨씬 더 높은 면역원성을 나타냈다. 면역시키지 않은 동물에는 일반적으로 치명적인 점점 더 많은 추가 면역량의 활성형 독소 A 또는 독소 B를 용인한 동물들은 활성형 독소를 받았음에도 이들 동물을 보호하고 생존에 이바지하는 매우 효과적인 중화 항체를 생산했다. 독소 A 또는 독소 B에 대하여 효과적인 면역 반응을 시작한 동물로부터 하이브리도마의 생산은 매우 강력한 항-독소 A와 항-독소 B 단일 클론 항체를 가져왔으며, 이는 생체 외 및 생체 내에서 높은 수준의 보호를 제공한다. 다중 클론 항체와 단일 클론 항체를 포함한 항체의 생산에서, 보조제를 사용할 수 있다. 사용하기에 적합한 보조제의 비 제한적인 예로는 불완전 프로인트 보조제(incomplete Freund's adjuvant), 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드, Ribi(즉, 모노포스포릴 리피드 A, 트레할로스 디미콜레이트, 마이코박테리움 세포벽 골격 및 트윈®80, 2% 스쿠알렌 포함), 사포닌, 퀵 A 또는 알룸을 포함한다. 세포독성 T 림프구(CTL) 반응은 예를 들어, 트리팔미토일-S-글리세릴시스테이닐-세틸-세린과 같은 지질에 독소(또는 그의 단편, 비 활성 유도제 또는 유사체)를 콘주게이트하여 미리 준비할 수 있다.
- [0103] 다른 실시형태에서, 독소 A 및/또는 독소 B를 겨냥한 단일 클론 항체를 생성하기 위해 추가적인 면역화 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 동물(예를 들어, 마우스)의 생체 내 면역화는 바람직한 유형과 양의 단백질 또는 폴리펩티드, 예를 들어, 변성독소 또는 독소로 할 수 있다. 그러한 면역화는 충분한 항체 역가를 얻기 위해 몇 주에 이르기까지 간격을 두고 필요에 따라 반복한다. 일단 면역화되면, 동물은 항체 생산 림프구의 공급원으로 이용할 수 있다. 마지막 항원 추가 면역 후, 동물을 희생시켜 비장 세포를 적출한다. 마우스 림프구는 본원에 기술한 마우스 골수종 세포주와 더욱 높은 백분율로 안정적인 융합을 이룬다. 이들 가운데, BALB/c 마우스 계통이 적합하다. 그러나 다른 마우스 계통, 토끼, 햄스터, 양, 염소와 개구리도 항체 생산 세포를 위한 숙주로 이용할 수 있다. Goding (in *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., pp. 60-61, Orlando, Fla., Academic Press, 1986) 참조. 특히, 계놈에 인간 면역 글로불린 유전자를 삽입하여 마우스의 면역 글로블린을 생산할 수 없는 마우스 계통을 이용할 수 있다. 예로서 메다렉스(Medarex, 현 브리스톨 마이어스 스쿼브)/젠팜 인터네셔널이 생산하는 HumAb 마우스 계통과 아브게닉스가 생산하는 XenoMouse 계통을 포함한다. 이러한 마우스는 면역화에 대해 전적으로 인간 면역 글로불린 분자를 생산한다.
- [0104] 분열하는 형질모세포 단계에 있는 이러한 항체 생산 세포는 우선적으로 융합한다. 체세포는 예를 들어, 항원 자극을 받은 동물의 림프절, 비장 및 말초 혈액으로부터 얻을 수 있으며, 선택하는 림프세포는 특정 융합 시스템에서 경험적 유용성에 주로 의존한다. 그런 다음, 상기 항체 분비 림프구는 세포 배양액에서 무한정으로 복제할 수 있는 (마우스) B 세포 골수종 세포 또는 변형 세포와 융합시켜, 불멸의 면역 글로불린 분비 세포주를 생산한다. 그 결과 얻어지는 융합 세포 또는 하이브리도마를 배양하고, 그 결과로 얻어지는 콜로니를 원하는 단일 클론 항체 생산을 위해 스크리닝한다. 항체 대량 생산을 위해 그러한 항체를 생산하는 콜로니를 클로닝하고 서브클로닝하여 생체 내(복수) 또는 생체 외에서 배양한다. 하이브리도마 방법론과 기술에 관한 서술은 본원에 참조로 포함시킨 "Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975) 또는 Harlow, E. and Lane, D., Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY"에서 볼 수 있다.
- [0105] 대안적으로, 항체를 생산할 수 있는 인간 체세포, 특히 B 림프구가 골수종 세포주와의 융합에 적합하다. 개체에서 조직 검사한 비장, 편도선 또는 림프절에서 얻은 B 림프구를 이용할 수 있으나, 더욱 쉽게 접근할 수 있는 말초 혈액 B 림프구(PBL)이 바람직하다. 또한, 인간 B 세포는 엡스타인-바 바이러스에 의해 직접 불멸화할 수

있다(Cole et al., 1995, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). 원칙적으로 체세포 하이브리드화 과정이 바람직하지만, B 림프구의 바이러스 또는 종양성 전환과 같은 단일 클론 항체 생산을 위한 다른 기술을 이용할 수 있다.

[0106] 바람직하게 하이브리도마를 생산하는 융합 과정에 이용하기에 적합한 골수종 세포주는 항체를 생산하지 않고, 높은 융합 효율을 나타내며, 원하는 하이브리도마 생장을 지지하는 특정 선택 배지에서 세포들이 자랄 수 없게 하는 효소가 결여되어 있다. 융합 세포주 생산에 이용할 수 있는 이러한 골수종 세포주의 예로는 마우스에서 유래한 P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4.1, Sp2/0-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bul; 쥐에서 유래한 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210; 및 인간에서 유래한 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6를 포함한다(Goding, in Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp. 65-66, Orlando, Fla., Academic Press, 1986; Campbell, in Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984).

[0107] 포유류의 골수종 세포 또는 세포 배양액에서 무한정 복제할 수 있는 기타 융합 파트너와의 융합은 표준 및 잘 알려진 기술, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜("PEG") 또는 기타 융합제를 이용하여 달성한다(본원에 참고문헌으로 포함시킨 Milstein and Kohler, *Eur. J. Immunol.* 6:511 (1976) 참조).

[0108] 다른 실시형태에서, 상기 항체는 재조합 항체일 수 있다. 본원에 사용한 바와 같은 "재조합 항체"라는 용어는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생산 또는 분리한 항체, 예를 들어 다른 종의 면역 글로불린 유전자를 위해 유전자 변형한 동물(예를 들어, 마우스)로부터 분리한 항체, 숙주 세포에 형질전환시킨 재조합 발현벡터를 이용하여 발현시킨 항체, 또는 다른 DNA 염기서열에 면역 글로불린 유전자 염기서열을 접합시키는 단계를 수반하는 다른 기타 수단에 의해 제조, 발현, 생산 또는 분리한 항체를 포함하고자 의도한 것이다.

[0109] 다른 실시형태에서, 상기 항체는 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다. 본원에 사용한 용어 "키메라 항체"는 쥐 과 동물 면역 글로불린(Ig) 가변영역 또는 극가변영역을 인간 Ig 불변영역 또는 불변 및 가변 프레임워크 영역과 결합시킨 항체를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 상기 키메라 항체는 본원에 제공한 상기 기탁된 항체 가운데 어느 항체의 가변 영역과 인간 불변영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 인간 불변영역은 인간 IgG1 불변영역과 같은 인간 IgG 불변영역이다. 상기 키메라 항체는 아래 실시예에서 제공한 방법 또는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 생산할 수 있다. 본원에 사용한 용어 "인간화 항체"는 인간 프레임워크 영역과 관련하여, 실질적으로 모항체, 예를 들어, 쥐 과 동물 단일 클론 항체에서 유래한 항원 결합 CDR만을 대체로 보유하는 항체를 나타낸다(예를 들어, Waldmann, 1991, *Science* 252:1657 참조). 상기 쥐 과 동물 항체의 결합 특성을 유지하지만 인간 Ig 불변/프레임워크 영역을 가지고 있는 이러한 키메라 또는 인간화 항체는 생체 내 투여 시 감소된 면역원성을 나타낼 것으로 기대된다. 따라서, 상기 키메라 및 인간화 항체는 바람직하게는 제공된 상기 단일 클론 항체의 독소 중화 활성을 유지하며, 반복 투여(예를 들어, 인간에)하기에 적합하다. 당업자는 상기 인간화 항체의 활성과 본원에 제공한 기탁된 단일 클론 항체의 활성을 비교하기 위해 그리고 상기 인간화 항체가 인정된 클로스트리듐 디피실리 감염의 재발을 치료 및/또는 예방하는지 여부를 확인하기 위해 알려진 방법(예를 들어, 생체 외 세포를 기초로 하는 분석법)을 이용할 수 있다. 당업자는 또한 아래 기술한 클로스트리듐 디피실리 감염에 대한 햄스터 모델을 포함한 본원에 기술한 방법을 이용할 수 있다.

[0110] 상기 인간화 단일 클론 항체의 염기서열은 다음과 같은 설명적인, 비 제한적인 방법으로 설계할 수 있다. 먼저, CDR 구조에 중요한 프레임워크 아미노산 잔기를 식별한다. 이와 함께, 알려진 인간 면역 글로불린(생식세포 계열) 염기서열 중에서 쥐 과 동물 V_H 와 V_L 에 각각 높은 상동성을 나타내는 인간 V_H 와 V_L 염기서열을 선택한다. 상기 쥐 과 동물 단일 클론 항체의 CDR 염기서열을 CDR 구조를 유지하는 데 중요한 프레임워크 아미노산 잔기와 함께, 선택한 상기 인간 프레임워크 염기서열에 융합시킨다. 또한, 그 결과 얻어지는 인간화 단일 클론 항체의 잠재적인 면역원성을 감소시키기 위해, 상응하는 V 영역 하위 집단에서 이례적으로 발견되는 인간 프레임워크 아미노산 잔기를 일반적인 잔기로 치환한다. 이러한 인간화 V_H 및 V_L 영역을 각각 발현벡터, 예를 들어, pCON 감마1과 pCON 카파(Lonza Biologics, Berkshire, UK)에 클로닝한다. 이들 벡터는 상기 인간 면역 글로불린의 중쇄 및 경쇄 유전자의 불변영역을 코딩한다. 293T 세포를 이펙틴 시스템(Efectene system, Qiagen, Valencia, CA)을 이용하여 이들 발현벡터로 일시적으로 형질감염시킬 수 있다. 형질감염 후, 예를 들어, 3일 후, 분비된 키메라 단일 클론 항체를 함유하는 세포 상청액을 수집하여 단백질을 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 상술한 항체를 재조합 방법으로 생산하기 위해 기타 발현벡터와 숙주세포를 이용할 수 있다.

- [0111] 항체 또는 항원 결합 단편을 인간화하는 기타 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제 5,585,089호, 제5,693,761호, 제5,693,762호, 및 제6,180,370호에 제공된 방법들을 포함한다. 이들 특허에 제공된 인간화 수행방법은 본원에 전체로서 참조로 포함된다. 이들 특허에 제공된 방법에 따른 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편 또한 본원에 제공된다.
- [0112] 일 실시형태에서, 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일 클론 항체(hmAb)는 (i) 각 중쇄(H)이 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역과 인간 CH 영역, 예를 들어, IgG1 C 영역을 함유하는, 두 개의 H 쇠 폴리펩티드와 (ii) 각 경쇄(L)이 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역과 인간 CL 영역, 예를 들어, 카파쇄 C 영역을 함유하는, 두 개의 L 쇠 폴리펩티드로 이루어진 면역 글로불린 단백질 또는 그의 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일 클론 항체는 (i) 각 중쇄(H)이 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역과 인간 CH 영역, 예를 들어, IgG1 C 영역을 함유하는, 두 개의 H 쇠 폴리펩티드와 (ii) 각 경쇄(L)이 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역과 인간 CL 영역, 예를 들어, 카파쇄 C 영역을 함유하는, 두 개의 L 쇠 폴리펩티드로 이루어진 면역 글로불린 단백질 또는 그의 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일 클론 항체는 (i) 각 중쇄(H)이 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역과 인간 CH 영역, 예를 들어, IgG1 C 영역을 함유하는, 두 개의 H 쇠 폴리펩티드와 (ii) 각 경쇄(L)이 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역과 인간 CL 영역, 예를 들어, 카파쇄 C 영역을 함유하는, 두 개의 L 쇠 폴리펩티드로 이루어진 면역 글로불린 단백질을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일 클론 항체는 (i) 각 중쇄(H)이 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역과 인간 CH 영역, 예를 들어, IgG1 C 영역을 함유하는, 두 개의 H 쇠 폴리펩티드와 (ii) 각 경쇄(L)이 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역과 인간 CL 영역, 예를 들어, 카파쇄 C 영역을 함유하는, 두 개의 L 쇠 폴리펩티드로 이루어진 면역 글로불린 단백질을 포함한다. 그러한 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일 클론 항체는 본 발명의 hPA-39 단일 클론 항체를 포괄한다.
- [0113] 일 실시형태에서, 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일 클론 항체는 (i) 각 중쇄(H)이 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역과 인간 CH 영역, 예를 들어, IgG1 C 영역을 함유하는, 두 개의 H 쇠 폴리펩티드와 (ii) 각 경쇄(L)이 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역과 인간 CL 영역, 예를 들어, 카파쇄 C 영역을 함유하는, 두 개의 L 쇠 폴리펩티드로 이루어진 면역 글로불린 단백질을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일 클론 항체는 (i) 각 중쇄(H)이 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역과 인간 CH 영역, 예를 들어, IgG1 C 영역을 함유하는, 두 개의 H 쇠 폴리펩티드와 (ii) 각 경쇄(L)이 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역과 인간 CL 영역, 예를 들어, 카파쇄 C 영역을 함유하는, 두 개의 L 쇠 폴리펩티드로 이루어진 면역 글로불린 단백질을 포함한다. 그러한 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 단일 클론 항체는 본 발명의 hPA-50 단일 클론 항체를 포괄한다.
- [0114] 일 실시형태에서, 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 단일 클론 항체는 (i) 각 중쇄(H)이 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역과 인간 CH 영역, 예를 들어, IgG1 C 영역을 함유하는, 두 개의 H 쇠 폴리펩티드와 (ii) 각 경쇄(L)이 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역과 인간 CL 영역, 예를 들어, 카파쇄 C 영역을 함유하는, 두 개의 L 쇠 폴리펩티드로 이루어진 면역 글로불린 단백질을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 단일 클론 항체는 (i) 각 중쇄(H)이 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역과 인간 CH 영역, 예를 들어, IgG1 C 영역을 함유하는, 두 개의 H 쇠 폴리펩티드와 (ii) 각 경쇄(L)이 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역과 인간 CL 영역, 예를 들어, 카파쇄 C 영역을 함유하는, 두 개의 L 쇠 폴리펩티드로 이루어진 면역 글로불린 단백질을 포함한다. 그러한 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 단일 클론 항체는 본 발명의 hPA-41 단일 클론 항체를 포괄한다.
- [0115] 상술한 본 발명의 인간화 항체의 L 쇠와 H 쇠 C 영역은 각각 Genbank 수탁번호 NW_001838785와 Genbank 수탁번호 MW_001838121에 함유된 염기서열을 가진 인간 카파 L 쇠 C 영역(C_L)과 인간 IgG1 H 쇠 C 영역(C_H)을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 인간화 항체는 IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4 이소 타입 중에서 선택되는 인간 H 쇠 C 영역을 포함한다.
- [0116] 설명을 위한 일 실시형태에서, 본 발명은 각각의 중쇄가 VH 영역과 인간 CH 영역을 함유하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드와 각각의 경쇄가 VL 영역과 인간 CL 영역을 함유하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 이루어진, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 대하여 생성된 단일 클론 항체 또는 그의 단편을 포괄한다. 서열번호 14의 중쇄 폴리펩티드의 연속 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 염기서열(또는 cDNA)은 서열번호 15에 기재하였고(도 38b), 서열번호

호 16의 경쇄 폴리펩티드의 연속 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 염기서열(또는 cDNA)은 서열번호 17에 기재하였다(도 38a).

[0117] 설명을 위한 일 실시형태에서, 본 발명은 각각의 중쇄가 VH 영역과 인간 CH 영역을 함유하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드와 각각의 경쇄가 VL 영역과 인간 CL 영역을 함유하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 이루어진, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 대하여 생성된 단일 클론 항체 또는 그의 단편을 포괄한다. 서열번호 18의 중쇄 폴리펩티드의 연속 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 염기서열(또는 cDNA)은 서열번호 19에 기재하였고(도 39b), 서열번호 20의 경쇄 폴리펩티드의 연속 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 염기서열(또는 cDNA)은 서열번호 21에 기재하였다(도 39a).

[0118] 설명을 위한 일 실시형태에서, 본 발명은 각각의 중쇄가 VH 영역과 인간 CH 영역을 함유하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드와 각각의 경쇄가 VL 영역과 인간 CL 영역을 함유하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 이루어진, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 대하여 생성된 단일 클론 항체 또는 그의 단편을 포괄한다. 서열번호 22의 중쇄 폴리펩티드의 연속 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 염기서열(또는 cDNA)은 서열번호 23에 기재하였고(도 40b), 서열번호 24의 경쇄 폴리펩티드의 연속 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 염기서열(또는 cDNA)은 서열번호 25에 기재하였다(도 40a).

[0119] 또한, 본 발명은 상술한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A와 항-독소 B 인간화 항체의 일부분 또는 단편을 포괄한다. 그러한 일부분 또는 단편은 당업자가 일반적으로 확인할 수 있는 바와 같이, H 쇠 폴리펩티드와 L 쇠 폴리펩티드의 V 영역의 상보성 결정 영역(CDR), 즉 F(ab) 단편, F(ab') 단편, F(ab')₂ 단편, Fc 단편, Fd 단편 등을 포함한다. 일 실시형태에서 V 영역을 함유하는 상기 인간화 항체의 일부분 또는 단편, 또는 그의 기능적인 일부분은 각각의 독소에 최적으로 결합하여 독소의 활성을 중화시킨다. 일 실시형태에서 상기 인간화 항체의 그러한 기능적인 일부분 또는 단편은 전체 인간화 항체보다 더 우수하지 않다면, 그와 비슷한 수준에서 독소 활성을 최적으로 중화시킨다.

[0120] 본 발명에 따르면, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 또는 독소 B를 겨냥하여 분자적으로 클로닝하여 인간화한 단일 클론 항체가 제공된다. 그러한 인간화 단일 클론 항체를 아래 실시예 9의 D절과 E절에 기술한 바와 같이 분리하여 특성을 밝혔다. 일 실시형태에서, 상기 인간화 항체 각각의 경쇄 불변영역(CL)은 카파(κ)류이다. 일 실시형태에서, 상기 인간화 항체 각각의 중쇄 불변영역(CH)은 IgG1 이소 타입이다. 다른 실시형태에서, 상기 인간화 항체의 CH 영역은 IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgA 또는 IgM 이소 타입이다. 독특한 가변(V) 영역을 함유하는 인간화 단일 클론 항체는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 또는 독소 B 중 어느 하나에 결합하여 그 활성을 중화시키는 것으로 밝혀졌다. 인간화 단일 클론 항체의 VL 및 VH 영역은 완전한 면역 글로불린(Ig) 또는 항체 분자의 일부분을 형성할 수 있거나, 상기 항체의 일부분 또는 단편, 특히, 결합 및/또는 중화 활성이 있는 일부분 또는 단편으로 이용될 수 있다. 항체 단편의 비 제한적인 예로는 Fab, F(ab)₂ 및 F(ab'), 또는 F(ab')₂ 단편을 포함한다. 본 발명의 실시형태는 L 쇠의 V 영역이 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 7의 어느 하나 이상으로부터 선택되는, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 대한 활성이 있는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 인간화 단일 클론 항체 또는 그의 단편을 다룬다. 일 실시형태에서, 본 발명은 상술한 항체의 VH 및 VL 영역의 상기 CDR, 즉, CDR1, CRD2 및/또는 CDR3를 다룬다. 본 발명의 실시형태는 L 쇠의 V 영역이 서열번호 10에 기재된, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 대한 활성이 있는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 인간화 단일 클론 항체 또는 그의 단편을 다룬다. 본 발명의 실시형태는 H 쇠의 V 영역이 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 5 및 서열번호 6의 어느 하나 이상으로부터 선택되는, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 대한 활성이 있는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 인간화 단일 클론 항체 또는 그의 단편을 다룬다. 본 발명의 실시형태는 H 쇠의 V 영역이 서열번호 8 또는 서열번호 9의 어느 하나 이상으로부터 선택되는, 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 대한 활성이 있는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 인간화 단일 클론 항체 또는 그의 단편을 다룬다. 일 실시형태에서, 본 발명은 상술한 항체의 VH 및 VL 영역의 상기 CDR, 즉, CDR1, CRD2 및/또는 CDR3를 다룬다.

[0121] 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및/또는 항-독소 B 항체의 항원 결합 부분, CDR, 또는 가변(V) 영역을 코딩하는 핵산을 포괄한다. 여러 가지 실시형태에서, 상기 일부분, CDR 또는 V 영역은 본원에 기술한 바와 같이 PA-38, PA-39, PA-41, 또는 PA-50, 또는 그의 인간화 버전으로부터 유래한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 각각의 핵산에 의해 코딩되는 항원 결합 부분, CDR, 또는 V 영역의 아미노산 서열을 포괄한다.

[0122] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 단일 클론 항체는 이중 특이적 항체, 이작용(bifunctional) 항체, 다중 특

이적 항체, 또는 이형 기능성(heterofunctional) 항체의 형태로 변형시킬 수 있다. 이중 특이적 및 이형 특이적 항체의 비 제한적인 예와 그러한 항체를 제조하는 과정은 여러 가지 설명을 위한 문헌, 예를 들어, UA20090060910, WO2009/058383, WO2009/030734, WO2007/093630, USP 6,071,517, WO2008/024188, UA20070071675, USP 7,442,778, USP 7,235,641, USP 5,932,448 및 USP 5,292,668에서 볼 수 있다. "이중 특이적 항체"라는 용어는 두 개의 서로 다른 결합 특이성이 있으며, (a) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 (b) 클로스트리듐 디피실리의 독소 B와 결합하거나 상호 작용하는 임의의 작용제, 예를 들어, 단백질, 펩티드, 또는 단백질 또는 펩티드 복합체를 포함하도록 의도한 것이다. 일 실시형태에서, 상기 이중 특이적 항체는 PA-39 또는 PA-50 또는 그의 항원 결합 단편과 PA-41 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 이중 특이적 항체는 PA-39 또는 PA-50 또는 그의 항원 결합 단편과 PA-41 또는 그의 항원 결합 단편의 키메라 또는 인간화 형태를 포함한다. 따라서, PA-39와 PA-41, 그의 키메라 또는 인간화 형태, 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 이중 특이적 항체는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 독소 B 모두와 결합할 것이다. 이와 비슷하게, PA-50과 PA-41, 그의 키메라 또는 인간화 형태, 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 이중 특이적 항체는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 독소 B 모두와 결합할 것이다. "다중 특이적 항체"라는 용어는 두 개를 초과하는 서로 다른 결합 특이성이 있으며, (a) 클로스트리듐 디피실리의 독소 A, (b) 클로스트리듐 디피실리의 독소 B, 및 (c) 적어도 하나의 다른 성분과 결합하거나 상호 작용하는 임의의 작용제, 예를 들어, 단백질, 펩티드, 또는 단백질 또는 펩티드 복합체를 포함하도록 의도한 것이다. 따라서, 본 발명은 이중 특이적, 삼중 특이적, 사중 특이적, 및 기타 다중 특이적 항체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일 실시형태에서, 상기 항체 또는 상기 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체의 항원 결합 단편은 인간화된다.

[0123] "이중 특이적 항체"라는 용어는 또한 디아바디(diabody)를 포함한다. 디아바디는 이중적인 특이성이 있고 단일 분자로 복수의 서로 다른 에피토프를 표적으로 삼을 수 있는 치료 효과가 있는 항체를 제공한다. 디아바디는 V_H 와 V_L 영역이 단일 폴리펩티드 사슬에 발현되나, 같은 사슬 상의 두 영역 사이에서 짝을 이루기에는 너무 짧은 링커를 이용하여 이들 영역이 다른 사슬의 상보적인 영역과 짝을 이루게 하여 두 개의 항원 결합 부위를 만드는 2개의 이중 특이적인 항체이다(예를 들어, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poijak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123 참조). 상기 이중 특이적 항체의 두 항원 결합 영역은 화학적으로 연결되어 있거나, 이중 특이적 항체 생산을 위해 유전자 조작된 세포에 의해 발현된다(일반적으로 Fanger *et al.*, 1995 *Drug News & Perspec.* 8(3):133-137 참조). 일 실시형태에서 효과적인 양의 이중 특이적 항체를 클로스트리듐 디피실리 감염 및/또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병이 있는 대상자에게 투여할 수 있으며, 상기 이중 특이적 항체는 대상자에서 독소 A와 독소 B의 독성을 중화한다.

[0124] 특정 실시형태에서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 본원에 사용한 용어 "인간 항체"는 인간 생식세포 계열의 면역 글로불린 염기서열로부터 유래된 가변 및 불변 Ig 영역이 있는 항체를 포함하고자 의도한 것이다. 상기 인간 항체는 인간 생식세포 계열의 면역 글로불린 염기서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 무작위 또는 생체 외 위치 특이성 돌연변이 유발 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나 본원에 사용한 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 다른 포유류 종의 생식세포 계열로부터 유래한 CDR 염기서열을 인간 프레임워크 염기서열로 이식시킨 항체(본원에서 "인간화 항체"라 함)를 포함하고자 의도하는 것은 아니다. 독소 A 및/또는 독소 B를 대상으로 하는 인간 항체는 유전자 변형한 형질전환 마우스를 이용하여 생성하여, 마우스 시스템보다는 인간 면역 체계의 성분들을 발현하도록 사육할 수 있다.

[0125] 또한, 인간 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 위치의 대부분에 대해 형질전환시킨 마우스를 면역시켜 온전한 인간 단일 클론 항체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 기재내용이 본원에 참조로서 포함된 미국 특허 제5,591,669호, 제5,598,369호, 제5,545,806호, 제5,545,807호, 제6,150,584호, 및 그에 인용된 참고문헌 참조. 이들 동물은 내인성(예를 들어, 쥐과 동물) 항체 생산에서 기능적인 결실이 있도록 유전자 조작된 것이다. 이들 동물은 인간 생식세포 계열의 면역 글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하도록 더 변형하여, 그 결과 이들 동물의 면역화는 원하는 항원에 대한 온전한 인간 항체를 생산한다. 이들 마우스(예를 들어, XenoMouse(아브게닉스), HumAb 마우스(메다렉스/젠팜))의 면역화 후, 표준 하이브리도마 기술에 따라 단일 클론 항체를 준비한다. 이러한 단일 클론 항체는 인간 면역 글로불린 아미노산 서열이 있으므로, 인간에 투여할 때, 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응을 유발하지 않을 것이다.

[0126] 당업자는 상술한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 및 폴리뉴클레오티드 또한 본원에 제공하였음을 인정할 것이다. 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 염기서열을 포함하는 핵산 및 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공되었음도 인정할 수 있다. 따라서, 항체를 코딩하는 핵산과 폴리뉴클레오티드를 함유 및/또는 발현하도록 유전자 조작한 벡터와 플라스미드가 본 발명에 의해 제공된다. 본원에 사용한 "암호 영역"은 폴

리펩티드 염기서열을 코딩하는 뉴클레오티드 염기서열의 영역을 의미한다. 그리고, 상기 암호영역은 신호 펩티드와 같이 나중에 절단되는 단백질의 일부분을 코딩하는 영역을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 뉴클레오티드와 아미노산 서열은 신호 펩티드를 코딩하거나 신호 펩티드인 염기서열을 포함할 수 있다. 본 발명은 신호 펩티드를 코딩하거나 신호 펩티드인 상기 염기서열의 일부분과 함께, 또는 그것이 없는 이들 염기서열 각각을 포함한다.

[0127] 본원에 제공한 상기 항체는 당업자에게 알려진 기타 방법뿐만 아니라 아래의 방법을 이용하여 클로닝할 수 있다. 비 제한적인 예로서, 전체 RNA를 하이브리도마 세포로부터 생성하며, 올리고-dT 프라이머를 이용하여 cDNA를 역전사시킨다. RNA 제거를 위해 RN아제 H를 이용하여 단일 가닥 cDNA를 제조할 수 있다. 유리 뉴클레오티드 제거를 위해 스핀 컬럼 정제법을 이용할 수 있다. 그 다음으로, 말단 전이효소로 3' 폴리-dG 꼬리를 붙일 수 있다. 상기 불변영역에 올리고-dC 프라이머와 디제너레이트 프라이머(degenerate primer)까지 이용하여 PCR 증폭을 행할 수 있다. 대략, 양호한 중쇄 증폭을 위해 40 사이클을 행할 수 있다. 그런 다음, PCR 산물의 직접적인 염기서열 결정을 할 수 있다.

[0128] 특정 실시형태에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 앞서 말한 핵산 분자와 상동성이 높은 핵산 단백질에 의해 코딩된다. 상동성 있는 핵산 분자는 본원에 제공한 상기 뉴클레오티드 염기서열과 적어도 약 90% 동일한 뉴클레오티드 염기서열을 포함할 수 있다. 상동성 있는 핵산 분자는 본원에 제공한 상기 뉴클레오티드 염기서열과 적어도 약 95% 동일한, 적어도 약 97% 동일한, 적어도 약 98% 동일한, 또는 적어도 약 99% 동일한 뉴클레오티드 염기서열을 포함할 수 있다. 상동성은 당업자에게 잘 알려진 다양한, 공개적으로 이용할 수 있는 소프트웨어 도구를 이용하여 계산할 수 있다. 예시적인 도구로 미국 국립보건원의 생물정보센터(NCBI)의 웹사이트에서 이용할 수 있는 BLAST 시스템을 포함한다.

[0129] 상동성이 높은 뉴클레오티드 염기서열을 식별하는 하나의 방법은 핵산 혼성화를 통한 방법이다. 또한, 본원에 기술한 독소 A 및/또는 독소 B 결합 속성과 기타 기능적 속성들이 있는 항체가 제공되며, 이때 이 항체는 높은 엄격성 조건 하에서 본 발명의 항체를 코딩하는 상기 핵산 분자로 혼성화하는 핵산 분자에 의해 코딩된다. 또한, 중합효소 연쇄반응(PCR)과 관련된 핵산 염기서열을 클로닝하기에 적합한 기타 증폭 기법을 이용하여 관련된 염기서열을 식별할 수 있다. 그러한 기법의 경우, CDR과 같은 원하는 핵산 염기서열의 일부분을 증폭시키기 위해 PCR 프라이머가 일반적으로 선택된다.

[0130] 본원에 사용한 바와 같은 "높은 엄격성 조건"이라는 용어는 당해 기술 분야에서 잘 알고 있는 매개변수를 나타낸다. 핵산 혼성화 매개변수는 그러한 방법들을 편집한 참고문헌, 예를 들어, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, 또는 *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York에서 볼 수 있다. 높은 엄격성 조건의 하나의 비 제한적인 예는 65°C에서의 혼성화 완충액(3.5X SSC, 0.02% 피콜, 0.02% 폴리비닐 피롤리돈, 0.02% 소 혈청 알부민, 2.5mM NaH₂PO₄(pH7), 0.5% SDS, 2mM EDTA)에서의 혼성화이다. SSC는 0.15M 소듐 클로라이드/0.015M 소듐 시트레이트, pH7이고, SDS는 소듐 도데실 설페이트이며, EDTA는 에틸렌디아민테트라아세트산이다. 혼성화한 후, 상기 핵산을 옮긴 막을 예를 들어, 실온에서 2X SSC에 세척한 다음, 68°C까지의 온도에서 0.1 내지 0.5X SSC/0.1X SDS에서 세척한다.

[0131] 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드 발현에 필요한 기타 핵산 염기서열, 예를 들어, ORI, 프로모터, 인핸서, 종결 염기서열 외에 상술한 핵산 분자를 포함하는 벡터(예를 들어, 발현벡터) 또는 플라스미드가 본원에 제공된다. 본원에 기술한 결합 특이성 및/또는 상기 항체 또는 항원 결합 단편의 특성이 있는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편 생산을 위한 숙주 세포를 형질전환하거나 형질감염시키기 위해 상기 벡터를 이용할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 벡터는 제공된 상기 항체 및 항원 결합 단편의 중쇄 또는 그의 일부분을 코딩하는 분리된 핵산 분자를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 벡터는 경쇄 또는 그의 일부분을 코딩하는 핵산 염기서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 상기 벡터는 중쇄 또는 그의 일부분의 염기서열과 경쇄 또는 그의 일부분의 염기서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본원에 기술한 상기 항체 또는 항원 결합 단편을 생산하는 플라스미드를 제공한다.

[0132] 또한, 본 발명 항체의 변형된 버전이 제공된다. 일반적으로 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산에 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 변형을 일으키며, 이러한 변형은 결실, 점 돌연변이, 절단, 아미노산 치환 및 아미노산 또는 비 아미노산 성분의 첨가를 포함할 수 있다. 대안적으로, 절단, 링커 분자의 첨가, 비오틴 같은 검출 가능한 부분의 첨가, 지방산의 첨가 등에 의해 폴리펩티드에 직접적으로 변형을 일으킬 수 있다. 변형은 또한 상기 항체 또는 항원 결합 단편 아미노산 서열의 전부 또는 일부분을 포함하는 융합 단백질을 포괄한

다. 변형은 나아가 상기 항체를 세포독성 작용제, 약물 또는 치료제와 같은 다른 작용제와 결합 또는 연결시키는 것을 포괄한다.

[0133] 변형된 폴리펩티드는 생리적 활성과 관련이 없는 속성을 바꾸기 위해 특이적으로 변형시킨 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들어, 원치 않는 이황화 결합을 방지하기 위해 시스테인 잔기를 치환 또는 제거할 수 있다. 이와 비슷하게, 폴리펩티드의 발현을 향상시키기 위해 발현 시스템의 프로테아제에 의한 단백질 분해를 제거함으로써 특정 아미노산을 바꿀 수 있다(예를 들어, KEX2 프로테아제 활성이 있는 효모 발현 시스템의 이염기성 아미노산 잔기). 추가적으로, 예를 들어, 2006년 7월 6일 공개된 WO2006/071877에 기술된 바와 같이, 특정 투여 경로, 예를 들어, 경구 투여에 따른 상기 항체의 효소에 의한 단백질 용해성 분해(proteolytic degradation)를 방지하기 위해 하나 이상의 아미노산을 특히 Ig 불변영역에서 바꿀 수 있다.

[0134] 편의상 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 변경시켜서 변형을 일으킨다. 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 돌연변이는 바람직하게는 코딩 염기서열의 아미노산 리딩프레임을 보존하며, 바람직하게는 핵산 내에 상기 변형된 폴리펩티드의 발현에 치명적일 수 있는, 헤어핀 또는 루프와 같은 2차 구조를 형성하기 위해 혼성화하기 쉬운 영역을 만들지 않는다.

[0135] 아미노산 치환을 선택하거나 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 내의 선택된 위치에 무작위로 돌연변이를 생성하여 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중 어느 것에 변형을 일으킬 수 있다. 그런 다음, 변형된 폴리펩티드를 발현시켜 어떤 돌연변이가 원하는 속성이 있는 변형된 폴리펩티드를 제공하는지를 확인하기 위해 하나 이상의 활성을 시험할 수 있다. 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대해 침묵하지만, 특정 숙주에서 번역을 위한 바람직한 코돈을 제공하는 변형된 폴리펩티드(또는 비 변형된 폴리펩티드)에 추가로 돌연변이를 일으킬 수 있다. 예를 들어 대장균에서, 핵산 번역을 위한 바람직한 코돈은 당업자에게 잘 알려져 있다. 상기 폴리펩티드의 발현을 향상시키기 위해 염기서열 또는 cDNA 클론의 비 코딩 염기서열에 또 다른 돌연변이를 일으킬 수 있다. 변형된 폴리펩티드의 활성은 본원에 개시한 바와 같이 변형된 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 발현벡터에 클로닝하고, 이 벡터를 적합한 숙주세포에 도입하여, 변형된 폴리펩티드를 발현시킨 다음, 폴리펩티드의 기능적인 능력을 시험하여 변형된 폴리펩티드의 활성을 시험할 수 있다. 앞서 말한 과정은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0136] 당업자는 또한 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 제공하기 위해 폴리펩티드에 보존적 아미노산 치환을 일으킬 수 있음을 인식할 것이다. 본원에 사용한 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산을 치환하는 단백질의 상대적인 전하량 또는 크기 특성을 바꾸지 않는 아미노산 치환을 의미한다. 폴리펩티드 염기서열을 바꾸는 방법들을 편집한 참고문헌, 예를 들어, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, 또는 *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York에서 볼 수 있는 방법과 같이 당업자에게 알려진 바와 같은 폴리펩티드 염기서열을 바꾸는 방법에 따라 변형된 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환은 다음의 예시 군 (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D 내의 아미노산에 일으킨 치환을 포함한다.

[0137] 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 변경함으로써 일반적으로 폴리펩티드의 보존적 아미노산 치환을 일으킨다. 당업자에게 알려진 여러 가지 방법을 통해 그러한 치환을 시킬 수 있다. 예를 들어, PCR 유도 돌연변이, 위치 지정 돌연변이 유도에 의해, 또는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 화학적 합성에 의해 아미노산 치환을 일으킬 수 있다. 아미노산 치환이 폴리펩티드의 작은 단편에 일어날 경우, 이 펩티드를 직접 합성함으로써 치환을 일으킬 수 있다. 본원에 개시한 바와 같이 변경된 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 박테리아 또는 포유류 발현벡터에 클로닝하고, 이 벡터를 적합한 숙주세포에 도입하여, 변경된 폴리펩티드를 발현시킨 다음, 폴리펩티드의 기능적인 능력을 시험하여 기능적으로 동등한 폴리펩티드 단편의 활성을 시험할 수 있다.

[0138] 본 발명의 항-독소 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 다른 기능성 분자, 예를 들어, 다른 펩티드 또는 단백질에 유도체화하거나 연결시킬 수 있다. 추가적으로, 예를 들어, 화학 커플링, 유전자 융합, 비공유 회합 등에 의해 다른 항체, 검출 가능한 작용제, 세포독성 작용제, 치료제, 제약 작용제 및/또는 다른 분자, 예를 들어, 스트렙트아비딘 핵 영역 또는 폴리히스티딘 태그와의 결합을 매개할 수 있는 단백질 또는 펩티드와 같은 하나 이상의 다른 분자물질(molecular entity)에 항체 또는 항체 부분을 기능적으로 연결시킬 수 있다.

[0139] 유도체 합성된 단백질 또는 항체는 같거나 다른 유형의 둘 이상의 단백질 또는 항체를 교차 결합시키거나 커플링시켜서 생산할 수 있다. 적합한 가교제 또는 커플링제는, 적당한 스페이서로 분리된 두 개의 별도의 반응성이 있는 이형 이중기능적(heterobifunctional)인 것(예를 들어, m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신아미드

에스테르) 또는 동형 이중기능적인 것(예를 들어, 디석신이미딜 수버레이트), 및 상업적으로 이용 가능한 것(Pierce Chemical Company, Rockford, IL)을 포함한다. 본 발명의 항-독소 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 표지와 같은 다른 분자물질에 콘주게이트될 수 있다. 단백질을 유도체 합성화 또는 표지화할 수 있는 검출 가능한 작용제 또는 표지는 형광 화합물, 효소, 보결분자단(예를 들어, 스트렙타아비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴), 화학 발광성 물질, 생물 발광성 물질, 화합물(chemical entity) 및 방사성 물질을 포함한다. 검출 가능한 형광 화합물의 예로 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민 및 피코에리스린을 포함한다. 또한, 알칼린 포스파타아제(AP), 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 베타-갈락토시다제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코스 옥시다제 등과 같은 검출 가능한 효소로 단백질을 유도체화할 수 있다. 이렇게 효소적으로 유도체화한 단백질 또는 항체는 검출할 수 있는 반응 생성물을 생산할 수 있도록 효소의 특이적인 기질을 첨가할 경우, 검출 가능하게 된다. 비오틴과 같은 보결분자단으로 유도체화한 단백질은 아비딘 또는 스트렙타아비딘 결합의 간접적인 측정에 의해 검출할 수 있다.

[0140] 표지화한 단백질 또는 항체는 알려진 또는 소정의 항원을 친화 크로마토그래피 또는 면역침강법과 같은 표준 기법에 의해 분리하기 위해, 또는 예를 들어, 주어진 치료 요법의 효능을 추적 감시하기 위한 임상 시험 과정의 일부분으로 조직 내 단백질 수준을 확인하고자 알려진 또는 소정의 항원을 검출하기 위해 진단 및/또는 실험 작용제 또는 시약으로서 이용할 수 있다. 일 실시형태에서, 검출될 항원은 세포 용해물 내 또는 환자 시료 내의 독소일 수 있다.

[0141] 특정 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들어, 둘 이상의 서로 다른 항체 또는 그의 항원 결합 단편(예를 들어, 독소 A를 겨냥하는 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 독소 B를 겨냥하는 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 독소 A를 겨냥하는 둘 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 독소 B를 겨냥하는 둘 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 등)를 포함하는 제약 조성물로서, 조합하여 이용된다. 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 조합은 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 단일 치료법에서 조합될 수 있다(즉, 동시에 투여될 수 있다). 대안적으로, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 개별적으로(즉, 다른 시간에). 투여할 수 있다따라서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 함께 또는 별도로 저장할 수 있게 된다. 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 수성 매체에 또는 동결 건조된 형태로 저장될 수 있으며, 이는 사용 전에 재구성될 수 있다.

[0142] 다른 실시형태에서, 하나 이상의 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물이 제공된다. 또한, 하나 이상의 상술한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 조합을 함유하는 조성물이 제공된다. 또한, 각각 하나 이상의 상술한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 함유하는 조성물로서, 조합하여 사용하고자 의도한 조성물도 제공된다. 그러한 조성물은 생리학적으로 또는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 운반제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 생리학적으로 또는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 운반제 또는 희석제는 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 혼합할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 조성물은 복수의(예를 들어, 둘 이상) 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 특이적으로 결합하여 독성 효과를 중화시키는 동안, 조성물의 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 특이적으로 결합하여 독성 효과를 중화시킨다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 디피실리의 독소 A에 특이적으로 결합하여 독성 효과를 중화시키는 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 클로스트리듐 디피실리의 독소 B에 특이적으로 결합하여 독성 효과를 중화시키는 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 모두 인간화된 것이다.

[0143] 특정 실시형태에서, 상기 조성물은 본원에 기술한 바와 같은 하나의 항-독소 A 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 본원에 기술한 바와 같은 하나의 항-독소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 조합을 포함한다. 그러한 조성물에서, 항-독소 A 항체와 항-독소 B 항체는 동일한 양 또는 비율, 즉 1:1로 존재할 수 있다. 대안적으로, 그러한 조성물에서, 항-독소 A 항체와 항-독소 B 항체는 1/2:1; 2:1; 3:1; 4:1 등과 같이 서로 다른 양 또는 비율로 존재할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 조성물의 항체는 인간화 항체이다. 일 실시형태에서, 상기 조성물은 단일 클론 항체 PTA-9888, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태와 단일 클론 항체 9693, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태의 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 조성물은 단일 클론 항체 PTA-9694, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태와 단일 클론 항체 9693, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태의 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 조성물은 다음 중 어느 하나의 조합을 포함한다: 단일 클론 항체 PTA-9692, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태와 단일 클론 항체 9693, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태; 또는 단일 클론 항체 PTA-9888, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태와 단일 클론 항체 9692, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태; 또는 단일 클론 항체 PTA-9694, 그의 항원 결합

단편, 또는 그의 인간화 형태와 단일 클론 항체 9692, 그의 항원 결합 단편, 또는 그의 인간화 형태.

[0144] 또한, 제약 조성물을 조합 치료법, 즉, 다른 치료제와 조합하여 투여할 수 있다. 예를 들어, 조합 치료법은 적어도 하나의 다른 종래 치료법과 함께 본원에 제공한 바와 같은 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 포함할 수 있다. 그러한 추가적인 치료제는 항생제 치료제와 비 항생제 치료제를 포함한다. 추가적인 치료제는 클로스트리듐 디피실리 변성독소 백신, 암피실린/아목시실린, 반코마이신, 메트로니다졸, 피다소마이신, 리네졸리드, 니타록사니드, 리팍시민, 라모플라닌, 디피마이신(PAR-101 또는 OPT-80으로도 불림), 클린다마이신, (2세대 및 3세대 세팔로스포린과 같은) 세팔로스포린, (가티플록사신 또는 목시플록사신과 같은) 플루오로퀴놀론, 매크로라이드(예를 들어, 에리스로마이신, 클라리스로마이신, 아지스로마이신), 페니실린, 아미노글리코사이드, 트리메토프림-설파메톡사졸, 클로르암페니콜, 테트라사이클린, 이미페넴 및 메로페넴을 포함한다. 또한 추가적인 치료제는 항생제, 항균제, 살균제 또는 정균제를 포함한다. 일 실시형태에서, 추가적인 치료제는 클로스트리듐 디피실리 및/또는 그 독소를 대상으로 하는 작은 분자 또는 저분자량의 화학적 화합물일 수 있다. 일 실시형태에서, 추가적인 치료제는 OPT-80이다. 비 항생제 치료제는 비 특이적인 전하 메커니즘을 통하여 독소 A와 독소 B에 결합하는 고분자량의 음이온성 고분자인 툴레바머를 포함한다.

[0145] 대안으로서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 다른 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여 이용할 수 있음이 예상된다. 다른 추가적인 치료제는 정상 수집 면역 글로불린, 정맥용 면역 글로불린, 또는 혈청 내 다중 클론성 항-독소 A 및 항-독소 B 면역 글로불린을 포함한다. 다른 항체는 공개된 문헌(예를 들어, WO/2006/121422; US2005/0287150)에 기술되고 보고된 바와 같은 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 또는 독소 B를 대상으로 한 인간 단일 클론 항체를 포함한다.

[0146] 또한, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 이용하는 단계를 수반하는 치료 또는 예방 방법, 즉, 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병, 병리 측면, 또는 그의 발달 또는 진행을 치료, 해소, 경감, 박멸, 예방 또는 지연시키는 방법이 본원에 포함된다. 클로스트리듐 디피실리 관련 설사는 일반적으로 클린다마이신, 세팔로스포린 및 플루오로퀴놀론과 같은 항생제 사용을 통해 결장의 미생물을 붕괴시켜 촉발된다. 결장의 미세 서식 환경의 이러한 작은 교란은 클로스트리듐 디피실리 포자에 노출과 함께 고통 받는 개체에 콜로니화를 이끈다. 콜로니화되는 전체 환자의 약 3분의 1은 심한 설사, 결장 천공, 결장 절제 및 사망을 초래할 수 있는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사를 발달시킨다. 따라서, 본 발명의 하나 이상의 항체, 또는 본원에 기술한 바와 같은 조성물을 대상자에 투여함으로써 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사를 치료하는 방법이 제공된다.

[0147] 본원에 사용한 "치료하다"는 본원에 제공한 항체 또는 조성물 또는 조성물 조합의 투여를 통해 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병이 있는 대상자에게 부여한 임의의 이익을 의미한다. 예를 들어 그리고 제한 없이, 그러한 이익은 하나 이상의 증상 또는 부작용의 제거, 또는 이러한 감염 또는 질병으로 말미암은 하나 이상의 증상 또는 부작용 중증도의 감소 또는 개선; 이러한 감염 또는 질병 진행의 지연, 중단 또는 역전; 위장관, 결장, 대장 등의 정상적이고 자연스러운 미생물의 집락 재형성, 재기 또는 재상주 또는 이러한 감염 또는 질병의 치유(즉, 임상가가 대상자를 평가하여 대상자가 이러한 감염 또는 질병을 더 이상 보유했다고 확인할 것)일 수 있다. 클로스트리듐 디피실리 감염과 관련된 증상 또는 부작용은 탈수, 설사, 경련, 신부전, 대장 천공, 중독성 거대결장증을 포함을 하며, 결장 파열과 사망으로 이끌 수 있다. 제공한 조성물을 본원에 제공한 증상 또는 부작용 중 어느 것 또는 전부를 감소, 약화, 개선 또는 제거에 이용할 수 있다.

