



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0119913  
(43) 공개일자 2021년10월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)  
G01N 33/569 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/1271 (2013.01)  
A61P 11/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0038878
- (22) 출원일자 2021년03월25일  
심사청구일자 없음
- (30) 우선권주장  
62/994,744 2020년03월25일 미국(US)

- (71) 출원인  
시너모어 바이오로지스 (수조우) 컴퍼니 리미티드  
중국 215000 수조우 인터스트리얼 파크 상텐 스트리트 빌딩5 넘버218
- (72) 발명자  
차오, 쯔-위안  
대만 11492 타이페이 네이후 디스트릭트 뤼구앙 로드 513 라인 22 엘리 넘버 5 6에프-6  
창, 칭-웬  
대만 11492 타이페이 네이후 디스트릭트 뤼구앙 로드 513 라인 22 엘리 넘버 5 6에프-6  
차오, 에릭  
대만 11492 타이페이 네이후 디스트릭트 뤼구앙 로드 513 라인 22 엘리 넘버 5 6에프-6
- (74) 대리인  
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 황색포도상구균의 알파-독소에 특이적인 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 개시는 황색포도상구균의 α-독소에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부위에 관한 것이다. 본 개시는 또한 약제학적 조성물, 황색포도상구균 감염으로 인한 질병 및/또는 질환의 치료 및/또는 예방이 필요한 대상체에서 상기 질병 및/또는 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법, 및 샘플에서 황색포도상구균의 α-독소를 검출하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

**A61P 31/04** (2018.01)

**G01N 33/56938** (2013.01)

**A61K 2039/505** (2013.01)

**C07K 2317/565** (2013.01)

**C07K 2317/92** (2013.01)

**G01N 2333/3156** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

황색포도상구균(*Staphylococcal aureus*)의  $\alpha$ -독소의 에피토프 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위(CDR) 및 경쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위를 포함하고, 상기 중쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위는 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 부위를 포함하고, 상기 경쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위는 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 부위를 포함하며:

상기 CDRH1 부위는 서열 번호 1 내지 2로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRH2 부위는 서열 번호 3 내지 6 및 31로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRH3 부위는 서열 번호 7 내지 9로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하며;

상기 CDRL1 부위는 서열 번호 10 내지 13으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRL2 부위는 서열 번호 14 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하며; 상기 CDRL3 부위는 서열 번호 16 내지 18로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CDRH1 부위는 서열 번호 1의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRH2 부위는 서열 번호 3의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRH3 부위는 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하며;

상기 CDRL1 부위는 서열 번호 10의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRL2 부위는 서열 번호 14의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRL3 부위는 서열 번호 16의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 것인,

항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 19의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위; 및 서열 번호 20의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 21 내지 23로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위; 및 서열 번호 24 내지 26으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 5**

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 27의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위; 및 서열 번호 28의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 6**

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 29의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위; 및 서열 번호 30의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 7**

제1항에 있어서,

상기 항체는 포유 동물 항체, 단일 클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 8**

황색포도상구균의 α-독소 중화가 필요한 대상체에서 상기 황색포도상구균의 α-독소 중화를 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 항체는  $1 \times 10^{-7}$  to  $1 \times 10^{-10}$  범위의 KD로 α-독소에 결합하는 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 10**

제8항에 있어서,

황색포도상구균(*S. aureus*) 감염과 관련하여 수동 면역 요법을 제공하는, 약제학적 조성물.

**청구항 11**

황색포도상구균 감염으로 인한 질병 및/또는 질환의 치료, 예방적 치료 및/또는 예방이 필요한 대상체에서 상기 질병 및/또는 질환을 치료, 예방적 치료 및/또는 예방하기 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 12**

제11항에 있어서,

상기 황색포도상구균 감염으로 인한 질병 및/또는 질환은 폐렴인 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 13**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 샘플을 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플에서 황색포도상구균의 α-독소를 검출하는 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 샘플 내 황색포도상구균의 α-독소 검출용 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 황색포도상구균의 α-독소에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 종종 인체에 무증상으로 운반되는 기회감염성(opportunistic) 병원체이다. 병원성 균주는 종종 강력한 단백질 독소 및 인간 면역 체계를 회피하는 기타 독성 인자를 생성하여 감염을 촉진한다. 황색포도상구균(*S. aureus*)은 경미한 피부 감염에서 폐렴, 수막염, 골수염, 심내막염, 독성 쇼크 증후군, 균혈증 및 패혈증과 같은 생명을 위협하는 질병에 이르기까지 다양한 질병을 일으킬 수 있다. 이는 여전히 병원내 감염의 가장 흔한 5가지 원인 중 하나이며 종종 수술 후 상처 감염의 원인이다.

[0004] 메티실린 내성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)과 같은 항생제 내성 형태의 황색포도상구균의 출현은 임상 의학에서 전 세계적인 문제이다. MRSA의 독성 메커니즘에 대한 현재 개념에는 세포 표면 및 분비된 독성 인자의 놀랄 만한 배열이 포함된다. 세포 표면 독성 인자에는 접착 매트릭스 분자(MSCRAMM), 철 조절 단백질, 다당류 세포간 부착 및 캡슐 다당류를 인식하는 미생물 표면 성분이 포함된다. 분비된 독성 인자는 일반적으로 지수 후(post-exponential) 및 정지 단계 중에 생성되며, 여기에는 외효소, 외독소 α, β, γ 및 δ 독소, Panton-Valentine leukocidin (PVL), 초항원 및 독성 쇼크 증후군 독소-1 (TSST-1) 및 표피탈락 독소 A 및 B가 포함된다. US 20210079071은 황색포도상구균의 치료를 위한 응고 포도상구균 및 vWbp의 단일 클론 항체 억제제를 제공한다.

[0005] 알파-독소 (AT)는 황색포도상구균 임상 분리물(isolate) 사이에서 보존되는 세포 세공(cytolytic pore) 형성 독소이며, 폐렴, 피부 괴사증(endocarditis), 심내막염 및 패혈증에서 역할을 하는 것으로 나타났다. AT는 진핵 세포 표면에서 고리 구조로 조립될 수 있는 33 kDa 가용성 단량체 단백질로서 분비된다. 조립된 독소는 세포막에 삽입되고, 세포막의 무결성(integrity)을 파괴하여 세포 손상 및 사망에 기여하는 세공을 형성한다. 면역 예방의 표적으로서 독소는 디프테리아, 과상풍, 및 보툴리누스 중독(botulism)과 같은 세균성 질병에 대한 백신 또는 수동 면역 요법의 일부로서 수십 년 동안 성공적이었다. 최대 면역 반응을 생성하기 위해 때때로 반복적인 부스터(booster)와 오랜 시간이 필요한 능동 예방 접종과 달리, 수동 예방 접종은 급성 황색포도상구균 질병의 중증도를 줄이기 위해 예방 접종을 받지 않은 환자에게 즉각적인 치료를 제공한다.

[0006] 따라서 황색포도상구균 감염을 치료하거나 예방하기 위한 신규한 접근법을 개발할 필요가 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

- [0008] 본 발명은 황색포도상구균의 α-독소의 에피토프(epitope) 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 본 개시에 따른 항체는 황색포도상구균의 α-독소를 중화시키고, 따라서 황색포도상구균 감염으로 인한 질병 및/또는 질환의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 본 개시의 항체는 또한 황색포도상구균의 α-독소를 검출하는데 유용하다.
- [0009] 본 개시는 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 개시는 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 황색포도상구균 감염으로 인한 질병 및/또는 질환의 치료 및/또는 예방이 필요한 대상체에서 질병 및/또는 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0011] 본 개시는 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 샘플을 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플에서 황색포도상구균의 α-독소를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0012] 본 개시는 다음 부문에서 상세히 설명된다. 본 개시의 다른 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명 및 청구범위에서 찾을 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0014] 도 1: 항-α-독소 단일 클론 항체는 α-독소의 존재 하에 A549 세포의 세포 생존력을 증가시켰다. 4 및 40 μg/ml 농도의 정제된 항체를 8 μg/ml의 α-독소의 존재 하에 세포적 분석(cytolytic assay)에 첨가하여 1:0.1 (4 μg/ml) 또는 1:1 (40 μg/ml)의 α-독소 대 항체 비율을 얻었다. 비색 MTT 분석 키트를 사용하여 세포 생존력을 분석했다. “\*” 항체는 α-독소-유도 세포 용해를 예방하는 능력을 보여주었다.
- 도 2: 쥐 25A1 단일 클론 항체는 α-독소에 결합한다. Biacore T100에서 활성 유동 세포(active flow cell)에서 캡처된 25A1의 항원 결합 프로파일. 상이한 선은 1.56 ~ 50 nM의 다양한 농도에서 α-독소에 대한 25A1의 결합 반응을 나타낸다.
- 도 3a 다양한 항-α-독소 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인(domain)의 아미노산 서열. 인간 생식 계열 서열 IGHV1-2 및 IGKV3-11을 이식(grafting)에 사용했다. 무린 항체와 인간 생식 계열 서열 사이의 아미노산 차이는 굵게 표시되고 밑줄이 그어져 있다; CDR 잔기는 박스에 표시된다. 역 돌연변이는 회색 라벨로 표시된다. 도 3b 재조합 α-독소에 결합하는 항체의 결합 동역학의 SPR 센서그램(sensorgram). 결합 동역학은 Biacore T200에 의해 단일 주기 동역학 방법으로 측정되었다. 도 3c 25A1-B5B6AQT의 아미노산 서열. 신호 펩티드의 아미노산 서열은 굵게 표시되고 밑줄이 그어져 있다. 가변 부위는 회색으로 표시된다.
- 도 4: 25A1, 25A1-B2B4AQT, 및 25A1-B5B6AQT는 토끼 RBC 세포의 재조합 α-독소 또는 천연 α-독소 유도 용해를 억제한다. 항체의 연속 희석물 (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 및 0.78 mg/mL)을 토끼 RBC와 함께 재조합 α-독소 (400 ng/ml) 또는 조(crude) 박테리아 상층액 (1:8~1:16 희석물)과 함께 배양했다. 용혈은 상층액에서 헤모글로빈 방출량으로 측정된다. 용혈 억제율은 ((2% TritonX-100의 OD450 - 시험 항체의 OD450)/2 % TritonX-100의 OD450) x 100%로 계산하였다.
- 도 5: SYN100이 투여된 황색포도상구균 BAA-1717 감염된 쥐에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선. 쥐에 0일째에 8 x 10<sup>7</sup> CFU/쥐의 접종원 크기로 USA300 MRSA, BAA-1717을 정맥 내로 접종하였다. 25A1은 감염 24시간 전에 50, 25, 10 및 5 mg/kg으로 복강 내 (IP)로 투여하였다. 25 및 10 mg/kg의 대조군 항체도 감염 24시간 전에 복강 내로 투여하였다. 동물 사망률은 10일 동안 모니터링하였다. 비히클(vehicle) 대조군에 비해 동물의 50 퍼센트 이상 (50%)의 생존은 상당한 항 감염 활성을 나타냈다.
- 도 6: SYN100이 투여된 황색포도상구균 ATCC29213 감염된 쥐에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선. CD-1 쥐에 0일째

에  $2.0 \times 10^7$  CFU/쥐의 접종원 크기로 ATCC29213을 복강 내로 접종하였다. SYN100은 감염 24시간 전에 3개의 쥐 그룹에 100, 50 및 10 mg/kg으로 복강 내 (IP)로 투여하였다. 감염된 동물의 생존은 4일 동안 모니터링하였다.

도 7: SYN100이 투여된 황색포도상구균 BAA-1556, NRS261, 및 SF8300 감염된 쥐에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선. SYN100 예방은 쥐(murine) 폐렴 모델에서 생존율을 증가시킨다. C57BL/6J 쥐에 0일째에  $1.62 \times 10^7$  CFU/쥐의 접종원 크기로 BAA-1556;  $3.3 \times 10^7$  CFU/쥐 접종원 크기로 NRS261 또는  $2.82 \times 10^7$  cfu 접종원 크기로 SF8300을 비강 내로 접종하였다. SYN100은 감염 24시간 전에 BAA-1556 감염된 쥐에 10, 5, 및 1 mg/kg 또는 100, 50, 및 10 mg/kg으로 복강 내 (IP)로 투여하였다. 감염된 동물의 생존은 7일 동안 모니터링하였다.

도 8: SYN100, 및/또는 반코마이신이 투여된 황색포도상구균 NRS261 감염된 쥐에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선. C57BL/6J 쥐에 0일째에  $5.0 \times 10^7$  CFU/쥐의 접종원 크기로 NRS261를 비강 내로 접종하였다. SYN100은 감염 24시간 전에 4개의 쥐 그룹에 10 mg/kg으로 복강 내 (IP)로 투여하였다. 반코마이신은 감염 2시간 후 30, 15, 및 7.5 mg/kg으로 투여하였다. 3개의 그룹의 쥐는 반코마이신과 SYN100을 모두 받았다. 감염된 동물의 생존은 5일 동안 모니터링하였다.

도 9: SYN100이 투여된 황색포도상구균 ST20120426 감염된 토끼에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선. 뉴질랜드 토끼에 0일째에  $3.2-5.2 \times 10^7$  CFU/토끼의 접종원 크기로 ST20120426을 비강 내로 접종하였다. SYN100은 감염 24시간 전에 125, 100, 75, 50, 및 25 mg/kg으로 정맥 내로 투여하였다. 감염된 동물의 생존을 7일 동안 모니터링하였다.

