(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월19일
(11) 등록번호 10-2822827
(24) 등록일자 2025년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01) *C07K 16/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56961 (2013.01)
A61P 31/10 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7006350
(22) 출원일자(국제) 2020년07월28일
심사청구일자 2023년05월19일
(85) 번역문제출일자 2022년02월24일
(65) 공개번호 10-2022-0113346
(43) 공개일자 2022년08월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/043908
(87) 국제공개번호 WO 2021/021830
국제공개일자 2021년02월04일
(30) 우선권주장
62/879,894 2019년07월29일 미국(US)
62/879,912 2019년07월29일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20110189183 A1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
더 어드미니스트레이터 오브 더 튜레인 에듀케이셔널 펀드
미국 루이지애나 70112 뉴올리언즈 스위트 1400 카넬 스트리트 1440
더 보드 오브 슈퍼바이저스 오브 루이지애나 스테이트 유니버시티 앤드 애그리컬처럴 앤드 메카니컬 컬리지
미국 70808 루이지애나주 배톤 루즈 웨스트 레이크쇼어 드라이브 3810
스타디우스 바이오파마, 엘엘씨
미국, 루이지애나주 70112, 뉴 올리언스, 스위트 200, 826 유니온 스트리트
(72) 발명자
윌슨 러셀 비.
미국, 루이지애나 70112, 뉴 올리언스, 스위트 200, 830 유니온 스트리트, 씨/오 오토이뮨 테크놀로지스, 엘엘씨
신 홍
미국, 루이지애나 70112, 뉴 올리언스, 룸 6263, 6 플로어, 1901 페르디도 스트리트
로빈슨 제임스 이.
미국, 루이지애나 70118, 뉴 올리언스, 스위트 300, 6823 세인트 찰스 애비뉴, 씨/오 더 애드미니트레이터스 오브 더 튤레인 에듀케이셔널 펀드
(74) 대리인
특허법인한얼

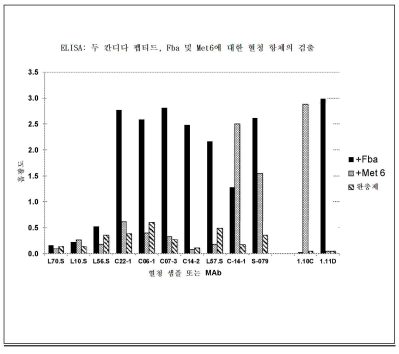
전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 **칸디다에 대한 항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 칸디다에 결합하고, 이를 중화시키는 항체, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 16/14 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
G01N 2333/40 (2013.01)
G01N 2469/10 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
WO2017009442 A1
WO2008074840 A2
WO2000061637 A1
JP01019915 A
US20170137476 A1

명 세 서

청구범위

청구항 1

클론-쌍형성한(clone-paired) 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 포함하는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 중쇄 CDR 서열이 (a) 서열 번호: 18(CDRH1), 서열 번호: 19(CDRH2), 및 서열 번호: 20(CDRH3), (b) 서열 번호: 21(CDRH1), 서열 번호: 22(CDRH2), 및 서열 번호: 23(CDRH3), (c) 서열 번호: 24(CDRH1), 서열 번호: 25(CDRH2), 및 서열 번호: 26(CDRH3), (d) 서열 번호: 27(CDRH1), 서열 번호: 28(CDRH2), 및 서열 번호: 29(CDRH3), (e) 서열 번호: 50(CDRH1), 서열 번호: 51(CDRH2), 및 서열 번호: 52(CDRH3), 또는 (f) 서열 번호: 53(CDRH1), 서열 번호: 54(CDRH2), 및 서열 번호: 55(CDRH3)이고,

상기 경쇄 CDR 서열이 (a) 서열 번호: 30(CDRL1), KAS(CDRL2), 및 서열 번호: 31(CDRL3), (b) 서열 번호: 32(CDRL1), WAS(CDRL2), 및 서열 번호: 33(CDRL3), (c) 서열 번호: 34(CDRL1), DDT(CDRL2), 및 서열 번호: 35(CDRL3), (d) 서열 번호: 36(CDRL1), EDS(CDRL2), 및 서열 번호: 37(CDRL3), (e) 서열 번호: 56(CDRL1), RDN(CDRL2), 및 서열 번호: 57(CDRL3), 또는 (f) 서열 번호: 58(CDRL1), 서열 번호: 59(CDRL2), 및 서열 번호: 60(CDRL3)인, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 (a) 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2, (b) 서열 번호: 3 및 서열 번호: 4, (c) 서열 번호: 5 및 서열 번호: 6, (d) 서열 번호: 7 및 서열 번호: 8, (e) 서열 번호: 42 및 서열 번호: 43, 및 (f) 서열 번호: 44 및 서열 번호: 45로부터 선택되는 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되거나, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 상기 (a) 내지 (f)로부터 선택되는 클론-쌍형성한 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 (a) 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11, (b) 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13, (c) 서열 번호: 14 및 서열 번호: 15, (d) 서열 번호: 16 및 서열 번호: 17, (e) 서열 번호: 46 및 서열 번호: 47, 및 (f) 서열 번호: 48 및 서열 번호: 49의 클론-쌍형성한 서열로부터 선택되는 경쇄 가변 서열 및 중쇄 가변 서열을 포함하거나, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 상기 (a) 내지 (f)로부터 선택되는 클론-쌍형성한 서열과 95%의 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 중쇄 가변 서열을 포함하는, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항원-결합 단편이 재조합 scFv(단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 또는 Fv 단편인, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체 또는 이중특이적(bispecific) 항체인, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체가,

FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키고/거나 반감기를 증가시키고/거나, 치료 효능을 증가시키도록 돌연변이화된 Fc 부분, 또는

LALA, N297, GASD/ALIE, YTE 또는 LS 돌연변이를 포함하는 돌연변이화된 Fc 부분, 또는

FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키도록 변형된 글리칸을 포함하는 돌연변이화된 Fc 부분, 또는

글리칸의 효소적 또는 화학적 부가 또는 제거 또는, 정의된 글리코실화 패턴으로 조작된 세포주에서의 발현에 의해 변형된 글리칸을 포함하는 돌연변이화된 Fc 부분을 포함하는 IgG, 또는 재조합 IgG 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 세포 투과 펩티드(cell penetrating peptide)를 추가로 포함하고/거나, 인트라바디인, 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

다음 단계를 포함하는, 대상체에서 칸디다(*Candida*) 감염을 검출하는 시험관내 방법:

(a) 상기 대상체로부터 단리된 샘플을 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 샘플 중의 칸디다 항원에 대한 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합에 의해 상기 샘플 중의 칸디다를 검출하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 샘플이 체액, 혈액, 가래, 눈물, 타액, 점액 또는 혈청, 정액, 자궁경부 또는 질 분비물, 양수, 태반 조직, 소변, 삼출액, 여출액(transudate), 소 조직(tissue scraping) 또는 대변인, 시험관내 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 검출이 ELISA, RIA, 측면 유동 검정법 또는 웨스턴 블롯(Western blot)을 포함하는, 시험관내 방법.

청구항 11

칸디다에 감염된 대상체를 치료하거나, 또는 칸디다에 걸릴 위험이 있는 대상체의 감염 가능성을 감소시키는 방법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 감염 이전 또는 감염 이후에 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 대상체가 임신한 여성, 성적으로 왕성한 여성, 또는 불임 치료를 받고 있는 여성인, 약제학적 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 RNA 또는 DNA 서열 또는 벡터를 사용하는 유전적 전달에 의해 대상체에 전달되는, 약제학적 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 하이브리도마 또는 조작된 세포(engineered cell).

청구항 16

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 백신 제제.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

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

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **우선권 주장**

[0002] 본 출원은 둘 모두 2019년 7월 29일 출원된 미국 가출원 시리얼 번호 62/879,894 및 62/879,912에 대한 우선권의 이익을 주장하고, 두 출원의 전체 내용이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] **배경**

[0004] **1. 본 개시내용의 분야**

[0005] 본 발명은 일반적으로 의학, 감염성 질환, 및 면역학 분야에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 개시내용은 칸디다 종(*Candida spp*)에 결합하는 인간 항체, 및 파종성 칸디다증(disseminated candidiasis)을 앓는 대상체(subject) 치료에서의 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0006] **2. 배경**

[0007] 침습성 진균 감염의 가장 흔한 원인은 칸디다 속의 구성원이다(문헌 [Kim and Sudbery, 2011]). 파종성 칸디다증은 모든 병원내 혈류 감염의 3위를 차지하며, 항진균 요법에도 불구하고, 이환된 개체 중 적어도 40%는 상기 질환으로 사망하며, 임의의 다른 전신 진균증(mycosis)보다 더 많은 사례의 사망의 원인이 된다. 미국에서만 연간 60,000-70,000건의 파종성 칸디다증이 발생하고, 연관된 의료비는 연간 20억-40억 달러인 것으로 추정된다. 인간 병원체인 칸디다 종이 다수 존재하며, 가장 의학적으로 관련된 것은 가장 흔한 종으로 확인된 (~60%) C. 알비칸스(*C. albicans*); C. 글라브라타(*C. glabrata*) (~15-20%); 주로 혈관 카테터를 가진 입원 환자에서 발견되는 C. 파라프실로시스(*C. parapsilosis*) (~10-20%); 대개는 암(백혈병)을 앓는 환자, 및 골수 이식을 받은 환자에서 발견되는 C. 트로피칼리스(*C. tropicalis*) (~6-12%); C. 귈리어몬디(*C. guilliermondi*) (<5%); C. 루시타니아에(*C. lusitaniae*) (<5%); 및 주로 HIV 양성인 환자에서 발견되는 C. 듀블리니엔시스(*C. dubliniensis*)이다.

[0008] 비알비칸스 종에 의해 유발된 감염의 높은 발병률과 항진균제 내성 출현에 대한 우려가 높아지고 있다. 비알비칸스 종 중에서 C. 트로피칼리스 및 C. 파라프실로시스 둘 모두 일반적으로는 아졸에 감수성이지만; C. 트로피칼리스는 C. 알비칸스보다 플루코나졸™에 더 작은 감수성을 띤다. C. 글라브라타는 본질적으로 항진균제, 특히, 플루코나졸™에 대해 더 큰 저항성을 띤다. C. 크루세이(*C. krusei*)는 본질적으로 플루코나졸™에 대해 저항성을 띠고, 상기 종에 의해 유발된 감염은 이전 플루코나졸™ 예방 및 호중구감소증(neutropenia)과 밀접한 연관이 있다(문헌 [Turner and Butler, 2014]). 추가로, 최근에 새롭게 확인된 다중약물 저항성 균주인 C. 아우리스(*C. auris*)의 보고된 감염 발병률이 빠른 속도로 증가하고 있는 것으로 보인다(문헌 [Chowdhary et al., 2013]). 특히, 고형 장기 이식 후의 침습성 진균증 또한 이식 타입에 따라 발병률이 최대 40%, 및 이환율과 사망률은 장기 및 진균 타입에 따라 25% 내지 95% 로 심각한 문제가 된다(문헌 [Low and Rotstein, 2011]).

[0009] 파종성 칸디다증과 연관된 높은 사망률과 의료 시스템에 대한 상당한 부담을 감안할 때, 현행 항진균 요법을 보충하거나, 또는 대체하기 위한 새로운 접근법이 요구된다. 한 가지 접근법은 칸디다 감염을 치료하거나, 또는 예방하기 위해 항체를 사용하는 것이다. 이러한 가능성은 C. 알비칸스에 대한 항체가 파종성 칸디다증에 대한

숙주 방어에 기여한다는 것을 보여주는 여러 일련의 증거: B 세포가 고갈된 마우스는 칸디다에 대해 증가된 감수성을 나타내고, 면역글로불린(IVIG) 요법은 간 이식에서 칸디다증의 더 낮은 발병률과 연관이 있다는 증거에 의해 뒷받침된다(문헌 [Casadevall *et al.*, 2002]).

[0010] 에푼구맙(Efungumab)(마이코그랩(Mycograb)™)으로 명명되는 인간 재조합 단일 쇄 항체 단편(SCFV)은 파종성 칸디다증용 면역치료제로 개발되고 있다(문헌 [Karwa and Wargo, 2009]). 상기 SCFV는 칸디다로부터의 열 충격 단백질 HSP70에 결합하고, 암포테리신(암포테리신) B의 효과를 증가시켰다. 상기 약물은 제조상의 문제로 인해 규제 승인이 두번 거부되었으며, 유리 시스틴 잔기가 제거한 변형된 버전이 시험되었다. 암포테리신 B 활성 증진이 검출되었지만, 비특이적인 것으로 밝혀졌다(문헌 [Richie *et al.*, 2012]). 에푼구맙의 추가 개발은 중단되었다. 더욱 최근에, 칸디다 세포벽 단백질인 Hyr1 및 다른 미확인 세포벽 단백질에 대한 여러 인간 모노클로날 항체가 단리 및 설명되었다(문헌 [Rudkin et al., 2018]). 이러한 항체는 파종성 칸디다증의 마우스 모델에서 수동 전달 후에 보호하지만, 옵소닌화에 의해 작용하고, C. 알비칸스의 식세포 작용을 증진시킨다. 이러한 작용 모드는 대식세포 또는 호중구 기능이 손상되어 있을 수 있고, 추가로, C. 알비칸스가 Pra1의 작용을 통해 C. 알비칸스의 보체 매개 부착 및 흡수를 감소시키는 기전을 갖고 있는 경우에는 면역억제된 또는 면역손상된 환자에서 치료제로서 상기 항체를 사용하는 데 있어 단점이 될 수 있다(문헌 [Luo *et al.*, 2010]).

[0011] 항체의 역할에 대한 추가 증거는 칸디다 감염으로부터 보호하기 위한 글리코펩티드 기반 백신의 개발 연구에서 비롯된 것이다. 예를 들어, C. 알비칸스 세포벽 단백질에서 발견되는 6개의 추정 T-세포 펩티드를 보호성 β-1,2-만노트리오스 [β-(Man)$_3$] 글리칸 에피토프에 접합시켜 글리코펩티드 접합체를 생성하였다(문헌 [Xin *et al.*, 2008]). 괄호 안에 표시된 펩티드의 유래 기점이 된 6개의 단백질은 4개의 다른 단백질에 추가로 프럭토스-비스포스페이트 알돌라제(Fba)(YGKDVKDLDYAQE; 서열 번호: 40); 메틸테트라히드로프테로일트리글루타메이트 호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(MET6)(PRIGGQRELKKITE; 서열 번호: 38)를 포함하는 세포벽 연관 단백질이다(문헌 [Xin et al., 2008]). 상기 연구의 의도는 펩티드를 T-세포 에피토프로 사용하여 글리코펩티드 접합체의 글리칸 부분에 대한 보호 항체 반응을 촉진시키는 것이었다. 따라서, 면역화 프로토콜은 세포 매개 면역(CMI) 반응보다 항체를 선호하도록 디자인되었고, 항체는 다양한 접합체의 글리칸 및 펩티드 부분, 둘 모두에 대한 것으로 생성되었다. β-(Man)$_3$-Fba 및 β-(Man)$_3$-Meth 접합체를 비롯한 당접합체들 중 3개는 마우스 생존 및 낮은 신장 곰팡이 부담으로 입증된 바와 같이 진균에 의한 혈행성 챌린지로부터의 보호를 유도하였다. 추가로, Fba 및 Met6 펩티드에 대해 생성된 마우스 모노클로날 항체 또한 단독으로 수동 전달 후 마우스를 보호하였다(문헌 [Xin *et al.*, 2008]).

[0012] 문라이팅(moonlighting) 단백질 프럭토스-비스포스페이트 알돌라제(Fba) 및 5-메틸테트라히드로프테로일트리글루타메이트 호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(Met6)를 비롯한(문헌 [Gancedo *et al.*, 2016]; [Medrano-Diaz, *et al.*, 2018]), 다수의 칸디다 단백질은 병원성 인자(문헌 [Mayer, Wilson, and Hube, 2014])인 것으로 확인되었다. 상기 대사 효소는 보통 세포내에 위치하지만, 알려지지 않은 기전에 의해서도 또한 분비되어 진균 세포벽에 결합하여 병독성 인자로서의 역할을 한다. 문라이팅 단백질은 플라스미노겐, 피브로넥틴, 세포외 기질 단백질 또는 보체 고정 억제제의 결합을 비롯한 다양한 기전을 통해 병독성 인자로서 작용하거나, 숙주 세포에 결합하는 부착 분자로서의 역할을 하여 염증 반응을 동원한다. 따라서, 상기 병독성 인자는 병원성 칸디다 종이 숙주 방어 기전을 침입하고, 회피할 수 있는 능력을 허용한다(문헌 [Henderson and Martin, 2011]).

[0013] 미국 특허 6,309,642, 6,391,587, 및 6,403,090 및 미국 특허 출원 공개 U.S. 2003/0072775에는 포스포만나 에피토프 또는 펩티드 미모토프를 코딩(encoding)하는 폴리뉴클레오티드를 모방하는 펩티드에 기초한 백신을 개시되어 있고, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 감염에 대한 수동 면역화를 위한, MAb B6.1을 비롯한 마우스 모노클로날 항체이 개시되어 있다.

발명의 내용

[0014] **요약**

[0015] 따라서, 본 발명에 따라, 대상체에서 칸디다 감염을 검출하는 방법을 제공한다. 실시양태에서, 본 방법은 (a) 상기 대상체로부터의 샘플을, 각각 표 3 및 4로부터의 클론-쌍형성한(clone-paired) 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 단계; (b) 상기 샘플 중의 한 칸디다 항원, 또는 이의 조합에 대한 상기 항체 또는 항체 단편의 결합에 의해 상기 샘플 중의 칸디다를 검출하는 단계를 포함한다. 샘플은 혈액, 가래, 눈물, 타액, 점액 또는 혈청, 정액, 자궁경부 또는 질 분비물, 양수, 태반 조직, 소변, 삼출액, 여출액(transudate), 소파 조직(tissue scraping) 또는 대변일 수 있다. 검출은 ELISA, RIA, 측면 유동 분석 또는 웨

스턴 블롯(Western blot)을 포함할 수 있다. 본 방법은 단계 (a) 및 (b)를 두 번째로 수행하고, 제1 검정법과 비교하여 칸디다 항원 수준의 변화를 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 칸디다는 C. 알비칸스, C. 글라브라타, C. 트로피칼리스 또는 C. 아우리스를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 병원성 칸디다 종일 수 있다.

[0016] 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열 중 임의의 것에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성(identity)을 갖는 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩된다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함한다. 항체 또는 항체 단편은 표 2에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 70%, 약 80% 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 단편은 재조합 scFv (단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다.

[0017] 또 다른 실시양태에서, 칸디다로 감염된 대상체, 또는 칸디다에 걸릴 위험이 있는 대상체에게 각각 표 3 및 4로부터의 클론-쌍형성한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편을 전달하는 단계를 포함하는, 칸디다로 감염된 대상체를 치료하거나, 또는 칸디다에 걸릴 위험이 있는 대상체의 감염 가능성을 감소시키는 방법을 제공한다. 항체 또는 항체 단편은 표 3 및 4에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 클론-쌍형성한 CDR을 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 3 및 4로부터의 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 동일한 클론-쌍형성한 CDR을 갖는다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩된다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함한다. 항체 또는 항체 단편은 표 2에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 70%, 약 80% 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 칸디다는 C. 알비칸스, C. 글라브라타, C. 트로피칼리스 또는 C. 아우리스를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 병원성 칸디다 종일 수 있다.

[0018] 항체 단편은 재조합 scFv (단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 또는 이중특이적(bispecific) 항체일 수 있다. 항체는 예컨대, LALA, N297, GASD/ALIE, YTE 또는 LS 돌연변이와 같이, FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키고/거나, 반감기를 증가시키고/거나, 치료 효능을 증가시키도록 돌연변이화된 Fc 부분, 또는 예컨대, 글리칸의 효소적 또는 화학적 부가 또는 제거, 또는 정의된 글리코실화 패턴으로 조작된(engineered) 세포주에서의 발현과 같은 FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키도록 변형된 글리칸을 포함하는 IgG, 또는 재조합 IgG 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 세포 투과 펩티드(cell penetrating peptide)를 추가로 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 인트라바디(intrabody)일 수 있다.

[0019] 항체 또는 항체 단편은 감염 이전 또는 감염 이후에 투여될 수 있다. 대상체는 임신한 여성, 성적으로 왕성한 여성, 또는 불임 치료를 받고 있는 여성일 수 있다. 전달은 항체 또는 항체 단편 투여, 또는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 RNA 또는 DNA 서열 또는 벡터를 사용하는 유전적 전달을 포함할 수 있다.

[0020] 추가의 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편이 각각 표 3 및 4로부터의 클론-쌍형성한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 특징으로 하는 것인 모노클로날 항체를 제공한다. 항체 또는 항체 단편은 표 3 및 4에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 클론-쌍형성한 CDR을 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 3

및 4로부터의 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 동일한 클론-쌍형성한 CDR을 갖는다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩된다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함한다. 항체 또는 항체 단편은 표 2에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 70%, 약 80% 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 칸디다는 C. 알비칸스, C. 글라브라타, C. 트로피칼리스 또는 C. 아우리스를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 병원성 칸디다 종일 수 있다.

[0021] 항체 단편은 재조합 scFv (단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 또는 이중특이적 항체일 수 있다. 항체는 예컨대, LALA, N297, GASD/ALIE, YTE 또는 LS 돌연변이와 같이, FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키고/거나, 반감기를 증가시키고/거나, 치료 효능을 증가시키도록 돌연변이화된 Fc 부분, 또는 예컨대, 글리칸의 효소적 또는 화학적 부가 또는 제거, 또는 정의된 글리코실화 패턴으로 조작된 세포주에서의 발현과 같은 FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키도록 변형된 글리칸을 포함하는 IgG, 또는 재조합 IgG 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 세포 투과 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 인트라바디일 수 있다.

[0022] 또한 추가의 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편이 각각 표 3 및 4로부터의 클론-쌍형성한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 특징으로 하는 것인 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 하이브리도마 또는 조작된 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 3 및 4로부터의 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 동일한 클론-쌍형성한 CDR을 갖는다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩된다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 70%, 약 80% 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다.

[0023] 항체 단편은 재조합 scFv (단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 또는 이중특이적 항체일 수 있다. 항체는 예컨대, LALA, N297, GASD/ALIE, YTE 또는 LS 돌연변이와 같이, FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키고/거나, 반감기를 증가시키고/거나, 치료 효능을 증가시키도록 돌연변이화된 Fc 부분, 또는 예컨대, 글리칸의 효소적 또는 화학적 부가 또는 제거, 또는 정의된 글리코실화 패턴으로 조작된 세포주에서의 발현과 같은 FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키도록 변형된 글리칸을 포함하는 IgG, 또는 재조합 IgG 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 세포 투과 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 인트라바디일 수 있다.

[0024] 추가 실시양태에서, 각각 표 3 및 4로부터의 클론-쌍형성한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열 을 특징으로 하는 하나 이상의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 백신 제제를 제공한다. 항체 또는 항체 단편은 표 3 및 4에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 클론-쌍형성한 CDR을 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 3 및 4로부터의 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 동일한 클론-쌍형성한 CDR을 갖는다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩된다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한

서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 70%, 약 80% 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다.

[0025] 항체 단편은 재조합 scFv (단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 또는 이중특이적 항체일 수 있다. 항체는 예컨대, LALA, N297, GASD/ALIE, YTE 또는 LS 돌연변이와 같이, FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키고/거나, 반감기를 증가시키고/거나, 치료 효능을 증가시키도록 돌연변이화된 Fc 부분, 또는 예컨대, 글리칸의 효소적 또는 화학적 부가 또는 제거, 또는 정의된 글리코실화 패턴으로 조작된 세포주에서의 발현과 같은 FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키도록 변형된 글리칸을 포함하는 IgG, 또는 재조합 IgG 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 세포 투과 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 인트라바디일 수 있다.

[0026] 추가의 또 다른 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 1차 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 하나 이상의 발현 벡터를 포함하는 백신 제제를 제공한다. 발현 벡터(들)는 신드비스 바이러스(Sindbis virus) 또는 VEE 벡터(들)일 수 있다. 백신은 바늘 주입, 제트 주입 또는 전기천공에 의한 전달용으로 제제화될 수 있다. 백신은 본원에 기술된 바와 같은 별개의 항체 또는 항체 단편과 같은 제2 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 하나 이상의 발현 벡터를 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 또한 추가 실시양태는 칸디다로 감염되거나, 또는 칸디다 감염의 위험이 있는 임신한 대상체에게 각각 표 3 및 4로부터의 클론-쌍형성한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편을 전달하는 단계를 포함하는, 칸디다로 감염되거나, 또는 칸디다 감염의 위험이 있는 임신한 대상체의 태반 및/또는 태아의 건강을 보호하는 방법을 포함한다. 항체 또는 항체 단편은 표 3 및 4에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 클론-쌍형성한 CDR을 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 3 및 4로부터의 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 동일한 클론-쌍형성한 CDR을 갖는다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩된다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 70%, 약 80% 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 칸디다는 C. 알비칸스, C. 글라브라타, C. 트로피칼리스 또는 C. 아우리스를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 병원성 칸디다 종일 수 있다.

[0028] 항체 단편은 재조합 scFv (단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 또는 이중특이적 항체일 수 있다. 항체는 예컨대, LALA, N297, GASD/ALIE, YTE 또는 LS 돌연변이와 같이, FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키고/거나, 반감기를 증가시키고/거나, 치료 효능을 증가시키도록 돌연변이화된 Fc 부분, 또는 예컨대, 글리칸의 효소적 또는 화학적 부가 또는 제거, 또는 정의된 글리코실화 패턴으로 조작된 세포주에서의 발현과 같은 FcR 상호작용을 변경(제거 또는 증진)시키도록 변형된 글리칸을 포함하는 IgG, 또는 재조합 IgG 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 세포 투과 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 인트라바디일 수 있다.

[0029] 항체 또는 항체 단편은 감염 이전 또는 감염 이후에 투여될 수 있다. 대상체는 임신한 여성, 성적으로 왕성한 여성, 또는 불임 치료를 받고 있는 여성일 수 있다. 전달은 항체 또는 항체 단편 투여, 또는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 RNA 또는 DNA 서열 또는 벡터를 사용하는 유전적 전달을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 비처리 대조군과 비교하여 태반 크기를 증가시킬 수 있거나, 또는 비처리 대조군과 비교하여 태아의 진균 부하

(fungal load) 및/또는 병리를 감소시킬 수 있다.

[0030] 또 다른 실시양태는 (a) 칸디다 항원을 포함하는 샘플을 각각 표 3 및 4로부터의 클론-쌍형성한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 1차 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 항원에 대한 상기 1차 항체 또는 항체 단편의 검출가능한 결합에 의해 상기 항원의 항원 완전성(antigenic integrity), 정확한 형태 및/또는 정확한 서열을 결정하는 단계를 포함하는, 칸디다 항원의 항원 완전성, 정확한 형태 및/또는 정확한 서열을 결정하는 방법을 포함한다. 샘플은 재조합적으로 생산된 항원, 또는 백신 제제 또는 백신 생산 배치(batch)를 포함할 수 있다. 검출은 ELISA, RIA, 웨스턴 블롯, 표면 플라즈몬 공명 또는 생물층 간섭법을 사용하는 바이오센서, 또는 유세포 분석 염색(flow cytometric staining)을 포함할 수 있다. 상기 방법은 시간 경과에 따른 항원의 항원 안정성을 결정하기 위해 단계 (a) 및 (b)를 두 번째로 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 칸디다는 C. 알비칸스, C. 글라브라타, C. 트로피칼리스 또는 C. 아우리스를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 병원성 칸디다 종일 수 있다.

[0031] 1차 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩된다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 70%, 약 80% 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 1차 항체 단편은 재조합 scFv (단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다.

[0032] 본 방법은 (c) 상기 항원을 포함하는 샘플을 각각 표 3 및 4로부터의 클론-쌍형성한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 제2 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 단계; 및 (d) 상기 항원에 대한 상기 제2 항체 또는 항체 단편의 검출가능한 결합에 의해 상기 항원의 항원 완전성을 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 검출은 ELISA, RIA, 웨스턴 블롯, 표면 플라즈몬 공명 또는 생물층 간섭법을 사용하는 바이오센서, 또는 유세포 분석 염색을 포함할 수 있다. 상기 방법은 시간 경과에 따른 항원의 항원 안정성을 결정하기 위해 단계 (c) 및 (d)를 두 번째로 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 제2 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 가변 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩된다. 항체 또는 항체 단편은 표 1에 기재된 바와 같은 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 가변 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 70%, 약 80% 또는 약 90%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열과 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 표 2로부터의 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 제2 항체 단편은 재조합 scFv (단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다.

[0034] 추가로, 항체 또는 항체 단편이 클론-쌍형성한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 포함하고, 여기서, 중쇄 CDR 서열은 표 3으로부터 선택되고, 여기서, 경쇄 CDR 서열은 표 4로부터 선택되고, 여기서, 항체 또는 이의 단편은 도 10, 도 11, 도 12, 및 도 13으로 구성된 군으로부터 선택되는 리본 다이어그램에 도시된 적색 또는 오렌지색 리본으로부터의 적어도 5개의 아미노산을 포함하는 이의 VL 및/또는 VH 파라토프를 통해 이의 동족 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 모노클로날 항체 또는 이의 단편을 제공한다.