[0148] 본원에 사용한 "클로스트리듐 디피실리 감염"은 장내 미생물에 클로스트리듐 디피실리가 이전에는 존재하지 않았을 경우 장내 미생물에 클로스트리듐 디피실리의 존재, 또는 부작용 및/또는 장내 또는 위장관을 포함하는 기타 기관과 조직 내 독소 A 및/또는 B 수준의 증가를 일으키거나 일으킬 수 있는 장내 미생물 내 클로스트리듐 디피실리 존재의 변화(예를 들어, 하나 이상의 기타 박테리아 등에 대한 클로스트리듐 디피실리의 총량의 증가 등)로 말미암은 감염을 나타낸다. 일반적으로, 클로스트리듐 디피실리 관련 설사는 장내 클로스트리듐 디피실리 획득 및 증식이 원인이 된다. 생체 내에서, 독소 A와 독소 B는 질병을 일으키는 잠재적인 시너지와 함께 서로 다른 병리학적 프로파일을 나타낸다. 예를 들어, 토끼와 마우스에서 독소 A는 설사를 유도하는 장내 독소인 반면, 독소 B는 이들 중에서 유체 반응을 끌어내지 않는다. 그러나 생체 외에서 독소 B는 훨씬 강력하게 세포 독성을 나타낸다. 독소 A 음성, 독소 B 양성(A-/B+)인 클로스트리듐 디피실리 균주들에 대한 보고가 점차 늘고 있다. A-/B+ 균주는 *tcdA* 유전자의 반복적인 영역 결실 덕분에 독소 A를 생산하지 못하나, 여전히 임상적인 질병을 일으킬 수 있다. 반대로, 현재까지 인간에서 독소 A 양성, 독소 B 음성(A+/B-)인 균주에 대한 보고는 없었다.

- [0149] 클로스트리듐 디피실리 감염은 일반적으로 간혹 복부 경련과 함께, 약하거나 온건한 정도의 설사로 나타난다. 장 점막 상에 고착성의 노르스름한 흰색의 플라크인 위막이 간혹 관찰된다. 드문 경우, 클로스트리듐 디피실리 감염 환자는 급성 복통증과 결장의 정상적인 세균총의 붕괴, 클로스트리듐 디피실리의 콜로니화 및 점막 염증과 손상을 유발하는 독소 분비가 원인인 전격성의 생명을 위협하는 대장염을 나타낼 수 있다. 항생제적 치료법은 결장 미생물을 바꾸는 핵심 인자이다. 정상적인 장 미생물은 클로스트리듐 디피실리의 콜로니화와 과성장에 저항하지만, 정상적인 미생물을 억제하는 항생제 사용은 클로스트리듐 디피실리 박테리아가 증식할 수 있게 한다. 클로스트리듐 디피실리는 건강한 성인의 2 내지 3%, 그리고 건강한 유아의 70%에 이르는 다수에 존재한다. 일측면에서, 본 발명의 단일 클론 항체는 증상은 없으나 클로스트리듐 디피실리 감염에 걸리기 쉽거나 클로스트리듐 디피실리 감염에 걸려서 관련 질병으로 고통 받을 위험이 있는 대상자를 치료하는 데 이용된다. 그러한 대상자는 입원하거나 또는 병원 환경 외부에 있을 수 있다.
- [0150] 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 주요한 위험 요소는 항생제 노출 이전이다. 클로스트리듐 디피실리 대장염과 관련된 가장 흔한 항생제는 세팔로스포린(특히 2세대와 3세대), 암피실린/아목시실린 및 클린다마이신을 포함한다. 그보다 덜 흔한 관련 항생제는 매크로라이드(즉, 에리스로마이신, 클라리스로마이신, 아지스로마이신) 및 기타 페니실린이다. 이러한 질병을 유발하는 것으로 간혹 보고되는 화합물 또는 기타 작용제는 아미노글리코사이드, 플루오로퀴놀론, 트리메토프림-설파메톡사졸, 메트로니다졸, 클로르암페니콜, 테트라사이클린, 이미페넴 및 메로페넴을 포함한다. 임의의 단일 항생제에 짧게 노출되더라도 특히 정상적인 장내 미생물이 악영향을 받거나 죽는다면 클로스트리듐 디피실리 대장염을 유발할 수 있다. 장기간의 항생제 치료과정 또는 둘 이상의 항생제 사용은 질병 위험을 증가시킨다. 클로스트리듐 디피실리 대장염 치료에 일반적으로 사용하는 항생제는 질병을 일으키는 것으로 나타났다. 클로스트리듐 디피실리에 의한 감염과 관련된 기타 위험 인자로는 고령(65세 초과); 약해진 면역 체계; 최근의 입원(특히 감염 환자와 병실 공유, 중환자실 입원 및 장기간 입원); 요양원, 호스피스 또는 기타 장기 치료시설 거주; 복부 수술; 만성 결장 질병(예를 들어, 염증성 장질환(IBD) 또는 결장암); 위산을 줄여 클로스트리듐 디피실리가 장으로 더욱 쉽게 통과할 수 있게 할 수 있는, 처방된 또는 처방전 없이 불필요한 제산제 복용; 및 이전의 클로스트리듐 디피실리 감염을 포함한다. 클로스트리듐 디피실리 질병과 관련 있는 더 많은 인자들로는 항종양약, 주로 메토타렉세이트, 용혈성-요독성 증후군, 악성 종양, 장허혈, 신부전, 신생아괴사성장염, 히르슈슈프룽 병(Hirschsprung disease), IBD 및 비위관을 포함한 비 외과적 위장관 수술을 포함한다. 본원에 제공한 조성물을 투여할 수 있는 대상자로는 클로스트리듐 디피실리 감염 위험이 있는 상술한 임의의 대상자를 포함한다.
- [0151] 클로스트리듐 디피실리 대장염이 있는 대부분 환자들이 특정 치료법 없이 회복하지만, 증상이 오래 계속되거나 쇠약하게 만들 수 있다. 클로스트리듐 디피실리 관련 설사는 심각한 병태일 수 있으며, 허약한 노인 환자에서 25%에 이르는 사망률을 나타낼 수 있다. 더욱 심각하게 앓는 환자에 초점을 둔 보고서는 10 내지 30%의 사망률을 보여준다. 클로스트리듐 디피실리 감염은 나이 든 사람들에게서 더욱 흔하며, 노령은 콜로니화 및 질병에 대한 민감성을 촉진시킬 수 있다. 유아와 어린 아동이 자주 클로스트리듐 디피실리와 그 독소를 포함하고 있으나, 임상적 감염은 흔치 않다. 클로스트리듐 디피실리에 의한 교차 감염은 신생아실에서 흔하지만, 신생아는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사를 발달시키는 것으로 보이지 않는다.
- [0152] 본 발명의 인간화 항체 및/또는 본원에 제공한 조성물을 이용하는 여러 가지 방법들이 본원에 제공된다. 예를 들어, 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 질병이 있고, 본원에 제공한 증상 또는 부작용 중 어느 것을 나타내거나, 본원에 제공한 질병 중 어느 것을 앓고 있는 대상자를 치료하는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 대상자의 클로스트리듐 디피실리 감염과 관련된 질병 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 중증도를 감소, 약화 또는 개선시킨다. 또 다른 예로서, 클로스트리듐 디피실리 관련 설사로 고통 받는 대상자를 치료하는 방법이 제공된다.
- [0153] 또한, 대상자의 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B를 중화시키는 방법이 제공된다. 일례로서, 복합형의, 전신에 영향을 주는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 독소 B를 중화시키는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 복합형의, 전신에 영향을 주는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 독소 B는 인간화 항-독소 A 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 인간화 항-독소 B 항체 또는 그의 항원 결합 단편 모두, 또는 이들 항체를 포함하는 조성물을 투여하여 중화시킨다. 또 다른 측면에서, 복합형의, 전신에 영향을 주는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A와 독소 B는 독소 A와 독소 B 모두에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 이러한 항체(예를 들어, 인간화된 형태)를 포함하는 조성물을 투여하여 중화시킨다. 일부 실시형태에서, 인간화 항체 또는 조성물은 클로스트리듐 디피실리를 대상으로 하는 또 다른 치료제와 함께 투여된다.
- [0154] 또 다른 실시형태로서, 클로스트리듐 디피실리 감염된 대상자의 정상적인 위장 미생물을 복원하여, 클로스트리

듬 디피실리 및/또는 그 독소에 의한 감염을 효과적으로 치료하는 방법 또한 제공된다. 또 다른 실시형태로서, 대상자의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병에 대한 민감성을 줄이는 방법 또한 제공된다. 또 다른 실시형태로서, 대상자에서 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병을 예방하는 방법이 제공된다.

- [0155] 전술한 방법에서, 대상자는 본원에 제공한 항체 또는 조성물 중 하나 이상을 투여 받는다(예를 들어, 클로스트리듐 디피실리 독소 A를 대상으로 하는 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물과 클로스트리듐 디피실리 독소 B를 대상으로 하는 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물). 상기 조성물은 대상자에게 동시에 또는 다른 시간에 투여할 수 있다. 상기 조성물은 대상자에게 약학적으로 허용 가능한 담체, 운반제 또는 부형제와, 선택적으로 클로스트리듐 디피실리 및/또는 그 장내 독소에 대해 효과적인 다른 항생제, 비 항생제 약물 또는 치료제를 포함하는 조성물 내에 혼합물로서 투여할 수 있다.
- [0156] 인간화 항-독소 A 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및/또는 인간화 항-독소 B 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 상기 인간화 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 개별적으로 또는 함께 포함하는 약학적으로 허용 가능한 조성물은 본 발명에 따른 상술한 방법 가운데 어느 한 방법에서 이용될 수 있다.
- [0157] 본원에 사용한 "약학적으로 허용 가능한 담체" 또는 "생리학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 그리고 모든 염, 용매, 분산매, 코팅제, 항균제와 항진균제, 등장제와 흡수지연제 및 생리학적으로 호환 가능한 기타를 포함한다. 바람직하게는, 상기 담체는 경구, 정맥 내, 복강 내, 근육 내, 피하, 비경구, 척추 또는 상피 투여(예를 들어, 주사 또는 투입에 의한)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉 항체는 산의 작용 및 기타 상기 화합물을 불활성화시킬 수 있는 천연 조건으로부터 화합물을 보호하기 위해 물질 내로 코팅시킬 수 있다.
- [0158] 투여 시, 본 발명의 약학적 제제는 약학적으로 허용 가능한 양으로 그리고 약학적으로 허용 가능한 조성물로 적용된다. "약학적으로 허용 가능한"이라는 용어는 상기 활성 성분의 생물학적 활성 효과를 저해하지 않는, 비 독성의, 생리학적으로 허용 가능한 물질을 나타낸다. 그러한 제제는 일상적으로 염, 완충제, 보존제, 호환 가능한 담체, 그리고 선택적으로 면역조성제, 케모카인 및 사이토카인을 포함하는 보충적 면역강화제와 같은 기타 치료제를 함유할 수 있다. 의약품으로 이용될 경우, 상기 염은 약학적으로 허용 가능해야 하지만, 비 약학적으로 허용 가능한 염은 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 제조하는 데 편리하게 이용될 수 있으므로, 본 발명의 범위에서 배제되지 않는다.
- [0159] 염은 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 보유하며, 어떠한 원치 않는 독성학적 효과도 주지 않는다(예를 들어, Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19 참조). 이러한 염의 예로는 산 부가염과 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 지방족 모노- 및 디-카르복실산, 페닐 치환된 알카노익산, 하이드록시 알카노익산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 설폰산 등과 같은 무독성 유기산뿐만 아니라, 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등과 같은 무독성 무기산으로부터 유래한 염을 포함한다. 염기 부가염은 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 소듐 또는 칼슘과 같은 반대이온이 있거나 없는 에틸렌디아민 아세테이트(EDTA), 프로카인 등과 같은 무독성 유기 아민류뿐만 아니라, 소듐, 포타슘, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼리 토금속으로부터 유래한 염을 포함한다.
- [0160] 본 발명의 조성물 중 임의의 조성물은 원한다면 약학적으로 허용 가능한 담체와 조합될 수 있다. 본원에 사용한 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 인간으로 투여하기에 적합한, 하나 이상의 호환 가능한 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 나타낸다. "담체"라는 용어는 적용을 촉진시키기 위해 활성 성분과 조합되는 유기 또는 무기의, 천연 또는 합성 성분을 나타낸다. 상기 약학적 조성물의 구성성분 또한 제공한 조성물의 분자들과, 그리고 원하는 약학적 효능을 크게 손상시킬 상호 작용이 일어나지 않는 방식으로 서로 혼합될 수 있다.
- [0161] 상기 제약 조성물은 아세트산염, 시트르산염, 붕산염 및 인산염을 포함하는 적합한 완충제를 함유할 수 있다.
- [0162] 상기 제약 조성물은 또한 선택적으로 염화벤잘코늄, 클로로부탄올 및 파라벤과 같은 적합한 보존제를 함유할 수 있다.
- [0163] 상기 제약 조성물은 편리하게 단위 제형으로 제공할 수 있으며, 약학 분야에 잘 알려진 방법 가운데 어느 하나의 방법으로 제조할 수 있다. 모든 방법은 상기 활성제를 하나 이상의 부수적인 성분을 구성하는 담체와 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 상기 조성물은 상기 활성 화합물을 액체 담체, 미세하게 나뉜 고체 담체 또는 둘 다와 함께 균일하게 그리고 직접적으로 회합시킨 다음, 필요한 경우 생성물의 모양을 형성함으로써 제조한다.

- [0164] 본 발명의 항-독소 A와 항-독소 B 항체, 또는 그의 일부분은 치료 또는 예방 반응과 같은 원하는 최적의 반응을 제공하기 위해 조정할 수 있는 투약 계획에 따라 개별 대상자에게 제공할 수 있다. 설명적으로, 1회 분량의 약을 한 번에 투여할 수 있고, 시간에 걸쳐 몇 차례 나누어서 투여할 수 있으며, 또는 복용량을 특정 치료 상태에 의해 권고될 수 있는 바와 같이, 비례하여 감소 또는 증가시킬 수 있다. 비경구 조성물은 투여의 편의 및 복용의 균일성을 위해 단일 제형으로 포장 또는 제조할 수 있다. 단일 제형은 치료해야 할 대상자를 위해 단일한 용량으로 제공하는, 물리적으로 별개의 단위를 나타내며, 여기서 각 단위는 필요한 약학적 담체, 운반제, 부형제 또는 희석제와 관련하여 바람직한 치료 효과를 생산하기 위해 계산된 미리 정해진 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 단위 제형을 위한 명세서는 (a) 상기 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성해야 할 특정 치료 효과, 그리고 (b) 개체의 민감성 치료를 위한 활성 화합물과 같은, 조제 분야의 고유한 한계에 의해 좌우되며, 이들에 직접적으로 의존한다.
- [0165] 비경구 투여에 적합한 조성물은 편리하게도 멸균된 수성 또는 비 수성 제제를 포함하며, 이 제제는 바람직하게는 수용자의 혈액과 등장성이다. 이러한 제제는 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 이용하는 알려진 방법에 따라 제형화할 수 있다. 멸균성의 주사 가능한 제제는 또한 예를 들어, 1,3-부탄 디올에 녹인 용액으로서, 무독성의 비경구로 허용 가능한 희석제 또는 용매에 녹인 멸균성의 주사 가능한 용액 또는 현탁액일 수 있다. 허용 가능한 운반제와 용매 중에서, 이용할 수 있는 운반제와 용매는 물, 링거액 및 등장성의 소듐 클로라이드 용액이다. 또한, 멸균성의 고정유는 용매 또는 현탁 매질로 편리하게 이용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노- 또는 디-글리세라이드를 포함하는 임의의 완하성 지방유를 이용할 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산을 주사제 제조에 이용할 수 있다. 경구, 피하, 복강 내, 정맥 내, 근육 내 등의 투여에 적합한 담체 제형은 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA에서 볼 수 있다.
- [0166] 상기 활성 성분은 임플란트와 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는, 제어 방출 제형과 같은 급속 방출에 대하여 성분들을 보호할 담체를 이용하여 제조할 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 폴라젠, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 고분자를 이용할 수 있다. 그러한 제형을 제조하는 여러 가지 방법들이 특허를 받았거나 일반적으로 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참조.
- [0167] 주사를 포함한 임의의 종래 경로에 의해 또는 시간에 걸친 점진적인 주입에 의해 본 발명의 항체와 조성물을 치료제로서 투여할 수 있다. 비 제한적인 예로서, 투여 경로는 경구, 정맥 내, 피하, 복강 내, 근육 내, 척추 강 내, 강 내, 안와후방, 질, 직장, 흡입, 흡인, 피부, 좌제를 통해, 또는 경피일 수 있다.
- [0168] 본 발명의 항체 및 조성물은 효과적인 양 또는 용량으로 투여된다. "효과적인 양"은 본원에 제공한 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 조성물이 단독으로 또는 추가 용량 또는 기타 치료제와 함께 원하는 반응을 생산, 예를 들어, 대상자의 클로스트리듐 디피실리 감염, 설사, 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병을 치료, 개선, 박멸, 해소 또는 예방하는 양을 나타낸다. 이는 상기 감염, 설사, 또는 질병의 진행을 지속된 기간 동안, 예를 들어, 1주일 초과, 2주일, 3주일, 1개월, 2개월, 3개월 또는 3개월 초과 기간 동안 늦추기만 하는 것을 수반할 수 있다. 그러나 그러한 효과적인 양은 상기 감염, 설사, 또는 질병의 진행을 최적으로 치료하거나 영구적으로 중단한다. 이는 정기적인 방법에 의해 추가 감시할 수 있다. 또한, 상기 질병 또는 병태의 치료에 대한 원하는 반응은 상기 감염 또는 질병의 개시를 지연시키거나 심지어 상기 감염 또는 질병 개시의 예방일 수 있다.
- [0169] 물론, 효과적인 양은 치료되는 특정 감염 또는 질병, 상기 감염 또는 질병의 중증도, 연령, 건강 상태, 크기와 체중을 포함하는 개별 환자의 매개변수, 치료 지속기간, 병행하는 치료법이 있을 경우 그 종류, 특정 투여 경로 및 의사의 지식과 기술 내에 있는 비슷한 인자에 따라 결정된다. 이러한 인자들은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 정기적인 시험 또는 실험만으로 해결할 수 있다. 개별 구성성분 또는 그 조합의 최대 용량, 즉, 타당한 의료적 판단에 따른 가장 높은 안전한 용량을 이용하는 것이 일반적으로 바람직하다. 그러나 환자가 의료적인 이유, 심리적 이유 또는 사실상 임의의 기타 이유로 더 낮은 용량 또는 용인할 수 있는 용량을 고집할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.
- [0170] 전술한 방법에 이용한 약학적 조성물은 바람직하게는 멸균된 것으로, 환자에 투여하기에 적합한 중량 또는 부피 단위 내에 원하는 반응을 생산하기 위해 본원에 제공한 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편을 효과적인 양으로 함유한다. 상기 반응은 예를 들어, 질병 증상의 감소와 같은, 상기 조성물의 생리학적인 효과를 확인하여 측정할 수 있다. 다른 분석법이 당업자에게 알려져 있을 것이며, 반응 수준을 측정하기 위해 이용할 수 있다.
- [0171] 대상자에게 투여하는 조성물의 용량 또는 양은 서로 다른 매개변수에 따라, 특히 이용하는 투여 방식과 대상자

의 상태에 따라 선택할 수 있다. 다른 인자로는 원하는 치료기간을 포함한다. 적용한 초기 용량에서 대상자의 반응이 불충분한 경우에는 환자의 인내심이 허용하는 정도까지 더 많은 용량(또는 다른, 더욱 국지적인 전달 경로에 의해 효과적으로 더 많은 용량)을 이용할 수 있다.

[0172] 일반적으로, 용량 또는 양은 약 $1\mu\text{g/kg}$ 내지 약 $100,000\mu\text{g/kg}$ 의 범위일 수 있다. 본 발명의 항체, 항체 일부분, 또는 조성물의 치료적으로 또는 예방적으로 효과적인 양을 구성하는 용량 범위의 비 제한적인 예로는 0.1mg/kg 내지 100mg/kg ; 0.1mg/kg 내지 60mg/kg ; 0.5mg/kg 내지 75mg/kg ; 0.5mg/kg 내지 25mg/kg ; 0.75mg/kg 내지 40mg/kg ; 1mg/kg 내지 50mg/kg ; 또는 1mg/kg 내지 5mg/kg 을 포함한다. 임의의 특정 개체, 환자, 또는 대상자를 위해, 특정 용량과 복용 계획은 개별적인 필요와 상기 항체 및/또는 조성물을 투여하거나 투여를 감독하는 숙련된 의사의 전문적인 판단에 따라 시간에 따라 조정되어야 함은 인정할 수 있을 것이다. 그러한 용량 범위는 오로지 설명을 위한 것이며, 본 발명의 범위 또는 실행을 제한하고자 의도한 것이 아니다. 상기 조성물을 기초로 하여, 상기 용량은 연속적인 펌프에 의해 연속적으로, 또는 주기적인 시간 간격으로 전달할 수 있다. 특정 조성물의 복수 용량에 대한 원하는 시간 간격은 당업자가 지나친 실험을 하지 않고서도 정할 수 있다. 상기 조성물의 투여에 적합한 기타 프로토콜은 당업자에게 알려진 것일 것이며, 여기서 투여 용량, 투여 일정, 투여 위치, 투여 방식 등은 전술한 내용에 따라 다르다.

[0173] 상기 조성물을 인간 이외의 포유류에 투여하는 일, 예를 들어, 시험을 위한 목적 또는 수의과적 치료 목적을 위한 투여는 상술한 바와 대체로 동일한 조건 하에서 이루어진다.

[0174] 또한, 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체를 포함하는 조성물 및 사용 지침서를 포함하는 키트를 본원에서 제공한다. 상기 키트는 추가로 추가적인 치료제와 같은 적어도 하나의 추가적인 시약, 또는 본원에서 제공한 바와 같은 하나 이상의 추가적인 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, 키트 내의 최초의 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 독소 B에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 경우, 독소 A에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 그 역도 같음)을 함유할 수 있다.

[0175] 상기 키트의 구성성분은 수성 매체 또는 동결 건조된 형태 중 어느 하나에 포장할 수 있다. 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 콘주게이트의 형태로 키트 내에 이용될 경우(예를 들어, 이중 특이적 항체 콘주게이트), 그러한 콘주게이트의 구성성분은 완전히 콘주게이트된 형태, 중간체 형태, 또는 사용자에 의해 콘주게이트되는 별개의 부분 중 어느 하나, 또는 제공된 사용 지침서에 따른 키트로 제공할 수 있다.

[0176] 키트는 시험관, 바이알, 플라스크, 병, 시린지 등과 같은 하나 이상의 용기 또는 일련의 용기 내에 밀폐되어 들어가기도록 구분되는 담체를 포함할 수 있다. 제1의 하나의 용기 또는 일련의 용기는 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편을 함유할 수 있다. 제2의 하나의 용기 또는 일련의 용기는 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편을 함유할 수 있으며, 여기서 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 제1 용기 내의 내용물 또는 기타 다른 추가적인 치료제와는 다르다. 본원에 제공한 키트는 제1 및 제2 용기에 함유된 항체 또는 항원 결합 단편을 연결시키는 분자를 함유하는 제3 용기를 더 포함할 수 있다.

[0177] 본원에 사용한 폴리펩티드, 단백질 또는 그의 단편과 관련하여, "분리됨"은 타고난 환경에서 분리되어 식별 또는 이용을 허용할 정도의 충분한 양으로 존재함을 의미한다. 단백질 또는 폴리펩티드를 언급할 때 분리됨은 예를 들어, (i) 발현 클로닝에 의해 선택적으로 생산된 또는 (ii) 크로마토그래피 또는 전기영동에 의한 것과 같이 정제됨을 의미한다. 분리된 단백질 또는 폴리펩티드는 대체로 순수할 수 있으나, 반드시 그럴 필요는 없다. 용어 "대체로 순수"는 단백질 또는 폴리펩티드가 본질적으로 사실상 또는 생체 내 시스템에서 발견될 수 있는 기타 물질들이 실용적이면서 의도하는 용도에 적합한 정도까지 결여되어 있음을 의미한다. 대체로 순수한 폴리펩티드는 당해 분야에서 잘 알려진 기법에 의해 생산될 수 있다. 분리된 단백질은 약학적 제제에서 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합될 수 있으므로, 상기 단백질은 상기 제제 중량에 대해 적은 백분율만을 포함할 수 있다. 그럼에도 상기 단백질은 생체계에서 자연적으로 연관될 수 있는 물질들로부터 분리되어 격리된, 즉, 다른 천연적으로 발생하는 단백질로부터 분리된다.

[0178] 또한, 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 치료 효능에 대해 후보 작용제를 평가하는 방법이 제공된다. 그러한 방법은 대상자의 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병 위험을 증가시키는 작용제를 대상자에 처리하는 단계, 대상자에게 클로스트리듐 디피실리를 접종하는 단계, 대상자를 후보 작용제로 치료하는 단계, 및 후보 작용제의 치료 효능을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 본원에 사용한 "클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병 위험을 증가시키는 작용제"는 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 개시 또는 진행을 촉진한다고 여겨지는 임의의 작용제이다. 그러한 작용제는 항생제 또는 비 항생제 작용제일 수 있다. 예를 들어, 상기 작용제는

본원에 기술한 항생제 중 어느 하나일 수 있다. 예시적으로, 그러한 항생제는 클린다마이신, 메트로니다졸, 반코마이신, 피탁소마이신, 니타족사니드, 리팍시민, 라모플라닌, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0179] 이들 방법에서, 후보 작용제는 클로스트리듐 디피실리 접종 전 또는 접종 후에 대상자에게 투여할 수 있다. 후보 작용제는 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병을 치료 또는 예방하는 잠재력이 있다고 여겨지는 임의의 작용제일 수 있다. 항생제 또는 비 항생제일 수 있는 후보 작용제는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0180] 이들 방법은 이하 실시예에서 기술한 생체 외 및 생체 내 방법 중 어느 하나를 포함한다.

[0181] 클로스트리듐 디피실리 관련 설사 치료의 궁극적인 목표는 모든 항생제를 중단하고 정상적인 장내 미생물의 복구를 허용하는 것이다. 본 발명에 따르면, 본원에 기술한 항-독소 A 및 항-독소 B 단일 클론 항체는 클로스트리듐 디피실리 독소의 발병 효과를 차단하고자 고안한 비 항생제적 치료법을 제공하고, 항생제 중단을 가능하게 하여, 결장이 치유될 시간 및 정상적인 장내 미생물이 재건할 수 있는 시간을 제공할 수 있다. 본 발명의 단일 클론 항체는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사의 엄격한 햄스터 모델에서 완전하고 지속적인(37일 초과) 보호 효과를 나타냈다. 예외적인 특성과 속성을 기초로 할 때, 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B 단일 클론 항체는 가장 심각한 질병 사례로 고통 받는 개체들을 포함한, 기존의 치료법으로 빈약하게 치료받는 환자들에게 새로운 치료 옵션과 의약품을 제공한다.

[0182] 또한, 본 발명은 단일 클론 항체 PA-39(ATCC 수탁번호 PTA-9692), PA-39의 인간화 형태, 단일 클론 항체 PA-50(ATCC 수탁번호 PTA-9694), PA-50의 인간화 형태, 단일 클론 항체 PA-41(ATCC 수탁번호 PTA-9693), PA-41의 인간화 형태, 독소 A와의 결합에 대해 단일 클론 항체 PA-39 또는 그의 인간화 형태와 경쟁하는 항체, 독소 A와의 결합에 대해 단일 클론 항체 PA-50 또는 그의 인간화 형태와 경쟁하는 항체, 또는 독소 B와의 결합에 대해 단일 클론 항체 PA-41 또는 그의 인간화 형태와 경쟁하는 항체 중에서 하나 이상에 의해 인식 및/또는 결합되는 에피토프 영역을 함유하는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B의 일부분, 단편, 또는 펩티드를 포함하는 백신 또는 면역원을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 백신 또는 면역원은 단일 클론 항체 PA-39(ATCC 수탁번호 PTA-9692), PA-39의 인간화 형태, 또는 독소 A 및 독소 B와의 결합에 대해 단일 클론 항체 PA-39 또는 그의 인간화 형태와 경쟁하는 항체 중에서 하나 이상에 의해 인식 및/또는 결합되는 에피토프 영역을 함유하는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및 독소 B의 일부분, 단편, 또는 펩티드를 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 백신 또는 면역원의 독소 A 및/또는 독소 B의 에피토프를 함유하는 일부분, 단편, 또는 펩티드는 단백질 가수분해성 절단에 의해 독소 A 또는 독소 B 단백질로부터 유래한다. 일 실시형태에서, 상기 백신 또는 면역원의 독소 A 단편, 일부분, 또는 펩티드는 엔테로키나아제에 의한 단백질 가수분해성 절단에 의해 생산된다. 일 실시형태에서, 상기 백신 또는 면역원의 독소 B 단편, 일부분, 또는 펩티드는 카스파아제(카스파아제1)에 의한 단백질 가수분해성 절단에 의해 생산된다. 일 실시형태에서, 상기 백신 또는 면역원의 에피토프를 함유하는 일부분 또는 단편은 독소 A 또는 독소 B 단백질의 화학적으로 또는 재조합에 의해 합성된 펩티드이다. 일 실시형태에서, 상기 항체에 의해 인식되어 결합되는 독소 A 및/또는 독소 B의 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 백신 또는 면역원의 단편, 일부분, 또는 펩티드는 독소 A의 아미노 말단; 독소 B의 아미노 말단; 독소 A의 카르복시 말단; 독소 B의 카르복시 말단; 독소 A의 수용체 결합 영역; 독소 A의 수용체 결합 영역 이외의 영역; 독소 B의 N-말단 효소적 영역; 독소 A의 글루코실 트랜스페라아제 영역; 독소 B의 글루코실 트랜스페라아제 영역; 독소 A의 단백질 가수분해 영역; 독소 B의 단백질 가수분해 영역; 독소 A의 소수성, 포어 형성 영역; 또는 독소 B의 소수성, 세공 형성 영역 중 하나 이상으로부터 유래한다.

[0183] 일부 실시형태에서, 상기 항체에 의해 인식되고 결합되는 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 단편은 독소 A 또는 독소 B의 아미노 말단으로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 상기 항체에 의해 인식되고 결합되는 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 단편은 독소 A 또는 독소 B의 카르복시 말단으로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 상기 항체에 의해 인식되고 결합되는 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 단편은 독소 A 또는 독소 B의 글루코실 트랜스페라아제 영역으로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 상기 항체에 의해 인식되고 결합되는 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 단편은 독소 A 또는 독소 B의 단백질 가수분해 영역으로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 상기 항체에 의해 인식되고 결합되는 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 단편은 독소 A 또는 독소 B의 소수성, 세공 형성 영역으로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 상기 항체에 의해 인식되고 결합되는 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 단편은 독소 A의 수용체 결합 영역으로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 상기 항체에 의해 인식되고 결합되는 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 단편은 독소 B의 수용체 결합 영역으로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 상기 항체에 의해 인식되고 결합되는 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 단편은 독소 A의 수용체 결합 영역 이외의 영역으로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 상기

항체에 의해 인식되고 결합되는 하나 이상의 에피토프 영역을 함유하는 단편은 독소 B의 N-말단 효소적 영역으로부터 유래한다. 일 실시형태에서, 독소 A 및/또는 독소 B의 에피토프를 함유하는 단편 또는 일부분은 크기가 300kDa 미만이다. 다른 실시형태에서, 독소 A 및/또는 독소 B의 에피토프를 함유하는 단편 또는 일부분은 크기가 약 158 내지 160kDa, 약 100 내지 105kDa, 예를 들어, 103kDa, 약 90 내지 95kDa, 예를 들어, 91kDa, 및/또는 약 63 내지 68 kDa, 예를 들어, 63kDa 또는 68kDa이다. 다른 실시형태에서, 독소 A의 에피토프를 함유하는 단편 또는 일부분은 크기가 약 158 내지 160kDa; 약 90 내지 95kDa, 예를 들어, 91kDa, 및/또는 약 63 내지 68kDa, 예를 들어, 68kDa이다. 다른 실시형태에서, 독소 B의 에피토프를 함유하는 단편 또는 일부분은 크기가 약 100 내지 105kDa, 예를 들어, 103kDa, 및/또는 ~63 내지 68kDa, 예를 들어, 63kDa이다.

[0184] 그러한 독소의 일부분, 단편, 또는 펩티드는 클로스트리듐 디피실리 감염된 대상자 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병으로 고통 받는 대상자에게 백신 또는 면역원의 형태로 투여할 경우, 대상자에게 체액성 반응, 즉, 독소 A 및/또는 독소 B에 특이성을 나타내는 항체를 유도할 수 있어, 그렇게 함으로써 대상자가 독소에 대한 면역 반응을 시작할 수 있고, 대상자의 클로스트리듐 디피실리 관련 질병, 감염, 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사를 중화, 차단, 감소, 개선, 치유, 또는 치료할 수 있게 한다. 따라서, 다른 실시형태는 대상자에게 상술한 백신 또는 면역원을 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 클로스트리듐 디피실리 감염 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 질병을 중화, 차단, 감소, 개선, 치유 또는 치료하는 방법을 필요로 하는 대상자에 이를 제공한다. 일 실시형태에서, 대상자는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B에 대한 체액성 반응을 유도하여, 그렇게 함으로써 대상자의 클로스트리듐 디피실리 관련 질병, 감염, 또는 클로스트리듐 디피실리 관련 설사를 중화, 차단, 감소, 개선, 치유 또는 치료한다. 다른 실시형태에서, 대상자는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B에 대하여 세포성 면역 반응을 유도한다. 다른 실시형태에서, 대상자는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 및/또는 독소 B에 대하여 체액성 및 세포성 면역 반응 모두를 유도한다.

[0185] 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 클로스트리듐 디피실리 감염에 취약한 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 세포 내 또는 상기 세포에 대항하여 독소 A 및/또는 독소 B 활성을 중화, 억제, 또는 차단하는 방법으로, 여기서 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 경쟁적 또는 혼합 경쟁적 작용 메커니즘에 의해 상기 세포 내 또는 상기 세포에 대항하여 독소 A 및/또는 독소 B의 활성을 중화, 억제, 또는 차단하는 방법을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 항체는 단일 클론 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체 중 하나 이상이다. 일 실시형태에서, 상기 세포는 대상자 내의 세포이고, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 대상자에게 효과적인 양으로 투여된다. 일 실시형태에서, 상기 세포는 대상자의 위장관 내 세포, 예를 들어, 장내 상피 세포이다. 일 실시형태에서, 상기 독소는 독소 A이다. 일 실시형태에서, 상기 독소는 독소 B이다. 일 실시형태에서, 상기 독소는 독소 A이고, 항체의 작용 메커니즘은 경쟁적 저해 작용 메커니즘이다. 일 실시형태에서, 상기 독소는 독소 A이고, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 PA-50(ATCC 수탁번호 PTA-9694), 그의 인간화 형태, 또는 독소 A 활성을 중화시키기 위해 PA-50과 경쟁하는 항체 또는 그의 단편이다. 일 실시형태에서, 상기 독소는 독소 A이고, 상기 항체의 작용 메커니즘은 혼합 경쟁적 저해 작용 메커니즘이다. 일 실시형태에서, 독소는 독소 A이고, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 PA-39(ATCC 수탁번호 PTA-9692), 그의 인간화 형태, 또는 독소 A 활성을 중화시키기 위해 PA-39과 경쟁하는 항체 또는 그의 단편이다. 일 실시형태에서, 상기 독소는 독소 B이고, 항체의 작용 메커니즘은 혼합 경쟁적 저해 작용 메커니즘이다. 일 실시형태에서, 상기 독소는 독소 B이고, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 PA-41(ATCC 수탁번호 PTA-9693), 그의 인간화 형태, 또는 독소 B 활성을 중화시키기 위해 PA-41과 경쟁하는 항체 또는 그의 단편이다.

[0186] 본원에 사용한 용어, 독소의 "경쟁적 저해제"는 배양액 내의 독소 농도가 증가함에 따라 최대 중화 백분율의 변화 없이 중화 곡선에서 우측으로의 EC₅₀ 변화를 나타내는 독소 중화 저해제, 예를 들어, 항체, 작용제, 또는 작은 분자 또는 화합물(chemical entity)을 나타낸다. 따라서, 경쟁적 저해제는 일반적으로 더 많은 저해제의 첨가로 독소의 세포독성 효과를 극복할 수 있다. 독소의 "비경쟁적 저해제"라는 용어는 배양액에서 독소의 농도가 증가함에 따라 농도 변화 없이 최대 중화 백분율의 감소를 나타내며, 50%의 최대 반응값(EC₅₀)을 나타내는 독소 중화 저해제를 나타낸다. 따라서, 비 경쟁적 저해제는 일반적으로 더 많은 저해제의 첨가에 의해 독소의 세포독성 효과를 완전히 극복할 수 없다. 독소의 "혼합 경쟁적 저해제"라는 용어는 배양액 내의 독소의 농도가 증가함에 따라 어느 정도 경쟁적 저해와 비 경쟁적 저해를 나타내는 독소 중화 저해제를 의미한다. 예를 들어, 독소의 혼합 경쟁적 저해제는 독소의 다른 세포독성 효과를 차단할 뿐만 아니라, 독소에 결합하여 독소가 세포에 결합하는 것을 차단함으로써 그 효과를 나타낼 수 있으며, 그렇게 함으로써 혼합 경쟁적 작용 메커니즘을 발휘한다.

[0187] **실시예**

[0188] 실시예 1

[0189] 클로스트리듐 디피실리 독소 A 및/또는 독소 B에 대한 중화 단일클론 항체의 생성

[0190] A. 면역원 제조

[0191] 클로스트리듐 디피실리 독소 A 및/또는 독소 B에 대한 중화 단일클론 항체는 클로스트리듐 디피실리 독소 A 변성독소(독소의 불활성 형태) 및 활성 형태의 독소 A 및/또는 독소 B로 마우스를 면역함으로써 생성하였다. 쥐과 동물 mAb(PA-38: 항-독소 A mAb, ATCC # PTA-9888; PA-39: 항-독소 A 및 B mAb, ATCC # PTA-9692; PA-41: 항-독소 B mAb, ATCC # PTA-9693; 및 PA-50: 항-독소 A mAb, ATCC # PTA-9694)는 변성독소 A로 동물을 면역시킨 후 독소 A 및/또는 독소 B의 활성 형태로 면역함으로써 생성하였다. 독소 A 변성독소, 독소 A, 독소 B(List Biological Laboratories Inc., Campbell, CA) 및 독소 A(Techlab Inc., Blacksburg, VA)는 사용될 때까지 4℃에서 저장하였다. 독소와 변성독소는 클로스트리듐 디피실리의 대조 균주로서 통상 사용되는 균주 VPI 10463로부터 유래되었다. Quil A 보조제(Accurate Chemical, Westbury, NY)를 변성독소 또는 독소 요구량에 가한 후 혼합하였다. 혼합물은 면역 60분 이내 제조하고 면역이 준비될 때까지 얼음상에 보관하였다. 융합전 최종 부스팅(boost)을 위해, 요구되는 독소를 PBS에 희석후 면역에 사용될 때까지 얼음상에 보관하였다.

[0192] B. 면역 및 융합

[0193] 30 마리의 암컷 BALB/c 마우스(Charles River Labs, Wilmington, MA)에 2 면역 용량(PA-50) 또는 3 면역 용량(PA-38, PA-39 및 PA-41)의 독소 A 변성독소(10 킬)를 3주 간격으로 피하주사한 후, 활성 독소 A 또는 활성 독소 B를 그 용량을 증가시키면서 역시 3주 간격으로 부스팅 면역하였다. PA-38를 위해, 한 마리의 마우스에 독소 A(List Biological Laboratories Inc.)로 매 3주마다 총 3번 부스팅 면역을 하였으며, 각 부스팅은 그 용량을 500 ng에서 2 킬로 올리고, 독소 A(8 킬)를 최종 부스팅한 후 3일 후 비장을 적출하였다. PA-39 및 PA-41를 위해, 두 마리의 마우스에 각각 3주마다 독소 B로 3회 또는 5회의 부스팅 면역을 실시하였으며, 각 부스팅은 그 용량을 2 킬에서 12.5 킬로 올리고, 독소 B(20 킬)를 최종 부스팅한 다음 3일 후 비장을 적출하였다. PA-50을 위해, 한 마리의 마우스에 독소 A(Techlab Inc.)로 총 4번 부스팅을 위해 매 3주마다 부스팅 면역을 하였으며, 각 부스팅은 그 용량을 20 ng에서 2.5 킬로 올리고, 최종 부스팅으로 독소 A(10 킬)를 투여한 후 3일 후 비장을 적출하였다. 변성독소 및 독소의 면역 용량 및 부스팅 용량을 각각 보조제, 예컨대 Quil A(10 킬)와 함께 투여하였다. 활성 형태의 독소 A 또는 독소 B로 부스팅하는 것은 방어 항체를 전개할 수 있는 동물을 확인하는데 도움이 된다. 면역된 동물로부터 얻은 혈청을 차례로 희석하고 후술하는 바와 같이 CHO-K1 세포에 대한 독소 A의 세포독성을 중화하는 능력을 시험하였다. 융합에 사용하기 위해 가장 높은 역가의 중화 항체를 갖는 동물을 선별하고, 보조제없이 독소로 부스팅하였다.

[0194] 부스팅후 동물들을 희생시키고 분리한 비장세포를 표준 방법을 사용하여 Sp2/0 세포주와 융합하였다. 하이브리도마를 선택 배지, RPMI-1640, 10% FBS, 10% BM Condimed-H1(Roche Applied Science, Indianapolis, IN) 및 베타 머캅토에탄올(PA-38 및 PA-39를 위해) 또는 하이브리도마-SFM 및 선택 압력을 위해 100 μM 하이포크산틴, 1 μg/ml 아자세린 및 16 μM 티미딘을 함유하는 10% FBS(PA-41 및 PA-50를 위해)에 현탁하였다. 하이브리도마를 96웰 평면 바닥 조직 배양 플레이트(BD Biosciences, San Jose, CA)에 플레이트팅하였다. 플레이트를 37℃에서 3일간 인큐베이션한 후, HT 성장 배지(아자세린이 없는 선택 배지)를 가하였다. 추가로 4~7일간 더 인큐베이션한 후 하이브리도마 상청액에 대해 중화 활성을 스크리닝하였다.

[0195] PA-38에 대한 1차 스크리닝에서, 608개의 하이브리도마 상청액의 CHO-K1 세포(ATCC# CCL-61, Manassas, VA)상에서 독소 A(List Laboratories)의 세포독성 효과를 중화하는 능력을 시험하였다. PA-39 및 PA-41에 대한 1차 스크리닝에서, 2416개의 하이브리도마 상청액의 CHO-K1 세포 상에서 독소 B(List Laboratories)의 세포독성 효과를 중화하는 능력을 시험하였다. PA-50에 대한 1차 스크리닝에서, 1440개의 하이브리도마 상청액의 T-84 세포 상에서 독소 A(Techlab Inc.)의 세포독성 효과를 중화하는 능력을 시험하였다. 2차 분석은 토끼 적혈구의 독소-매개 응집을 저해하는 능력을 조사하였다. 스크리닝 과정에서, 스크리닝 분석에서 클로스트리듐 디피실리 독소를 효과적으로 저해 또는 중화하는 4개의 mAb를 분리하였고, 이들을 PA-38(항-독소 A), PA-39(항-독소 A/B), PA-50(항-독소 A) 및 PA-41(항-독소 B)로 명명하였다. 이들 mAb를 생성하는 하이브리도마 세포주는 희석 제한으로 두 번 클로닝하여 클론 세포주를 생성하였다. PA-38, PA-39, PA-41 및 PA-50 mAb는 IsoStrip 마우스 단일클론 항체 이소타이핑 키트(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)를 사용하여 분석한 결과 각각 아이소타입 IgG2a, κ, IgG1, κ, IgG1, κ, 및 IgG1, κ인 것으로 결정되었다. mAb-생성 하이브리도마 세포주는 이들이 생성하는 mAb와 동일한 명칭으로 지정하였다.

[0196] **C. 스크리닝: 세포에 대한 독소 A 또는 B 세포독성 효과의 중화**

[0197] 하이브리도마 상청액에 대해 세포에 대한 독소 A 또는 독소 B의 세포독성효과를 중화하는 능력을 스크리닝하였다. 높은 처리 효율을 갖는 방법을 개발하여 한번에 수천 개의 하이브리도마 상청액을 처리하였다. 세포독성 분석을 위해 CHO-K1 세포(PA-38, PA-39 및 PA-41를 위해) 또는 T-84 세포(PA-50를 위해)를 사용하였다. 세포를 분석 플레이트(96웰, 백색 불투명 벽, 투명 평면 바닥 플레이트; Perkin Elmer, Waltham, MA)에 Biomek FX 로봇 시스템(Beckman Coulter, Brea, CA)을 사용하여 추가하였다. 분석 플레이트를 37℃에서 4 시간 동안 인큐베이션하여 세포들이 벽에 부착되도록 하였다. T-84 분석을 위해, 독소 A를 240 ng/ml로 희석하였다. CHO-K1 분석을 위해, 독소 A는 2 µg/ml로 또는 독소 B는 6 ng/ml로 희석하였다. 희석된 독소를 Biosafety Cabinet(BSC) 내에서 시약 희석 플레이트(96 웰 둥근 바닥 플레이트; BD, Franklin Lakes, NJ)에 수동으로 추가하였다. 하이브리도마 상청액을 수동으로 수확하고 시약 희석 플레이트의 웰에 Biomek FX 시스템을 사용하여 추가하였다. 상청액 및 독소 혼합물을 37℃에서 1 시간 동안 인큐베이션하고 Biomek FX 시스템을 사용하여 세포를 함유하고 있는 분석 플레이트에 추가하였다. 37℃에서 72시간 동안 인큐베이션한 후, 20 켈/웰 CellTiter-Blue(Promega, Madison, WI)를 각 웰에 추가하였다. 플레이트를 4 시간 더 인큐베이션한 후 SpectraMax M5 플레이트 리더(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로, 여기 파장 560 nm 및 방출 파장 590 nm에서 판독하였다. 독소 처리 및 미처리 배양액에서의 세포 생존을 비교하였다. 세포 생존 퍼센트를 농도에 따라 플롯하였다.

[0198] **D. 본 발명의 쥐과 동물 mAb 제조**

[0199] 생체 내 및 생체 외 제조 방법을 사용하여 본 발명의 분리 및/또는 정제 mAb를 수득하였다. 쥐과 동물 mAb의 생체 내 제조를 위해, 적합한 하이브리도마 세포주를 프리스턴-프라이드 BALB/c 마우스의 복강에 주사하여 복수액을 얻었다. mAb를 암모늄 설페이트로 침전시키고 단백질 A 크로마토그래피를 실시하여 >95% 균질성으로 정제하였다. 정제 항체는 포스페이트-완충 식염수(PBS) 내에 재현탁하였다.

[0200] 소량(< 100 mg) 생체 외 제조를 위해, 배양액에서 성장된 하이브리도마 상청액으로부터 쥐과 동물 mAb를 정제하였다. 하이브리도마는 Hybridoma-SFM(Invitrogen) 및 10% FBS에서 배양하였다. 세포주는 T-150 플라스크에서 주에 3번 패시징 및 익스팬딩하여 세포 농도가 2×10^6 세포/ml가 초과되지 않도록 하였다. PA-39(IgG1, κ), PA-41(IgG1, κ) 및 PA-50(IgG1, κ)를 함유하는 상청액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리하고 여과하여 청정화하였다. 청정화된 물질을 최종 농도의 러닝 완충액(60 mM 글리신/3 M NaCl, pH 8.5)로 희석하고 러닝 완충액으로 평형화한 단백질 A 칼럼내에 로딩하였다. 칼럼을 세척한 후, PA-39 또는 PA-41 mAb를 0.1 소듐 아세테이트(pH 5.5)로 용출하고, pH 7.0로 중화하였다. PA-38(IgG2a, κ)를 함유하는 상청액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리하고 여과하여 청정화하였다. 청정화된 물질을 최종 농도 25 mM 소듐 포스페이트 완충액/100 mM NaCl, pH 7.0로 맞추고, 50 mM 소듐 포스페이트 완충액/0.5 M NaCl로 평형화한 단백질 A 칼럼내에 로딩하였다. 칼럼을 세척하고, PA-38 mAb를 0.1 소듐 아세테이트(pH 3.0)로 용출하고, 용출된 항체를 pH 7.0로 중화하였다.

[0201] 대량의(> 100 mg) mAb를 생체 외 제조하기 위해, 하이브리도마를 5% Ultra Low IgG FBS를 함유하는 초기 밀도 2×10^5 세포/ml의 하이브리도마-SFM와 함께 WAVE 바이오리액터(GE Healthcare, Piscataway, NJ)내로 접종하였다. 매일 세포를 계수하고 세포 생존을 모니터하였다. 약 6 내지 7일만에 항체 생성이 고원기로 되었으며(plateaued), 배양이 종료되었다. 배양액을 청정화하고 접선유속여과(tangential flow filtration)로 10-20배 농축하였다. 항체를 60 mM 글리신 3 M NaCl(pH 8.5)로 평형화한 단백질 A 칼럼상에 로딩하였다. 칼럼을 동일한 완충액으로 세척하고 항체를 50 mM 아세테이트(pH 3.5)로 용출하였다. 모은 항체를 1M 트리스로 pH 7.4로 중화하고, 10mg/mL로 농축하고, PBS내로 다이어필터(diafilter)하였다. 정제된 mAb는 멸균여과하고 -80℃에서 보관하였다.