도 10a SYN100 및/또는 리네졸리드가 투여된 황색포도상구균 ST20120426 감염된 토끼에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선. 뉴질랜드 토끼에 0일째에  $2.9-4.1 \times 10^7$  CFU/토끼의 접종원 크기로 ST20120426을 비강 내로 접종하였다. SYN100은 감염 24시간 전에 30 mg/kg으로 정맥 내로 투여하였다. 리네졸리드는 감염 4시간 후 50 mg/kg으로 투여하였다. 감염된 동물의 생존을 48시간 동안 모니터링하였다. 도 10b 폐 염증은 모든 치료 그룹에 대한 거시적 (macroscopic) 점수 측면에서 평가하였으며, 점수가 높을수록 세균성 감염으로 인한 더 심각한 손상을 나타낸다. 열린 원은 감염 후 30시간까지 죽은 동물을 나타낸다. 채워진 원은 감염 후 30 시간까지 살아있는 동물을 나타낸다. 도 10c 체중 (BW)에 대한 폐 중량 (LW)의 비율. 도 10d 폐 조직 내 세균 수. p-값 <0.0083은 유의성을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 황색포도상구균의  $\alpha$ -독소의 에피토프 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0016] 다음 설명에서, 청구된 대상의 이해를 용이하게 하기 위해 다수의 용어가 사용되며 후술하는 정의가 제공된다. 본 명세서에서 명시적으로 정의되지 않은 용어는 평범하고 일반적인 의미에 따라 사용된다.
- [0017] 달리 명시되지 않는 한, 단수(a 또는 an)는 “하나 이상”을 의미한다.
- [0018] 본 명세서에 사용된 용어 “에피토프”는 항체가 결합하는 항원 상의 부위를 의미한다.
- [0019] 본 명세서에 사용된 용어 “항체”는 특정 항원 (예를 들어,  $\alpha$ -독소)에 특이적으로 결합하거나 그와 상호 작용하는 하나 이상의 상보성 결정 부위 (complementarity determining region, CDR)를 포함하는 임의의 항원 결합 분자 또는 분자 복합체를 의미한다. 용어 “항체”는 이황화 결합에 의해 상호 연결된 4개의 폴리펩타이드 사슬, 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄 뿐만 아니라 이의 다량체 (예를 들어, IgM)를 포함하는 면역 글로불린 분자를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 부위 (본 명세서에서 HCVR 또는  $V_H$ 로 약칭됨) 및 중쇄 불변 부위를 포함한다. 중쇄 불변 부위는  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ 의 3개의 도메인을 포함한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 부위 (본 명세서에서 LCVR 또는  $V_L$ 로 약칭됨) 및 경쇄 불변 부위를 포함한다. 경쇄 불변 부위는 하나의 도메인 ( $C_{L1}$ )을 포함한다.  $V_H$  및  $V_L$  부위는 프레임워크(framework) 부위 (FR)이라고하는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 부위 (CDR)라고하는 추가 가변 부위로 더 세분화될 수 있다. 각  $V_H$  및  $V_L$ 은 아미노 말단에서 카르복시 말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다. 본 개시의 상이한 양태에서, 항- $\alpha$ -독소 항체 (또는 이의 항원 결합 부분)의 FR은 인간 생식 계열 서열과 동일할 수 있거나, 자연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 공통(consensus) 서열은 둘 이상의 CDR의 병렬(side-by-

side) 분석을 기반으로 정의될 수 있다.

- [0020] 본 명세서에 사용되는 용어 “단일 클론 항체”는 하이브리도마(hybridoma) 기술을 통해 생성된 항체로 제한되지 않는다. 단일 클론 항체는 이용 가능하거나 당 업계에 공지된 임의의 수단에 의해 임의의 진핵 생물, 원핵 생물, 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유래된다.
- [0021] 본 명세서에 사용된 용어 “키메라(chimeric)” 항체는 비-인간 면역 글로불린으로부터 유래된 가변 서열 및 일반적으로 인간 면역 글로불린 주형으로부터 선택되는, 인간 면역 글로불린 불변 부위를 갖는 항체를 의미한다.
- [0022] 비-인간 항체의 “인간화” 형태는 비-인간 면역 글로불린에서 유래된 최소 서열을 포함하는 키메라 면역 글로불린이다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 부위는 비-인간 면역 글로불린의 CDR 부위에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 부위는 인간 면역 글로불린 서열의 FR 부위이다.
- [0023] 본 명세서에 사용된 용어 “상보성 결정 부위” (CDR)는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 모두의 가변 부위 내에서 발견되는 비-인접(non-contiguous) 항원 결합 부위를 의미한다. CDR은 Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); 및 MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)에 의해 설명되었으며, 여기서 정의는 서로 비교할 때 아미노산 잔기의 중첩(overlapping) 또는 서브세트(subset)을 포함한다.
- [0024] 본 명세서에 사용된 용어 항체의 “항원 결합 부분”, 항체의 “항원 결합 단편” 등은 자연 발생적인, 효소적으로 수득 가능한, 합성, 또는 유전적으로 조작된 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 폴리펩티드 또는 당단백질(glycoprotein)을 포함한다.
- [0025] 본 명세서에 사용된 용어 “치료”, “치료하는” 등은 포유 동물, 특히 인간에서 질병의 임의의 치료를 포함하며, 다음을 포함한다: (a) 질병에 걸리기 쉬우나 아직 진단되지 않은 대상체에서 질병이 발생하는 것을 방지; (b) 질병 억제, 즉 발병 억제; 및 (c) 질병 완화, 즉 질병의 퇴행 유발.
- [0026] 본 명세서에서 호환적으로 사용된 용어 “개인”, “대상체”, “숙주” 및 “환자”는 무린 (쥐, 생쥐), 비-인간 영장류, 인간, 개, 고양이, 유제류 (예: 말, 소, 양, 돼지, 염소) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 포유 동물을 의미한다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된 용어 “치료적 유효량” 또는 “유효량”은 질병을 치료하기 위해 포유 동물 또는 다른 대상체에게 투여할 때, 질병에 대한 이러한 치료에 효과가 충분한 항체의 양을 의미한다.
- [0028] 본 명세서에서 사용된 용어 “샘플”은 개인, 대상체 또는 환자로부터 얻은 다양한 샘플 유형을 포함하며 진단 또는 모니터링 분석에 사용될 수 있다. 정의는 생물학적 기원의 혈액 및 기타 액체 샘플, 생검 표본 또는 조직 배양과 같은 고체 조직 샘플 또는 이들로부터 유래된 세포 및 이들의 자손(progeny)을 포함한다.
- [0029] 본 개시는  $\alpha$ -독소를 특이적으로 중화시켜 황색포도상구균 감염과 관련하여 수동 면역 요법을 제공하는 단일 클론 항체를 개발한다. 수동 예방 접종은 예방 접종을 받지 않은 환자에게 즉각적인 치료를 제공하여 급성 황색포도상구균 질병의 중증도를 줄이는 데 도움이 된다. 기능적으로, 본 개시의 항체는 AT-유도 세포 독성에 대해 상당한 억제 활성을 나타내고 황색포도상구균 및/또는 폐렴의 감염을 예방, 예방적 치료 및/또는 치료하는 데 있어서 강력한 생체 내 효능을 나타냈다.
- [0030] 특히, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위 (CDR) 및 경쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위를 포함하고, 상기 중쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위는 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 부위를 포함하고, 상기 경쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위는 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 부위를 포함하며:
- [0031] 상기 CDRH1 부위는 서열 번호 1 내지 2로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRH2 부위는 서열 번호 3 내지 6 및 31로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRH3 부위는 서열 번호 7 내지 9로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하며;
- [0032] 상기 CDRL1 부위는 서열 번호 10 내지 13으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; 상기 CDRL2 부위는 서열 번호 14 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하며; 상기 CDRL3 부위는 서열 번호 16 내지 18로 이루어진 군으로부터 선택된 아미

노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함한다.

[0033] 서열 목록은 표 1에 나타나 있다.

표 1

[0034]

서열 번호	이름	서열
1	25A1 CDRH1	GYSFTDYNMN
2	25G1 CDRH1	GYSFTGYFMN
3	25A1 CDRH2	SINPYYGITSYNQTFKG
4	25E12 CDRH2	SINPHYGITSYNQTFKG
5	25H3 CDRH2	SINPYYGITTYNQTFKG
6	25G1 CDRH2	RINPYNGDTLYKQNFKD
7	25A1 CDRH3	IYYGDSLGLDY
8	25G1 CDRH3	DGDGYYYAMDY
9	5H9 CDRH3	VYYGDSLGLDY
10	25A1 CDRL1	SASSSVSYMH
11	25A10 CDRL1	SASSSISYMH
12	25B7 CDRL1	SASSSKSYIH
13	5H9 CDRL1	SASSSVSYMY
14	25A1 CDRL2	DTSKLAS
15	5H9 CDRL2	DTSNLAS
16	25A1 CDRL3	QQWSSNPLT
17	25A10 CDRL3	QQWSSNPPT
18	25G1 CDRL3	HQRSSYPWT
19	25A1 중쇄 가변 부위	QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNVKQSHGKSLEWIGSINPYYGITSYNQTFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARIYYGDSLGLDYWGQGTITVTVSS
20	25A1 경쇄 가변 부위	DIELTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLEIKR
21	HU25A1/VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNMNVVQAPGQGLEWMGSIINPYYGITSYNQTFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARIYYGDSLGLDYWGQGTITVTVSS
22	HU25A1/VHB2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNMNVVQAPGQGLEWMGSIINPYYGITSYNQTFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARIYYGDSLGLDYWGQGTITVTVSS
23	HU25A1/VHB5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNMNVVQAPGQGLEWMGSIINPYYGITSYNQTFKGRVTLTVDTISISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARIYYGDSLGLDYWGQGTITVTVSS
24	HU25A1/VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKEIKR
25	HU25A1/VLB4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKEIKR
26	HU25A1/VLB6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKEIKR
27	25A1-B2B4AQT/VH(humanized antibody)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNMNVVQAPGQGLEWMGSIINPYYGITSYAQTFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARIYYGDSLGLDYWGQGTITVTVSS
28	25A1-B2B4AQT/VL(인간화 항체)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKEIK
29	25A1-B5B6AQT/VH(인간화 항체)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNMNVVQAPGQGLEWMGSIINPYYGITSYAQTFKGRVTLTVDTISISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARIYYGDSLGLDYWGQGTITVTVSS
30	25A1-B5B6AQT/VL(인간화 항체)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKEIK
31	25E4 CDRH2	SINPYYGITSYNQTFRG

[0035] 본 개시에 따른 항체는 전장(full-length)일 수 있거나 (예를 들어, IgG1 또는 IgG4 항체) 항원 결합 부분 (예를 들어, Fab, F(ab')<sub>2</sub> 또는 scFv 단편)만을 포함할 수 있으며, 필요에 따라 기능에 영향을 미치지도록 변형될 수 있다. 본 개시에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 황색포도상구균의 α-독소에 특이적으로 결합한다. 세포 세포공(cytolytic pore) 형성 독소로서, α-독소는 황색포도상구균 임상 분리물 사이에서 보존된다. 알파-독소는 33 kDa 가용성 단량체 단백질로, 진핵 세포 표면의 고리 구조로 조립된 다음 조립된 독소가 세포막에 삽입되어, 세포막의 무결성을 파괴하여 세포 손상 및 사망에 기여하는 세포공을 형성한다.

[0036] 본 개시는 고 친화도로 α-독소 분자의 모노머 또는 고리 구조에 결합하는 항-α-독소 항체 및 이의 항원 결합

단편을 포함한다.

[0037] 당업자에게 알려진 다양한 기술을 사용하여 항체가 폴리펩티드 또는 단백질 내에서 “하나 이상의 아미노산에 특이적으로 결합” 하는지 여부를 결정할 수 있다. 예시적인 기술은 예를 들어 Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., N.Y.)에 설명된 것과 같은 일반적인 교차 차단 분석(cross-blocking assay), 알라닌 스캐닝 돌연변이 분석, 펩티드 블롯(blot) 분석 (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463), 및 펩티드 절단 분석을 포함한다. 또한, 에피토프 절제, 에피토프 추출 및 항원의 화학적 변형과 같은 방법을 사용할 수 있다(Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). 항체가 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 내 아미노산을 확인하는 데 사용할 수 있는 또 다른 방법은 질량 분석법에 의해 검출되는 수소/중수소 (deuterium) 교환이다. 일반적으로, 수소/중수소 교환 방법은 관심있는 단백질을 중수소 표지한 다음, 항체를 중수소 표지된 단백질에 결합시키는 것을 포함한다. 다음으로, 단백질/항체 복합체는 물로 이동시켜 항체에 의해 보호되는(중수소 라벨이 남아있는) 잔기를 제외한 모든 잔기에서 수소-중수소 교환이 일어나도록 한다. 항체의 해리(dissociation) 후, 표적 단백질은 프로테아제 절단 및 질량 분석법 분석을 거쳐, 항체가 상호 작용하는 특정 아미노산에 해당하는 중수소 표지된 잔기를 드러낸다. 예를 들어 Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A 참조.

[0038] 본 개시는 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항- $\alpha$ -독소 항체를 추가로 포함한다.

[0039] 항체가 당 업계에 공지된 통상적인 방법을 사용하여 참조(reference) 항- $\alpha$ -독소 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는지, 또는 그와 결합을 위해 경쟁하는지 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 시험 항체가 본 개시의 참조 항- $\alpha$ -독소 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 결정하기 위해, 참조 항체가  $\alpha$ -독소 단백질 (예를 들어,  $\alpha$ -독소의 단량체 또는 고리 구조)에 결합하도록 한다. 다음으로, 시험 항체가  $\alpha$ -독소 분자에 결합하는 능력을 평가한다. 시험 항체가 참조 항- $\alpha$ -독소 항체와의 포화 결합 후  $\alpha$ -독소에 결합할 수 있다면, 시험 항체는 참조 항- $\alpha$ -독소 항체와 다른 에피토프에 결합한다고 결론을 내릴 수 있다. 반면에, 시험 항체가 참조 항- $\alpha$ -독소 항체와의 포화 결합 후  $\alpha$ -독소 분자에 결합할 수 없다면, 시험 항체는 본 개시의 참조 항- $\alpha$ -독소 항체가 결합한 에피토프와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 추가 일반적인 실험 (예: 펩티드 돌연변이 및 결합 분석)은 시험 항체의 관찰된 결합 부족이 실제로 참조 항체와 동일한 에피토프에 대한 결합 때문인지, 또는 입체 차단 (또는 다른 현상)이 관찰된 결합 부족의 원인인지를 확인하기 위해 수행될 수 있다. 이러한 종류의 실험은 ELISA, RIA, Biacore, 유동 세포 분석법(flow cytometry) 또는 당 업계에서 이용 가능한 다른 정량적 또는 정성적 항체 결합 분석을 사용하여 수행할 수 있다. 본 개시의 특정 양태에 따르면, 경쟁 결합 분석에서 측정했을 때 예를 들어, 한 항체의 1배, 5배, 10배, 20배 또는 100배 과잉이 다른 항체의 결합을 적어도 50%, 바람직하게는 75%, 90% 또는 심지어 99%까지 억제하는 경우, 2개의 항체는 동일한 (또는 중첩되는) 에피토프에 결합한다. 대안적으로, 한 항체의 결합을 감소 또는 제거하는 항원의 모든 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소 또는 제거하는 경우, 두 항체는 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 간주된다. 한 항체의 결합을 감소 또는 제거하는 아미노산 돌연변이의 서브세트 만이 다른 항체의 결합을 감소 또는 제거하는 경우 두 항체는 “중첩되는(overlapping) 에피토프” 를 갖는 것으로 간주된다.