[0035] 항체 또는 항체 단편은 표 1로부터 선택되는 클론-쌍형성한 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있거나, 표 1로부터 선택되는 클론-쌍형성한 서열과 적어도 70%, 80%, 또는 90%의 동일성을

갖는 경쇄 및 중쇄 가변 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있거나, 또는 표 1로부터 선택되는 클론-쌍형성한 서열과 적어도 95%의 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표 2의 클론-쌍형성한 서열로부터 경쇄 가변 서열 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 표 2로부터 선택되는 클론-쌍형성한 서열과 적어도 70%, 80% 또는 90%의 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 표 2로부터 선택되는 클론-쌍형성한 서열과 95%의 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다.

[0036] 항체 단편은 재조합 scFv (단일 쇄 단편 가변) 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 또는 이중특이적 항체일 수 있다. 항체는 돌연변이화된 Fc 부분을 포함하는 IgG, 또는 재조합 IgG 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 돌연변이화된 Fc 부분은 FcR 상호작용을 변경, 제거 또는 증진시킬 수 있거나; 반감기를 증가시킬 수 있거나; 치료 효능을 증가시킬 수 있거나; 또는 이의 조합일 수 있다. 돌연변이화된 Fc 부분은 LALA 돌연변이, N297 돌연변이, GASD/ALIE 돌연변이, YTE 돌연변이, 또는 LS 돌연변이를 포함할 수 있다. 돌연변이화된 Fc 부분은 글리칸 변형될 수 있다. 글리칸 변형은 FcR 상호작용을 변경, 제거 또는 증진시킬 수 있다. 글리칸 변형은 글리칸의 효소적 또는 화학적 부가 또는 제거 또는 정의된 글리코실화 패턴으로 조작된 세포주에서의 발현을 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 세포 투과 펩티드를 추가로 포함할 수 있고/거나, 인트라바디이다.

[0037] 청구범위 및/또는 명세서에서 "포함하는"이라는 용어와 함께 사용될 때 ㅎ'나"("a" 또는 "an")라는 단어의 사용은 "하나"를 의미할 수 있지만, "하나 이상의," "적어도 하나," 및 "하나 이상"이라는 의미와 일치한다. "약"이라는 단어는 본원에서 대략, 거의, 약(around) 또는 약(in the region of)을 의미하는 것으로 사용된다. "약"이라는 용어가 수치 범위와 함께 사용되는 경우, 명시된 수치 값의 위 및 아래 경계를 확장하여 해당 범위를 수정한다. "약"이라는 용어는 명시된 숫치의 플러스 또는 마이너스 5%를 의미할 수 있다.

[0038] 본원에 기술된 된 임의의 방법 또는 조성물은 본원에 기술된 임의의 다른 방법 또는 조성물과 관련하여 구현될 수 있다. 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 하기의 상세한 설명으로부터 자명해질 것이다. 그러나, 본 개시내용의 정신 및 범주 내에서의 다양한 변경 및 변형이 본 상세한 설명으로부터 당업자에게 자명해질 수 있는 바, 상세한 설명 및 구체적인 예는 본 개시내용의 구체적인 실시양태를 나타내면서, 단지 예시로 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0039] **도면의 간단한 설명**

특허 또는 출원 파일은 컬러로 실행된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)을 포함하는 본 특허 또는 특허 출원 공개의 사본은 요청 및 필요한 수수료 납부시에 특허청에 의해 제공될 것이다.

하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 발명의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 개시내용은 본원에 제시된 구체적인 실시양태의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다.

도 1은 펩티드 Fba (서열 번호: 40), 또는 Met6 (서열 번호: 38), 또는 10명의 상이한 인간 기증자로부터의 혈청 샘플 (L70.S, L10.S, L56.S, C22-1, C06-1, C07-3, C14-2, L57.S, C-14-1, S-079)에 대한 완충제로 코팅된 웰에 결합하는 항체의 ELISA 데이터를 보여주는 것이다. 양성 대조군은 1.10C (항-Met6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13) 및 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)를 포함하였다.

도 2는 MET6 펩티드와 1.10C의 반응 및 결합 친화도를 측정하기 위한 억제제로서 합성 MET6 펩티드 (서열 번호: 38)를 사용한, 항체 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13)에 대한 ELISA 억제 데이터를 보여주는 것이다. 각 점은 3개의 측정의 평균이며, 제시된 데이터는 4회의 독립 실험 중 전형적인 실험으로부터의 것이다.

도 3은 Fba 펩티드와 1.11D의 반응 및 결합 친화도를 측정하기 위한 억제제로서 합성 Fba 펩티드 (서열 번호: 40)를 사용한, 항체 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)에 대한 ELISA 억제 데이터를 보여주는 것이다. 각 점은 3개의 측정의 평균이며, 제시된 데이터는 4회의 독립 실험 중 전형적인 실험으로부터의 것이다.

도 4는 생물층 간섭법에 의해 측정된, 항체 1.10C (우측 패널) 및 1.11D (좌측 패널)의 이의 동족 비오티닐화된 펩티드 (MET6-비오틴, 서열 번호: 39; Fba-비오틴, 서열 번호: 41)에 대한 결합에 대한 동역학적 친화도 상수의 측정을 보여주는 것이다.

도 5는 생물층 간섭법에 의해 측정된, 항체 1.10C (우측 패널) 및 1.11D (좌측 패널)의 이의 동족 비오티닐화된 펩티드 (MET6-비오틴, 서열 번호: 39; Fba-비오틴, 서열 번호: 41)에 대한 결합에 대한 정상-상태 친화도 상수의 측정을 보여주는 것이다.

도 6은 생물층 간섭법을 이용하여, 항체 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)가 C. 알비칸스 (상단) 및 C. 아우리스 (하단), 둘 모두로부터의 전장의 재조합 Fba 단백질에 특이적으로 결합한다는 것을 입증하는 것이다. 항체 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13)는 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 7은 생물층 간섭법을 이용하여, 항체 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13)가 C. 알비칸스, 둘 모두로부터의 전장의 재조합 MET6 단백질에 특이적으로 결합한다는 것을 입증하는 것이다. 항체 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)는 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 8은 MAb 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13) 및 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)의 수동 전달에 의한 전달이 C. 알비칸스에 의한 사망으로부터의 보호를 부여한다는 것을 입증하는 것이다. 치사량의 C. 알비칸스 3153A 세포에 의한 혈행성 챌린지 4시간 전에 C57B/L6 마우스에 항체를 단독으로 또는 조합하여 i.p. 투약으로 제공하였다. 플루코나졸™ (FLC)을 양성 대조군으로서 사용하였고, 포스페이트 완충처리된 염수 (DPBS)를 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 9는 MAb 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13) 및 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)를 포함하는 칵테일의 수동 전달에 의한 전달이 C. 아우리스에 의한 사망으로부터의 보호를 부여한다는 것을 입증하는 것이다. 치사량의 C. 아우리스 세포에 의한 혈행성 챌린지 4시간 전에 A/J 마우스에 항체를 단독으로 또는 조합하여 i.p. 투약으로 제공하였다. 플루코나졸™ (FLC)을 양성 대조군으로서 사용하였고, 포스페이트 완충처리된 염수 (DPBS)를 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 10-11. Met6 항체 2B10에 대한 항체 모델링.

도 12-13. Fba 항체 2B10에 대한 항체 모델링.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] **예시적인 실시양태의 설명**

[0041] 상기 논의된 바와 같이, 본 개시내용은 칸디다에 결합하고, 이를 중화시키는 항체 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0042] 본 개시내용의 이들 및 다른 측면은 하기에서 상세하게 설명된다.

[0043] 본원에서 하나 이상의 바람직한 실시양태의 상세한 설명을 제공한다. 그러나, 본 발명은 다양한 형태로 구현될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 그러므로, 본원에 개시된 구체적인 세부사항은 제한하는 것으로 해석되지 않아야 하며, 오히려 청구범위에 대한 기초로서 및 당업자가 임의의 적절한 방식으로 본 발명을 사용하도록 교시하기 위한 대표적인 기초로서 해석되어야 한다.

[0044] 단수 형태 "하나"("a," "an") 및 "그"는 문맥상 달리 명백하기 명시되지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다.

[0045] "예를 들어," "예컨대," "비롯한"이라는 어구 등 중 임의의 것이 본원에서 사용되는 경우에는 언제든, 달리 명확하게 언급되지 않는 한, "및 제한 없이"라는 어구가 뒤따르는 것으로 이해된다. 유사하게, "예," "예시적인" 등은 비제한적인 것으로 이해된다.

[0046] "실질적으로"라는 용어는 의도된 목적에 부정적인 영향을 미치지 않는 기술어로부터의 편차를 허용한다. 기술용어는 "실질적으로"라는 단어가 명확하게 언급되지 않더라도, "실질적으로"라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해된다.

[0047] "포함하는(comprising)" 및 "포함하는(including)" 및 "가지는" 및 "포함하는(involving)" (및 유사하게, "포함하다(comprises)," "포함하다(includes)," "갖는다" 및 "포함하다(involves)") 등의 용어는 상호교환적으로 사용되고, 동일한 의미를 갖는다. 구체적으로, 각 용어는 "포함하는"에 대한 일반적인 미국 특허법 정의와 일관되게 정의되는 바, 따라서, "적어도 하기"를 의미하는 개방 용어로 해석되며, 이는 또한 추가 특징, 제한, 측면 등을 배제하는 것으로 해석되지 않는다. 따라서, 예를 들어 "단계 a, b 및 c를 포함하는 프로세스"는 프로세스가 적어도 단계 a, b 및 c를 포함한다는 것을 의미한다. "하나"("a" 또는 "an")라는 용어가 사용되는 경우에는

언제든, 해석이 문맥상 무의미하지 않는 한, "하나 이상"인 것으로 이해된다.

[0048] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바, "대상체," "개체," 또는 "환자"는 척추동물, 바람직하게, 포유동물, 더욱 바람직하게, 인간을 지칭할 수 있다. 특정 실시양태에서, "대상체," 개체," 또는 "환자"는 파충류를 지칭한다. 포유동물은 뮤린, 유인원, 인간, 농장 동물, 운동경기용 동물, 및 애완동물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. "애완동물"이라는 용어는 개, 고양이, 기니아 피그, 마우스, 래트, 토끼, 흰 족제비, 뱀, 거북이, 도마뱀, 새 등을 포함한다. 농장 동물이라는 용어는 말, 양, 염소, 닭, 돼지, 소, 당나귀, 라마, 알파카, 칠면조 등을 포함한다.

[0049] "샘플" 또는 "생물학적 샘플"이라는 용어는 대상체로부터 단리된 조직, 세포 및 생물학적 유체 뿐만 아니라, 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 체액을 지칭할 수 있다. 따라서, 혈액, 및 혈청, 혈장 또는 림프를 비롯한 혈액의 분획 또는 성분이 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"이라는 용어의 사용에 포함된다. "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 가래, 눈물, 타액, 점액 또는 혈청, 정액, 자궁경부 또는 질 분비물, 양수, 태반 조직, 소변, 삼출액, 여출액, 소파 조직, 또는 대변을 추가로 포함할 수 있다.

[0050] **I.칸디다 및 칸디다증**

[0051] **A. 칸디다 종.**

[0052] 칸디다는 효모 속이며, 전 세계적으로 진균 감염의 가장 흔한 원인이다. 많은 종은 인간을 비롯한 숙주의 무해한 공생체 또는 내공생체이지만; 점막 장벽이 파괴되거나, 면계가 손상되면, 이는 침입하여 기회 감염으로 알려진 질환을 유발할 수 있다. 칸디다 알비칸스는 가장 흔한 단리된 종이며, 인간 및 다른 동물에서 감염 (칸디다증 또는 아구창(thrush))을 유발할 수 있다. 포도주 양조에서, 일부 칸디다 종은 포도주를 망칠 수 있다.

[0053] 많은 종은 포유동물 숙주의 C. 알비칸스를 비롯한 장내 플로라에서 발견되는 반면, 다른 종은 곤충 숙주에서 내공생체로 산다. 특히, 면역계가 손상된 환자 (면역손상)에서의 혈류 및 주요 기관의 전신 감염 (칸디다혈증 (candidemia) 또는 침습성 칸디다증)은 미국에서 연간 90,000명 이상의 사람들에서 발생한다.

[0054] 항생제는 위장 (GI) 칸디다 과다증식 및 GI 점막 침투를 비롯한 효모 (진균) 감염을 촉진시킨다. 여성이 생식기 효모 감염에 더 취약하지만, 남성 또한 감염될 수 있다. 예컨대, 장기간의 항생제 사용과 같은 특정 인자는 남성 및 여성, 둘 모두에서 위험을 증가시킨다. 당뇨병을 앓거나, 면역손상된 사람, 예컨대, HIV에 감염된 사람이 효모 감염에 더 취약하다.

[0055] 실험실에서의 성장시, 칸디다는 크고, 둥근 흰색 또는 크림색 콜로니로 나타나며, 실온에서 아가 플레이트에서 효모 냄새를 방출한다. C. 알비칸스는 포도당 및 말토스를 산 및 가스로, 수크로스를 산으로 발효시키며, 락토스는 발효하지 않는데, 이는 다른 칸디다 종과 구별하는 데 도움이 된다.

[0056] 최근의 분자 계통 발생 연구에 따르면 칸디다 속은 매우 다계통 발생적이다 (자연군을 형성하지 않는 먼 관련이 있는 종 포함). 저렴한 비용의 분자적 방법이 도래하기 전, 감염된 환자로부터 단리된 효모는 다른 칸디다 종과의 관계에 대한 명확한 증거 없이 종종 칸디다라고 불렸다. 예를 들어, 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 귈리어몬디(*Candida guilliermondii*) 및 칸디다 루시타니아(*Candida lusitaniae*)에는 분명히 잘못 분류되었으며, 일단 계통 발생학적 재조직화가 완료되고 나면, 다른 속에 배치될 것이다.

[0057] 일부 칸디다 종은 이의 핵 유전자를 폴리펩티드의 아미노산 서열로 번역할 때 비표준 유전자 코드를 사용한다. 상기 대체 코드를 가진 종 간의 유전자 코드의 차이는 코돈 CUG (일반적으로 아미노산 류신을 코딩)가 효모에 의해 다른 아미노산인 세린으로 번역된다는 것이다. 상기 종에서 CUG 코돈의 대체 번역은 안티코돈에 대하여 5'에 33번 위치에 위치하는 구아노신을 갖는 세린-tRNA (ser-tRNACAG)의 핵산 서열 때문이다. 다른 모든 tRNA에서 이 위치는 일반적으로 피리미딘 (종종 우리딘)이 점유한다. 이러한 유전자 코드 변화는 원핵생물과 진핵생물, 둘 모두에서 센스 코돈의 재배치를 비롯한, 세포질 mRNA의 유일하게 알려진 변경이다. 이 유전자 코드는 유기체의 환경에 보다 빠르게 적응하는 기전이 될 수 있을 뿐만 아니라, 종분화를 조장하는 유전적 장벽을 생성함으로써 칸디다 속의 진화에서 중요한 역할을 한다.

[0058] 칸디다는 건강한 성인 피부에서 적은 수로 거의 보편적이며, C. 알비칸스는 호흡기, 위장관 및 여성 생식기 점막의 정상 플로라의 일부이다. 다른 조직에 비해 피부가 건조하면 진균의 증식을 억제하지만, 손상된 피부나 인접 부위의 피부는 빠르게 성장하기 더 쉽다.

[0059] C. 알비칸스를 비롯한 여러 종의 과다증식은 예컨대, 구강인두 칸디다증 (아구창) 또는 외음부질 칸디다증 (질 칸디다증) 및 귀두염(balanitis)을 유발할 수 있는 포피하 칸디다증과 같은 표재성 감염부터 예컨대, 진균혈증

및 침습성 칸디다증과 같은 전신 감염에 이르는 감염을 유발할 수 있다. 구강 칸디다증은 노인 의치 착용자에서는 흔한 것이다. 다른 건강한 개체에서, 상기 감염은 국소 또는 전신 항진균제 (일반적으로 미코나졸 또는 클로트리마졸과 같은 통상의 일반 의약품(over-the-counter) 항진균제 치료)로 치유될 있다. 쇠약하거나, 또는 면역손상된 환자에서, 또는 정맥내로 (혈류로) 도입된 경우, 칸디다증은 농양, 혈전정맥염(thrombophlebitis), 심내막염 또는 눈 또는 다른 기관의 감염을 일으키는 전신 질환이 될 수 있다. 전형적으로, 상대적으로 중증인 호중구감소증 (낮은 호중구)은 칸디다가 피부 방어를 통과하여 더 깊은 심부 조직에 질환을 일으키는 것이 전제 조건이 되며; 그러한 경우, 감염된 피부 부위의 기계적 파괴는 전형적으로 더 깊은 심부 조직의 진균 침입의 한 요인이 된다.

[0060] 칸디다 종 중 피부 및 위장관 및 비뇨생식관의 공생체인 인간 플로라의 정상적인 구성 요소인 C. 알비칸스는 대부분의 칸디다 혈류 감염 (칸디다혈증)의 원인이 된다. 그러나 C. 글라브라타 및 C. 루고사(*C. rugosa*)에 의해 유발되는 감염 발병률이 증가하고 있는데, 이는 빈번하게는 현재 사용되는 아졸 그룹의 항진균제에 대한 감수성이 더 작기 때문일 수 있다. 다른 의학적으로 중요한 종으로는 C. 파라프실로시스, C. 트로피칼리스, C. 아우리스 및 C. 듀블리니엔시스를 포함한다. 예컨대, C. 올레오필라(*C. oleophila*)와 같은 칸디다 종은 과일의 생물학적 방제제로 사용되었다.

[0061] **B. 칸디다증**

[0062] 칸디다증은 임의 타입의 칸디다 (효모 타입)로 인한 진균 감염이다. 구강이 이환된 경우, 이는 일반적으로 아구창으로 불린다. 징후 및 증상으로는 혀 또는 구강 및 인후의 다른 부위에 흰색 반점을 포함한다. 다른 증상으로는 쓰림 및 연하 곤란을 포함할 수 있다. 질이 이환된 경우, 이는 일반적으로 효모 감염으로 불린다. 징후 및 증상으로는 생식기 가려움증, 작열감, 때로는 질로부터의 흰색 "커터지 치즈 같은(cottage cheese-like)" 분비물을 포함한다. 음경의 효모 감염은 덜 일반적이며, 전형적으로 가려운 발진이 나타난다. 아주 드물게, 효모 감염은 침습성이 되어 신체의 다른 부분으로 퍼질 수 있다. 이는 침범 부분에 따라 다른 증상과 함께 발열을 유발할 수 있다.

[0063] 20가지 초과의 칸디다 타입이 가장 흔한 칸디다 알비칸스 감염을 유발할 수 있다. 구강 감염은 생후 1개월 미만의 아동, 노인 및 면역계가 약한 사람들에게서 가장 흔하게 나타난다. 약한 면역계를 초래하는 병태로는 HIV/AIDS, 장기 이식 후 사용되는 약물, 당뇨병 및 코르티코스테로이드 사용을 포함한다. 다른 위험으로는 의치 및 항생제 요법 후를 포함한다. 질 감염은 임신 중, 면역계가 약한 사람, 항생제 사용 후 더 흔하게 발생한다. 침습성 칸디다증에 걸릴 위험이 있는 개체는 저체중아, 수술에서 회복 중인 사람, 중환자실에 입원한 사람 및 다르게 면역계가 손상된 사람을 포함한다.

[0064] 구강 감염을 예방하기 위한 노력으로는 면역 기능이 약한 사람에서 클로르헥시딘 구강 세척제 사용 및 흡입 스테로이드 사용 후 구강 세척을 포함한다. 심지어 빈번한 질 감염이 있는 사람들 사이에서도 예방 또는 치료를 위한 프로바이오틱스를 뒷받침하는 증거는 거의 없다. 구강 감염의 경우, 국소 클로트리마졸 또는 니스타틴을 사용한 치료가 일반적으로 효과적이다. 이들이 작용하지 않을 경우, 경구 또는 정맥내 플루코나졸, 이트라코나졸, 또는 암포테리신 B가 사용될 수 있다. 클로트리마졸을 비롯한 다수의 국소 항진균제가 질 감염에 사용될 수 있다. 널리 퍼진 질환을 앓는 사람들에서는 예컨대, 카스포펀진 또는 미카펀진과 같은 에키노칸딘이 사용된다. 몇 주 동안의 정맥내 암포테리신 B가 대안으로 사용될 수 있다. 특정의 초고위험군에서는 항진균제가 예방적으로 사용될 수 있다.

[0065] 구강 감염은 생후 1개월 미만의 아기 중 약 6%에서 발생한다. 암으로 화학요법을 받는 사람들 중 약 20% 및 AIDS 환자 중 20% 또한 상기 질환에 걸린다. 여성의 약 3/4이 이의 일생 중 어느 때나 1회 이상 효모 감염을 앓는다. 널리 퍼진 질환은 위험 인자가 있는 사람을 제외하고는 드물다.

[0066] 칸디다증의 징후 및 증상은 이환 부위에 따라 달라진다. 대부분의 칸디다 감염은 예컨대, 발적, 가려움증, 및 가벼운 통증과 같은 최소한의 합병증을 일으키지만, 특정 집단에서 치료하지 않고 방치할 경우, 합병증은 심각하거나, 치명적일 수 있다. 건강한 (면역적격) 사람에서 칸디다증은 일반적으로 피부, 손톱 또는 발톱 (조갑진균증(onychomycosis)), 구강 및 인두 (아구창), 식도 및 생식기 (질, 음경 등)을 포함하는 점막의 국소 감염이고; 건강한 개체에서는 덜 일반적으로 위장관, 요로 및 호흡기가 칸디다 감염 부위이다.

[0067] 면역손상된 개체에서 식도의 칸디다 감염은 건강한 개체보다 더 자주 발생하고, 전신 감염이 될 가능성이 더 높은 바, 칸디다혈증으로 불리는 진균혈증인 훨씬 더 중증인 병태를 유발한다. 식도 칸디다증의 증상으로는 연하곤란, 연하통, 복통, 구역 및 구토를 포함한다.

[0068] 아구창은 일반적으로 유아에서 나타난다. 유아에서는 몇 주 이상 지속되지 않는 한, 비정상으로 간주되지 않는다.

[0069] 질 또는 외음부의 감염은 심한 가려움증, 작열감, 쓰림, 자극 및 희끄무레하거나 희끄무레한 회색의 커터지 치즈 같은 분비물을 유발할 수 있다. 남성 생식기 감염 (귀두염 아구창)의 증상으로는 음경 머리 주위의 붉은 피부, 음경 머리 부분의 부기, 자극, 가려움 및 쓰림, 포피 아래의 두껍고 덩어리진 분비물, 불쾌한 냄새, 포피가 뒤쪽으로 젖혀지지 않는 상태 (포경), 및 소변을 보거나 성관계를 할 때 통증을 포함한다.

[0070] 건강한 개체의 위장관 칸디다증의 일반적인 증상은 항문 가려움증, 트림, 팽만감, 소화 불량, 구역, 설사, 가스, 장 경련, 구토 및 위궤양이다. 항문 주위 칸디다증은 항문 가려움증을 유발할 수 있고; 병변은 외관상 홍반성, 구진성 또는 궤양성일 수 있고, 성병으로 간주되지 않는다. 장에서의 칸디다의 비정상적인 증식이 세균 불균형을 일으킬 수 있다. 아직 명확하지는 않지만, 이러한 변경은 일반적으로 과민성 대장 증후군 및 다른 위장 질환으로 설명되는 증상의 원인일 수 있다.

[0071] 칸디다 효모는 일반적으로 건강한 인간, 흔히 인체의 정상적인 구강 및 장내 플로라의 일부, 및 특히 피부에 존재하지만; 이의 성장은 일반적으로 인간 면역계와 인체의 동일한 위치를 점유하는 박테리아와 같은 다른 미생물의 경쟁에 의해 제한된다. 칸디다는 성장을 위해 특히 피부에 수분을 필요로 한다. 예를 들어, 젖은 수영복을 장기간 착용하는 것이 위험 인자가 되는 것으로 간주된다. 극단적인 경우, 피부 또는 점막의 표재성 감염이 혈류로 들어가 전신 칸디다 감염을 유발할 수 있다.

[0072] 칸디다증의 위험을 증가시키는 요인으로는 HIV/AIDS, 단핵구증(mononucleosis), 암 치료, 스테로이드, 스트레스, 항생제 사용, 당뇨병 및 영양 결핍을 포함한다. 호르몬 대체 요법 및 불임 치료도 소인이 될 수 있다. 항생제 치료는 구강 및 장내 플로라의 자원에 대한 효모의 천연 경쟁자를 제거할 수 있는 바; 이에 병태의 중증도는 증가될 수 있다. 약화되거나, 또는 발달되지 않은 면역계 또는 대사 질환은 칸디다증의 중요한 소인이다. 면역계가 약화된 사람 중 거의 15%에서는 칸디다 종에 의한 전신 질환이 발병한다. 단순 탄수화물이 많이 함유된 식단은 구강 칸디다증의 발병률에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다.

[0073] C. 알비칸스는 건강해 보이는 여성, 즉, 감염 증상을 거의 또는 전혀 경험하지 않은 여성 중 19%의 여성의 질에서 단리되었다. 외부의 세제 또는 질 세척제의 사용 또는 내부 장애 (호르몬 또는 생리학적 장애)는 예컨대, 락토바실리(*lactobacilli*)와 같은 락트산 박테리아로 구성된 정상적인 질 플로라을 교란시킬 수 있고, 칸디다 세포의 과다증식을 초래하여 예컨대, 국소 염증과 같은 감염 증상을 유발할 수 있다. 임신 및 경구 피임약의 사용이 위험 인자인 것으로 보고되었다. 당뇨병 및 항생제의 사용 또한 효모 감염률 증가와 연관이 있다.

[0074] 음경 칸디다증의 원인으로는 감염된 개체와의 성교, 면역력 저하, 항생제, 당뇨병을 포함한다. 남성 생식기 효모 감염은 덜 일반적이지만, 감염된 파트너와의 성교를 통한 직접적인 접촉으로부터 유발된 음경의 효모 감염은 드문 일은 아니다.

[0075] 질 칸디다증의 증상은 더욱 흔한 세균성 질염(bacterial vaginosis)에서도 나타나며; 호기성 질염은 구별되며, 감별 진단에서 제외되어야 한다. 2002년 연구에 따르면, 효모 감염을 자가 치료하는 여성 중 33%만이 실제로 상기 감염을 앓은 반면, 대부분은 세균성 질염 또는 혼합형 감염을 앓았다.

[0076] 효모 감염의 진단은 현미경 검사 또는 배양을 통해 이루어진다. 광학 현미경으로 식별하기 위해 환부의 스크랩핑 또는 스왑을 현미경 슬라이드에 놓는다. 이어서, 10% 수산화칼륨 (KOH) 용액 한 방울을 시료에 첨가한다. KOH는 피부 세포를 용해시키지만, 칸디다 세포는 무손상 상태로 그대로 남겨두는 바, 이를 통해 많은 칸디다 종의 전형적인 가균사와 출아 효모 세포를 시각화할 수 있다.

[0077] 배양 방법의 경우, 멸균 스왑으로 감염된 피부 표면을 문지른다. 이어서, 스왑을 배양 배지에 스트리킹한다. 배양물을 37℃ (98.6° F)에서 며칠 동안 인큐베이션시켜 효모 또는 박테리아 콜로니를 발생시킨다. 콜로니의 특징 (예컨대, 형태 및 색상)을 통해 질환 증상을 유발하는 유기체를 초기 진단할 수 있다.

[0078] 호흡기, 위장관, 식도 칸디다증은 진단을 위해 내시경이 요구된다. 위장관 칸디다증의 경우, 진균 배양을 위해 십이지장에서 3-5 ml의 체액 샘플을 수득하여야 한다. 위장관 칸디다증의 진단은 1 ml당 1,000개 초과의 콜로니 형성 단위를 포함하는 배양물을 기반으로 한다. 칸디다증은 이들 타입으로 분류될 수 있다:

[0079] 점막 칸디다증

[0080] 구강 칸디다증 (아구창, 구강인두 칸디다증)

[0081] · 위막 칸디다증

[0082] · 홍반성(erythematous) 칸디다증

[0083] · 증식성(hyperplasti) 칸디다증

[0084] · 의치-관련 구내염(stomatitis) - 칸디다 유기체가 사례 중 약 90%에 관여한다

[0085] · 구각구순염(Angular cheilitis) - 칸디다 종이 사례 중 약 20%의 원인이 되고, 알비칸스 및 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 혼합 감염은 사례 중 약 60%의 원인이 된다

[0086] · 정중 능형 설염(median rhomboid glossitis)

[0087] 칸디다성 외음질염(vulvovaginitis) (질 효모 감염)

[0088] 칸디다 귀두염 - 귀두 음경의 감염, 거의 전적으로 포경수술을 하지 않은 남성에서만 발생

[0089] 식도 칸디다증 (칸디다성 식도염)

[0090] 위장 칸디다증

[0091] 호흡기 칸디다증

[0092] 피부 칸디다증

[0093] 칸디다성 모낭염(folliculitis)

[0094] 칸디다성 피부스침증(intertrigo)

[0095] 칸디다성 손발톱주위염(paronychia)

[0096] 항문 주위 칸디다증, 항문소양증(pruritus ani)으로 나타날 수 있다

[0097] 칸디다발진(candidid)

[0098] 만성 피부 점막 칸디다증

[0099] 선천성 피부 칸디다증

[0100] 기저귀 칸디다증: 어린아이의 기저귀 부위의 감염

[0101] 효모균성 지간 미란증(erosio interdigitalis blastomycetica)

[0102] 칸디다에 의해 유발된 칸디다성 조갑진균증 (손톱 감염)

[0103] 전신 칸디다증

[0104] 칸디다혈증, 패혈증으로 이어질 수 있는 진균혈증의 한 형태

[0105] 침습성 칸디다증 (파종성 칸디다증) — 칸디다에 의한 기관 감염

[0106] 만성 전신 칸디다증 (간비장 칸디다증) - 때때로 호중구감소증에서 회복하는 동안 발생

[0107] 항생제 칸디다증 (의원성(iatrogenic) 칸디다증).