[0202] **실시예 2**

[0203] **본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및/또는 독소 B mAb의 독소 A 및/또는 독소 B에 대한 특이성 및 친화성**

[0204] **A. 독소 A 및/또는 독소 B에 대한 mAb 특이성 결정을 위한 ELISA**

[0205] ELISA 플레이트(BD Biosciences)를 50 ng/웰의 독소 A(List Laboratories) 또는 25ng/웰의 독소 B(List Laboratories)로 4℃에서 밤새 코팅하였다. PBS-(칼슘 또는 마그네슘이 없는 PBS, 0.05% Tween 20)로 플레이트를 세척한후, 200 탕의 차단 완충액(칼슘 또는 마그네슘이 없는 PBS, 0.1 % Tween 20, 2.5% 무지방 우유)으로 1 시간 동안 37℃에서 웰을 차단하였다. 이런 세척 단계를 반복하고 하이브리도마 상청액 또는 정제 mAb를 37℃

에서 1 시간 동안 추가하였다. 플레이트를 세척하고 1 시간 동안 37℃에서 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-콘쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG-Fc(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)와 함께 인큐베이션하였다. 플레이트를 ABTS 퍼옥시다제 기질 시스템(KPL, Gaithersburg, MD), ABTS 퍼옥시다제 정지 용액(KPL)으로 전개하고, SpectraMax 플레이트 리더(Molecular Devices)로 405 nm에서 판독하였다.

[0206] 적정 데이터는 **도 1a 내지 1c**에 나타내었다. **도 1a**는 PA-38가 독소 A에 결합하고 독소 B에는 결합하지 않는 것을 보여준다. **도 1b**는 PA-39가 독소 A 및 독소 B 모두에 결합할 수 있음을 보여준다. **도 1c**는 PA-41가 독소 B에는 결합하나 독소 A에는 결합하지 않음을 보여준다.

[0207] B. 비아코어에서 mAb의 독소 A 및 B에 대한 반응성

[0208] 비아코어 3000 기기(GE Healthcare)를 사용하여 본 발명의 mAb의 독소 A 및/또는 독소 B에 대한 결합 특이성을 결정하였다. mAb는 아민 커플링을 위해 제조자 지시에 따라 CM5 센서 칩(GE Healthcare)에 약 10,000 공명 유닛(RU)에서 고정되었다. 비관련 특이성의 아이소타입-매치된 항체의 참조 표면(Southern Biotech)이 대조군으로 사용되었다. 결합 실험은 25℃에서 HEPES-기초 HPS-EP 완충액(GE Healthcare)에서 수행하였다. 정제된 독소 A 또는 독소 B(30 nM; List Biological Laboratories)를 대조 및 시험 유동 세포 상으로 5 쿨/분의 속도로 통과시켰다. 이후 지시된 곳에, 추가 mAb(100 nM)를 5 μ L/분의 속도로 유동 세포상에 통과시켜 다가(multivalent) 또는 경쟁적 결합을 조사하였다.

[0209] **도 2a 내지 2d**에 도시된 것처럼, mAb PA-38(**도 2a**) 및 mAb PA-50(**도 2c**)는 독소 A에 특이적으로 결합하고; mAb PA-41(**도 2d**)는 독소 B에 특이적으로 결합하며; mAb PA-39(**도 2b**)는 독소 A에 우선적으로 결합하나 독소 B에도 특이적으로 결합하였다. 이러한 데이터의 결과는 ELISA 데이터와 일치하였으며(**도 1a 내지 1c**), 본 발명의 mAb의 독소 A 및/또는 독소 B에 대한 결합 특이성을 입증하였다.

[0210] C. 결합 친화성

[0211] 본 발명의 mAb의 각 독소에 대한 결합 친화성을 결정하는데에도 비아코어 분석을 사용하였다. 비아코어 마우스 항체 포획 키트와 함께 준비된 CM5 센서 칩을 사용하여 mAb를 포획하였다. 이후 독소를 다양한 농도(0.4~100 nM, 두배 증강)로 유동 세포에 통과시켰다. 모든 독소 농도가 두 번(duplicate)로 시험되었고 칩 표면은 키트에 특정된 조건을 사용하여 매 시행마다 재생되었다. 독소에 대한 mAb의 K_D 를 산출하는 Bia 평가 소프트웨어 1:1(Langmuir) 결합 모델을 사용하여 RU 변화를 분석하고 기록하였다. 결합 및 해리 데이터와 피팅을 **도 3a 내지 3e**에 나타내었다.

[0212] 독소 A에 대한 mAb의 K_D 는 비아코어 분석에 의해 PA-38은 1.0 nM, PA-39는 0.16 nM, PA-50은 0.16 nM으로 결정되었다. 독소 B에 대한 mAb의 K_D 는 PA-39는 2.4 nM, PA-41은 0.59 nM로 결정되었다. 이 결과는 본 발명의 mAb가 독소 A 및/또는 독소 B에 나노몰 및 나노이하몰의 친화성으로 결합함을 보여준다.

[0213] 실시예 3

[0214] 생체 외 세포-기초 중화 분석

[0215] CHO-K1 세포 또는 T-84 세포를 사용한 세포-기초 세포독성 분석을 사용하여 항-독소 A 및 항-독소 B mAb의 중화 활성을 평가하였다.

[0216] A. CHO-K1 세포상에서의 독소 A 세포독성 효과의 중화

[0217] CHO-K1 세포는 분석 플레이트(96 웰, 백색 불투명 벽, 투명 평면 바닥 플레이트(Perkin Elmer)) 내에 시딩하였다(50 μ L내 2,000 세포/웰). 세포들은 4 시간 동안 부착되도록 한 후 처리하였다. 동일 부피(35 μ L)의 2 쿨/mL 독소 A(List Biological Laboratories) 및 단계적으로 희석한 mAb를 시약 희석 플레이트(96-웰 둥근 바닥 플레이트(Falcon)) 내에서 1 시간 동안 37℃에서 혼합한 후, 혼합물 50 μ L을 플레이트의 각 웰에 추가하였다. 72시간 동안 인큐베이션한 후 20 쿨/웰 CellTiter-Blue(Promega)를 각 웰내에 추가하였다. 플레이트를 4 시간 동안 더 인큐베이션한 후, SpectraMax M5 플레이트 리더(Molecular Devices)로 여기 파장 560 nm 및 방출 파장 590 nm에서 판독하였다. 독소 처리 및 미처리 배양액에서의 세포 생존을 비교하였다. 세포 생존 퍼센트를 mAb 농도에 대해 플롯하였다. 저해 데이터를 GraphPad 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀, 에스자형 용량-반응 곡선에 피팅하여, 세포독성의 50% 중화에 요구되는 mAb 농도(EC_{50})를 산출하였다. **도 4**에서 도시된 것처럼, mAb PA-39는 CHO-K1 세포에서 93 pM의 EC_{50} 로 독소 A 활성을 완전히 중화하였다.

[0218] **B. CHO-K1 세포에서의 독소 B 세포독성 효과의 중화**

[0219] CHO-K1 세포독성 분석을 사용하여 항-독소 B 특이성 mAb의 중화 활성을 평가하였다. 항-독소 A mAb의 평가와 유사하게, 독소 B(8 pg/mL, TechLab)를 단계적으로 희석한 mAb와 함께 1 시간 동안 37°C에서 인큐베이션한 후, 96-웰 플레이트내 CHO-K1(2,000 세포/웰)에 추가하였다. 72시간후, 20클/웰 CellTiter-Blue(Promega)를 각 웰에 추가하였다. 플레이트를 4 시간 더 인큐베이션한 후, SpectraMax M5 플레이트 리더(Molecular Devices)로 여기 파장 560 nm 및 방출 파장 590 nm에서 판독하였다. 세포 생존능(cell viability)은 CellTiter-Blue를 사용하여 결정하였으며; 처리 및 미처리 배양액간 세포 생존을 비교하였다. 저해 데이터를 GraphPad 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀, 에스자형 용량-반응 곡선에 피팅하였으며, 세포독성의 50% 중화에 요구되는 mAb 농도(EC₅₀)를 산출하였다. 도 5에서 도시된 것처럼, PA-41은 CHO-K1 세포에서 독소 B 세포독성 중화에 있어 매우 높은 활성(9.2 pM의 EC₅₀)을 나타내었다.

[0220] mAb PA-39는 ELISA 및 비아코어 분석에서 독소 B에 대해 결합하는 것이 확인되었으나, 이 mAb는 CHO-K1 및 다른 세포-기초 분석에서 독소 B에 대한 생체 외 활성은 갖지 않았다. 독소 A 및 독소 B 둘다에 결합하나 생체 외 세포-기초 분석에서 독소 A 또는 독소 B를 중화하는 기능적 활성이 없는 항체들이 보고되었다(46, 92 및 93). 본 발명은 독소 A 및 독소 B 둘다에 결합하며 또한 클로스트리듐 디피실리 독소 즉 독소 A의 세포독성을 중화하는 이중 능력을 갖는 새로운 mAb을 포함한다.

[0221] **C. T-84 세포에서의 독소 A 세포독성 효과의 중화**

[0222] T-84 세포독성 분석을 사용하여 항-독소 A mAb의 중화 활성을 평가하였다. T-84 세포를 분석 플레이트(96 웰, 백색 불투명 벽, 투명 평면 바닥 플레이트(Perkin Elmer)) 내에 시딩하였다(50 µL내 15,000 세포 / 웰). 세포들은 4 시간 동안 부착되도록 한 후 처리하였다. 동일 부피(35 클)의 240 ng/mL 독소 A(Techlab) 및 단계적으로 희석한 mAb를 시약 희석 플레이트(96-웰 등근 바닥 플레이트(Falcon)) 내에서 1 시간 동안 37°C에서 혼합한 후, 혼합물 50 µl을 분석 플레이트의 각 웰에 추가하였다. 72 시간 동안 인큐베이션한 후 20 클/웰 CellTiter-Blue(Promega)를 각 웰에 추가하였다. 플레이트를 4 시간 더 인큐베이션한 후, SpectraMax M5 플레이트 리더(Molecular Devices)로 여기 파장 560 nm 및 방출 파장 590 nm에서 판독하였다. 독소 처리 및 미처리 배양액에서의 세포 생존을 비교하였다. 저해 데이터를 GraphPad 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀, 에스자형 용량-반응 곡선에 피팅하고, 세포독성의 50% 중화에 요구되는 mAb 농도(EC₅₀)를 산출하였다. 도 6에서 도시된 것처럼, mAb PA-38 및 PA-50는 T-84 세포에서 각각 175pM 및 146pM의 EC₅₀로 독소 A 활성을 완전히 중화하였다. T-84 세포 분석에서, mAb PA-39는 독소 A에 대해 최소 활성을 나타내었으며, PA-41은 활성을 나타내지 않았다.

[0223] **D. 토끼 적혈구(RBC) 응집**

[0224] 적혈구 응집(hemagglutination) 분석을 사용하여, 본 발명의 mAb의 독소 A가 세포 수용체에 결합하는 것을 차단하는 능력을 평가하였다. 본 분석을 위해, 동일 부피(30 µL/웰)의 독소 A(8 µg/mL; TechLab) 및 단계적으로 희석한 mAb를 시약 희석 플레이트(96-웰 등근 바닥 플레이트(Falcon))에서 4°C에서 1 시간 동안 혼합하였다. 토끼 적혈구(RBC)(Colorado Serum Co., Denver, CO)를 PBS로 3회 세척하고 PBS에 재현탁하였다. 60 µL의 1% RBC 현탁액을 독소 A-mAb 혼합물을 포함하는 96-웰 플레이트의 웰에 추가한후, 플레이트를 4°C에서 4 시간 인큐베이션하였다. 자유형 독소 A는 RBC의 적혈구 응집을 야기한다. 따라서, 독소 A에 결합하는 항-독소 A mAb의 추가는 적혈구 응집을 방지하는 것으로 예상된다. 적혈구 응집 정도는 ImageQuant 400 기기를 이용하여 결정하였고; 완전 적혈구 응집은 현탁액내 RBC에 비교시 더 강한 신호를 나타내었다. EC₅₀ 값은 GraphPad 프리즘 비-선형 회귀, 에스자형 용량-반응 곡선 피팅을 이용하여 저해 데이터로부터 산출하였다. 도 7에 도시된 것처럼, mAb PA-38(검은 사각형) 및 mAb PA-50(검은 삼각형)은 각각 30 nM 및 1.8 nM의 EC₅₀로 RBC에 대한 독소 A 활성을 완전히 중화하였다. PA-38 및 PA-50는 독소 A가 그 수용체에 결합하는 것을 차단함으로써 독소 A를 중화하는 것으로 보인다. mAb PA-39 및 PA-41은 분석에서 불활성인 것으로 밝혀졌다.

[0225] **E. Caco-2 단층 분석**

[0226] Caco-2 세포를 96-웰 Multiscreen Caco-2 플레이트(Millipore Billerica, MA)의 상부 챔버내 시딩하고(75 µL 내 25,000 세포 / 웰), 배지 250 µL를 하부 챔버에 추가하였다. 세포들은 3~4일마다 정기적으로 배지를 갈아주면서 10일간 성장시켰다. 10~14일간 인큐베이션한 후, 단단한 단층이 형성되는 것을 상피 볼트옴미터(모델: EVOMX, World Precision Instruments, Sarasota, FL)로 경상피 전기 저항(transsepithelial electrical resistance; TEER)을 측정함으로써 확인하였다. 단층의 통합성이 수립되고 확인된 후, 동일 부피(60 µl)의 독

소 A(50 ng/ml) 및 단계적으로 희석한 mAb를 37℃에서 1 시간 동안 혼합한후, 분석 플레이트의 상부 챔버에 가하였다. 플레이트를 18-24 시간 동안 인큐베이션한 후 볼트옴미터로 TEER 값을 측정하였다. 독소 처리 및 미처리 웰에서 단층 통합성을 비교하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, 저해 데이터를 GraphPad 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀, 에스자형 용량-반응 곡선에 피팅하여 50% 중화에 요구되는 mAb 농도(EC₅₀)를 결정하였다. mAb PA-38 및 PA-50은 각각 485 pM 및 196 pM의 EC₅₀로 독소 A에 의한 Caco-2 단층의 붕괴를 중화시켰다. 다른 mAb는 이 분석에서 불활성인 것으로 밝혀졌다.

[0227] 이론에 얽매이지는 바라지 않으며, 이러한 세포-기초, 생체 외 결과로부터 PA-38 및 PA-50이 동일 클래스의 항-독소 A mAb인 반면, PA-39는 다른 클래스의 항-독소 A mAb으로 보인다. mAb PA-38 및 PA-50은 수용체 결합에 중요한 독소 A 에피토프에 결합하는 것으로 보이고; mAb PA-39는 생체 외에서 독소 A의 세포독성 효과를 더욱 직접 차단하는 식으로 독소에 결합하는 것으로 보인다.

[0228] 실시예 4

[0229] 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B mAb의 마우스에서의 생체 내 효능 평가

[0230] 생체 내 마우스 모델을 사용하여 본원에 기술된 mAb들이 동물에서 순환 클로스트리듐 디피실리 독소를 중화하는 능력을 측정하였다. 단독 또는 조합으로 투여된 mAb PA-38, PA-39, PA-41, 또는 PA-50의 생체 내 중화 활성은 시험 동물에서 조합되고 조직적인 클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B(Techlab)의 효과에 대항하여 시험되었다.

[0231] 그룹당 암컷 스위스 웹스터 마우스 4-6 마리(연구 시작시 약 6-8 주령; Charles River Laboratories)를 실험에 사용하였다. 마우스들은 최소한 4일간 시설에 길들이고, 동물들의 건강을 사용전에 확인하였다. 동물 실험은 IACUC 승인 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0232] 초기 실험은 마우스에서의 독소 A 및 독소 B 독성을 확인하기 위해 수행되었다. 동물에 0, 20, 100, 500, 2500 ng 독소/동물 용량으로 복강(i.p.)투여하고, 후속하는 항체 중화 실험에 사용하기 위한 치사량을 선택하였다. PBS를 투여한 대조 마우스는 어떤 영향도 없었다. 100 ng 용량의 독소 A(TechLab)가 중화 실험을 위해 선택되었는데, 이 용량이 주사후 24 시간 이내에 100%의 마우스를 치사시킬 수 있는 최저량이었기 때문이다. 유사하게 100 ng 용량의 독소 B(TechLab)가 중화실험에 선택되었는데, 이 용량이 주사후 24 시간 이내에 100%의 마우스를 치사시킬 수 있는 최저량이었기 때문이다.

[0233] 항-독소 mAb의 중화활성을 평가하기 위해, 각 mAb를 다른 용량 수준으로 0일에 1회 마우스(그룹 당 5 마리)에 복강 투여하고, 1일째에, 100 ng/200 ml의 독소 A 또는 독소 B를 복강투여하였다. 독소 투여후, 사흘간은 매일 그 후는 21일까지 매주 동물들을 관찰하였다. 동물 생존이 이 연구의 첫번째 종말점이었다.

[0234] 중화실험을 위해, 모든 용량의 항체를 칼슘 또는 마그네슘이 없는 PBS(PBS-, Invitrogen, Carlsbad, CA) 내에 포물레이션하였다. mAb PA-38, PA-39, PA-41 또는 PA-50을 다른 용량 수준으로 0일에 1회 마우스에 복강주사(200 ml/용량/동물) 하고, 1일에 독소를 주사하였다(항체 주사 부위와 다른 부위에 복강주사). 독소 투여후, 처음 3-4일간은 매일, 이후는 21일까지 매주 두번 동물의 건강 상태를 모니터하였다. 생존여부와 함께 동물들의 케이지 측면 관찰(예, 구부린 자세, 털의 엉켜붙은 상태, 활성도)도 기록하였다.

[0235] 상이한 용량 수준의 PA-38(동물당 0.2 킬 내지 250 킬) 및 PA-50(동물당 0.2 킬 내지 100 킬)가 평가되었다. 이 모델에서, PA-38 및 PA-50은 도 9a 및 9b에 나타난 바와 같이, 동물당 2 µg mAb와 같은 낮은 용량 수준에서 100 ng 용량의 독소 A를 중화시키고 동물을 100% 생존시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 대조적으로, 비교 인간 항-독소 A 단일클론 항체(WO/2006/121422 및 US2005/0287150; 여기에서 CDA-1 비교 mAb로 지칭)은 본 발명의 mAb와 달리 동물당 5 킬에서 동물들을 독소-관련 치사로부터 보호하지 못했다(도 9c). PA-41은 0.5 킬 내지 250 킬의 용량범위에서 평가되었으며, 도 10에 나타난 바와 같이, 동물당 5 µg의 mAb 단일 용량에서 100 ng 용량의 독소 B 독성을 동물내에서 완전히 중화시켰다. MAb PA-39(동물당 100 µg)는 독소 A 또는 B에 대한 마우스의 독소-관련 치사를 지연시키는 것이 관찰되지 않았다.

[0236] 독소 A에 대한 개별 항체(PA-38, PA-50) 또는 독소 B에 대한 개별 항체(PA-41)의 중화활성이 생체 내에서 명백히 입증된후, 동일한 생체 내 마우스 모델에서 독소들의 조합 치사량(100 ng의 독소 A 및 100 ng의 독소 B)에 대한 mAb 조합(PA-38 + PA-41)의 효과를 각 mAb 5 및 50 µg 용량수준에서 시험하였다. 추가로 개별 단일클론 항체를 대조로 포함하였다. 도 11에 도시된 것처럼, PA-38 및 PA-41 mAb 조합은 50 µg/동물(5 마리중 4 마리 생존) 및 5 µg/ 동물(5마리중 한 마리 생존) 모두에서 독소 조합으로부터 방어한 반면, 각 mAb 단독은 모든 동

물들이 독소 투여후 24 시간내 치사하였다.

[0237] 실시예 5

[0238] 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B mAb의 골든 시리안 햄스터에서 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD) 모델 내 평가

[0239] 햄스터내 CDAD 모델은 인간에서의 CDAD 질병의 핵심적 측면을 재현한다. 항생제 투여시, 정상 결장 세균총이 근절되며 햄스터는 쉽게 클로스트리듐 디피실리에 의한 감염에 취약해진다. 감염은 심각한 설사, 위막성 결장염 및 치사를 결과한다. 햄스터 CDAD 모델을 사용하여 클로스트리듐 디피실리 생균으로 인한 동물의 질병 및 치사를 방지하는 본 발명 mAb의 잠재적 효능을 평가하였다. 이들 실험은 모두 IACUC 승인 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0240] A. 약물동력학 분석

[0241] 클로스트리듐 디피실리 생균에 감염된 햄스터를 이용한 햄스터 모델에서의 효능 연구를 수행하기 전에, 정상 비감염 햄스터에서의 약물동력학적 연구를 수행하였다. 골든 시리안 햄스터(Harlan)에 정제 mAb PA-38 또는 mAb PA-41을 0.2 mg/동물 또는 1 mg/동물로 복강주사하였다. 혈액 샘플을 후안와 또는 심장 천자(종료) 출혈 테크닉으로 0.125, 0.25, 1, 2, 4, 7, 10, 14 및 21 일에 수집하였다. 혈액 샘플은 8000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 수득하였다.

[0242] 혈청내 mAb 농도를 ELISA로 측정하였다. 96웰 ELISA 플레이트(BD Biosciences)를 250 ng/웰의 독소 A(Techlab) 또는 독소 B(Techlab)로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 3회 PBS/0.05% Tween-20® PBS-T로 세척하고 200 탸의 차단 완충액(칼슘 또는 마그네슘이 없는 PBS, 0.1% Tween 20®, 2.5% 무지방 우유)로 1 시간 동안 실온에서 차단하였다. 항체 참조 표준(정제 mAb PA-38 또는 mAb PA-41)을 1% 합동 나이트(pooled naive) 햄스터 혈청에 희석하여 0.3~1000 ng/ml 범위의 표준 곡선을 생성하였다. 희석된 시험 샘플 및 표준을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0243] 전술한 바와 같이 플레이트를 세척하고 1 시간 동안 실온에서 Fcγ 특이적 HRP-콘주게이트된 염소 항-마우스 IgG(Jackson ImmunoResearch)와 함께 인큐베이션하였다. 플레이트를 ABTS 퍼옥시다제 기질 시스템(KPL)으로 전개하고, ABTS 퍼옥시다제 정지 용액(KPL)으로 정지시키고, SpectraMax 플레이트 리더기(Molecular Devices)로 405 nm에서 판독하였다. 상이한 시점에서 각 햄스터내 mAb 농도를 표준 곡선을 사용하여 산출하였다. 약 10%의 샘플은 항체 역가를 나타내지 않았는데, 아마도 잘못 주사하거나 또는 흡수가 되지 않은 것에 기인되는 것으로 보이며; 이들 샘플은 PK 파라미터 산출에 포함하지 않았다. 비구획 약물동력학 분석을 WinNonLin, Version 4.0(Pharsight Corp., Mountain View, CA)을 사용하여 수행하고 그 데이터를 표 1 및 도 12a 및 12b에 나타내었다. 도시된 것처럼, Cmax 및 곡선하면적(AUC)은 용량 의존적이었다. 각 항체들은 6일을 초과하는 말단 반감기를 나타내었으며, 이는 하기 기술되는 효능 연구에서 항체 보유를 보증한다.

표 1

햄스터내 mAb의 PK 파라미터

mAb	AUC _{INF_obs} (일*µg/ml)	Tmax (일)	Cmax (µg/ml)	반감기 _λ (일)	Rsq
PA-38 2mg/kg	303.8	2.00	25.2	7.4	0.999
PA-38 10mg/kg	1522.6	0.25	128.0	10.6	0.988
PA-41 2mg/kg	202.2	0.25	20.5	6.2	1.000
PA-41 10mg/kg	696.7	1.00	78.1	6.8	1.000

[0244]

[0245] B. 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B mAb 조합의 골든 시리안 햄스터에서 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD) 모델 내 평가

[0246] 햄스터내 클로스트리듐 디피실리 관련 설사의 생체 내 모델에서 감염된 동물의 생존에 미치는 본 발명의 귀과

동물 항-독소 A 및 항-독소 B mAb의 능력을 평가하는 효능 시험을 수행하였다. 골든 시리안 수컷 햄스터 (~90g)(Cr1:LVG(SYR))(Charles River Laboratories, Inc., Kingston, NY)를 클린다마이신(Sigma, St. Louis, PBS내 5 mg/mL로 포물레이션함) 단일 피하 용량 50mg/kg으로 전처리하여 정상 결장 세균총을 파괴하였다. 다음 날, 관련 시험 그룹내 햄스터에 경구 용량(0.5 mL내 1×10^7 CFU)의 클로스트리듐 디피실리(ATCC 43596 균주) 현탁액을 투여하였다. 균주 43596는 이전부터 햄스터 모델에서 중화 항체를 평가하는데 사용되어 왔다. 동물들의 체중을 매주 측정하고 매일 건강상태 및 생존여부를 모니터하였다.

[0247]

시험 항체는 본 발명의 쥐과 동물 mAb의 조합 즉 mAb PA-38 및 PA-41 조합 또는 mAb PA-39 및 PA-41 조합을 포함하였다. 염소 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B 다클론 항체(Techlab)는 양성 대조로 포함되었다. mAb 및 대조 시약은 표 2에 기재된 대로 투여되었다.

표 2

햄스터 효능 연구에서의 처리 그룹.

그룹	처리	용량(mg/kg)	경로	계획	햄스터수
1	비감염	NA*	NA	NA	4
2	비감염+클린다마이신	NA	NA	NA	4
3	감염된 대조	NA	NA	NA	8
4	반코마이신	20	PO	BID X 5 일	8
5	염소 다클론 Ab	1 mL/햄스터	IP	Q2d X 4	8
6	PA-38 + PA-41	50, 50	IP	Q2d X 4	8
7	PA-39 + PA-41	50, 40	IP	Q2d X 4	8

*적용불가

[0248]

[0249]

제1 그룹의 햄스터들은 연구 내내 아무런 처리도 하지 않았다. 제2~7 그룹의 햄스터는 클린다마이신 포스포이트를 단일 피하 용량 50 mg/kg로 전처리하였다(-1일). 제5~ 그룹의 햄스터는 다클론 염소 항체(그룹 5) 또는 mAb 조합(그룹 6 및 7)을 표 2에 쓰여진 대로 클린다마이신 처리 직후 i.p. 투여하였다. 24 시간 후, 제3~7 그룹의 각 햄스터에 0.5 mL의 클로스트리듐 디피실리 ATCC 43596($10^6 \sim 10^7$ CFU/mL) 현탁액을 경구 위관영양(oral gavage)으로 접종하였다(0일). 이들 그룹에 -1일에 항체를 초기 투여한 후, 후속하는 3번의 처리는 격일마다 1,3 및 5일에 하루 한번 투여하였다. 제4 그룹의 동물에는 반코마이신(20 mg/kg BID)을 경구 위관영양으로 1~5일에 하루 두번, 약 6시간 간격으로 투여하였다. 반코마이신 투여(그룹 4 동물)는 동물에 클로스트리듐 디피실리를 접종하고 약 20-24 시간후에 시작하였다.

[0250]

mAb-처리 및 대조 그룹의 생존 결과를 도 13에 나타내었다. 모든 그룹에 대한 햄스터 치사율을 요약하여 표 3에 나타내었다. 어떠한 처리도 없이 클로스트리듐 디피실리에 감염된 모든 햄스터(감염된 대조, 그룹 3)은 연구 2일 또는 3일에 치사하였다. 반코마이신-처리 그룹(그룹 4)에서는, 8마리중 7마리의 햄스터가 15일과 19일 사이에 치사하였다. 이 모델에서 전형적으로 관찰되는 바와 같이, 반코마이신-처리 햄스터의 대부분(88%)이 치료 중단 2주 내에 클로스트리듐 디피실리 감염이 재발되고 치사하였다. 대조적으로, mAb PA-39 + PA-41(그룹 7) 조합으로 처리한 모든 햄스터들과, mAb PA-38 + PA-41 조합(그룹 6)으로 처리한 8마리 중 7마리의 햄스터가 연구 종료시까지 생존하였다(감염후 37 일). 또한 연구 종료시 염소 다클론 항체로 처리한 그룹(그룹 5) 내 모든 동물도 생존하였다. 모든 생존 햄스터는 사후 부검시 정상 위장관을 가지고 있었다(도 15a, 15c 및 15d 참조).

표 3

각 그룹내 햄스터 치사율 및 치사일

그룹	처리	동물 수	치사율 %	연구일							
				2	3	5	7	15	18	19	37
1	비감염	4	0								
2	비감염+클린다마이신	4	50			1	1				
3	감염된 대조	8	100	5	3						
4	반코마이신	8	88					1	5	1	
5	염소다클론 Ab	8	0								
6	PA-38 + PA-41	8	13		1						
7	PA-39 + PA-41	8	0								

[0251]

[0252]

이들 결과는 mAb PA-39 및 PA-41 조합 및 mAb PA-38 및 PA-41 조합이 효과적으로 그리고 지속적으로 햄스터들을 심각한 질병으로부터 질병 초기 및 후속 재발로부터 보호함을 보여준다. mAb 처리로 인한 지속 혜택(37일)은 햄스터모델에서 클린다마이신 처리에 후속하는 클로스트리듐 디피실리 감염 수렴을 위한 윈도우(2주)를 훨씬 초과한다.

[0253]

다클론- 및 mAb-처리 그룹 및 대조 그룹 동물들의 체중을 도 14에 나타내었다. 비감염 대조 그룹(그룹 1) 내 햄스터들은 연구 전반에 걸쳐 체중이 꾸준히 13~29 g 정도 증가되었다. 모든 감염된 대조 동물들은 접종후 첫번째 체중 측정전에 이미 치사하였다. 반코마이신, 염소 다클론 항체, PA-38 + PA-41 mAb 조합 및 PA-39 + PA-41 mAb 조합으로 처리된 동물들의 평균 체중은 감염후 첫주간 상당히 감소하였다. 그 후 mAb-처리된 그룹과 다클론 항체-처리된 그룹의 평균 체중은 꾸준히 증가하여 연구가 끝날 즈음에는 비감염 대조와 거의 유사하여, 명백한 독성이 없음을 보여주었다.

[0254]

본 햄스터 연구 전반에 걸쳐, 본 발명의 mAb 조합은 클로스트리듐 디피실리 감염의 관련되고 엄격한 햄스터 모델에서 햄스터들을 지속적이고 효과적으로 치사로부터 보호하는 것이 확인되었다. 이러한 발견은 mAb 조합이 mAb-처리된 동물에서 비감염된 동물에 버금가는 정상 장세균총의 성장 및 재균집을 허용하기에 충분한 시간 동안 클로스트리듐 디피실리 감염으로부터 동물을 보호하는 기전을 뒷받침한다(도 15a-d). 따라서, 본 발명의 mAb는 감염 동물의 치료적 보호와 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 효과적 해결, 위장관 건강의 회복 및 생존을 제공하였다.

[0255]

C. 본 발명의 개별적 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및/또는 독소 B mAb의 골든 시리안 햄스터에서 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD) 모델에서의 평가

[0256]

본 발명의 개별적인 쥐과 동물 mAb들을 감염 동물에 투여하였을 때의 효능을 조합으로 투여된 것과 비교하여 평가하는 시험을 햄스터에 부가적으로 실시하여 연구하였다. 본 연구의 처리 그룹들을 표 4에 나타내었다.

표 4

mAb 조합과 비교한 개별 mAb 의 햄스터 효능연구

그룹	처리	용량 (mg/kg)	경로	계획	햄스터수
1	감염된 대조	NA ¹	NA	NA	7
2	반코마이신	20	PO	BID X 5 일	7
3	PA-39 + PA-41	50, 50	IP	Q2d X 4	7
4	PA-41	50	IP	Q2d X 4	7
5	PA-38	50	IP	Q2d X 4	7
6	PA-39	50	IP	Q2d X 4	7
7	PA-50	50	IP	Q2d X 4	7

¹ 적용불가

[0257]

[0258]

본 연구에서, 그룹 1~7의 햄스터들은 클린다마이신 포스포이트를 단회 피하 용량 50 mg/kg로 전처리 하였다(-1일). 그룹 3~7의 동물들은 클린다마이신 처리직후 mAb를 복강 투여하였다. 24 시간 후, 그룹 1~7의 각 햄스터는 상기 섹션 B에 기술된 대로 0.5 mL의 클로스트리듐 디피실리 현탁액을 경구 위관영양으로 접종하였다(0일). 시험 mAb는 그룹 3~7의 동물에 1, 3 및 5일에 단일 용량으로 투여하였다. 반코마이신은 ~5일에 하루 두번 동물에 투여하였다(그룹 2). 하루 2번 햄스터들의 생존능을 관찰하였다. 체중은 매주 한번 기록하였다. 연구중 치사하거나 안락사된 동물들은 부검을 실시하였다. 연구 종료시(접종후 40일), 모든 남아있는 햄스터들에 대해 종료 부검을 수행하였다.

[0259]

mAb-처리 및 대조 동물 그룹의 생존을 도 16a에 나타내고, 모든 그룹의 햄스터들의 치사일을 표 5에 요약하였다.

표 5

치사율 및 치사일

그룹	처리	햄스터 수	치사율%	연구일											
				2	3	4	8	11	12	14	15	18	19	40	
1	감염된 대조	7	100	7											
2	반코마이신	7	100						1	2	1	1	2		
3	PA-39 + PA-41	7	14						1						
4	PA-41	7	100	6	1										
5	PA-38	7	100	5	2										
6	PA-39	7	100	1	1	1	2	1	1						
7	PA-50	7	100	3	4										

[0260]

[0261]

감염된 대조 그룹(그룹 1)에서는 모든 7마리의 햄스터들이 2일째에 치사하였다. 이 햄스터 모두는 사후 조사시 위장관 염증을 나타내었다. 반코마이신-처리 그룹(그룹 2)에서는 모든 7마리의 햄스터들이 연구 12일과 19일 사이에 치사하였다. 이 치사시간은 이 모델에서 반코마이신 처리에 대해 이전에 관찰된 시간과 유사하였다. 사후 검사결과 모든 햄스터에서 클로스트리듐 디피실리 감염의 지표인 위장관 염증이 있었다.

- [0262] PA-39+PA-41 mAb 조합 처리 그룹(그룹 3)은 본 연구에서 감염 햄스터들을 보호하는데 매우 효과적이었다. 그룹 3의 7마리중 6마리의 햄스터가 연구 종료까지 생존하였다. 한마리의 햄스터는 연구 12일에 치사하였다. 사후조사 결과 이 햄스터는 클로스트리듐 디피실리 감염의 전형인 위장관 염증이 있었다.
- [0263] 단일 항체 처리 그룹 중에서(그룹 4-7), mAb PA-39 단독(그룹 6)은 처리 동물에서 약간의 방어 활성을 나타내었다. 이 그룹 내 햄스터들은 2일 내지 12일에 치사하였다. 개별적인 mAb, PA-41(그룹 4), PA-38(그룹 5), 또는 PA-50(그룹 7)로 처리된 그룹에서, 햄스터들은 2 및 3일에 치사하였다. 종료 부검에서 이들 그룹내 모든 햄스터들에 클로스트리듐 디피실리 감염의 지표인 위장관 염증이 있었다. 대조적으로 생존한 모든 처리 햄스터들은 정상 위장관을 갖고 있었다.
- [0264] 이 연구 결과는 PA-39 + PA-41 mAb 조합 처리가 성공적으로 햄스터를 처리 종료후 1달 이상 동안 발병되는 것로부터 보호하는 것을 보여주며, 이는 PA-39 + PA-41 mAb 조합으로 처리된 8마리의 햄스터 중 8마리가 클로스트리듐 디피실리 감염에서 생존한 전술한 실시예 5B의 연구에서 얻은 결과와 동일하였다. 이 연구에서, mAb PA-39는 단독 mAb 처리로 클로스트리듐 디피실리 감염 햄스터를 클로스트리듐 디피실리 질병으로부터 보호하는데 약간의 활성을 나타내었다.
- [0265] **D. 종말 혈액에서의 항체 농도 결정 및 종말 햄스터 맹장 샘플에서 클로스트리듐 디피실리 존재 평가**
- [0266] 혈액은 연구중 빈사 동물로부터 수집하였다. 또한 연구 종료시 생존하는 모든 동물로부터 혈액을 수거하였다. 하기에 다르게 지시하지 않은 한, 혈액 샘플을 처리하여 혈청을 수집하였다. 처리된 샘플은 추가 분석을 위해 $<-70^{\circ}\text{C}$ 에서 동결시켰다.
- [0267] 전술한 생체 내 효능 햄스터 연구에 후속하여, 연구 동물에서 채취한 종말 혈액 내 mAb 존재를 검사하였다. 실시예 5B에 전술된 mAb 조합연구를 위해, 그룹 7 동물의 8 마리는 mAb PA-39(50 mg/kg) + mAb PA-41(40 mg/kg) 조합을 용량 투여(Q2d x 4) 받았으며, 연구 37일에 종말적으로 출혈시켰다. 이 종말 혈액에서 수집한 혈청에는 PA-39가 $3.3 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$ 의 수준으로, PA-41가 $2.4 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$ 의 수준으로 검출되었다. 실시예 5C에 기술된 개별적 mAb 연구를 위해, 그룹 3 동물중 6 마리는, mAb PA-39(50 mg/kg) + mAb PA-41(50 mg/kg) 조합을 용량 투여(Q2d x 4) 받았으며, 이는 연구 40일에 종말적으로 출혈시키고, 혈액 샘플을 처리하여 혈장을 수득하였다. 이 종말 혈액에서 수집된 혈장에서 PA-39는 $1.8 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$ 의 수준으로 PA-41은 $3.4 \pm 3.2 \mu\text{g/mL}$ 의 수준으로 검출되었다. 이 분석에서 항체의 검출 한계는 1.6 ng/mL 이었다. 따라서, 검출가능한 수준의 mAb가 몇 주의 시간에 걸쳐 동물에서 측정되었다. 이는 이들 mAb가 처리 요법 전반 및 마지막 용량의 mAb의 투여된 후까지 걸쳐 치료적 혜택을 제공하는 작용 방식을 뒷받침한다.
- [0268] 실시예 5C의 그룹 3의 종료 부검에서, 각 햄스터의 맹장을 노출하였으며, 이들은 모두 정상으로 보였다. 염증이 나 발적이 관찰되지 않았으며, 맹장의 내용물의 조도는 비교적 단단하였다. 각 맹장벽을 일회용 멸균 메스로 절단하였다. 각 햄스터마다 새로운 메스를 사용하여 교차 오염을 방지하였다. 소량의 대변을 맹장으로부터 멸균 면봉을 사용하여 제거하여 멸균 시험관에 넣었다. 10-궤 접종 루프를 사용하여 튜브에서 대변 샘플을 채취하고 클로스트리듐 디피실리 선택적인 말혈액배지와 함께 CCFA를 포함하는 아가 플레이트(Remel, Lot 735065)에 샘플을 도말하였다. 플레이트를 혐기성 박스에 넣고 48 시간 동안 37°C 에서 인큐베이션하였다. 콜로니 비교를 위해 원배양액에서의 클로스트리듐 디피실리 ATCC 43596을 하나의 플레이트에 도말하고 대변 도말을 함께 인큐베이션하였다. 모든 6마리의 햄스터에서 온 검체를 도말한 플레이트에서 클로스트리듐 디피실리 유사 콜로니가 관찰되었다. 이러한 실험 결과는 본 발명의 mAb를 처리된 생존 동물에도 여전히 클로스트리듐 디피실리가 있지만 그들의 정상 세균총이 재균락되어 정상 장 세균 평형을 회복하고, 이것이 전체적인 생존에 기여한 것을 나타낸다.
- [0269] **E. 본 발명의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및/또는 독소 B 인간화 mAb 및 비교 항-독소 A 및 항-독소 B mAb의 골든 시리안 햄스터에서 클로스트리듐 디피실리 관련 설사(CDAD) 모델에서의 평가**
- [0270] 본 발명의 인간화 항-독소 A 및 항-독소 B mAb 조합의 생체 내 효능을 인간 항-독소 A 비교 mAb CDA-1 및 인간 항-독소 B 비교 mAb CDB-1 조합의 효능과 비교하여 평가하는 후속 시험을 햄스터에서 수행하였으며, 각 항체 조합을 클로스트리듐 디피실리-감염 동물에 투여하였다. 본 연구를 위한 처리 그룹을 하기 표 5A에 나타내었다.

[0271] <표 5A>

햄스터 비교 효능 연구에서의 처리 그룹

그룹	처리	용량 (mg/kg)	경로	계획	햄스터수
1	비감염된 대조	NA ¹	NA	NA	4
2	감염된 대조	NA	NA	NA	8
3	반코마이신	20	BID	BID X 5 일	8
4	hPA-41 + hPA-50	50, 50	IP	Q2d X 4	10
5	hPA-41 + hPA-50	20, 20	IP	Q2d X 4	10
6	CDA-1 + CDB-1	50, 50	IP	Q2d X 4	10
7	CDA-1 + CDB-1	20, 20	IP	Q2d X 4	10

¹ 적용불가

[0272]

[0273] 시험 항체는 본 발명의 인간화 mAb 조합 즉 인간화 항-독소 A mAb PA-50 및 인간화 항-독소 B mAb PA-41 조합 (hPA-41 + hPA-50) 또는 비교 인간 항-독소 A mAb(CDA-1 비교 mAb 로 지칭) 및 비교 인간 항-독소 B mAb(CDB-1 비교 mAb로 지칭) 의 조합(CDA-1 + CDB-1)을 표 5A에 나타낸 양으로 포함하였다. 비교 mAb는 공개된 중쇄 및 경쇄 영역의 3D8 및 124(W02006/121422 및 US2005/0287150)에 기초하여 합성하고(DNA2.0), 전장 IgG1 발현 벡터 내 클로닝하고(pCON-감마 및 pCON-카파), CHO-KSV1 세포에서 발현하고 여기에 기술된 방법으로 정제하였다. mAb 조합 및 대조는 표 5A에 기술된 대로 처리하였다.

[0274]

처리 방법은 본질적으로 전술한 실시예 Part B에 기술된 바와 같다. 간략하게, 골든 시리안 햄스터(Charles River Laboratories, Stone Ridge, NY, 50일령)가 본 실시예 5E 연구에 사용되었다. 대조 그룹 1의 햄스터는 비감염(및 미처리)되었다. 그룹 2~7의 동물은 정상 결장 세균총을 파괴하기 위해 클린다마이신 포스페이트를 단일 피하 용량 50 mg/kg로 전처리하였다(-1일). 그룹 4~7 동물은 클린다마이신 처리 직후 IP 투여로 용량투여하였다. 24 시간후 그룹 2~7의 각동물들에 0.5 mL의 클로스트리듐 디피실리(ATCC 43596, 균주 545) 현탁액을 경구 위관영양(0일), (즉, 경구 용량)으로 접종하였다. 그룹 4~7의 동물에 1, 3 및 5일에 단일 용량으로 시험 항체들을 부가적으로 투여하였다. 반코마이신은 그룹 3의 동물에 1~5일에 약 6시간 간격으로 하루 두번 투여하였다. 동물의 체중을 매주 측정하고, 39일간 생존 및 건강 상태를 매일 모니터하였다. 종료시 부검을 수행하고, 클로스트리듐 디피실리 미생물의 맹장 역가를 선택배지내 48시간 동안 37℃ 에서 혐기성 배양으로 측정하였다. 검출 한계는 20 CFU/맹장함량g 이었다. 본 연구 및 전술한 햄스터 연구는 Ricerca Biosciences(Concord, OH)에서 동물실험관련위원회 가이드라인에 따라 수행되었다.

[0275]

mAb-처리 및 대조 그룹의 생존결과를 도 16b-1에 나타내었다. 본 연구의 치사율 데이터를 하기 표 5B에 나타내었다. 햄스터 생존 요약은 하기 표 5C에 나타내었다.

[0276] <표 5B>

각 그룹내 햄스터 치사율 및 치사일

그룹	처리	동물 수	치사율 %	연구일							
				2	3	5	8	11 내지 14	18 내지 20	22	... 30
1	비감염된 대조	4	0								
2	감염된 대조	8	100	7	1						
3	반코마이신	8	100					1	5	2	
4	hPA-50 + hPA-41 50, 50 mg/kg	10	10				1				
5	hPA-50 + hPA-41 20, 20 mg/kg	10	0								
6	비교 CDA-1 + CDB-1 50, 50 mg/kg	10	100			1		8			1
7	비교 CDA-1 + CDB-1 20, 20 mg/kg	10	100			2		8			

[0277]

[0278]

표 5B에서 관찰되는 바와 같이, 모든 4 마리의 비감염 대조 햄스터(그룹 1)는 연구 종료시까지 생존하였다. 모든 감염된 대조(그룹 2) 동물들은 2 및 3일째 치사하였다. 반코마이신-처리 그룹(그룹 3)에서는 모든 연구 동물들이 13 및 22일 사이에 모두 치사하였다. hPA-50 + hPA-41(50, 50 mg/kg)을 투여한 그룹 4에서는 10 마리 중 9 마리의 동물들이 연구 종료시까지 생존하였다. 이 그룹의 햄스터 한마리는 8일째 거의 빈사상태였으며 위장관의 적색 탈색이 있었으나, 나머지 9 마리의 생존 동물들은 정상 위장관을 나타내었다. 그룹 5의 모든 10 마리의 햄스터들은 연구 종료시까지 생존하였고 정상 위장관을 가지고 있었다. 비교 mAb 그룹에서 50 mg/kg(그룹 6)이 투여된 10 마리 중 9 마리는 5 및 14일 사이에 치사하였고; 한마리는 연구 28일에 치사하였다. 20 mg/kg의 비교 mAb 조합(그룹 7)이 투여된 모든 10 마리의 햄스터는 연구 5일과 14일 사이에 치사하였다.

[0279] <표 5C>

본 발명의 인간화 mAb 및 비교 mAb로 처리한 동물의 생존 중간값 및 전체 생존

그룹/처리	용량(mg/kg)	생존중간값(일)	40일 생존율(%)
그룹 1 비감염	NA*	40	100
그룹 2 감염	NA*	2	0
그룹 3 반코마이신	20	20	0
그룹 4 hPA-50 + hPA-41	50, 50	NA	90
그룹 5 hPA-50 + hPA-41	20, 20	NA	100
그룹 6 CDA-1 + CDB-1	50, 50	14	0
그룹 7 CDA-1 + CDB-1	20, 20	11	0

* 적용불가

[0280]

[0281]

표 5C에서 관찰되는 바와 같이, 비감염된 대조 그룹 1의 모든 4 마리의 동물들은 연구 종료시까지 생존하였다(40일). 처리없이 클로스트리듐 디피실리에 감염된 모든 동물들(감염된 대조, 그룹 2)는 생존 중간값이 2 일이었으며; 이 그룹의 동물 중 아무도 연구 종료시까지 생존하지 못했다. 반코마이신-처리 그룹(그룹 3)에서는, 생존 중간값이 20일이었으며, 40일까지 아무도 생존하지 못했다. hPA-50 + hPA-41 mAb 조합을 처리한 양 그룹은 본 연구에서 감염된 동물을 보호하는데 효과적이었다(그룹 4 및 5). 인간화 mAb PA-50 + PA-41(각각 20 mg/kg; 그룹 5) 조합으로 처리된 햄스터들 모두(100%) 및 인간화 mAb PA-50 + PA-41(각각 50 mg/kg; 그룹 4) 처리된 햄스터의 90%가 연구 종료시까지 생존하였다(감염후 40일). 모든 생존 햄스터들은 본질적으로 사후 부검시 정상 위장관을 갖고 있었다. 반면, 비교 항-독소 A 및 항-독소 B mAb 조합을 투여받은 동물들의 생존 중간값은 비교 mAb 양 용량에서 유사하였고; 비교 mAb 조합으로 처리된 두 그룹의 모든 동물들은 치사하였다. 특히 CDA-1 + CDB-1(각각 50 mg/kg; 그룹 6) 조합을 처리받은 동물들의 생존 중간값은 14일인 반면, CDA-1 + CDB-1(각각 20 mg/kg; 그룹 7) 조합을 처리한 동물들의 생존 중간값은 11일이었다.