[0040] 본 명세서에 사용된 용어 “항체” 는 또한 전체 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다. 항체의 항원 결합 단편은, 예를 들어 항체 가변 및 임의로 불변 도메인을 코딩하는 DNA의 조작 및 발현을 포함하는 단백질 가수 분해 소화(proteolytic digestion) 또는 재조합 유전 공학 기술과 같은 임의의 적합한 표준 기술을 사용하여 전체 항체 분자로부터 유도될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되어 있고/있거나, 예를 들어 상업적 공급원, DNA 라이브러리 (예를 들어, 파지-항체 라이브러리 포함)로부터 쉽게 입수할 수 있거나 합성될 수 있다. DNA는, 예를 들어 하나 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적절한 구성으로 배열, 코돈을 도입, 시스테인 잔기를 생성, 아미노산을 변형, 추가 또는 삭제 등을 하기 위해, 화학적으로 또는 분자 생물학 기술을 사용하여 서열화되고 조작될 수 있다.

[0041] 항원 결합 단편의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단일 사슬 Fv (scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 추가 가변 부위를 모방하는 아미노산 잔기로 구성된 최소 인식 단위 (e.g., CDR3 펩티드와 같은 분리된 상보성 결정 부위 (CDR)), 또는 제한된 FR3-CDR3-FR4 펩티드. 도메인 특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인 삭제된 항체, 키메라 항체, CDR 이식 (grafted) 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디(triobody), 테트라바디(tetrabody), 미니바디(minibody), 나노바디(nanobody) (예: 1가 나노 바디, 2가 나노 바디 등), 소형 모듈형 면역의약품 (SMIP, small module immunopharmaceutical), 및 상어 가변 IgNAR 도메인과 같은, 다른 조작된(engineered) 분자는 또한 본 명세서

에서 사용되는 “항원 결합 단편”이라는 표현 내에 포함된다.

- [0042] 항체의 항원 결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함한다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성일 수 있으며 일반적으로 하나 이상의 프레임워크 서열을 갖는 프레임에 인접하거나 프레임 내에 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다.  $V_L$  도메인과 관련된  $V_H$  도메인을 갖는 항원 결합 단편에서,  $V_H$  및  $V_L$  도메인은 임의의 적합한 배열로 서로에 대해 위치할 수 있다. 예를 들어, 가변 부위는 2량체(dimeric)일 수 있고  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$  또는  $V_L$ - $V_L$  이량체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원 결합 단편은 단량체  $V_H$  또는  $V_L$  도메인을 포함할 수 있다.
- [0043] 특정 양태에서, 항체의 항원 결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유적으로 연결된 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 수 있다. 본 개시의 항체의 항원 결합 단편 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적인 예시적 구성은 다음을 포함한다: (i)  $V_H$ - $C_{H1}$ ; (ii)  $V_H$ - $C_{H2}$ ; (iii)  $V_H$ - $C_{H3}$ ; (iv)  $V_H$ - $C_{H1}$ - $C_{H2}$ ; (v)  $V_H$ - $C_{H1}$ - $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ; (vi)  $V_H$ - $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ; (vii)  $V_H$ - $C_L$ ; (viii)  $V_L$ - $C_{H1}$ ; (ix)  $V_L$ - $C_{H2}$ ; (x)  $V_L$ - $C_{H3}$ ; (xi)  $V_L$ - $C_{H1}$ - $C_{H2}$ ; (xii)  $V_L$ - $C_{H1}$ - $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ; (xiii)  $V_L$ - $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ; 및 (xiv)  $V_L$ - $C_L$ . 상기 열거된 예시적인 구성을 포함하는 가변 및 불변 도메인의 임의의 구성에서, 가변 및 불변 도메인은 서로 직접 연결되거나 전체 또는 부분 경첩(hinge) 또는 링커 부위에 의해 연결될 수 있다. 경첩 부위는 적어도 2개 (예: 5, 10, 15, 20, 40, 60개 또는 그 이상)의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 이는 단일 폴리펩타이드 분자에서 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 사이에 연성 또는 반-연성 연결을 생성한다. 더욱이, 본 개시 내용의 항체의 항원 결합 단편은 서로 및/또는 하나 이상의 단량체  $V_H$  또는  $V_L$  도메인 (예를 들어, 이황화 결합(들)에 의해)과 비공유 결합된 상기 나열된 임의의 가변 및 불변 도메인 구성의 동종 이량체 또는 이종 이량체 (또는 다른 다량체)를 포함할 수 있다.
- [0044] 전체 항체 분자와 마찬가지로 항원 결합 단편은 단일 특이적이거나 다중 특이적일 수 있다 (예를 들어, 이중 특이적). 항체의 다중 특이적 항원 결합 단편은 전형적으로 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별개의 항원 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 본 명세서에 개시된 예시적인 이중 특이적 항체 형식을 포함하는, 임의의 다중 특이적 항체 형식은 당 업계에서 이용 가능한 통상적인 기술을 사용하여 본 개시의 항체의 항원 결합 단편의 맥락에서 사용하기 위해 개조될 수 있다.
- [0045] 바람직하게는, 본 개시에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 포유 동물 항체이다.
- [0046] 본 명세서에 사용된 용어 “포유 동물 항체”는 포유 동물 생식 계열 면역 글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 부위를 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 개시의 포유 동물 항체는 예를 들어 CDR 및 특히 CDR3에서 포유 동물 생식 계열 면역 글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다.
- [0047] 본 명세서에 사용된 용어 “재조합 포유 동물 항체”는 숙주 세포로 형질 감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체와 같은 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 모든 포유 동물 항체 (아래에 추가로 설명됨), 재조합, 조합 포유 동물 항체 라이브러리(library)에서 분리된 항체 (아래에 추가로 설명됨), 포유 동물 면역 글로불린 유전자에 대해 형질 전환된(transgenic) 동물(예컨대, 쥐)로부터 분리된 항체 또는 포유 동물 면역 글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱 하는 것을 포함하는 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 항체를 포함하도록 의도된다. 이러한 재조합 포유 동물 항체는 동물 생식 세포 면역 글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 부위를 갖는다. 그러나, 특정 양태에서, 이러한 재조합 포유 동물 항체는 시험관 내 돌연변이 유발 (또는, 인간 Ig 서열에 대한 동물 형질 전환이 사용되는 경우, 생체 내 체세포 돌연변이 유발)을 겪고, 따라서 재조합 항체의  $V_H$  및  $V_L$  부위의 아미노산 서열은 인간 생식 계열  $V_H$  및  $V_L$  서열로부터 유래되고 이와 관련되지만, 생체 내 포유 동물 항체 생식 계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.
- [0048] 인간 항체와 같은 포유류 항체는 경첩 이질성과 관련된 두 가지 형태로 존재할 수 있다. 한 형태에서, 면역 글로불린 분자는 약 150-160 kDa의 안정한 4쇄 구조를 포함하며, 여기서 이량체는 사슬 간 중쇄 이황화 결합에 의해 함께 유지된다. 두 번째 형태에서, 이량체는 사슬 간 이황화 결합을 통해 연결되지 않고 약 75-80 kDa의 분자가 공유 결합된 경쇄 및 중쇄 (반 항체)로 구성된다. 이러한 형태들은 심지어 친화성 정제 후에도 분리하기가 매우 어려웠다.

[0049] 본 명세서에 개시된 항- $\alpha$ -독소 항체는 항체가 유래된 상응하는 생식 계열 서열과 비교하여 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 부위에서 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 본 명세서에 개시된 아미노산 서열을, 예를 들어 공개 항체 서열 데이터베이스로부터 입수 가능한 생식 계열 서열과 비교함으로써 쉽게 확인할 수 있다. 본 개시는 본 명세서에 개시된 임의의 아미노산 서열로부터 유래된 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 하나 이상의 프레임 워크 및/또는 CDR 부위 내의 하나 이상의 아미노산은 영역은 항체가 유래된 생식 계열 서열의 상응하는 잔기(들), 또는 다른 포유 동물 생식 계열 서열의 상응하는 잔기(들), 또는 상응하는 생식 계열 잔기(들)의 보존적 아미노산 치환으로 돌연변이 된다 (이러한 서열 변화는 본 명세서에서 집합적으로 “생식 계열 돌연변이”로 지칭됨). 당업자는, 본 명세서에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 부위 서열로 시작하여, 하나 이상의 개별 생식 계열 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는 수많은 항체 및 항원 결합 단편을 쉽게 생산할 수 있다. 특정 양태에서,  $V_H$  및/또는  $V_L$  도메인 내의 모든 프레임워크 및/또는 CDR 잔기는 항체가 유래된 원래 생식 계열 서열에서 발견된 잔기로 다시 돌연변이 된다. 다른 양태에서, 특정 잔기만이 원래 생식 계열 서열로 다시 돌연변이 된다 (예를 들어, FR1의 처음 8개 아미노산 내에서 또는 FR4의 마지막 8개 아미노산 내에서 발견되는 돌연변이 된 잔기만, 또는 CDR1, CDR2 또는 CDR3 내에서 발견되는 돌연변이 된 잔기만). 다른 양태에서, 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 잔기(들)는 상이한 생식 계열 서열 (즉, 항체가 원래 유래된 생식 계열 서열과 상이한 생식 계열 서열)의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이 된다. 또한, 본 개시의 항체는 프레임워크 및/또는 CDR 부위 내에 2개 이상의 생식 계열 돌연변이의 임의의 조합을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 특정 개별 잔기는 특정 생식 계열 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이 되는 반면, 원래 생식 계열 서열과 상이한 특정 다른 잔기는 유지되거나 상이한 생식 계열 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이 된다. 일단 획득되면, 하나 이상의 생식 계열 돌연변이를 포함하는 항체 및 항원 결합 단편은 개선된 결합 특이성, 증가된 결합 친화성, 개선되거나 강화된 길항적 또는 효능적 생물학적 특성 (경우에 따라), 감소된 면역원성(immunogenicity) 등과 같은 하나 이상의 원하는 특성에 대해 쉽게 테스트될 수 있다. 이러한 일반적인 방식으로 수득된 항체 및 항원 결합 단편은 본 개시에 포함된다.

[0050] 본 개시는 또한 하나 이상의 보존적 치환을 갖는 본 명세서에 개시된 임의의  $V_H$ ,  $V_L$  및/또는 CDR 아미노산 서열의 변이를 포함하는 항- $\alpha$ -독소 항체를 포함한다. 예를 들어, 본 개시는 본 명세서에 개시된 임의의  $V_H$ ,  $V_L$  및/또는 CDR 아미노산 서열에 비해 예를 들어 10개 이하, 8개 이하, 6개 이하, 4개 이하 등의 보존적 아미노산 치환을 갖는  $V_H$ ,  $V_L$  및/또는 CDR 아미노산 서열을 갖는 항- $\alpha$ -독소 항체를 포함한다.

[0051] 핵산 또는 이의 단편을 언급할 때 용어 “실질적 동일성” 또는 “실질적으로 동일한”은, 다른 핵산 (또는 이의 상보적 가닥)과의 적절한 뉴클레오티드 삽입 또는 결실과 최적으로 정렬될 때, 아래 설명하는 바와 같이, FASTA, BLAST 또는 Gap과 같은 임의의 잘 알려진 서열 동일성의 알고리즘으로 측정 시, 뉴클레오티드 염기의 약 95% 이상, 보다 바람직하게는 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 뉴클레오티드 서열 동일성이 있음을 나타낸다. 참조 핵산 분자와 실질적 동일성을 갖는 핵산 분자는, 특정 예에서, 참조 핵산 분자에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 동일하거나 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다.

[0052] 폴리펩티드에 적용되는 용어 “실질적인 유사성” 또는 “실질적으로 유사한”은 2개의 펩티드 서열이, 최적으로 정렬될 때, 기본 갭 가중치를 사용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 적어도 95% 서열 동일성, 훨씬 더 바람직하게는 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 공유함을 의미한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 다르다. “보존적 아미노산 치환”은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성 (예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 (R 그룹)를 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환된 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않는다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 상이한 경우, 서열 동일성 백분율 또는 유사성의 정도를 상향 조정하여 치환의 보존적 특성을 정정할 수 있다. 이러한 조정을 위한 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예는 (1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; (2) 지방족-히드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; (3) 아미드 함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; (4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; (5) 염기성 측쇄: 리신, 아르기닌 및 히스티딘; (6) 산성 측쇄: 아스파테이트(aspartate) 및 글루타메이트(glutamate), (7) 황 함유 측쇄는 시스테인과 메티오닌이다. 바람직한 보존적 아미노산 치환기는: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파테이트 및 아스파라긴-글루타민이다. 대안으로, 보존적인 대체는 본 명세서에 참조로 포함되는, Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445에 개시된 PAM250 로그 유사도 행렬(log-likelihood matrix)에서 양의 값을 갖는 모든 변경이다. “적당히 보존적인” 대체는 PAM250 로그 유사도 행렬에서 음이 아닌 값을 갖는 모든 변경이다.

- [0053] 서열 동일성이라고도 하는 폴리펩티드에 대한 서열 유사성은, 일반적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하여, 다양한 치환, 결실 및 기타 변형에 배정된 유사성 측정을 사용하여 유사한 서열을 일치시킨다. 예를 들어, GCG 소프트웨어는, 기본 매개 변수와 함께 상이한 종의 유기체 또는 야생형 단백질과 이의 돌연변이 사이의 상동성 폴리펩티드와 같은, 밀접하게 관련된 폴리펩티드 간의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정하는 데 사용될 수 있는 Gap 및 Bestfit과 같은 프로그램을 포함한다. 폴리펩티드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 기본 또는 권장 매개 변수를 사용하여 FASTA를 사용하여 비교할 수도 있다. FASTA (예를 들어, FASTA2 및 FASTA3)는 질의(query)와 검색(search) 서열 사이에서 가장 잘 중첩되는 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다 (Pearson (2000) supra). 본 개시의 서열을 상이한 유기체로부터의 다수의 서열을 포함하는 데이터베이스와 비교할 때 또 다른 바람직한 알고리즘은 기본 파라미터를 사용하는 컴퓨터 프로그램 BLAST, 특히 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는 Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 및 Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402 참조.
- [0054] 본 개시의 한 바람직한 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위 및 경쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위를 포함하고, 상기 중쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위는 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 부위를 포함하고, 상기 경쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위는 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 부위를 포함하며,
- [0055] 상기 CDRH1 부위는 서열 번호 1 내지 2로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고;
- [0056] 상기 CDRH2 부위는 서열 번호 3 내지 6 및 31로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고;
- [0057] 상기 CDRH3 부위는 서열 번호 7 내지 9로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고;
- [0058] 상기 CDRL1 부위는 서열 번호 10 내지 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고;
- [0059] 상기 CDRL2 부위는 서열 번호 14 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열을 포함하며;
- [0060] 상기 CDRL3 부위는 서열 번호 16 내지 18로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열을 포함한다.
- [0061] 본 개시의 한 바람직한 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 2에 나타난 바와 같은 중쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위 및 경쇄 가변 부위의 상보성 결정 부위를 포함한다.