[0108] 면역계를 지원하고, 단순 탄수화물이 높지 않은 식단이 구강 및 장내 플로라의 건강한 균형에 기여한다. 효모 감염은 당뇨병과 연관이 있지만, 혈당 제어 수준은 위험에 영향을 미치지 않을 수 있다. 면 속옷을 입는 것은 젖은 옷을 오랫동안 입지 않는 것과 함께 피부 및 질 효모 감염의 발병의 위험을 줄이는 데 도움이 될 수 있다.

[0109] 구강 위생은 면역계가 약화되었을 때 구강 칸디다증을 예방하는 데 도움이 될 수 있다. 암 치료를 받고 있는 사람의 경우, 클로르헥시딘 구강 세척제는 아구창을 예방하거나, 감소시킬 수 있다. 흡입용 코르티코스테로이드를 사용하는 사람들은 흡입기를 사용한 후 물 또는 구강 세척제로 입을 헹굼으로써 구강 칸디다증 발병의 위험을 감소시킬 수 있다.

[0110] 재발성 효모 감염을 경험하는 여성의 경우, 경구 또는 질내 프로바이오틱스가 향후 감염을 예방하는 데 도움이 된다는 제한된 증거가 있다. 이는 환제로서 또는 요구르트로서 포함한다.

[0111] 칸디다증은 항진균제로 치료되며; 이는 클로트리마졸, 니스타틴, 플루코나졸, 보리코나졸, 암포테리신 B, 및 에

키노칸딘을 포함한다. 정맥내 플루코나졸 또는 정맥내 에키노칸딘, 예컨대, 카스포펀진은 일반적으로 면역손상되거나, 또는 위독한 개체를 치료하는 데 사용된다.

[0112] 칸디다증 관리를 위한 임상 진료 지침의 2016년 개정판에는 상이한 칸디다 종, 항진균제 저항성 형태, 면역 상태, 및 감염 국재화 및 중증도를 포함하는 칸디다 감염에 대한 다수의 구체적인 치료 요법이 열거되어 있다. 면역적격 개체에서의 위장관 칸디다증은 2-3주 동안 하루 100-200 mg의 플루코나졸로 치료된다.

[0113] 구강 및 인후 칸디다증은 항진균제로 치료된다. 구강 칸디다증은 일반적으로 국소 치료에 반응하고; 그렇지 않으면, 구강 감염에 전신 항진균제가 필요할 수 있다. 피부 주름의 칸디다성 피부 감염 (칸디다성 피부스침증)은 일반적으로 국소 항진균제 치료 (예컨대, 니스타틴 또는 미코나졸)에 잘 반응한다. 경구 항진균제를 사용한 전신 치료는 중증인 경우, 또는 국소 요법으로 치료가 실패한 경우에 보류된다. 칸디다 식도염은 경구 또는 정맥으로 치료될 수 있고; 중증 또는 아졸 저항성 식도 칸디다증의 경우, 암포테리신 B 치료가 필요할 수 있다.

[0114] 질 효모 감염은 전형적으로 국소 항진균제로 치료된다. 플루코나졸의 1회 용량은 질 효모 감염 치료에 90% 효과가 있다. 중증의 비재발성인 경우, 수회에 걸쳐 플루코나졸을 투약하는 것이 권고된다. 국소 치료로는 질 좌제 또는 약용 세척제를 포함할 수 있다. 다른 타입의 효모 감염은 다른 투약을 필요로 한다. 젠티안 바이올렛은 모유 수유 중인 아기의 아구창에 사용될 수 있다. C. 알비칸스는 플루코나졸에 대한 저항성을 나타낼 수 있으며, 이는 종종 재발성 구강 감염에 대해 여러 과정의 플루코나졸로 치료받는 HIV/AIDS 환자에게 더 큰 문제가 된다.

[0115] 임신 중 질 효모 감염의 경우, 이용가능한 안전성 데이터로 인해 국소 이미다졸 또는 트리아졸 항진균제가 선택 요법으로 간주된다. 이러한 국소 제제의 전신 흡수는 최소화되어 태반경유 전달의 위험이 거의 없다. 임신 중 질 효모 감염의 경우, 더 짧은 기간 대신 7일 동안 국소 아졸 항진균제로 치료하는 것이 권고된다. 활동성 감염에 대한 프로바이오틱스의 이점은 발견되지 않았다.

[0116] 전신 칸디다증은 칸디다 효모가 혈류에 들어갈 때 발생하며, 중추신경계, 신장, 간, 뼈, 근육, 관절, 비장 또는 눈을 비롯한 다른 기관으로 확장될 수 있다 (파종성 칸디다증이 된다). 치료는 전형적으로 경구 또는 정맥내 항진균제로 구성된다. 혈액의 칸디다성 감염에서, 정맥내 플루코나졸 또는 에키노칸딘, 예컨대, 카스포펀진이 사용될 수 있다. 암포테리신 B이 또 다른 옵션이다.

[0117] **II. 모노클로날 항체 및 이의 제조**

[0118] 본원에서 사용되는 바, "항체" 또는 "항원 결합 폴리펩티드"는 항원을 특이적으로 인식하고, 그에 결합하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체를 지칭할 수 있다. 항체는 전체 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편 또는 단일 쇄일 수 있다. 예를 들어, "항체"는 항원에 결합하는 생물학적 활성을 갖는 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 임의의 단백질 또는 펩티드 함유 분자를 포함할 수 있다. 비제한적인 예는 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 리간드 결합부의 상보성 결정 영역 (CDR), 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 (FR) 영역, 또는 이의 임의의 부분, 또는 결합 단백질의 적어도 한 부분이다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 (Ig) 분자의 면역학적 활성 부분, 즉, 항원에 특이적으로 결합하는 (그와 면역반응하는) 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭할 수 있다. "특이적으로 결합한다" 또는 "~와 면역반응한다"라는 것은 항체가 원하는 항원의 하나 이상의 항원 결정기와 반응하고, 다른 폴리펩티드와는 반응하지 않는다는 것을 의미한다.

[0119] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체 단편" 또는 "항원 결합 단편"은 예컨대, $F_{(ab')2}$, $F_{(ab)2}$, $F_{ab'}$, F_{ab}, Fv, scFv 등과 같은 항체의 일부이다. 구조와 상관 없이, 항체 단편은 무손상 항체가 인식하는 동일한 항원과 결합한다. 용어 "항체 단편"은 압타머, 미니바디 및 디아바디를 포함할 수 있다. 용어 "항체 단편"은 또한 특정 항원에 결합하여 복합체를 형성함으로써 항체처럼 작용하는 임의의 합성 또는 유전적으로 조작된 단백질을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 항체, 항원-결합 폴리펩티드, 변이체 또는 유도체로는 폴리클로날, 모노클로날, 다중특이적, 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 단일 쇄 항체, 에피토프-결합 단편, 예컨대, Fab, Fab' 및 F(ab')2, Fd, Fvs, 단일 쇄 Fv (scFv), 단일 쇄 항체, dAb (도메인 항체), 미니바디, 디술피드 결합 Fv (sdFv), VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편 및 항-이디오타입 (항-Id) 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0120] "단일 쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 면역글로불린의 중쇄 (V_H) 및 경쇄 (V_L)의 가변 영역의 융합 단백질을 지칭할 수 있다. 단일 쇄 Fv ("scFv") 폴리펩티드 분자는 공유 결합된 VH:VL 이종이량체이며, 이는 펩티드 코딩 링커에 의해 연결된 VH- 및 VL-코딩 유전자를 포함하는 유전자 융합으로부터 발현될 수 있다. 문헌 [Huston *et*

al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85(16):5879-5883 (1988)]을 참조한다. 일부 측면에서, 영역은 10개 내지 약 25개 아미노산으로 이루어진 짧은 링커 펩티드로 연결된다. 링커는 가요성을 위해 글리신 뿐만 아니라, 가용성을 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부할 수 있으며, V_H의 N-말단과 V_L의 C-말단을 연결하거나, 또는 그 반대로 연결할 수 있다. 이 단백질은 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고 원래 면역글로불린의 특이성을 보유한다. 자연적으로 응집되었지만, 항체 V 영역으로부터 화학적으로 분리된 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드 쇄를, 항원 결합 부위 구조와 실질적으로 유사한 3차원 구조로 폴딩되는 scFv 분자로 전환하기 위한 화학 구조를 식별하기 위한 많은 방법이 설명되어 있다. 예컨대, 미국 특허 번호 5,091,5 13; 미국 특허 번호 5,892,019; 미국 특허 번호 5,132,405; 및 미국 특허 번호 4,946,778 (상기 특허들은 각각 그 전문이 참조로 포함된다)를 참조한다.

[0121] 본 발명의 측면은 단리된 모노클로날 항체를 제공한다. 세포 및 핵산, 예컨대, DNA 또는 RNA와 관련하여 본원에서 사용되는 바, 단리된"이라는 용어는 거대분자의 천연 공급원에 존재하는 각각 다른 DNA 또는 RNA로부터 분리된 분자를 지칭할 수 있다. "단리된"이라는 용어는 또한 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 때 세포 물질, 바이러스 물질 또는 배양 배지가 실질적으로 없는 핵산 또는 펩티드, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없는 핵산 또는 펩티드를 지칭할 수 있다. 예를 들어, "단리된 핵산"은 단편으로서 자연적으로 발생하지 않고, 자연 상태에서 발견되지 않는 핵산 단편을 포함할 수 있다. "단리된"은 또한 다른 세포 단백질 또는 조직으로부터 단리된 세포 또는 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 단리된 폴리펩티드는 정제된 폴리펩티드 및 재조합 폴리펩티드, 둘 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, "단리된 항체"는 이의 자연 환경의 구성요소로부터 분리 및/또는 회수된 것일 수 있다. 이의 자연 환경의 오염 구성요소는 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이며, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리법(Lowry 방법에 의해 측정된 95중량% 초과, 및 가장 특히 99중량% 초과의 항체로; (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 수득하기에 충분한 정도로; 또는 (3)쿠마시 블루 또는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건에서 SDS-PAGE에 의해 균질할 정도로 정제된다. 단리된 항체는 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 동소 항체를 포함한다. 그러나, 일반적으로 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계를 거쳐 제조될 것이다.

[0122] 기본 4쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L)와 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 이종사량체 당단백질이다. IgM 항체는 J 쇄로 불리는 추가 폴리펩티드와 함께 5개의 기본 이종사량체 단위로 구성되어 있는 바, 10개의 항원 결합 부위를 포함하는 반면, 분비된 IgA 항체는 중합화하여 J 쇄ㄴ와 함께 기본 4쇄 단위 2-5개를 포함하는 다가 집합체를 형성할 수 있다. IgG의 경우, 4쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각 L 쇄는 하나의 공유 디술피드 결합에 의해 H 쇄에 연결되어 있는 반면, 2개의 H 쇄는 H 쇄 이소타입에 따라 하나 이상의 디술피드 결합에 의해 서로 연결되어 있다. 각 H 및 L 쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇄내 디술피드 브릿지를 갖는다. 각 H 쇄는 N-말단에 가변 영역 (V_H)에 이어서, 알파 및 감마 쇄 각각에 대한 3개의 불변 도메인 (C_H) 및 뮤 및 이소타입에 대한 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각 L 쇄는 N-말단에 가변 영역 (V_L)에 이어서, 이의 다른 쪽 끝에 불변 도메인 (C_L)을 갖는다. V_L은 V_H와 정렬되고, C_L은 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_{H1})과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 영역 사이의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. V_H와 V_L의 쌍형성은 함께 단일 항원 결합 부위를 형성한다. 상이한 부류의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예컨대, 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6]을 참조한다.

[0123] 임의의 척추동물 종으로부터의 L 쇄는 이의 불변 도메인 (C_L)의 아미노산 서열에 따라 카파 및 람다로 불리는 2개의 명확하게 구별되는 타입 중 하나로 지정될 수 있다. 이의 중쇄 (C_H)의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 다른 부류 또는 이소타입으로 지정될 수 있다. 면역글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5가지 부류가 있으며 중쇄는 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 지정된다. 감마 및 알파 부류는 C_H 서열 및 기능의 비교적 작은 차이에 따라 하위부류로 추가로 분류되고, 인간은 하기 하위부류: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다.

[0124] "가변"이라는 용어는 V 도메인의 특정 세그먼트가 항체 사이에서 서열이 광범위하게 다르다는 사실을 지칭할 수 있다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 이의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 제공한다. 그러나, 가변성은 가변 영역의 110개 아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되지 않는다. 대신, V 영역은 각각 9-12개 아미노산 길이인 "초가변 영역"으로 불리는 극도의 가변성을 갖는 더 짧은 영역에 의해 분리된 15-30개의 아미노산으로

이루어진 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 상대적으로 불변의 스트레치로 구성된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 4개의 FR을 포함하며, 대부분 베타 시트 구성을 채택하고, 루프 연결을 형성하고, 일부 경우에는 베타 시트 구조의 일부를 형성하는 3개의 초가변 영역으로 연결된다. 각 쇄의 초가변 영역은 FR에 의해 밀접하게 함께 유지되고, 다른 쇄의 초가변 영역과 함께 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는 데 직접적으로 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대, 항체의 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC), 항체-의존성 세포 식세포 작용 (ADCP), 항체 의존성 호중구 식세포 작용 (ADNP), 및 항체 의존성 보체 침착 (ADCD)에 대한 참여를 나타낸다.

[0125] 본원에서 사용될 때, 용어 초가변 영역"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭할 수 있다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR," 예컨대, 카바트(Kabat) 넘버링 체계 (문헌 [Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)])에 따라 넘버링되었을 때, V_L 중 대략 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 주위, 및 V_H 중 대략 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3) 주위로부터의 아미노산 잔기; 및/또는 "초가변 루프"로부터의 상기 잔기 (예컨대, 코티아(Chothia) 넘버링 체계 (문헌 [Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)])에 따라 넘버링되었을 때, V_L 중 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 V_H 중 95-101 (H3)); 및/또는 "초가변 루프"/CDR로부터의 상기 잔기 (예컨대, IMGT 넘버링 체계 (문헌 [Lefranc *et al., Nucl. Acids Res.* 27:209-212 (1999)], [Ruiz *et al., Nucl. Acids Res.* 28:219-221 (2000)])에 따라 넘버링되었을 때, V_L 중 잔기 27-38 (L1), 56-65 (L2) 및 105-120 (L3), 및 V_H 중 27-38 (H1), 56-65 (H2) 및 105-120 (H3))를 포함한다. 임의적으로, 항체는 하기 지점, AHo (문헌 [Honneger, A. and Plunkthun, A., *J. Mol. Biol.* 309:657-670 (2001)])에 따라 넘버링되었을 때, V_L 중 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) 및 123 (L3), 및 V_H 중 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) 및 123 (H3) 중 하나 이상의 지점에 대칭 삽입부를 갖는다.

[0126] "생식세포계열 핵산 잔기"는 불변 또는 가변 영역을 코딩하는 생식세포계열 유전자에 자연적으로 존재하는 핵산 잔기를 의미한다. "생식세포계열 유전자"는 생식 세포 (즉, 난자가 될 세포 또는 정자에 있는 세포)에서 발견되는 DNA이다. "생식세포계열 돌연변이"는 단일 세포 단계에서 생식 세포 또는 접합체에서 발생한 특정 DNA의 유전가능한 변이를 지칭하며, 자손에게 유전될 때, 상기 돌연변이는 신체의 모든 세포에 포함된다. 생식세포계열 돌연변이는 단일 체세포에서 획득되는 체세포 돌연변이와 대조를 이룬다. 일부 경우에, 가변 영역을 코딩하는 생식세포계열 DNA 서열의 뉴클레오티드가 돌연변이화되고 (즉, 체세포 돌연변이), 다른 뉴클레오티드로 대체된다.

[0127] 본원에서 사용되는 바, 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭할 수 있으며, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되는 것으로서, 고도로 특이적이다. 추가로, 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 대조적으로, 각 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 모노클로날 항체는 이의 특이성 이외에도, 다른 항체에 의해 오염되지 않은 상태로 합성될 수 있다는 장점이 있다. "모노클로날"이라는 수식어는 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 유용한 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975)]에 의해 최초로 기술된 하이브리도마 방법론에 의해 제조될 수 있거나, 또는 항원 특이적 B 세포, 감염 또는 면역화에 반응하는 항원 특이적 형질모세포의 단일 세포 분류, 또는 벌크 분류된 항원 특이적 수집물에서 단일 세포로부터 연결된 중쇄 및 경쇄 포획 후 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (예컨대, 미국 특허 4,816,567 참조). "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어, 문헌 [Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에서 설명된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0128] 완전 인간 항체는 CDR을 포함하여 경쇄 및 중쇄, 둘 모두의 전체 서열이 인간 유전자로부터 발생하는 항체 분자이다. 인간 모노클로날 항체는 예를 들어, 인간 B-세포 하이브리도마 기술 (문헌 [Kozbor *et al.*, *Immunol Today* 4: 72, 1983] 참조); 및 인간 모노클로날 항체를 생산하는 EBV 하이브리도마 기술 (문헌 [Cole *et al.* In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985] 참조)을 사용하여 제

조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체가 이용될 수 있고, 인간 하이브리도마를 사용하여 (문헌 [Cote *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030, 1983] 참조), 또는 시험관내에서 인간 B-세포를 엡스타인 바 (Epstein Barr) 바이러스로 형질전환시킴으로써 (문헌 [Cole *et al.*, In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985] 참조) 제조될 수 있다.

[0129] 추가로, 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리를 비롯한 다른 기술을 사용하여 제조될 수 있다 (문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol*, 227:381, 1991; Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991]). 유사하게, 인간 항체는 인간 항체는 인간 면역글로불린 유전자좌를 트랜스제닉 동물, 예컨대, 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스에 도입함으로써 제조될 수 있다. 챌린지시 유전자 재배열, 어셈블리 및 항체 레퍼토리를 포함한 모든 면에서 인간에서 관찰된 것과 매우 유사한 인간 항체 생성이 관찰된다. 이러한 접근법은 예를 들어, 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625, 126; 5,633,425; 5,661,016에, 및 문헌 [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 and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)]에 기술되어 있다.

[0130] 인간 항체는 추가로 항원에 의한 공격에 반응하여 동물의 내인성 항체보다 완전한 인간 항체를 생성하도록 변형된 트랜스제닉 비인간 동물을 사용하여 생성될 수 있다 (PCT 공개 WO94/02602 및 미국 특허 번호 6,673,986 참조). 비인간 숙주에서 면역글로불린 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 내인성 유전자는 무력화되고, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 활성 유전자좌가 숙주의 게놈에 삽입된다. 인간 유전자는 예를 들어, 필수 인간 DNA 세그먼트를 포함하는 효모 인공 염색체를 사용하여 포함된다. 이어서, 원하는 모든 변형을 제공하는 동물은 변형의 전체 보체보다 적은 수를 포함하는 중간 트랜스제닉 동물을 교배함으로써 자손으로서 수득된다. 상기 비인간 동물의 바람직한 실시양태는 마우스이고, PCT 공개 WO 96/33735 및 WO 96/34096에 개시된 바와 같이 제노마우스(Xenomouse)™로 명명된다. 이 동물은 완전한 인간 면역글로불린을 분비하는 B 세포를 생산한다. 항체는 예를 들어, 폴리클로날 항체의 제제로서 관심 면역원으로 면역화한 후 동물로부터 직접, 또는 대안적으로 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마와 같은 동물로부터 유래된 불멸화된 B 세포로부터 수득될 수 있다. 추가로, 인간 가변 영역을 갖는 면역글로불린을 코딩하는 유전자는 항체를 직접 수득하기 위해 회수 및 발현될 수 있거나, 또는 예컨대, 예를 들어, 단일 쇄 Fv (scFv) 분자와 같은 항체의 유사체를 수득하기 위해 추가로 변형될 수 있다. 또한, 크리에이티브 바이오랩스(Creative BioLabs: 미국 뉴욕주 셜리)와 같은 회사는 본원에 기술된 것과 유사한 기술을 사용하여 선택된 항원에 대해 지시된 인간 항체를 제공하도록 고용될 수 있다.

[0131] **A. 일반 방법**

[0132] 칸디다에 결합하는 모노클로날 항체는 여러모로 적용될 것이다. 이는 칸디다 감염을 검출하고, 진단하는 데 사용하기 위한 것 뿐만 아니라, 칸디다 감염을 치료하기 위한 진단 키트의 생산을 포함한다. 이러한 맥락에서, 상기 항체를 진단제 또는 치료제에 연결하거나, 경쟁 검정법에서 포획제 또는 경쟁자로 사용하거나, 또는 추가 작용제를 부착하지 않고 개별적으로 사용할 수 있다. 항체는 하기에 추가로 논의되는 바와 같이 돌연변이화되거나, 또는 변형될 수 있다. 항체를 제조하고, 특징화하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다 (예컨대, 문헌 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]; 미국 특허 4,196,265) 참조.

[0133] 모노클로날 항체 (MAb)를 생성하는 방법은 일반적으로 폴리클로날 항체를 제조하는 방법과 동일한 라인을 따라 시작된다. 이 두 방법 모두의 제1 단계는 적절한 숙주의 면역화 또는 이전의 자연 감염에 기인하여 또는 허가된 또는 실험적 백신에 의한 백신접종으로 면역성이 있는 대상체의 확인이다. 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 주어진 면역화용 조성물은 이의 면역원성이 다양할 수 있다. 따라서, 펩티드 또는 폴리펩티드 면역원을 캐리어에 커플링함으로써 달성될 수 있는 바와 같이 숙주 면역계를 부스팅하는 것이 종종 필요하다. 예시적이고 바람직한 캐리어는 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) 및 우혈청 알부민 (BSA)이다. 예컨대, 오브알부민, 마우스 혈청 알부민 또는 토끼 혈청 알부민과 같은 다른 알부민도 캐리어로 사용될 수 있다. 폴리펩티드를 캐리어 단백질에 접합시키는 수단은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 글루타르알데히드, m-말레이미도벤코일-N-히드록시숙신이미드 에스테르, 카르보디이미드 및 비스-비아조타이즈드(biazotized) 벤지딘을 포함한다. 또한 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 특정 면역원 조성물의 면역원성은 애주번트로 알려진 면역 반응의 비특이적 자극제의 사용에 의해 증진될 수 있다. 동물에서 예시적이고 바람직한 애주번트는 완전 프로인트 애주번트 (사멸된 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)를 함유하는 면역 반응의 비특이적 자극제), 불완전 프로인트 애주번트 및 수산화알루미늄 애주번트를 포함하고, 인간에서의 것으로는 알룸, CpG, MFP59 및 면역자극 분자의 조합

("애주번트 시스템," 예컨대, AS01 또는 AS03)을 포함한다. 나노입자 백신, 또는 유전자 코딩된 항원이 물리적 전달 시스템 (지질 나노입자 또는 금 바이오블리스틱 비드)에서 DNA 또는 RNA 유전자로 전달되고, 니들, 유전자총, 경피 전기천공 장치로 전달되는 것을 포함하는, 칸디다 특이적 B 세포를 유도하기 위한 추가적인 실험 형태의 접종이 수행될 수 있다. 항원 유전자는 또한 복제 적격 또는 결함이 있는 바이러스 벡터, 예컨대, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스바이러스 또는 알파바이러스 레플리콘, 또는 대안적으로, 바이러스-유사 입자에 의해 코딩된 바와 같이 운반될 수 있다.

[0134] 자연 병원체에 대한 인간 항체의 경우, 적합한 접근법은 병원체에 노출된 대상체, 예컨대, 질환에 걸린 것으로 진단받은 대상체, 또는 병원체에 대한 보호 면역을 생성하기 위해 또는 실험용 백신의 안전성이나 효능을 시험하기 위해 백신접종을 받은 대상체를 확인하는 것이다. 순환 항-병원체 항체를 검출할 수 있고, 이어서, 항체 양성 대상체로부터 항체 코딩 또는 생산 B 세포를 수득할 수 있다.

[0135] 폴리클로날 항체의 생산에 사용된 면역원 조성물의 양은 면역원의 성질 뿐만 아니라, 면역화에 사용된 동물에 따라 변한다. 다양한 경로를 사용하여 면역원을 투여할 수 있다 (피하, 근육내, 진피내, 정맥내 및 복강내). 폴리클로날 항체의 생산은 면역화 후 다양한 시점에 면역화된 동물의 혈액을 샘플링함으로써 모니터링할 수 있다. 2차 부스터 주사 또한 제공될 수 있다. 부스팅 및 적정 프로세스는 적합한 역가가 달성될 때까지 반복한다. 원하는 수준의 면역원성이 수득되는 경우, 면역화된 동물을 방혈하여 혈청을 단리시키고, 보관하고/거나, 동물을 사용하여 MAb를 생성할 수 있다.

[0136] 면역화 후에, 항체, 구체적으로, B 림프구 (B 세포)를 생산할 수 있는 체세포를 MAb 생성 프로토콜에서 사용하기 위해 선택한다. 이들 세포를 생검된 비장, 림프절, 편도선 또는 아데노이드, 골수 흡인물 또는 생검, 폐 또는 위장관과 같은 점막 기관으로부터의 조직 생검 또는 순환 혈액으로부터 수득할 수 있다. 이어서, 면역화된 동물 또는 면역 인간으로부터의 항체 생산 B 림프구를 일반적으로 면역화된 동물 또는 인간 또는 인간/마우스 키메라 세포와 동일한 종 중 하나인 불멸의 골수종 세포의 세포와 융합한다. 하이브리도마 생산 융합 방법에 사용하기에 적합한 골수종 세포주는 바람직하게는 비항체 생산성이고, 융합 효율이 높고, 이어서, 원하는 융합된 세포 (하이브리도마)만의 성장을 지지하는 특정의 선택 배지에서 성장할 수 없도록 하는 효소 결핍능을 갖는다. 다수의 골수종 세포 중 어느 하나가 당업자에게 공지된 바와 같이 사용될 수 있다 (문헌 [Goding, pp. 65-66, 1986]; [Campbell, pp. 75-83, 1984]). HMMA2.5 세포 또는 MFP-2 세포가 상기 세포 중 특이 유용한 예이다.

[0137] 항체를 생산하는 비장 또는 림프절 세포 또는 골수종 세포의 하이브리드를 생성하는 방법은, 이러한 비가 각각 약 20:1 내지 약 1:1로 변할 수 있지만, 세포막의 융합을 촉진시키는 작용제 또는 작용제들 (화학적 또는 전기적 작용제)의 존재하에서 일반적으로 체세포를 골수종 세포와 2:1의 비로 혼합시키는 단계를 포함한다. 일부 경우에서, 초기 단계로 인간 B 세포를 엡스타인 바 바이러스 (EBV)로 형질전환시키면, B 세포의 크기가 증가하여, 상대적으로 큰 크기의 골수종 세포와의 융합이 증진된다. EBV에 의한 형질전환 효율은 형질전환 배지에서 CpG 및 Chk2 억제제 약물을 사용함으로써 증진된다. 대안적으로, 인간 B 세포는 추가 가용성 인자, 예컨대, IL-21 및 TNF 슈퍼패밀리의 타입 II 구성원인 인간 B 세포 활성화 인자 (BAFF)를 함유하는 배지에서 CD40 리간드 (CD154)를 발현하는 형질감염된 세포주와의 공동 배양에 의해 활성화될 수 있다. 센다이 바이러스를 사용한 융합 방법은 문헌 [Kohler and Milstein (1975; 1976)]에 의해 기술되었고, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 예컨대, 37% (v/v) PEG를 사용한 융합 방법은 문헌 [Gefter *et al.* (1977)]에 의해 기술되었다. 전기적으로 유도된 융합 방법의 사용 또한 적절하고 (문헌 [Goding, pp. 71-74, 1986]), 더 나은 효율성을 위한 프로세스가 있다 (문헌 [Yu *et al.*, 2008]). 융합 방법은 일반적으로 약 1×10^{-6} 내지 1×10^{-8}의 낮은 빈도로 생존가능한 하이브리드를 생성하지만, 최적화된 절차를 사용하면 200분의 1에 가까운 융합 효율을 달성할 수 있다 (문헌 [Yu *et al.*, 2008]). 그러나, 상대적으로 낮은 융합 효율은 문제를 일으키지 않는데, 생존가능한 융합된 하이브리드는 선택 배지에서 배양함으로써 모체의 주입된 세포 (특히 일반적으로 무한히 계속 분열하는 주입된 골수종 세포)로부터 분화되기 때문이다. 선택 배지는 일반적으로 조직 배양 배지에서 뉴클레오티드의 새로운 합성을 차단하는 작용제를 포함하는 것이다. 예시적이고 바람직한 작용제는 아미노프테린, 메토트렉세이트 및 아자세린이다. 아미노프테린과 메토트렉세이트는 퓨린 및 피리미딘, 둘 모두 새로운 합성을 차단하는 반면, 아자세린은 오직 퓨린 합성만을 차단한다. 아미노프테린 또는 메토트렉세이트가 사용되는 경우, 배지는 뉴클레오티드의 공급원으로서 히포크잔틴 및 티미딘으로 보충된다 (HAT 배지). 아자세린이 사용되는 경우, 배지는 히포크잔틴으로 보충된다. B 세포 공급원이 EBV 형질전환된 인간 B 세포주인 경우, 골수종에 융합되지 않은 EBV 형질전환 세포주를 제거하기 위해 오우아바인이 첨가된다.