[0282]

연구의 부가 평가는 체중 측정, 연구 종료시 총 부검 및 클로스트리듐 디피실리 미생물의 맹장내 역가를 포함하였다. 반코마이신 또는 PA-50/PA-41 조합을 처리한 동물의 체중 평균은 감염후 첫 주동안 감소하였다가 다시 반등하였다(도 16b-2). 39일까지, PA-50/PA-41 조합을 처리한 동물의 체중 평균은 병행하여 사육한 건강하고 비감염된 동물의 평균 체중과 유사하였다($P>0.05$). CDA1/CDB1 비교항체 조합으로 처리한 동물의 평균 체중은 연구 중 꾸준히 감소하였다.

[0283]

39일에 PA-50/PA-41 조합으로 처리한 19 마리의 생존 동물의 위장관은 비감염 동물의 위장관과 유사하였으며; 맹장내 클로스트리듐 디피실리 역가는 검출불가($<1.3 \log_{10}$ CFU, $n=11$)이거나 낮았다($4.15 \pm 0.76 \log_{10}$ CFU, $n=8$). 반면에 다른 처리그룹의 일부 또는 모든 동물은 치사시 위장관의 염증이 관찰되었다. 클로스트리듐 디피실리는 맹장 분석된 4 마리의 미처리 동물 중 4 마리에 검출되었고(평균 CFU = $8.96 \pm 0.59 \log_{10}$, PA-50/PA-41에 대해 $P<0.0001$), 4 마리의 반코마이신-처리 동물중 4 마리에 검출되었다(평균 CFU = $6.01 \pm 0.93 \log_{10}$, PA-50/PA-41에 대해 $P<0.017$). CDA1/CDB1 비교 항체 조합으로 처리한 대부분의 햄스터는 맹장 내용물이 거의 없었으며, 따라서 클로스트리듐 디피실리 역가의 정량 분석에서 배제되었다.

[0284]

본 연구 및 상기 연구의 통계적 분석을 위해, 중화 데이터를 GraphPad 프리즘(v. 4.0 GraphPad Software, San Diego, CA)을 사용하여 4-파라미터 논리식에 피팅하였다. 이면 t 테스트 또는 log-rank 테스트를 사용하여 각각 평균 또는 생존 데이터 비교에 사용하였다.

- [0285] 연구 결과는 클로스트리듐 디피실리-감염 동물을 인간화 mAb PA-50 및 PA-41 조합으로 처리하는 경우 양 용량 수준에서 효과적이고 지속적으로 햄스터들을 심각한 질병으로부터 초기 및 후속하는 재발로부터 보호하는 것을 보여준다. 인간화 mAb 조합 처리의 지속 혜택(40 일)은 반코마이신 또는 대조인 비교 항-독소 A 및 항-독소 B mAb로 처리한 것에 비해 동물의 장기 생존을 상당히 개선하였다.
- [0286] 생체 내 동물시험에서 입증된 바와 같이, 인간화 PA-50/PA-41 mAb 조합의 처리는 CDI에 대해 잘 수립된 골든 시리안 햄스터 모델에서의 클로스트리듐 디피실리 감염 치료에 매우 효과적이다. PA-50/PA-41로 단기 치료는 감염후 39일에 95% 생존율을 나타내었으며, 이는 치료를 하지 않거나, 표준 항생제 치료 또는 비교 mAb를 투여 받은 동물의 생존율이 0%인 것에 비교된다. PA-50/PA-41로 처리한 동물은 감염후 39 일에 정상 체중을 나타내고 명백한 위장관 병변을 나타내지 않았다. 클로스트리듐 디피실리는 대부분의 동물에서 회수되지 않았으며, 이는 미처리된 동물에 대해 $>7\text{-log}_{10}$ 청소율에 반영되었다. 이러한 발견에 대한 한가지 가능한 설명은 항생제 부재중 독소의 mAb-매개 중화가 방어성 미생물총이 동물의 위장관에서 재수립되는 것을 허용하였다는 것이다.
- [0287] 독소 A 또는 독소 B는 단독으로 CDI의 햄스터 모델에서 치명적인 질병을 유발할 수 있으며, 일반적으로 최대 치료 효능을 위해 양 독소에 대한 mAb가 요구되는 것으로 보고되었다. 전술한 본 연구들에서, 쥐과 동물 mAb PA-50 및 PA-41은 햄스터 모델에서 각각 50 mg/kg 사용하였을 때 아무런 생존 혜택을 나타내지 못했으며, 이는 조합 처리가 요구되는 것을 강조한다.
- [0288] 본 햄스터 연구에서 전반적으로, 쥐과 동물 mAb 조합을 사용한 전술한 발견과 유사하게, 본 발명의 인간화 mAb 조합이 클로스트리듐 디피실리 감염의 엄격한 햄스터 모델에서의 치사로부터 햄스터들을 효과적이고 지속적으로 보호함이 입증되었다. 이론에 얽매임없이 이러한 발견은 인간화 mAb 조합이 클로스트리듐 디피실리 감염으로부터 동물을 보호하고, 및/또는 인간 mAb-처리된 동물에서 정상 장관 세균총의 성장 및 재균락을 허용하기에 충분히 오랜 시간 동안 클로스트리듐 디피실리 감염에 대한 반응을 시작할 수 있도록 하여 감염 동물에 대한 치료적 보호 및 클로스트리듐 디피실리 관련 질병의 효과적 해결, 위장관 건강의 회복 및 생존을 가능케하는 반응기전을 뒷받침한다.
- [0289] **실시예 6**
- [0290] **클로스트리듐 디피실리 의 독소 A 및 독소 B 영역에 대한 mAb 결합**
- [0291] 본 발명의 mAb가 결합하는 클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B의 에피토프 영역을 결정하기 위한 실험이 수행되었다. 클로스트리듐 디피실리에 의해 생성되는 독소 A 및 독소 B는 모두 약 300 kDa이며 상당한 서열 및 구조적 상동성을 공유한다. 양쪽 다 클로스트리디아성 반복 올리고펩티드(CROP)를 함유하는 C-말단 수용체-결합 영역, 구멍 형성을 일으키고 독소가 엔도솜막 내로 삽입되는 것을 매개하는 것으로 생각되는 중앙 소수성 영역 및 N-말단 효소성 영역을 절단하여 글루코실트랜스페라제가 시토솔 내로 들어가도록 하는 단백질 분해성 영역을 갖는다. 클로스트리듐 디피실리 독소를 코딩하는 핵산서열은 다른 클로스트리듐 디피실리 단백질과 마찬가지로 공개되었으며 국립 바이오테크놀로지 정보 센터(NCBI) 데이터베이스(i.e., www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 얻을 수 있다. 예를 들어 클로스트리듐 디피실리 균주 VPI 10463에 대한 독소 A 및 독소 B를 코딩하는 DNA 서열은 NCBI 수탁번호 x92982에서 발견될 수 있으며; 또한 NCBI 수탁번호 NC_009089, 영역 795842-803975는 클로스트리듐 디피실리 630 크로모솜 완전 게놈 서열에서 유래한 독소 A의 DNA 서열을 제공하며, NCBI 수탁번호 NC_009089, 영역 787393-794493은 클로스트리듐 디피실리 630 크로모솜 서열에서 유래한 독소 B를 코딩하는 DNA 서열을 제공한다.
- [0292] **A. 클로스트리듐 디피실리 독소 B의 항체 결합 영역 매핑**
- [0293] 전장 클로스트리듐 디피실리 독소 B는 세개의 하기 주요 영역으로 구성되어 있다: 글루코실트랜스페라제(GT) 활성(63 kDa)을 프로세싱하는 N-말단 효소 영역, C-말단 세포 수용체 결합(59 kDa), 및 이들이 양쪽 말단에 있는 추정적 전좌 영역(148 kDa)(도 17a 및 17c). 수개의 독소 B 단편은 효소 카스파아제1을 사용한 전장 독소 B의 효소성 절단에 의해 생성되었다(도 17c). 독소 B를 카스파아제1(효소/독소 비율 약 1 U/mg 독소)로 37°C에서 96 시간 동안 처리한 후, 두개의 C-말단 함유 단편(193 및 167 kDa) 및 두개의 N-말단 함유 단편(103 및 63kDa)을 포함한 네개의 주요 단편이 생성되었으며, 이는 SDS-PAGE로 검출하였다(도 17b). 26 및 14 kDa과 같은 다른 더 작은 단편도 생성되는 것으로 보였으나, 3~8% 트리스-아세테이트 겔 분석에서는 검출되지 않았다.
- [0294] SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 분석을 카스파아제1로 처리하거나 처리하지 않은 독소 B에 대해 수행하였다(도 18a 내지 18c). mAb PA-41은 카스파아제1-처리 독소 B의 103 kDa 및 63 kDa 단편을 모두 인식하였으며(도 18b의 우측

레인), 이로부터 PA-41은 독소 B의 N-말단효소 영역에 결합함을 알 수 있다. N-말단서열 분석 결과 PA-41이 독소 B의 63 kDa N-말단 효소 영역에 결합하는 것이 확인되었다. 미처리 독소 B에서 63 kDa 밴드(도18b의 좌측 레인)가 PA-41에 의해 인식되지 않음이 흥미롭게 주목되며, 이는 레인의 동일한 분자량(63 kDa)을 갖는 두 단편이 다른 단백질임을 암시한다.

[0295] MAb PA-39는 카스파아제1-처리 독소 B의 167 kDa 단편(도18c, 우측 레인), 및 미처리 독소 B 제제의 63 kDa 단백질(도18c, 좌측 레인)에도 결합하였으며, 이는 PA-39가 독소 B의 전좌 영역 내 에피토프에 결합함을 암시한다. 따라서, 카스파아제1-처리 클로스트리듐 디피실리 독소 B의 SDS-PAGE/웨스턴 블랏 분석 결과에 기초하여, mAb PA-41 및 PA-39는 독소 B와 서로 다르게 상호작용하는 것으로 밝혀졌다. mAb PA-41은 독소 B의 N-말단 효소 영역 내 에피토프에 결합하며, mAb PA-39는 독소의 전좌 영역 내 에피토프(아미노산 850-1330)에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 발견은 엔테로키나제 소화를 이용한 독소 B 단편의 SDS-PAGE/웨스턴 블랏 분석에 의해서도 확인되었다.

[0296] 항-독소 B mAb의 독소 B에의 경쟁적 결합이 비아코어를 이용하여 수행되었다. 도 19a 내지 19e에 나타낸 바와 같이, mAb PA-39 및 PA-41은 독소 B의 상이한 에피토프 영역에 결합한다. 쥐과 동물 mAb PA-39 및 PA-41은 독소 B상의 단일 부위 또는 에피토프에 결합하는 것으로 밝혀졌으며; 이러한 mAbs는 C-말단세포 수용체결합(CRB) 영역에는 결합하지 않는 것으로 밝혀졌다. 쥐과 동물 PA-41의 독소 B에 대한 결합 친화성은 0.59 mM이었다. 부가적으로 PA-41에 의해 결합된 독소 B상의 부위는 비교 항-독소 B mAb CDB-1(WO/2006/121422; US2005/0287150)의 결합을 차단하지 않았다(도19d). 이러한 발견은 웨스턴 블랏 분석 결과와 일치한다. 도 19c 및 19e에서 관찰된 바와 같이, 비교 항-독소 B mAb CDB-1는 mAb PA-39 및 PA-41과 상이한 에피토프에서 독소 B에 결합한다.

[0297] B. 클로스트리듐 디피실리 독소 A의 항체 결합 영역 매핑

[0298] 전장 클로스트리듐 디피실리 독소 A는 310 kDa의 분자량을 가지며(도 20a), 세 개의 하기 주요 영역을 포함한다: 글루코실트랜스페라제(GT) 활성을 갖는 N-말단효소 처리 영역(약 63kDa), C-말단 CRB 영역(약 101 kDa)과 이들이 양 말단에 존재하는 소수성 영역 (약 144 kDa).

[0299] 수 개의 독소 A 단편은 효소 엔테로키나제(EK)를 사용한 전장 독소의 효소성 절단에 의해 생성되었다. 독소 A를 엔테로키나제(효소/독소 비율 약 3 mU/mg 독소)로 25°C에서 48시간 동안 처리한 후, 네개의 C-말단 단편(약 223, 약 158~160, 약 91, 및 약 68 kDa) 및 세개의 N-말단 단편(약 195, 약 181, 및 약 127 kDa)을 포함한 아홉개의 주요 단편이 생성되었다. 더 작은 단편(약 53 및 약 42 kDa)도 관찰되었다(도 20b 및 20c).

[0300] SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 분석을 엔테로키나제로 처리하거나 미처리한 독소 A에 대해 수행하였다(도 21a 내지 21c). 전장독소 A 및 분자량 약 223, 약 158~160, 약 91, 및 약 68 kDa 을 갖는 단편들이 mAb PA-50에 의해 인식되었으며(도 21b); N-말단서열분석 결과 68 kDa 단편은 C-말단수용체결합(CRB) 영역의 일부를 함유하는 것으로 확인되었다. mAb PA-50 결합 패턴은 mAb가 독소 A의 C-말단함유 단편과 결합하는 것을 암시한다. 이들을 같이 고려해 볼 때, 상기 결과들은 mAb PA-50이 독소 A상의 C-말단수용체-결합 에피토프에 결합하는 것을 나타낸다. mAb PA-39는 C-말단함유 단편(약 223 및 약 158~160 kDa) 및 약 181 kDa N-말단함유 단편에 결합하였으며(도 21c), 이는 mAb PA-39가 독소 A의 수용체 결합 영역의 바깥 영역 내에 있는 에피토프에 결합함을 나타낸다. 복수개의 결합 부위(적어도 두개의 결합 부위)가 비아코어 분석을 이용한 mAb PA-50 및 독소 A 상호작용연구에서 확인되었다(도 22a-1). 비아코어 분석을 이용한 비교 연구에서, 고정된 쥐과 동물 PA-50은 독소 A에 0.16 nM의 친화성으로 특이적으로 결합하였다. 또한 독소 A는 쥐과 동물 mAb PA-50에 의해 센서 칩상으로 포획된 후, 부가적인 PA-50과 후속하여 비교 항-독소 A mAb CDA-1(WO/2006/121422; US2005/0287150)과 결합할 수 있음이 밝혀졌다(도 22a-2). 추가적으로 비교 항-독소 A mAb CDA-1에 의해 비아코어 칩상에서 포획된 독소 A는 추가적인 CDA-1 및 PA-50 mAb와 결합할 수 있으며, 이는 비교 mAb CDA-1가 독소 A상에서 복수개의 반복체에 결합하며, 이는 독소 A상의 PA-50 mAb 결합 에피토프와 상이함을 나타낸다(도 22b). 따라서, 이들 결과로부터 결정된 바와 같이, PA-50 mAb 에피토프는 독소 A 상의 복수개의 카피들에 존재하며 CDA-1에 대한 에피토프와 중복되지 않는다. 나아가, PA-39 mAb는 비교 CDA-1 mAb가 결합하는 독소 A 에피토프들과 서로 다른 독소 A 상의 에피토프에 결합하였다(도 22c). MAbs PA-39 및 PA-50은 독소 A상에서 서로 다른 에피토프에 결합하는 것이 밝혀졌다(도 22d). 웨스턴 블랏 분석은 PA-39 및 비교 mAb CDA-1가 EK-처리 독소 A에 서로 다른 결합 패턴을 가지며, 이는 독소 A 상의 상이한 결합 영역 및 상이한 에피토프를 나타낸다(도 22e). 웨스턴 블랏 분석은 PA-50 및 비교 mAb CDA-1이 EK-처리 독소 A의 동일한 영역에 결합하나(도 22f), 다른 에피토프에 결합하는 것을 보여준다(도 22b).

[0301] 본 실시예 A 및 B에 기술한 바와 같이 쥐과 동물 mAb PA-50 및 PA-41에 대한 결합 부위는 웨스턴 블로팅이 후속하는 독소의 제한적 단백질분해에 의해 독소의 특이적 용역에 국소적으로 분포되어 있다. 쥐과 동물 mAb PA-50은

전장 독소 A 및 큰 223 kDa 단편 및 68, 91 및 160 kDa 크기의 카복시-말단단편을 포함하는 수개의 엔테로키나제 절단 산물을 인식하였다(도 22f). N-말단 서열분석 결과 68 kDa 단편은 독소 A의 카복시-말단영역에 해당함이 확인되었다. 동일한 단편이 CDA-1 비교 mAb에 의해 인식되었다. 쥐과 동물 mAb PA-41은 전장 독소 B 및 카스파아제-1 소화에 의해 생성된 63 및 103 kDa 아미노-말단 단편들에도 결합하였다(도 18b). 반면 CDB-1 비교 mAb는 구별되는 세트의 카스파아제-1 절단 산물을 인식하였다. N-말단 서열분석 결과 63 kDa 단편은 독소 B의 아미노-말단 영역에 해당하는 것이 확인되었다. 총체적으로, 이들 데이터들은 mPA-50이 독소 A의 수용체-결합 영역 내 복수개의 부위에 결합하며, mPA-41은 독소 B의 효소성 영역 내 단일 부위에 결합함을 나타낸다.

[0302] 실시예 7

[0303] 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B mAb-작용 기전 연구

[0304] A. 작용 기전 연구에 사용된 생체 외 세포-기초 분석

[0305] 항-독소 mAb의 작용기전을 평가하기 위해, 상이한 농도의 독소 A 또는 독소 B를 사용하여 생체 외 분석을 수행하였다. 이들 분석은 실시예 3에 기술한 바와 같이 CHO-K1 또는 T-84 세포를 사용하였다.

[0306] 간략하게 기술하면, CHO-K1 분석을 사용하여 항-독소 A 및 항-독소 B mAb(PA-39 및 PA-41)의 중화능을 평가하였다. CHO-K1 세포를 96-웰 플레이트에 시딩하였다(2,000 세포/웰). 세포들은 4 시간 동안 부착되도록 한 후 처리하였다. 상이한 농도(60, 30, 15, 또는 6 ng/mL)의 클로스트리듐 디피실리 독소(균주 VPI 10463)를 단계적으로 희석한 mAb와 함께 인큐베이션하고, 96-웰 둥근 바닥 플레이트에서 1 시간 동안 37°C에서 혼합하고, 이후 혼합물을 세포 배양 플레이트에 가하였다. 72 시간 동안 인큐베이션한 후, 20 μ l/well CellTiter-Blue를 가하고; 혼합물을 4 시간 더 인큐베이션한 후; 세포 생존퍼센트를 대조와 비교하여 측정하였다.

[0307] 또한 T-84 세포독성 분석을 이용하여 항-독소 A mAb의 중화능을 평가하였다. T-84 세포(인간 결장암 세포주)를 96-웰 플레이트에 시딩하였다(15,000 세포/웰). 세포들은 4 시간 동안 부착되도록 한 후 처리하였다. 상이한 농도(240, 120, 60, 또는 30 ng/mL)의 클로스트리듐 디피실리 독소(균주 VPI 10463)를 단계적으로 희석한 mAb와 함께 인큐베이션하고, 96-웰 둥근 바닥 플레이트에서 1 시간 동안 37°C에서 혼합하고, 이후 혼합물을 세포 배양 플레이트에 가하였다. 72 시간 동안 인큐베이션한 후, 20 μ l/well CellTiter-Blue를 가하고; 혼합물을 4 시간 더 인큐베이션한 후; 세포 생존퍼센트를 대조와 비교하여 측정하였다.

[0308] B. 항-독소 A mAb가 독소 A의 세포 내로의 내재화를 방지하는 것을 보여주는 ELISA

[0309] 항-클로스트리듐 디피실리 독소 mAb의 작용 기전을 더 평가하기 위해 설계된 실험에서, 각 시험 항체(PA-39, PA-50, 비교 항-독소 A mAb CDA-1 및 항-독소 A 염소 다클론 항체 대조)를 그 EC₉₀ 값의 100배에서 배로 세포에 대한 CC₉₀ 농도의 독소 A와 혼합하고 1 시간 동안 인큐베이션하여, 높은 세포독성 농도의 독소 A 에서 완전히 중화할 수 있게 하였다. 이후 이들 혼합물을 배로 세포와 함께 37°C에서 15분간 인큐베이션하였다. 이후 세포를 PBS로 세척하고 고정 및 침투화하였다. 시험 항체와 결합 경쟁하지 않는 홀스 래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-라벨링된 항-독소 A 항체(PA-38)를 내재화 독소 A에 대한 프로브로 사용하고 화학 발광을 사용하여 검출하였다(도 31g). 이 분석에서, 세포와 결합하고 세포 내로 내재화되는 독소 A만이 프로브에 의해 검출되며, HRP 화학발광 반응에 기초한 화학발광 시그널을 생성한다. 화학발광 검출은 퍼옥시드 존재하에 HRP 효소 및 그 기질간 반응을 촉매하여 가시광선을 생성하는 효소를 사용한다(즉 퍼옥시드에 의한 루미놀의 촉매화된 산화). 산화된 루미놀은 기저 상태로 붕괴되면서 발광한다. 기질이 HRP에 의해 촉매화되면, 광 시그널이 루미노미터에 의해 정량된다(Analyst GT).

[0310] C. 중화활성 및 MOA 연구 결과

[0311] 항-독소 A mAb

[0312] 항-독소 A 항체의 중화 활성 및 작용 기전을 평가하는데 사용된 세포성 세포독성 분석에서, 본 실시예의 섹션 A에 기술한 바와 같이 독소 A는 증가되는 농도로 세포에 첨가되었다. 이들 실험에서 항-독소 A mAb PA-39, PA-50 및 비교 mAb CDA-1에 의한 독소 A 중화가 평가되었으며, 그 결과를 도 31b 내지 31d 및 하기 표 A에 나타내었다.

[0313] <표 A>

독소 A 역가 실험 결과 및 최대 저해 퍼센트

mAb	[독소 A] (ng/mL)	[EC ₅₀]* (nM)	최대 저해 퍼센트
PA-39	60	0.340	69
	30	0.080	86
	15	0.003	96
	6	0.002	97
PA-50	240	0.91	105
	120	0.54	100
	60	0.27	114
	30	0.10	118
CDA-1 비교 mAb	240	9.0	52
	120	6.6	74
	60	5.1	103
	30	2.0	110

*: EC₅₀은 곡선이 대조의 100%에 도달하지 않는 경우 50% 최대 저해

[0314] 퍼센트로 산출하였다

[0315] 표 A에 나타난 데이터로 알 수 있는 바와 같이, 독소 역가 분석에서 mAb PA-39의 생체 외 활성은 더 많은 독소 A가 배양에 첨가될수록 EC₅₀ 및 최대 저해 퍼센트 모두 이동을 나타내었으며, 이는 PA-39의 혼합-경쟁적 저해 기전을 나타낸다. 100배 과량의 PA-39로 보호한 후 독소 A의 ELISA 검출 분석 결과, PA-39에 의한 독소 저해가 독소 내재화 및 세포독성 독소 효능을 방지함으로써 일어나는 것임을 확인해 주었다. 독소 역가 분석에서 mAb PA-50의 생체 외 활성은 더 많은 독소 A가 배양에 첨가될수록 EC₅₀의 이동을 나타내었으며, 이는 PA-50에 대한 경쟁적 저해 기전을 나타낸다. 100배 과량의 PA-50으로 보호한 후 독소 A의 ELISA 검출 분석 결과, PA-50에 의한 독소 저해가 독소 내재화를 방지함으로써 일어나는 것임을 확인해 주었다.

[0316] 항-독소 B mAb

[0317] 항-독소 B 항체의 중화 효능 및 작용 기전을 평가하는데 사용된 세포성 세포독성 분석에서, 본 실시예의 섹션 A에 기술한 바와 같이 독소 B는 증가되는 농도로 세포에 첨가하였다. 이들 역가 실험에서 항-독소 B mAb PA-41 및 비교 mAb CDB-1에 의한 독소 B 중화가 평가되었으며, 그 결과를 도 31e 및 31f 및 하기 표 B에 나타내었다. 하기 표에 나타난 데이터로부터 알 수 있는 바와 같이, 독소 역가 분석에서 mAb PA-41의 생체 외 활성은 더 많은 독소 B가 배양에 첨가될수록 EC₅₀ 및 최대 저해 퍼센트 모두 이동을 나타내었으며, 이는 PA-41에 대한 혼합-경쟁적 저해 기전을 나타낸다.

[0318] <표 B>

독소 B 역가 실험 결과 및 최대 저해 퍼센트

mAb	[독소 B] (pg/mL)	[EC ₅₀]* (nM)	최대 저해 퍼센트
PA-41	20	0.82	49
	10	0.33	80
	5	0.13	96
	2	0.05	96
CDB-1 비교 mAb	20	4.1	23
	10	3.0	51
	5	1.1	75
	2	0.2	95

*: EC₅₀은 곡선이 대조의 100%에 도달하지 않는 경우 50% 최대 저해

퍼센트로 산출하였다.

[0319]

[0320]

본 실시예에서 전술한 분석에 기초하여, 단순히 더 높은 농도의 저해제를 첨가함으로써 증가하는 농도의 독소 A 또는 독소 B를 완전히 중화시키는 능력을 갖는 저해제는 항체가 더 많이 결합하고 더 높은 농도의 독소를 중화하여 EC₅₀의 이동을 나타내며, 따라서 경쟁적 저해제로 간주될 것이다. 증가하는 농도의 독소의 독성 효과를 해소할 수 없는 저해제는 더 높은 농도에서 더 낮은 최대 퍼센트 효과를 나타내나 EC₅₀의 이동은 나타나지 않으며, 따라서 비-경쟁적 저해제로 간주될 것이다. 나아가 더 높은 농도의 독소에서 저해제 농도의 증가 결과 EC₅₀의 이동 및 더 낮은 최대 퍼센트 효과를 나타내는 저해제는 혼합-경쟁적 저해제로 간주될 것이다. 어느 정도까지, 세포성 세포독성 분석을 사용하여 작용기전을 평가하는 것은 분석 반복성 및 최대 저해 퍼센트의 고원(plateau)에 영향을 미치는 저해제를 함유하지 않은 대조 웰에서 관찰되는 배경 세포독성에 관련된 오차를 고려하여 수행해야만 한다. 결과적으로 이러한 효과로 인해 독소 농도가 증가될 때 EC₅₀ 값이 약간 우측으로 이동하는 것이 관찰될 수 있다.

[0321]

전술한 바에 따라, EC₅₀의 이동 및 PA-39 세포독성 곡선에 관찰되는 고원의 저하(도 31b), 및 표 A에 산출된 최대 퍼센트 효과의 저하로 인해 PA-39 mAb는 독소 A 중화 및 MOA에 있어 혼합-경쟁적 저해제로 간주된다. 이들 데이터는 높은 농도의 PA-39에서의 세포독성 효과 정도를 보여주는 ELISA 결과에 의해 뒷받침되며(도 31h), 따라서 PA-39 MOA의 최소한 일부는 세포 내에서 일어나는 것을 나타낸다. PA-50 mAb는 경쟁적 저해제로 관찰되었으며, 이는 세포독성 분석 곡선에서 관찰되는 EC₅₀ 값의 우측 이동(도 31c) 및 최대 저해 퍼센트의 최소 변화를 보여주는 표 A 데이터에 의해 입증된다. 이들 데이터는 높은 농도의 PA-50에서 독소 A 결합 및 내재화의 완전한 저해를 보여주는 ELISA 결과에 의해 뒷받침된다(도 31h).

[0322]

도 31d에 도시된 것처럼, 비교 mAb CDA-1는 EC₅₀의 최소 이동을 나타내었으나, 독소가 증가할수록 최대 퍼센트 효과의 상당한 감소를 나타내었다. 도 31d의 결과를 표 A의 데이터와 함께 고려하였을 때, CDA-1 비교 mAb는 비-경쟁적 작용 기전을 보이며, 이들 활성 모두는 세포 바깥에서 관찰되기 때문이다. 독소 결합 및 세포 내재화의 공간적 방해로 인해 도 31d의 데이터 플롯을 나타내는 것으로 보이며, 이는 CDA-1 비교 mAb의 비-경쟁적 MOA를 뒷받침한다.

[0323]

전술한 독소 B 중화 및 MOA에 따라, 도 31e 및 표 B의 데이터 모두에 관찰되는 EC₅₀의 우측 이동 및 최대 퍼센트 효과의 저하로부터 PA-41 mAb는 혼합-경쟁적 작용 기전을 나타내는 것으로 여겨진다.

[0324]

mAb PA-41에 대해 관찰된 결과는, 최대 퍼센트 효과는 저하되나 EC₅₀ 이동 정도는 다소 적은 비교 mAb CDB-1에 대한 결과와 대조적이다. 이 경우에서, 독소 B에 대한 비교 mAb 활성의 작용기전은 특히 상기 언급한 오차로 다소 불분명하였다.

- [0325] 실시예 8
- [0326] 본 발명의 mAb의 맹독성 분리체 또는 균주를 포함하는 클로스트리듐 디피실리 분리체 또는 균주 패널에 대한 시험
- [0327] 본 발명의 클로스트리듐 디피실리 항-독소 A 및 항-B mAb의 클로스트리듐 디피실리의 광범위한 관련 분리체로부터 유래되는 독소 중화 능력을 평가하기 위해, 맹독성 BI/NAP1/027 분리체를 포함하여, 20개의 임상 독소발생 클로스트리듐 디피실리 분리체 또는 균주 컬렉션에 대해 mAb의 중화활성을 시험하였다. 클로스트리듐 디피실리는 독소 A 및 B를 코딩하는 유전자에서 상당한 균주간 이종성을 나타내므로, 이 연구는 기술된 mAb 및 특히 mAb PA-50 및 PA-41에 의한 독소 중화 범위를 조사하기 위해 수행된 것이다.
- [0328] 임상 독소발생 클로스트리듐 디피실리 분리체 패널(표 6)은 지리적 다양성, 및 독소타입, 리보타입 및 제한 엔도뉴클레아제 분석에 기초한 유전적 다양성을 고려하여 TechLab(Blacksburg, VA)에서 보유된 국제적인 클로스트리듐 디피실리 분리체 또는 균주 컬렉션에서 선택하였다.
- [0329] 표 6에 범주화시킨 것과 같이, 클로스트리듐 디피실리 균주는 3개의 참조 균주(VPI 10463(ATCC 43255), 630(ATCC BAA-1382) 및 545(ATCC 43596)), 6개의 병원-유래 BI/NAP1/027 균주(CCL678, HMC553, Pitt45, CD196, 5, 7.1), 2개의 독소 A-/독소 B+(tcdA-tcdB+) 균주(F1470, 8864), 3개의 외래 환자 분리체(MH5, CCL13820 및 CCL14402) 및 기타 빈번한 임상 분리체(Pitt2, CCL14137, UVA17, UVA30/TL42, Pitt102, Pitt7)를 포함한다. 추가적으로, 분리체 13(CCL13820) 및 19(Pitt 102)는 표 6에서 "외래 환자 분리체" 및 "빈번한 임상 분리체(리보타입 027 이외)"로 각각 범주화되었는데, 이들 역시 toxA-/toxB+ 균주이다. 이들 클로스트리듐 디피실리 독소들을 함유하는 배양 상청액은 TechLab에서 제조하였고, 여과-멸균하고 4℃에서 저장하였다. 배양 상청액에서의 독소 존재는 클로스트리듐 디피실리 독소/항독소 키트(TechLab) 및 세포독성 분석으로 확인하였다.
- [0330] 각 독소-함유 배양 상청액의 CHO-K1 세포(배양 상청액의 독소 B 활성을 결정하기 위해 사용됨) 및 T-84 세포(배양 상청액의 독소 A 활성을 결정하기 위해 사용됨)에 대한 세포독성 활성은 적정된 배양 상청액으로 세포를 처리하여 평가하였다.

표 6

상청액 생성에 사용된 클로스트리움 디피실리 분리체/균주

번호	균주	카테고리	리보타입	독소타입	REA타입	년	위치
1	VPI 10463 ATCC 43255	A+B+기준 균주	003	0	알수 없음	~1975	미국
2	630 ATCC BAA-1382		알수 없음	알수 없음	알수 없음	1982	스위스
3	545 ATCC 43596		알수 없음	알수 없음	알수 없음	알수 없음	벨기에, 루벤
4	CCL 678	리보타입 027 (이래 환자 분리체)	027	III	BI	2007	미국, 버지니아
5	HMC553					2008	미국, 펜실베이니아
6	Pitt 45					2001-2002	미국, 펜실베이니아
7	Cd 196					1988	프랑스, 파리
8	5					2004	캐나다, 퀘벡
9	7.1					2004	캐나다, 퀘벡
10	F1470	tcdA ⁺ tcdB ⁺ 균주	017	VIII	CF1	1990	벨기에, 루벤
11	8864 CCUG 20309		036	X	CY1	1986	영국, 버밍엄
12	MH 5	병원의 분리체	001	알수 없음	알수 없음	2008	미국, 버지니아
13	CCL13820		017	VIII	CF	2008	미국, 버지니아
14	CCL 14402		027	III	BI	2008	미국, 버지니아
15	Pitt 2	빈번한 임상 분리체(리보타입 027 이외)	001	알수 없음	J	2001-2002	미국, 펜실베이니아
16	CCL 14137		001	알수 없음	J	2008	미국, 버지니아
17	UVA17		002	알수 없음	G	2006-2007	미국, 버지니아
18	UVA30/TL42		014	알수 없음	Y	2006-2007	미국, 버지니아
19	Pitt 102		017	VIII	CF	2001-2002	미국, 펜실베이니아
20	Pitt 7		078	V	BK	2001-2002	미국, 펜실베이니아

[0331]

[0332]

본 발명의 mAb 의 중화 활성을 시험하기 위해, 독소-함유 배양 상청액은 세포 생존능을 95% 이상 소실시키는 최대 희석 상태로 사용하였다. 독소 상청액은 다양한 농도의 mAb와 1 시간 동안 미리 혼합한 후 세포에 가하여 37 °C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 생존능은 Cell-Titer Blue(Promega)로 측정하였다. 처리 웰의 생존 퍼센트는 미처리 대조 웰의 생존 퍼센트와 비교하고 그래프로 나타내어 mAb의 생체 외 중화 활성(EC₅₀)을 산출하였다. 첫 시리즈 실험에서, 도 23a는 CHO-K1세포를 사용한 mAb PA-41의 독소-함유 상청액 중화활성을 보여준다. PA-41는 세계의 독소A-/독소 B+ 균주를 제외한 모든 맹독성 균주를 포함하는 독성 클로스트리듐 디피실리 균주의 상청액을 강력하게(EC₅₀ 범위: 1.1⁻¹¹M 내지 6.5⁻¹⁰M) 중화시켰다. 독소 A-/독소 B+는 효소성 영역의 서열에 있어서 통상의 클로스트리듐 디피실리 균주와 상당히 다른 것으로 보고되어 있다. PA-41는 독소 B의 효소성 영역에 결합하므로, 이 영역의 서열 다양성이 PA-41이 두개의 독소 A-/독소 B+ 균주에서 유래된 독소 B에 대해 중화 효과가 낮은 이유를 설명해 줄 수 있을 것이다. CHO-K1 세포주에서 클로스트리듐 디피실리 고병원성 균주에 대

한 hPA-41 및 비교 인간 항-독소 B mAb CDB-1(WO/2006/121422; US2005/0287150)의 활성을 평가하는 실험을 수행하였다. 이 연구에서, hPA-41은 6개의 BI/NAP1/027 균주에서 유래한 모든 상청액에 대해 상당한 중화 활성을 나타내는 반면, 비교 mAb CDB-1은 최소 활성을 나타내는 것이 관찰되었다(도 23b). 또한 이 연구에서, hPA-41 mAb는 BI/NAP1/027 균주 독성의 중화에 있어 비교 mAb CDB-1보다 1,000배보다 더 많은 중화 활성을 나타내었다. 2개의 참조 균주(VPI 10463 및 ATCC 43596) 및 6 BI/027/027 균주(CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 및 Montreal 7.1)에 대한 hPA-41 및 CDB-1 비교 mAb의 중화활성을 도 23b에 나타내었다. 이 연구에서 hPA-41 항-독소 B mAb는 독소 A-/B+인 3개의 리보타입 017 분리체(표 6)에는 불활성이지만, hPA-41은 패널 내 다른 균주에 대해서 비교 mAb보다 훨씬 큰 중화활성을 나타내었다.

[0333] T-84 세포를 사용한 독소 A-함유 클로스트리듐 디피실리 배양 상청액을 중화시키는 mAb PA-50 활성은 도 24a에 나타낸 바와 같이 2.6^{-12} M 내지 7.7^{-11} M 이었다. PA-50은 맹독성 균주를 비롯하여 독소 A를 생성하는 모든 가능한 균주에서 유래한 상청액을 완전히 중화하였다. PA-50은 4개의 독소 A-/독소 B+ 균주(F1470, 8864, CCL 13820, CCL 14402)는 중화하지 않았는데, 이들 균주는 독소 A를 생성하지 않기 때문이다. hPA-50은 패널의 나머지 균주의 활성을 중화시키는데 매우 효과적이었다. 다른 비교 연구에서, 독소-A 생성 클로스트리듐 디피실리의 6개의 BI/NAP1/027 균주 전부에 대한 hPA-50의 중화활성은 비교 mAb CDA-1(WO/2006/121422; US2005/0287150)의 중화활성보다 100배 더 큰 것으로 밝혀졌다(도 24b). hPA-50은 또한 클로스트리듐 디피실리 독소 A-생성 참조 균주 VPI 10463 및 545에 대해서도 비교 mAb CDA-1보다 더 큰 중화 활성을 나타내었다. 유사하게, mAb PA-39는 클로스트리듐 디피실리 배양 상청액의 독소 A를 7.7^{-12} M 내지 4.8^{-8} M의 EC_{50} 값으로 중화하였다(도 25a). mAb PA-50에 대해 나타난 바와 같이 4개의 독소 A-/독소 B+ 균주는 PA-39에 의해 중화되지 않았다. 또한 비교 연구 결과 모든 6개의 BI/NAP1/027 균주에 대한 mAb PA-39 중화활성이 비교 인간 항-독소 A mAb CDA-1의 중화활성보다 100배 더 크며; PA-39는 패널 내 나머지 균주에 대해서도 상당히 더 높은 중화 활성을 나타내었다(도 25b). 한 독소 균주 CCL 14402는 분석에서 mAb 중화 활성을 정확히 측정할 수 있을 만큼 충분히 T-84 세포 생존능을 감소시키지 않는 점이 주목되었다.

[0334] CHO-K1 세포주를 이용한 연구에서, hPA-41은 모든 6개의 6 BI/NAP1/027 균주에서 유래한 상청액에 대해 고수준의 중화 활성을 보인 반면, 비교 mAb CDB-1은 최소 활성을 나타내었다. 인간화 PA-41은 맹독성 BI/NAP1/027 클로스트리듐 디피실리 균주를 중화시킴에 있어 비교 mAb CDB-1보다 1,000배 이상 더 큰 중화활성을 보였다. 2개의 참조 균주(VPI 10463 및 ATCC 43596) 및 6개의 BI/027/027 균주(CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 및 Montreal 7.1)에 대한 본 연구의 hPA-41 및 CDB-1의 중화활성을 도 23b에 나타내었다. 유사하게 본 연구에서, 독소 A-/B+인 3개의 리보타입 017 분리체를 제외한 패널 내 다른 균주에 대해 비교 mAb CDB-1과 비교시 hPA-41은 훨씬 더 높은 중화 활성을 나타내었다. hPA-39 및 비교 인간 항-독소 A mAb CDA-1의 T-84 세포에 대한 중화 활성을 평가하기 위해 유사한 실험을 수행하였다. 그 결과, hPA-39는 모든 6개의 BI/NAP1/027 균주에 대해 비교 mAb CDA-1보다 100 배 이상 더 큰 중화활성을 나타내었다(표 25B). 인간화된 PA-39는 본 연구에서 패널의 나머지 균주에 대해서도 비교 mAb CDA-1보다 훨씬 더 높은 중화 활성을 나타내었다. 따라서, hPA-41 및 hPA-39 mAb는 시험된 모든 균주에 대해 고 수준의 항-클로스트리듐 디피실리 맹독성 균주 중화활성을 나타내었다. 이는 인간화 mAb에 의해 인식되는 에피토프가 다양한 균주에 고도로 보존되어 있음을 나타낸다.

[0335] 표 6과 유사하게, 표 7는 전술한 생체 외 클로스트리듐 디피실리 독소 중화 실험 결과를 나타낸 것이며, 이는 북아메리카 및 유럽에서 분리된 독소발생 클로스트리듐 디피실리 균주 패널과 인간화 항-독소 mAb 및 비교 mAb CDA-1 및 CDB-1에 의해 생성된 결과 EC_{50} 값을 나타낸 것이다. 패널은 임상적으로 관찰되는 비율(94, 95)에 거의 비례적으로 리보타입 001, 002, 003, 012, 014, 017, 027 및 078을 포함하며, 예외적으로 리보타입 017 $tcdA^- tcdB^+$ 균주는 패널에 과-표현되었다(over-represented). $tcdA^- tcdB^+$ 균주에서 유래된 상청액은 독소 B를 단독으로 함유하는 상청액에 의한 치사에 불응하는 세포들을 확인하는 도구로 사용되었으며, 따라서 독소 A 매개 세포독성을 검사하는데 적합하다. VPI 10463도 패널에 포함되었으며, 이는 정제 및 미정제 독소에 의해 수득되는 결과들을 비교할 수 있게 해주었다.

[0336] 본 연구에서, 인간화 mAb PA-50은 독소 A를 균주-비의존적인 방식으로 중화하였다. EC_{50} 의 중간값은 32 pM이었고(범위: 20 내지 127 pM, 표 7), 통상 2개 이상의 힐 슬롭(Hill slopes)을 갖는 가파른 용량-반응 곡선이 관찰되었다(도 25c). PA-50은 각 시험 분리체에 대해 CDA1보다 활성이 높았다. 패널에 포함된 리보타입 078 균주 및 맹독성 027 균주에 대해 최대 역가 차이를 보였는데, PA-50은 CDA1보다 약 1,000배 더 강력하였다($P=0.0002$).

[0337] 인간화 mAb PA-41는 23pM의 EC₅₀ 중간값으로 각 tcdA⁺tcdB⁺ 균주를 강력하게 저해하였으며(범위: 7.7 내지 129 pM, 표 7), 본질적으로 완전한 중화는 더 높은 농도에서 관찰되었다(도 25d). PA-41은 일반적으로 tcdA⁺tcdB⁺ 균주에 대해 CDB1보다 더 효과적이었으며, 맹독성 027 균주에 대해 약 500배 더 강력하였다(P=0.003). CDB1은 리보타입 017 tcdA⁻tcdB⁺ 균주에서 유래하는 독소 B를 중화하는데 효과적이었으나, PA-41은 그렇지 않았다. 최종적으로 PA-41 및 PA-50은 참조 균주 VPI 10463에서 유래되는 조 형태 및 정제 형태의 독소에 대해 유사한 활성을 나타내었다(표 7 및 도 25c 및 25d).

표 7

다양한 클로스트리듐 디피실리 균주에서 유래되는 독소의 생체 외 중화

리보타입	균주	EC ₅₀ , pM			
		항-독소 A mAb		항-독소 B mAb	
		PA-50	CDA1	PA-41	CDB1
001	CCL14137	39	611	9.7	129
001	MH5	127	384	18	73
001	Pitt 2	27	247	13	92
002	UVA17	26	825	129	671
003	VPI 10463	20	1271	7.7	136
012	545	38	4552	15	153
012	630	54	1019	111	1782
014	UVA30/TL42	51	625	21	324
017	CCL13820	N/A	N/A	>10 ⁵	72
017	F1470	N/A	N/A	>10 ⁵	46
017	Pitt 102	N/A	N/A	>10 ⁵	8.1
027	CCL678	29	58,950	77	>10 ⁵
027	CCL14402	ND	ND	19	4,678
027	CD196	61	132,600	16	9,812
027	HMC553	29	109,000	24	14,730
027	Montreal 5	29	87,090	36	25,810
027	Montreal 7.1	31	109,400	29	16,800
027	Pitt 45	43	108,100	29	26,510
078	Pitt 07	32	>10 ⁵	59	8,415

[0338]

[0339] 본 실시예에서 도시된 것처럼, 인간화 mAb PA-50 및 PA-41은 각각 현재 전염성 CDI를 대표하는 유전적으로 다양한 균주에서 유래하는 클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 B에 대해 고수준의 중화 활성을 나타내었다. 이들 mAb의 활성 범위는 독소 내 유전형 및 표현형 다양성을 고려해 볼 때 주목할만하다. 특히 PA-50 및 PA-41은 맹독성, 항생제 저항성 027 균주에 의해 생성되는 독소를 피코몰 활성으로 중화한 반면, 비교 mAb는 나노몰 활성을 갖는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 이전에 보고된(90)바와 같이 027 균주에서의 독소 A에 대한 CDA-1 결합의 감소를 반영할 수 있다. 027 균주에서 유래된 독소 B는 다른 클로스트리듐 디피실리 균주에 비해 현저한 서열 차이를 나타낸다. 서열 차이는 카복시-말단수용체-결합 영역 내에 집중되며, 증가된 생체 외 세포독성과 관련된다. 그러나 이러한 서열 차이는 독소 B의 아미노-말단 영역 내 에피토프와 결합하는 PA-41의 중화 활성에는 영향을 미치지 않았다. PA-50 및 PA-41은 최근의 027 유병 출현보다 앞선 균주 CD196를 포함하여, 패널 내 모든 6개의 027 균주를 피코몰 역가로 중화시켰다. 전체적으로, 이러한 발견은 PA-50 및 PA-41에 대한 에피토프들이 027 혈통 전반에 광범위하게 보존되어 있음을 보여준다.

[0340] CDI는 통상 독소 A 및 B 모두를 생성하는 클로스트리듐 디피실리 균주에 의해 발병된다. 그러나, tcdA⁻tcdB⁺ 균주 또한 이 질병에 연관되어 있다. 임상적으로 관련된 tcdA⁻tcdB⁺ 균주는 주로 리보타입 017이다. 리보타입 017 균주는 햄스터에서 감소된 병독성을 나타내며, 아미노-말단 영역이 VPI 10463 유래 tcdB와 C. sordellii 에서 유래하는 치명적인 독소(tcsL) 양자와 70-80% 서열상동성인 비전형 tcdB를 코딩하는 것으로 보고되었다. 표현형

적으로 리보타입 017 tcdB는 히브리드 특성을 가지며, 각각 전형적인 tcdB 및 tcsL 독소의 수용체-결합 성질 및 글리코실화 특이성을 나타낸다. 017 tcdB 의 비전형 아미노-말단 영역은 왜 이 독소가 본 연구에서 PA-41에 의해 중화되지 않는지를 설명해준다. 비록 017 균주는 지역적으로 유행하고 CDI의 국소적인 발생을 야기할 수 있으나, 전체적으로 최근 CDI 치료를 위한 탐색적 요법의 국제적인 3상 임상 연구에서 볼 수 있는 균주들의 2% 미만을 구성하는 것으로 밝혀졌다(94, 95).

[0341] 실시예 9

[0342] 키메라 mAb의 생성

[0343] 모 마우스 mAb의 가변 영역 및 인간 IgG1의 불변 영역을 포함하는 키메라 단일클론 항체를 제조하고 그 특성을 분석하였다. 키메라 mAb의 제조는 정확한 항-독소 활성 및 결합 특이성을 갖는 쥐과 동물 가변 영역이 클로닝되고 쥐과 동물 가변 영역과 인간 불변 영역의 구축이 각 클로닝된 mAb의 결합 및 중화 성질을 그다지 변화시키지 않았음을 보증하기 위한 것이었다. 키메라 mAb는 통상적으로 모 마우스 mAb와 동일한 결합 활성을 나타낸다.

[0344] MAb PA-38, PA-39, PA-41 및 PA-50은 모두 카파 경쇄를 함유한다. 키메라 mAb를 생성하기 위해, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 핵산서열을 비제한적인 예로 각각 pCON 감마1 및 pCON 카파(Lonza Biologics, Berkshire, UK)와 같은 적당한 발현 벡터내로 삽입하였다. 적합한 플라스미드는 인간 카파 경쇄의 불변 영역 또는 인간 IgG1 중쇄의 불변 영역을 코딩한다. 키메라 mAb 제조를 위해, 각 mAb의 중쇄의 가변 영역을 pCON 감마1 플라스미드에 클로닝하였다. 경쇄 유전자를 함유하는 플라스미드에 완전한 중쇄 유전자를 서브클로닝하여 중쇄 및 경쇄 유전자 모두를 코딩하는 단일 플라스미드를 만들었다. 제조자 제안 프로토콜에 따라 Effectene(Qiagen, Valencia, CA)을 사용하여 이 발현 벡터로 293F 세포를 일시적으로 형질감염하였다. 형질감염후 7일간 분비된 키메라 mAb를 함유하는 세포 상청액을 수집하고 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다. 키메라 mAb(s) 및 쥐과 동물 mAb에 대해 세포독성 및 적혈구 응집 분석에서 역가 및 활성을 비교하였다.