표 2

클론	CDRH1 (서열 번호)	CDRH2 (서열 번호)	CDRH3 (서열 번호)
25A1	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)
25A10	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)
25E4	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFRG (31)	IYYGDSLGLDY (7)
25E12	GYSFTDYNMN (1)	SINPHYGITSYNQTFKG (4)	IYYGDSLGLDY (7)
25H3	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITTYNQTFKG (5)	IYYGDSLGLDY (7)
25B7	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)
25G1	GYSFTGYFMN (2)	RINPYNGDTLYKQNFKD (6)	DGDGYYYAMDY (8)
25G4	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)
5H9	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	VYYGDSLGLDY (9)
N2F6	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)
클론	CDRL1 (서열 번호)	CDRL2 (서열 번호)	CDRL3 (서열 번호)
25A1	SASSSVSYMH (10)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPLT (16)
25A10	SASSSISYMH (11)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPPT (17)
25E4	SASSSVSYMH (10)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPPT (17)
25E12	SASSSVSYMH (10)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPPT (17)
25H3	SASSSVSYMH (10)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPLT (16)
25B7	SASSSKSYIH (12)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPLT (16)

25G1	SASSSISYMH (11)	DTSKLA (14)	HQRSSYPWT (18)
25G4	SASSSVSYMH (10)	DTSKLA (14)	QQWSSNPPT (17)
5H9	SASSSVSYMY (13)	DTSNLA (15)	QQWSSNPLT (16)
N2F6	SASSSVSYMY (13)	DTSNLA (15)	QQWSSNPLT (16)

- [0063] 본 개시의 한 바람직한 양태에서, 항체 25A1 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 1의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 CDRH1 부위를 포함하고; CDRH2 부위는 서열 번호 3의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; CDRH3 부위는 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; CDRL1 부위는 서열 번호 10의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; CDRL2 부위는 서열 번호 14의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하고; CDRL3 부위는 서열 번호 16의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항체 25A1은 서열 번호 19의 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위를 포함한다. 바람직하게는, 항체 25A1은 서열 번호 20의 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함한다.
- [0064] 또 다른 측면에서, 본 개시에 따른 항체는 바람직하게는 인간화 항체이다. “인간화 항체”는 한 종의 항체; 예를 들어, 설치류 항체로부터의 CDR이 설치류 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 사슬로부터 인간 프레임워크 부위 (FR) 서열을 포함하는 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인으로 전달되는 재조합 단백질이다. 항체 분자의 불변 도메인은 인간 항체의 불변 도메인에서 유래된다.
- [0065] 본 개시에 따른 인간화 항체의 결합 친화도를 개선하기 위해, 인간 프레임워크 부위의 일부 아미노산 잔기는 CDR의 중 (예컨대, 설치류)에서 상응하는 아미노산 잔기로 대체된다.
- [0066] 바람직하게는, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 21 내지 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위를 포함한다. 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 24 내지 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이의 실질적 유사 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함한다.
- [0067] 본 개시의 한 바람직한 양태에서, 인간화 항체 25A1-B2B4AQT 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 27의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위; 및 서열 번호 28의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함한다.
- [0068] 본 개시의 한 바람직한 양태에서, 인간화 항체 25A1-B5B6AQT 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 29의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위; 및 서열 번호 30의 아미노산 서열 또는 이의 실질적 유사 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함한다.
- [0069] 바람직하게는, 본 개시에 따른 항체는 단일 클론 항체이다.
- [0070] 본 개시의 항체는 단일 특이적, 이중 특이적 또는 다중 특이적일 수 있다. 다중 특이적 항체는 하나의 표적 폴리 펩티드의 상이한 에피토프에 특이적일 수 있거나 하나 이상의 표적 폴리 펩티드에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 본 개시의 항- $\alpha$ -독소 항체는 다른 기능성 분자, 예를 들어 다른 펩티드 또는 단백질에 연결되거나 공동 발현될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 단편은 (예를 들어, 화학적 결합, 유전적 융합, 비공유 결합 등에 의해) 다른 항체 또는 항체 단편과 같은 하나 이상의 다른 분자 개체(entity)에 기능적으로 연결되어 제2 결합 특이성을 갖는 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 본 개시는 면역 글로불린의 한 팔(arm)이  $\alpha$ -독소 또는 이의 단편에 특이적이고 면역 글로불린의 다른 팔이 제2 치료 표적에 특이적이거나 치료 모이어티에 접합된 이중 특이적 항체를 포함한다.
- [0071] 본 개시의 한 바람직한 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 치료제와 접합된다.
- [0072] 치료제의 예는 항생제이다. 항생제의 예는 닥티노마이신, 블레오마이신, 미트라마이신, 안트라마이신, 스트렙토조토신, 그라미시딘 D 또는 미토마이신을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0073] 본 개시의 한 바람직한 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 원핵 및 진핵 발현 시스템을 포함하는 임의

의 수의 발현 시스템을 사용하여 생산될 수 있다. 일부 양태에서, 발현 시스템은 하이브리도마와 같은 포유 동물 세포 발현, 또는 CHO 세포 발현 시스템이다. 이러한 많은 시스템은 상용 공급 업체에서 널리 구할 수 있다. 항체가  $V_H$  및  $V_L$  부위를 모두 포함하는 양태에서,  $V_H$  및  $V_L$  부위는 단일 벡터를 사용하여, 예를 들어 디시스트론(di-cistronic) 발현 유닛에서, 또는 상이한 프로모터의 제어 하에 발현될 수 있다. 다른 양태에서,  $V_H$  및  $V_L$  부위는 별도의 벡터를 사용하여 발현될 수 있다. 본 명세서에 기술된  $V_H$  및  $V_L$  부위는 임의로 N-말단에 메티오닌을 포함할 수 있다.

[0074] 관심 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자는 세포로부터 클로닝될 수 있으며, 예를 들어 단일 클론 항체를 코딩하는 유전자는 하이브리도마에서 클로닝되어 재조합 단일 클론 항체를 생산하는 데 사용될 수 있다. 단일 클론 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자 라이브러리는 하이브리도마 또는 형질 세포로도 만들 수 있다. 중쇄 및 경쇄 유전자 산물의 무작위 조합은 다양한 항원 특이성을 갖는 대규모 항체 풀을 생성한다 (예: Kuby, Immunology (3.sup.rd ed. 1997) 참조).

[0075] 단일 사슬 항체 또는 재조합 항체의 생산을 위한 기술(미국 특허 번호 4,946,778, 미국 특허 번호 No. 4,816,567)은 본 개시의 폴리펩티드에 대한 항체를 생산하도록 조정될 수 있다. 또한, 형질 전환 쥐, 또는 다른 포유 동물과 같은 다른 유기체를 사용하여 인간화 또는 인간 항체를 발현할 수 있다 (예를 들어 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); 및 Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)).

[0076] 본 개시의 한 바람직한 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 세포 표면에서 발현된다. 더 바람직하게는 세포는 T 세포이다.

[0077] 본 개시는 본 개시의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 개시의 약제학적 조성물은 개선된 이동, 전달, 내성 등을 제공하는 적합한 희석제, 담체, 부형제 및 기타 제제와 함께 제형화 된다. 조성물은 수의학적 용도 또는 인간에서의 약제학적 용도와 같은 특정 용도를 위해 제형화 될 수 있다. 사용되는 조성물 및 부형제, 희석제 및/또는 담체의 형태는 항체의 의도된 용도 및, 치료 용도의 경우, 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 모든 제약 화학자에게 알려진 처방집에서 많은 적절한 제형을 찾을 수 있다: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa. 이러한 제형은 예를 들어 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질 (양이온 또는 음이온) 함유 소포(vesicle) (예: LIPOFECTIN.TM., Life Technologies, Carlsbad, Calif.), DNA 접합체, 무수물 흡수 페이스트, 수중 유적형 및 유중 수적형 에멀전, 에멀전 카보왁스 (다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고체 겔, 및 카보왁스를 함유하는 반고체 혼합물을 포함한다. 또한 Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311 참조.

[0078] 환자에게 투여되는 항체의 용량은 환자의 연령과 크기, 표적 질환, 상태, 투여 경로 등에 따라 달라질 수 있다. 바람직한 용량은 일반적으로 체중 또는 체표면적에 따라 계산된다. 본 발명의 항체를 성인 환자에서 황색포도상구균 감염과 관련된 상태 또는 질환을 치료하기 위해 사용하는 경우, 본 발명의 항체를 정맥 내 투여하는 것이 유리할 수 있다. 상태의 중증도에 따라, 치료 빈도와 기간을 조정할 수 있다. 항체 투여를 위한 효과적인 투여량 및 일정은 경험적으로 결정될 수 있다; 예를 들어, 환자의 진전은 주기적인 평가를 통해 모니터링할 수 있으며, 이에 따라 용량을 조정할 수 있다. 더욱이, 용량의 이종간 스케일링(interspecies scaling)은 당 업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

[0079] 다양한 전달 시스템이 공지되어 있으며 본 개시의 약제학적 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있다, 예를 들어, 리포솜 내 캡슐화, 마이크로 입자, 마이크로 캡슐, 돌연변이 바이러스를 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개 세포 내 섭취 (예를 들어, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 참조). 도입 방법은 피내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내, 피하, 비강 내, 경막 외 및 경구 경로를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 조성물은 임의의 편리한 경로, 예를 들어 주입 또는 볼루스(bolus) 주사, 상피 또는 점막 내벽 (예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국부적일 수 있다.

[0080] 본 개시의 약제학적 조성물은 표준 바늘 및 주사기를 사용하여 피하 또는 정맥 내로 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달과 관련하여, 펜(pen) 전달 장치는 본 개시의 약제학적 조성물 전달에 용이하게 적용된다. 이러한 펜 전

달 장치는 재사용 가능하거나 일회용일 수 있다. 재사용 가능한 펜 전달 장치는 일반적으로 약제학적 조성물을 포함하는 교체 가능한 카트리지를 사용한다. 카트리지 내의 모든 약제학적 조성물이 투여되고 카트리지가 비면, 빈 카트리지는 쉽게 폐기되고 약제학적 조성물을 포함하는 새 카트리지로 교체할 수 있다. 그런 다음 펜 전달 장치를 다시 사용할 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에는 교체 가능한 카트리지가 없다. 오히려, 일회용 펜 전달 장치는 장치 내의 저장소에 보유되는 약제학적 조성물로 미리 채워진다. 저장소에 약제학적 조성물이 비면, 전체 장치가 폐기된다.

[0081] 특정 상황에서, 약제학적 조성물은 제어 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 양태에서, 펌프가 사용될 수 있다 (Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 참조). 다른 양태에서, 중합체 물질이 사용될 수 있다; Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Fla 참조. 또 다른 양태에서, 제어 방출 시스템은 조성물의 표적 근처에 배치될 수 있으며, 따라서 전신 용량의 일부 (예를 들어, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 참조)만을 필요로 한다. 다른 제어 방출 시스템은 Langer, 1990, Science 249:1527-1533의 검토에서 논의된다.

[0082] 주사 가능한 제제는 정맥 내, 피하, 피내 및 근육 내 주사, 방울 주입 등을 위한 투여 제형을 포함할 수 있다. 이러한 주사 가능한 제제는 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다. 예를 들어, 주사 가능한 제제는 예를 들어, 주사에 통상적으로 사용되는 멸균 수성 매질 또는 유성 매질에 위에 기재된 항체 또는 이의 염을 용해, 현탁 또는 유화시킴으로써 제조할 수 있다. 주사용 수성 매질로는, 예를 들어, 알코올 (예: 에탄올), 폴리알코올 (예: 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 비이온성 계면활성제 [예: 폴리소르베이트 80, HCO-50 (수소첨가 피마자유의 폴리옥시에틸렌 (50몰) 부가물)] 등과 같은 적절한 가용화제와 조합하여 사용될 수 있는 생리 식염수, 포도당을 함유하는 등장액, 및 기타 보조제 등이 있다. 유성 매질로는, 예를 들어, 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과 같은 가용화제와 조합하여 사용될 수 있는 참기름, 대두유 등이 사용된다. 이렇게 제조된 주사제는 바람직하게는 적절한 앰플에 채워진다.

[0083] 유리하게는, 위에 기재된 경구 또는 비경구 사용을 위한 약제학적 조성물은 유효 성분의 용량에 적합하도록 적절한 단위 용량의 제형으로 제조된다. 단위 용량의 이러한 투여 제형은, 예를 들어, 정제, 알약, 캡슐, 주사 (앰플), 좌약 등을 포함한다.

[0084] 본 개시는 본 개시의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 본 개시의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 황색포도상구균의  $\alpha$ -독소를 중화시키는 방법을 제공한다. 한 양태에서, 항체는  $1 \times 10^{-7}$  내지  $1 \times 10^{-10}$  M 범위의 KD로  $\alpha$ -독소에 결합하고; 바람직하게는, KD는  $1 \times 10^{-8}$  내지  $1 \times 10^{-10}$  M 범위이고; 더 바람직하게는, KD는  $1 \times 10^{-9}$  내지  $1 \times 10^{-10}$  M 범위이다. 한 양태에서, 방법은 황색포도상구균 감염과 관련하여 수동 면역 요법을 제공한다.

[0085] 본 개시는 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 황색포도상구균 감염으로 인한 질병 및/또는 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 일 양태에서, 황색포도상구균 감염은 폐렴이다.