[0138] 바람직한 선택 배지는 HAT 또는 오우아바인을 포함하는 HAT이다. 뉴클레오티드 구조 경로를 작동시킬 수 있는

유일한 세포는 HAT 배지 속에서 생존할 수 있다. 골수종 세포는 구조 경로의 주요 효소, 예컨대, 히포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HPRT)에 결함이 있으며, 이는 생존할 수 없다. B 세포는 이러한 방식으로 작동할 수 있지만, 이들은 배양물 속에서 제한된 수명 기간을 가지며, 일반적으로 약 2주 내에 죽는다. 따라서, 선택 배지 속에서 생존할 수 있는 유일한 세포는 골수종 및 B 세포로부터 형성된 하이브리드이다. 융합에 사용된 B 세포의 공급원이 EBV-형질전환된 B 세포의 세포주인 경우, 본원에서와 같이, EBV-형질전환된 B 세포가 약물 사멸에 민감한 바, 하이브리드의 약물 선택을 위해 또한 사용되지만, 사용된 골수종 파트너는 오우아바인 저항성인 것으로 선택된다.

[0139] 배양은 이로부터 특이적인 하이브리도마가 선택되는 하이브리도마의 집단을 제공한다. 전형적으로, 하이브리도마의 선택은 세포를 단일 클론 희석에 의해 마이크로타이터 플레이트에서 배양한 후, (약 2 내지 3주 후) 원하는 반응성에 대해 개별 클론 상청액을 시험함으로써 수행한다. 검정법은 예컨대, 방사면역검정법, 효소 면역검정법, 세포독성 검정법, 플라크 검정법 도트 면역결합 검정법 등과 같이 민감성이고, 단순하고, 신속하여야 한다. 이어서, 선택된 하이브리도마를 연속하여 희석시키거나, 또는 유세포 분석법에 의한 분류에 의해 단일 세포 분류하고, 개별 항체-생산 세포주내로 클로닝하며, 이어서, 상기 클론을 무기한 증식시켜 mAb를 제공할 수 있다. 세포주는 2개의 기본 방식으로 MAb 생산을 위해 이용될 수 있다. 하이브리도마의 샘플은 동물 (예컨대, 마우스) 내로 주사될 수 있다 (흔히 복강 내로). 임의적으로, 동물을 주사 전에 탄화수소, 특히, 오일, 예컨대, 프리스탄 (테트라메틸펜타데칸)으로 프라이밍시킨다. 인간 하이브리도마를 이러한 방식으로 사용하는 경우, 면역손상된 마우스, 예컨대, SCID 마우스에게 주사하여 종양 거부를 방지하는 것이 최적이다. 주사를 맞은 동물은 융합된 세포 하이브리드에 의해 생산된 특이적인 모노클로날 항체를 분비하는 종양을 발생시킨다. 이어서, 동물의 체액, 예컨대, 혈청 또는 복수액을 탭핑하여 MAb를 고농도로 제공한다. 개별 세포주를 또한 시험관내에서 배양할 수 있으며, 여기서, MAb는 이들이 고농도로 용이하게 수득될 수 있는 기점이 되는 배양 배지로 자연적으로 분비된다. 대안적으로, 인간 하이브리도마 세포주를 시험관내에서 사용하여 세포 상청액 중 면역글로불린을 생성할 수 있다. 세포주는 무혈청 배지 중에서의 성장을 위해 적합화시켜 고순도의 인간 모노클로날 면역글로불린을 회수하는 능력을 최적화시킬 수 있다.

[0140] 어느 하나의 수단에 의해 생산된 MAb는 원하는 경우, 여과, 원심분리 및 다양한 크로마토그래피 방법, 예컨대, FPLC 또는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제될 수 있다. 본 개시내용의 모노클로날 항체의 단편은 효소, 예컨대, 펩신 또는 파파인을 사용한 소화를 포함하는 방법에 의해 및/또는 화학적 환원에 의한 디술피드 결합의 절단에 의해 수득될 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용에 포함된 모노클로날 항체 단편은 자동화된 펩티드 합성기를 사용하여 합성할 수 있다.

[0141] 예를 들어, 분자 클로닝 접근법을 사용하여 모노클로날 항체를 생성할 수 있다. 관심 항원으로 표지된 단일 B 세포는 상자성 비드 선택 또는 유세포 분석법에 의한 분류를 사용하여 물리적으로 분류될 수 있고, 이어서, RNA는 RT-PCR에 의해 증폭된 단일 세포 및 항체 유전자로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, 항원 특이적 벌크 분류된 세포 집단은 미세소포체로부터 분리될 수 있고, 매칭된 중쇄 및 경쇄 가변 유전자는 중쇄 및 경쇄 앰플리콘의 물리적 연결, 또는 소포체로부터의 중쇄 및 경쇄 유전자의 공통된 바코딩을 이용하여 단일 세포로부터 회수될 수 있다. 단일 세포로부터의 매칭된 중쇄 및 경쇄 유전자는 RT-PCR 프라이머, 및 세포당 하나의 바코드로 전사체를 표시하기 위한 바코드를 보유하는 세포 투과성 나노입자로 세포를 처리함으로써 항원 특이적 B 세포 집단으로부터 수득될 수 있다. 항체 가변 유전자는 또한 하이브리도마 계통의 RNA 추출에 의해 단리되고, 항체 유전자는 RT-PCR에 의해 수득될 수 있고, 면역글로불린 발현 벡터로 클로닝될 수 있다. 대안적으로, 조합 면역글로불린 파지미드 라이브러리는 세포주로부터 단리된 RNA로부터 제조되고, 적절한 항체를 발현하는 파지미드는 진균 항원을 사용하여 패닝함으로써 선택된다. 종래 하이브리도마 기술에 비해 본 접근법의 장점은 단일 라운드에서 대략 10^4배의 많은 항체를 생산하고, 스크리닝할 수 있고, H 및 L 쇄 조합에 의해 새로운 특이성이 생성되어 적절한 항체를 찾을 수 있는 가능성이 더 증가한다는 것이다.

[0142] 본 발명에 유용한 항체 제조를 교시하는 다른 미국 특허들 (이는 각각 본원에서 참조로 포함된다)로는 조합 접근법을 이용한 키메라 항체의 제조를 기술하는 미국 특허 5,565,332; 재조합 면역글로불린 제제를 기술하는 미국 특허 4,816,567; 및 항체-치료제 접합체를 기술하는 미국 특허 4,867,973을 포함한다.

[0143] **B. 본 개시내용의 항체**

[0144] 제1 경우에서, 본 개시내용에 따른 항체는 이의 결합 특이성을 특징으로 할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "면역학적 결합" 및 "면역학적 결합 특성"은 면역글로불린 분자와 면역글로불린의 특이성의 대상이 되는 항원 사이에서 발생하는 비공유 상호작용 타입을 지칭할 수 있다. 면역학적 결합 상호작용의 강도 또는 친화도는

상호작용의 평형 결합 상수 (K_D)로 표현될 수 있으며, 여기서, K_D가 작을수록 친화도는 더 크다는 것을 나타낸다. 당업자는 당업자에게 널리 공지된 기술을 사용하여 주어진 항체의 결합 특이성/친화도를 평가함으로써 상기 항체가 본 청구범위의 범주 내에 포함되는지 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, 주어진 항체의 결합 대상이 되는 에피토프는 항원 분자 내에 위치하는 3개 이상의 (예컨대, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개의) 아미노산으로 이루어진 단일 인접 서열을 포함할 수 있다 (예컨대, 도메인의 선형 에피토프). 대안적으로, 에피토프는 항원 분자 내에 위치하는 복수의 비인접 아미노산 (또는 아미노산 서열)을 포함할 수 있다 (예컨대, 입체형태적 에피토프). 본원에서 사용되는 바, 용어 "에피토프"는 면역글로불린, scFv, 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질 결정기를 포함할 수 있다. 가변 영역을 통해 항체는 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인식하고, 특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 항체의 VL 도메인 및 VH 도메인, 또는 상보성 결정 영역 (CDR)의 서브세트는 결합하여 3차원 항원 결합 부위를 정의하는 가변 영역을 형성한다. 이러한 4차 항체 구조는 Y의 각 아암 끝에 존재하는 항원 결합 부위를 형성한다. 에피토프 결정기는 일반적으로 예컨대, 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹화로 구성되며, 일반적으로 특정 3차원 구조적 특성 뿐만 아니라, 특정 전하 특징을 갖는다. 예를 들어, 항체는 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 펩티드에 대해 생성될 수 있다. 더욱 구체적으로, 항원 결합 부위는 각각의 VH 및 VL 쇄 상의 3개의 CDR (즉, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)에 의해 정의된다.

[0145] 당업계의 숙련가에게 공지된 다양한 기술을 사용하여 항체가 폴리펩티드 또는 단백질 내에서 "하나 이상의 아미노산과 상호작용"하는지 여부를 결정할 수 있다. 예시적인 기술은 예를 들어, 예컨대, 문헌 [Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)]에 기술된 것과 같은 통상의 교차 차단 검정법을 포함한다. 교차 차단은 예컨대, ELISA, 생물층 간섭법, 또는 표면 플라즈몬 공명과 같은 다양한 결합 검정법으로 측정될 수 있다. 다른 방법으로는 알라닌 스캐닝 돌연변이 분석, 펩티드 블롯 분석 (문헌 [Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63]), 펩티드 절단 분석, 단일 입자 재구성을 사용한 고해상도 전자 현미경법 기술, 크리오EM 또는 단층 촬영, 결정학 연구 및 NMR 분석을 포함한다. 추가로, 예컨대, 항원의 에피토프 절제, 에피토프 추출 및 화학적 변형과 같은 방법이 사용될 수 있다 (문헌 [Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496]). 항체가 상호작용하는 폴리펩티드 내의 아미노산을 확인하는 데 사용될 수 있는 또 다른 방법은 질량 분석법에 의해 검출되는 수소/중수소 교환이다. 일반적으로, 수소/중수소 교환 방법은 관심 단백질을 중수소로 표지한 후, 항체를 중수소로 표지된 단백질에 결합시키는 것을 포함한다. 이어서, 단백질/항체 복합체를 물로 옮기고, 항체 복합체에 의해 보호되는 아미노산 내의 교환가능한 양성자는 계면의 일부가 아닌 아미노산 내의 교환가능한 양성자보다 더 느린 속도로 중수소에서 수소로 역교환된다. 결과적으로, 단백질/항체 계면의 일부를 형성하는 아미노산은 중수소를 보유할 수 있는 바, 계면에 포함되지 않은 아미노산에 비해 상대적으로 더 높은 질량을 나타낼 수 있다. 항체의 해리 후, 표적 단백질은 프로테아제 절단 및 질량 분석법 분석을 거쳐 항체가 상호작용하는 특정 아미노산에 상응하는 중수소 표지된 잔기를 밝힌다. 예컨대, 문헌 [Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259]; [Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A]를 참조한다. 항체가 칸디다를 중화하면, 항체 회피 돌연변이 변이체 유기체는 시험관내에서 또는 동물 모델에서 고농도 항체의 존재하에 칸디다를 증식시킴으로써 단리될 수 있다. 항체가 표적으로 하는 항원을 코딩하는 칸디다 유전자의 서열 분석을 통해 항체 회피를 부여하는 돌연변이(들)가 밝혀지며, 이는 에피토프 중의 잔기, 또는 알로스테릭하게 에피토프의 구조에 영향을 미치는 것을 시사한다.

[0146] 용어 "에피토프"는 B 및/또는 T 세포가 반응하는 항원 상의 부위를 지칭할 수 있다. B-세포 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산, 둘 모두로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 노출되면 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 일반적으로 변성 용매로 처리하면 손실된다. 에피토프는 전형적으로 고유한 공간적 입체형태로 적어도 3개, 더욱 일반적으로는 적어도 5개 또는 8-10개의 아미노산을 포함한다.

[0147] 항원 구조 기반 항체 프로파일링(Antigen Structure-based Antibody Profiling: ASAP)으로도 공지된 변형 지원 프로파일링(Modification-Assisted Profiling: MAP)은 각 항체의 화학적으로 또는 효소적으로 변형된 항원 표면에 대한 결합 프로파일의 유사성에 따라 동일한 항원에 대해 지시된 다수의 모노클로날 항체 (mAb)를 범주화하는 방법이다 (US 2004/0101920 (본원에서 그 전문이 참조로 구체적으로 포함된다) 참조). 각 범주는 또 다른 범주로 표시되는 에피토프와 뚜렷하게 다르거나, 또는 부분적으로 중복되는 고유한 에피토프를 반영할 수 있다. 상기 기술을 통해 유전적으로 동일한 항체를 신속하게 필터링할 수 있으며, 특징화는 유전적으로 구별되는 항체에 집중할 수 있다. 하이브리도마 스크리닝에 적용될 때, MAP는 원하는 특징을 갖는 mAb를 생성하는 희귀 하이브리도마 클론의 확인을 용이하게 할 수 있다. MAP를 사용하여 본 개시내용의 항체를 상이한 에피토프에 결합하

는 항체 군으로 분류할 수 있다.

[0148] 본 개시내용은 동일한 에피토프, 또는 에피토프의 일부에 결합할 수 있는 항체를 포함한다. 유사하게, 본 개시내용은 또한 표적 또는 이의 단편에 대한 결합에 대해 본원에 기술된 특정 예시적인 항체 중 임의의 것과 경쟁하는 항체를 포함한다. 항체가 당업계에 공지된 통상적인 방법을 사용하여 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 또는 그와의 결합에 대해 경쟁하는지 여부를 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 시험 항체가 참조와 동일한 에피토프에 결합하는지 결정하기 위해, 참조 항체는 포화 조건하에서 표적에 결합하도록 허용된다. 이어서, 표적 분자에 결합할 수 있는 시험 항체의 능력이 평가된다. 시험 항체가 참조 항체와의 포화 결합 후 표적 분자에 결합할 수 있는 경우, 시험 항체는 참조 항체와 상이한 에피토프에 결합한다고 결론지을 수 있다. 반면에, 시험 항체가 참조 항체와의 포화 결합 후 표적 분자에 결합할 수 없다면, 이때 시험 항체는 참조 항체에 의해 결합된 에피토프와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0149] 항체가 참조 항-칸디다 항체와의 결합에 대해 경쟁하는지 여부를 결정하기 위해, 상기 기술된 결합 방법은 2가지 방향으로 수행된다: 제1 방향에서, 참조 항체는 포화 조건하에서 칸디다 항원에 결합하도록 허용된 후, 시험 항체의 칸디다 항원에 대한 결합이 평가된다. 두 번째 방향에서, 시험 항체는 포화 조건하에 칸디다 항원 분자에 결합하도록 허용된 후, 이어서, 칸디다 항원에 대한 참조 항체의 결합이 평가된다. 두 방향 모두에서, 제1 (포화) 항체만이 칸디다 항원에 결합할 수 있는 경우, 이때 시험 항체 및 참조 항체는 칸디다 항원에 대한 결합에 대해 경쟁하는 것으로 결론지어진다. 당업계의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이, 참조 항체와의 결합에 대해 경쟁하는 항체는 참조 항체와 동일한 에피토프에 반드시 결합할 필요는 없지만, 중첩 또는 인접한 에피토프에 결합함으로써 참조 항체의 결합을 입체적으로 차단할 수 있다.

[0150] 2개의 항체는 각각이 나머지 다른 항체가 항원에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제 (차단)한다면, 동일하거나 중첩되는 에피토프에 결합하는 것이다. 즉, 1, 5, 10, 20 또는 100배 과량의 한 항체가 경쟁 결합 검정법에서 측정할 때 적어도 50%, 그러나, 바람직하게는 75%, 90% 또는 심지어 99%만큼 나머지 다른 항체의 결합을 억제시킨다 (문헌 [Junghans *et al*., Cancer Res. 1990 50:1495-1502]). 대안적으로, 한 항체의 결합을 감소 또는 제거하는, 항원 내의 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 나머지 다른 항체의 결합을 감소 또는 제거한다면, 두 항체는 동일한 에피토프를 갖는 것이다. 한 항체의 결합을 감소 또는 제거하는 일부 아미노산 돌연변이가 나머지 다른 항체의 결합을 감소 또는 제거한다면, 두 항체는 중첩 에피토프를 갖는 것이다.

[0151] 이어서, 관찰된 시험 항체의 결합 결여가 실제로 참조 항체와 동일한 에피토프에 대한 결합 때문인지 또는 입체 차단 (또는 다른 현상) 관찰된 결합 결여의 원인이 되는지 여부를 확인하기 위해 추가의 통상적인 실험 (예컨대, 펩티드 돌연변이 및 결합 분석)을 수행할 수 있다. 이런 종류의 실험은 ELISA, RIA, 표면 플라즈몬 공명, 유세포 분석법 또는 당업계에서 이용가능한 임의의 다른 정량적 또는 정성적 항체 결합 검정법을 사용하여 수행될 수 있다. EM 또는 결정학을 사용한 구조 연구는 결합에 대해 경쟁하는 두 항체가 동일한 에피토프를 인식하는지 여부를 입증할 수도 있다.

[0152] 또 다른 측면에서, 각 표 3 및 4에 예시된 바와 같은 중쇄 및 경쇄로부터의 클론-쌍형성한 CDR을 갖는 모노클로날 항체를 제공한다. 모노클로날 항체는 표 3 및 4에 기재된 서열과 적어도 70%의 동일성을 갖는 클론-쌍형성한 CDR을 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 표 3 및 4로부터의 서열과 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 동일하다. 상기 항체는 본원에 기술된 방법을 사용하여 하기 실시예 섹션에서 논의되는 클론에 의해 생성될 수 있다.

[0153] 또 다른 측면에서, 항체는 추가의 "프레임워크" 영역을 포함하는 이의 가변 서열을 특징으로 할 수 있다. 이는 전체 가변 영역을 코딩하거나, 또는 나타내는 것으로 표 1 및 2에 제공되어 있다. 추가로, 항체 서열은 임의적으로 하기에 더 상세히 논의되는 방법을 사용하여 이들 서열과 다를 수 있다. 예를 들어, 핵산 서열은 (a) 가변 영역이 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인으로부터 분리될 수 있거나, (b) 핵산이 상기 기술된 것과 다를 수 있지만, 그에 의해 코딩된 잔기에 영향을 미치지 않거나, (c) 핵산은 주어진 비율(%)만큼, 예컨대, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성으로 상기 기술된 것과 다를 수 있거나, (d) 핵산은 예컨대, 약 50℃ 내지 약 70℃의 온도에서 약 0.02 M 내지 약 0.15 M NaCl로 제공되는, 저염 및/또는 고온 조건으로 예시되는 바와 같이, 고도로 엄격한 조건하에서 하이브리드화할 수 있는 능력에 의해 상기 기술된 것과 다를 수 있거나, (e) 아미노산은 주어진 비율(%)만큼, 예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성으로 상기 기술된 것과 다를 수 있거나, 또는 (f) 아미노산은 보존적 치환 (하기에서 논의)을 허용함으로써 상기 기술된 것과 다를 수 있다는 점에서 상기 기술된 것과 다를 수 있다. 상기 내용은 각각은 표 1에 기술된 핵산 서열 및 표 2의 아미노산 서열에 적용된다.

[0154] 본 개시내용의 측면은 본원에 기술된 항-칸디다 항체 또는 항체 단편의 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에 대해 명시된 동일성(%) 또는 유사성(%)을 갖는 항체를 특징으로 한다. 예를 들어, 항체는 본원에 기술된 항-칸디다 항체 또는 항체 단편 중 어느 하나의 명시된 영역 또는 전장을 비교하였을 때, 60% , 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 가질 수 있다. 하기 기술되는 바와 같이, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열을 비교할 때, 두 서열 중의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 최대 일치하도록 정렬되었을 때, 동일하다면, 두 서열은 "동일한" 것이라고 할 수 있다. 두 서열 간의 비교는 전형적으로 서열 유사성의 국부 영역을 확인하고, 비교하기 위해 비교창에 걸쳐 서열을 비교함으로써 수행된다. 본원에서 사용되는 바, "비교창"은 두 서열이 최적으로 정렬된 후, 서열이 동일한 개수의 인접 위치의 참조 서열과 비교될 수 있는, 적어도 약 20개의 인접 위치, 일반적으로 30 내지 약 75개, 40 내지 약 50개의 인접 위치로 이루어진 세그먼트를 지칭한다.

[0155] 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은 디폴트 파라미터를 사용하여 생물정보학 소프트웨어의 레이저진(Lasergene) 제품군 중 Megalign 프로그램 (DNASTAR, 인크.(DNASTAR, Inc.: 미국 위스콘신주 매디슨))을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 프로그램은 하기 참고문헌에 기술된 몇 가지 정렬 방식을 구현한다: 문헌 [Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins--Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358]; [Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogeny pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.]; [Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151-153]; [Myers, E. W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17]; [Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105]; [Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425]; [Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy--the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, Calif.]; [Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726-730].

[0156] 대안적으로, 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은 문헌 [Smith and Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482]의 국부 동일성 알고리즘에 의해, 문헌 [Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 동일성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌 [Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444]의 유사성 검색 방법에 의해, 이들 알고리즘 (제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group: GCG: 미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575)의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package) 내의 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 및 TFASTA)의 컴퓨터 실행에 의해, 또는 검사에 의해 수행될 수 있다.

[0157] 서열 동일성(%) 및 서열 유사성(%)을 측정하는 데 적합한 알고리즘의 한 특정 예로는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이 있으며, 이는 각각 문헌 [Altschul *et al.* (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402] 및 [Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 기술되어 있다. BLAST 및 BLAST 2.0은 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드에 대한 서열 동일성(%)을 측정하기 위해 예를 들어, 본원에 기술된 파라미터와 함께 사용될 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용가능하다. 항체 서열의 재배열된 성질 및 각 유전자의 가변 길이는 단일 항체 서열에 대한 다회 라운드의 BLAST 검색을 필요로 한다. 또한, 다른 유전자의 수동 어셈블리는 어렵고, 오류가 발생하기 쉽다. 서열 분석 도구 IgBLAST (월드 와이드 웹 ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)는 생식세포계열 V, D 및 J 유전자에 대한 매치, 재배열 접합부의 세부사항, Ig V 도메인 프레임워크 영역의 묘사 및 상보성 결정 영역을 확인한다. IgBLAST는 뉴클레오티드 또는 단백질 서열을 분석할 수 있고, 배치로 서열을 프로세스할 수 있고, 생식세포계열 유전자 데이터베이스 및 다른 서열 데이터베이스에 대한 검색이 동시에 이루어질 수 있도록 허용하여 가장 최선으로 일치하는 생식세포계열 V 유전자를 얻을 수 있다.

[0158] 한 예시적인 예에서, 누적 점수는 뉴클레오티드 서열의 경우, 파라미터 M (매칭 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상 > 0) 및 N (미스매칭 잔기에 대한 패널티 점수; 항상 < 0)을 사용하여 계산될 수 있다. 누적 정렬 점수가 이의 최대 달성 값으로부터 X의 양만큼 하락하거나; 누적 점수가 하나 이상의 음으로 점수화된 잔기 정렬의 축적으로 인해 0 이하로 떨어지거나; 또는 어느 한 쪽의 서열의 말단에 도달한 경우에 각각의 방향으로의 워드 히트의 연장은 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X는 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오티드 서열의 경우)은 디폴트로서 워드길이 (W) 11, 기대값 (E) 10, 및 BLOSUM62 점수화 매트릭스 (문헌 [Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915] 참조) 정렬, (B) 50, 기대값 (E) 10, M=5, N=-4, 및 양쪽 가닥의 비교를 사용한다.

[0159] 아미노산 서열의 경우, 누적 점수를 계산하는 데 점수화 매트릭스가 사용될 수 있다. 누적 정렬 점수가 이의 최

대 달성 값으로부터 X의 양만큼 하락하거나; 누적 점수가 하나 이상의 음으로 점수화된 잔기 정렬의 축적으로 인해 0 이하로 떨어지거나; 또는 어느 한 쪽의 서열의 말단에 도달한 경우에 각각의 방향으로의 워드 히트의 연장은 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X는 정렬의 감도 및 속도를 결정한다.

[0160] 한 접근법에서, "서열 동일성(%)"은 적어도 20개 위치로 이루어진 비교창에 걸쳐 최적으로 정렬된 두 서열을 비교함으로써 결정되며, 여기서, 비교창 중의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부는 두 서열의 최적의 정렬을 위해 (부가 또는 결실을 포함하지 않는) 참조 서열과 비교하여, 20% 이하, 일반적으로 5 내지 15%, 또는 10 내지 12%의 부가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 상기 서열 동일성(%)은 두 서열 모두에 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 존재하는 위치의 개수를 측정하여 매칭되는 위치의 개수를 산출하고, 매칭되는 위치의 개수를 참조 서열의 위치의 총 개수 (즉, 창 크기)로 나누고, 그 값에 100을 곱하여 서열 동일성(%)을 산출한다.

[0161] 하기 기술된 항체 및 이의 항원 결합 단편 중 임의의 것의 "유도체"는 항원에 면역특이적으로 결합하지만, "모체" (또는 야생형) 분자와 비교하여 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 아미노산 치환, 부가, 결실 또는 변형을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭할 수 있다. 상기 아미노산 치환 또는 부가는 자연 발생 (즉, DNA 코딩) 또는 비자연 발생 아미노산 잔기를 도입할 수 있다. 용어 "유도체"는 예를 들어, 증진되거나 손상된 이펙터 또는 결합 특징을 나타내는 변이체 Fc 영역을 갖는, 예를 들어, 항체 등을 형성하기 위해 변경된 CH1, 힌지, CH2, CH3 또는 CH4 영역을 갖는 변이체로서 포함한다. 용어 "유도체"는 추가로 비-아미노산 변형, 예를 들어, 글리코실화될 수 있는 아미노산 (예컨대, 변경된 만노스, 2-N-아세틸글루코사민, 갈락토스, 푸코스, 글루코스, 시알산, 5-N-아세틸뉴라민산, 5-글리콜뉴라민산 등 함량), 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대해 연결될 수 있는 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경된 탄수화물 변형은 하기: 항체의 가용화, 항체의 세포내 수송 및 분비 촉진, 항체 어셈블리 촉진, 입체형태적 완전성, 및 항체 매개 이펙터 기능 중 하나 이상의 것을 조정한다. 구체적인 실시양태에서, 변경된 탄수화물 변형은 탄수화물 변형이 결여된 항체에 비해 항체 매개 이펙터 기능을 증진시킨다. 변경된 항체 매개 이펙터 기능을 유도하는 탄수화물 변형은 당업계에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Shields, R. L. *et al.* (2002) "*Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity*," J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740]; [Davies J. *et al.* (2001) "*Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For FC gamma RIII*," Biotechnology & Bioengineering 74(4): 288-294]). 탄수화물 함량을 변경하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 예컨대, 문헌 [Wallick, S. C. *et al.* (1988) "*Glycosylation Of A VH Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha* (1----6) *Dextran Increases Its Affinity For Antigen*," J. Exp. Med. 168(3): 1099-1109]; [Tao, M. H. *et al.* (1989) "*Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG. Role Of Carbohydrate In The Structure And Effector Functions Mediated By The Human IgG Constant Region*," J. Immunol. 143(8): 2595-2601]; [Routledge, E. G. *et al.* (1995) "*The Effect Of Aglycosylation On The Immunogenicity Of A Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody*," Transplantation 60(8):847-53]; [Elliott, S. *et al.* (2003) "*Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering*," Nature Biotechnol. 21:414-21]; [Shields, R. L. *et al.* (2002) "*Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity*," J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740)]을 참조한다.

[0162] 유도체 항체 또는 항체 단편은 비드 기반 또는 세포 기반 검정법 또는 동물 모델에서의 생체내 연구에 의해 측정된 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC), 항체-의존성 세포 식세포 작용 (ADCP), 항체 의존성 호중구 식세포 작용 (ADNP), 또는 항체 의존성 보체 침착 (ADCD) 기능에서 바람직한 수준의 활성을 부여하기 위해 조작된 서열 또는 글리코실화 상태로 생성될 수 있다.

[0163] 유도체 항체 또는 항체 단편은 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 제제화, 투니카마이신의 대사 합성 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 화학적 변형에 의해 변형될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체 유도체는 모체 항체와 유사하거나 동일한 기능을 가질 것이다. 또 다른 실시양태에서, 항체 유도체는 모체 항체에 비해 변경된 활성을 나타낼 것이다. 예를 들어, 유도체 항체 (또는 이의 단편)는 모체 항체보다 더 단단히 이의 에피토프에 결합하거나, 단백질 분해에 대해 더 큰 저항성을 가질 수 있다.