[0345] 전술한 과정에 따라, 모 마우스 PA-39 및 PA-41 mAb에 기초하여 키메라 mAb(cPA-39 및 cPA-41)를 생성하였다. 조 세포 상청액 내 이들 키메라 mAb의 농도는 약 2~11 µg/mL이었다. 특히, cPA-39를 생성하는 형질감염된 293F 세포 배양에서 유래된 조 상청액은 10.6 µg/mL의 키메라 mAb를 함유하는 반면, cPA-41 를 생성하는 여러 형질감염된 293F 세포 배양에서 유래된 조 상청액은 9.6~10.9 µg/mL의 키메라 mAb을 함유하였다.

[0346] 키메라 mAb와 그들 각각의 모 마우스 mAb의 생체 외 클로스트리듐 디피실리 독소 중화능은 전술한 바와 같이(실시예 3) 세포독성 분석(cPA-39: CHO-K1 세포, cPA-41: CHO-K1세포 및 cPA-50: T-84 세포)를 수행하여 비교하였다. 도 26(PA-41), 도 27(PA-39) 및 도 28(PA-50)에 나타난 바와 같이 모든 키메라 mAb는 그 쥐과 동물 모 mAb와 비교시 동등한 효과를 나타내는 것으로 판명되었다. 이러한 결과는 모 마우스 mAb와 동등한 독소 중화 역가를 갖는 기능적 키메라 mAb의 제조 및 키메라화가 성공적임을 보여준다.

[0347] 실시예 10

[0348] 쥐과 동물 mAb(s)의 인간화 및 본 발명의 인간화 mAb의 생체 외 독소 중화 역가 시험

[0349] 인간화 mAb는 본 기술분야의 공지 방법으로 생성되었다. 다양한 인간화 mAb에 대한 기술 및 예는, 예컨대 Zenapax (65,66) Synagis (67-69), Herceptin (70-72), Mylotarg (73,74), Xolair (75-77), Raptiva (78-80), Avastin (81,82) 및 Tysabri (83)를 포함한다. 인간에서 mAb 활성이 불리하게 영향받지 않도록 면역원성을 최소화하는데 효과적인 인간화 단일클론 항체가 생성될 수 있다(84-87). 바람직하게, 인간화 mAb는 모 마우스 mAb의 2배 이내의 독소-중화 활성을 입증하였다. 나아가 인간화 mAb는 클로스트리듐 디피실리 감염 햄스터 모델에서 강력한 효능을 최적으로 입증하였다.

[0350] 상보성 결정 영역(CDR) 이식에 대한 확립된 방법이 여기에 기술된 쥐과 동물 항-독소 A 및/또는 항-독소 B mAb의 인간화 형태를 생성하는데 사용되었다. 인간화 mAb(s)와 모 마우스 mAb의 생체 외 및 생체 내 독소-중화 활성이 비교되었다. 본 발명에 따라, 인간화 mAb(s)는 모 쥐과 동물 mAb의 항-독소 활성을 보유할 수 있으며, 또한 인간에 반복 투여하는데 적합하다.

[0351] A. 쥐과 동물 mAb의 중쇄 및 경쇄 유전자의 분자 클로닝

[0352] 항체 유전자 클로닝을 위해 확립된 방법이 사용되었다(88). 간략하게 기술하면, 제조자 제안 프로토콜에 따라 TRIzol 시약(Invitrogen)을 사용하여 1×10^7 하이브리도마 세포로부터 전체 RNA를 정제하였다. 5µg의 전체 RNA를 oligo-dT 프라이머 및 SuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen)을 사용하여 역전사하였다. 생성되는

cDNA를 RNase H로 처리하여 RNA 주형을 제거한후, QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen)로 정제하여 자유 뉴클레오타이드 및 프라이머를 제거하였다. 다음, dGTP 존재하에 제조자 제안 프로토콜에 따라 효소 말단 트랜스페라제(NEB)를 사용하여 cDNA의 3' 말단에 구아닌 뉴클레오타이드의 꼬리를 추가하였다. 생성되는 꼬리달린(tailed) cDNA는 이후 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역에 어닐링되는 하나의 프라이머 및 cDNA의 구아노신 꼬리에 어닐링되는 하나의 유니버설 프라이머를 사용하여 PCR 하였다. 중쇄 및 경쇄 모두를 위해, 유니버설 프라이머 5' TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCC3' (서열번호: 11)가 사용되었다. 경쇄를 증폭시키기 위해, 프라이머 5' TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC3' (서열번호: 12)가 사용되고, 중쇄는 프라이머 5' TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC(CAT)GATGGGG(GC)TGT(TC)GTTTGGC3' (서열번호: 13)를 사용하여 증폭하였으며, 이때 괄호안 서열은 염기 퇴보(base degeneracies)를 나타낸다. 생성되는 PCR-증폭된 DNA는 QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen)로 정제하고 서열분석하였다. 약 500 염기쌍 DNA 단편이 증폭되는 동안 에러가 도입되지 않도록 PCR 반응은 세 번(triplicate)로 수행되고 서열분석되었다.

[0353] **B. mAb 가변 영역의 인간화**

[0354] 인간화 mAb 서열을 제조하기 위해, CDR 구조에 중요한 프레임워크 아미노산 잔기를 먼저 확인하였다. 병행하여, 각각 쥐과 동물 V_H 및 V_L 에 높은 상동성을 갖는 인간 V_H 및 V_L 서열을 공지된 인간 면역글로불린 서열로부터 선택하였다. 쥐과 동물 mAb에서 온 CDR 서열을 필요한 경우 CDR 구조 유지에 중요한 프레임워크 아미노산 잔기와 함께, 선택된 인간 프레임워크 서열 내로 이식하였다. 또한 생성된 인간화 mAb의 잠재적 면역원성을 경감시키려는 노력의 일환으로, 상응하는 V 영역 하위그룹에서 비전형적인 것으로 밝혀진 인간 프레임워크 아미노산 잔기는 전형적인 잔기로 치환하였다. 이러한 인간화 V_H 및 V_L 영역은 각각 비제한적인 예로 pCON 감마1 및 pCON 카파(Lonza Biologics, Berkshire, UK)와 같은 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 이들 벡터들은 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자의 불변 영역을 코딩한다. Effectene 시스템(Qiagen, Valencia, CA)을 사용하여 이들 발현 벡터로 293F 세포를 일시적으로 형질감염하였다. 형질감염후 7일간 분비된 인간화 mAb을 함유하는 세포 상청액을 수집하고 단백질을 A 크로마토그래피로 정제하였다.

[0355] **C. 인간화 mAb를 발현하는 클로닝된 적합한 CHO 세포의 생성**

[0356] 안정적인 CHO 세포/세포주 생성은 생체 외 세포 분석 및 골든 시리안 햄스터에서의 클로스트리듐 디피실리 관련-설사(CDAD) 모델 모두에서 시험하기에 충분한 양의 mAb 제조를 가능하게 한다. 안정적으로 형질감염된 CHO 세포를 생성하기 위해 한 예로, 글루타민 신테타제 선택 및 증폭 시스템(GS)을 사용한 Lonza Biologics(Berkshire, UK) 제조 CHO K1 SV 세포를 사용할 수 있다. Lonza GS 시스템은 통상 상당량의 인간화 mAb을 제조할 수 있는 고-생산 CHO 세포를 산출한다.

[0357] CHO K1 SV 세포는 1X 글루타민(Invitrogen) 및 1X H/T Supplement (Invitrogen)로 보충된 CD CHO 세포 배양 배지(Invitrogen)에서 팽창시켰다. 100 μ L의 멸균 TE 완충액 내 재현탁시킨 40 μ g의 선형화된 플라스미드 DNA와 함께 1×10^7 의 살아있는 세포들을 290 V, 무한 저항 및 960 μ F에서 전기천공하였다. 50 ml의 완전 CD CHO 배지를 함유하는 T-150 플라스크에 세포들을 넣고 약 48 시간동안 37°C 및 8.0% CO₂에서 인큐베이션하였다. 세포들을 원심분리하고, 100 μ M MSX(Sigma) 함유 GS 선택 배지(CD CHO + 1X GS Supplement(JRH Biosciences) + 1X H/T Supplement)에 최종 밀도 3.3×10^5 세포/ml로 재현탁하고, 96 웰 플레이트(Corning)에 5000 살아있는 세포/웰로 플레이팅하고, 약 3~4 주동안 1차 세포 콜로니(형질감염된 세포 클론들)가 나타날때까지 인큐베이션하였다. 제조용 mAb 제조를 위해, 조심스럽게 20 μ L의 상청액을 제거하여 약 300개의 세포 콜로니(클론)를 샘플링하고, 96-웰 포맷으로 ELISA 분석을 수행하였다. 간략하게 기술하면, 96-웰 플레이트를 포획 항체(염소 항-인간 항체)로 코팅하고, 클로닝된 CHO 형질 감염체(1:800 희석)에서 유래한 상청액을 추가하여 플레이트 웰에 결합된 포획 항체에 결합하도록 하였다. 세척후, 2차 항체(알칼린 포스파타제 콘주게이트된 염소 항-인간 항체)를 플레이트에 가하고 샘플 내 인간 항체에 결합하도록 한 후, 세척하여 비-특이적 결합체들을 제거하였다. 이후 플레이트를 1-Step PNPP 키트(Thermo, Rockford, IL)를 사용해 알칼린 포스파타제 활성에 대해 분석하여, 항체를 최대로 분비하는 클론을 확인하였다. 고함량의 mAb을 생성하는 클론을 1X 글루타민 및 1X H/T Supplement로 보충된 CD CHO 세포 배양 배지에서 팽창시켰다. 분비된 인간화 mAb을 함유하는 세포 상청액을 수집하고 단백질을 A로 정제하였다. 가장 좋은 산출을 나타내는 클론을 제한 희석으로 서브클로닝하고 스케일-업하여, 그램 단위량의 제조용 인간화 단일클론 항체를 제조하였다.

[0358] **D. 인간화 mAb hPA-39, hPA-41 및 hPA-50**

- [0359] 분자적으로 클로닝된 인간화 mAb를 전술한대로 분리하고, 그 특성을 확인하였다(하기 섹션 E 참조). 각 인간화 항체의 경쇄(L) 불변 영역(CL)은 카파(κ) 클래스의 경쇄 불변 영역이고; 각 인간화 항체의 중쇄(H) 불변 영역(CH)은 IgG1 아이소타입의 중쇄 불변 영역이다. 독특한 가변(V) 영역을 함유하는 인간화 mAb는 클로스트리듐 디피실리의 독소 A 또는 독소 B에 결합하고 그 활성을 중화시키는 것으로 판명되었다. 인간화 mAb의 L 및 H 쇠의 V 영역은 완전 면역글로불린(Ig) 또는 통상 디설파이드 결합으로 연결된 두 개의 H 쇠 폴리펩티드 및 두 개의 L 쇠 폴리펩티드로 구성된 항체 분자의 부분을 형성하거나, 또는 이들은 별개의 항체 부위 또는 단편, 특히 독소 A 및/또는 독소 B에 결합하고/하거나 독소 활성을 중화하는 항체 부위 또는 단편일 수 있다. 적합한 V-영역-함유 면역글로불린 단편 또는 부위의 비제한적인 예로 F(ab), F(ab'), 또는 F(ab')₂ 단편을 포함한다.
- [0360] 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 및 독소 B mAb는 전술한 과정에 따라 제조되었다. 인간화 공정은 감수성있는 세포에서 독소 A에 결합하고 독소 A 활성을 중화하는 수 개의 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A 인간화 mAb(hmAb)를 산출하였다. 이러한 hmAb의 예로 서열번호 1의 VH 영역(도 32a) 및 인간 IgG1 C 영역을 포함하는 H 쇠 폴리펩티드 서열과 서열번호: 3의 VL 영역(도 33a) 및 인간 카파 C 영역을 포함하는 L 쇠 폴리펩티드 서열을 포함하는 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A mAb; 서열번호: 2의 VH 영역(도 32b) 및 인간 IgG1 C 영역을 포함하는 H 쇠 폴리펩티드 서열과 서열번호: 3의 VL 영역(도 33a) 및 인간 카파 C 영역을 포함하는 L 쇠 폴리펩티드 서열을 포함하는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A hmAb; 서열번호: 1의 VH 영역(도 32a) 및 인간 IgG1 C 영역을 포함하는 H 쇠 폴리펩티드 서열과 서열번호: 4의 VL 영역(도 33b) 및 인간 카파 C 영역을 포함하는 L 쇠 폴리펩티드를 포함하는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A hmAb; 및 서열번호: 2의 VH 영역(도 32b) 및 인간 IgG1 C 영역을 포함하는 H 쇠 폴리펩티드 서열과 서열번호: 4의 VL 영역(도 33b) 및 인간 카파 C 영역을 포함하는 L 쇠 폴리펩티드 서열을 포함하는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A hmAb 을 포함한다. 이러한 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A mAb는 본 발명의 PA-39 hmAb(hPA-39)를 포함한다. 두 개의 L 쇠 및 두 개의 H 쇠를 갖는 완전 hPA-39 면역글로불린은 본 발명의 VH 영역(예, 서열번호: 1; 서열번호: 2) 및 적당한 CH 영역, 예컨대 Genbank 수탁번호 NW_001838121에 함유된 IgG1 아이소타입의 CH 영역으로 구성된 hPA-39 H 쇠 폴리펩티드와 본 발명의 hPA-39 VL 영역(예, 서열번호: 3; 서열번호: 4) 및 적당한 CL 영역, 예컨대 GenBank 수탁번호 NW_001838785에 함유된 카파 서브타입의 CL 영역으로 구성된 hPA-39 L 쇠 폴리펩티드를 공발현하고 분비하는 숙주 세포에서 제조될 수 있다.
- [0361] 본 발명의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A mAb의 다른 예는 서열번호: 5의 VH 영역(도 34a) 및 인간 IgG1 C 영역을 포함하는 H 쇠 폴리펩티드 서열과 서열번호: 7의 VL 영역(도 35) 및 인간 카파 C 영역을 포함하는 L 쇠 폴리펩티드 서열을 포함하는 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A mAb; 및 서열번호: 6의 VH 영역(도 34b) 및 인간 IgG1 C 영역을 포함하는 H 쇠 폴리펩티드 서열과 서열번호: 7의 VL 영역(도 35) 및 인간 카파 C 영역을 포함하는 L 쇠 폴리펩티드 서열을 포함하는 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A mAb를 포함한다. 이러한 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A mAb는 본 발명의 인간화 PA-50(hPA-50) mAb를 포함한다. 두 개의 L 쇠 및 두 개의 H 쇠를 포함하는 완전 hPA-50 면역글로불린은 본 발명의 VH 영역(예, 서열번호: 5; 서열번호: 6) 및 적당한 CH 영역, 예컨대 Genbank 수탁번호 NW_001838121에 함유된 IgG1 아이소타입의 CH 영역으로 구성된 hPA-50 H 쇠 폴리펩티드와 본 발명의 VL 영역(서열번호: 7) 및 CL 영역, 예컨대 GenBank 수탁번호 NW_001838785에 함유된 카파 서브타입의 CL 영역으로 구성된 hPA-50 L 쇠 폴리펩티드를 공-발현하고 분비하는 적당한 숙주 세포에서 제조될 수 있다.
- [0362] 인간화 공정은 나아가 감수성 있는 세포에서 독소 B와 결합하고 독소 B 활성을 생체 외 중화시키는 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B 인간화 mAb를 산출하였다. 이러한 hmAb의 예는 서열번호: 8의 VH 영역(도 36a) 및 인간 IgG1 C 영역을 포함하는 H 쇠 폴리펩티드 서열과 서열번호: 10의 VL 영역(도 37) 및 인간 카파 C 영역을 포함하는 L 쇠 폴리펩티드 서열을 포함하는 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B mAb; 및 서열번호: 9의 VH 영역(도 36b) 및 인간 IgG1 C 영역을 포함하는 H 쇠 폴리펩티드 서열과 서열번호: 10의 VL 영역(도 37) 및 인간 카파 C 영역을 포함하는 L 쇠 폴리펩티드 서열을 포함하는 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B mAb 를 포함한다. 이러한 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B mAb는 본 발명의 인간화 PA-41(hPA-41) mAb를 포함한다. 두 개의 L 쇠 및 두 개의 H 쇠를 갖는 완전 hPA-41 면역글로불린은 본 발명의 hPA-41 VH 영역(예 서열번호: 8; 서열번호: 9) 및 적당한 CH 영역, 예컨대 Genbank 수탁번호 NW_001838121에 함유된 IgG1 아이소타입의 CH 영역으로 구성된 hPA-41 H 쇠 폴리펩티드와 본 발명의 hPA-41 VL 영역(예, 서열번호: 10) 및 CL 영역, 예컨대 GenBank 수탁번호 NW_001838785에 함유된 카파 서브타입의 CL 영역으로 구성된 hPA-41 L 쇠 폴리펩티드를 공발현하고 분비하는 적당한 숙주 세포에서 제조될 수 있다.
- [0363] 또한, 클로스트리듐 디피실리 독소 A 또는 독소 B와 결합하여 독소 활성을 강하게 중화시키는 인간화 클로닝된

mAb(hmAb)가 제조되었다. 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A hmAb PA-50은 각각 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드와 각각 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성되어 있다. 서열번호: 14의 hPA-50 중쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)이 서열번호: 15에 기재되어 있고(도 38b); 서열번호: 16의 hPA-50 경쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)이 서열번호: 17에 기재되어 있다(도 38a). 항-클로스트리듐 디피실리 독소 A hmAb PA-39는 각각 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드와 각각 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성되어 있다. 서열번호: 18의 hPA-39 중쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)이 서열번호: 19에 기재되어 있고(도 39b); 서열번호: 20의 hPA-39 경쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)이 서열번호: 21에 기재되어 있다(도 39a). 항-클로스트리듐 디피실리 독소 B hmAb PA-41은 각각 VH 영역 및 인간 CH 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 폴리펩티드와 각각 VL 영역 및 인간 CL 영역을 포함하는 두 개의 경쇄 폴리펩티드로 구성되어 있다. 서열번호: 22의 hPA-41 중쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)이 서열번호: 23에 기재되어 있고(도 40b); 서열번호: 24의 hPA-41 경쇄 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열(또는 cDNA)이 서열번호: 25에 기재되어 있다(도 40a).

[0364] 단일클론 항체 CDA-1 및 CDB1(7, 89)가 비교 mAb로 사용되기 위해 제조되었다. 3D8 및 124의 Ig 중쇄 및 경쇄 가변영역(WO2006/121422 및 US2005/0287150)을 코딩하는 DNA 서열을 합성하고(DNA2.0), 벡터 pCON-감마1 및 pCON-카파 내로 클로닝하였다. 전장 IgG1,k mAb는 안정적으로 형질감염된 CHO-K1SV 세포 내에서 발현시키고 전술한 바와 같이 정제하였다. 비아코어에 의해 독소 A 및 B에 대한 결합 친화성, 공지 방법(7)에 따라 독소-매개 세포변성 효과의 저해 및 적혈구 응집을 시험하였을때, 상기 CDA1 및 CDB1 제제는 예측된 수준의 활성을 나타내었다.

[0365] E. 인간화 mAb의 생체 외 특성 확인

[0366] 생체 외 클로스트리듐 디피실리 독소 중화 실험을 수행하여, 인간화 mAb와 모 마우스 mAb의 기능적 활성을 비교하였다. 도 29에 나타난 바와 같이, 인간화 PA-41(hPA-41) mAb는, 9 pM의 EC₅₀를 갖는 쥐과 동물 PA-41 mAb(mPA-41)에 비해, 더 강력하게 독소 B의 세포독성을 중화하였다(6 pM의 EC₅₀). 유사하게, 인간화 PA-39 mAb(hPA-39) 및 인간화 PA-50 mAb(hPA-50)는 각각 CHO-K1 세포 또는 T-84 세포를 이용한 독소 A 중화에 있어, 그들의 쥐과 동물 모 mAb와 동등한 강한 활성을 나타내었다(hPA-39에 대해서는 도 30 및 hPA-50에 대해서는 도 31에 도시). 이러한 결과는 모 쥐과 동물 mAb가 성공적으로 인간화되며 이들 인간화 mAb는 기능적이며 효과적임을 입증한다.

[0367] 본 연구에서 조사한 항-클로스트리듐 디피실리 독소 mAb 중에, PA-50은 통상 두 개가 넘는 힐(Hill) 계수를 갖는 뚜렷한 용량-반응 중화 곡선을 나타내었으며, 이는 협동 저해(cooperative inhibition)를 나타낸다. 협동 작용은 자연계에서 흔하며, 종종 가파른 용량-반응 곡선 및 1을 초과하는 힐 계수를 갖는 특징을 나타낸다. 협동 활성을 보이는 약물은 바이러스 감염 치료에서 증강된 임상 활성과 관련되어 있다. 또한 PA-50은 독소 A에 다가 형식(multivalent fashion)으로 결합한다. 다가 형식은 협동을 위해 종종 필요한 조건이나 충분 조건은 아니다.

[0368] 실시예 11

[0369] 본 발명의 쥐과 동물 항-독소 mAb의 Fab 단편의 생성

[0370] A. Fab 단편의 제조

[0371] Fab 단편화는 제조자 지시에 따라 마우스 IgG1 Fab 및 F(ab')₂ 제조 키트(Pierce)와 키트에 공급되어있는 시약을 사용하여 수행하였다. 동일한 단편화 프로토콜을 모든 mAb; PA-39, PA-41 및 PA-50에 사용하였다. 간략하게 기술하면, 고정된 피신 슬러리(750 µl)를 소화 완충액으로 세척한 후(75mM cysteine, pH 5.6) 약 3 mg의 mAb를 가하고, 혼합물을 4 시간 동안 37°C에서 일정하게 엔드-오버-엔드 회전(end-over-end rotation)하면서 인큐베이션하였다. 소화가 종결된 후, 슬러리를 원심분리하고 소화 산물을 수집하였다. 슬러리는 단백질 A 결합 완충액으로 3회 세척하고 세척물을 종결된 소화물에 가하였다. NAb 단백질 A 칼럼을 단백질 A 결합 완충액으로 평형화시키고 소화된 항체 샘플을 가하였다. 칼럼과 샘플은 실온에 10분간 인큐베이션하였다. 칼럼을 1000g에서 1분간 원심분리하여 Fab 단편을 함유하는 유동물(flow through)을 수집하였다. 칼럼을 단백질 A 결합 완충액으로 3회 세척하였다. 유동물을 수거하고 PBS로 완충액 교환하고 농축하였다.

[0372] B. Fab 단편의 SDS-PAGE

- [0373] Novex gel system(Invitrogen)을 사용하여 SDS-PAGE로 샘플을 분석하고, 후술하는 모든 시약은 달리 지시되지 않는 한 Invitrogen에서 구입한 시약을 사용하였다. 샘플을 NuPage 샘플 완충액과 혼합하고 DTT로 환원시켰다. 환원 및 미환원된 샘플을 100℃에서 10분간 인큐베이션하였다. 샘플(4 μ g)을 4~12% Bis Tris NuPage겔에 로딩한 후, 전기 영동을 수행하였다(MOPS 러닝완충액 사용, 180V에서 60분간 시행). 전기 영동후, 겔을 고정제(40% 메탄올, 10% 아세트산)와 함께 20분간 인큐베이션한 후, 물로 행구고, 일정하게 회전하면서 단순 청색 염색(Simply Blue Stain)으로 발색 염색하였다.
- [0374] **C. Fab의 생체 외 특성 분석**
- [0375] 생체 외 클로스트리듐 디피실리 독소 중화시험을 수행하여 Fab(▲)와 전체 mAb(■)의 기능적 활성을 결합 부위수에 기초하여 비교하였다. PA-39 Fab는 전체 PA-39에 비교해 CHO-K1 세포 상에서 독소 A의 세포독성을 강력하게 중화하였다(각각 880 pM의 EC₅₀ 및 200 pM의 EC₅₀를 나타냄)(도 41a). PA-41 Fab는 CHO-K1 세포상에서 독소 B 활성을 중화시킴에 있어 전체 PA-41와 동등하게 강력한 것으로 판명되었다(각각 88 pM의 EC₅₀ 및 80 pM의 EC₅₀를 나타냄)(도 41b). PA-50 Fab는 T-84 세포상에서 독소 A를 중화시킴에 있어서 1.8 nM의 EC₅₀ 값을 나타내었으며, 전체 PA-50 mAb는 100 pM의 EC₅₀ 값을 나타내었다(도 41c).
- [0376] **실시예 12**
- [0377] **인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 mAb의 인간 조직 시료상에서의 면역조직화학적 분석**
- [0378] 주어진 항원의 발현 연구에 있어 면역조직화학(IHC)의 가치는 마이크로-해부학적 사항, 및 정상 및 암 조직에서의 이종성의 평가를 가능하게 하는데 있다. IHC는 다른 분석 방법보다 유리한데 개개의 세포 타입에 단백질을 직접 국소적 분포시킬 수 있기 때문이다. 정상 및 암 조직에서의 유전자 발현 차이가 검출될 수 있으며, 동시에 세포 수 및 조성의 변화를 알 수 있다. 이 기술의 단점은 연구되는 분자의 발현이 낮아서 위-음성 결과를 나타내거나 유사한 에피토프나 다른 항원에 의해 공유되는 에피토프에의 항체-결합에 기인하는 위-양성 결과(교차-반응성)를 나타낼 수 있다는 점이다. 이러한 단점을 줄이기 위해, 본 연구는 양성 독소-특이적 주입 마우스 대조 시료에 강하고 특이적인 염색을 나타내는 가능한 최저 농도로 각 항체를 사용하여 수행하였다.
- [0379] 인간화 mAb PA-41 및 PA-50은 비오틴화하여, 부신, 방광, 골수, 유방, 소뇌, 대뇌피질, 자궁경부, 결장, 식도, 안구, 나팔관, 심장, 회장, 공장, 신장, 간, 폐, 임파절, 근육, 난소, 말초신경, 췌장, 부갑상선, 뇌하수체, 태반, 전립선, 피부, 소장, 척수, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 노관, 자궁 및 백혈구를 포함하는 동결 인간 조직 선택에서의 면역조직화학적 결합 패턴을 조사하였다. 전술한 37개의 상이한 타입의 인간 조직 중 각각의 하나의 조직을 각 항체로 염색하였다. 양 항체에 대해 위킹 IHC 분석을 전개하였다. 관련없는 인간 IgG1,k 아이소타입 대조 항체는 모든 샘플에 포함시켰다.
- [0380] 조직 제조를 위해, OCT 화합물(Optimal Cutting Temperature embedding compound; Sakura, Torrance, CA)에 임베딩한 동결 시료를 5 마이크로미터로 절단하고 양성으로 하전된 유리 슬라이드상에 위치시켰다. 각 항체 및 조직 시료를 위한 IHC 염색 방법 및 조건을 개발하고, 시험하고 적정화하였다. 금방 절단된 동결 비교 조직 섹션을 사용하여 직접 비오틴화 IHC 과정을 수행하였다. 저온 유지장치에서 슬라이드를 옮겨 실온에서 10분간 공기-건조하고, 실온에서 5분간 95% 에탄올에서 고정하고, 트리스 완충된 식염수/0.1% Tween-20 세척 완충액(TBST; DakoCytomation)의 3 연속 베스에서 3분간 세척하였다. 모든 후속되는 세척은 전술한 방식으로 수행하였다. 내인성 퍼옥시다제 활성은 실온에서 즉시-사용 퍼옥시다제 블록으로 5분간 인큐베이션하여 차단하였다. 완충액으로 세척한 후, 내인성 비오틴 활성은 비오틴에 의해 후속되는 각 아비딘과 15분간 인큐베이션하여 차단하였으며, 각 단계는 후속하여 완충액 세척하였다. PA-41을 위해, 슬라이드를 배경 스나이프 단백질 차단 시약과 함께 10분간 실온에서 인큐베이션하였으며, 후속되는 완충액 세척은 없었다. 슬라이드를 시험 제품 또는 음성 대조 시약(PA-41을 위해 1.25 mg/ml 사용하고 PA-50을 위해 10 mg/ml 사용)과 함께 실온에서 30분간 인큐베이션하였다. PA-50 제1 항체는 Dako 희석제에 1:350으로 희석하고, PA-41 제1 항체는 프롤라인(250mM, 0.576g, Genzyme, CA) 및 히스티딘(15mM, 0.046g, Genzyme, CA)을 희석제 20 ml(pH 7.7)에 추가하여 제조한 Dako 희석제에 1:3520으로 희석하였다. TBST에 세척하고, ABC 검출시약(TBST내 1:50)을 양 항체 분석용 조직 섹션에 적용하고 30분간 실온에서 인큐베이션한 후 완충액으로 세척하였다. 3,3'-디아미노벤지딘 테트라클로라이드(DAB) 용액과 함께 5분간 실온에서 인큐베이션하여 면역반응을 가시화하였다. 슬라이드를 탈이온(DI)수로 각각 30-60 초간 3회 세척하고, 변형 Mayers 헤마톡실린(DakoCytomation)으로 대비염색하고, 0.2% 암모니아에서 청색화한후, 등급 알코올로 탈수시키고 자일렌에서 세척하고 커버글라스를 덮었다. 염색된 슬라이드의 해석은 현미경 검사로 수행하였다. 일반적으로 항체 염색후 슬라이드상 조직의 형태학적 검토는 적정량의 조직이 존재

하는지 여부와 지정된 정상 조직 요소들이 적절히 재현되어 있는지 여부를 결정한다. 상기 기준을 만족시키지 못하는 샘플은 연구 병리학자에 의해 분석에서 거부되었다.

[0381] 점수 시스템은 염색 강도의 반-정량적 분석을 포함한다. 시험 제품의 염색 강도는 음성 대조 항체로 염색된 인 근 섹션을 함유하는 조직 대조 슬라이드의 강도에 비교하여 판단되었다. 음성 시약 대조로 라벨링된 섹션의 염 색은 "배경(background)" 염색으로 간주되었다. "0"은 배경에 비해 염색없음을 나타내고; "1+"은 약한 염색; "2+"는 중간 정도의 염색; 및 "3+"은 강한 염색을 나타낸다. 표준 병리학 실무에 따라 염색 강도는 모든 조직 요소에 관찰되는 최고 수준의 강도에서 보고되었다.

[0382] 인간화 PA-50 및 PA-41 mAb 모두에 대한 IHC 분석 결과 시험된 인간 조직 시료 중 어느 것에서도 양성 염색(0%) 은 나타나지 않았다. 독소-주입된 마우스 다리 근육 대조 조직(PA-50 에 대해 독소 A 및 PA-41에 대해 독소 B) 에서 연구 내내 일관된 강한 염색(예, 3+)이 표시되었다. PA-50에 대해, 어떤 조직 샘플에서도 진실 양성 염색 은 나타나지 않았다(즉 100% 세포가 0% 염색을 보였다). PA-41에 대해 시험된 37가지 인간 조직에서 진실 양성 염색이 나타나지 않았으나, 정상 간(리포크롬 색소로 인해), 정상 폐(외부체를 갖는 폐 마크로파지) 및 정상 근 육(인공 염색에 일치하는 반응)에서 최고 염색 강도로서 약한(1+) 양성 염색이 보였다(리포크롬 색소로 인해). PA-41에 대한 이러한 약한 염색값은 분석내 최소 염색 변동을 고려하여 볼 때 모든 대조에 비교하여 사소한 것 으로 간주되었다.

[0383] 실시예 13

[0384] 비-인간 영장류에서의 인간화 항-클로스트리듐 디피실리 독소 mAb의 약물동력학 분석

[0385] 비-나이프(non-naive) 키노몰구스 원숭이에 대해 정제 인간화 mAb PA-41 또는 mAb PA-50을 사용하여 약물동력학 (PK) 연구를 수행하였다. 본 연구에서, 수컷 비-나이프 키노몰구스 원숭이(Macaca fascicularis)에 1 mg/kg/동 물 또는 5 mg/kg/동물의 정제 인간화 mAb PA-41 또는 mAb PA-50을 정맥 주사하였다. 본 연구는 동물실험 관련 위원회(IACUC) 정책 및 과정에 따라 수행하였다.

[0386] 표 8은 PK 연구 형식을 나타낸 것이며, 각 mAb(10 mg/kg 농도)는 비-나이프 동물에 두 용량 수준에서 정맥 주사 되었음을 보여준다.

표 8

비 인간 영장류에서 인간화 mAb PK 연구

그룹	처리	경로	용량수준 (mg/kg/day)	농도 (mg/kg)	용량부피 (mL/kg/day)	원숭이 수 (수컷)
1	PA-41	IV	1	10	0.1	3
2	PA-41	IV	5	10	0.5	3
3	PA-50	IV	1	10	0.1	3
4	PA-50	IV	5	10	0.5	3

[0387]

[0388] 연구 개시시 동물에 연구 항체를 단회 정맥 주사하였다. 그 후 각 동물로부터 29일내 14개의 별개 시점에 정맥 혈관을 정맥천자하여 혈액샘플을 수득하였다(즉, 투여전; 투여후 1일에 0.5, 2, 6, 12 및 24 시간; 및 투여후 3, 4, 7, 9, 12, 15, 22 및 29일). 혈액 샘플은 혈청 분리 튜브로 수집하고 응고될 때까지 얼음(wet ice)상에 유지하였다. 응고후 혈액샘플을 4℃, 1800g에서 15분간 원심분리하여 혈청을 수득하였다. 혈청 샘플은 사용할때 까지 -70℃에서 보관하였다.

[0389] 혈청내 mAb 농도는 ELISA로 측정하였다. 96-웰 ELISA 플레이트(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY)를 100 ng/웰의 독소 A(Techlab) 또는 독소 B(Techlab)로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 플레이트는 PBS/0.05% Tween-20® PBS-T로 3회 세척하고 200 탕의 차단 완충액(칼슘 또는 마그네슘이 없는 PBS, 0.1 % Tween 20®, 1% 카제인)로 1 시간 동안 실온에서 차단하였다. 항체 표준 표준(정제 mAb PA-41 또는 mAb PA-50)을 1% 합동 나이

브 키노몰구스 원숭이 혈청(Bioreclamation)에서 회석하여 0.3 ~ 4000 ng/ml의 범위로 표준 곡선을 생성하였다. 회석된 시험 샘플 및 표준을 세 벌로 시험하고 1 시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다.

[0390] 플레이트를 PBS-T로 6회 세척하고 HRP-콘쥬게이트된 염소 항-인간 IgG1(The Binding Site, San Diego, CA)과 함께 1 시간동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 SureBlue TMB 1-컴포넌트 퍼옥시다제 기질(KPL)로 전개하고, 1N 염산(Thermo Fisher Scientific)으로 중지시키고 SpectraMax 플레이트 리더기(Molecular Devices)로 450 nm에서 판독하였다. 각 원숭이에서 다른 시점에서의 mAb 농도를 표준 곡선을 사용하여 산출하였다. 비구획 약물동력학적 분석을 WinNonLin, Version 4.0(Pharsight Corp., Mountain View, CA)을 사용하여 수행하였다. 인간화 mAb PA-50에 대한 PK 결과를 도 42a에 나타내었고, 인간화 mAb PA-41에 대한 PK 결과를 도 42b에 나타내었다. 1 mg/kg 및 5 mg/kg 용량의 PA-50은 각각 14.5 ± 0.3 및 12.3 ± 0.5 의 평균 $T_{1/2}$ (일)를 나타내었으며, 1 mg/kg and 5 mg/kg 용량의 PA-41은 각각 8.9 ± 0.3 및 9.2 ± 0.3 의 평균 $T_{1/2}$ (일)를 나타내었다.

[0391] 참조문헌

- [0392] 1. Bartlett, J. G., T. W. Chang, M. Gurwith, S. L. Gorbach, and A. B. Onderdonk. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. The New England Journal of Medicine 298:531-534.
- [0393] 2. Kyne, L., R. J. Farrell, and C. P. Kelly. 2001. Clostridium difficile. Gastroenterol. Clin North Am 30:753-777.
- [0394] 3. Kelly, C. P. and J. T. LaMont. 2008. Clostridium difficile--more difficult than ever. The New England Journal of Medicine 359:1932-1940.
- [0395] 4. MacCannell, D. R., T. J. Louie, D. B. Gregson, M. Laverdiere, A. C. Labbe, F. Laing, and S. Henwick. 2006. Molecular analysis of Clostridium difficile PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. J Clin Microbiol 44:2147-2152.
- [0396] 5. McDonald, L. C., G. E. Killgore, A. Thompson, R. C. Owens, Jr., S. V. Kazakova, S. P. Sambol, S. Johnson, and D. N. Gerding. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. The New England Journal of Medicine 353:2433-2441.
- [0397] 6. Warny, M., J. Pepin, A. Fang, G. Killgore, A. Thompson, J. Brazier, E. Frost, and L. C. McDonald. 2005. Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 366:1079-1084.
- [0398] 7. Babcock, G. J., T. J. Broering, H. J. Hernandez, R. B. Mandell, K. Donahue, N. Boatright, A. M. Stack, I. Lowy, R. Graziano, D. Molrine, D. M. Ambrosino, and W. D. Thomas, Jr. 2006. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent Clostridium difficile-induced mortality in hamsters. Infect Immun 74:6339-6347.
- [0399] 8. Bartlett, J. G. 1981. Antimicrobial agents implicated in Clostridium difficile toxin-associated diarrhea of colitis. Johns Hopkins Med J 149:6-9.
- [0400] 9. McFarland, L. V., M. E. Mulligan, R. Y. Kwok, and W. E. Stamm. 1989. Nosocomial acquisition of Clostridium difficile infection. The New England Journal of Medicine 320:204-210.
- [0401] 10. Zilberberg, M. D., A. F. Shorr, and M. H. Kollef. 2008. Increase in adult Clostridium difficile-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000-2005. Emerg. Infect Dis 14:929-931.
- [0402] 11. Riley, T. V., Codde, J. P., and Rous, I. L. Increased length of hospital stay due to Clostridium difficile-associated diarrhoea. Lancet 345, 455-456. 2-18-1995.
- [0403] 12. O'Brien, J. A., B. J. Lahue, J. J. Caro, and D. M. Davidson. 2007. The emerging infectious challenge of clostridium difficile-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. Infect Control Hosp Epidemiol. 28:1219-1227.

- [0404] 13. Redelings, M. D., F. Sorvillo, and L. Mascola. 2007. Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerg. Infect Dis* 13:1417-1419.
- [0405] 14. Loo, V. G., L. Poirier, M. A. Miller, M. Oughton, M. D. Libman, S. Michaud, A. M. Bourgault, T. Nguyen, C. Frenette, M. Kelly, A. Vibien, P. Brassard, S. Fenn, K. Dewar, T. J. Hudson, R. Horn, P. Rene, Y. Monczak, and A. Dascal. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *The New England Journal of Medicine* 353:2442-2449.
- [0406] 15. Warny, M. K. C. 2003. Pathogenicity of *Clostridium difficile* toxins. Washington DC: ASM Press 366:503-524.
- [0407] 16. Kelly, C. P., C. Pothoulakis, and J. T. LaMont. 1994. *Clostridium difficile* colitis. *The New England Journal of Medicine* 330:257-262.
- [0408] 17. Lyerly, D. M., D. E. Lockwood, S. H. Richardson, and T. D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun.* 35:1147-1150.
- [0409] 18. McFarland, L. V., H. W. Beneda, J. E. Clarridge, and G. J. Raugi. 2007. Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. *Am J Infect Control* 35:237-253.
- [0410] 19. Drudy, D., T. Quinn, R. O'Mahony, L. Kyne, P. O'Gaora, and S. Fanning. 2006. High-level resistance to moxifloxacin and gatifloxacin associated with a novel mutation in *gyrB* in toxin-A-negative, toxin-B-positive *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 58:1264-1267.
- [0411] 20. Rupnik, M., N. Kato, M. Grabnar, and H. Kato. 2003. New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *J Clin Microbiol* 41:1118-1125.
- [0412] 21. Voth, D. E. and J. D. Ballard. 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18:247-263.
- [0413] 22. Reineke, J., S. Tenzer, M. Rupnik, A. Koschinski, O. Hasselmayer, A. Schratzenholz, H. Schild, and C. Eichel-Streiber. 2007. Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 446:415-419.
- [0414] 23. Aslam, S., R. J. Hamill, and D. M. Musher. 2005. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis* 5:549-557.
- [0415] 24. Musher, D. M., S. Aslam, N. Logan, S. Nallacheru, I. Bhaila, F. Borchert, and R. J. Hamill. 2005. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clin Infect Dis* 40:1586-1590.
- [0416] 25. Pepin, J., M. E. Alary, L. Valiquette, E. Raiche, J. Ruel, K. Fulop, D. Godin, and C. Bourassa. 2005. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* 40:1591-1597.
- [0417] 26. Fekety, R. and A. B. Shah. 1993. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA* 269:71-75.
- [0418] 27. Fekety, R., L. V. McFarland, C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, G. W. Elmer, and M. E. Mulligan. 1997. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. *Clin Infect Dis* 24:324-333.
- [0419] 28. Pothoulakis, C. and J. T. LaMont. 1993. *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. *Gastroenterol. Clin North Am* 22:623-637.
- [0420] 29. McFarland, L. V., C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, R. Fekety, G. W. Elmer, K. A. Moyer, S. A. Melcher, K. E. Bowen, J. L. Cox, Z. Noorani, and . 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease.

JAMA 271:1913-1918.

- [0421] 30. McFarland, L. V., G. W. Elmer, and C. M. Surawicz. 2002. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol.* 97:1769-1775.
- [0422] 31. Kyne, L., M. Warny, A. Qamar, and C. P. Kelly. 2000. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *The New England Journal of Medicine* 342:390-397.
- [0423] 32. Kyne, L., M. Warny, A. Qamar, and C. P. Kelly. 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 357:189-193.
- [0424] 33. Leav, B., Blair, B., Leney, M., Knauber, M., Reilly, C., Lowy, I., Kohberger, R., Gerding, D. N., Kelly, C., Katchar, K., Baxter, R., and Ambrosino, D. 2008. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhea(CDAD). ICAAC/IDSA, Poster B-1295. 2008.
- [0425] 34. Wilcox, M. H., W. N. Fawley, C. D. Settle, and A. Davidson. 1998. Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection--relapse or reinfection? *J Hosp Infect* 38:93-100.
- [0426] 35. Jodlowski, T. Z., R. Oehler, L. W. Kam, and I. Melnychuk. 2006. Emerging therapies in the treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Ann. Pharmacother* 40:2164-2169.
- [0427] 36. Missaghi, B., A. J. Valenti, and R. C. Owens, Jr. 2008. *Clostridium difficile* Infection: A Critical Overview. *Curr. Infect Dis Rep* 10:165-173.
- [0428] 37. Optimer Pharmaceuticals, News Release, November 10. 2008.
- [0429] 38. Louie, T. J., J. Peppe, C. K. Watt, D. Johnson, R. Mohammed, G. Dow, K. Weiss, S. Simon, J. F. John, Jr., G. Garber, S. Chasan-Taber, and D. M. Davidson. 2006. Tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, compared with vancomycin in the treatment of mild to moderately severe *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 43:411-420.
- [0430] 39. Louie, T. G. M. G. D. e. al. 2007. Results of a phase III trial comparing tolevamer, vancomycin and metronidazole in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea(CDI). 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- [0431] 40. Kelly, C. P., C. Pothoulakis, J. Orellana, and J. T. LaMont. 1992. Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A-receptor binding. *Gastroenterology* 102:35-40.
- [0432] 41. Salcedo, J., S. Keates, C. Pothoulakis, M. Warny, I. Castagliuolo, J. T. LaMont, and C. P. Kelly. 1997. Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. *Gut* 41:366-370.
- [0433] 42. Leung, D. Y., C. P. Kelly, M. Boguniewicz, C. Pothoulakis, J. T. LaMont, and A. Flores. 1991. Treatment with intravenously administered gamma globulin of chronic relapsing colitis induced by *Clostridium difficile* toxin. *J Pediatr* 118:633-637.
- [0434] 43. Medarex and Massachusetts Biologic Laboratories, News Release, November 3. 2008.
- [0435] 44. Kamiya, S., K. Yamakawa, X. Q. Meng, H. Ogura, and S. Nakamura. 1991. Production of monoclonal antibody to *Clostridium difficile* toxin A which neutralizes enterotoxicity but not haemagglutination activity. *FEMS Microbiol Lett* 65:311-315.
- [0436] 45. Kink, J. A. and J. A. Williams. 1998. Antibodies to recombinant *Clostridium difficile* toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of *C. difficile*-associated disease in a hamster model of infection. *Infect Immun* 66:2018-2025.
- [0437] 46. Lyerly, D. M., C. J. Phelps, J. Toth, and T. D. Wilkins. 1986. Characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile* with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 54:70-76.

- [0438] 47. Harlow, E. and Lane, D. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York . 1988.
- [0439] 48. Clark, G. F., H. C. Krivan, T. D. Wilkins, and D. F. Smith. 1987. Toxin A from *Clostridium difficile* binds to rabbit erythrocyte glycolipids with terminal Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc sequences. *Arch Biochem Biophys* 257:217-229.
- [0440] 49. Anton, P. M., M. O'Brien, E. Kokkottou, B. Eisenstein, A. Michaelis, D. Rothstein, S. Paraschos, C. P. Kelly, and C. Pothoulakis. 2004. Rifalazil treats and prevents relapse of *clostridium difficile*-associated diarrhea in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3975-3979.
- [0441] 50. Boss, S. M., C. L. Gries, B. K. Kirchner, G. D. Smith, and P. C. Francis. 1994. Use of vancomycin hydrochloride for treatment of *Clostridium difficile* enteritis in Syrian hamsters. *Lab Anim Sci* 44:31-37.
- [0442] 51. Freeman, J., S. D. Baines, D. Jabes, and M. H. Wilcox. 2005. Comparison of the efficacy of ramoplanin and vancomycin in both in vitro and in vivo models of clindamycin-induced *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 56:717-725.
- [0443] 52. Kink, J. A. and J. A. Williams. 1998. Antibodies to recombinant *Clostridium difficile* toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of *C. difficile*-associated disease in a hamster model of infection. *Infect Immun* 66:2018-2025.
- [0444] 53. Kokkottou, E., A. C. Moss, A. Michos, D. Espinoza, J. W. Cloud, N. Mustafa, M. O'Brien, C. Pothoulakis, and C. P. Kelly. 2008. Comparative efficacies of rifaximin and vancomycin for treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and prevention of disease recurrence in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1121-1126.
- [0445] 54. Kurtz, C. B., E. P. Cannon, A. Brezzani, M. Pitruzzello, C. Dinardo, E. Rinard, D. W. Acheson, R. Fitzpatrick, P. Kelly, K. Shackett, A. T. Papoulis, P. J. Goddard, R. H. Barker, Jr., G. P. Palace, and J. D. Klinger. 2001. GT160-246, a toxin binding polymer for treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2340-2347.
- [0446] 55. McVay, C. S. and R. D. Rolfe. 2000. In vitro and in vivo activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2254-2258.
- [0447] 56. Razaq, N., S. Sambol, K. Nagaro, W. Zukowski, A. Cheknis, S. Johnson, and D. N. Gerding. 2007. Infection of hamsters with historical and epidemic BI types of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 196:1813-1819.
- [0448] 57. Fernie, D. S., R. O. Thomson, I. Batty, and P. D. Walker. 1983. Active and passive immunization to protect against antibiotic associated caecitis in hamsters. *Developmental Biology Standard* 53:325-332.
- [0449] 58. Giannasca, P. J., Z. X. Zhang, W. D. Lei, J. A. Boden, M. A. Giel, T. P. Monath, and W. D. Thomas, Jr. 1999. Serum antitoxin antibodies mediate systemic and mucosal protection from *Clostridium difficile* disease in hamsters. *Infect Immun* 67:527-538.
- [0450] 59. Kim, P. H., J. P. Iaconis, and R. D. Rolfe. 1987. Immunization of adult hamsters against *Clostridium difficile*-associated ileocectitis and transfer of protection to infant hamsters. *Infect Immun* 55:2984-2992.
- [0451] 60. Lysterly, D. M., E. F. Bostwick, S. B. Binion, and T. D. Wilkins. 1991. Passive immunization of hamsters against disease caused by *Clostridium difficile* by use of bovine immunoglobulin G concentrate. *Infect Immun* 59:2215-2218.
- [0452] 61. Kelly, C. P., C. Pothoulakis, F. Vavva, I. Castagliuolo, E. F. Bostwick, J. C. O'Keane, S. Keates, and J. T. LaMont. 1996. Anti-*Clostridium difficile* bovine immunoglobulin concentrate inhibits cytotoxicity and enterotoxicity of *C. difficile* toxins. *Antimicrob Agents Chemother* 40:373-379.