[0086] 본 명세서에 사용된 용어 “치료하는” 및 “치료”는 증상의 심각성 및/또는 빈도를 감소시키고, 증상 및/또는 그 근본 원인을 제거하고/하거나, 손상의 개선 또는 복원을 촉진하도록 유해(adverse) 상태, 질병 또는 질환을 앓고 있는 임상적으로 증상이 있는 개인에게 제제 또는 제형을 투여하는 것을 의미한다. 용어 “예방하는” 및 “예방”는 특정 유해 상태, 장애 또는 질병에 걸리기 쉬운 임상적으로 무증상인 개인에게 제제 또는 조성물을 투여하는 것을 의미하며, 따라서 증상의 발생 및/또는 그 근본 원인의 예방과 관련된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 예방 또는 예방하는 것은 조건의 절대적 (완전한) 차단 또는 방지를 달성할 필요는 없다. 오히려, 예방은 예방할 질병 또는 상태의 상당한 (예: 약 50% 넘는) 감소 또는 방지를 달성할 수 있다. 본 명세서에 명시적으로 또는 함축적으로 달리 명시되지 않는 한, 용어 “치료” (또는 “치료하는”)가 가능한 예방에 대한 언급 없이 사용된다면, 예방도 포함되는 것으로 의도된다.

[0087] 본 발명은 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 샘플을 접촉시키는 단계를 포함하는 샘플에서 황색포도상구균의  $\alpha$ -독소를 검출하는 방법을 제공한다.

[0088] 또한, 본 발명은 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 샘플 내 황색포도상구균의  $\alpha$ -독소 검출용 진단 시약 또는 키트를 제공한다.

[0089] 본 개시의 항- $\alpha$ -독소 항체는 또한, 예를 들어 진단 목적을 위해, 샘플에서  $\alpha$ -독소, 또는  $\alpha$ -독소-발현 세포를 검출 및/또는 측정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항- $\alpha$ -독소 항체 또는 이의 단편은  $\alpha$ -독소의 비정상적인 발현 (예: 과잉 발현, 과소 발현, 발현 결여 등)을 특징으로 하는 상태 또는 질병을 진단하는 데 사용될 수 있다.  $\alpha$ -독소에 대한 예시적인 진단 분석은, 예를 들어 환자로 부터 얻은 샘플을 본 개시의 항- $\alpha$ -독소 항체와 접촉시키는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 항- $\alpha$ -독소 항체는 검출 가능한 표지 또는 리포터(reporter) 분자로 표지된다. 대안적으로, 표지되지 않은 항- $\alpha$ -독소 항체는 그 자체가 검출 가능하게 표지된 2차 항체와 조합하여 진단 응용에 사용될 수 있다. 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자는  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , 또는  $^{125}\text{I}$ 와 같은 방사성 동위 원소; 플루오레세인 이소티오시아염(fluorescein isothiocyanate), 또는 로다민과 같은 형광 또는 화학 발광 모이어티; 또는 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 서양고추냉이 과산화 효소(horseradish peroxidase), 또는 루시페라아제(luciferase)와 같은 효소일 수 있다. 샘플에서  $\alpha$ -독소를 검출하거나 측정하는 데 사용할 수 있는 특정 예시적인 분석에는 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA), 방사 면역 분석(RIA) 및 형광 활성화 세포 분리(FACS)가 포함된다.

[0090] 하기 실시예는 당업자가 본 개시를 실시하는 것을 돕기 위해 제공된다.

[0091] **실시예**

[0092] **물질 및 방법**

[0093] **항원의 준비**

[0094] 무독성  $\alpha$ -독소 돌연변이, AT<sub>H35L</sub>의 서열은 C-말단 6X His tag ((pET27b TAC1p  $\alpha$ -hemolysin-6His)가 있는 프레임에서 pET27b 벡터로 구축되었다. 알파-독소 AT<sub>H35L</sub>은 E. coli BL21 균주로부터 발현 및 정제되었다. 간단히 말해서, 750 mL 신선한 배양액을 37°C에서 0.67의 OD<sub>600</sub>으로 성장시켰다. IPTG (이소프로필- $\beta$ -D-티오갈락토포라노시드)를 0.25 mM의 최종 농도로 첨가하여 30°C에서 5시간 동안 단백질 발현을 유도했다. 세포를 수거하여 100 ml의 용해 완충액(lysis buffer)에 재 현탁 시킨 후, 프렌치 프레스(French press)를 사용하여 7주기 동안 균질화 시켰다. 세포 용해물을 정화한 다음 2ml의 Ni-NTA와 혼합했다. 결합 2시간 후, 재조합 His-tag  $\alpha$ -독소 AT<sub>H35L</sub>을 20 ~ 150 mM 이미다졸 용액으로 용출시키고 인산염 완충 식염수로 투석시켰다.

[0095] **면역화 및 파지 라이브러리 생성**

[0096] 8-10 주령 BABL/c 쥐는 10주 동안 2주마다 복강 주사를 통해  $\alpha$ -독소 AT<sub>H35L</sub> 불완전 Freud's adjuvant로 면역화 시켰다. 최종 주사 2주 후, 희생 전 3일 동안 매일 추가 부스트가 제공되었다. 항-AT scFv (단일 사슬 가변 단편) 파지 라이브러리는 쥐 비장 세포로부터 생성되었다. 간단히 말해서, RNA 분리를 위해 TRIZOL® 시약으로 쥐 비장을 균질화하고 용해한 다음, SuperScript III™를 사용하여 cDNA를 합성했다. DNA 단편의 중쇄 가변 부위(V<sub>H</sub>) 및 경쇄 가변 부위(V<sub>L</sub>)은 scFv 프라이머 세트에 의해 증폭시켰다. V<sub>L</sub>-링커-V<sub>H</sub>를 생성하기 위해, V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub> 및 연성(flexible) 링커의 혼합물을 PCR 반응으로 증폭했다. V<sub>L</sub>-링커-V<sub>H</sub> 단편을 SfiI로 분해하고, 절단된 삽입물을 파지미드(phagemid) 벡터와 결합시켰다. 결합 혼합물을 E. coli TG1 컴피턴트 세포로 전기 친공하여 파지 라이브러리를 생성했다. 다양성은  $1.24 \times 10^9$  형질 전환체로 추정되었다.

[0097] **파지 라이브러리의 친화성 선택**

[0098] 그 다음 용액 기반 및 플레이트 기반 방법을 모두 사용하여 파지 라이브러리에서 항-AT 항체를 패닝(panning)했다. 용액 기반 패닝의 경우, 비오닐레이티드(biotinylated)- $\alpha$ -독소를 파지 라이브러리 및 스트렙타비딘(streptavidin) 자성 입자와 함께 배양했다. 세척 후, 결합된 파지 항체를 용출시켰다. 용출된 파지는 증폭되어 패닝 선택의 다음 라운드에 사용되었다. 총 3 라운드의 패닝이 수행되었다. 플레이트 기반 패닝의 경우,  $\alpha$ -독소를 마이크로 플레이트에 코팅하고 파지 라이브러리와 함께 배양한 후, 총 3 라운드의 플레이트 기반 패닝을 수행했다. 파지 입자를 초기에  $\alpha$ -독소에 결합하는 능력에 대해 스크리닝 하였고 파지 ELISA를 사용하여 분석하였고 DNA를 시퀀싱 하였다.

[0099] **파지 ELISA**

[0100] 10 마이크로리터의 개별 파지 하룻밤 배양 조직(culture)을 37°C에서 2시간 동안 96-웰(well) 마이크로 플레이트 플레이트 내 150  $\mu\text{L}$ 의 2YT-A 배지에서 성장시켰다. 이어서 배양 조직을 50  $\mu\text{L}$ 의 헬퍼 파지 ( $2 \times 10^{10}$

PFU/ml)로 감염시키고 37°C에서 추가 2시간 동안 웨이킹(shaking)하면서 배양하였다. 125 µg/ml 카나마이신이 보충된 50 마이크로리터의 2YT-A 배지를 배양 플레이트에 첨가하고 30°C에서 밤새 웨이킹하면서 배양하였다. 관심 파지를 포함하는 배양 상층액을 3,300 x g에서 30분 동안 원심 분리하여 얻어 파지 ELISA 스크리닝에 사용하였다. 100 µl의 파지 상층액을 AT-코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하였다. 쥐 항-M13-HRP 및 TMB 기질로 양성 결합체를 검출하였다. 흡광도는 ELISA 플레이트 판독기로 450 nm에서 측정하였다.

[0101] **전장 항체의 구축 및 발현**

[0102] 경쇄 및 중쇄를 증폭하고 각각 DraIII/BsiWI 및 MluI/NheI로 처리하였다. 삽입물을 경쇄 및 중쇄 불변 부위를 포함하는 벡터에 연결하고, 구축물은 발현을 위해 F293 세포로 형질 감염시켰다. 정제된 전장 항체는 AT-유도 A549 세포 용해(cytolysis)의 중화(neutralization)에서 테스트되고 IC<sub>50</sub>에 의해 순위가 매겨졌다.

[0103] **제조항 α-독소에 결합하는 SPR**

[0104] 표면 플라즈마 공명 (Surface plasma resonance, SPR)을 사용하여 25A1의 제조항 AT에 대한 결합 동역학을 결정했다. 간단히 말해서, 25A1의 약 200개의 반응 단위 (response unit, RU)를 표준 아민 커플링 절차를 사용하여 CM5 칩에 고정시켰다. 이어서, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 nM의 농도로 연속 희석된 AT를 180초 동안 30 µL/분으로 주입하고 480초 동안 해리시켰다. 운동 파라미터 (K<sub>on</sub> 및 K<sub>off</sub>) 및 친화도 (K<sub>D</sub>)는 1:1 상호 작용 결합 모델과 함께 Biacore T100 평가 소프트웨어 2.0을 사용하여 계산하였다.

[0105] **부모 쥐 단일 클론 항체 25A1의 인간화**

[0106] 인간화는 상보성 결정 부위 (CDR) 이식에 의해 수행되었다. 쥐 25A1 단백질 서열을 인간 생식 계열 서열에 정렬시켜 높은 서열 동일성을 갖는 인간 서열을 확인하고, 경쇄 패밀리 IGVK3-11 및 중쇄 패밀리 IGHV1-2의 서열을 프레임워크 서열로 채택하였다. CDR 이식 외에도, 서열은 잠재적 유리(free) 시스테인, 탈아미노화, 리신 클리핑(clipping) 및 프로테아제 절단 부위 형성에 대해 추가로 분석되었다. 키메라 및 인간화 25A1 항체는 F293 세포에서 일시적으로 발현되고 정제되었다.

[0107] **α-독소 유도 A549 세포 용해의 중화**

[0108] 항-AT 항체에 대한 기능적 분석이 확립되었다. A549 세포를 2 x 10<sup>4</sup> 세포/웰로 마이크로 플레이트에 접종하고 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 밤새 배양했다. 다음 날, 배지를 제거하고 세포를 배지로 세척하였다. 정제된 항체를 0.4, 4 및 40 µg/mL로 세포에 첨가하고 8 µg/mL의 AT와 함께 공동 배양하였다. 배양이 끝날 때, 비색 MTT 분석 키트를 사용하여 세포 생존력을 분석했다. 결과는 OD<sub>690</sub> nm에서 배경 흡광도(background absorbance)로 결정되고 OD<sub>570</sub> nm 측정에서 차감되었다 (도 1).

[0109] **토끼 적혈구 용해 분석**

[0110] 황색포도상구균 조 상층액은 6000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 3 ml의 Tryptic Soy Broth (TSB) 하룻밤 배양 조직(culture)으로부터 수집하였다. 다양한 균주의 상층액을 여과 멸균하고 추가 사용까지 -80°C에서 보관했다.

[0111] 이오딧사놀(iodixanol) 구배 용액을 사용하여 RBC 세포를 수집하고 최종 세포 펠렛을 균형 잡힌 염 배지 (0.85% NaCl, 10 mM HEPES, pH7.4)에 재 현탁 시키고 4°C에서 보관했다. AT 유도 토끼 RBC 용혈을 중화시키는 항체의 능력을 평가했다. 구체적으로, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 및 1.56 및 0.78 농도의 각 항체 25 µl를 100 µl의 10% 토끼 RBC와 함께 웰에 첨가한 다음, 25 µl의 다양한 균주의 1:8 ~ 1:16 희석된 황색포도상구균 배양 상층액을 첨가했다. 37°C에서 45 ~ 60분 동안 배양한 후, 플레이트를 5분 동안 원심 분리하고, 50 µl의 상층액을 새로운 미량정량판(microtiter plate)로 부드럽게 제거하고, 450 nm에서 흡광도를 판독했다. 항체 효능은 α-독소 유도 용혈의 50% 억제에 달성된 항체 농도로 정의된다. 2% TritonX-100은 100% 용혈 대조군으로 사용되었다. 용혈 억제는 ((2% TritonX-100의 OD450 - 시험 항체의 OD450)/2% TritonX-100의 OD450) x 100 %로 계산하였다.

[0112] **쥐 균혈증 모델**

[0113] 6마리의 암컷 BALB/c 또는 CD-1 쥐 그룹을 대조군 항체 또는 25A1의 복강 내 주사로 수동 면역화한 다음, 24시간 후 90% 치사량의 황색포도상구균 BAA-1717를 정맥 내 (i.v.) 주사 또는 ATCC29213 균주의 복강 내 주사하여 공격했다. 동물 사망률은 연속 10일 동안 관찰하였다. GraphPad Prism을 사용하여 생존을 기록하고 결과를 분석

했다. Log-rank (Mantel-Cox) 및 Gehan-Breslow-Wilcoxon 검정을 사용한 Kaplan-Meir 생존 분석으로 통계적 유의성 분석을 수행했다.

[0114] **쥐 폐렴 모델**

[0115] 7-9 주령 암컷 C57BL/6J 쥐 10 마리의 그룹 (Jackson Labs, Bar Harbor, MI)을 SYN100 (25A1-B5B6AQT)의 복강 내 주사로 수동 면역화한 다음, 24시간 후 치사량의 각 황색포도상구균 임상 단리물을 비강 내 (IN) 투여하여 공격하였다. 반코마이신은 감염 후 2시간에 피하 투여했다. 감염 후 7일 동안 1일 3회 집합체 조사(census)를 통해 동물의 생존을 모니터링했다. GraphPad Prism을 사용하여 생존을 기록하고 결과를 분석했다. Log-rank (Mantel-Cox) 및 Gehan-Breslow-Wilcoxon 검정을 사용한 Kaplan-Meir 생존 분석으로 통계적 유의성 분석을 수행했다.