[0164] **C. 항체 서열 조작**

[0165] 다양한 실시양태에서, 예컨대, 발현 개선, 교차 반응성 개선 또는 표적에서 벗어난 결합 감소와 같은 다양한 이유에서 확인된 항체의 서열을 조작하도록 선택할 수 있다. 변형된 항체는 표준 분자 생물학적 기술을 통한 발현, 또는 폴리펩티드의 화학적 합성을 비롯한, 당업자에게 공지된 임의의 기술에 의해 제조될 수 있다. 재조합 발현 방법은 본 문서의 다른 곳에서 다룬다. 하기 내용은 항체 조작을 위한 관련 목표 기술에 대한 일반적인 논의이다.

[0166] 하이브리도마를 배양한 후, 이어서, 세포를 용해시키고, 총 RNA를 추출할 수 있다. 랜덤 육량체를 RT와 함께 사용하여 RNA의 cDNA 카피를 생성한 후, 이어서, 모든 인간 가변 유전자 서열을 증폭시킬 것으로 예상되는 PCR 프라이머의 다중 혼합물을 사용하여 PCR을 수행할 수 있다. PCR 생성물을 pGEM-T Easy 벡터로 클로닝한 후, 이어서, 표준 벡터 프라이머를 사용하여 자동화된 DNA 시퀀싱에 의해 시퀀싱할 수 있다. 하이브리도마 상청액으로부터 수집된 항체를 사용하여 결합 및 중화 검정법을 수행하고, 단백질 G 칼럼을 사용하여 FPLC에 의해 정제할 수 있다.

[0167] 본 개시내용의 항체는 본원에 기술된 임의의 단일 쇄 항체를 코딩하는 DNA 세그먼트를 함유하는 벡터 (또는 본원에서 "발현 벡터"로도 지칭)에 의해 발현될 수 있다. 이는 벡터, 리포솜, 네이키드 DNA, 애주번트-지원 DNA, 유전자 총, 카테터 등을 포함할 수 있다. 벡터는 예컨대, WO 93/64701에 기술된, 표적화 모이어티 (예컨대, 세포 표면 수용체에 대한 리간드), 및 핵산 결합 모이어티 (예컨대, 폴리리신)를 갖는 화학적 접합체, 바이러스 벡터 (예컨대, DNA 또는 RNA 바이러스 벡터), 융합 단백질, 예컨대, PCT/US 95/02140 (WO 95/22618)에 기술된, 표적 모이어티 (예컨대, 표적 세포에 특이적인 항체) 및 핵산 결합 모이어티 (예컨대, 프로타민)를 함유하는 융합 단백질, 플라스미드, 파지 등을 포함한다. 벡터는 염색체, 비염색체 또는 합성 벡터일 수 있다.

[0168] 벡터는 바이러스 벡터, 융합 단백질 및 화학적 접합체를 포함할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스를 포함한다. DNA 바이러스 벡터가 바람직하다. 이러한 벡터는 폭스 벡터, 예컨대, 오르토폭스 또는 아비폭스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 예컨대, 단순 헤르페스 I 바이러스 (HSV) 벡터 (문헌 [Geller. *et al.*, *J. Neurochem*, 64:487 (1995)]; [Lim *et al.*, in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995)]; [Geller *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90:7603 (1993)]; [Geller *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87: 1149 (1990)] 참조), 아데노바이러스 벡터 (문헌 [LeGal LaSalle *et al.*, *Science*, 259:988 (1993)]; [Davidson *et al.*, *Nat. Genet.* 3:219 (1993)]; [Yang *et al.*, *J. Virol.* 69:2004 (1995)] 참조) 및 아데노-연관 바이러스 벡터 (문헌 [Kaplitt *et al.*, *Nat. Genet.* 8: 148 (1994) 참조)를 포함한다.

[0169] 폭스 바이러스 벡터는 유전자를 세포의 세포질에 도입시킨다. 아비폭스 바이러스 벡터는 핵산의 단기 발현만을 초래한다. 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 및 단순 헤르페스 바이러스 (HSV) 벡터는 핵산을 신경 세포 내로 도입하는 데 바람직하다. 아데노바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 (약 4개월)보다 더 짧은 기간 (약 2개월) 발현을 일으키며, 이는 차례로 HSV 벡터보다 더 짧다. 선택된 특정 벡터는 표적 세포 및 치료되는 병태에 따라 달라진다. 도입은 표준 기술, 예컨대, 감염, 형질감염, 형질도입 또는 형질전환에 의한 것일 수 있다. 유전자 전달 모드의 예로는 예컨대, 네이키드 DNA, CaPO4 침전, DEAE 덱스트란, 전기천공, 원형질체 융합, 리포펙션, 세포 미세주입 및 바이러스 벡터를 포함한다.

[0170] 이들 벡터는 다양한 방식으로 사용될 수 있는 다량의 항체를 발현하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 샘플에서 칸디다의 존재를 검출하기 위해, 항체는 또한 칸디다에 결합하여, 이의 활성을 파괴시키도록 하는 데 사용될 수 있다.

[0171] 재조합 전장 IgG 항체는 클로닝 벡터로부터의 중쇄 및 경쇄 Fv DNA를 IgG 플라스미드 벡터로 서브클로닝하여 생성할 수 있고, 293 (예컨대, 프리스타일(Freestyle)) 세포 또는 CHO 세포로 형질감염시킬 수 있고, 항체를 293 또는 CHO 세포 상청액으로부터 수집하고, 정제할 수 있다. 다른 적절한 숙주 세포 시스템은 박테리아, 예컨대, E. 콜라이(*E. coli*), 곤충 세포 (S2, Sf9, Sf29, 하이 파이브(High Five)), 식물 세포 (예컨대, 인간 유사 글리칸에 대해 조작되거나, 또는 조작되지 않은 담배), 조류, 또는 다양한 비인간 트랜스제닉과 관련하여, 예컨대, 마우스, 래트, 염소 또는 소를 포함한다.

[0172] 후속 항체 정제 및 숙주 면역화 둘 모두를 위한 항체를 코딩하는 핵산의 발현 또한 본 발명에 따라 수행될 수 있다. 항체 코딩 서열은 예컨대, 천연 RNA 또는 변형된 RNA와 같은 RNA일 수 있다. 변형된 RNA는 mRNA에 증가된 안정성과 낮은 면역원성을 부여하여 치료상 중요한 단백질의 발현을 촉진하는 특정 화학적 변형을 함유할 수 있다. 예를 들어, N1-메틸-슈도우리딘 (N1mΨ)은 번역 능력 측면에서 여러 다른 뉴클레오시드 변형 및 이들의 조합을 능가한다. 면역/eIF2α 인산화-의존적 번역 억제를 끄는 것 외에도, 도입된 N1mΨ 뉴클레오티드는 mRNA의

리보솜 일시 중지 및 밀도를 증가시켜 번역 과정의 역학을 극적으로 변경시킨다. 변형된 mRNA의 리보솜 로딩 증가는 동일한 mRNA에서 리보솜 리사이클링 또는 신규 리보솜 동원을 선호함으로써 개시에 대해 더 관대하게 만든다. 이러한 변형은 RNA 접종 후 생체내 항체 발현을 증진시키는 데 사용될 수 있다. RNA는, 천연이든 변형되었든 상관없이, 네이키드 RNA로서 또는 전달 비히클, 예컨대, 지질 나노입자로 전달될 수 있다.

[0173] 대안적으로, 항체를 코딩하는 DNA는 동일한 목적으로 사용될 수 있다. DNA는 이의 디자인 목적 대상이 되는 숙주 세포에서 활성인 프로모터를 포함하는 발현 카세트에 포함된다. 발현 카세트는 유리하게는 복제가능한 벡터, 예컨대, 종래 플라스미드 또는 미니벡터에 포함된다. 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대, 폭스바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 아데노-연관 바이러스를 포함하며, 렌티바이러스도 사용될 수 있다. 예컨대, VEE 바이러스 또는 신드비스 바이러스에 기초한 알파바이러스 레플리콘과 같은 항체 유전자를 코딩하는 레플리콘도 사용될 수 있다. 상기 벡터의 전달은 근육내, 피하 또는 피내 경로를 통해 바늘에 의해, 또는 생체내 발현이 요구될 때 경피 전기천공에 의해 수행될 수 있다.

[0174] 최종 cGMP 제조 프로세스와 동일한 숙주 세포 및 세포 배양 프로세스에서 생산된 항체의 신속한 이용가능성이 프로세스 개발 프로그램의 지속 기간을 단축시킬 수 있다. 론자(Lonza)는 CHO 세포에서 소량 (최대 50g)의 항체를 신속하게 생산하기 위해 CDACF 배지에서 성장한 풀링된 형질감염체를 사용하는 일반적인 방법을 개발하였다. 실제 과도 시스템보다 약간 느리지만, 장점은 더 높은 제품 농도와 생산 세포주와 동일한 숙주 및 프로세스를 사용한다는 것을 포함한다. 일회용 생물반응기에서 모델 항체를 발현하는 GS-CHO 풀의 성장 및 생산성의 예: 유가식 모드로 작동되는 일회용 백 생물반응기 배양물 (5 L 작업 부피)에서, 형질감염 후 9주 이내에 수거 항체 농도는 2 g/L를 달성하였다.

[0175] 항체 분자는, 예를 들어, mAb의 단백질분해 절단에 의해 생산되는 단편 (예컨대, F(ab'), $F(ab')_2$), 또는 예를 들어, 재조합 수단을 통해 생산가능한단일 쇄 면역글로불린을 포함할 것이다. F(ab') 항체 유도체는 1가인 반면,$F(ab')_2$ 항체 유도체는 2가이다. 한 실시양태에서, 상기 단편은 서로 결합하거나, 다른 항체 단편 또는 수용체 리간드와 결합하여 "키메라" 결합 분자를 형성할 수 있다. 유의하게는, 이러한 키메라 분자는 동일한 분자의 다른 에피토프에 결합할 수 있는 치환기를 포함할 수 있다.

[0176] 관련된 실시양태에서, 항체는 개시된 항체의 유도체, 예컨대, 개시된 항체의 것과 동일한 CDR 서열을 포함하는 항체 (예컨대, 키메라, 또는 CDR-이식된 항체)이다. 대안적으로, 예컨대, 항체 분자에 보존적 변화를 도입하는 것과 같은 변형이 이루어질 수 있다. 이와 같이 변화시키기 위해, 아미노산의 하이드로패틱 지수(hydropathic index)를 고려할 수 있다. 단백질에 상호작용적 생물학적 기능을 부여하는 데 있어서 하이드로패틱 아미노산 지수의 중요성은 일반적으로 본 분야에서 이해된다 (문헌 [Kyte and Doolittle, 1982]). 아미노산의 상대적인 하이드로패틱 특징은 생성된 단백질의 2차 구조에 기여하며, 이는 결국 다른 분자, 예를 들어, 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과 단백질의 상호작용을 한정한다.

[0177] 또한, 친수성에 기초하여 유사 아미노산의 치환이 효과적으로 이루어질 수 있다. 본원에 참조로 포함된 미국 특허 4,554,101에서는 인접 아미노산의 친수성에 의해 지배되는 단백질의 최대 국소 평균 친수성이 단백질의 생물학적 특성과 관련이 있다고 명시한다. 미국 특허 4,554,101에 상세히 설명된 바와 같이, 하기 친수성 값이 아미노산 잔기에 배정되었다: 염기성 아미노산: 아르기닌 (+3.0), 리신 (+3.0), 및 히스티딘 (-0.5); 산성 아미노산: 아스파르테이트 (+3.0 ± 1), 글루타메이트 (+3.0 ± 1), 아스파라긴 (+0.2), 및 글루타민 (+0.2); 친수성, 비이온성 아미노산: 세린 (+0.3), 아스파라긴 (+0.2), 글루타민 (+0.2), 및 트레오닌 (-0.4), 황 함유 아미노산: 시스테인 (-1.0) 및 메티오닌 (-1.3); 소수성, 비방향족 아미노산: 발린 (-1.5), 류신 (-1.8), 이소류신 (-1.8), 프롤린 (-0.5 ± 1), 알라닌 (-0.5), 및 글리신 (0); 소수성, 방향족 아미노산: 트립토판 (-3.4), 페닐알라닌 (-2.5), 및 티로신 (-2.3).

[0178] 예를 들어, 아미노산은 유사한 친수성을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있고, 생물학적으로 또는 면역학적으로 변형된 단백질을 생성할 수 있다. 이러한 변화에서, 친수성 값이 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, 친수성 값이 ± 1 이내인 아미노산의 치환이 특히 바람직하며, 친수성 값이 ± 0.5 이내인 아미노산의 치환이 더욱더 특히 바람직하다.

[0179] 상기 개괄된 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환기의 상대적 유사성, 예를 들어, 이의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등을 기초로 한다. 상기의 다양한 특징을 고려하는 예시적인 치환은 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 아르기닌 및 리신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신을 포함한다.

[0180] 본 발명은 또한 이소타입 변형에 관한 것이다. 상이한 이소타입을 갖도록 Fc 영역을 변형함으로써, 상이한 기능성을 달성할 수 있다. 예를 들어, IgG_1로 변경하면, 항체 의존성 세포 세포독성이 증가할 수 있고, 클래스 A로 전환하면, 조직 분포가 개선될 수 있으며, 클래스 M으로 전환하면 원자가가 개선될 수 있다.

[0181] 대안적으로 또는 추가로, 아미노산 변형을 IL-23p19 결합 분자의 Fc 영역의 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC) 기능을 변경하는 하나 이상의 추가 아미노산 변형과 조합하는 것이 유용할 수 있다. 특히 관심 결합 폴리펩티드는 C1q에 결합하고, 보체 의존성 세포독성을 나타내는 것일 수 있다. 임의적으로 CDC를 매개하는 능력을 추가로 갖는 기존 C1q 결합 활성을 갖는 폴리펩티드는 이들 활성 중 하나 또는 둘 모두가 증진되도록 변형될 수 있다. C1q를 변경 및/또는 이의 보체 의존성 세포독성 기능을 변경하는 아미노산 변형은, 예를 들어, WO/0042072 (이는 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있다.

[0182] 예컨대, C1q 결합 및/또는 FcγR 결합을 변형하고, 이로써, CDC 활성 및/또는 ADCC 활성을 변경함으로써 이펙터 기능이 변경된 항체의 Fc 영역을 디자인할 수 있다. "이펙터 기능"은 (예컨대, 대상체에서) 생물학적 활성을 활성화시키거나, 또는 감소시키는 역할을 한다. 이펙터 기능의 예는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC); 식세포 작용; 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 이펙터 기능은 Fc 영역이 결합 도메인 (예컨대, 항체 가변 도메인)과 결합될 것을 필요로 할 수 있으며, 다양한 검정법 (예컨대, Fc 결합 검정법, ADCC 검정법, CDC 검정법 등)을 사용하여 평가될 수 있다.

[0183] 예를 들어, C1q 결합이 개선되고, FcγRIII 결합이 개선된 (예컨대, ADCC 활성이 개선되고, CDC 활성도 개선된) 항체의 변이체 Fc 영역을 생성할 수 있다. 대안적으로, 이펙터 기능이 감소되거나, 제거되는 것이 바람직하다면, 변이체 Fc 영역은 감소된 CDC 활성 및/또는 감소된 ADCC 활성을 갖도록 조작될 수 있다. 다른 실시양태에서, 이들 활성 중 단 하나만이 증가될 수 있고, 임의적으로, 다른 활성은 감소될 수 있다 (예컨대, ADCC 활성은 개선되지만, CDC 활성이 감소된 Fc 영역 변이체를 생성하기 위해, 및 그 반대의 Fc 영역 변이체를 생성하기 위해).

[0184] **FcRn 결합**. Fc 돌연변이는 또한 신생아 Fc 수용체 (FcRn)와의 상호작용을 변경하고, 이의 약동학적 특징을 개선시키기 위해 도입되고, 조작될 수 있다. FcRn에 대한 결합이 개선된 인간 Fc 변이체 집합이 기술되었다 (문헌 [Shields *et al.*, (2001)]). FcγRI, FcγRII, FcγRIII, 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 부위의 고해상도 맵핑 및 FcγR에 대한 결합이 개선된 IgG1 변이체의 디자인 (문헌 [J. Biol. Chem. 276:6591-6604]). 알라닌 스캐닝 돌연변이유발, 무작위 돌연변이유발, 및 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합 및/또는 생체내 거동을 평가하기 위한 스크리닝을 포함하는 기술을 통해 생성될 수 있는 아미노산 변형을 포함하여, 반감기를 증가시킬 수 있는 많은 방법이 공지되어 있다 (문헌 [Kuo and Aveson, (2011)]). 계산 전략법에 이은 돌연변이유발 또한 돌연변이시키고자 하는 아미노산 돌연변이 중 하나를 선택하는 데 사용될 수 있다.

[0185] 따라서, 본 개시내용은 FcRn에 대한 결합이 최적화된 항원 결합 단백질의 변이체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항원 결합 단백질의 상기 변이체는 상기 항원 결합 단백질의 Fc 영역에 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하고, 여기서, 상기 변형은 상기 모체 폴리펩티드와 비교하여 Fc 영역의 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 및 447로 구성된 군으로부터 선택되고, 여기서, Fc 영역의 아미노산 넘버링은 카바트의 EU 인덱스 넘버링이다. 본 개시내용의 추가 측면에서, 변형은 M252Y/S254T/T256E이다.

[0186] FcRn-결합 폴리펩티드를 분자에 도입하거나, 분자를 FcRn-결합 친화도는 유지되지만, 다른 Fc 수용체에 대한 친화도가 크게 감소된 항체와 융합하거나, 항체의 FcRn 결합 도메인과 융합하여 반감기가 변형된 생리적 활성 분자를 수득하는 방법이 다양한 공개문헌에 기술되어 있다 (예컨대, 문헌 [Kontermann (2009)] 참조).

[0187] 유도체화된 항체는 포유동물, 특히, 인간에서 모체 항체의 반감기 (예컨대, 혈청 반감기)를 변경하는 데 사용될 수 있다. 이러한 변경을 통해 결과적으로 반감기는 15일 초과, 바람직하게, 20일 초과, 25일 초과, 30일 초과, 35일 초과, 40일 초과, 45일 초과, 2개월 초과, 3개월 초과, 4개월 초과, 또는 5개월 초과가 될 수 있다. 포유동물, 바람직하게, 인간에서 본 개시내용의 항체 또는 이의 단편의 반감기 증가는 포유동물에서 상기 항체 또는

항체 단편의 혈청 역가를 높이고, 따라서, 상기 항체 또는 항체 단편의 투여 빈도를 감소시키고/거나, 투여하고자 하는 상기 항체 또는 항체 단편의 농도를 감소시킨다. 생체내 반감기가 증가된 항체 또는 이의 단편은 당업자에게 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 생체내 반감기가 증가된 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호 작용에 관여하는 것으로 확인된 아미노산 잔기를 변형 (예컨대, 치환, 결실 또는 부가)함으로써 생성될 수 있다.

[0188] 문헌 [Beltramello *et al.* (2010)]은 이전에, (C-도메인에 대한 IMGT 고유 넘버링에 따라) CH2 도메인의 위치 1.3 및 1.2에 있는 류신 잔기가 알라닌 잔기로 치환된 것을 생성함으로써 뎅기 바이러스 감염을 증진시키는 경향에 기인하여 중화 mAb의 변형을 보고하였다. 문헌 [Hessell *et al.* (2007)]에 기술된 바와 같이, "LALA" 돌연변이로도 공지된 상기 변형은 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIIIa에 대한 항체 결합을 폐지한다. 변이체 및 비변형 재조합 mAb를 4개의 뎅기 바이러스 혈청형에 의한 감염을 중화하고, 증진하는 능력에 대해 비교하였다. LALA 변이체는 비변형 mAb와 동일한 중화 활성을 유지했지만, 증진 활성이 전혀 없었다. 따라서, 이러한 성질의 LALA 돌연변이 또한 본 개시된 항체와 함께 사용될 수 있다

[0189] **변경된 글리코실화**. 본 개시내용의 특정 실시양태는 시알산, 갈락토스 또는 푸코스 없이 실질적으로 균질한 글리칸을 함유하는, 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이다. 실시양태에서, 모노클로날 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 이들 모두는 각각 중쇄 또는 경쇄 불변 영역에 부착될 수 있다. 상기 언급된 실질적으로 균질한 글리칸은 중쇄 불변 영역에 공유 결합될 수 있다.

[0190] 본 개시내용의 또 다른 실시양태는 신규 Fc 글리코실화 패턴을 갖는 mAb를 포함한다. 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 GNGN 또는 G1/G2 글리코폼으로 표시되는 실질적으로 균질한 조성물로 존재한다. Fc 글리코실화는 치료용 mAb의 항바이러스 및 항암 특성에서 중요한 역할을 한다. 시험관내에서 푸코스가 없는 항-HIV mAb의 증가된 항-렌티바이러스 세포 매개된 바이러스 억제를 보여주는 최근 연구와 일치한다.

[0191] GNGN 또는 G1/G2 글리코폼으로 표시되는 실질적으로 균질한 조성물을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 실질적으로 균질한 GNGN 글리폼이 없고, G0, G1F, G2F, GNF, GNGNF 또는 GNGNFX 함유 글리코폼이 있는 동일한 항체에 비해 Fc 감마 RI 및 Fc 감마 RIII에 대해 증가된 결합 친화도를 나타낸다. 본 개시내용의 한 실시양태에서, 항체는 1×10^{-8} M 이하의 Kd로 Fc 감마 RI로부터, 및 1×10^{-7} M 이하의 Kd로 Fc 감마 RIII으로부터 해리된다.

[0192] Fc 영역의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결이다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 지칭한다. O-연결 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 나타내지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신도 사용될 수 있다. 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄 펩티드 서열에 효소적으로 부착하기 위한 인식 서열은 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌이며, 여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다. 따라서, 폴리펩티드 중의 상기 펩티드 서열 중 어느 하나의 존재는 글리코실화 부위를 생성할 수 있다.

[0193] 글리코실화 패턴은, 예를 들어, 폴리펩티드에서 발견되는 하나 이상의 글리코실화 부위(들)를 결실시키고/거나, 폴리펩티드에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위(들)를 부가함으로써 변경될 수 있다. 항체의 Fc 영역에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 하나 이상의 상기-기술된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 예시적인 글리코실화 변이체는 중쇄의 잔기 Asn 297의 아미노산 치환을 갖는다. 변경은 또한 원래 폴리펩티드 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 부가하거나, 그에 의해 치환함으로써 이루어질 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우). 추가로, Asn 297을 Ala로 변이시키면 글리코실화 부위 중 하나가 제거될 수 있다.

[0194] 특정 실시양태에서, 항체는 베타 (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 III (GnT III)을 발현하는 세포에서 발현되어 GnT III이 IL-23p19 항체에 GlcNAc를 부가한다. 이러한 방식으로 항체를 제조하는 방법은 WO/9954342, WO/03011878, 특허 공개 20030003097A1, 및 문헌 [Umana *et al.*, Nature Biotechnology, 17:176-180, February 1999]에 제공되어 있다. 예컨대, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복부(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: CRISPR)와 같은 게놈 편집 기술을 사용하여 예컨대, 글리코실화와 같은 특정 번역 후 변형을 증진시키거나, 또는 감소하거나, 또는 제거하기 위해 세포주를 변경시킬 수 있다. 예를 들어, CRISPR 기술은 재조합 모노클로날 항체를 발현하기 위해 사용되는 293 또는 CHO 세포에서 글리코실화 효소를 코딩하는 유전자를 제거하기 위해 사용될 수 있다.

[0195] **모노클로날 항체 단백질 서열 책임(liability) 제거**. 인간 B 세포에서 수득된 항체 가변 유전자 서열을 조작하여 이의 제조가능성과 안전성을 증진시킬 수 있다. 단백질 서열 책임은 하기의 것을 포함하는 부위와 연관된 서열 모티프를 검색함으로써 확인할 수 있다:

[0196] 1) 쌍을 형성하지 않는 Cys 잔기,

[0197] 2) N-연결된 글리코실화,

[0198] 3) Asn 탈아미드화,

[0199] 4) Asp 이성질체화,

[0200] 5) SYE 말단절단,

[0201] 6) Met 산화,

[0202] 7) Trp 산화,

[0203] 8) N-말단 글루타메이트,

[0204] 9) 인테그린 결합,

[0205] 10) CD11c/CD18 결합, 또는

[0206] 11) 단편화.

[0207] 상기 모티프는 재조합 항체를 코딩하는 cDNA의 합성 유전자를 변경하여 제거될 수 있다.

[0208] 치료용 항체 개발 분야에서의 단백질 조작 노력은 특정 서열 또는 잔기가 용해도 차이와 연관되어 있다는 것을 분명히 보여준다 (문헌 [Fernandez-Escamilla *et al.*, *Nature Biotech.*, 22 (10), 1302-1306, 2004]; [Chennamsetty *et al.*, *PNAS*, 106 (29), 11937-11942, 2009]; [Voynov *et al.*, *Biocon. Chem.*, 21 (2), 385-392, 2010]). 문헌에서 용해도-변경 돌연변이의 증거는 예컨대, 아스파르트산, 글루탐산 및 세린과 같은 일부 친수성 잔기가 예컨대, 아스파라긴, 글루타민, 트레오닌, 리신 및 아르기닌과 같은 다른 친수성 잔기보다 단백질 용해도에 훨씬 더 유리하게 기여한다는 것을 나타낸다.

[0209] **안정성**. 항체는 증진된 생물물리적 특성을 위해 조작될 수 있다. 평균 겉보기 용융 온도를 사용하여 상대적 안정성을 결정하기 위해 항체를 언폴딩하는 데 고온을 사용할 수 있다. 시차 주사 열량측정법 (DSC)은 분자의 열용량, C_p (1도당 온도를 높이는 데 필요한 열)를 온도의 함수로 측정한다. DSC를 사용하여 항체의 열 안정성을 연구할 수 있다. mAb에 대한 DSC 데이터는 mAb 구조 내에서 개별 도메인의 언폴딩을 해결하여 (Fab, C_H2, 및 C_H3 도메인의 언폴딩으로부터) 써모그램에서 최대 3개의 피크를 생성하기 때문에 특히 흥미롭다. 전형적으로, Fab 도메인의 언폴딩은 가장 강한 피크를 생성한다. Fc 부분의 DSC 프로파일 및 상대적 안정성은 인간 IgG_1, IgG_2, IgG_3, 및 IgG_4 하위부류에 대한 특징적인 차이를 보여준다 (문헌 [Garber and Demarest, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 751-757, 2007]). CD 분광계로 수행되는 원편광 이색성 (CD)을 사용하여 평균 겉보기 용융 온도를 측정할 수도 있다. 200 내지 260 nm 범위에서 0.5 nm 증분으로 항체에 대한 원자외선 CD 스펙트럼을 측정할 것이다. 최종 스펙트럼은 20회 누적 평균으로 결정될 수 있다. 잔류 타원도 값은 배경을 공제한 후에 계산될 수 있다. 항체 (0.1 mg/mL)의 열적 언폴딩은 25-95℃에서 1℃/분의 가열 속도로 235 nm에서 모니터링될 수 있다. 동적 광 산란 (DLS)을 사용하여 응집 경향을 평가할 수 있다. DLS는 단백질을 포함한 다양한 입자의 크기를 특징화하는 데 사용된다. 시스템의 크기가 분산되지 않은 경우, 입자의 평균 유효 직경을 결정할 수 있다. 이 측정은 입자 코어의 크기, 표면 구조의 크기, 및 입자 농도에 따라 달라진다. DLS는 본질적으로 입자로 인한 산란광 강도의 변동을 측정하기 때문에, 입자의 확산 계수를 결정할 수 있다. 상업용 DLA 장치의 DLS 소프트웨어는 상이한 직경의 입자 집단을 나타낸다. 안정성 연구는 DLS를 사용하여 편리하게 수행될 수 있다. 샘플의 DLS 측정은 입자의 유체 역학적 반경이 증가하는지를 결정하여 입자가 시간이 지남에 따라 또는 온도가 변함에 따라 응집되는지를 보여줄 수 있다. 입자가 응집되면, 반경이 더 큰 입자의 더 큰 집단을 알 수 있다. 온도에 따른 안정성은 계내에서 온도를 제어함으로써 분석될 수 있다. 모세관 전기영동 (CE) 기술은 항체 안정성의 특징을 결정하기 위한 입증된 방법을 포함한다. iCE 접근법을 사용하여 탈아미드화, C-말단 리신, 시알릴화, 산화, 글리코실화 및 단백질의 pI 변화를 초래할 수 있는 단백질에 대한 임의의 다른 변이에 기인하여 항체 단백질 전하 변이체를 분석할 수 있다. 각각의 발현된 항체 단백질은 프로테인 심플 모리스(Protein Simple

Maurice) 장치를 사용하여 모세관 칼럼 (cIEF)에서 고처리량, 유리 용액 등전점 포커싱 (IEF)으로 평가될 수 있다. 등전점 (pI)에 초점을 맞추는 분자의 실시간 모니터링을 위해 30초마다 전체 칼럼 UV 흡수 검출을 수행할 수 있다. 이 접근법은 이동 단계의 필요성을 제거하면서 기존 겔 IEF의 고해상도와 칼럼-기반 분리에서 발견되는 정량화 및 자동화의 장점을 결합한다. 이 기술은 발현된 항체에 대한 아이덴티티, 순도 및 이질성 프로파일의 재현 가능한 정량 분석을 산출한다. 결과는 흡광도 및 고유 형광 검출 모드 둘 모두를 사용하고, 0.7 μg/mL에 이르는 검출 감도로 항체에 대한 전하 이질성 및 분자 크기를 확인한다.