- [0453] 62. Delmee, M., M. Homel, and G. Wauters. 1985. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *J Clin Microbiol* 21:323-327.
- [0454] 63. Delmee, M., V. Avesani, N. Delferriere, and G. Burtonboy. 1990. Characterization of flagella of *Clostridium difficile* and their role in serogrouping reactions. *J Clin Microbiol* 28:2210-2214.
- [0455] 64. Barbut, F., A. Richard, K. Hamadi, V. Chomette, B. Burghoffer, and J. C. Petit. 2000. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 38:2386-2388.
- [0456] 65. Carswell, C. I., G. L. Plosker, and A. J. Wagstaff. 2001. Daclizumab: a review of its use in the management of organ transplantation. *BioDrugs* 15:745-773.
- [0457] 66. Wiland, A. M. and B. Philosophe. 2004. Daclizumab induction in solid organ transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 4:729-740.
- [0458] 67. Fenton, C., L. J. Scott, and G. L. Plosker. 2004. Palivizumab: a review of its use as prophylaxis for serious respiratory syncytial virus infection. *Paediatr. Drugs* 6:177-197.
- [0459] 68. Wu, H., D. S. Pfarr, Y. Tang, L. L. An, N. K. Patel, J. D. Watkins, W. D. Huse, P. A. Kiener, and J. F. Young. 2005. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *J Mol Biol* 350:126-144.
- [0460] 69. Romero, J. R. Palivizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus disease from 1998 to 2002: results from four years of palivizumab usage. *Pediatr. Infect. Dis* 22, S46-S54. 2003.
- [0461] 70. Carter, P., L. Presta, C. M. Gorman, J. B. Ridgway, D. Henner, W. L. Wong, A. M. Rowland, C. Kotts, M. E. Carver, and H. M. Shepard. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.
- [0462] 71. Emens, L. A. 2005. Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Am J Ther* 12:243-253.
- [0463] 72. Finn, R. S. and D. J. Slamon. 2003. Monoclonal antibody therapy for breast cancer: herceptin. *Cancer Chemother Biol Response Modif.* 21:223-233.
- [0464] 73. Giles, F., E. Estey, and S. O'Brien. 2003. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer* 98:2095-2104.
- [0465] 74. Siemoneit, K., S. Cardoso Mda, K. Koerner, A. Wolpl, and B. Kubanek. 1995. Human monoclonal antibodies for the immunological characterization of a highly conserved protein domain of the hepatitis C virus glycoprotein E1. *Clin Exp Immunol* 101:278-83.
- [0466] 75. Casale, T. B. 2004. Omalizumab: an effective anti-IgE treatment for allergic asthma and rhinitis. *Drugs Today (Barc.)* 40:367-376.
- [0467] 76. Holgate, S. T., R. Djukanovic, T. Casale, and J. Bousquet. 2005. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy* 35:408-416.
- [0468] 77. Presta, L. G., S. J. Lahr, R. L. Shields, J. P. Porter, C. M. Gorman, B. M. Fendly, and P. M. Jardieu. 1993. Humanization of an antibody directed against IgE. *The Journal of Immunology* 151:2623-2632.
- [0469] 78. Jordan, J. K. 2005. Efalizumab for the treatment of moderate to severe plaque psoriasis. *Ann. Pharmacother* 39:1476-1482.
- [0470] 79. Werther, W. A., T. N. Gonzalez, S. J. O'Connor, S. McCabe, B. Chan, T. Hotaling, M. Champe, J. A. Fox, P. M. Jardieu, P. W. Berman, and L. G. Presta. 1996. Humanization of an anti-lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 monoclonal antibody and reengineering of the humanized antibody for binding

to rhesus LFA-1. The Journal of Immunology 157:4986-4995.

- [0471] 80. Leonardi, C. L. 2004. Current concepts and review of efalizumab in the treatment of psoriasis. Dermatol. Clin 22:427-435.
- [0472] 81. Ferrara, N., K. J. Hillan, H. P. Gerber, and W. Novotny. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov. 3:391-400.
- [0473] 82. Presta, L. G., H. Chen, S. J. O'Connor, V. Chisholm, Y. G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, and N. Ferrara. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. Cancer Res 57:4593-4599.
- [0474] 83. Steinman, L. 2005. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. Nat Rev Drug Discov. 4:510-518.
- [0475] 84. Fagnani, R. 1994. The immunogenicity of foreign monoclonal antibodies in human disease applications: problems and current approaches. Immunol Ser. 61:3-22.
- [0476] 85. Mateo, C., E. Moreno, K. Amour, J. Lombardero, W. Harris, and R. Perez. 1997. Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. Immunotechnology. 3:71-81.
- [0477] 86. Reichert, J. M., C. J. Rosensweig, L. B. Faden, and M. C. Dewitz. 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. Nat Biotechnol 23:1073-1078.
- [0478] 87. Stephens, S., S. Emtage, O. Vetterlein, L. Chaplin, C. Bebbington, A. Nesbitt, M. Sopwith, D. Athwal, C. Novak, and M. Bodmer. 1995. Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual anti-idiotypic responses. Immunology 85:668-674.
- [0479] 88. Co, M. S., N. M. Avdalovic, P. C. Caron, M. V. Avdalovic, D. A. Scheinberg, and C. Queen. 1992. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen. J Immunol. 148:1149-1154.
- [0480] 89. Lowy, I. *et al.* 2010. Treatment with monoclonal antibodies against Clostridium difficile toxins. N. Engl. J Med., 362, 197-205.
- [0481] 90. Babcock, G. J. *et al.* Human Monoclonal Antibodies Neutralize Toxins Produced by Epidemic Strains of Clostridium difficile, the Infectious Diseases Society of America 43rd Annual Meeting, October 6-9, 2005; San Francisco, California.
- [0482] 91. Optimer Pharmaceuticals Reports Positive Data from its North American Phase 3 CDI Study of OPT-80. *Optimer Pharmaceuticals, Press Release* (2008).
- [0483] 92. Rothman SW, *Toxicon*. 1988; 26(6):583-97.
- [0484] 93. WO2005US0047100 to Diversa
- [0485] 94. Cheknis, A. K. *et al.* Distribution of *Clostridium difficile* strains from a North American, European and Australian trial of treatment for *C. difficile* infections: 2005-2007. Anaerobe 15: 230-233 (2009).
- [0486] 95. Gerding D, *et al.* Restriction endonuclease analysis (REA) typing of *Clostridium difficile* in a phase 3 treatment trial of fidaxomicin vs vancomycin: Decreased cure rate for epidemic BI/NAP1/027 strain. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract, L1-1642, San Francisco, CA, September 12-15, 2009

[0487] 본 발명은 설명을 목적으로 상세히 기술되었으나 이러한 상세한 기술은 단지 설명을 위함이며, 당업자는 본 발명의 정신과 하기 청구된 범위 내에서 변형을 할 수 있을 것이다.

[0488] 모든 출원에 인용된 모든 참조문헌, 특허 및 공개된 특허출원의 내용은 본 출원에서 참조로 포함된다.

[0489] 참조문헌 목록은 참조문헌이 선행기술임을 인정하는 것은 아니다.

수탁번호

[0490]

기탁기관명 : ATCC
수탁번호 : PTA-9692
수탁일자 : 20090106

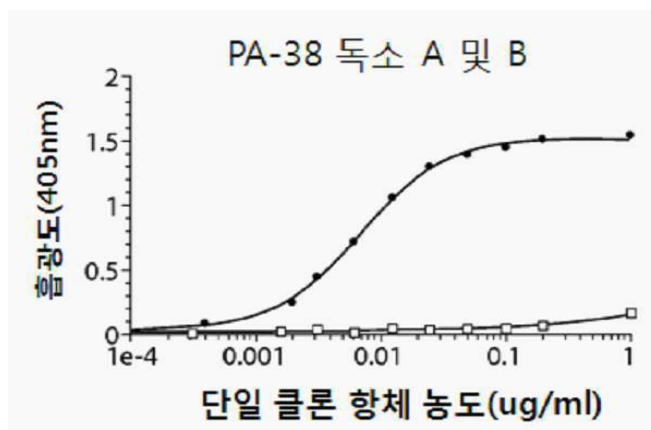
기탁기관명 : ATCC
수탁번호 : PTA-9693
수탁일자 : 20090106

기탁기관명 : ATCC
수탁번호 : PTA-9694
수탁일자 : 20090106

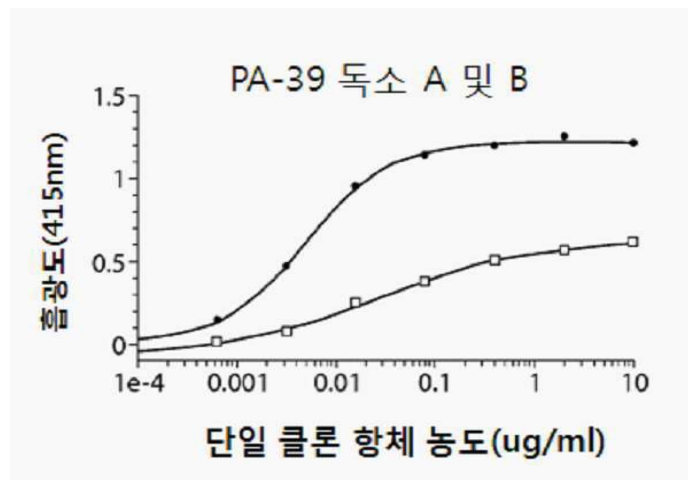
기탁기관명 : ATCC
수탁번호 : PTA-9888
수탁일자 : 20090324