[0116] **토끼 폐렴 모델**

[0117] 3 내지 9 마리의 수컷 뉴질랜드 토끼 그룹을 감염 24시간 전에 상이한 용량의 SYN100으로 처리하였다. 감염의 접종원 크기는 2.9-5.2 x 10<sup>7</sup> CFU/토끼 이내로 유지되었다. 리네졸리드는, 사용되는 경우, 감염 후 4시간에 50 mg/kg/8h로 피하 주사로 투여하였다. 감염 후 7일 동안 1일 2회 집합체 조사(census) 통해 동물의 생존을 모니터링했다. GraphPad Prism을 사용하여 생존을 기록하고 결과를 분석했다. Log-rank (Mantel-Cox) 및 Gehan-Breslow-Wilcoxon 검정을 사용한 Kaplan-Meir 생존 분석으로 통계적 유의성 분석을 수행했다.

[0118] **실시예 1항-a-독소 항체의 분리**

[0119] BABL/c 쥐는 H35L 돌연변이를 도입함으로써 특이적으로 불활성화된 재조합 AT로 면역되었다. 그 다음 단일 사슬 가변 단편 (scFv) 파지 라이브러리를 구축하고 황색포도상구균으로부터 정제된 AT로 패닝했다. 3 라운드의 패닝 후, 29개의 고유한 결합체를 확인, 생산하고 AT-유도 A549 세포 용해에 대한 중화 활성을 테스트했다. 그 결과 29개의 정제된 항체 중 10개 (25A1, 25A10, 25E4, 25E12, 25H3, 25B7, 25G1, 25G4, 5H9, 및 N2F6)만이 항체가 40 µg/mL에서 사용될 때 A549 세포 용해를 억제하는 것으로 나타났다 (도 1). 10개의 항체의 중화 활성은 표 3에 요약되어 있다. 그 다음 항체를 전장 항체로 전환하고 결합에 대해 추가로 특성화하고 중화 활성에 대해 확인했다. 10개의 클론의 CDR 서열이 표 2에 나타나 있다 (상기 제시된 바와 같음). CDR 서열을 비교한 결과 10개의 억제 항체 중 9개가 아미노산 서열에서 거의 동일하다는 것이 밝혀졌다. 그들 중 5 개 (25A10, 25A1, 25E12, 25H3, 및 25E4)는 AT-유도 A549 세포 용해의 중화에서 매우 유사한 기능적 활성을 가졌다. 결합 및 기능적 활성을 기준으로 클론 25A1을 선택했다.

**표 3**

[0120]

클론	서열 분석	세포 독성	클론	서열 분석	세포 독성
aN2-25A10	√	++	aSTAPH N2F6	√	+
aN2-25D5	√	-	aSTAPH N2H1	√	-
aN3-12.5A7	√	-	aSTAPH N2A2	√	-
aN2-25D8	√	-	aSTAPH N2F11	√	-
aN3-12.5E6	√	-	aSTAPH N2E10	√	-
aN2-25G12	√	-	aSTAPH N2B6	√	-
aN3-25F2	√	-	aN2-25A1	√	++
aN3-25G1	√	+	aSTAPH N2D12	√	-
aN3-12.5D2	√	-	H9395 R4A8	√	-
aN2-25B8	√	-	aN2-25E12	√	++
H9395 R4B11	√	-	aN2-25H3	√	++
aN2-25B7	√	+	aSTAPH N2D1	√	-
aN3-12.5H9	√	+	aN2-25E4	√	++
aSTAPH N2B11	√	-	aN2-25G4	√	+
aSTAPH N2B10	√	-			

[0121] **실시예 2 재조합 a-독소에 대한 25A1의 고 친화성 결합**

[0122] 재조합 AT에 대한 25A1의 친화성은 표면 혈장 공명에 의해 평가했다. 도 2에서 볼 수 있듯이, 25A1은 8.346 x

$10^{-10}$  M의 KD로  $\alpha$ -독소에 결합한다. 결합 및 해리 상수는 각각  $7.608 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $6.349 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이었다. 이 데이터는 25A1이 AT에 대해 높은 친화성을 가짐을 나타낸다.

[0123] **실시예 3: 인간화된 25A1의 엔지니어링 및 특성화**

[0124] 뮤린 항체로 도입된 면역원성을 감소시키기 위해, 그들의 높은 서열 및 뮤린 25A1에 대한 구조 때문에 경쇄의 경우 인간 프레임워크 IGVK3-11\*01F 및 중쇄의 경우 IGHV1-2\*02F에 뮤린 25A1 항체의 CDR을 이식하기로 선택했다. 역 돌연변이의 다른 조합이 생성되고 항원 결합에 대해 테스트되었다. 결합 친화도 및 역 돌연변이의 수에 기초하여, 중쇄 25A1-VHB2 및 25A1-VHB5의 2개의 변이체 및 경쇄 25A1-VLB4 및 25A1-VLB6의 2개의 변이체를 선택하여 변이체 25A1-HuB2B4, 25A1-HuB5B4, 25A1HuB2B6, 및 25A1-HuB5B6을 구축하였다. CDR 이식 및 역 돌연변이 후 항체의 서열 변이는 도 3a에 나타나 있다. 재조합  $\alpha$ -독소에 대한 인간화 항체 25A1-HuB2B4, 25A1-HuB5B4, 25A1HuB2B6, 및 25A1-HuB5B6의 결합 동역학 ( $K_D$ )은 forteBio에 의해 각각  $1.1 \times 10^{-9}$  M,  $1.5 \times 10^{-9}$  M,  $1.1 \times 10^{-9}$  M, and  $1.1 \times 10^{-9}$  M로 결정되었으며, 이는 부모 쥐 항체 25A1의  $K_D$ ,  $1.5 \times 10^{-9}$  M와 매우 유사하다 (도 3b).

[0125] 그 다음 시퀀스 책임(liability) 검사를 위해 25A1-B2B4 및 25A1-B5B6을 선택했다. 잠재적 당화(glycosylation) 부위는 중쇄 CDR2 부위의 N61에서 확인되었다 (도 3c). 따라서 N61은 추가 당화로 인한 불필요한 합병증을 방지하기 위해 알라닌으로 돌연변이 되었다. N61A 돌연변이 클론은 25A1-B2B4AQT 및 25A1-B5B6AQT로 명명되었다.

[0126] **실시예 4  $\alpha$ -독소 유도 토끼 적혈구 용혈의 중화**

[0127] 인간화된 25A1, 25A1-B2B4AQT, 및 25A1-B5B6AQT를 생산하고 천연  $\alpha$ -독소 유도 토끼 적혈구 용혈의 억제에 대해 테스트했다. 간단히 말해서, 5개의 황색포도상구균 임상 균주 (BAA-1717, BAA-1756, ATCC33592, BAA-42, 및 Wood46)로부터 고정기 (하룻밤 배양)의 박테리아 상층액을 수집하고, 0.195 ~ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 협의 범위에 걸쳐 다양한 항-AT 항체와 함께 토끼 RBC에 첨가했다. 5개의 시험된 균주로부터 재조합 및 천연  $\alpha$ -독소로 유도된 RBC 용혈의 억제율은 도 4에 나타나 있다. 항체 25A1, 25A1-B2B4AQT, 및 25A1-B5B6AQT는 시험된 균주의 천연  $\alpha$ -독소에 결합할 수 있었고, 다양한 천연  $\alpha$ -독소 매개 RBC 용혈의 ~50%-90% 억제를 나타냈다. 재조합  $\alpha$ -독소 유도 용혈을 억제하기 위한 25A1, 25A1-B2B4AQT, 및 25A1-B5B6AQT의  $\text{IC}_{50}$  값은 462.3, 442.9 및 304.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였고; ATCC33592의 경우 1518, 1801 및 1830  $\text{ng}/\text{mL}$ ; BAA-1756의 경우 6913, 7956 및 7322  $\text{ng}/\text{mL}$ , Wood46의 경우 1299, 1707 및 1537  $\text{ng}/\text{mL}$ , BAA-42의 경우 860.6, 910.8 및 996.3  $\text{ng}/\text{mL}$ 로, 25A1-B2B4AQT 및 25A1-B5B6AQT 모두가 25A1에 필적하는 억제 능력을 유지하였음을 나타낸다.

[0128] **실시예 5 SYN100은 뮤린 균혈증 및 폐렴 모델에서 생존율을 증가시킨다**

[0129] 황색포도상구균은 여러 장기 기능 장애가 있는 전신 염증인 패혈증의 일반적인 원인이다. AT는 황색포도상구균 hla 돌연변이가 지연된 사망까지의 시간을 나타내고 쥐 패혈증 모델에서 생존을 증가시키기 때문에 패혈증 모델에서 중요한 역할을 한다. 따라서 황색포도상구균 감염으로부터 쥐를 보호하는 능력에 대해 25A1을 테스트했다. 도 5에 나타난 바와 같이, 비히클 대조군의 사망은 2일과 5일 사이에 관찰되었다. 대조적으로, 25A1 처리 그룹은 증가된 생존율을 나타냈다; 50, 25, 10 및 5  $\text{mg}/\text{kg}$  용량 그룹의 전체적 생존율은 83%, 67%, 33% 및 50%였으며 (도 5), 이 데이터는 25A1을 통한 예방이 균혈증 감염에 대한 보호를 제공함을 나타낸다. 메티실린 감수성 황색포도상구균 균주 ATCC29213으로 확립된 또 다른 뮤린 패혈증 모델에서, SYN100은 100, 50 및 10  $\text{mg}/\text{kg}$ 에서 예방 요법으로서 보호를 나타냈다 (도 6). 다양한 균주 간에 약간의 차이가 있지만, 이러한 관찰된 효능은 황색포도상구균 패혈증 및 균혈증에서 SYN100의 예방적 사용을 지지한다.

[0130] 황색포도상구균은 환자에서 인공 호흡기 관련 폐렴의 빈번한 원인이므로, 황색포도상구균 유도 쥐 폐렴 모델에서 SYN100의 보호 효능을 평가했다. 감염은 SYN100 투여 24시간 후 3개의 황색포도상구균 임상 단리물 BAA1556 (USA300), SF8300 (USA300), 또는 NRS261 (USA200)으로 비강 내 공격에 의해 유도되었다. 급성 폐렴 모델에서, 비히클 대조군의 사망은 공격 후 18-20시간 사이에 발생했다. 대조적으로, SYN100의 예방적 투여는 세 가지 모델 모두에서 생존의 상당한 연장을 가져왔으며, 이는 SYN100이 다양한 황색포도상구균 임상 분리물에 대한 보호를 제공할 수 있음을 나타낸다 (도 7).

[0131] 후속 실험에서, SYN100이 항생제 치료와 관련하여 작동하는 방식이 뮤린 NRS261 폐렴 모델에서 테스트되었다. 반코마이신은 병원에서 MRSA 감염을 치료하기 위해 일반적으로 처방된다; 따라서 치료 기준으로서 반코마이신

치료와 함께 SYN100의 효능을 테스트했다. 도 8에 나타나 있듯이, 10 mg/kg의 SYN100 및 최대 30 mg/kg의 반코마이신은 모두 쥐의 생존을 크게 연장하지 못했다. 그럼에도 불구하고, SYN100과 반코마이신을 모두 투여 받은 세 그룹의 쥐는 용량 의존적 생존을 보였으며, 이는 SYN100과 반코마이신 사이의 시너지 효과를 크게 나타낸다.

[0132] **실시예 6 SYN100은 토끼 폐렴 모델에서 생존율을 증가시킴**

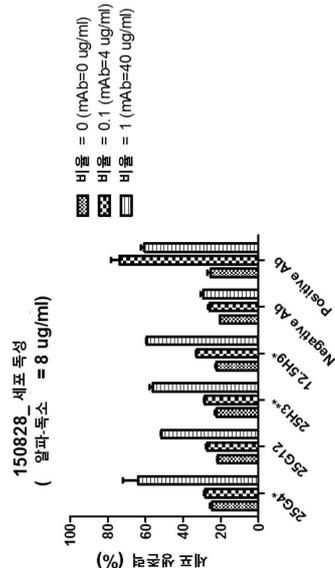
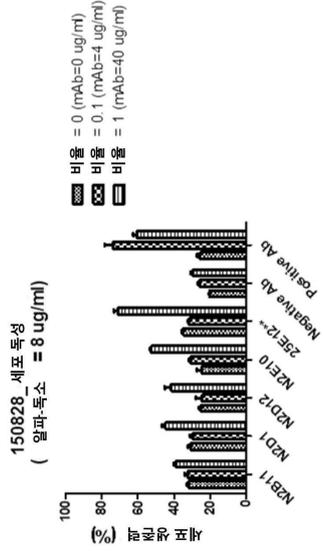
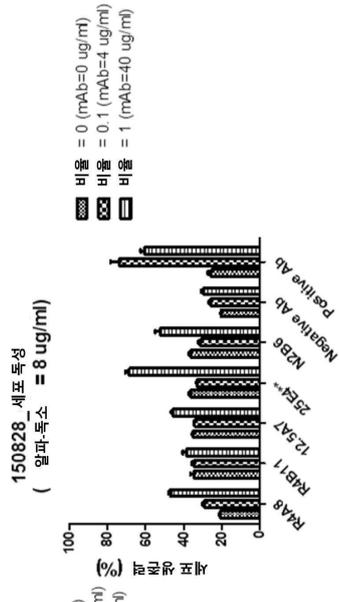
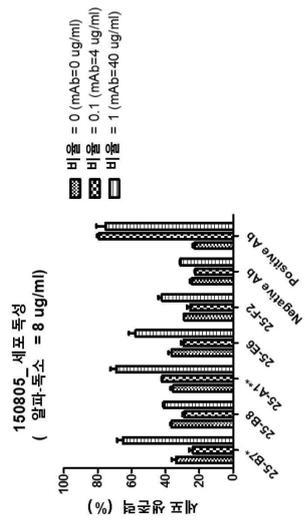
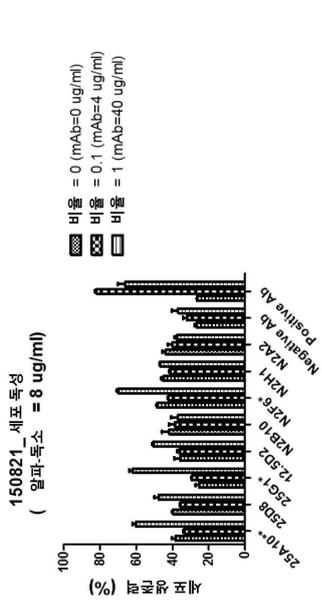
[0133] 여러 면에서 토끼는 쥐보다 황색포도상구균 감염에 더 적합한 모델 유기체이다. 따라서 병원에서 획득한 MRSA 균주 ST20120426으로 확립된 토끼 폐렴 모델에서 SYN100의 효능을 테스트했다. ST20120406은 상대적으로 많은 양의  $\alpha$ -독소를 분비하는 매우 독성이 강한 균주로, 대조군 동물이 24시간 이내에 쓰러지도록 한다. 도 9에 나타나 있듯이, 이 모델에서 테스트된 모든 용량의 SYN100은 25 내지 125 mg/kg의 범위에서 생존을 상당히 연장했으며 황색포도상구균 폐렴에서 SYN100의 유용성에 대한 또 다른 증거를 나타낸다.