[0210] **용해도**. 항체 서열의 고유 용해도 점수를 결정할 수 있다. 고유 용해도 점수는 캠솔 인트링식(CamSol Intrinsic)을 사용하여 계산될 수 있다 (문헌 [Sormanni *et al.*, *J Mol Biol* 427, 478-490, 2015]). 예컨대, scFv와 같은 각 항체 단편의 HCDR3에서 잔기 95-102 (카바트 넘버링)에 대한 아미노산 서열은 용해도 점수를 계산하기 위해 온라인 프로그램을 통해 평가될 수 있다. 또한, 실험실 기술을 사용하여 용해도를 결정할 수 있다. 용액이 포화되고, 용해도 한계에 도달할 때까지, 동결건조된 단백질을 용액에 첨가하거나, 적합한 분자량 컷오프가 있는 미세농축기에서 한외여과에 의해 농축하는 것을 포함하는 다양한 기술이 존재한다. 가장 간단한 방법은 황산암모늄을 사용한 단백질 침전을 포함하는 방법을 사용하여 단백질 용해도를 측정하는 비정질 침전 유도이다 (문헌 [Trevino *et al.*, *J Mol Biol*, 366: 449-460, 2007]). 황산암모늄 침전은 상대적 용해도 값에 대한 빠르고, 정확한 정보를 제공한다. 황산암모늄 침전은 잘 정의된 수성 및 고체 상으로 침전된 용액을 생성하며, 비교적 소량의 단백질을 필요로 한다. 황산암모늄에 의한 비정질 침전 유도를 사용하여 수행된 용해도 측정은 다른 pH 값에서도 쉽게 수행될 수 있다. 단백질 용해도는 pH 의존성이 높으며, pH는 용해도에 영향을 미치는 가장 중요한 외인성 요인으로 간주된다.

[0211] **자가반응성**. 일반적으로, 음성 선택에 의해 개체 발생 동안 자가반응성 클론이 제거되어야 한다고 생각되지만, 자가반응 특성을 가진 많은 인간 자연 발생 항체가 성인 성숙한 레퍼토리에서 지속되고, 자가반응성은 병원체에 대한 다수의 항체의 항-병원체 기능을 증진시킬 수 있다는 것이 분명해졌다. 조기 B 세포 발달 동안 항체의 HCDR3 루프에는 종종 양전하가 풍부하고, 자가반응 패턴을 나타낸다는 것에 주의하여야 한다 (문헌 [Wardemann *et al.*, *Science* 301, 1374-1377, 2003]). 현미경법 (부착성 HeLa 또는 HEp-2 상피 세포 사용) 및 유세포 분석법에 의한 세포 표면 염색 (현탁 주르카트(Jurkat) T 세포 및 293S 인간 배아 신장 세포 사용)에서 인간 기원 세포에 대한 결합 수준을 평가하여 주어진 항체의 자가반응성을 시험할 수 있다. 조직 어레이에서 조직에 대한 결합 평가를 사용하여 자가반응성을 조사할 수도 있다.

[0212] **바람직한 잔기 ("인간 유사성(Human Likeness)")**. 혈액 기증자로부터 인간 B 세포의 B 세포 레퍼토리 심층 시퀀싱은 많은 최근 연구에서 광범위하게 수행되고 있다. 인간 항체 레퍼토리의 상당 부분에 대한 서열 정보는 건강한 인간에게 공통적인 항체 서열 특징의 통계적 평가를 용이하게 한다. 인간 재조합 항체 가변 유전자 참조 데이터베이스의 항체 서열 특징에 대한 지식을 통해 항체 서열의 "인간 유사성" (HL)의 위치 특이적 정도를 추정할 수 있다. HL은 치료용 항체 또는 백신으로서의 항체와 같은 임상 사용에서 항체 개발에 유용한 것으로 나타났다. 목표는 항체 약물의 효능을 현저히 감소시키거나, 건강에 심각한 영향을 미칠 수 있는 부작용과 항-항체 면역 반응을 줄이기 위해 항체의 인간 유사성을 증가시키는 것이다. 총 약 4억 개의 서열의 3명의 건강한 인간 혈액 기증자의 조합된 항체 레퍼토리의 항체 특성을 평가할 수 있고, 항체의 초가변 영역에 초점을 맞춘 새로운 "상대 인간 유사성" (rHL) 점수를 생성할 수 있다. rHL 점수는 인간 (양의 값인 점수)과 비인간 서열(음의 값인 점수)을 쉽게 구별할 수 있게 한다. 항체는 인간 레퍼토리에서 일반적이지 않은 잔기를 제거하도록 조작될 수 있다.

[0213] **D. 단일 쇄 항체**

[0214] 단일 쇄 가변 단편 (scFv)은 짧은 (보통 세린, 글리신) 링커와 함께 연결된 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 융합물이다. 이 키메라 분자는 불변 영역의 제거와 링커 펩티드의 도입에도 불구하고, 원래의 면역글로불린의 특이성을 유지한다. 이 변형은 일반적으로 특이성을 변경하지 않고 그대로 유지시킨다. 이들 분자는 역사적으로 단일 펩티드로서 항원 결합 도메인을 발현하는 것이 매우 편리한 파지 디스플레이를 용이하게 하기 위해 생성되었다. 대안적으로, scFv는 하이브리도마 또는 B 세포로부터 유래된 서브클로닝된 중쇄 및 경쇄로부터 직접 생성될 수 있다. 단일 쇄 가변 단편에는 완전한 항체 분자에서 발견되는 불변 Fc 영역, 및 따라서, 항체를 정제하는 데 사용되는 공통 결합 부위 (예컨대, 단백질 A/G)가 없다. 상기 단편은 단백질 L이 카파 경쇄의 가변 영역과 상호작용하기 때문에 종종 단백질 L을 사용하여 정제/고정될 수 있다.

[0215] 가요성 링커는 일반적으로 예컨대, 알라닌, 세린 및 글리신과 같은 나선- 및 선회부-촉진 아미노산 잔기로 구성된다. 그러나, 다른 잔기도 또한 작용할 수 있다. 탕(Tang) 등 (1996)은 단백질 링커 라이브러리로부터 단일 쇄

항체 (scFv)에 대한 맞춤형 링커를 빠르게 선택하는 수단으로 파지 디스플레이를 사용하였다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대한 유전자가 가변 조성의 18개 아미노산 폴리펩티드를 코딩하는 세그먼트로 연결된 무작위 링커 라이브러리를 구축하였다. scFv 레퍼토리 (대략 5 x 10^6개의 다른 구성원)는 사상 파지 상에 제시되었고, 그에 대해 합텐을 사용한 친화성 선택을 수행하였다. 선택된 변이체 집단은 결합 활성에서 상당한 증가를 보였지만, 상당한 서열 다양성을 유지하였다. 이어서, 1054개의 개별 변이체를 스크리닝하여 가용성 형태로 효율적으로 생성된 촉매 활성 scFv가 생성되었다. 서열 분석 결과, V_H C 말단에서 링커 중 보존된 프롤린, V_H C 말단 뒤 2개의 잔기, 및 선택된 테터의 유일한 공통 특징으로서 다른 위치의 아르기닌 및 프롤린의 존재가 나타났다.

[0216] 본 개시내용의 재조합 항체는 또한 수용체의 이량체화 또는 다량체화를 허용하는 서열 또는 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 서열에는 IgA로부터 유래된 서열이 포함되며, 이는 J-쇄와 함께 다량체의 형성을 허용한다. 또 다른 다량체화 도메인은 Gal4 이량체화 도메인이다. 다른 실시양태에서, 쇄는 두 항체의 조합을 허용하는 예컨대, 비오틴/아비딘과 같은 제제로 변형될 수 있다.

[0217] 별도의 실시양태에서, 단일 쇄 항체는 비펩티드 링커 또는 화학적 단위를 사용하여 수용체 경쇄 및 중쇄를 연결함으로써 생성될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 별개의 세포에서 생산되고, 정제된 후, 적절한 방식으로 함께 연결될 것이다 (즉, 중쇄의 N-말단은 적절한 화학적 가교를 통해 경쇄의 C-말단에 부착).

[0218] 가교 시약은 2개의 상이한 분자, 예컨대, 안정화제 및 응고제의 작용기를 묶는 분자 브릿지를 형성하는 데 사용된다. 그러나, 동일한 유사체의 이량체 또는 다량체 또는 상이한 유사체로 구성된 헤테로머 복합체가 생성될 수 있다. 2개의 상이한 화합물을 단계적으로 연결하기 위해, 원하지 않는 동종중합체 형성을 제거하는 이종이작용성 가교제가 사용될 수 있다.

[0219] 예시적인 헤테로-이작용성 가교제는 2개의 반응성 기를 함유하는데: 하나는 1급 아민 기 (예컨대, N-히드록시숙신이미드)와 반응하고, 나머지 다른 하나는 티올 기 (예컨대, 피리딜 디술피드, 말레이미드, 할로겐 등)와 반응한다. 1급 아민 반응성 기를 통해 가교제는 한 단백질 (예컨대, 선택된 항체 또는 단편)의 리신 잔기(들)와 반응할 수 있으며, 티올 반응성 기를 통해, 이미 제1 단백질에 묶인 가교제는 나머지 다른 한 단백질 (예컨대, 선택제)의 시스테인 잔기 (유리 술프히드릴 기)와 반응한다.

[0220] 실시양태에서, 혈액 중에서 적당한 안정성을 갖는 가교제를 사용할 수 있다. 표적화제 및 치료제/예방제를 접합시키는 데 성공적으로 사용될 수 있는 수많은 타입의 디술피드 결합 함유 링커가 공지되어 있다. 입체적으로 방해되는 디술피드 결합을 포함하는 링커는 생체내에서 더 큰 안정성을 제공하여 작용 부위에 도달하기 전에 표적화 펩티드의 방출을 방지하는 것으로 입증될 수 있다. 따라서, 상기 링커는 연결제들의 한 군이다.

[0221] 또 다른 가교 시약은 인접한 벤젠 고리 및 메틸 기에 의해 "입체적으로 방해되는" 디술피드 결합을 함유하는 이작용성 가교제인 SMPT이다. 디술피드 결합의 입체 장애는 조직과 혈액에 존재할 수 있는 글루타티온과 같은 티올레이트 음이온에 의한 공격으로부터 결합을 보호하는 기능을 하며, 이에 따라 표적 부위에 부착된 제제를 전달하기 전에 접합체의 분리를 방지하는 데 도움이 된다고 여겨진다.

[0222] 다른 많은 공지된 가교 시약과 마찬가지로, SMPT 가교 시약은 예컨대, 시스테인의 SH 또는 1급 아민 (예컨대, 리신의 엡실론 아미노 기)과 같은 작용기를 가교하는 능력을 제공한다. 또 다른 타입의 가교제는 예컨대, 술포숙신이미딜-2-(p-아지도 살리실아미도)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트와 같은 절단가능한 디술피드 결합을 함유하는 헤테로-이작용성 광반응성 페닐아지드를 포함한다. N-히드록시-숙신이미딜 기는 1급 아미노 기와 반응하고, 페닐아지드 (광분해시)는 임의의 아미노산 잔기와 비-선택적으로 반응한다.

[0223] 방해된 가교제 이외에도, 방해되지 않은 링커 또한 이에 따라 사용될 수 있다. 보호된 디술피드를 포함하거나, 또는 생성하는 것으로 간주되지 않는 다른 유용한 가교제로는 SATA, SPDP 및 2-이미노티올란을 포함한다 (문헌 [Wawrzynczak & Thorpe, 1987]). 상기 가교제의 사용은 당업계에서 잘 이해되고 있다. 또 다른 실시양태는 가요성 링커의 사용을 포함한다.

[0224] 미국 특허 4,680,338은 아민-함유 중합체 및/또는 단백질과 리간드의 접합체를 생산하는 데, 특히, 킬레이터, 약물, 효소, 검출가능한 표지 등과 항체 접합체를 형성하는 데 유용한 이작용성 링커를 기술한다. 미국 특허 5,141,648 및 5,563,250은 다양한 온화한 조건하에서 절단가능한 불안정한 결합을 포함하는 절단가능한 접합체를 개시한다. 이 링커는 관심 작용제가 링커에 직접 결합될 수 있고, 절단으로 인해 활성제가 방출된다는 점에서 특히 유용하다. 특정 용도로는 예컨대, 항체 또는 약물과 같은 단백질에 유리 아미노 또는 유리 술프히드릴 기를 첨가하는 것을 포함한다.

[0225] 미국 특허 5,856,456은 융합 단백질, 예컨대, 단일 쇄 항체를 제조하기 위해 폴리펩티드 구성요소를 연결하는데 사용하기 위한 펩티드 링커를 제공한다. 링커의 길이는 최대 약 50개의 아미노산 길이이고, 하전된 아미노산(바람직하게, 아르기닌 또는 리신)과 그 뒤에 프롤린이 적어도 1회 존재하는 것을 포함하며, 더 큰 안정성과 감소된 응집을 특징으로 한다. 미국 특허 5,880,270은 다양한 면역진단 및 분리 기술에 유용한 아미노옥시-함유 링커를 개시한다.

[0226] **E. 다중특이적 항체**

[0227] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 이중특이적 또는 다중특이적이다. 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적인 이중특이적 항체는 단일 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 상기 항체는 제1 항원 결합 부위를 제2 항원에 대한 결합 부위와 조합할 수 있다. 대안적으로, 항-병원체 아암을 예컨대, T 세포 수용체 분자 (예컨대, CD3) 또는 IgG에 대한 Fc 수용체 (FcγR), 예컨대, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) 및 Fc 감마 RIII (CD16)과 같은 백혈구 상의 촉발 분자에 결합하는 아암과 조합하여 세포 방어 기전을 감염된 세포에 집중화시키고, 국재화시킬 수 있다. 또한, 이중특이적 항체를 사용하여 세포독성제를 감염된 세포에 국재화시킬 수 있다. 상기 항체는 병원체-결합 아암 및 세포독성제 (예컨대, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토트렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)에 결합하는 아암을 보유한다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예컨대, $F(ab')_2$ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다. WO 96/16673 은 이중특이적 항-ErbB2/항-Fc 감마 RIII 항체를 기술하고, 미국 특허 5,837,234는 이중특이적 항-ErbB2/항-Fc 감마 RI 항체를 개시한다. 이중특이적 항-ErbB2/Fc 알파 항체는 WO98/02463에 제시되어 있다. 미국 특허 5,821,337은 이중특이적 항-ErbB2/항-CD3 항체를 교시한다.

[0228] 이중특이적 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 제조는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동 발현에 기초하며, 여기서, 2개의 쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983)]). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 종별로 인해, 상기 하이브리도마 (쿼드로마)는 10개의 상이한 항체 분자의 혼합물을 생성하며, 그 중 하나만 올바른 이중특이적 구조를 갖는다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 올바른 분자의 정제는 다소 번거롭고, 제품 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829, 및 문헌 [Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0229] 상이한 접근법에 따라, 원하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 영역 (항체-항원 결합 부위)이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게, 융합물은 힌지, C_{H2} 및 C_{H3} 영역의 적어도 일부를 포함하는 Ig 중쇄 불변 도메인과의 것이다. 적어도 하나의 융합물에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 포함하는 제1 중쇄 불변 영역 (C_{H1})을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합물, 및 원하는 경우, 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 별도의 발현 벡터에 삽입되고, 적합한 숙주 세포로 공동 형질감염된다. 이는 구축에 사용된 3개의 폴리펩티드 쇄의 동일하지 않은 비율이 원하는 이중특이적 항체의 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는 데 더 큰 유연성을 제공한다. 동일한 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 쇄의 발현이 높은 수율을 가져오거나, 비율이 원하는 쇄 조합의 수율에 유의한 영향을 미치지 않는 경우, 2개 또는 3개 모두의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 단일 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0230] 상기 접근법의 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한 아암에서 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 나머지 다른 한 아암에서 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성 제공)으로 구성된다. 상기 비대칭 구조는, 이중특이적 분자의 절반에만 면역글로불린 경쇄가 존재하면 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 원치않는 면역글로불린 쇄 조합으로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다는 것이 밝혀졌다. 이 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체 생성에 대한 추가 상세한 설명에 대해서는 예를 들어, 문헌 [Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0231] 미국 특허 5,731,168에 기술된 또 다른 접근법에 따라, 한 쌍의 항체 분자 사이의 계면은 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 비율을 최대화하도록 조작될 수 있다. 바람직한 계면은 C_{H3} 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이 방법에서, 1차 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 더 큰 측쇄 (예컨대,티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄 (예컨대, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)와 동일하거나, 유사한 크기의 보상성 "공동"이 제2 항체 분자의 계면에 생성된다. 이는 예컨대, 동종이량체와 같은 다른 원치않은 최종-생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 기전을 제공한다.

[0232] 이중특이적 항체는 가교된 또는 "이종접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이종접합체의 항체 중 하나는 아비딘에 결합되고, 다른 하나는 비오틴에 결합될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 면역계 세포를 원치않는 세포로 표적화하는 데 (미국 특허 4,676,980), HIV 감염 치료 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089)를 위해 제안되었다. 이종접합체 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제는 당업계에 널리 공지되어 있고, 여러 가교 기술과 함께 미국 특허 4,676,980에 개시되어 있다.

[0233] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술도 문헌에 기술되었다. 예를 들어, 화학적 연결을 사용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)]에는 무손상 항체를 단백질분해로 절단하여 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 방법이 기술되어 있다. 상기 단편은 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원되어 인접 디티올을 안정화시키고, 분자간 디술피드물 형성을 방지한다. 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. 이어서, Fab'-TNB 유도체 중 하나는 메르캅토에틸아민을 사용한 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로 사용될 수 있다.

[0234] 화학적으로 커플링되어 이중특이적 항체를 형성할 수 있는 E. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접적인 회수를 촉진하는 기술이 존재한다. 문헌 [Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]에는 인간화 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 생산이 기술되어 있다. 각각의 Fab' 단편은 E. 콜라이로부터 개별적으로 분비되었고, 시험관내에서 유도 화학 커플링을 거쳐 이중특이적 항체를 형성하였다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 유발할 수 있었다.

[0235] 재조합 세포 배양물로부터 직접 이중특이적 항체 단편을 제조하고 단리하기 위한 다양한 기술 또한 기술되었다 (문헌 [Merchant *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **16**, 677-681 (1998). doi:10.1038/nbt0798-677pmid:9661204]). 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다 (문헌 [Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5):1547-1553, 1992]). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드는 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 힌지 영역에서 환원되어 단량체를 형성한 후, 이엇, 다시 산화되어 항체 이종이량체를 형성하였다. 이 방법은 또한 항체 동종이량체의 생산에도 사용될 수 있다. 문헌 [Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기술된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편을 제조하는 대체 기전을 제공하였다. 상기 단편은 동일한 쇄 상의 두 도메인 사이에 쌍이 형성될 수 있도록 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 V_L에 연결된 V_H를 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인은 또 다른 단편의 상보적 V_L 및 V_H 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원-결합 부위를 형성하게 된다. 단일 쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하는 또 다른 전략법도 보고되었다. 문헌 [Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994)]를 참조한다.

[0236] 특정 실시양태에서, 이중특이적 또는 다중특이적 항체는 DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) 복합체로 형성될 수 있다 (예컨대, 미국 특허 7,521,056; 7,527,787; 7,534,866; 7,550,143 및 7,666,400 참조, 상기 특허들 각각의 실시예 섹션은 본원에서 참조로 포함된다). 일반적으로, 이 기술은 cAMP-의존적 단백질 키나제 (PKA)의 조절 (R) 서브유닛의 이량체화 및 도킹 도메인(DDD) 서열과 다양한 AKAP 단백질 중 임의의 것으로부터 유래된 앵커 도메인 (AD) 서열 사이에서 발생하는 특이적 및 고친화성 결합 상호작용을 활용한다 (문헌 [Baillie *et al.*, *FEBS Letters.* 2005; 579: 3264]; [Wong and Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 959]). DDD 및 AD 펩티드는 임의의 단백질, 펩티드 또는 기타 분자에 부착될 수 있다. DDD 서열은 자발적으로 이량체화되고, AD 서열에 결합하기 때문에, 이 기술은 DDD 또는 AD 서열에 부착될 수 있는 임의의 선택된 분자 사이에 복합체를 형성할 수 있게 한다.

[0237] 2가 초과 항체 또한 생산될 수 있다. 예를 들어, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다 (문헌 [Tutt *et al.*, J. Immunol. 147: 60, 1991]; [Xu *et al.*, *Science*, 358(6359):85-90, 2017]). 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 빠르게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 개시내용의 항체는 항체의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 용이하게 생산될 수 있는 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 다가 항체 (예컨대, 4가 항체)일 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다 (또는 이로 구성된다). 이 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역에 대한 아미노-말단에 있는 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본원에서 바람직한 다가 항체는 3개 내지 약 8개, 그러나, 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다

(또는 이로 구성된다). 다가 항체는 적어도 하나의 폴리펩티드 쇄 (및 바람직하게는 2개의 폴리펩티드 쇄)를 포함하고, 여기서, 폴리펩티드 쇄(들)는 2개 이상의 가변 영역을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 쇄(들)는 VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc를 포함할 수 있으며, 여기서, VD1은 제1 가변 영역이고, VD2는 제2 가변 영역이고, Fc는 Fc 영역의 한 폴리펩티드 쇄이고, X1 및 X2는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1이다. 예를 들어, 폴리펩티드 쇄(들)는 VH-CH1-가요성 링커-VH-CH1-Fc 영역 쇄; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 영역 쇄를 포함할 수 있다. 본원의 다가 항체는 바람직하게는 적어도 2개 (바람직하게, 4개)의 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 본원의 다가 항체는, 예를 들어, 약 2개 내지 약 8개의 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 경쇄 가변 영역 폴리펩티드는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 임의적으로, C_L 도메인을 추가로 포함한다.

[0238] 전하 변형은, 이의 결합 아암 중 하나 (또는 2개 초과의 항원-결합 Fab 분자를 포함하는 분자의 경우에는 하나 초과)에서 VH/VL 교환을 통해 Fab-기반 이중특이적/다중특이적 항원 결합 분자의 생산에서 발생할 수 있는, Fab 분자의 아미노산 치환이 경쇄와 매칭되지 않는 중쇄의 미스페어링(mispairing)(벤스-존스(Bence-Jones)-타입 부산물)을 감소시키는 다중특이적 항체의 맥락에서 특히 유용하다 (또한 전문이 본원에 참조로 포함된, PCT 공개 번호 WO 2015/150447, 특히 그 안의 실시예 참조).

[0239] 따라서, 특정 실시양태에서, 치료제에 포함된 항체는

[0240] (a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 분자

[0241] (b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 분자로서, 여기서, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 대체되는 것인 제2 Fab 분자를 포함하고,

[0242] 여기서, 제1 항원은 활성화 T 세포 항원이고, 제2 항원은 표적 세포 항원이거나, 또는 제1 항원은 표적 세포 항원이고, 제2 항원은 활성화 T 세포 항원이고;

[0243] 여기서,

[0244] i) a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산은 양으로 하전된 아미노산에 의해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링), 여기서, a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산은 음으로 하전된 아미노산에 의해 치환되거나 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링); 또는

[0245] ii) b) 하에 제2 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산은 양으로 하전된 아미노산에 의해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링), 여기서, b) 하에 제2 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산은 음으로 하전된 아미노산에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링).

[0246] 특정 실시양태에서, 항체는 i) 및 ii) 하에 언급된 두 변형 모두 포함하지 않는다. 실시양태에서, 제2 Fab 분자의 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되지 않는다 (즉, 교환되지 않고 그대로 유지된다).

[0247] 항체의 또 다른 실시양태에서, a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산은 독립적으로 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링) (한 바람직한 실시양태에서, 독립적으로 리신 (K) 또는 아르기닌 (R)에 의해 치환), 및 a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산은 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링).

[0248] 추가 실시양태에서, a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산은 독립적으로 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링), 및 a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산은 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링).

[0249] 특정 실시양태에서, a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산은 독립적으로 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링) (한 바람직한 실시양태에서, 독립적으로 리신 (K) 또는 아르기닌 (R)에 의해 치환), 위치 123의 아미노산은 독립적으로 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링) (한 바람직한 실시양태에서, 독립적으로 리신 (K) 또는 아르기닌 (R)에 의해 치환), a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산은 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링), 위치 213의 아미노산은 독립적으로 글루탐산 (E), 또는 아스파르트산 (D)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링).

[0250] 추가의 특정 실시양태에서, a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산은 리신 (K)에 의

해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링), 위치 123의 아미노산은 리신 (K) 또는 아르기닌 (R)에 의해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링), a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산은 글루탐산 (E)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링), 위치 213의 아미노산은 글루탐산 (E)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링).

[0251] 추가의 또 다른 특정 실시양태에서, a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산은 리신 (K)에 의해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링), 위치 123의 아미노산은 아르기닌 (R)에 의해 치환되고 (카바트에 따라 넘버링), a) 하에 제1 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산은 글루탐산 (E)에 의해 치환되고 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링), 위치 213의 아미노산은 글루탐산 (E)에 의해 치환된다 (카바트 EU 인덱스에 따라 넘버링).

[0252] **F. 키메라 항원 수용체**

[0253] 인공 T 세포 수용체 (키메라 T 세포 수용체, 키메라 면역수용체, 키메라 항원 수용체 (CAR)로도 공지)는 임의의 특이성을 면역 이펙터 세포에 이식하는 조작된 수용체이다. 전형적으로, 상기 수용체는 레트로바이러스 벡터에 의해 촉진되는 이의 코딩 서열의 전달과 함께 T 세포에 모노클로날 항체의 특이성을 이식하는 데 사용된다. 이러한 방식으로, 다수의 표적 특이적 T 세포가 입양 세포 전달을 위해 생성될 수 있다. 이 접근법의 1상 임상 연구는 효능을 보여준다.

[0254] 상기 분자의 가장 일반적인 형태는 CD3-제타 막횡단 및 엔도도메인에 융합된, 모노클로날 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 단편 (scFv)의 융합물이다. 상기 분자는 이의 표적의 scFv에 의한 인식에 대한 반응으로 제타 신호를 전달한다. 상기 구축의 예로는 (디시알로강글리오사이드 GD2를 인식하는) 하이브리도마 14g2a로부터 유래된 scFv의 융합물인 14g2a-제타가 있다. T 세포가 이 분자를 발현할 때 (보통 온코레트로바이러스 벡터 형질도입에 의해 달성), T 세포는 GD2를 발현하는 표적 세포 (예컨대, 신경모세포종 세포)를 인식하고, 사멸시킨다. 악성 B 세포를 표적화하기 위해, 연구자들은 B 계통 분자인 CD19에 특이적인 키메라 면역수용체를 사용하여 T 세포의 특이성을 재지정한다.

[0255] 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변 부분은 가요성 링커에 의해 융합되어 scFv를 형성한다. 상기 scFv는 초기 단백질을 소포체 및 후속 표면 발현을 유도하기 위해 신호 펩티드가 선행된다 (이는 절단된다). 가요성 스페이서는 항원 결합을 허용하도록 scFv가 다른 방향으로 배향되도록 한다. 막횡단 도메인은 일반적으로 세포로 돌출되어 원하는 신호를 전달하는 신호전달 엔도도메인의 원래 분자에서 유래된 전형적인 소수성 알파 나선이다.

[0256] 타입 I 단백질은 사실상 그 사이에 막횡단 알파 나선에 의해 연결된 2개의 단백질 도메인이다. 막횡단 도메인이 통과하는 세포막 지질 이중층은 내부 부분 (엔도도메인)을 외부 부분 (엑토도메인)으로부터 분리하는 역할을 한다. 한 단백질의 엑토도메인을 다른 단백질의 엔도도메인에 부착하면 전자의 인식을 후자의 신호와 결합하는 분자가 생성된다는 것은 그리 놀라운 일이 아니다.

[0257] **엑토도메인.** 신호 펩티드는 초기 단백질을 소포체로 유도한다. 이는 수용체가 글리코실화되고, 세포막에 고정되어야 하는 경우 필수적이다. 임의의 진핵생물 신호 펩티드 서열은 일반적으로 잘 작동한다. 일반적으로, 대부분의 아미노 말단 성분에 고유하게 부착된 신호 펩티드가 사용된다 (예컨대, 경쇄-링커-중쇄 방향을 갖는 scFv에서는 경쇄의 천연 신호가 사용된다).

[0258] 항원 인식 도메인은 일반적으로 scFv이다. 그러나, 많은 대안이 존재한다. 단순한 엑토도메인 (예컨대, HIV 감염 세포를 인식하는 CD4 엑토도메인) 및 예컨대, (사이토카인 수용체를 보유하는 세포의 인식을 유도하는) 연결된 사이토카인과 같은 추가의 외래 인식 성분을 갖는 것으로서, 천연 T 세포 수용체 (TCR) 알파 및 베타 단일 쇄로부터의 항원 인식 도메인이 기술되었다. 실제로, 주어진 표적에 높은 친화도로 결합하는 거의 모든 것이 항원 인식 영역으로 사용될 수 있다.