도면

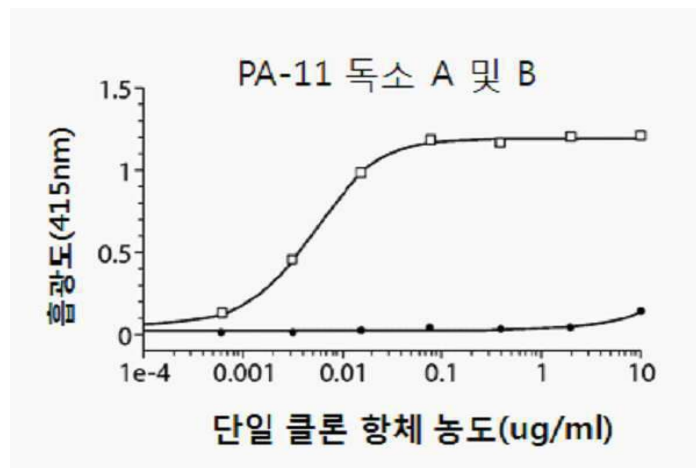
도면1



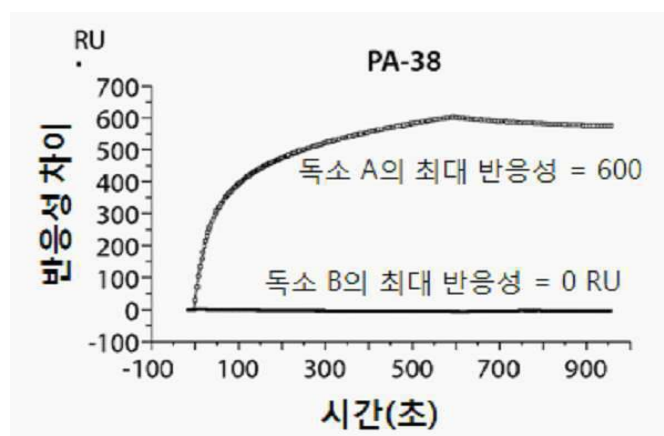
도면1b



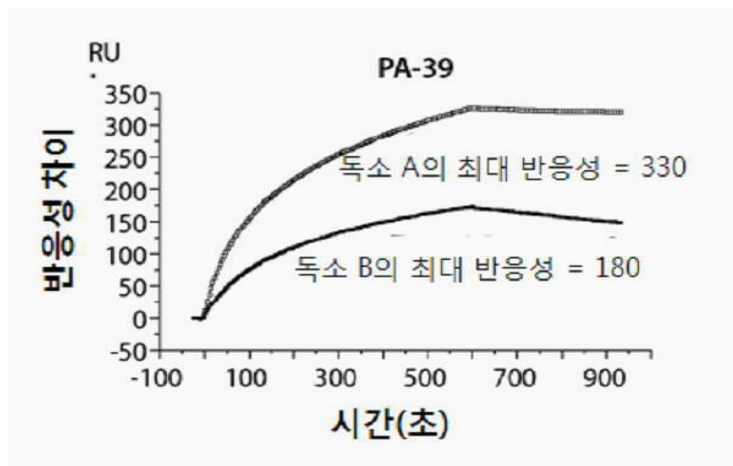
도면1c



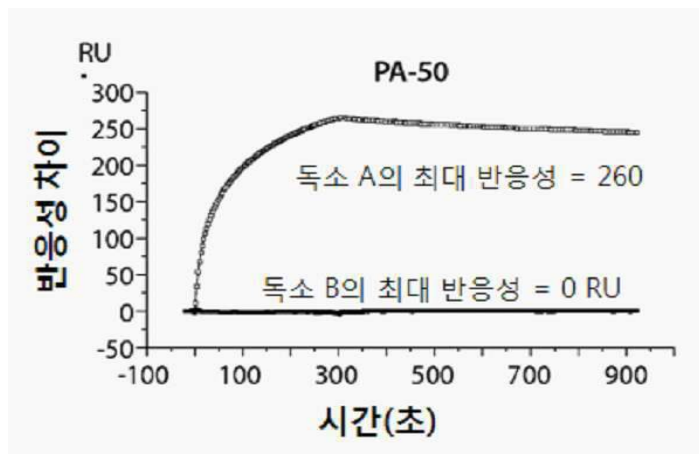
도면2a



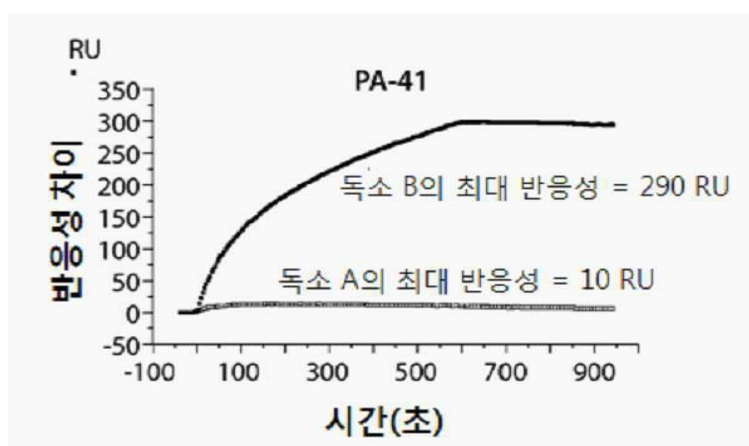
도면2b



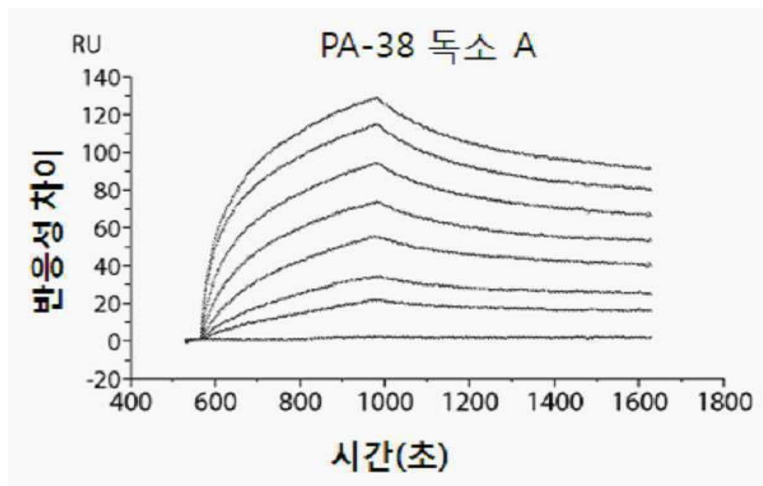
도면2c



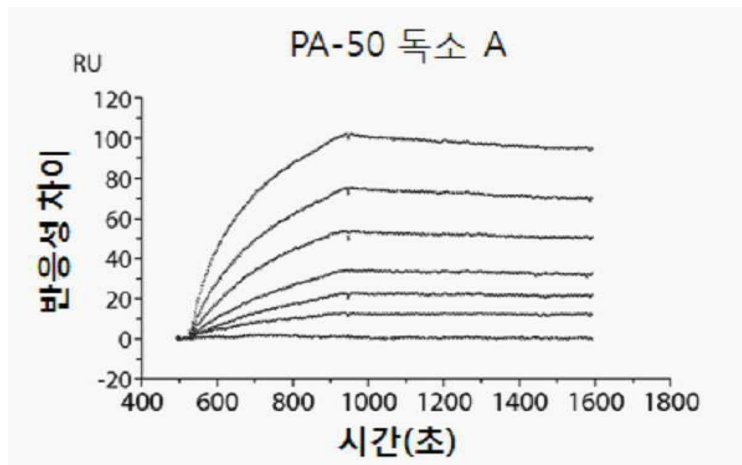
도면2d



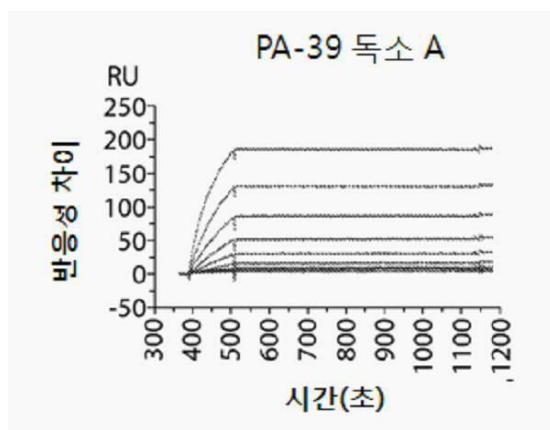
도면3a



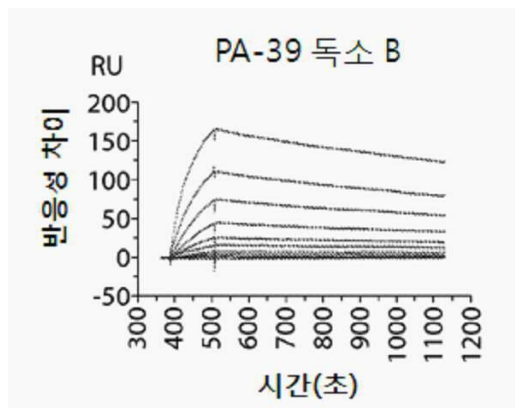
도면3b



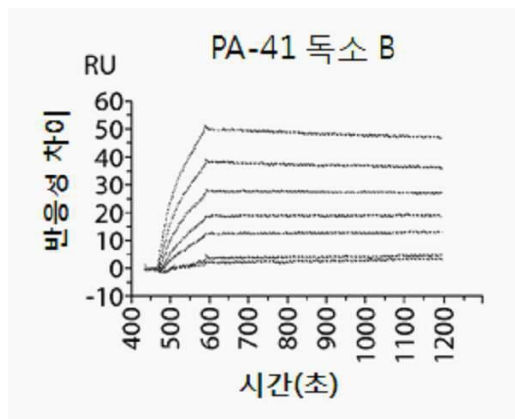
도면3c



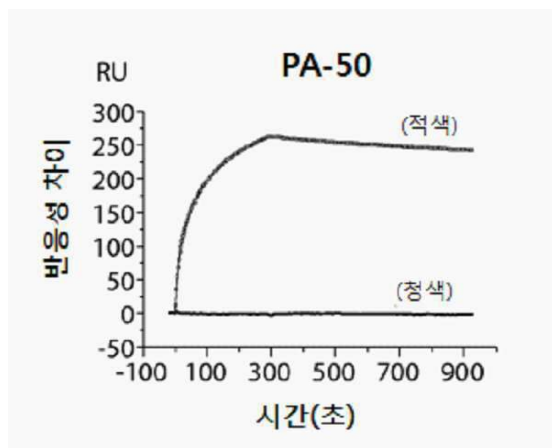
도면3d



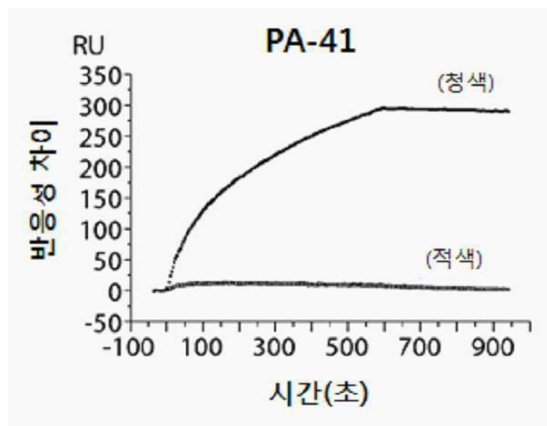
도면3e



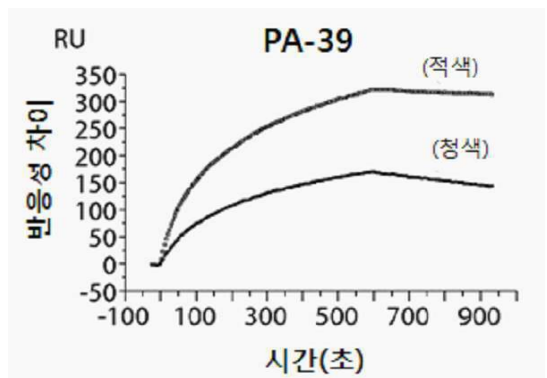
도면3f



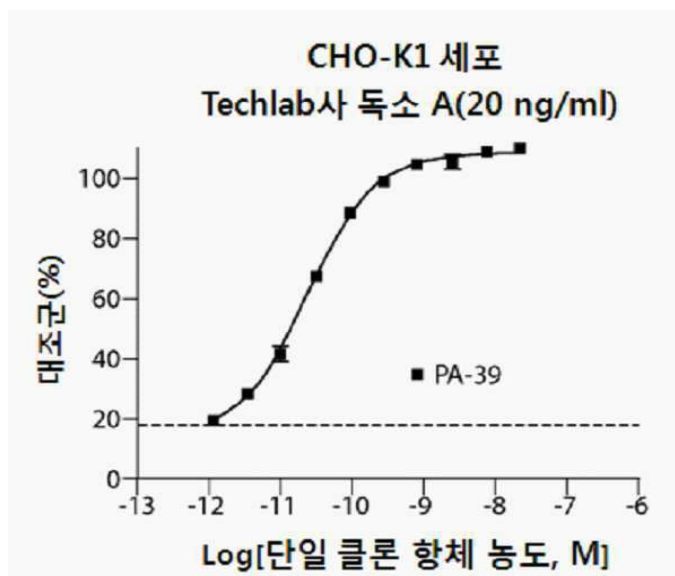
도면3g



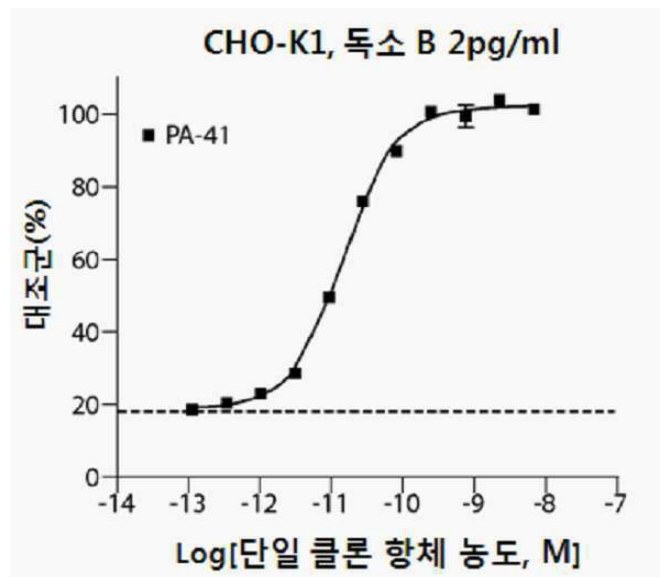
도면3h



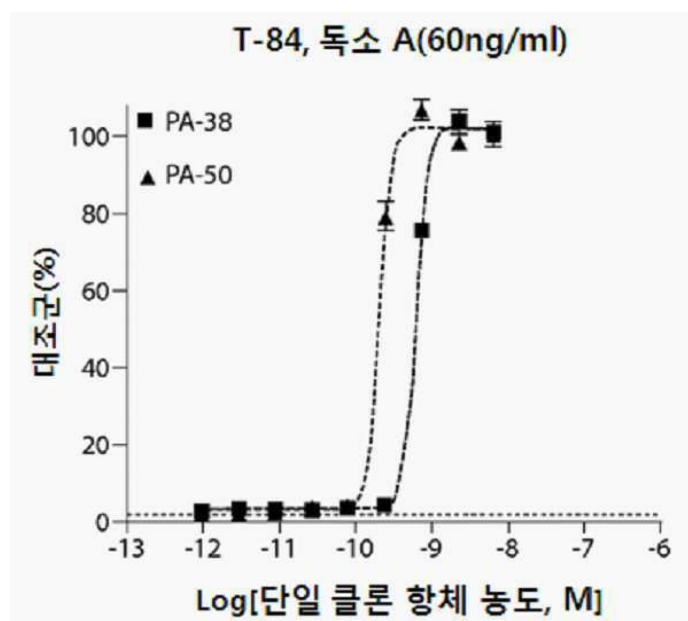
도면4



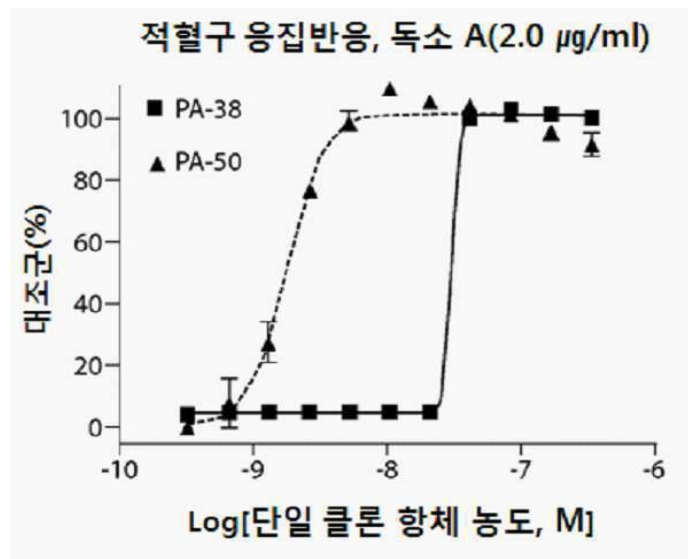
도면5



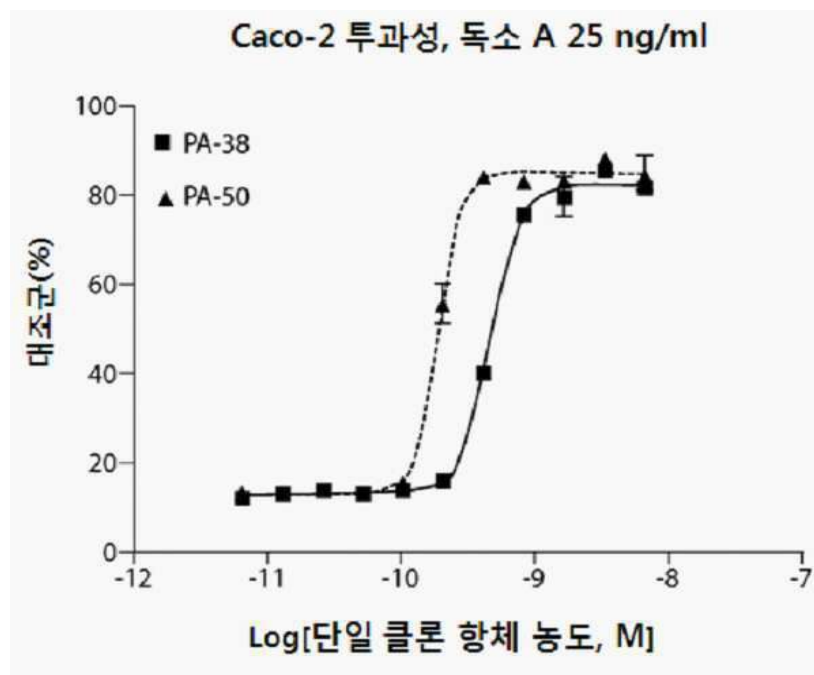
도면6



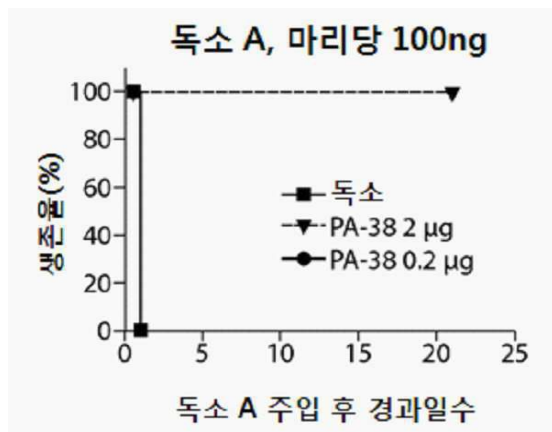
도면7



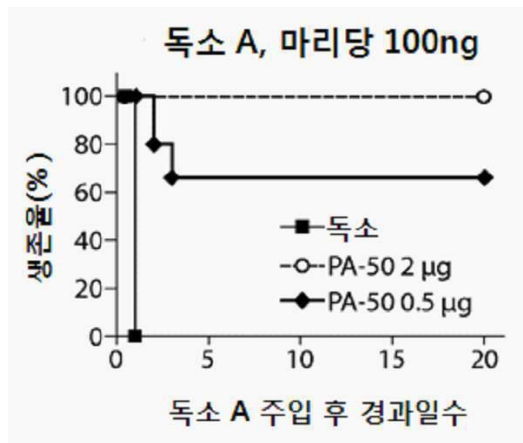
도면8



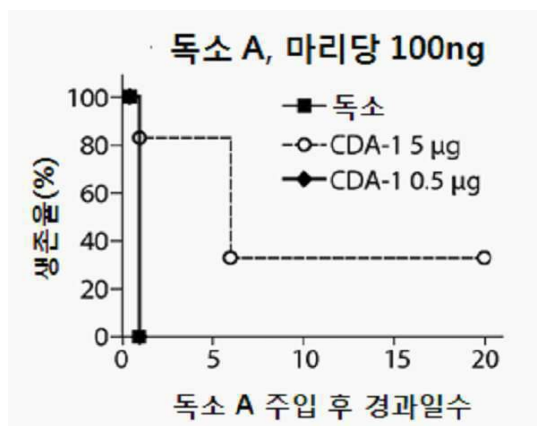
도면9a



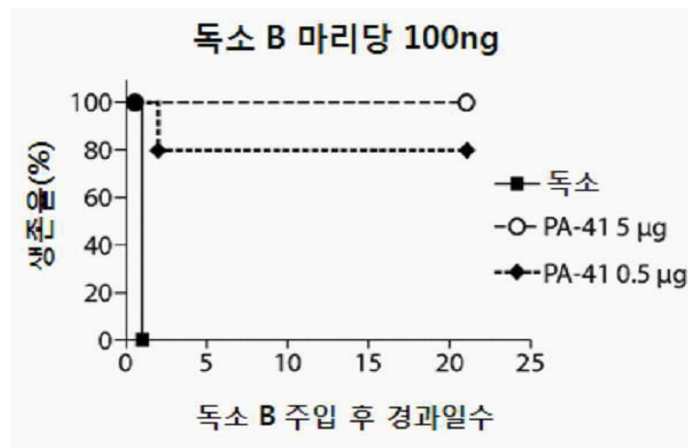
도면9b



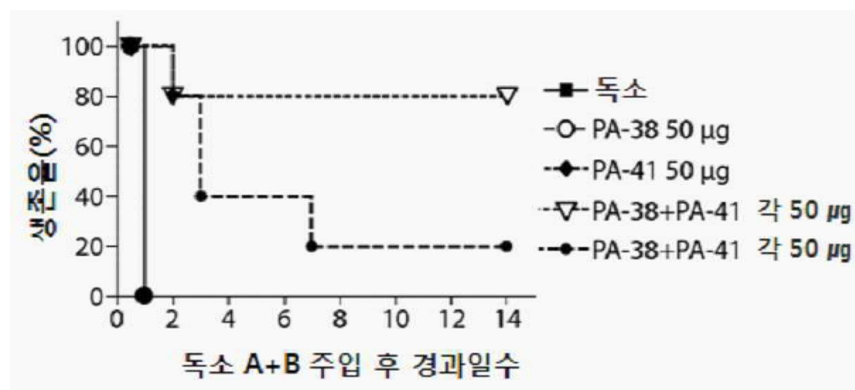
도면9c



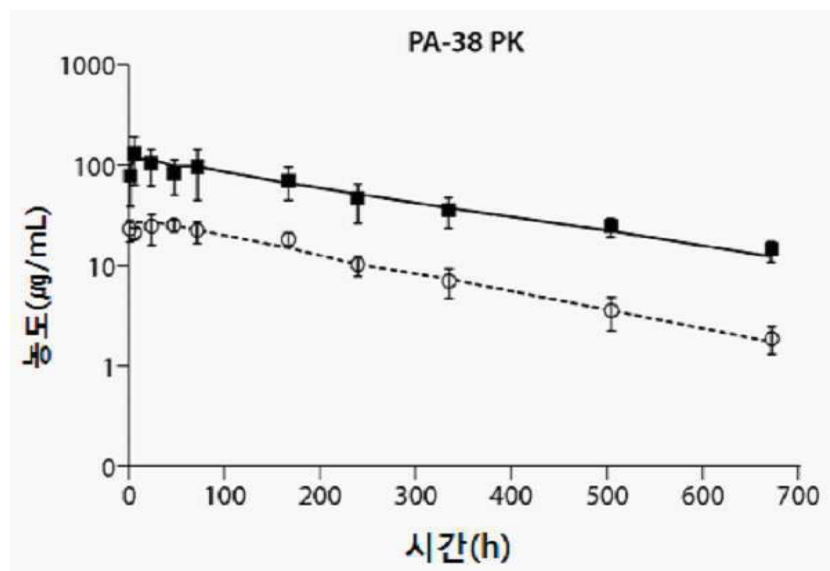
도면10



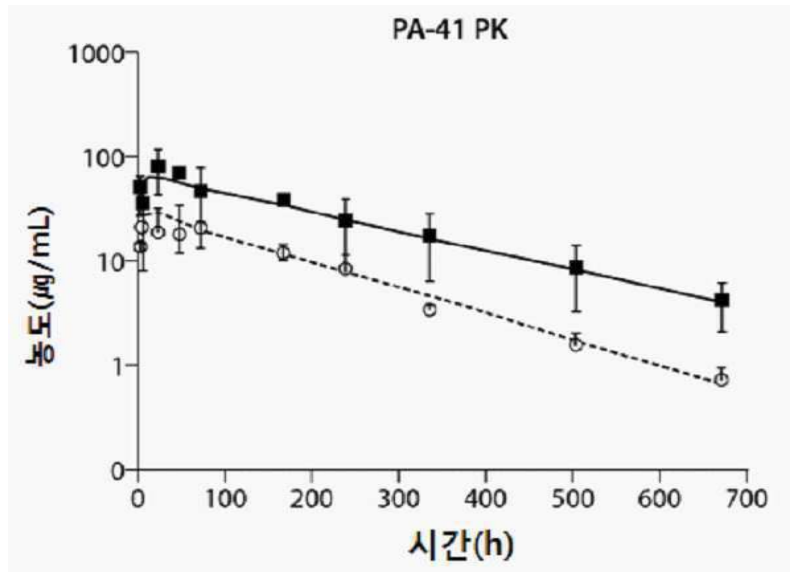
도면11



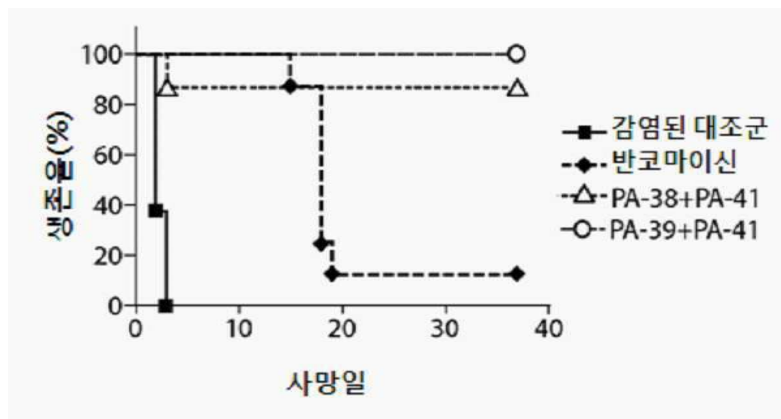
도면12a



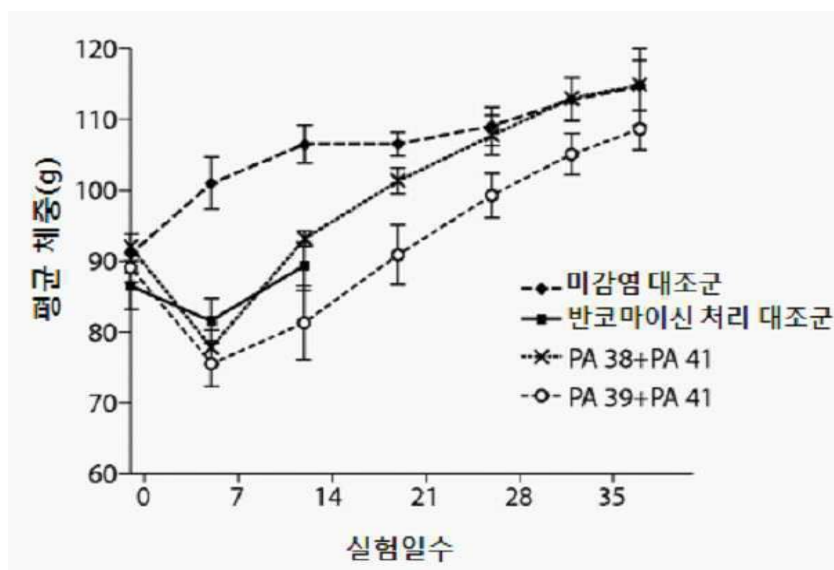
도면12b



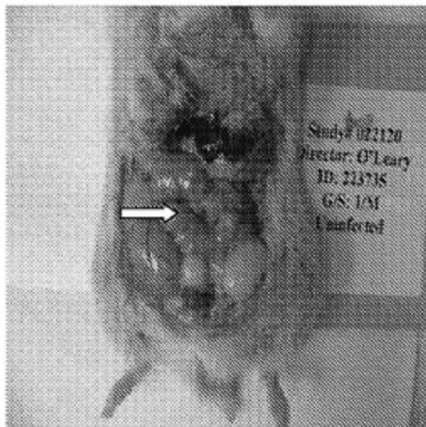
도면13



도면14



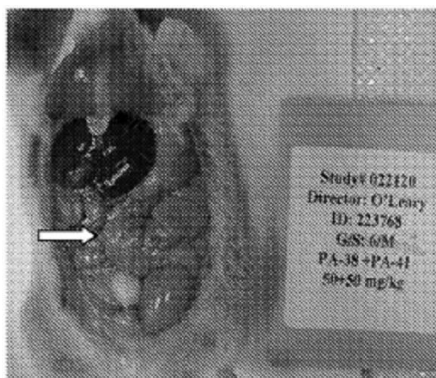
도면15a



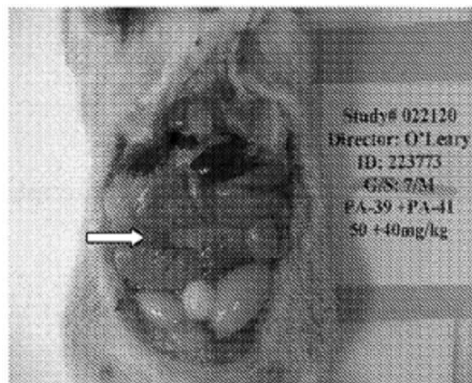
도면15b



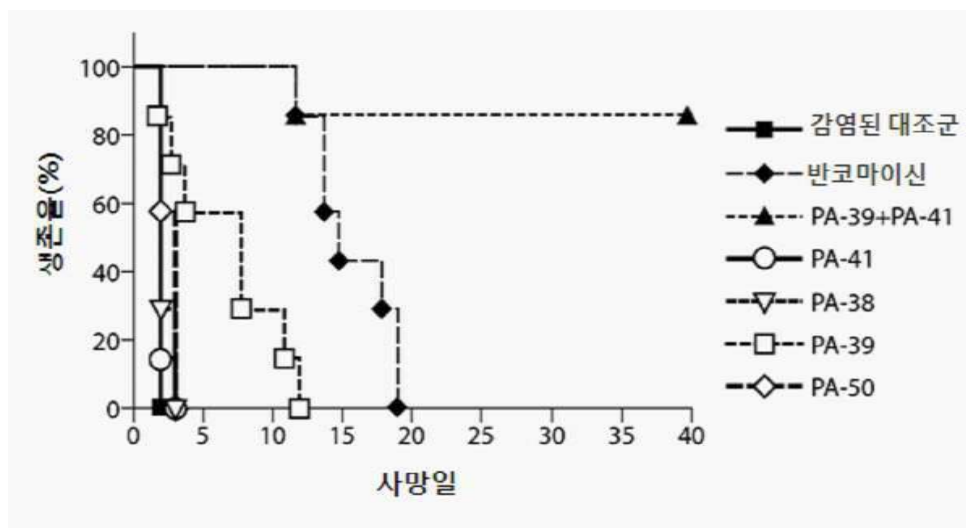
도면15c



도면15d

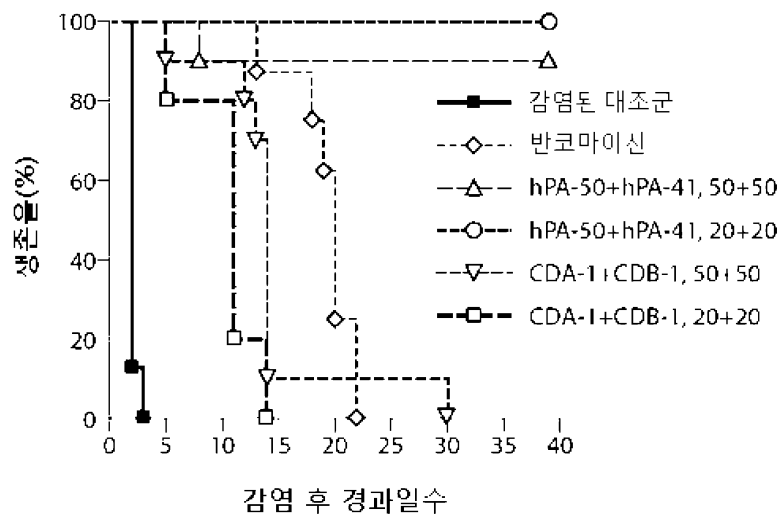


도면16a

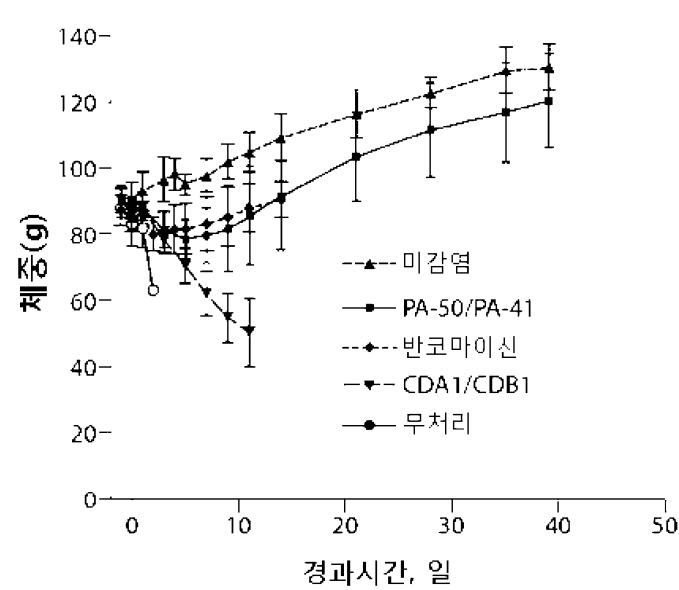


도면16b

【도 16b-1】



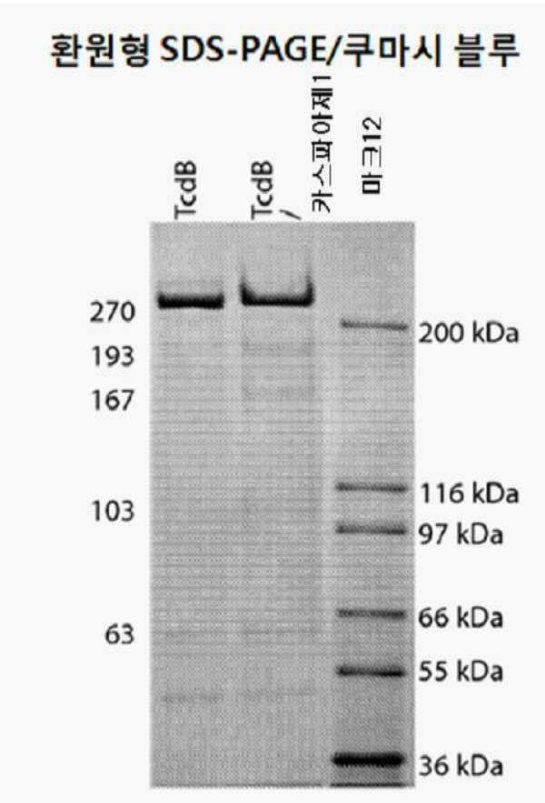
【도 16b-2】



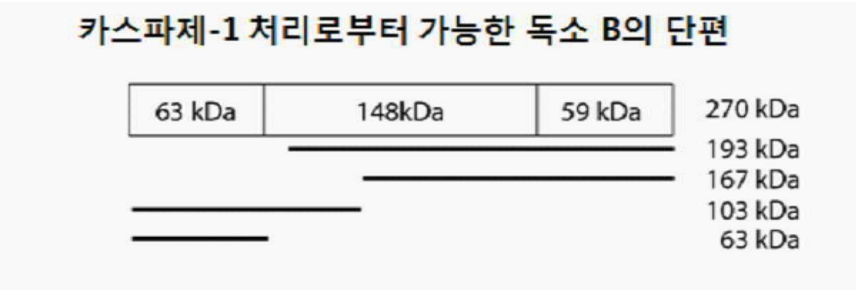
도면17a



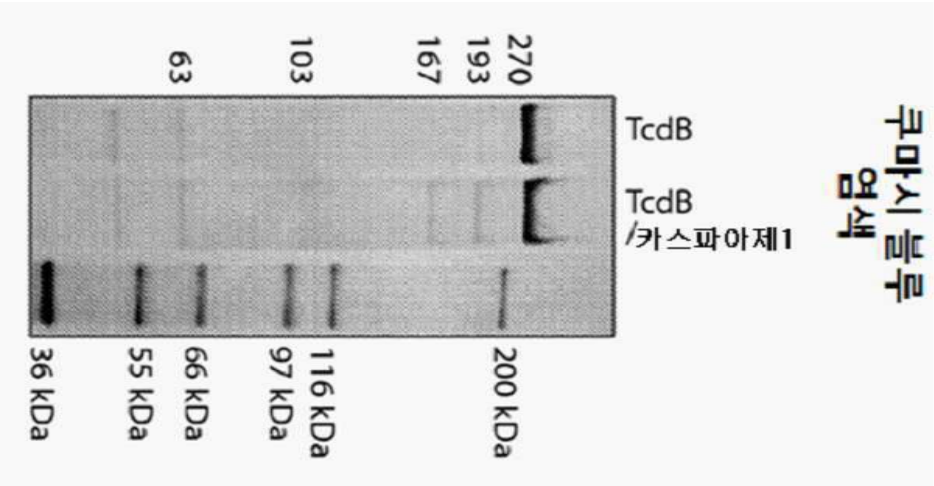
도면17b



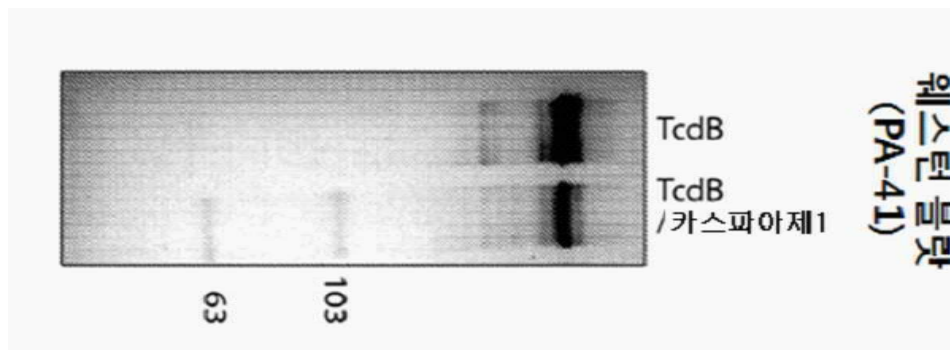
도면17c



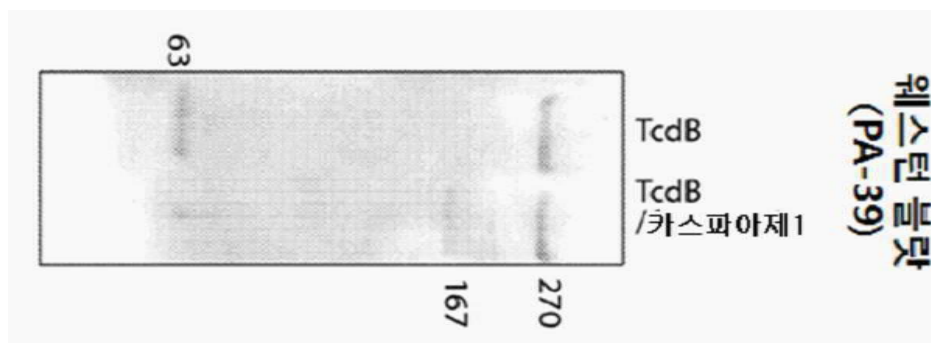
도면18a



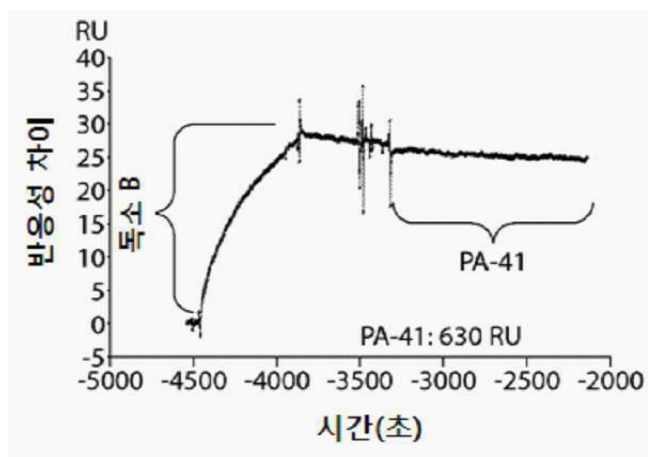
도면18b



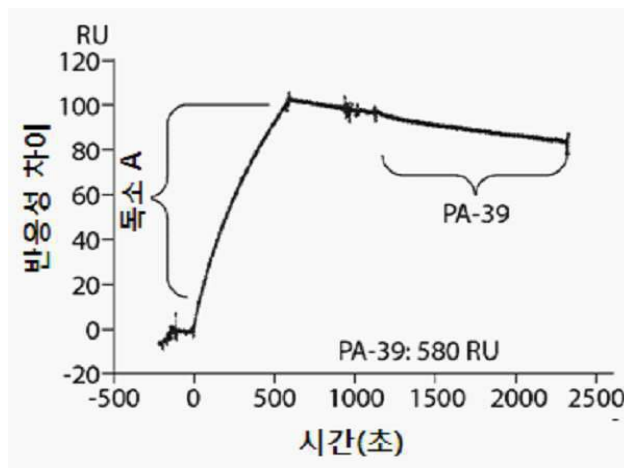
도면18c



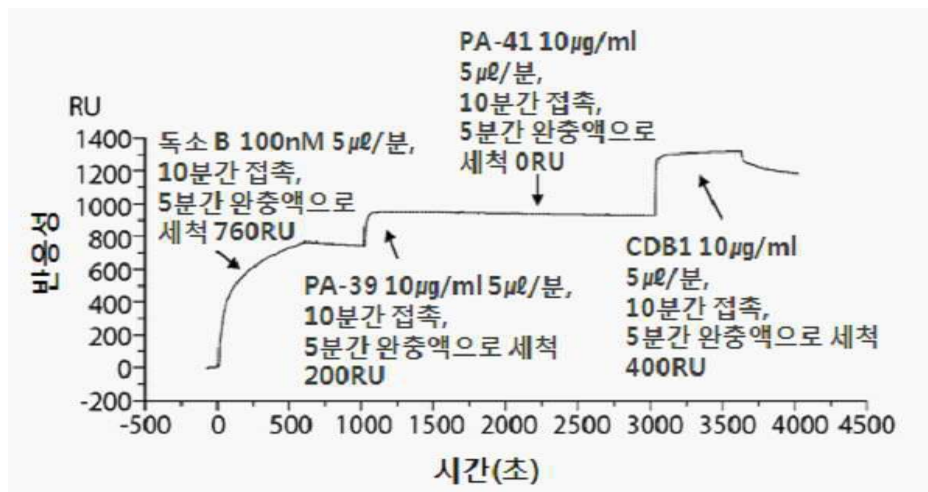
도면19a



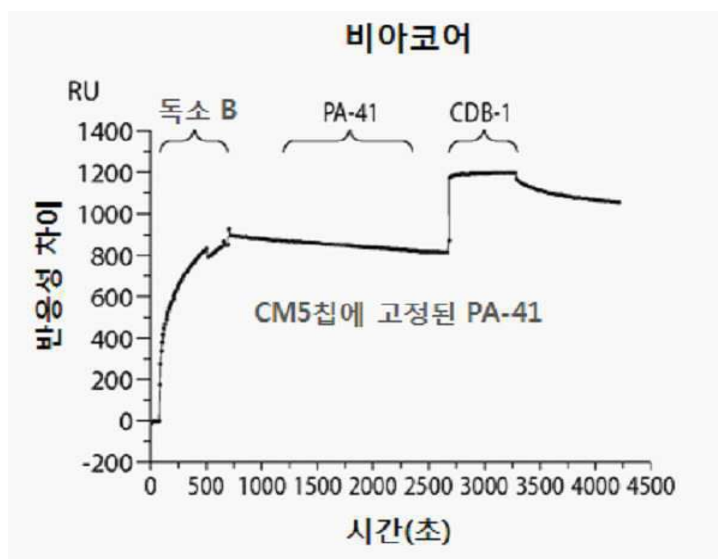
도면19b



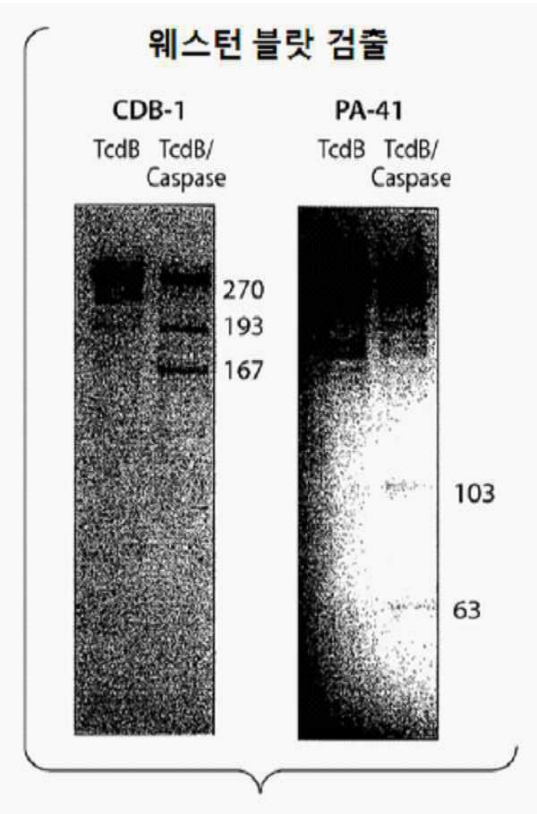
도면19c



도면19d



도면19e

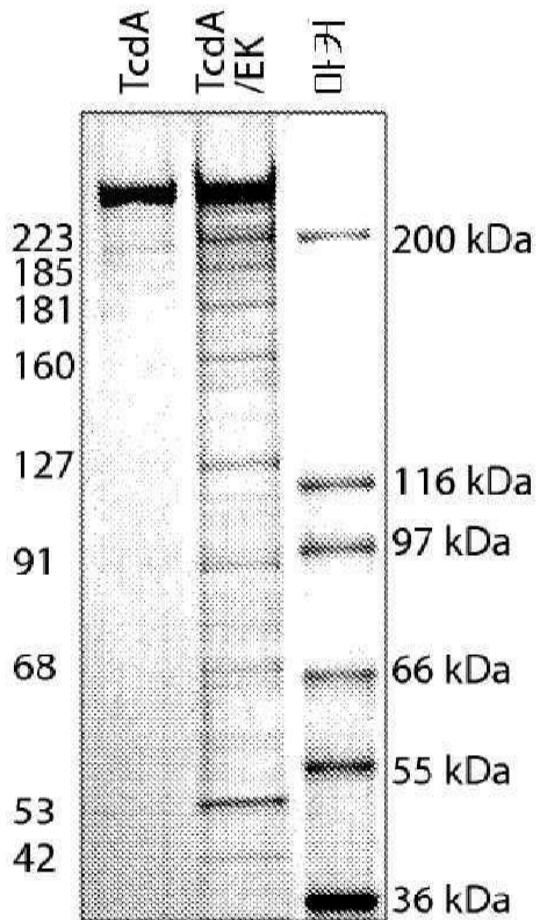


도면20a



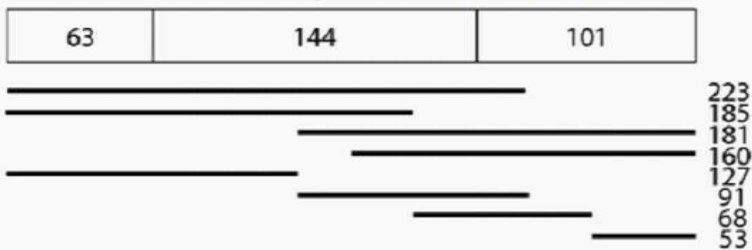
도면20b

SDS-PAGE / 쿠마시 염색



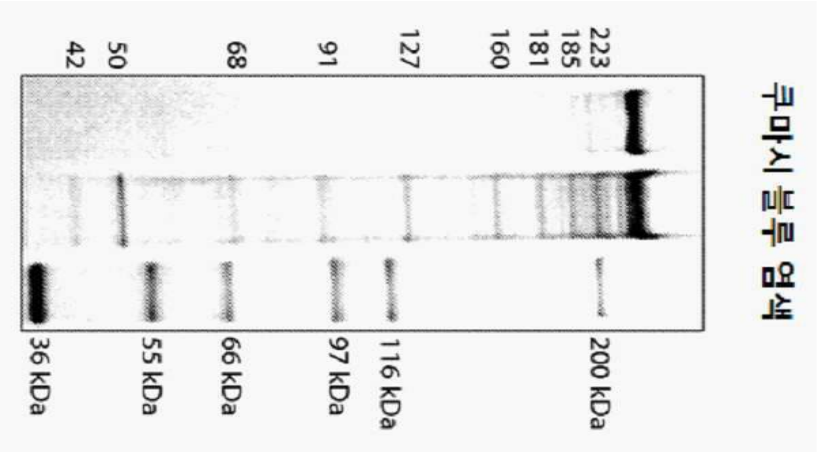
도면20c

클로스트리디움 디피실리균 독소 A상의 엔테로키나아제 절단 가능성 있는 부위

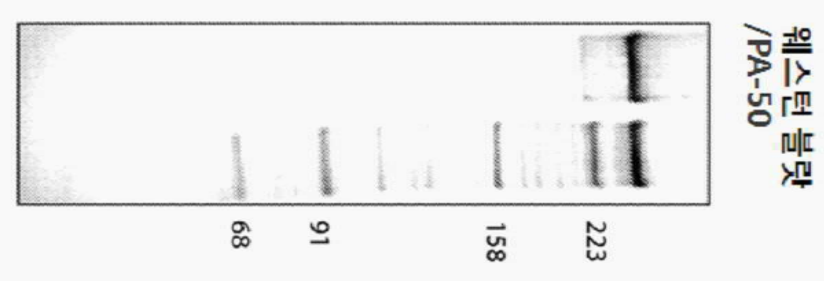


- C-말단 함유 단편 : 223, 181, 160, 91 및 68kDa
- N-말단 함유 단편 : 223, 185 및 127kDa
- 추가 확인이 필요한 단편 : 160, 53 및 42kDa

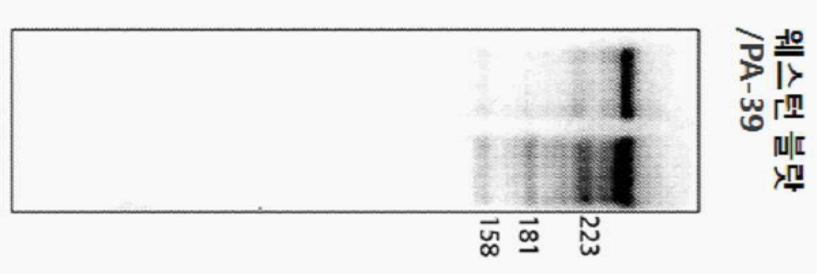
도면21a



도면21b

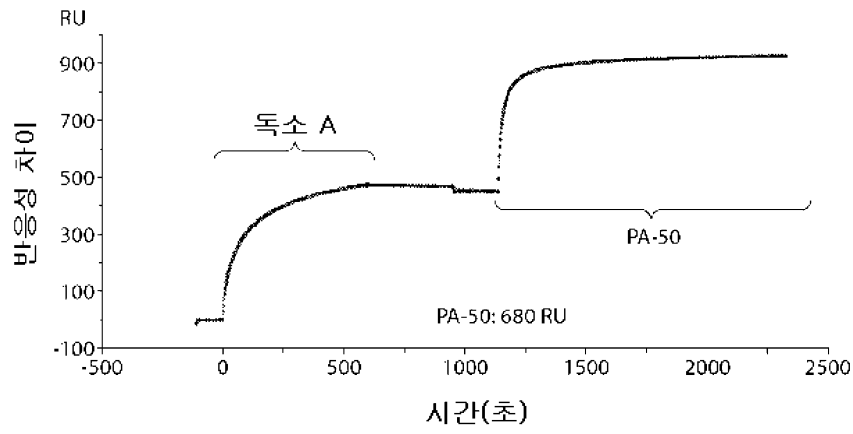


도면21c

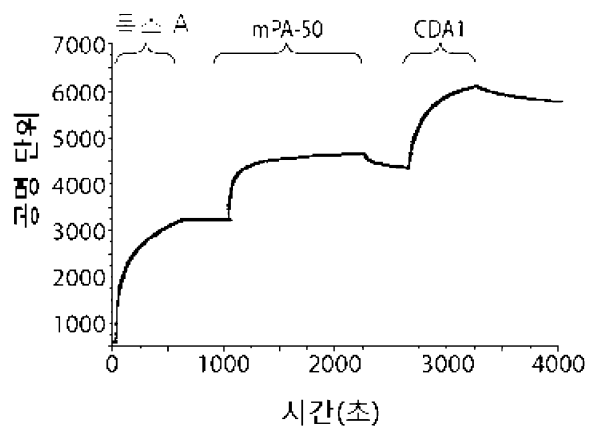


도면22a

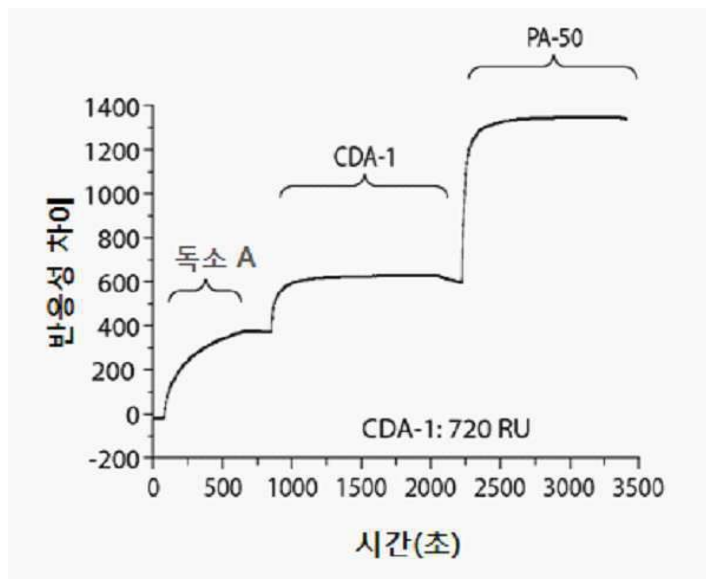
【도 22a-1】



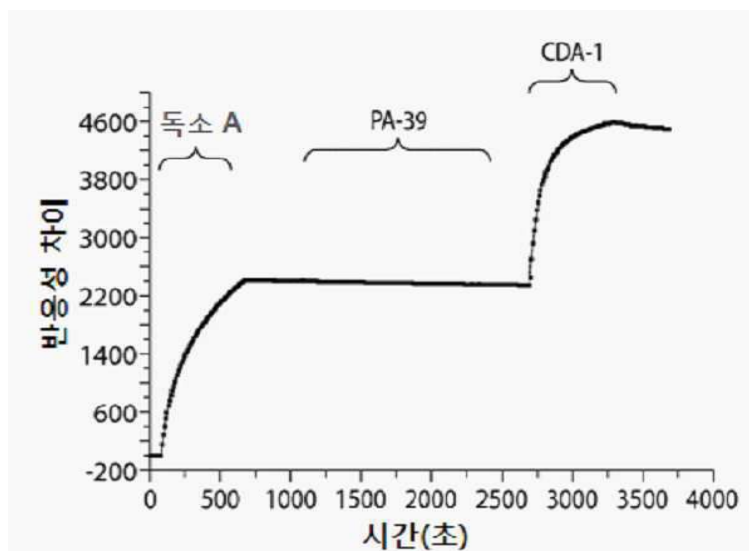
【도 22a-2】



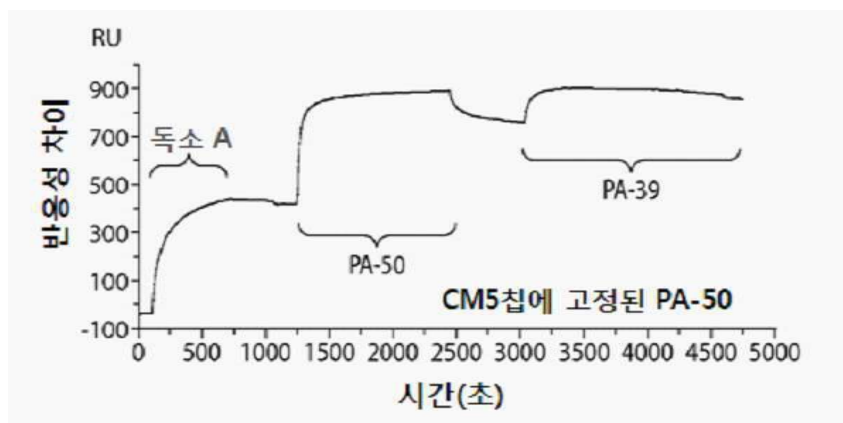
도면22b



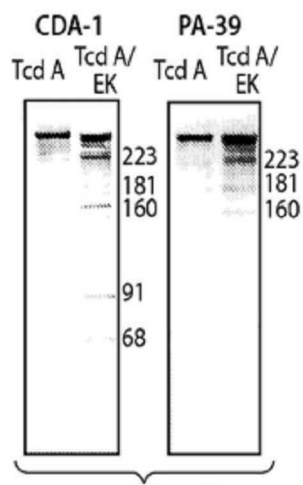
도면22c



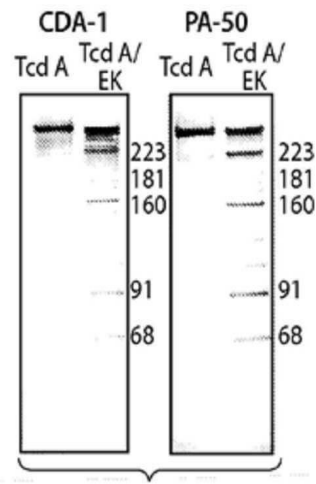
도면22d



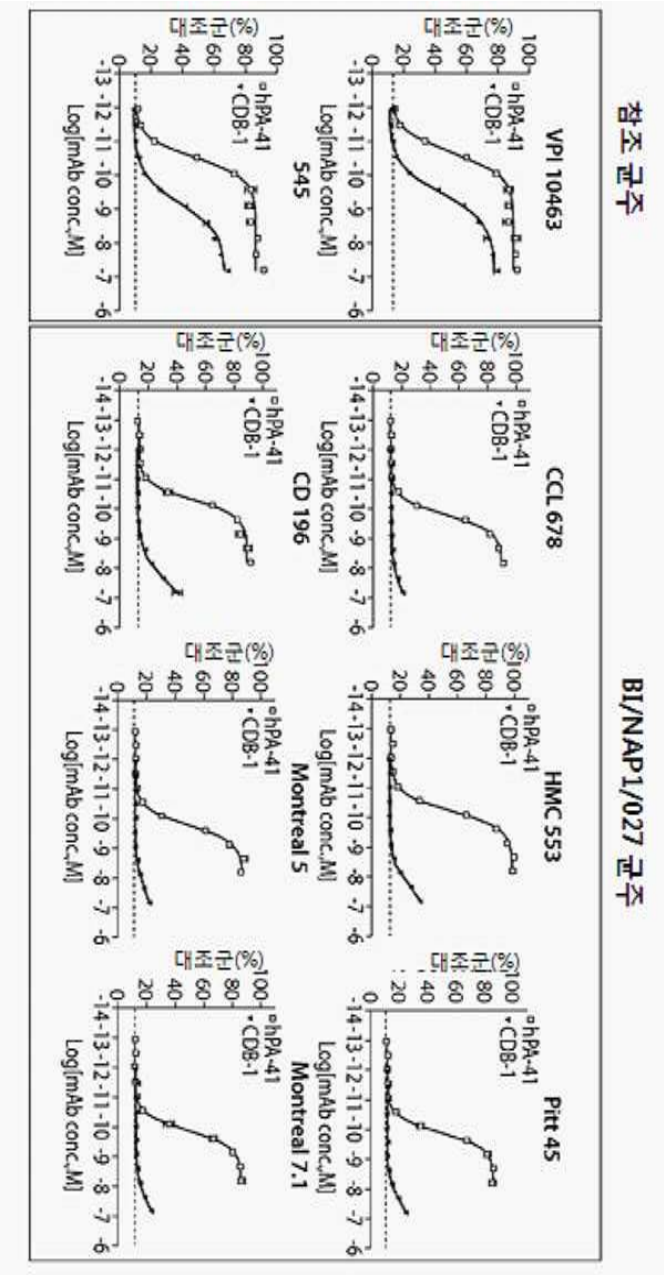
도면22e



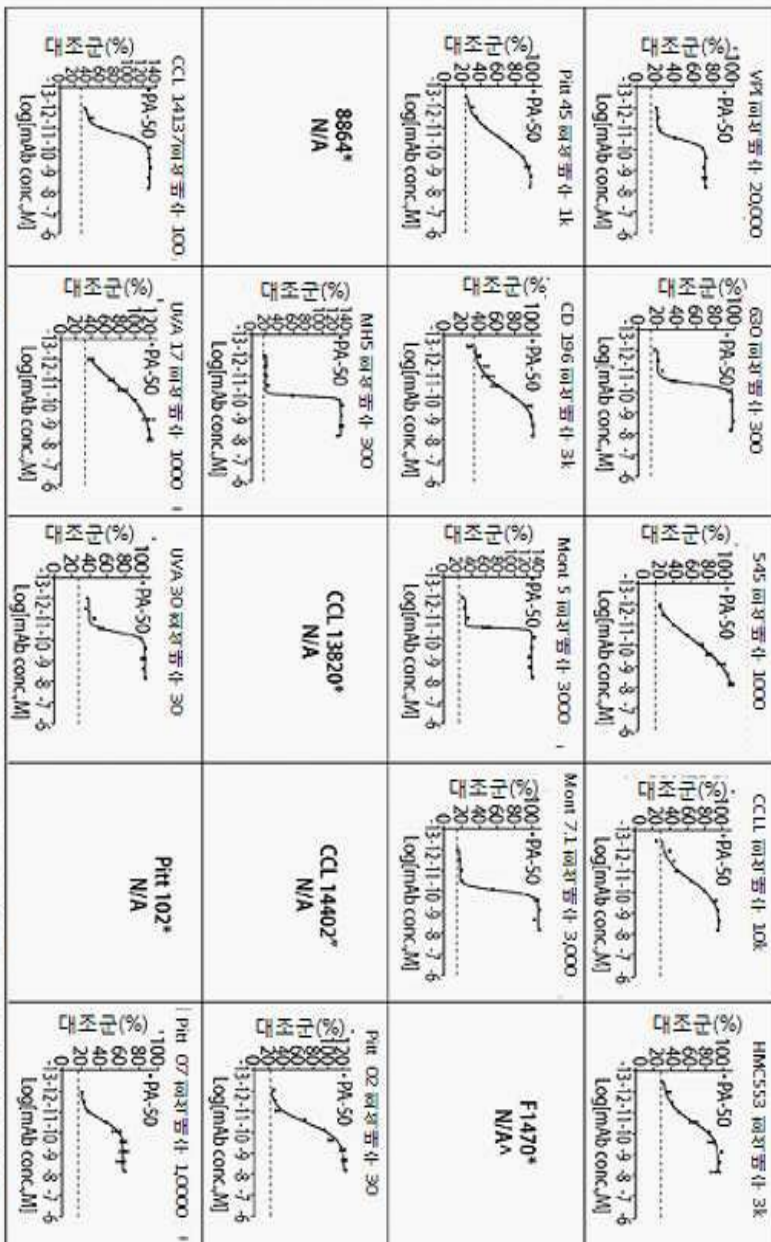
도면22f



도면23b

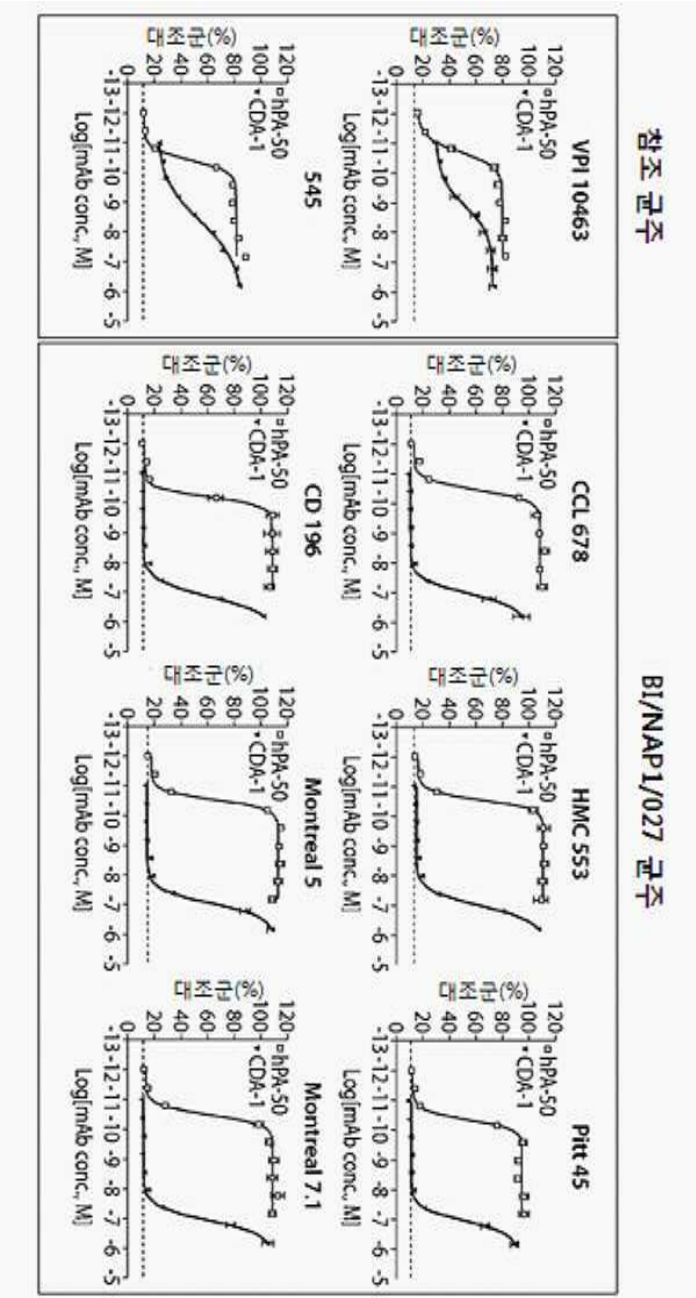


도면24a

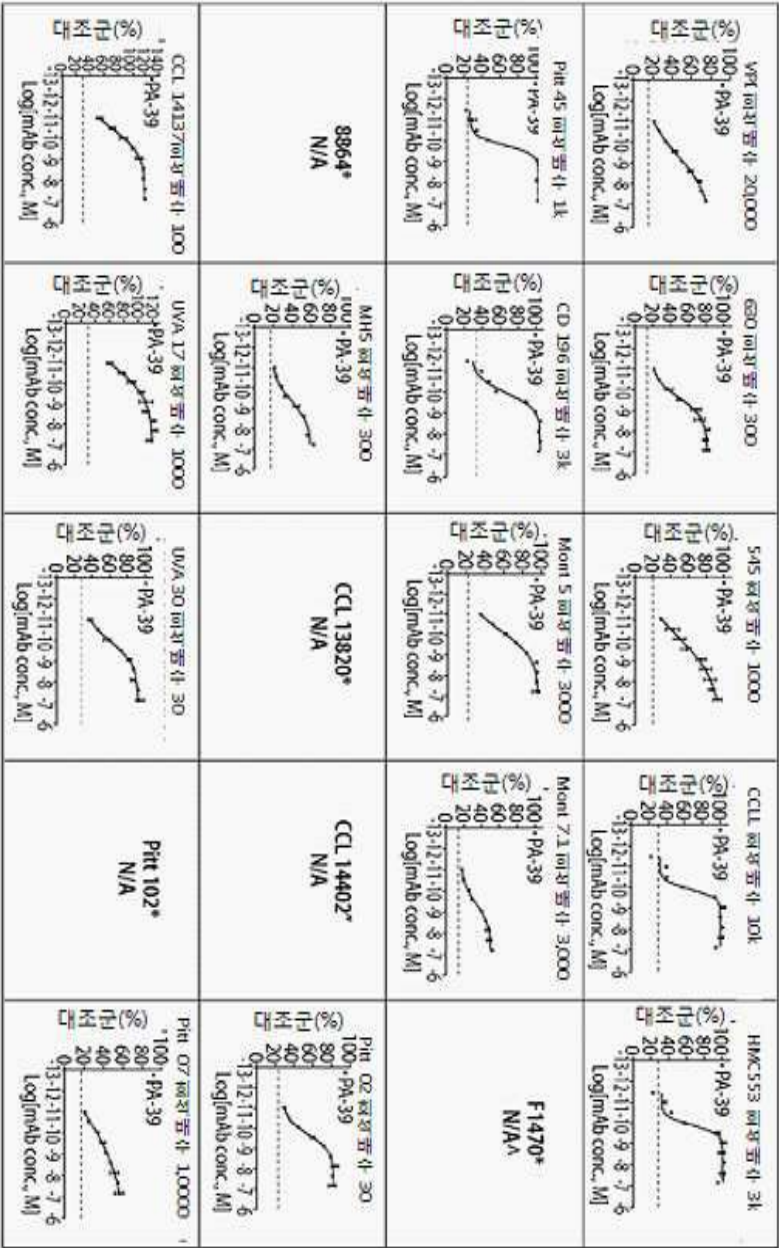


* : N/A: 해당없음; 독소 A-/독소 B+ 균주 F1470, 8864, CCL13820 및 CCL14402로부터 독소 A가 생산되지 않았음.
 * : 독소 A의 역가가 매우 낮았음; 상등액을 이용한 T-84에 대한 세포독성을 측정할 수 없었음.
 * : 해당없음; 독소 A/독소 B+ 균주로부터 독소 A가 생산되지 않았거나 농도가 너무 낮음.

도면24b

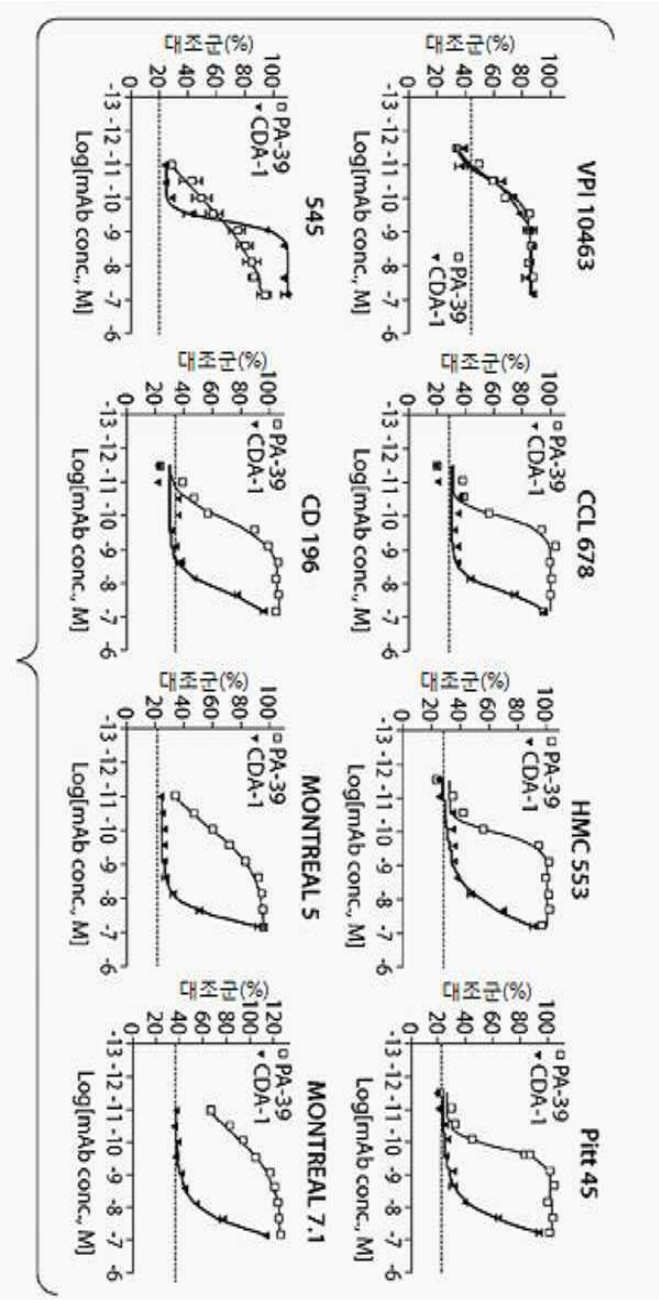


도면25a

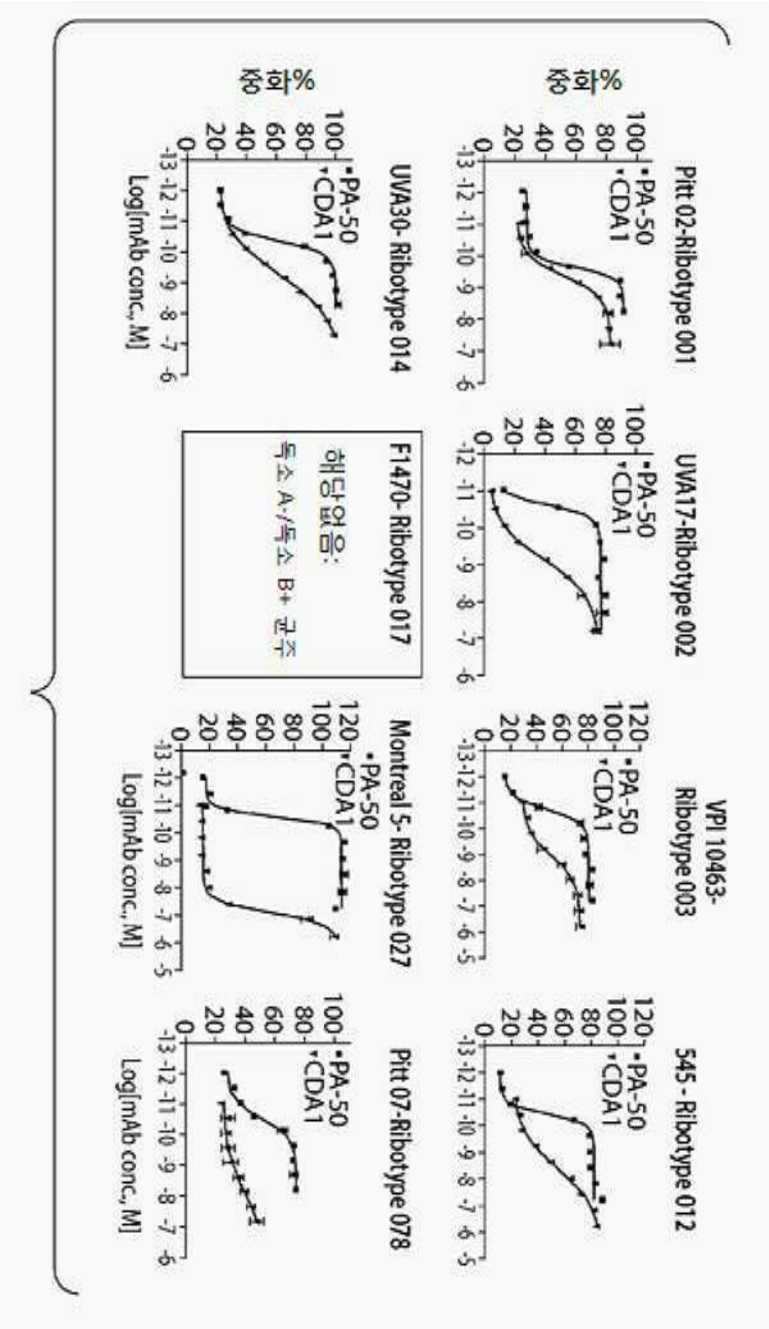


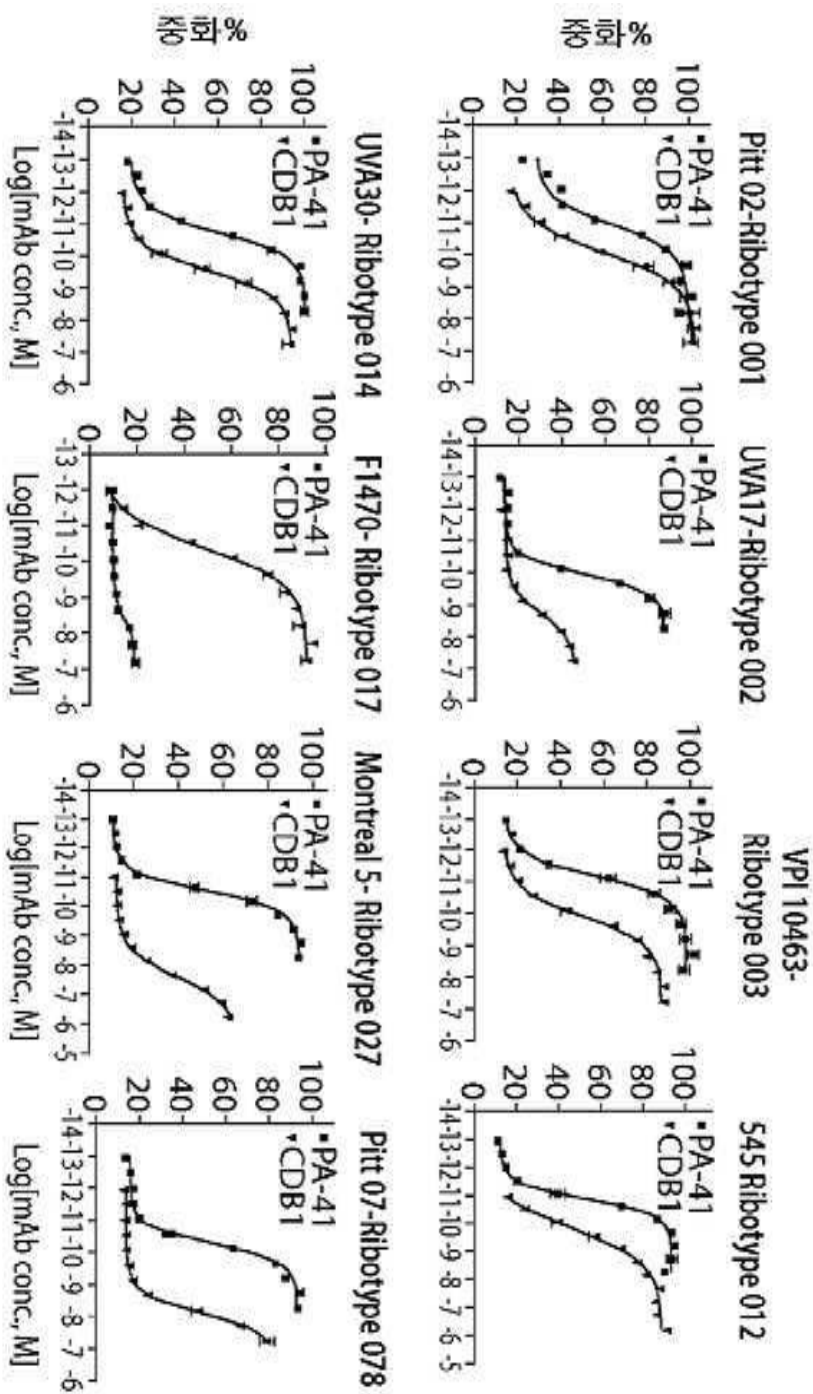
* : N/A: 해당없음, 독소 A/독소 B + 관주 F1470, 8864, CCL13820 및 CCL14402로부터 독소 A가 생산되지 않았음.
* : 독소 A의 역가가 매우 낮았음, 상등액을 이용한 T-84에 대한 세포독성을 측정할 수 없었음.
* : 해당없음, 독소 A/독소 B + 관주로부터 독소 A가 생산되지 않았거나 농도가 너무 낮음.