[0134] 항생제와 SYN100의 공동 치료는 ST20120426 토끼 폐렴 모델에서 더 자세히 조사되었다. 도 10a의 데이터는 30 mg/kg의 SYN100 및 50 mg/kg/8h의 리네졸리드 (LZD)를 사용한 단일 치료가 각각 56% 및 33%의 전체적 생존을 야기한 반면, SYN100 및 LZD를 모두 투여 받은 그룹은 89% 생존을 가짐을 나타낸다. 폐 조직을 추가로 조사한 결과 병용 치료 그룹만 폐 부종, 세균 부하가 현저히 감소되었으며 육안으로 보이는 외관이 더 정상인 것으로 나타났다. LZD는 박테리아에서 단백질 합성의 시작을 억제하고, 세포벽 합성 차단제인 반코마이신과 동등하게 효과적인 것으로 나타났다. 종합하면, 이러한 결과는 SYN100이 두 항생제의 작용을 보완하고 추가 또는 시너지 방식으로 MRSA 감염에 대한 추가 보호를 제공함을 시사한다.

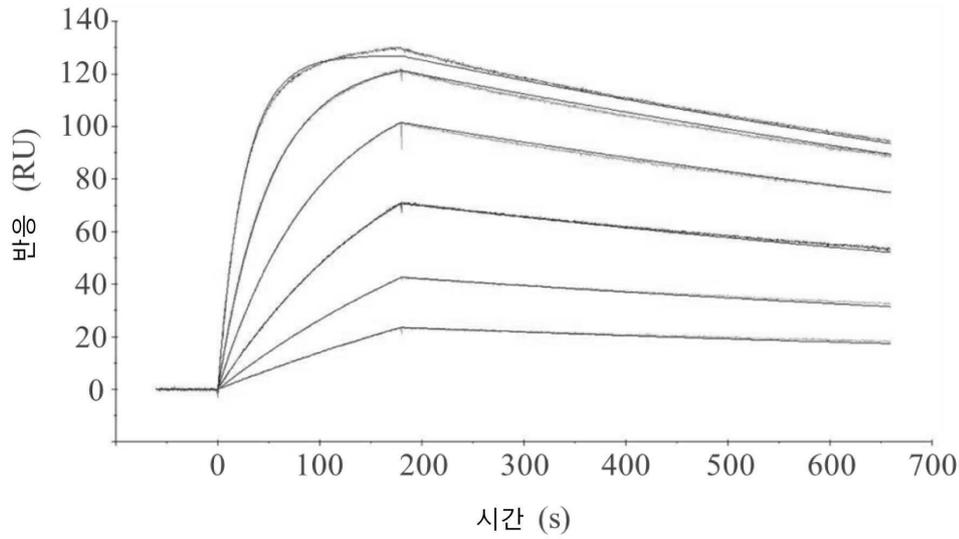
[0135] 본 개시는 위에서 설명된 특정 양태들과 관련하여 설명되었지만, 이에 대한 많은 대안과 이의 수정 및 변형이 당업자에게 명백할 것이다. 그러한 모든 대안, 수정 및 변형은 본 개시의 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

도면

도면1



도면2



$K_{on}(1/Ms)$	$K_{off}(1/s)$	$K_D(M)$	$R_{max}$	$\chi^2$
7.608E+5	6.349E-4	8.346E-10	129.0	0.581

도면3a

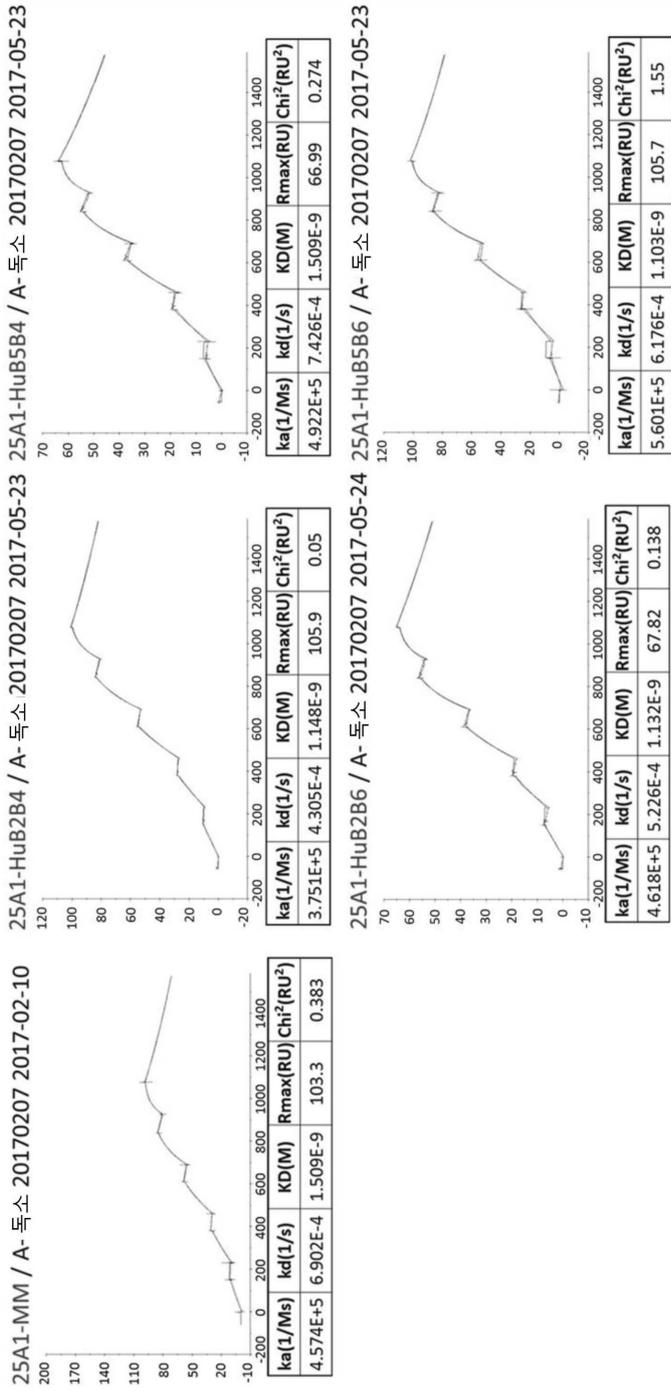
	1	10	20	30	40	50	60
25A1-VH	QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKAS	GYSFTDYNM		WVKQSHGKSLWIG	SINPYYGITSYNQTFKG		
IGHV1-2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTFTGYMH		WVRQAPGGLEWMG	WINPNSGGTNYAQKFKG		
HU25A1-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYSFTDYNM		WVRQAPGGLEWMG	SINPYYGITSYNQTFKG		
HU25A1/VHB2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYSFTDYNM		WVRQAPGGLEWMG	SINPYYGITSYNQTFKG		
HU25A1/VHB5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYSFTDYNM		WVRQAPGGLEWMG	SINPYYGITSYNQTFKG		

	70	80	90	100	110
25A1-VH	KATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAR	IYYGDSLGLDY		WGQGTITVTVSS	
IGHV1-2	RVTMTRDTSISTAYMELSR	RSDDTAVYYCAR		WGGDGFYAMDVWGQGLVTVSS	
HU25A1-VH	RVTMTRDTSISTAYMELSR	RSDDTAVYYCAR		IYYGDSLGLDYWGQGLVTVSS	
HU25A1/VHB2	RVTMTRDTSISTAYMELSR	RSDDTAVYYCAR		IYYGDSLGLDYWGQGLVTVSS	
HU25A1/VHB5	RVTMTRDTSISTAYMELSR	RSDDTAVYYCAR		IYYGDSLGLDYWGQGLVTVSS	

	1	10	20	30	40	50
25A1-VL	DIELTQSPAIMASPGKVTMTC	SASSSVSYMH		WYQQKSGTSPKRWIY	DTSKLAS	
IGVK3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSSYLA		WYQQKPGQAPRLIY	DASNRAT	
HU25A1-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	SASSSVSYMH		WYQQKPGQAPRLIY	DTSKLAS	
HU25A1/VLB4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	SASSSVSYMH		WYQQKPGQAPRRWIY	DTSKLAS	
HU25A1/VLB6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	SASSSVSYMH		WYQQKPGQAPRLIY	DTSKLAS	

	60	70	80	90	100
25A1-VL	GVPARFSGSGSGTSYSLTIS	SMEAEDAATYYC		QQWSSNPLT	FGAGTKLEIKR
IGVK3-11	GIPARFSGSGSGTDFTLTIS	SLEPEDFAVYYC		QQRSNWP	FGGKVEIKR
HU25A1-VL	GIPARFSGSGSGTDFTLTIS	SLEPEDFAVYYC		QQWSSNPLT	FGGKVEIKR
HU25A1/VLB4	GIPARFSGSGSGTDFTLTIS	SLEPEDFAVYYC		QQWSSNPLT	FGGKVEIKR
HU25A1/VLB6	GIPARFSGSGSGTDFTLTIS	SLEPEDFAVYYC		QQWSSNPLT	FGGKVEIKR

도면3b



도면3c

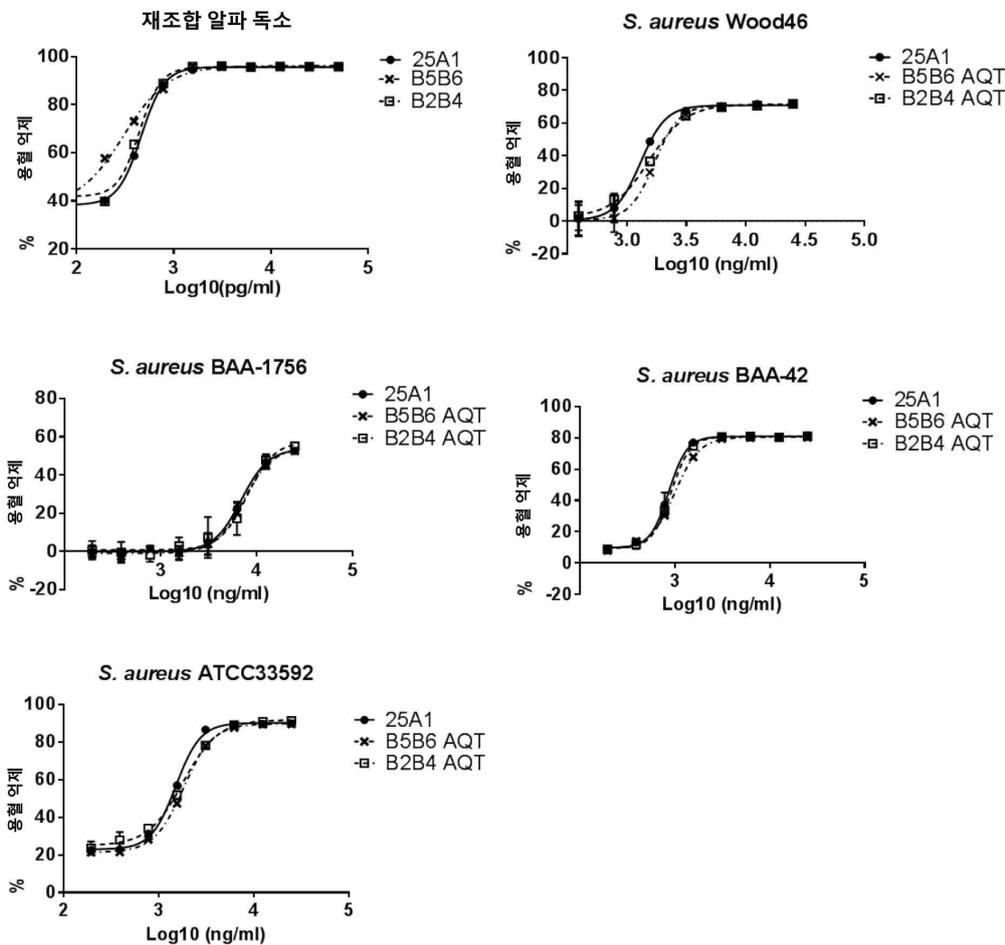
25A1-B5B6AQT 중쇄:

**DPKGSLSWRILLFLSLAFELSYG**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYSFTDYNMNVWRQAPGQGL  
 EWMGSINPYYGITSY**A**QTFKGRVTLTVDTSSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARIYYGDSLGLDYWGQG  
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPVAVLQSSG  
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK  
 PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

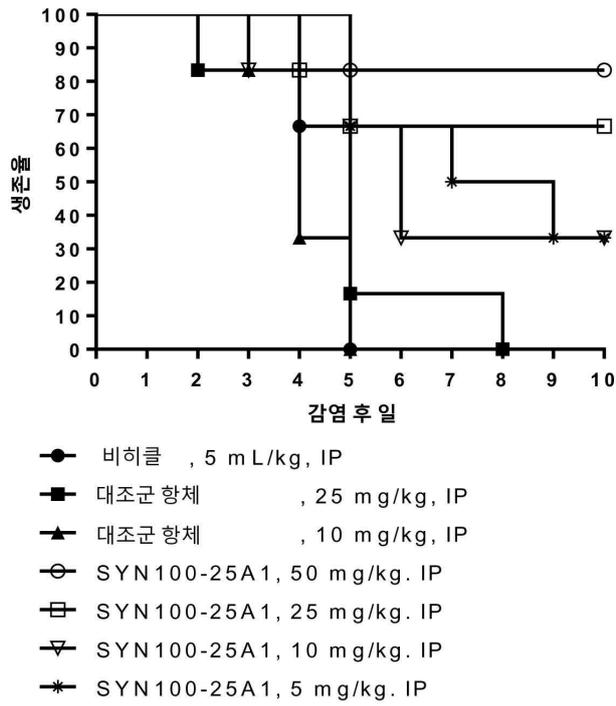
25A1-B5B6AQT 경쇄:

**METDTLLLVLLWVPGSTGE**IVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRRLIY  
 DTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTLSISLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFI  
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSLSTLTLSKAD  
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*

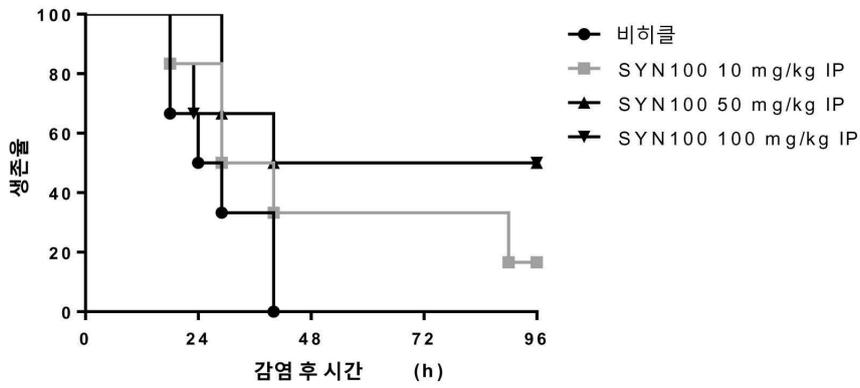
도면4



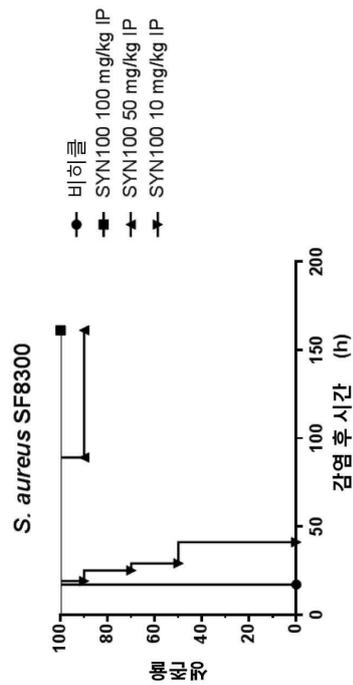
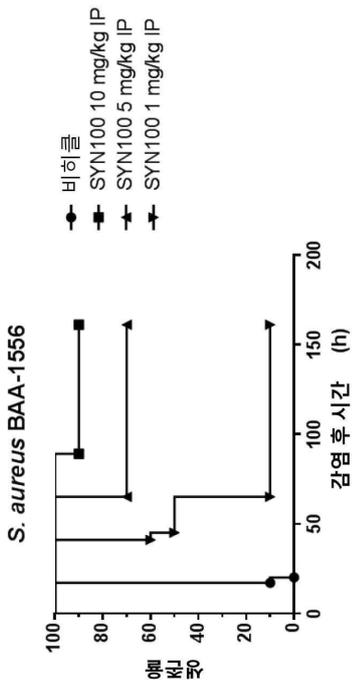
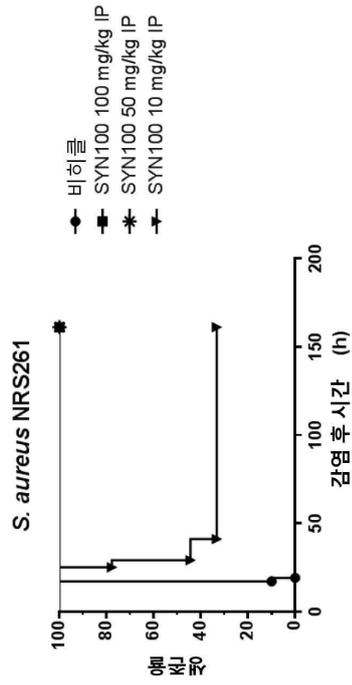
도면5



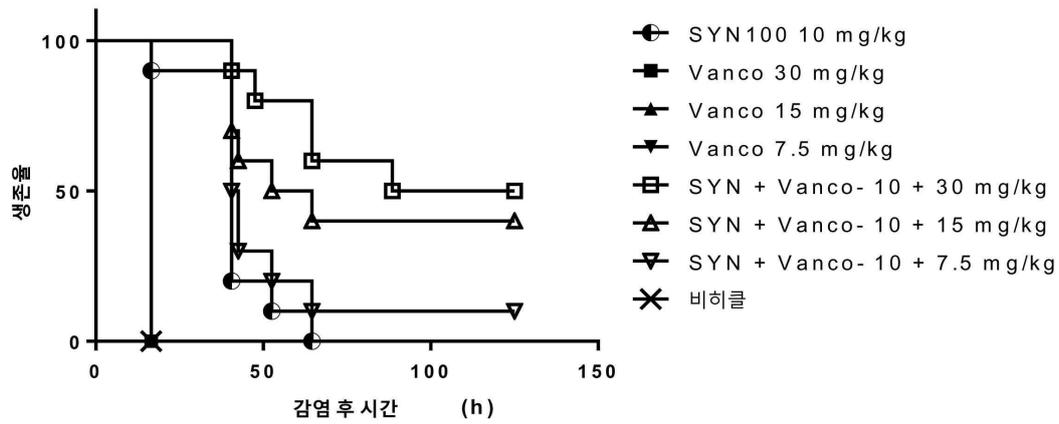
도면6



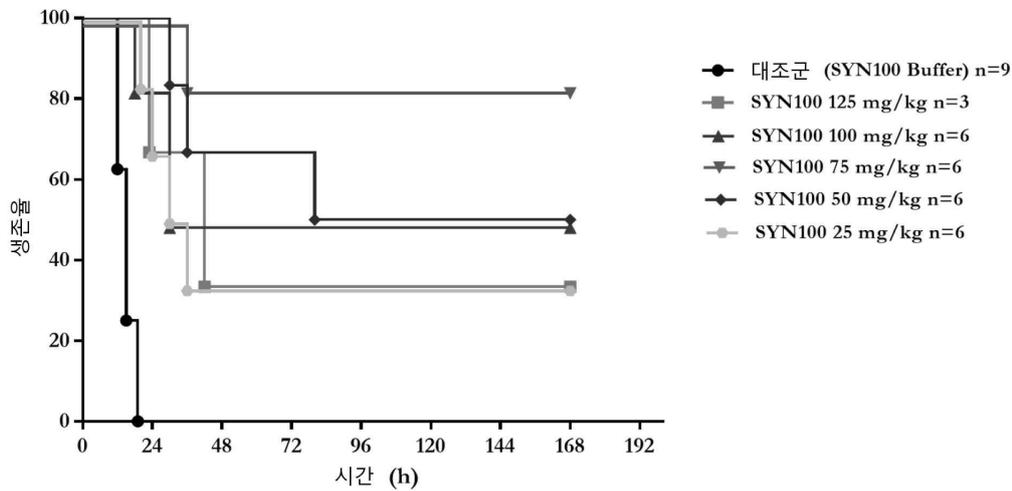
도면7



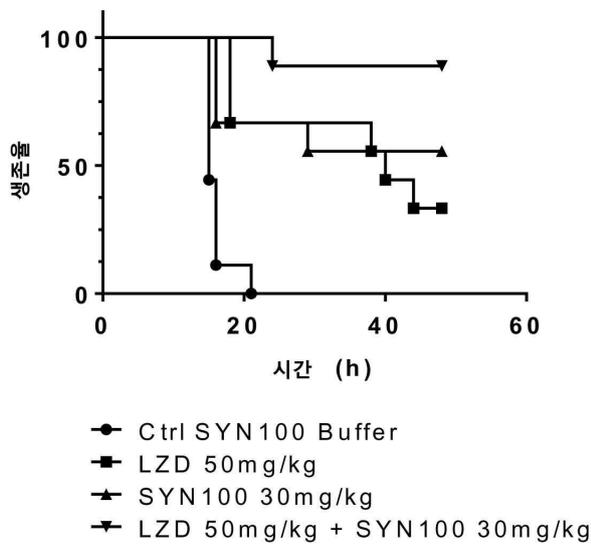
도면8



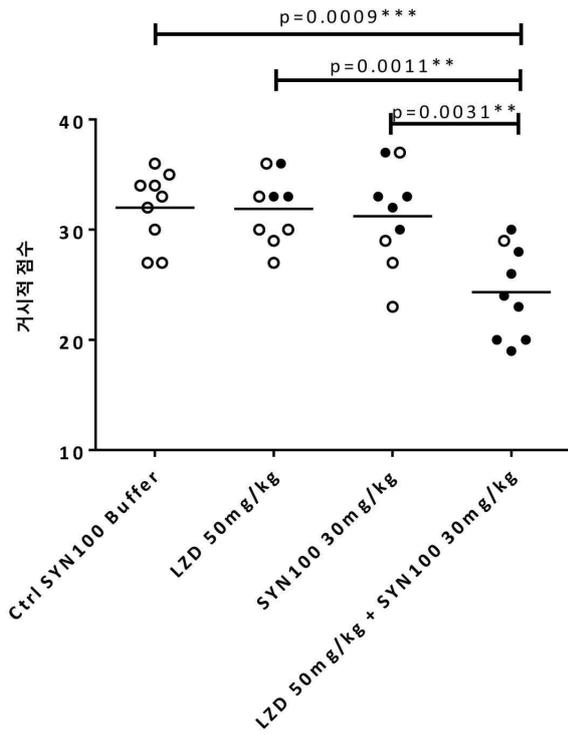
도면9



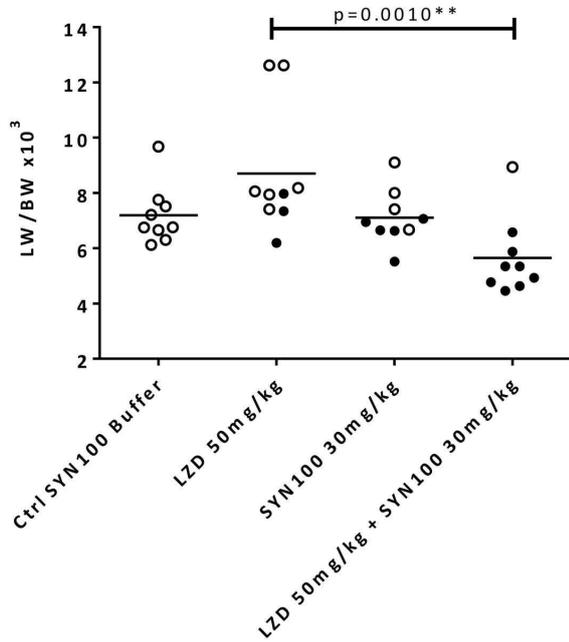
도면10a



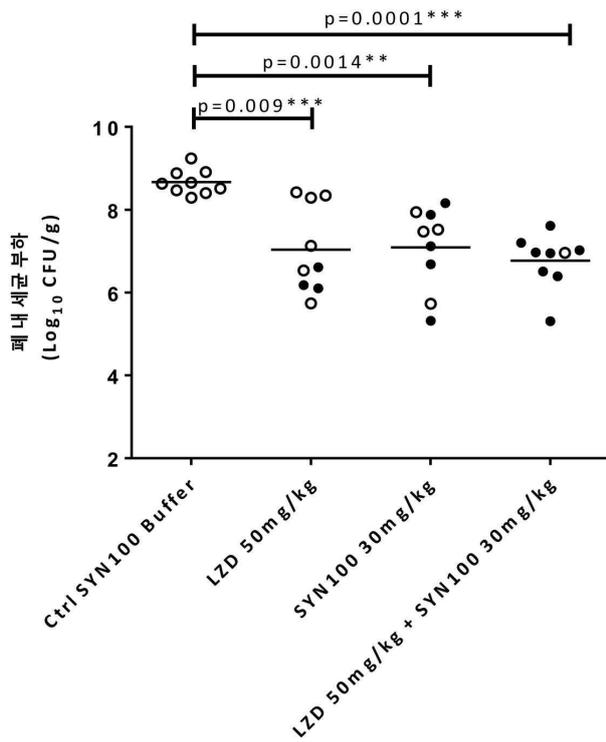
도면10b



도면10c



도면10d



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SYNERMORE BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.

<120> ANTIBODY SPECIFIC TO ALPHA-TOXIN OF STAPHYLOCOCCAL AUREUS AND USES THEREOF

<130> none

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> mouse

<400> 1

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> mouse

<400> 2

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn

1                    5                    10

<210>

> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

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

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<400> 4

Ser Ile Asn Pro His Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<400> 5

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

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse  
 <400> 6  
 Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Leu Tyr Lys Gln Asn Phe Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Asp

<210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> mouse  
 <400> 7  
 Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr  
 1                    5                    10

<210> 8  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> mouse  
 <400> 8  
 Asp Gly Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1                    5                    10  
 <210> 9  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> mouse  
 <400> 9

Val Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr  
 1                    5                    10  
 <210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> mouse  
 <400> 10

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
 1                    5                    10

<210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> mouse  
 <400> 11  
 Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met His  
 1                    5                    10

<210> 12

<

211> 10  
 <212> PRT  
 <213> mouse  
 <400> 12  
 Ser Ala Ser Ser Ser Lys Ser Tyr Ile His  
 1                    5                    10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> mouse

<400> 13

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr  
 1                    5                    10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> mouse

<400> 14

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
 1                    5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> mouse

<400> 15

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> mouse

<400> 16

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> mouse

<400> 17

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> mouse

<400> 18

His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> mouse

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe  
 50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> mouse

<400> 20

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 21

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 Ser Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                    40                    45

Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe  
                   50                    55                    60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Arg Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
                   100                    105                    110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 22

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 Ser Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                    40                    45

Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe



<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 24

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                   20                    25                    30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                    55                    60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe 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 Asn Pro Leu Thr  
                   85                    90                    95

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

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 25

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                   20                    25                    30

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

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



<400> 27

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 28

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



<400> 30

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                   20                    25                    30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                    55                    60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe 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 Asn Pro Leu Thr  
                   85                    90                    95

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

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<400> 31

Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe Arg  
 1                    5                    10                    15

Gly