[0259] 스페이서 영역은 항원 결합 도메인을 막횡단 도메인에 연결한다. 항원 결합 도메인이 항원 인식을 용이하게 하기 위해 다른 방향으로 배향할 수 있도록 충분히 가요성이어야 한다. 가장 단순한 형태는 IgG1의 힌지 영역이다. 대안으로는 면역글로불린의 CH_2CH_3 영역 및 CD3의 일부를 포함한다. 대부분의 scFv 기반 구축물의 경우, IgG1 힌지로 충분하다. 그러나, 최상의 스페이서는 종종 경험적으로 결정되어야 한다.

[0260] **막횡단 도메인**. 막횡단 도메인은 막을 가로지르는 소수성 알파 나선이다. 일반적으로, 엔도도메인의 가장 가까운 막 근위 구성요소의 막횡단 도메인이 사용된다. 흥미롭게도, CD3-제타 막횡단 도메인을 사용하면 천연 CD3-제타 막횡단 하전된 아스파르트산 잔기의 존재에 의존하는 인자인 천연 TCR에 인공 TCR을 도입할 수 있다. 다른

막횡단 도메인은 다른 수용체 안정성을 초래한다. CD28 막횡단 도메인은 뚜렷이 발현되고, 안정적인 수용체를 생성한다.

[0261] **엔도도메인**. 이는 수용체의 "끝(business-end)"이다. 항원 인식 후, 수용체는 클러스터링되고, 신호가 세포로 전달된다. 가장 일반적으로 사용되는 엔도도메인 구성요소는 3개의 ITAM을 포함하는 CD3-제타이다. 이는 항원이 결합된 후, 활성화 신호를 T 세포로 전달한다. CD3-제타는 완전히 유능한 활성화 신호를 제공하지 않을 수 있으며, 추가 공동자극 신호전달이 요구된다.

[0262] "제1세대" CAR은 전형적으로 내인성 TCR로부터의 신호의 1차 전달자인 CD3ζ 쇄로부터의 세포내 도메인을 가졌다. "제2세대" CAR은 다양한 공동자극 단백질 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인 (예컨대, CD28, 41BB, ICOS)을 CAR의 세포질 테일에 첨가하여 T 세포에 추가 신호를 제공한다. 임상전 연구 결과, 제2세대 CAR 디자인이 T 세포의 항종양 활성을 개선시키는 것으로 나타났다. 더욱 최근의 "제3세대" CAR은 예컨대, CD3z-CD28-41BB 또는 CD3z-CD28-OX40과 같이 다중의 신호전달 도메인을 조합하여 효능을 추가로 증강시킨다.

[0263] **G. ADC**

[0264] 항체 약물 접합체 또는 ADC는 감염성 질환을 앓는 사람들의 치료를 위한 표적화된 요법으로 디자인된 새로운 부류의 매우 강력한 바이오의약품 약물이다. ADC는 불안정한 결합을 갖는 안정된 화학적 링커를 통해 생물학적 활성 세포독성/항-병원체 페이로드 또는 약물에 연결된 항체 (전체 mAb 또는 항체 단편, 예컨대, 단일 쇄 가변 단편 또는 scFv)로 구성된 복합 분자이다. 항체 약물 접합체는 생체 접합체 및 면역접합체의 예이다.

[0265] 모노클로날 항체의 고유한 표적화 능력과 세포독성 약물의 암-살해 능력을 조합함으로써, 항체-약물 접합체는 건강한 조직과 이환 조직 사이를 민감하게 구별할 수 있게 한다. 이는, 전통적인 전신 접근법과 달리, 항체-약물 접합체가 감염 세포를 표적화하고, 이를 공격하여 건강한 세포가 덜 심각하게 영향을 받게 한다는 것을 의미한다.

[0266] ADC-기반 항종양 요법 개발에서, 항암 약물 (예컨대, 세포 독소(cell toxin) 또는 세포독소(cytotoxin))은 특정 세포 마커 (예컨대, 이상적으로는 감염된 세포 내에서 또는 감염된 세포 상에서만 발견되는 단백질)를 특이적으로 표적화하는 항체에 커플링된다. 항체는 상기 단백질을 체내에서 추적하여 암 세포 표면에 부착한다. 항체와 표적 단백질 (항원) 사이의 생화학적 반응은 종양 세포에서 신호를 일으킨 후, 세포독소와 함께 항체를 흡수하거나 내재화한다. ADC가 내재화되면, 세포독성 약물이 방출되어 세포를 사멸시키거나, 병원체의 복제를 손상시킨다. 상기 표적화에 기인하여, 이상적으로 약물은 부작용이 더 낮고, 다른 작용제보다 더 넓은 치료창을 제공한다.

[0267] 항체와 세포독성제/항-병원체 제제 사이의 안정한 연결은 ADC의 중대한 측면이다. 링커는 디술피드, 히드라존 또는 펩티드 (절단가능) 또는 티오에테르 (절단불가능)를 포함한 화학적 모티프를 기반으로 하며, 세포독성제의 표적 세포로의 분포 및 전달을 제어한다. 절단가능 및 절단불가능 타입의 링커는 임상전 및 임상 시험에서 안전한 것으로 입증되었다. 브렌툭시맙 베도틴으로는 강력하고, 독성이 높은 항미세관 제제인 모노메틸 아우리스타틴(Monomethyl auristatin) E 또는 합성 항신생물제인 MMAE를 인간 특이적 CD30-양성 악성 세포에 전달하는 효소-민감성 절단가능한 링커를 포함한다. 튜불린의 중합을 차단하여 세포 분열을 억제하는 MMAE는 독성이 높기 때문에, 단일-제제 화학요법 약물로 사용될 수 없다. 그러나, 항-CD30 모노클로날 항체 (종양 괴사 인자 또는 TNF 수용체의 세포막 단백질인 cAC10)에 연결된 MMAE의 조합은 세포외 체액에서 안정적이고, 카텝신에 의해 절단될 수 있으며, 요법에 안전한 것으로 입증되었다. 다른 승인된 ADC인 트라스투주맙 엠탄신은 메이탄신(Maytansine)의 유도체인 미세관-형성 억제제 머탄신(DM-1)과 안정하고, 절단불가능한 링커에 의해 부착된 항체 트라스투주맙 (허셉틴(Herceptin)®/제넨테크(Genentech)/로슈(Roche))의 조합이다.

[0268] 더 우수하고, 더 안정한 링커의 이용가능성은 화학 결합의 기능을 변화시켰다. 절단가능 또는 절단불가능한 링커 타입은 세포독성 (항암) 약물에 독특한 특성을 부여한다. 예를 들어, 절단불가능한 링커는 약물을 세포 내에 유지시킨다. 그 결과, 전체 항체, 링커 및 세포독성제는 항체가 아미노산 수준으로 분해되는 표적화된 암 세포로 진입한다. 생성된 복합체 (아미노산, 링커 및 세포독성제)는 이제 활성 약물이 된다. 대조적으로, 절단가능한 링커는 세포독성제를 방출하는 숙주 세포에서 효소에 의해 촉매화된다.

[0269] 현재 개발 중에 있는 또 다른 타입의 절단가능한 링커는 세포독성 약물/항-병원체 약물과 절단 부위 사이에 추가 분자를 첨가한다. 이 링커 기술을 통해 연구원들은 절단 동역학적 성질 변화에 대해 걱정하지 않고 더 큰 가요성을 가진 ADC를 생성할 수 있다. 연구원들은 또한 펩티드에서 아미노산을 시퀀싱하는 방법인 에드먼(Edman) 분해를 기반으로 한 새로운 펩티드 절단 방법을 개발하고 있다. ADC 개발의 향후 방향으로는 안정성 및 치료 지

수를 추가로 증진시키기 위한 부위-특이적 접합 (TDC) 및 α 방출 면역접합체 및 항체-접합된 나노입자의 개발도 포함한다.

[0270] **H. BiTE**

[0271] 이중 특이적 T세포 관여항체 (BiTE)는 항암 약물로 사용하기 위해 조사되는 인공 이중특이적 모노클로날 항체의 한 부류이다. 이는 감염된 세포에 대해 숙주의 면역계, 더욱 구체적으로는 T 세포의 세포독성 활성을 지시한다. BiTE는 마이크로메트 아게(Micromet AG)의 등록 상표이다.

[0272] BiTE는 약 55 킬로달톤의 단일 펩티드 쇄에서 상이한 항체의 2개의 단일 쇄 가변 단편 (scFv), 또는 4개의 상이한 유전자의 아미노산 서열로 구성된 융합 단백질이다. scFv 중 하나는 CD3 수용체를 통해 T 세포에 결합하고, 나머지 다른 하나는 특정 분자를 통해 감염된 세포에 결합한다.

[0273] 다른 이중특이적 항체와 마찬가지로, 일반적인 모노클로날 항체와 달리, BiTE는 T 세포와 표적 세포 사이에 연결을 형성한다. 이는 T 세포가 MHC I 또는 공동자극 분자의 존재와 상관관계, 퍼포린 및 그랜자임과 같은 단백질을 생산함으로써 감염된 세포에 세포독성 활성/항-병원체 활성을 발휘하게 한다. 이 단백질은 감염된 세포에 들어가 세포의 아폽토시스를 개시한다. 이 작용은 감염된 세포에 대한 T 세포 공격 동안 관찰된 생리적 과정을 모방한다.

[0274] **I. 인트라바디**

[0275] 항체는 세포 내부의 작용에 적합한 재조합 항체로, 상기 항체는 "인트라바디"로 공지되어 있다. 상기 항체는 세포내 단백질 수송을 변경하고, 효소 기능을 방해하고, 단백질-단백질 또는 단백질-DNA 상호작용을 차단하는 것과 같은 다양한 기전에 의해 표적 기능을 방해할 수 있다. 여러 면에서 이의 구조는 상기 논의된 단일 쇄 및 단일 도메인 항체의 구조를 모방하거나 이와 유사하다. 실제로, 단일 전사체/단일 쇄는 표적 세포에서 세포내 발현을 허용하고, 세포막을 통한 단백질 전달을 보다 실현 가능하게 만드는 중요한 특징이다. 그러나 추가 특징이 필요하다.

[0276] 인트라바디 치료의 실행에 영향을 미치는 두 가지 주요 문제는 세포/조직 표적화를 포함한 전달 및 안정성이다. 전달과 관련하여, 예컨대, 조직-유도 전달, 세포-타입 특이적 프로모터의 사용, 바이러스-기반 전달 및 세포-투과성/막 전위 펩티드의 사용과 같은 다양한 접근법이 사용되었다. 안정성과 관련하여, 접근법은 일반적으로 파지 디스플레이를 포함하고, 서열 성숙화 또는 컨센서스 서열의 개발을 포함할 수 있는 방법을 포함하는, 브루트 포스(brute force)에 의한 스크리닝, 또는 예컨대, 삽입 안정화 서열 (예컨대, Fc 영역, 샤페론 단백질 서열, 류신 지퍼) 및 디술피드 대체/변형과 같은 보다 직접적인 변형에 관한 것이다.

[0277] 인트라바디가 필요로 할 수 있는 추가 특징은 세포내 표적화를 위한 신호이다. 예컨대, 세포질, 핵, 미토콘드리아 및 ER과 같은 세포하 영역에 대해 인트라바디 (또는 다른 단백질)를 표적화할 수 있는 벡터가 디자인되었으며, 상업적으로 이용가능하다 (인비트로겐 코포레이션(Invitrogen Corp.); 문헌 [Persic *et al.*, 1997]).

[0278] 세포에 진입할 수 있는 이의 능력에 의해, 인트라바디는 다른 타입의 항체가 달성할 수 없는 추가 용도를 갖고 있다. 본 발명의 항체의 경우, 살아있는 세포에서 MUC1 세포질 도메인과 상호작용할 수 있는 능력은 예컨대, 신호전달 기능 (다른 분자에 결합) 또는 올리고머 형성과 같은 MUC1 CD와 연관된 기능을 방해할 수 있다. 특히, 이러한 항체는 MUC1 이량체 형성을 억제하는 데 사용될 수 있다.

[0279] **J. 정제**

[0280] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 정제된 것일 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "정제된"이라는 용어는 다른 성분으로부터 분리가능한 조성물로서, 여기서, 단백질은 이의 자연적으로 수득가능한 상태 대비의 임의 정도에 정제되는 것인 조성물을 지칭할 수 있다. 따라서, 정제된 단백질은 자연적으로 발생할 수 있는 환경이 없는 단백질을 지칭할 수 있다. "실질적으로 정제된"이라는 용어가 사용되는 경우, 이 명칭은 단백질 또는 펩티드가 조성물의 주요 성분을 구성하는 조성물, 예를 들어, 조성물에서 단백질이 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 그 초과를 구성하는 조성물을 지칭할 수 있다.

[0281] 단백질 정제 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 상기 기술은 한 수준에서 세포 환경을 폴리펩티드 및 비-폴리펩티드 분획으로 조질 분별하는 것을 포함한다. 폴리펩티드를 다른 단백질로부터 분리한 후, 관심 폴리펩티드는 크로마토그래피 및 전기영동 기술을 사용하여 추가로 정제하여 부분적 또는 완전한 정제 (또는 균질성이 될 때까지 정제)를 달성할 수 있다. 순수한 펩티드의 제조에 특히 적합한 분석 방법은 이온-교환 크로마토그래피, 배제 크로마토그래피; 폴리아크릴아미드 겔 전기영동; 등전점 포커싱이다. 단백질 정제를 위한 다른 방법은

황산암모늄, PEG, 항체 등을 사용하거나, 또는 열 변성 후, 원심 분리에 의한 침전; 겔 여과, 역상, 수산화 인회석 및 친화성 크로마토그래피; 및 상기 기술과 다른 기술의 조합을 포함한다.

[0282] 본 개시내용의 항체를 정제할 때, 원핵 또는 진핵 발현 시스템에서 폴리펩티드를 발현하고, 변성 조건을 사용하여 단백질을 추출하는 것이 바람직할 수 있다. 폴리펩티드는 폴리펩티드의 태그부착된 부분에 결합하는 친화성 칼럼을 사용하여 다른 세포 성분으로부터 정제될 수 있다. 당업계에 일반적으로 공지된 바와 같이, 다양한 정제 단계를 수행하는 순서가 변경될 수 있거나, 특정 단계가 생략될 수 있지만, 여전히 실질적으로 정제된 단백질 또는 펩티드의 제조를 위한 적합한 방법이 생성될 수 있다고 여겨진다.

[0283] 일반적으로, 완전한 항체는 항체의 Fc 부분에 결합하는 작용제 (즉, 단백질 A)를 사용하여 분별된다. 대안적으로, 항원을 사용하여 적절한 항체를 동시에 정제하고 선택할 수 있다. 상기 방법은 종종 예컨대, 칼럼, 필터 또는 비드와 같은 지지체에 결합된 선택제를 사용한다. 항체는 지지체에 결합되고, 오염물이 제거되고 (예컨대, 세척), 조건 (염, 열 등)을 적용하여 항체를 방출시킨다.

[0284] 단백질 또는 펩티드의 정제 정도를 정량화하기 위한 다양한 방법이 본 발명에 비추어 당업자에게 공지될 것이다. 여기에는, 예를 들어, 활성 분획의 특정 활성을 결정하거나 SDS/PAGE 분석에 의해 분획 내 폴리펩티드의 양을 평가하는 것이 포함된다. 분획의 순도를 평가하는 또 다른 방법은 분획의 비활성을 계산하고, 이를 초기 추출물의 비활성과 비교하여 순도를 계산하는 것이다. 물론 활성의 양을 나타내는 데 사용되는 실제 단위는 정제가 뒤따르도록 선택된 특정 검정 기술, 및 발현된 단백질 또는 펩티드가 검출가능한 활성을 나타내는지 여부에 따라 달라진다.

[0285] 폴리펩티드의 이동은 SDS/PAGE의 상이한 조건에 따라 때때로 상당히 다를 수 있다는 것이 공지되어 있다 (문헌 [Capaldi *et al.*, 1977]). 따라서, 상이한 전기영동 조건하에, 정제되거나, 부분적으로 정제된 발현 생성물의 겉보기 분자량이 달라질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0286] **III. 능동/수동 면역화 및 칸디다 감염 치료/예방**

[0287] **A. 제제화**

[0288] 본 개시내용은 항-칸디다 항체 및 이를 생성하기 위한 항원을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 예방적 또는 치료적 유효량의 항체 또는 이의 단편, 또는 펩티드 면역원, 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "제약상 허용되는 담체"는제약 투여와 화합성을 띠는, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, "제약상 허용되는"이라는 용어는 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인받았거나, 미국 약전 또는 동물, 및 더욱 특히 인간에서의 사용에 대해 일반적으로 인정되는 다른 약전에 열거되어 있다는 것을 의미할 수 있다. 용어 "담체"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 부형제 또는 비히클을 지칭할 수 있다. 적합한 담체는 당업계의 표준 참조 텍스트인 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences]의 최신판에 기술되어 있으며, 상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다. 상기 제약 담체는 멸균 액체, 예컨대, 물 및 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 것을 비롯한 오일, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등일 수 있다. 물은 제약 조성물이 정맥내로 투여될 때 특정 담체이다. 염수 용액, 덱스트로스 및 글리세롤 수용액 또한 특히 주사용 액제인 경우 액체 담체로 사용될 수 있다. 다른 적합한 제약 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0289] 원하는 경우, 조성물은 또한 소량의 습윤화제 또는 유화제, 또는 pH 완충화제를 함유할 수 있다. 이러한 조성물은 액제, 현탁제, 에멀젼, 정제, 환제, 캡슐, 분제, 지속 방출 제제 등의 형태를 취할 수 있다. 경구 제제는 제약 등급의 만닛톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 사카린나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등과 같은 표준 담체를 포함할 수 있다. 적합한 제약 제제의 예는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences"]에 기술되어 있다. 상기 조성물은 환자에게 적절한 투여를 위한 형태를 제공하기 위해 적절한 양의 담체와 함께 예방 또는 치료 유효량의 항체 또는 이의 단편, 바람직하게는 정제된 형태를 함유할 것이다. 제제는 경구, 정맥내, 동맥내, 협측, 비내, 분무, 기관지 흡입, 직장내, 질, 국소 또는 기계적 환기에 의해 전달될 수 있는 투여 모드에 적합하여야 한다. 본 발명의 제약 조성물은 이의 의도된 투여 경로와 양립가능하도록 제제화된다.

[0290] **B. 투여**

[0291] 투여 경로의 예는 비경구, 예컨대, 정맥내, 진피내, 피하, 경구 (예컨대, 흡입), 경피 (즉, 국소), 경점막 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 진피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 하기 성분을 포함할 수

있다: 멸균 희석제, 예컨대, 주사용수, 염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항박테리아제, 예컨대, 벤질알콜, 메틸파라벤; 항산화제, 예컨대, 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨; 킬레이팅제, 예컨대, 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA); 완충제, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 장성 조절제, 예컨대, 염화나트륨 또는 덱스트로스. pH는 예컨대, 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산 또는 염기로 조정할 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제작된 앰플, 일회용 주사기 또는 다중 용량 바이알에 포장될 수 있다.

[0292] 주사용으로 적합한 제약 조성물은 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 멸균 주사용 액제 또는 분산제의 즉석 제조를 위한 분산액 및 멸균 분제를 포함할 수 있다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리 염수, 정균수, 크레모포르 EL(Cremophor EL)™ (BASF: 미국 뉴저지주 파시파니) 또는 또는 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS)를 포함한다. 실시양태에서, 조성물은 멸균이고, 용이한 주사기 가능성이 존재하는 정도로 유체이다.

[0293] 제조 및 보관 조건에서 안정할 수 있으며, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산제인 경우, 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대, 만닛톨, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물에 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함함으로써 야기될 수 있다. 멸균 주사용 액제는 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 이의 조합과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 활성 화합물을 혼입한 후, 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 위에 열거된 것들로부터 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사용 액제의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 사전 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조이다.

[0294] 경구 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 젤라틴 캡슐에 동봉되거나, 정제로 압축할 수 있다. 경구 치료 투여의 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 도입될 수 있고 정제, 트로키 또는 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 경구 조성물은 또한 구강 세정제로 사용하기 위한 유체 담체를 사용하여 제조될 수 있으며, 여기서, 유체 담체 내의 화합물은 경구로 적용되고 헹구고, 뱉어내거나 삼켜진다. 제약상 화합성인 결합제 및/또는 애주번트 물질이 조성물의 일부로 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐제, 트로키제 등은 상기 성분 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다. 결합제, 예컨대, 미정질 셀룰로스, 트라가칸트 검 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대, 전분 또는 락토스, 붕해제, 예컨대, 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분; 활택제, 예컨대, 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로테스; 유동화제, 예컨대, 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대, 수크로스 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대, 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지색 향료.

[0295] 흡입에 의한 투여의 경우, 화합물은 적절한 추진제, 예를 들어, 이산화탄소와 같은 가스 또는 분무기를 함유하는 가압 용기 또는 디스펜서로부터 에어로졸 스프레이 형태로 전달된다.

[0296] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의해 이루어질 수 있다.

[0297] 경점막 또는 경피 투여의 경우, 투과하고자 하는 장벽에 적합한 침투제가 제제에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 경점막 투여를 위한 계면활성제, 담즙염 및 푸시딘산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌제의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여를 위해, 활성 화합물은 당업계에 일반적으로 공지된 바와 같이 연고, 고약, 겔 또는 크림으로 제제화된다.

[0298] 화합물은 또한 좌약 (예컨대, 코코아 버터 및 다른 글리세리드와 같은 통상의 좌약 기제 사용) 또는 직장 전달을 위한 정체 관장의 형태로 제조될 수 있다.

[0299] 한 실시양태에서, 활성 화합물은 이식체 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 방출 제어형 제제와 같이 신체로부터의 신속한 제거에 대해 화합물을 보호할 담체와 함께 제조된다. 예컨대, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 상기 제제의 제조 방법은 당업자에게 자명할 것이다. 물질은 또한 알자 코포레이션(Alza Corporation) 및 노바 파마슈티칼즈, 인크.(Nova Pharmaceuticals, Inc.)로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 리포솜 현탁액 (바이러스 항원에 대한 모노클로날 항체로 감염된 세포를 표적화하는 리포솜 포함)도 제약상 허

용되는 담체로 사용할 수 있다. 이들은 예를 들어, 미국 특허 번호 4,522,811에 기술된 바와 같이 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0300] 투여의 용이성과 투여량의 균일성을 위해 경구 또는 비경구 조성물을 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 이롭다. 본원에서 사용되는 투여 단위 형태는 치료하고자 하는 대상체에 대한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하고; 각 단위는 필요한 제약 담체와 함께 원하는 치료 효과를 달성하는 것으로 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 사양은 활성 화합물의 고유한 특성 및 달성하고자 하는 특정 치료 효과, 및 개체의 치료를 위해 상기 활성 화합물을 배합하는 기술 분야에서의 고유한 제한사항에 의해 지시되고, 그에 직접적으로 의존한다.

[0301] 개시된 것과 같은 항체가 칸디다 감염의 위험이 있는 대상체에서 생체내에서 생성되는 활성 백신이 또한 구상된다. 이러한 백신은 비경구 투여용으로 제제화될 수 있으며, 예컨대, 진피내, 정맥내, 근육내, 피하 또는 심지어 복강내 경로를 통한 주사용으로 제제화될 수 있다. 진피내 및 근육내 경로에 의한 투여가 이용될 수 있다. 대안적으로, 백신은 점막에 직접 국소 경로에 의해, 예를 들어, 점비제, 흡입, 분무기에 의해, 또는 직장내 또는 질 전달을 통해 투여될 수 있다. 제약상 허용되는 염은 산 염 및 예컨대, 예를 들어, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산으로 형성된 염을 포함한다. 유리 카르복실기로 형성된 염은 또한 예컨대, 예를 들어, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화제2철과 같은 무기 염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도될 수 있다.

[0302] 인위적으로 획득한 수동 면역으로 알려진 항체의 수동 전달은 일반적으로 정맥내 주사 또는 근육 주사를 포함할 것이다. 항체의 형태는 인간 또는 동물의 혈장 또는 혈청, 정맥내 (IVIG) 또는 근육내 (IG) 사용을 위한 풀링된 인간 면역글로불린으로서, 면역화되거나, 질환으로부터 회복된 기증자로부터의 고역가 인간 IVIG 또는 IG로서, 및 모노클로날 항체 (MAb)로서의 것일 수 있다. 상기 면역은 일반적으로 오직 단기간 동안만 지속되며, 특히 비인간 기원의 감마 글로불린으로 인한 과민 반응 및 혈청병의 위험이 있다. 그러나, 수동 면역은 즉각적인 보호를 제공한다. 항체는 주사에 적합한, 즉, 멸균성이고, 주사가능한 담체에서 제제화될 것이다.

[0303] 일반적으로, 본 개시내용의 조성물의 성분은 개별적으로 또는 단위 투여 형태로 함께 혼합되어, 예를 들어, 활성제의 양을 나타내는 앰플 또는 사세와 같은 밀봉된 용기에 건조 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 함께 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 멸균 제약 등급의 물 또는 염수를 함유하는 주입 병과 함께 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플이 제공될 수 있으며, 이로써, 투여 전에 성분이 혼합될 수 있다.

[0304] 본 개시내용의 조성물은 중성 또는 염 형태로 제제화될 수 있다. 제약상 허용되는 염은 예컨대, 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도된 것과 같은 음이온으로 형성된 염, 및 예컨대, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화제이철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로 형성된 것을 포함한다.

[0305] **C. MSC 전달 접근법**

[0306] 중간엽 줄기 세포 (MSC)는 현재 암 및 자가면역 질환을 비롯한 다양한 병태에 대한 유전자 요법 벡터로 활용되고 있는 고유한 다능성 전구 세포이다. MSC가 동종이계 MSC 이식 동안 항염증성 특성에 대해 주로 알려져 있지만, MSC가 특정 환경에서 실제로 적응 면역을 촉진할 수 있다는 증거가 있다. MSC는 골수, 지방 조직, 태반 및 제대혈을 비롯한 다양한 조직에서 확인되었다. 지방 조직은 MSC의 가장 풍부한 공급원으로 알려져 있는 것 중 하나이다.

[0307] MSC는 다양한 임상 및 임상전 환경에서 동종이계 숙주로 성공적으로 이식되었다. 이러한 기증자 MSC는 MHC (주조직적합성 복합체) 불일치 기증자로부터 세포 또는 조직 이식 후 발생할 수 있는 이식편대숙주병 (GvHD)의 억제를 포함하여 면역관용을 촉진한다. MSC 이식 후 감소된 GvHD 증상은 T 및 B 세포 증식의 직접적인 MSC 억제, 휴지기 자연 살해 세포 세포독성 및 수지상 세포 (DC) 성숙화에 기인하는 것이었다. 적어도 하나의 연구에서 이식된 동종이계 MSC에 대한 항체 생성이 보고되었다. 그럼에도 불구하고, GvHD를 예방하는 능력은 또한 외래 항원을 발현하는 MSC가 세포 백신 접종 동안 MSC이되, 구체적으로, 기증자 MSC는 아닌 것에 의해 발현되는 외래 항원(들)에만 면역 반응을 선택적으로 유도하는 것에서 다른 세포 타입 (즉, DC)보다 점을 가질 수 있다는 점을 시사한다.

[0308] MSC는 종양 미세환경에 대한 이의 선천적인 경향으로 인해 항암 치료제의 전달 비히클로 연구되었다. MSC는 또

한 IFNα 또는 IFNɣ의 발현을 통해 종양 형성 세포의 아폽토시스를 촉진하는 데 사용되었다. 추가로, MSC는 최근 종양 형성 및 전이의 예방 및 억제에 대해 연구되었다. 다른 연구에 따르면, 불멸화된 MSC는 종양을 유발할 수 있는 바, 실제로 사용하기에 안전한지 여부를 결정하기 위해 주의 깊게 연구되어야 한다. 이식된 1차 비불멸화된 MSC는 생체내에서 최대 며칠 동안만 지속된다.

[0309] 백신은 종종 감염성 질환을 예방하는 효율적이고, 비용면에서 효율적인 수단이다. 백신은 이전에 광범위한 이환율과 사망률을 일으켰던 디프테리아, 소아마비, 홍역을 비롯한 다른 질환을 통제하는 능력을 제공하면서, 파괴적인 질환인 천연두를 근절하는 데 혁신적인 잠재력을 보여주었다. 그러나, 전통적인 백신 접근법은 지금까지 HIV, 결핵, 말라리아 및 뎅기열, 헤르페스, 심지어 감기를 포함한 다른 많은 질환에 대한 보호를 제공하지 못했다. 전통적인 백신 접근법이 상기 질환에 대해 성공적이지 못한 이유는 복잡하고 다양하다. 예를 들어, HIV는 기능적 프로바이러스 게놈을 숙주 세포의 DNA에 통합하여 잠복기 또는 지속성을 확립한다. 잠복기/지속성이 확립되면, 고도로 활동적인 항레트로바이러스 요법으로도 HIV를 근절할 수 없다.

[0310] 새로운 대체 면역화 접근법은 DNA 백신과 세포 백신, 둘 모두를 포함한다. DNA 백신은 국부 세포 (즉, 근세포)가 동소에서 백신 항원을 생산할 수 있도록 하는 항원 코딩 플라스미드로 백신 접종 조직 부위에서 세포를 형질감염시키는 것을 포함한다. 세포 백신은 백신 항원을 발현하거나, 제시하는 미리 펄싱되거나, 형질감염된 숙주 항원 제시 세포 (예컨대, 수지상 세포, DC)의 직접 전달을 사용한다. 이러한 접근법의 장점은 백신 항원이 생체내에서 생산되고, 면역학적 프로세싱에 쉽게 사용할 수 있다는 것이다. 성공적인 임상전 시험에 대한 수많은 보고에도 불구하고, 상기의 두 접근법 모두 걸림돌에 부딪쳤다. 인간에서의 DNA 백신접종 연구는 낮은 효능을 보여주며, 이는 마우스와 인간의 선천적인 차이와 연관이 있다. DC 백신접종 전략법은 치료적 암 백신접종에 대한 제한된 임상 성공을 보여 왔으며, 필요한 개별 맞춤으로 인해 생산 비용이 높다.