도면25b



도면25c

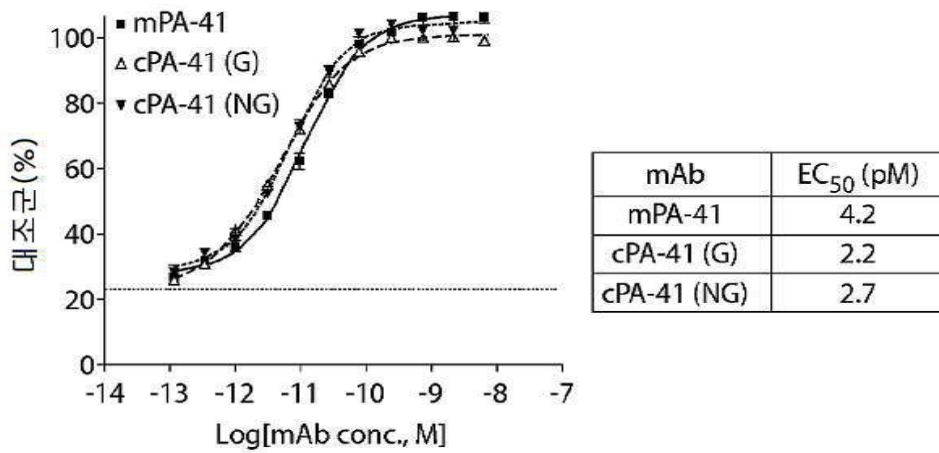




도면25d

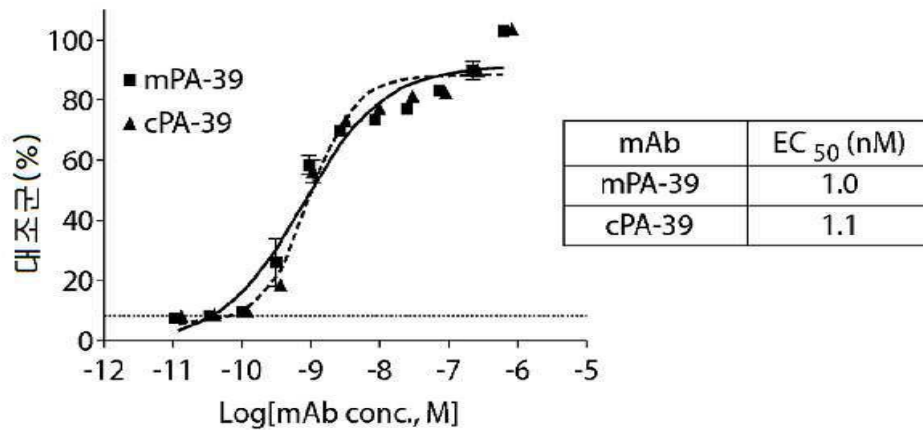
도면26

독소 B, CHO-K1에 대해 2 pg/ml



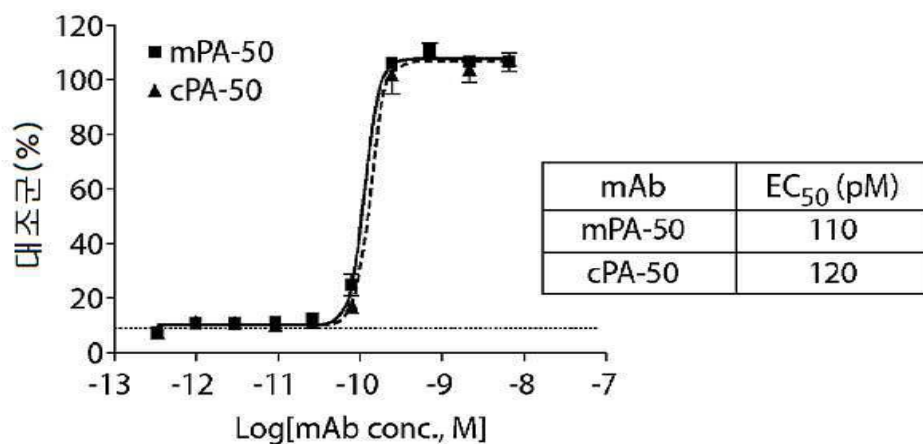
도면27

List 독소 A, T-84에 대해 60mg/ml

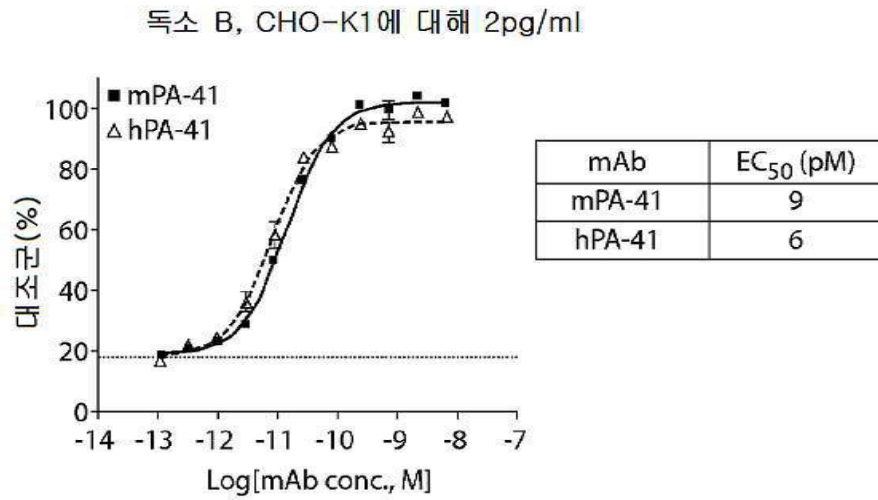


도면28

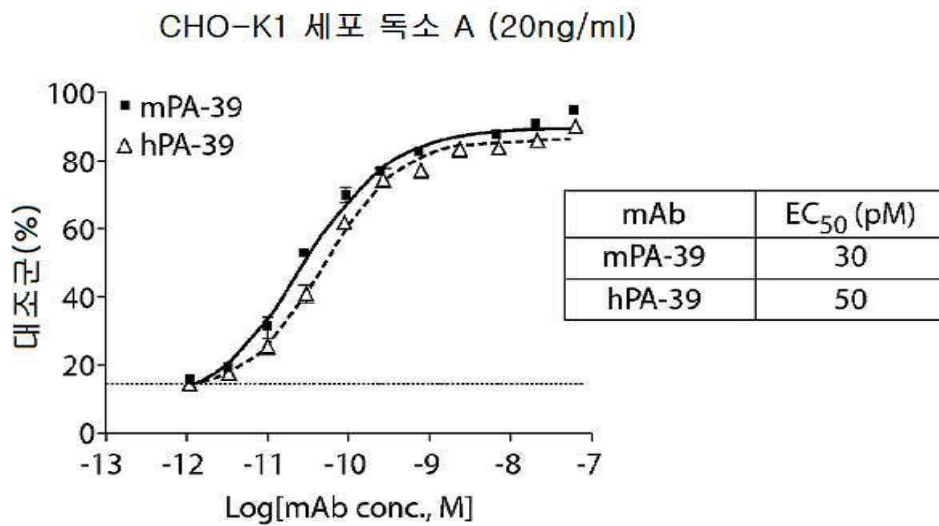
독소 A, T-84에 대해 60ng/ml



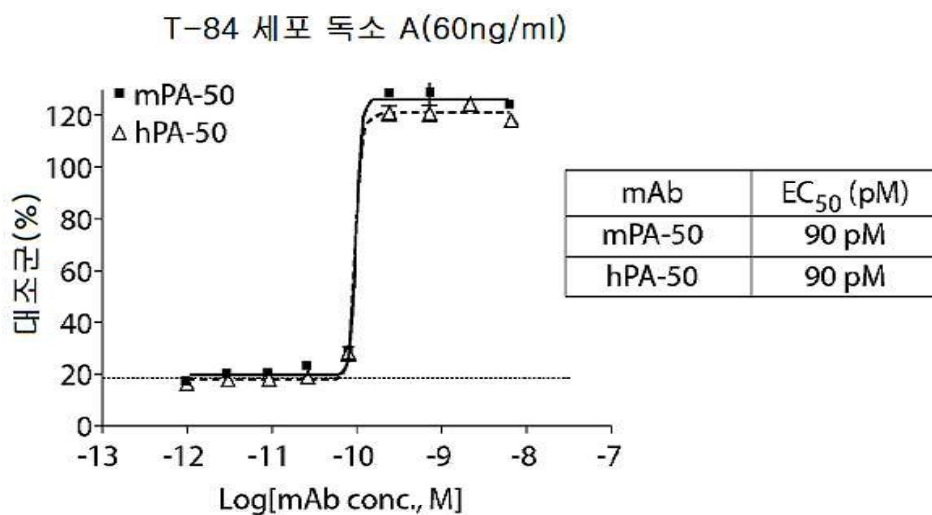
도면29



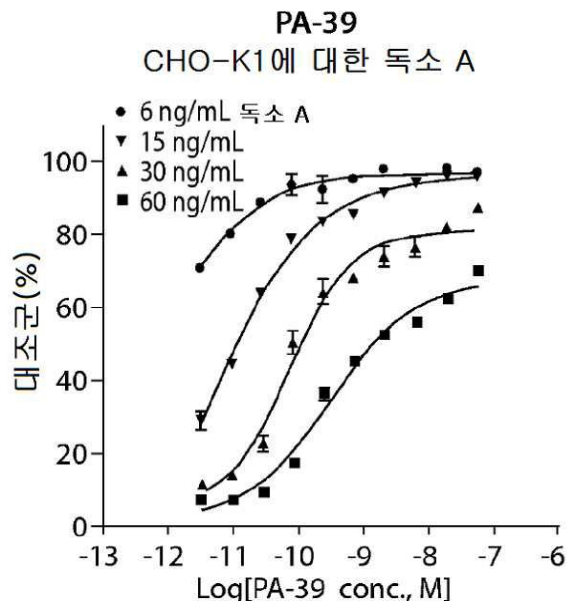
도면30



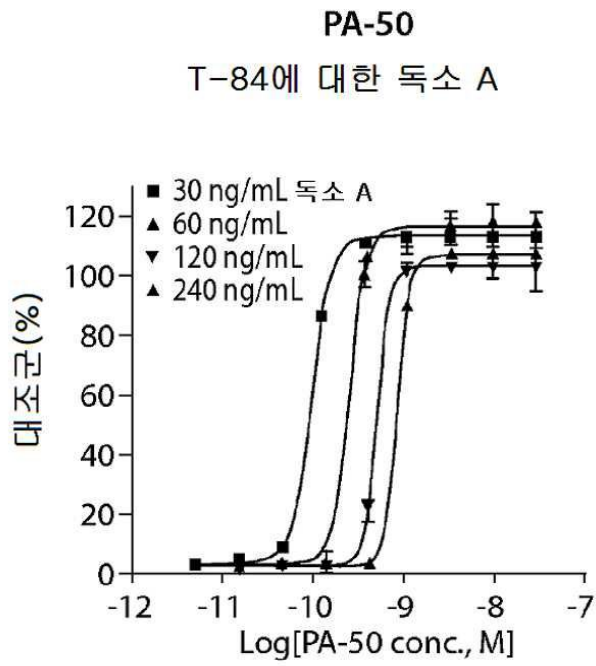
도면31a



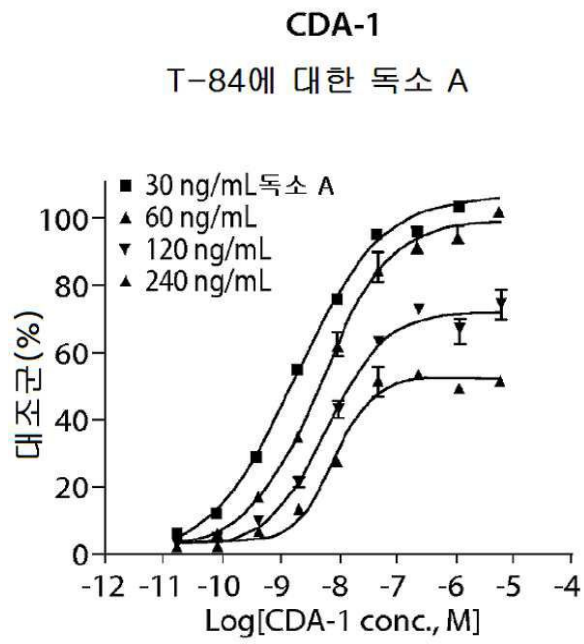
도면31b



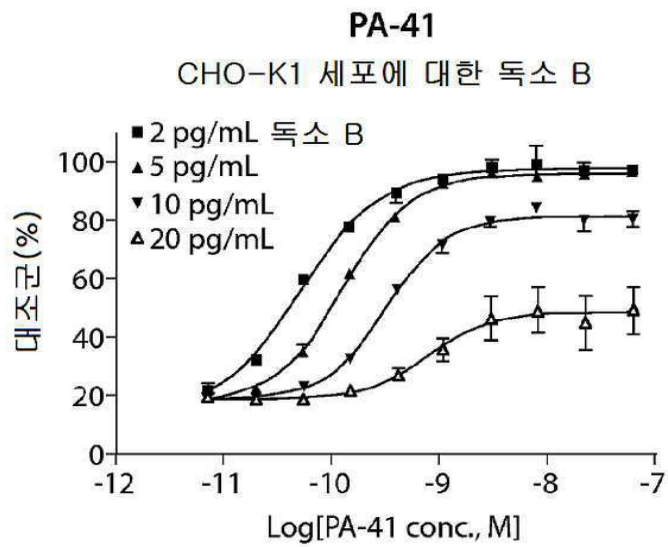
도면31c



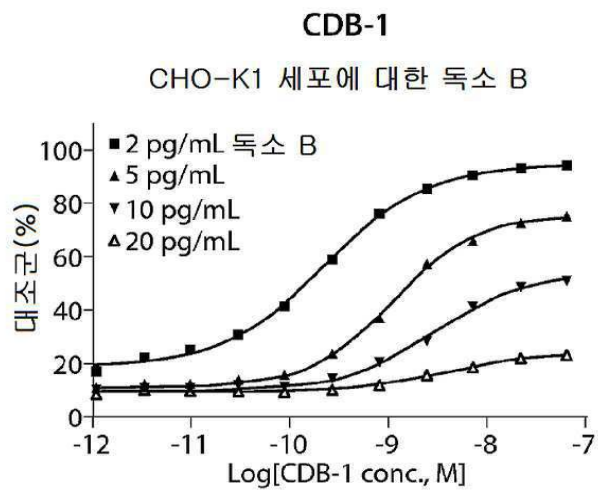
도면31d



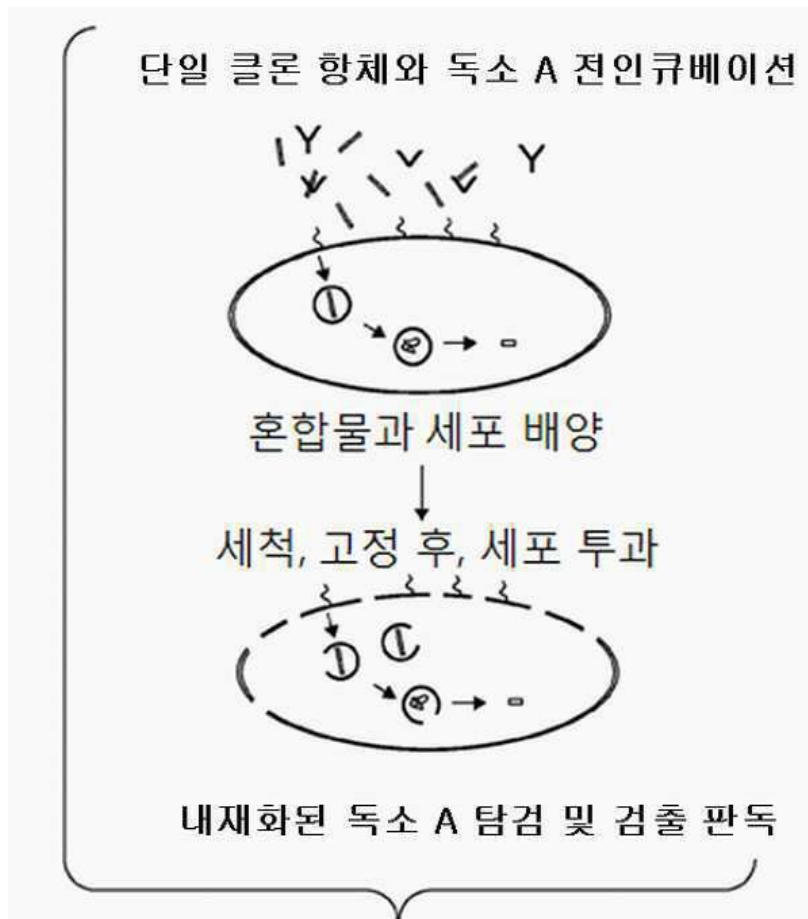
도면31e



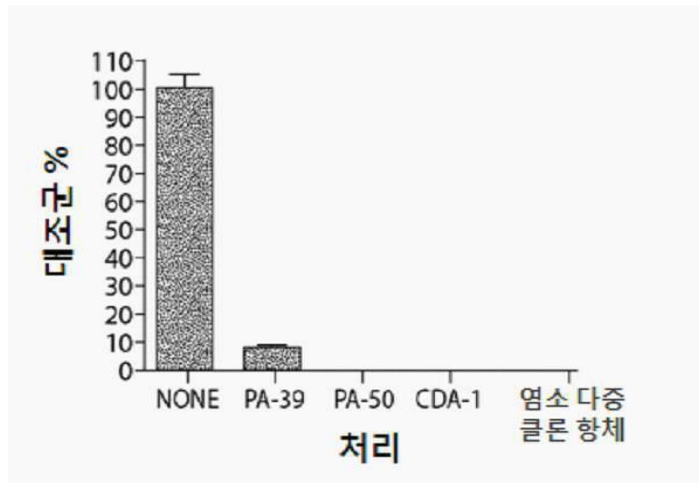
도면31f



도면31g



도면31h



도면32a

```

      1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF NDHNIHWVRQ

4           5           6           7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
APGQGLEWIG YIYPYIGTTVY NQKFKSKATL TVDTSTSTAY

      1           1
8           9           0           1
0122223456789 0123456789 0123456789 0123
MELRSLRSDDTAV YYCSRWGHRG FPYWGQGLTV TVSS
(SEQ ID NO:1)

```

도면32b

```

      1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF NDHNIHWVRQ

4           5           6           7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
APGQGLEWIG YIYPYIGTTVY NQKFKSKATL TVDNSTSTAY

      1           1
8           9           0           1
0122223456789 0123456789 0123456789 0123
MELRSLRSDDTAV YYCSRWGHRG FPYWGQGLTV TVSS
(SEQ ID NO:2)

```


도면33a

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCKASQNV	GTNVAWYQQK
4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
PGKAPKALIY	<u>SASYRYS</u> GV	S	RFSGSGSGT DFTLTISLQ
8	9	1	0
0123456789	0123456789	01234567	
PEDFAVYYCQ	<u>QYYSYPY</u> TF	Q	G

(SEQ ID NO:3)

도면33b

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCKASQNV	GTNVAWYQQK
4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
PGKAPKVLIIY	<u>SASYRYS</u> GV	S	RFSGSGSGT DFTLTISLQ
8	9	1	0
0123456789	0123456789	01234567	
PEDFAVYYCQ	<u>QYYSYPY</u> TF	Q	C

(SEQ ID NO:4)

도면34a

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	V	SCKASGYTF TDYNMDWVRQ
4	5	6	7
0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
APGQRLEWIG	<u>DINPKYDI</u> IGH	NPKFMG	KATL TVDKSASTAY
8	9	1	1
01222234567890	123456789	00123456789	0123
MELSSLRSED	TAV YYCAR	<u>SDRGW</u>	YFDVWGQGLV TVSS

(SEQ ID NO:5)

도면34b

```

123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF TDYNMDWVRQ

4          5          6          7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
APGQRLEWIG DINPKYDIIGH NPKFMGKATI TVDKSASTAY

          1          1
8          9          0          1
01222234567890 123456789 00123456789 0123
MELSSLRSEDTAV YCARSDRGW YFDVWGQGLV TVSS
(SEQ ID NO:6)

```

도면35

```

          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSCRASSSV NYMNWYQKP

4          5          6          7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
GQAPRPRIYA TSNLASGVPA RFSGSGSGTD YTLTISSLEP

          1
8          9          0
0123456789 0123456789 01234
EDFAVYYCQO WSSRTFGGGT KVEIK
(SEQ ID NO:7)

```

도면36a

```

          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYPF TNYFMHWVRQ

4          5          6          7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
APGQRLEWIG RINPYNGATS YSLNFRDKAT LTLDKSASTA

          1          1
8          9          0          1
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
YMELSSLRSE DTAVYYCARS TITSPLLDFW GQGLVTVSS
(SEQ ID NO:8)

```

도면36b

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYPF	<u>TNYFMHWVRQ</u>
4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
APGQRLEWIG	<u>RINPYNGATS</u>	YSLNFRDKAT	ITLDKSASTA
		1	1
8	9	0	1
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
YMELSSLRSE	DTAVYYCARS	<u>TITSPLLDWF</u>	GQGTTLVTVSS
(SEQ ID NO:9)			

도면37

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSCRASQSV	<u>GTSIHWYQQK</u>
4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
PGQAPRLLIK	<u>FASESISGIP</u>	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE
		1	
8	9	0	
0123456789	0123456789	01234567	
PEDFAVYYCQ	<u>QSNKWPFTFG</u>	QGTKLEIK	
(SEQ ID NO:10)			

도면38a

```

1  atg gat ttt caa gtt cag ata ttc tcc ttt ctt ctc att agc gcc
   M  D  F  Q  V  Q  I  F  S  F  L  L  I  S  A

46 agt gtg att atg tca aga ggg gag att gtc ctg aca cag agt ccc
   S  V  I  M  S  R  G  E  I  V  L  T  Q  S  P

91 gcc aca ctt agc ctg tcc ccc gga gag cgt gct aca ctc tct tgt
   A  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T  L  S  C

136 cgc gct tcc agc tct gtc aac tac atg aac tgg tat cag cag aaa
   R  A  S  S  S  V  N  Y  M  N  W  Y  Q  Q  K

181 ccc ggt cag gcc cct aga ccc cgg atc tat gcc aca tct aat ctt
   P  G  Q  A  P  R  P  R  I  Y  A  T  S  N  L

226 gcc tcc gga gtg cct gcc cga ttc agc ggg agc gga agt ggt acc
   A  S  G  V  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T

271 gat tac acc ctc aca atc tct agc ttg gaa cca gag gac ttt gca
   D  Y  T  L  T  I  S  S  L  E  P  E  D  F  A

316 gtc tat tac tgc caa cag tgg tct agt cgc act ttc ggt ggt ggc
   V  Y  Y  C  Q  Q  W  S  S  R  T  F  G  G  G

361 acc aaa ttg gag atc aag agg act gtc gct gcc cca agt gtg ttc
   T  K  L  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F

406 atc ttt cct cca tcc gat gag cag ctg aag agt gga acc gca tcc
   I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S

451 gtg gtt tgc ctg ctg aac aac ttt tac cct cgg gaa gct aaa gtg
   V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K  V

496 cag tgg aag gtg gac aat gca ctg cag tcc ggc aat agc cag gag
   Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E

541 tca gta acc gaa caa gat tcc aag gac tcc acc tac tct ctc tca
   S  V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S

586 tct acc ttg acc ctg tca aag gcc gac tat gaa aaa cac aag gtt
   S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V

631 tac gca tgt gag gta act cat caa ggg ctt agc tct cca gtc act
   Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T

676 aag agc ttt aac agg ggc gaa tgc tag (SEQ ID NO:17)
     K  S  F  N  R  G  E  C (SEQ ID NO:16)

```

도면38ba

```

1  atg gaa tgg tcc ggc gtg ttc atc ttt ttg ctg tca gtc acc gct
   M  E  W  S  G  V  F  I  F  L  L  S  V  T  A

46 ggc gtg cac tct caa gtc cag ctt gtt cag agc gga gca gaa gtg
   G  V  H  S  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V

91 aag aag cca ggg gcc agc gtc aag gtt tct tgt aaa gcc agt ggt
   K  K  P  G  A  S  V  K  V  S  C  K  A  S  G

136 tat acc ttt act gat tac aac atg gat tgg gta cgt cag gca ccc
   Y  T  F  T  D  Y  N  M  D  W  V  R  Q  A  P

181 gga caa cgg ctg gag tgg att ggc gac atc aat ccc aaa tac gac
   G  Q  R  L  E  W  I  G  D  I  N  P  K  Y  D

226 att atc ggc cat aac cct aag ttt atg gga aag gct acc att aca
   I  I  G  H  N  P  K  F  M  G  K  A  T  I  T

271 gta gat aag tct gct tcc acc gct tac atg gag ctc tcc tct ctg
   V  D  K  S  A  S  T  A  Y  M  E  L  S  S  L

316 cgc agt gag gat acc gca gtg tac tat tgc gcc agg agt gac cga
   R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  S  D  R

361 ggc tgg tat ttc gac gtt tgg ggg cag ggt aca ttg gtg act gtg
   G  W  Y  F  D  V  W  G  Q  G  T  L  V  T  V

406 tca agc gcc agc aca aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc
   S  S  A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P

451 tct agc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg
   S  S  K  S  T  S  G  G  T  A  A  L  G  C  L

496 gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca
   V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S  W  N  S

541 ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag
   G  A  L  T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q

586 tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc
   S  S  G  L  Y  S  L  S  S  V  V  T  V  P  S

631 agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag
   S  S  L  G  T  Q  T  Y  I  C  N  V  N  H  K

676 ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt
   P  S  N  T  K  V  D  K  R  V  E  P  K  S  C

```


도면38bb

```

721 gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg
    D K T H T C P P C P A P E L L
766 ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc
    G G P S V F L F P P K P K D T
811 ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac
    L M I S R T P E V T C V V V D
856 gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac
    V S H E D P E V K F N W Y V D
901 ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag
    G V E V H N A K T K P R E E Q
946 tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac
    Y N S T Y R V V S V L T V L H
991 cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac
    Q D W L N G K E Y K C K V S N
1036 aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa
    K A L P A P I E K T I S K A K
1081 ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg
    G Q P R E P Q V Y T L P P S R
1126 gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa
    E E M T K N Q V S L T C L V K
1171 ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg
    G F Y P S D I A V E W E S N G
1216 cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc
    Q P E N N Y K T T P P V L D S
1261 gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc
    D G S F F L Y S K L T V D K S
1306 agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag
    R W Q Q G N V F S C S V M H E
1351 gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg
    A L H N H Y T Q K S L S L S P
1396 ggt aaa tga      (SEQ ID NO:15)
    G K      (SEQ ID NO:14)

```


도면39a

```

1  atg gaa tct cag act caa gtg ttt gtg tac atg ttg ctg tgg ctg
   M  E  S  Q  T  Q  V  F  V  Y  M  L  L  W  L

46 agc ggc gtt gac ggt gac att cag atg acc caa agc ccc tca agt
   S  G  V  D  G  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S

91 ctt tct gct agc gtg ggg gac agg gtg acc ata aca tgc aaa gcc
   L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  K  A

136 agc caa aat gtg ggg act aac gtt gcc tgg tat cag cag aaa cca
   S  Q  N  V  G  T  N  V  A  W  Y  Q  Q  K  P

181 ggt aaa gca ccc aag gct ctg atc tac agt gca agt tat cga tac
   G  K  A  P  K  A  L  I  Y  S  A  S  Y  R  Y

226 tcc ggc gtg tcc tct cgg ttt tct ggc tct ggg agc gga acc gat
   S  G  V  S  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D

271 ttc act ctg acc att agt tca ctc caa cca gaa gat ttc gca gtc
   F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  V

316 tac tat tgt cag cag tac tat agt tac cca tat aca ttt gga cag
   Y  Y  C  Q  Q  Y  Y  S  Y  P  Y  T  F  G  Q

361 ggc acc aag ctg gaa atc aag aga acc gtt gcc gct cct tca gta
   G  T  K  L  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V

406 ttc atc ttc cct ccc tcc gat gag cag ttg aag tcc ggc aca gca
   F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A

451 agc gtc gta tgc ctt ttg aac aat ttc tat cca cgc gag gcc aaa
   S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K

496 gtg caa tgg aag gtc gac aac gct ctg cag tca ggc aac tcc caa
   V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q

541 gag tca gtc aca gag cag gac agc aaa gat tcc act tat tct ctc
   E  S  V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L

586 tct tct aca ctc act ctg agc aag gcc gac tat gag aag cat aag
   S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K

631 gtt tac gcc tgc gaa gtg acc cac cag gga ttg agt tcc cct gtc
   V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V

676 act aag tcc ttt aac cgt ggg gag tgt tag      (SEQ ID NO:21)
   T  K  S  F  N  R  G  E  C      (SEQ ID NO:20)

```

도면39ba

```

1  atg gag tgg tcc gga gtg ttc atc ttt ctg ctc tct gtt acc gct
   M  E  W  S  G  V  F  I  F  L  L  S  V  T  A

46 ggc gta cat agc caa gtc cag ctt gtc cag tct ggc gcc gag gtc
   G  V  H  S  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V

91 aag aaa cca ggg gcc agc gtg aaa gtt agt tgt aag gca tcc ggc
   K  K  P  G  A  S  V  K  V  S  C  K  A  S  G

136 tat acc ttc aac gat cac aat atc cac tgg gta cga cag gct cca
   Y  T  F  N  D  H  N  I  H  W  V  R  Q  A  P

181 ggc caa ggg ctg gaa tgg att ggt tac ata tac cct tac att gga
   G  Q  G  L  E  W  I  G  Y  I  Y  P  Y  I  G

226 aca aca gtg tat aac cag aag ttc aaa tcc aag gca act ctt act
   T  T  V  Y  N  Q  K  F  K  S  K  A  T  L  T

271 gtg gat aca tca acc tca act gcc tac atg gaa ttg aga tcc ctg
   V  D  T  S  T  S  T  A  Y  M  E  L  R  S  L

316 agg agt gac gac act gct gtc tat tac tgc agt cgg tgg gga cat
   R  S  D  D  T  A  V  Y  Y  C  S  R  W  G  H

361 cgc ggc ttt cct tat tgg ggt cag ggg aca ctc gtt act gtg agc
   R  G  F  P  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S

406 tct gcc agt acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tct
   S  A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P  S

451 agc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc
   S  K  S  T  S  G  G  T  A  A  L  G  C  L  V

496 aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc
   K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S  W  N  S  G

541 gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc
   A  L  T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  S

586 tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc
   S  G  L  Y  S  L  S  S  V  V  T  V  P  S  S

631 agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc
   S  L  G  T  Q  T  Y  I  C  N  V  N  H  K  P

676 agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg cca gca cag
   S  N  T  K  V  D  K  R  V  G  E  R  P  A  Q

721 gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc tgc ctg
   G  G  R  V  S  A  G  S  Q  A  Q  R  S  C  L

```

도면39bb

```

766 gac gca tcc cgg cta tgc agt ccc agt cca ggg cag caa ggc agg
    D A S R L C S P S P G Q Q G R

811 ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc act cat
    P R L P L H P E A S A R P T H

856 gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct ggg cag
    A Q G E G L L A F S P G S G Q

901 gca cag gct agg tgc ccc gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac
    A Q A R C P E P K S C D K T H

946 aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca
    T C P P C P A P E L L G G P S

991 gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc
    V F L F P P K P K D T L M I S

1036 cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa
    R T P E V T C V V V D V S H E

1081 gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg
    D P E V K F N W Y V D G V E V

1126 cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg
    H N A K T K P R E E Q Y N S T

1171 tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg
    Y R V V S V L T V L H Q D W L

1216 aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca
    N G K E Y K C K V S N K A L P

1261 gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga
    A P I E K T I S K A K G Q P R

1306 gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc
    E P Q V Y T L P P S R E E M T

1351 aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc
    K N Q V S L T C L V K G F Y P

1396 agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac
    S D I A V E W E S N G Q P E N

1441 aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc
    N Y K T T P P V L D S D G S F

1486 ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag
    F L Y S K L T V D K S R W Q Q

1531 ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac
    G N V F S C S V M H E A L H N

1576 cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga
    H Y T Q K S L S L S P G K
(aa: SEQ ID NO:18)
(na: SEQ ID NO:19)

```

도면40a

```

1 atg tcc gtt cct act caa gtg ctg gga ctg ctt ctt ctg tgg ctc
  M  S  V  P  T  Q  V  L  G  L  L  L  L  W  L

46 act gac gca agg tgt gag atc gtg ctg acc cag agt cca gcc aca
  T  D  A  R  C  E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T

91 ctc agc ttg tca ccc ggg gaa cgg gct aca ctg tcc tgt cgt gca
  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T  L  S  C  R  A

136 tca cag agc gtg ggt aca tca att cac tgg tat cag cag aag ccc
  S  Q  S  V  G  T  S  I  H  W  Y  Q  Q  K  P

181 ggt cag gct ccc aga ctc ctg ata aag ttt gcc tcc gaa tcc att
  G  Q  A  P  R  L  L  I  K  F  A  S  E  S  I

226 tct ggc att cca gcc cgc ttc tcc ggc tcc ggc agt gga act gat
  S  G  I  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D

271 ttc acc ctc acc att agt tct ttg gag cct gaa gat ttt gca gta
  F  T  L  T  I  S  S  L  E  P  E  D  F  A  V

316 tac tac tgt caa cag tct aac aag tgg cct ttt act ttt ggg cag
  Y  Y  C  Q  Q  S  N  K  W  P  F  T  F  G  Q

361 gga act aaa ctg gag atc aag cgc act gtc gct gct cca agc gta
  G  T  K  L  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V

406 ttc atc ttt cct ccc tcc gac gag cag ttg aaa tca ggg aca gcc
  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A

451 tct gtg gtc tgc ctg ctg aac aat ttc tac cca agg gaa gcc aaa
  S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K

496 gtg cag tgg aag gtc gat aat gca ctt caa tca ggt aat tct caa
  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q

541 gag agt gtg acc gag cag gat tcc aag gac agt acc tac tct ctc
  E  S  V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L

586 agc tca acc ctg acc ctt tct aaa gct gac tat gaa aaa cat aaa
  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K

631 gtc tac gcc tgc gaa gtg aca cac cag ggt ctg agt agc cct gtt
  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V

676 acc aag agc ttt aac cga ggc gag tgc tag      (SEQ ID NO:25)
  T  K  S  F  N  R  G  E  C      (SEQ ID NO:24)

```


도면40ba

```

1  atg gga tgg agc tgg att ttc ttg ttc ctc ctt tcc ggg act gct
   M  G  W  S  W  I  F  L  F  L  L  S  G  T  A
46  ggc gga ctg tcc caa gtc cag ttg gtg cag agc ggc gct gag gtt
   G  G  L  S  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V
91  aag aag ccc ggt gcc tct gtc aaa gtt agt tgc aaa gca agt ggc
   K  K  P  G  A  S  V  K  V  S  C  K  A  S  G
136 tac cct ttc aca aac tac ttt atg cac tgg gtg cgc cag gcc cct
   Y  P  F  T  N  Y  F  M  H  W  V  R  Q  A  P
181 ggg caa aga ctc gaa tgg atc ggt cgt atc aat cca tac aat ggg
   G  Q  R  L  E  W  I  G  R  I  N  P  Y  N  G
226 gca act agt tat tct ctc aac ttc agg gat aag gct acc att aca
   A  T  S  Y  S  L  N  F  R  D  K  A  T  I  T
271 ctg gac aag tct gcc tct acc gcc tat atg gag ctg agc tcc ctg
   L  D  K  S  A  S  T  A  Y  M  E  L  S  S  L
316 cgg agt gaa gat act gct gtc tat tac tgt gca cga tcc acc ata
   R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  S  T  I
361 acc tot ccc ctg ctg gac ttt tgg ggc cag ggc aca ctt gtg act
   T  S  P  L  L  D  F  W  G  Q  G  T  L  V  T
406 gta tca tca gca tcc aca aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca
   V  S  S  A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A
451 ccc tct agc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc
   P  S  S  K  S  T  S  G  G  T  A  A  L  G  C
496 ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac
   L  V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S  W  N
541 tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta
   S  G  A  L  T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L
586 cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc
   Q  S  S  G  L  Y  S  L  S  S  V  V  T  V  P
631 tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac
   S  S  S  L  G  T  Q  T  Y  I  C  N  V  N  H
676 aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg cca
   K  P  S  N  T  K  V  D  K  R  V  G  E  R  P
721 gca cag gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc
   A  Q  G  G  R  V  S  A  G  S  Q  A  Q  R  S
766 tgc ctg gac gca tcc cgg cta tgc agt ccc agt cca ggg cag caa
   C  L  D  A  S  R  L  C  S  P  S  P  G  Q  Q
811 ggc agg ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc
   G  R  P  R  L  P  L  H  P  E  A  S  A  R  P

```


도면40bb

```

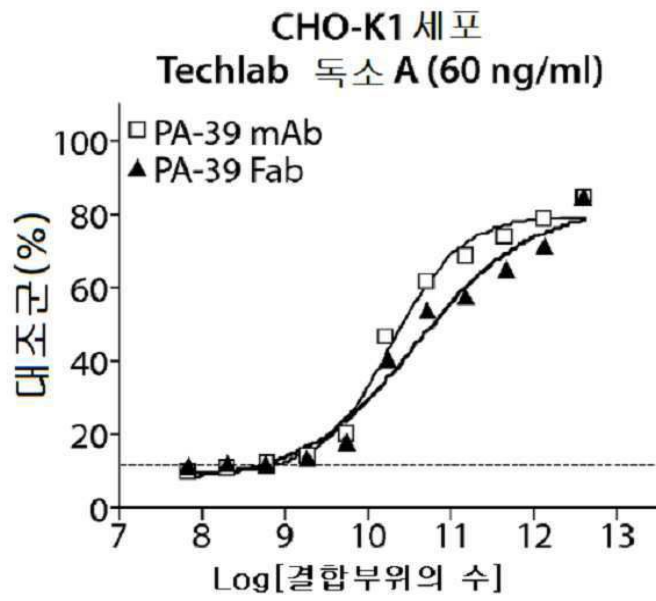
856 act cat gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct
    T  H  A  Q  G  E  G  L  L  A  F  S  P  G  S
901 ggg cag gca cag gct agg tgc ccc gag ccc aaa tct tgt gac aaa
    G  Q  A  Q  A  R  C  P  E  P  K  S  C  D  K
946 act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga
    T  H  T  C  P  P  C  P  A  P  E  L  L  G  G
991 ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg
    P  S  V  F  L  F  P  P  K  P  K  D  T  L  M
1036 atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc
    I  S  R  T  P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S
1081 cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg
    H  E  D  P  E  V  K  F  N  W  Y  V  D  G  V
1126 gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac
    E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  Y  N
1171 agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac
    S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V  L  H  Q  D
1216 tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc
    W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K  A
1261 ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag
    L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q
1306 ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag
    P  R  E  P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  R  E  E
1351 atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc
    M  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G  F
1396 tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg
    Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P
1441 gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc
    E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G
1486 tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg
    S  F  F  L  Y  S  K  L  T  V  D  K  S  R  W

1531 cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg
    Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A  L
1576 cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa
    H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K

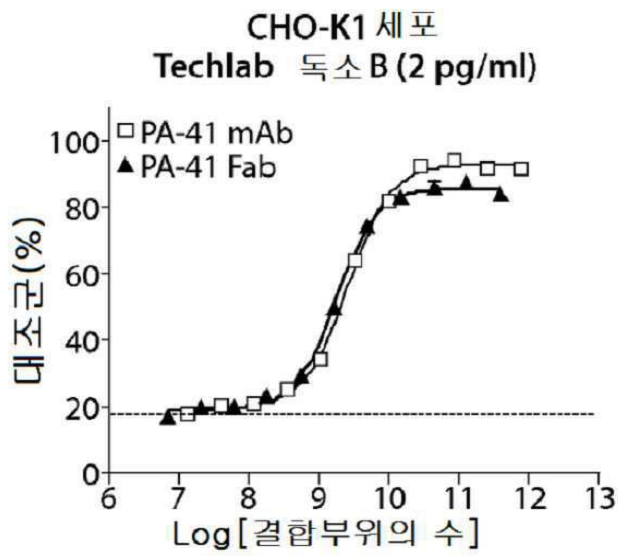
1621 tga
(aa; SEQ ID NO:22)
(na; SEQ ID NO:23)

```

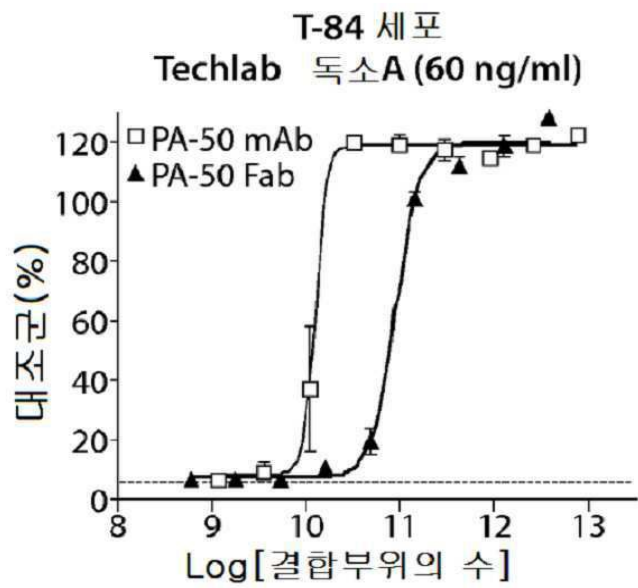
도면41a



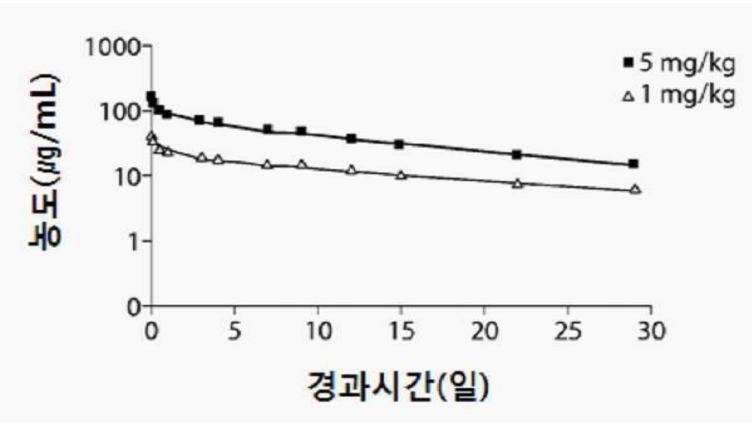
도면41b



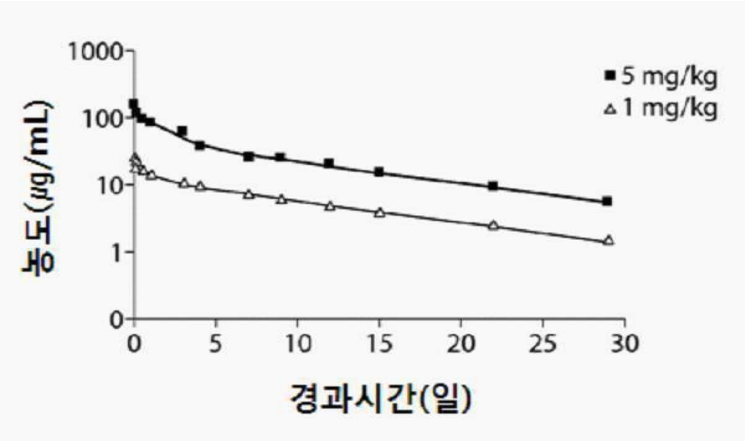
도면41c



도면42a



도면42b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC.

<120> ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE-ASSOCIATED
INFECTION AND DISEASE

<130> P0903.70000W000

<140> TBD

<141> 2011-04-15

<150> US 61/324,503

<151> 2010-04-15

<150> US 61/381,669

<151> 2010-09-10

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VH region

<400> 1

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VH region

<400> 2

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Asp His

20 25 30
Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Thr Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ser Arg Trp Gly His Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VL region

<400> 3

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

1 5 10 15

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VL region

<400> 4

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VH region

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Tyr Asp Ile Ile Gly His Asn Pro Lys Phe

50 55 60

Met Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Asp Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VH region

<400> 6

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

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

85 90 95
 Ala Arg Ser Asp Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 7

<211> 104

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VL region

<400> 7

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

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

85 90 95
 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VH region

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Ile Thr Ser Pro Leu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VH region

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Ala Arg Ser Thr Ile Thr Ser Pro Leu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, VL region

<400> 10

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

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

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

<210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> oligonucleotide primer
 <400> 11
 tataatctaga attccccccc cccccccccc 30
 <210> 12
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> oligonucleotide primer
 <400> 12
 tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc 46
 <210> 13
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> oligonucleotide primer
 <400> 13
 tatagagctc aagcttccag tggatagacc atgatggggg ctgttcgttt tggc 54
 <210> 14
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> antibody, heavy chain
 <400> 14
 Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

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

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

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

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

 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 15

<211> 1404

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, heavy chain

<400> 15

atggaatggt ccggcgtgtt catctttttg ctgtcagtca ccgctggcgt gcactctcaa 60
 gtccagcttg ttcagagcgg agcagaagtg aagaagccag gggccagcgt caaggtttct 120
 tgtaaagcca gtggttatac ctttactgat tacaacatgg attgggtacg tcaggcaccc 180

ggacaacggc tggagtggat tggcgacatc aatcccaa at acgacattat cggccataac 240
 cctaagt tta tgggaaaggc taccattaca gtagataagt ctgcttccac cgcttacatg 300
 gagctctcct ctctgcgcag tggagatacc gcagtgtact attgcgccag gaggtagccga 360
 ggctgggtatt tcgacgtttg ggggcagggt acattgggtga ctgtgtcaag cgccagcaca 420

aaggggcccat cggctcttccc cctggcacc cctagcaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcttgggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccttcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gaggtagacc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840

tgcgtgggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggctgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac 960
 cgtgtgggtca gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1140
 aaccagggtca gctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 16

<211> 233

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, light chain

<400> 16

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Asn Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 Pro Arg Pro Arg Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110
 Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 17
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> antibody, light chain
 <400> 17

atggattttc aagttcagat attctccttt cttctcatta gcgccagtgt gattatgtca 60
agaggggaga ttgtcctgac acagagtccc gccacactta gcctgtcccc cggagagcgt 120
gctacactct cttgtcgcgc ttccagctct gtcaactaca tgaactggta tcagcagaaa 180
cccggtcagg cccttagacc ccggatctat gccacatcta atcttgctc cggagtcct 240

gccccattca gcgggagcgg aagtgggtacc gattacaccc tcacaatctc tagcttgga 300
ccagaggact ttgcagtcta ttactgccaa cagtgggtcta gtcgcacttt cggtaggtggc 360
accaaattgg agatcaagag gactgtcgt gccccaagtg tgttcacttt tctccatcc 420
gatgagcagc tgaagagtgg aaccgcatcc gtggtttgcc tgctgaacaa cttttaccct 480
cgggaagcta aagtgtcagt aaccgaacaa gattccaagg actccaccta ctctctctca 540
tctaccttga ccctgtcaaa ggccgactat gaaaaacaca aggtttacgc atgtgaggta 600
actcatcaag ggcttagctc tccagtcact aagagcttta acaggggcga atgctag 657

<210> 18

<211> 538

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, heavy chain

<400> 18

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

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

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

35 40 45

Asn Asp His Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Thr Thr Val Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val

100 105 110

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

 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gly Glu Arg Pro Ala Gln
 225 230 235 240

 Gly Gly Arg Val Ser Ala Gly Ser Gln Ala Gln Arg Ser Cys Leu Asp
 245 250 255
 Ala Ser Arg Leu Cys Ser Pro Ser Pro Gly Gln Gln Gly Arg Pro Arg
 260 265 270
 Leu Pro Leu His Pro Glu Ala Ser Ala Arg Pro Thr His Ala Gln Gly
 275 280 285
 Glu Gly Leu Leu Ala Phe Ser Pro Gly Ser Gly Gln Ala Gln Ala Arg
 290 295 300

 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 325 330 335
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 340 345 350
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

355 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 370 375 380
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 385 390 395 400
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 405 410 415
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 420 425 430

 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 435 440 445
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 450 455 460
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 465 470 475 480
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 485 490 495

 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 500 505 510
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 515 520 525
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 530 535
 <210> 19
 <211> 1617
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> antibody, heavy chain
 <400> 19
 atggagtggg ccggagtgtt catctttctg ctctctgtta ccgctggcgt acatagccaa 60

 gtccagcttg tccagtctgg cgccgaggtc aagaaaccag gggccagcgt gaaagttagt 120

tgtaaggcat ccggctatac cttcaacgat cacaatatcc actgggtacg acaggctcca	180
ggccaagggc tggaatggat tggttacata tacccttaca ttggaacaac agtgataac	240
cagaagtcca aatccaaggc aactcttact gtggatacat caacctcaac tgcctacatg	300
gaattgagat ccctgaggag tgacgacact gctgtctatt actgcagtcg gtggggacat	360
cgcggctttc cttattgggg tcaggggaca ctctgtactg tgagctctgc cagtaccaag	420
ggcccatcgg tcttccccct ggccacctct agcaagagca cctctggggg cacagcggcc	480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccggtga cgggtcgtg gaactcaggc	540
gccctgacca gggcgctga cacttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	600
ctcagcagcg tggtagcgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac	660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagagag ttggtgagag gccagcacag	720
ggaggagggg tgtctgtgg aagccaggct cagcgtcct gcctggacgc atcccggcta	780
tgcagtccta gtccaggga gcaaggcagg ccccgctctgc ctcttcaccc ggaggcctct	840
gccccccca ctcatgtca gggagagggt cttctggctt tttcccagg ctctgggcag	900
gcacaggcta ggtgccccga gcccgaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	960
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac	1020
acctcatga tctcccgac cctgaggtc acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa	1080
gacctgagg tcaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	1140
aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	1200
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaaca agccctccca	1260
gcccccatcg agaaaacct ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggttac	1320
acctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc	1380
aaaggettct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac	1440
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctatagcaag	1500
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat	1560
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga	1617
<210> 20	
<211> 234	
<212> PRT	
<213> artificial sequence	
<220><223> antibody, light chain	
<400> 20	

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn

35 40 45

Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Ser Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 21

<211> 705

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, light chain

<400> 21

atggaatctc agactcaagt gtttgtgtac atgttgctgt ggctgagcgg cgttgacggt 60
gacattcaga tgacccaaag cccctcaagt ctttctgcta gcgtggggga cagggtgacc 120

ataacatgca aagccagcca aaatgtgggg actaacgttg cctggtatca gcagaaacca 180
ggtaaagcac ccaaggctct gatctacagt gcaagttatc gatactccgg cgtgtcctct 240
cggttttctg gctctgggag cggaaccgat ttactctga ccattagttc actccaacca 300
gaagatttcg cagtctacta ttgtcagcag tactatagtt accatatac atttgacag 360
ggcaccaagc tggaatcaa gagaaccgtt gccgtcctt cagtattcat ctccctccc 420
tccgatgagc agtgaagtc cggcacagca agcgtcgtat gccttttgaa caatttctat 480
ccacgcgagg ccaaagtga atggaaggtc gacaacgctc tgcagtcagg caactccaa 540

gagtcagtca cagagcagga cagcaaagat tccacttatt ctctctcttc tacactcact 600
ctgagcaagg ccgactatga gaagcataag gtttacgcct gcgaagtgc ccaccagga 660
ttgagttccc ctgtcactaa gtcctttaac cgtggggagt gttag 705

<210> 22

<211> 540

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, heavy chain

<400> 22

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

65					70					75					80
Leu	Asn	Phe	Arg	Asp	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Leu	Asp	Lys	Ser	Ala	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
				100					105					110	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Ile	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Asp	Phe	Trp
				115					120					125	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
				130					135					140	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
145					150					155					160
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
				165					170					175	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				180					185					190	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
				195					200					205	
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
				210					215					220	
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Gly	Glu	Arg	Pro
225					230					235					240
Ala	Gln	Gly	Gly	Arg	Val	Ser	Ala	Gly	Ser	Gln	Ala	Gln	Arg	Ser	Cys
				245					250					255	
Leu	Asp	Ala	Ser	Arg	Leu	Cys	Ser	Pro	Ser	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Arg
				260					265					270	
Pro	Arg	Leu	Pro	Leu	His	Pro	Glu	Ala	Ser	Ala	Arg	Pro	Thr	His	Ala
				275					280					285	
Gln	Gly	Glu	Gly	Leu	Leu	Ala	Phe	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Ala	Gln
				290					295					300	
Ala	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
305					310					315					320

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

325 330 335

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

340 345 350

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

355 360 365

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

370 375 380

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

385 390 395 400

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

405 410 415

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

420 425 430

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

435 440 445

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

450 455 460

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

465 470 475 480

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

485 490 495

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

500 505 510

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

515 520 525

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

530 535 540

<210> 23

<211> 765

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, heavy chain

<400> 23

atgggatgga gctggatttt cttgttcctc ctttccggga ctgctggcgg actgtcccaa 60
gtccagttagg tgcagagcgg cgctgagggt aagaagcccg gtgcctctgt caaagttagt 120
tgcaaagcaa gtggctaccc ttccacaaac tactttatgc actgggtgcg ccaggcccct 180
gggcaaagac tcgaatggat cggctgtatc aatccataca atggggcaac tagttattct 240
ctcaacttca gggataaggc taccattaca ctggacaagt ctgcctctac cgcctatatg 300

gagctgagct ccctgcggag tgaagatact gctgtctatt actgtgcacg atccaccata 360
acctctcccc tgctggactt ttggggccag ggcacacttg tgactgtatc atcagcatcc 420
acaaagggcc catcggctctt cccctggca ccctctagca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacgt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttag tgagaggcca 720

gcacagggag ggagggtgtc tgctggaagc caggctcagc gctcc 765

<210> 24

<211> 234

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, light chain

<400> 24

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile Lys Phe Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

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

115 120 125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

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

145 150 155 160
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165 170 175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180 185 190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

195 200 205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

210 215 220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 25

<211> 705

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> antibody, light chain

<400> 25

atgtccgttc ctactcaagt gctgggactg cttcttctgt ggctcactga cgcaaggtgt	60
gagatcgtgc tgacctagag tccagccaca ctcagcttgt caccggggga acgggctaca	120
ctgtcctgtc gtgcatcaca gagcgtgggt acatcaattc actggtatca gcagaagccc	180
ggtcaggctc ccagactcct gataaagttt gcctccgaat ccatttctgg cattccagcc	240
cgcttctccg gctccggcag tggaactgat ttcacctca ccattagttc ttgggagcct	300

gaagattttg cagtatacta ctgtcaacag tctaacaagt ggccttttac ttttgggcag	360
ggaactaaac tggagatcaa gcgcactgtc gctgctccaa gcgtattcat ctttcctccc	420
tccgacgagc agttgaaatc agggacagcc tctgtggtct gcctgctgaa caatttctac	480
ccaagggaag ccaaagtgca gtggaaggtc gataatgcac ttcaatcagg taatttctca	540
gagagtgtga ccgagcagga ttccaaggac agtacctact ctctcagctc aaccctgacc	600
ctttctaaag ctgactatga aaaacataaa gtctacgcct gcgaagtgac acaccagggt	660
ctgagtagcc ctgttaccaa gagctttaac cgaggcgagt gctag	705