[0311] 여기서, 본 발명자들은 칸디다를 특이적으로 표적화하는 항체를 에피솜으로 발현하는 면역보호 1차 중간엽 줄기세포 (IP-MSC)의 용도 뿐만 아니라, IP-MSC의 제조 및 사용 방법을 구상한다. IP-MSC는 항원 결합 폴리펩티드 (예컨대, 전체 항체, 단일 쇄 가변 항체 단편 (ScFV), Fab 또는 $F(ab')_2$ 항체 단편, 디아바디, 트리바디 등)를 코딩하는 하나 이상의 에피솜 벡터로 형질감염된다. 임의적으로, IP-MSC는 하나 이상의 다른 면역조정 폴리펩티드, 예컨대, 사이토카인, 예컨대, 인터류킨 (예컨대, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, 및 IL-12), 인터페론(예를 들어, IFNα, IFNβ, 또는 IFNω) 등을 추가로 발현할 수 있으며, 이는 진균을 중화시키는 항원-결합 폴리펩티드의 효과를 증진시킬 수 있다. 각각의 면역반응성 폴리펩티드는 진균에 의해 생산된 항원에 특이적인 중화 항체 (예컨대, 노출된 대상체로부터의 천연 항체)로부터의 항원-결합 영역의 아미노산 서열, 또는 상기 항체의 아미노산 서열을 포함한다. 각 항원-결합 영역 펩티드는 병원체 또는 독소에 특이적으로 결합하고, 이를 중화하도록 배열 및 배향된다.

[0312] 일부 실시양태에서, IP-MSC는, 병원체를 특이적으로 표적화하는, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 면역반응성 폴리펩티드, 또는 최대 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개의 면역반응성 폴리펩티드를 발현한다. 예를 들어, 각 면역반응성 폴리펩티드는 병원성 유기체로부터의 단백질 또는 이의 단편을 특이적으로 표적화하고, 그에 결합할 수 있다.

[0313] IP-MSC는 병원체에 의한 감염에 대한 수동 면역을 생성하거나, 또는 치료하는 데 유용하다. IP-MSC는 병원체에 의해 유발된 감염성 질환을 치료 또는 예방하기 위한 제약 조성물로서 사용하기 위해 제약상 허용되는 담체 (예컨대, 완충제, 예컨대, 포스페이트 완충처리된 염수, 또는 생존가능한 형질감염된 1차 MSC를 유지하기에 적합한 임의의 다른 완충처리된 물질)에 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, IP-MSC는 골수 유래 MSC를 포함하는 반면, 일부 다른 실시양태에서, IP-MSC는 지방 MSC 세포, 태반 MSC 세포, 또는 제대혈 MSC 세포를 포함한다.

[0314] 본원에 기술된 IP-MSC는 특히 적어도 부분적으로는 진균에 대한 일시적 수동 보호에 유용한데, 그 이유는 1차 MSC가 일반적으로 면역계에 의해 표적화되지 않는 더 낮은 면역원성을 갖는 세포이기 때문이다. 따라서, IP-MSC는 치료받는 대상체에 의해 허용되며, 면역반응성 폴리펩티드가 발현, 생산 및 방출되어 대상체가 노출되었거나 노출될 수 있는 칸디다에 결합하고, 이를 억제하는 데 충분한 시간 동안 세포가 생존할 수 있다. 추가로, 1차 MSC는 일반적으로 체내에서 제한된 수명을 갖는 바, 불멸화 MSC의 문제일 수 있는 MSC 치료의 비바람직한 장기적 부작용 (예컨대, 발암성)을 호전시킬 수 있다.

[0315] 본 발명자들은 다수의 (심지어 수백 개의) 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 다백질 또는 단백질 톡소이드에 대하여 동시에 보호적인 완전한 인간 단일 쇄 항체 단편, 전장 IgG, 또는 다른 면역반응성 폴리펩티드를 발현하기 위해 다중카피, 비-감염, 비-통합, 원형 에피솜을 사용한다. 일부 실시양태에서, 에피솜은 엡스타인-바 바이러스 (EBV) 핵 항원 1 발현 카세트 (EBNA1) 및 OriP 복제 기점으로부터 유래된 구성요소를 기반으로 한다.

이들은 바람직하게 사용되는 EBV의 유일한 구성요소이며, 이로써, 어떤 바이러스도 복제되거나, 어셈블리되지 않는다. 이 시스템은 중간엽 줄기 세포에서 안정적인 염색체외 지속성과 장기간 이소성 유전자 발현을 초래하다. 본원에 기술된 방법에서, ScFV 또는 다른 면역반응성 폴리펩티드는 MSC에서 효과적으로 발현되고, MSC로부터 보호량으로 분비된다. 이 기술은 미국 특허 9,101,597 (본원에서 참조로 포함된다)에 상세히 기술되어 있다. 인간 세포에서 매우 큰 인간 게놈 DNA 단편 (>300kb)을 도입하고 유지하는 EBV 기반 에피솜의 능력은 본원에 기술된 방법의 또 다른 중요한 이점이다. 이러한 특징을 통해 박테리아에서 복제할 수 있고, 대규모 정제, hMSC로의 형질감염 및 에피솜 플라스미드로 복제할 수 있는 벡터에서 수십 개의 발현 요소를 클로닝할 수 있다. 면역반응성 폴리펩티드 (예컨대, ScFV)에 대한 표적화된 발현 수준은 각 면역반응성 폴리펩티드에 대해 약 10 pg/세포/일, 바람직하게, 발현 수준은 5 pg/세포/일이다. 각 면역반응성 폴리펩티드에 대해 10 pg/세포/일의 생산성 속도로 약 1 x 10^{11} MSC를 주입하면, 적절한 치료 투여량 수준인 75 Kg 성인의 순환에서의 15 mg/mL 수준과 등가인 약 1 g의 가용성 폴리펩티드/일이 생성된다. 프로모터 및 다른 조절 요소는 각 타입의 면역조정 분자의 발현을 유도하는 데 사용된다.

[0316] 문헌의 여러 보고서는 MSC에서 잘 특징화된 프로모터의 비고전적인 발현 패턴을 지적한다. 인간 사이토메갈로바이러스 주요 즉시 초기 유전자 프로모터 (CMV-MIE)는 알려진 가장 강력한 프로모터 중 하나이며, 안정한 포유동물 세포주를 생산하는 리터당 수 그램의 재조합 단백질 약물 생성의 주요 요소이다. 그러나, CMV-MIE는 MSC에서 비교적 잘 전사되지 않는다. 대조적으로, EF1A, UBC 및 CAGG 프로모터는 명백한 징후 또는 프로모터 침묵 화없이 MSC에서 높은 수준의 발현을 입증하였다. 본원에 기술된 방법에 사용되는 에피솜 벡터는 임의의 그러한 프로모터를 포함할 수 있다. E. 콜라이에서 플라스미드의 확장을 위해 항생제 선별 마커가 없는 발현 벡터도 제공된다. 에피솜 플라스미드의 복제 성질은 항생제 내성 유전자의 오픈 리딩 프레임을 파괴하는 제한 엔도뉴클레아제를 사용한 이의 선형화를 배제한다. 따라서, 유전적 재배열은 항생제 내성 유전자의 발현을 초래하여 선택된 경우에 인간에게 비바람직한 항생제 내성 매개 부작용을 일으킬 수 있다고 생각할 수 있다. 이 시나리오는 필요하거나, 원하는 경우 E. 콜라이 균주에서 플라스미드의 성장 및 증식을 위한 대사성 선별가능한 마커로 항생제 내성 유전자를 대체함으로써 방지할 수 있다.

[0317] 벡터의 조절 요소는 관심 있는 각 면역조정 분자의 원하는 분비 수준 및 혈청 수준을 수용하기 위해 사용된다. 전장 항체, ScFV 또는 다른 면역반응성 폴리펩티드의 발현은 MSC 투여 후 1일 미만인 기간 이내에 치료 혈청 수준을 달성하기 위해 강력한 프로모터 (예컨대, CMV, EF1A, CAGG 등)의 이점을 갖는다. 사이토카인과 같은 다른 면역조정 분자는 종종 MSC에 의해 일시적으로 낮은 수준으로 발현 및 분비된다. 이질적인 발현 수준 및 발현 타이밍에서 요구되는 유연성을 수용하기 위해, 상기 유전자는 낮은 기본 프로모터 (즉, TK)로부터 또는 Tet 온/오프 프로모터로부터 제어된 유도를 통해 구동된다. Tet 프로모터 시스템은 테트라사이클린보다 2 로그 낮은 농도에서 Tet 프로모터를 활성화하고, 장내 플로라의 조절장애를 일으키지 않으며, 폴리케티드 항생제에 대한 내성을 일으키지 않고, 항생제 활성을 나타내지 않는 무해한 항생제 유사체, 예컨대, 안히드로테트라사이클린의 사용으로부터 이점을 얻는다. 안히드로테트라사이클은 물에 완전히 용해되며, 형질감염된 MSC에서 선택된 유전자의 활성화를 강화하기 위해 음용 사료로 투여될 수 있다. 인체에서 테트라사이클린의 제1 분해 생성물인 안히드로테트라사이클린의 잠재적인 독성은 Tet on/off 프로모터 시스템을 활성화하는 FDA 승인 테트라사이클린 유사체인 독시사이클린과 같은 다른 유사체의 투여로 우회될 수 있다. 이 시스템은 유해한 부작용이 발생하거나, 원하는 치료 종점을 달성하였을 때, 형질감염된 MSC의 표적화된 아폽토시스를 개시하기 위해 강력한 아폽토시스 유발 유전자 (예컨대, Bax)의 유도성 발현을 엄격하게 조절함으로써 안전장치 "킬 스위치" 디자인에 우선적으로 사용된다. Tet-on 시스템의 최근 발전으로 인해 원래의 Tet 시스템 (Tet-On Advanced™, Tet-On 3G™)보다 최대 100배 더 낮은 농도에서 Dox에 대한 프로모터 누출 및 반응성의 억제가 훨씬 향상되었다. 약물 선별 마커는 형질감염된 MSC: EBV 기반 벡터에서 벡터 안정성을 유지하는 데 사용되지 않고, 이 벡터는 복제되고, 세포 주기당 90-92%의 비율로 딸 세포에서 유지되는 것으로 알려져 있다.

[0318] 에피솜은 복제 바이러스를 생성하지 않고, 이들이 발현되는 세포는 MHC 분자를 상당한 양으로 생성하지 않기 때문에, 에피솜은 개체에서 플랫폼의 후속 사용을 방해하는 벡터 유래 면역을 초래하지 않는다. 이는 엡스타인-바 바이러스 (EBV) 핵 항원 1 발현 카세트로부터 유래된 구성요소에 대한, 및 MSC 배경 (HLA 타입 지정)에 대한 면역 반응을 검출하는 민감한 검정법 (항체 ELISA 및 T-세포 기반 검정법)을 디자인함으로써 확인할 수 있다. 유전자 연구는 숙주 세포 염색체로의 EBV 통합률을 조사하고 (FISH, 써던 블롯, qPCR), 벡터의 일시적인 복제 성질을 측정하기 위해 수행된다. EBV 벡터는 선별가능한 마커 부재하에서 세포 주기당 약 90 내지 92%의 복제를 유지하는 것으로 보고되었다. 복제율 감소는 숙주 시스템에서 벡터의 제거가 원인이 된다. 주입된 MSC의 구획화는, 에스테르화시 더 이상 지질 이중층을 통과하지 않고, 높은 형광성을 띠게 되는 세포막 투과성 염료 (녹색

CMFDA, 오렌지색 CMTMR)가 미리 로드된 형광 표지된 세포를 추적하여 비인간 영장류 (NHP)에서 평가된다. 이러한 측정은 새로 준비된 조직 절편 (림프절, 간, 비장, 근육, 뇌, 췌장, 신장, 장, 심장, 폐, 눈, 남성 및 여성 생식 조직) 또는 전신 스캔을 통해 수행된다. 추가 조직 절편은 벡터 서열 및 상응하는 전사체의 분석을 위한 DNA 및 RNA의 단리를 위해 프로세싱된다. 각 면역반응성 폴리펩티드, 사이토카인 및 차단 전사체에 특이적인 올리고를 디자인함으로써 모든 조직에서 개별 유전자 발현을 평가할 수 있다. 일부 프로모터는 다른 것보다 일부 조직에서 더 활발히 전사되며, 주사 후 말초 조직으로의 MSC의 우선적 국재화 및 MSC 상주 및 재조합 유전자의 상응하는 전사 활성 모두의 평가가 요구된다. 이를 위해, 하나는 Tet 온/오프 구동 RNS 전사체에 특이적이고, 나머지 다른 하나는 에피솜 벡터 DNA에 특이적인 것인, 2개의 인공 "바코드" 핵산 태그가 포함될 수 있다. 이러한 태그를 통해 NHP와 인간 게놈 및 트랜스크립톰 배경 사이에서 매우 고유한 서열을 신속하게 확인할 수 있다.

[0319] MSC는 최대 90% 효율로 대규모 전기천공에 적합하다. 맥스사이트, 인크.(MaxCyte, Inc.: 미국 메릴랜드주 게이더스버그)는 멸균 폐쇄형 형질감염 환경에서 극대량의 일시적 형질감염을 위해 특수 디자인된 사용하기 쉬운 소형 풋프린트 장치인 MAXCYTE® VLX™ 대규모 형질감염 시스템(MAXCYTE® VLX™ Large Scale Transfection System)을 판매한다. 유동 전기천공 기술을 사용하는 MAXCYTE® VLX™ 대규모 형질감염 시스템은 멸균 폐쇄형 형질감염 환경에서 높은 세포 생존율과 형질감염 효율로 약 30분 미만인 기간내에 최대 약 2 x 10^{11}개의 세포를 형질감염시킬 수 있다. 이 cGMP 준수 시스템은 벤치에서 cGMP 파일럿 및 상업적 제조에 이르기까지 재조합 단백질의 신속한 생산에 유용하다. MSC는 대규모 세포 배양 환경에서 화학적으로 정의된 (CD) 배지에서 성장할 수 있다. 바이오프로세싱 엔지니어링의 최근 발전은 만능 특징의 손실 및 유전적 안정성의 정체 없이 MSC의 대규모 확장을 지원하는 CD 제제의 급속한 개발을 초래하였다. 지방 유래 MSC는 지방흡입 수술에서 쉽게 조달할 수 있으며, 수술에서의 평균 수율은 약 약 1 x 10^{8} MSC이고, 이로써, 수명은 유지하고, 주입 후 수 주 동안 생체내에서 치료 분자의 발현 및 전달을 유지시키는 데 충분한 배가수(대략 25)로, 보관 이전에 생체외 확장을 위해 충분한 세포 개수를 제공할 수 있다 (대략 25배, > 3 x 10^{15}개 세포). MSC는 일반적으로 48 내지 72시간 범위에서 배가 숙도를 보이는 바, 50 내지 75일 범위의 생체내 수명을 제공한다. 주입된 MSC의 회전율은 트랜스진 생성물의 순환 수준을 측정함으로써, 및 인간의 혈액, 비강 흡인물 및 소변에서 qPCR에 의해 EBV 서열을 검출함으로써 평가할 수 있다. 원하는 치료 기간 후 MSC의 본질적으로 완전한 제거는 발현 벡터에 내장된 아폽토시스 유발 유전자의 제어된 유도성 발현을 통해 자기 파괴를 유도함으로써 달성될 수 있다. 주사 후 순환하는 MSC 유래 면역반응성 폴리펩티드 또는 다른 면역조정인자의 수준, 및 NHP에서 벡터 유도된 자가면역 또는 GVHD 반응도 평가할 수 있다. 인간의 경우, 예컨대, 간 손상 (ALT, AST), 간 (ALB, BIL, GGT, ALP 등)의 바이오마커 및 신장 기능 마커 (BUN, CRE, 우레아, 전해질 등)와 같은 자가면역 또는 동종이계 면역 반응과 연관된 추가 마커가 측정될 수 있다.

[0320] 림프조혈 계통 항원의 발현 부족을 통해 MSC는 조혈 세포, 내피 세포, 내피 전구체, 단핵구, B 세포 및 적혈구와 구별된다. 1차 MSC는 불멸이 아닌 바, 1차 세포에 대해 약 50개 분할의 "헤이플릭 한계(Hayflick limit)"이 적용된다. 그럼에도 불구하고, 한 세포가 약 10^{15}개의 딸 세포를 생산할 수 있는 확장 능력은 엄청나다. 추가로, MSC는 배치 간 변동성이 낮다. 위험에 처한 수백만 명의 개체를 신속하게 보호할 수 있는 세포 은행 크기는 다수의 사전 스크리닝된 기증자 지방 조직 유래 MSC를 풀링함으로써 생성될 수 있다: 1 x 10^{8}개의 세포/기증자로 100명의 기증자 x 생체외 25세대 = 약 3 x 10^{17} 개의 세포; 약 1 x 10^{11}개의 세포/주입=약 300만 개의 용량. 치료 MSC 은행의 생성에서 두 가지 접근법이 사용될 수 있다. (1) 단리, 확장, 시험, 보관, 이어서, 형질감염, 회수 및 투여; 및 (2) 단리, 확장, 시험, 형질감염, 해동시 바로 투여할 수 있는 세포를 생성하기 위한 보관 및 단기 회수.

[0321] 특징화를 위해, 마스터 세포 은행은 멸균성, 마이코플라스마, 시험관내 및 생체내 외래성 인자 시험, 레트로바이러스 시험, 세포 아이덴티티, 전자 현미경법, 및 다수의 특정 바이러스 PCR 검정법에 대해 시험될 수 있다 (FDA는 이의 1993년 및 1997년 가이던스 문서에서 14개를 요구하고 있으며, 그 목록은 여러 권고된 바이러스, 추가로는 주로 폴리오마 바이러스로 보강되었다). 1차 배양 조건에서 혈청의 잠재적인 초기 사용으로 소 바이러스의 9CFR 패널에 대한 테스트를 수행할 수 있다. 정상적인 조작 중에 세포가 돼지 생성물과 접촉하는 경우, 돼지 바이러스에 대한 시험도 수행하는 것이 바람직하다.

[0322] 조직 수복을 위해 MSC를 사용하는 것의 한계 중 하나는 세포가 생체외 확장 및 이의 유래 기점이 된 사람에게 재주사한 후 기관을 영구적으로 콜로니화할 수 없다는 것이다. MSC는 MHC가 매칭되는 개체 또는 비매칭되는 개체에게 주입되는지 여부와 상관없이 제한된 기간 (예컨대, 몇 주 또는 몇 개월) 동안 순환한다. 성체 MSC 범용

유전자 전달 플랫폼 개발의 이러한 특정 단점은 본원에 기술된 방법의 이점이다. 형질감염된 MSC에서 발현된 각 트랜스진의 약동학적 성질 (PK) 프로파일은 개발된 각 조작된 전달 벡터 플랫폼에 대해 NHP에서 평가될 수 있다. 1회 단일 용량 PK 연구는 IV 투여된 형질감염된 MSC를 이용하여 시노몰구스 원숭이에서 바람직하게 수행된다. 상기 연구에서 2마리의 수컷 원숭이와 2마리의 암컷 원숭이에게 각각 고용량 (약 10^{11}개의 세포), 중간 용량 (약 10^{8}개의 세포) 및 저용량 (약 10^{5}개의 세포)의 MSC를 정맥내로 (i.v.) 투여한다. 평가하고자 종점은 케이지 쪽 관찰, 체중, 정성적 사료 섭취, 안과학적 성질, 심전도, 임상 병리 (예컨대, 혈액학적 성질, 화학적 성질, 응고, 소변 검사); 면역학적 성질 (예컨대, 면역글로불린 및 예컨대, B 세포, T 세포 및 단핵구와 같은 말초 백혈구); 면역원성; 육안적 병리 (예컨대, 부검 및 선택된 기관 중량); 조직병리학적 성질; 조직 결합; 및 약동학적 성질을 포함한다. 각 재조합 항체의 혈청 농도는 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 및 63일째에 항체 특이적 포획 및 검출 (HRP 표지된 항-id) 시약을 사용하는 적격 샌드위치 타입 ELISA로 9주 동안 모니터링할 수 있다. PK 분석은 WINNONLIN 소프트웨어 (파사이트 코포레이션(Pharsight Corp.))를 사용하여 비구획 방법으로 수행될 수 있다. 각 항체에 대한 약동학적 파라미터는 최대 혈청 농도 (C_{max}), 용량 정규화된 혈청 농도 (C_{max}/D), 시점 0부터 무한대까지의 농도-시간 곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$), 용량 정규화된, 시점 0부터 무한대까지의 농도-시간 곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$/D), 전신 제거율 (CL), 정상 상태에서의 분포 부피 (V_{ss}), 말기 단계 동안의 겉보기 분포 부피 (V_z), 말기 제거 단계 반감기 ($t_{1/2,term}$), 및 평균 체류 시간 (MRT)으로 표현될 수 있다. 주사된 MSC의 말초 순환 및 구획화는 새로 준비된 조직 절편에서 또는 전신 스캔을 통해 상기에 기술된 바와 같이 세포막 투과성 CMFDA 또는 CMTMR 염료가 미리 로딩된 형광 표지된 세포를 추적하여 NHP에서 평가할 수 있다. 벡터 DNA 서열 및 전사체는 상기에서 개략적으로 설명된 바와 같이 qPCR로 모니터링될 수 있다.

[0323] 생체내 MSC에 대한 거부 반응이 없음을 설명하는 문헌이 광범위하게 존재한다. 그럼에도 불구하고, 이 현상은 동종 및 이종 DNA 벡터로 변형된 동계 MSC를 다회 주사한 후, 동종이계 반응의 면역학적 프로파일링을 통해 NHP에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 한 NHP 군에는 LASV 항체를 발현하는 에피솜 벡터로 형질감염된 동계 MSC를 볼루스로 주사하고, 또 다른 군에는 인플루엔자 항체를 발현하는 유사한 벡터가 주사할 수 있다. MSC 플랫폼 및 벡터 구성요소에 대한 면역 반응은 77일 동안 매주 평가할 수 있으며, 이 기간 동안 임의의 면역학적 반응은 검출가능하여야 한다. 독시사이클린 또는 다른 테트라사이클린 유사체의 투여에 의한 차단 기전의 활성화 후 NHP에서의 안전성 및 면역원성은 유사한 방식으로 평가될 수 있다. 독시사이클린 요법의 투여 후, 벡터 구성요소 및 MSC 전달 플랫폼에 대한 면역학적 유해 반응은 유사한 방식으로, 예컨대, 먼저 처음 2주 동안은 1일 2회, 이어서, 추가 77일 동안은 매주 평가될 수 있다. 아폽토시스 세포 사멸의 추가 마커는 확립된 검정법, 예컨대, 순환 MSC에서 증가된 혈청 젖산 탈수소효소 (LDH) 및 카스파제, 및 포스파티딜 세린 (PS)에 의해 추적할 수 있다. 이 77일 기간 후에 벡터 및 MSC에 대한 면역학적 반응이 검출되지 않으면, NHP에 동종 MSC를 다시 주사할 수 있으며, 한 군에는 동종 벡터로 형질감염된 MSC를 주사하는 반면, 나머지 다른 군은 이종 DNA 벡터를 받게 될 것다. 동종 및 이종 벡터는 동일한 배경을 갖지만, 다른 재조합 항체 레퍼토리를 갖게 될 것이다. 이 접근법은 재조합 항체 레퍼토리와 상관없이, MSC 및 발현 DNA 벡터에 대한 면역원성을 입증할 수 있다. MSC 플랫폼에 대한 면역학적 반응을 평가하기 위한 77일 타임라인은 이 시간 프레임에 걸쳐 10 mg/Kg으로 투여된 재조합 항체의 피크 혈청 수준의 평균 5000배 감소를 보여주는, 시노몰구스 원숭이에서의 인간 항체를 이용한 다중 용량 독성동역학적 연구에 기초하여 선택된다. 상기 연구에서 일부 NHP는 제1 투여 후 약 50 내지 60일 후에 항-인간 항체 반응을 일으킬 수 있는 반면, 일부 동물은 이종 IgG에 대해 검출가능한 체액 반응을 전혀 발생시키지 않을 수 있다.

[0324] 바람직하게, MSC는 마이크로Q 테코놀러지즈(MicroQ Technologies)의 장치와 같은, 증가된 샘플 용량 및 세포 모니터링 기술과 함께 저온 연쇄 수송의 제거를 허용하면서 유전자 변형 MSC의 가온 연쇄 (37℃) 수송을 허용하는 장치로 수송될 수 있는 장치에서 수송될 수 있다. 이러한 장치는 약 24시간 내지 약 168시간 동안 정확한 가온 온도를 유지하는 바, 전 세계 어디에서나 바로 사용할 수 있는 치료제를 배치하는 데 충분한 시간을 허용한다. 캡슐화된 세포의 보관 및 수송을 위한 추가 용량이 도입할 수 있고, 필요에 따라 가스 교환을 지원할 수 있는 캡슐을 제조할 수 있다. 캡슐화에서 투여까지의 경과 시간은 IP-MSC의 대사 변화, 세포 성장률, 생존능 변화 및 성능에 영향을 미칠 수 있는 임의의 추가 제품 변화를 설명할 것이다.

[0325] D. ADCC

[0326] 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC)은 면역 이펙터 세포에 의한 항체 코팅된 표적 세포의 용해를 유도하는 면역 기전이다. 표적 세포는 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 이의 단편이 일반적으로 Fc 영역에 대해 N-말단인

단백질 부분을 통해 특이적으로 결합하는 세포일 수 있다. 증가/감소된 항체 의존적 세포 매개 세포독성 (ADCC)을 갖는 항체는 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 측정된 바와 같이 증가/감소된 ADCC를 갖는 항체를 포함할 수 있다.

[0327] 본원에서 사용되는 바, 용어 "증가/감소된 ADCC"는 상기 기술된 ADCC의 기전에 의해 표적 세포를 둘러싸는 배지에서 주어진 항체 농도에서 주어진 시간에 용해되는 표적 세포 개수의 증가/감소, 및/또는 ADCC의 기전에 의해 주어진 시간에 주어진 개수의 표적 세포의 용해를 달성하는 데 필요한, 표적 세포를 둘러싼 배지 중의 항체 농도의 감소/증가로 정의된다. ADCC의 증가/감소는 동일한 표준 생산, 정제, 제제화 및 보관 방법 (당업자에게 공지)을 사용하여 동일한 타입의 숙주 세포에 의해 생산되지만, 조작되지 않은 동일한 항체에 의해 매개되는 ADCC 대비의 상대적인 것이다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법에 의해 변경된 글리코실화 패턴을 갖도록 (예컨대, 글리코실트랜스퍼라제, GnTIII 또는 다른 글리코실트랜스퍼라제를 발현하도록) 조작된 숙주 세포에 의해 생산된 항체에 의해 매개된 ADCC의 증가는 동일한 타입의 조작되지 않은 숙주 세포에 의해 생산된 동일한 항체에 의해 매개된 ADCC 대비의 상대적인 것이다.

[0328] **E. CDC**

[0329] 보체 의존성 세포독성 (CDC)은 보체계의 기능이다. 면역계의 항체 또는 세포의 개입 없이 막을 손상시켜 병원체를 사멸시키는 면역계의 프로세스이다. 3가지 주요 프로세스가 있다. 세 가지 모두 하나 이상의 막 공격 복합체 (MAC)를 병원체에 삽입하여 치명적인 콜로이드-삼투성 팽창, 즉, CDC를 유발한다. 이는 항체 또는 항체 단편이 항진균 효과를 갖게 하는 기전 중 하나이다.

[0330] **IV. 항체 접합체**

[0331] 본 개시내용의 항체는 적어도 하나의 작용제에 연결되어 항체 접합체를 형성할 수 있다. 진단제 또는 치료제로서 항체 분자의 효능을 증가시키기 위해, 적어도 하나의 원하는 분자 또는 모이어티를 연결하거나, 공유 결합하거나, 복합체화시키는 것이 통상적이다. 상기 분자 또는 모이어티는 적어도 하나의 이펙터 또는 리포터 분자일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 이펙터 분자는 원하는 활성, 예컨대, 세포독성 활성을 갖는 분자를 포함한다. 항체에 부착된 이펙터 분자의 비제한적인 예로는 독소, 항종양제, 치료 효소, 방사성핵종, 항바이러스제, 킬레이팅제, 사이토카인, 성장 인자 및 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 그에 반해, 리포터 분자는 검정법을 사용하여 검출될 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 항체에 접합된 리포터 분자의 비제한적인 예로는 효소, 방사성표지(radiolabel), 합텐, 형광성 표지, 인광성 분자, 화학발광성 분자, 발색단, 광친화성 분자, 착색된 입자 또는 리간드, 예컨대, 비오틴을 포함한다.

[0332] 항체 접합체는 일반적으로 진단제로 사용하기에 바람직하다. 항체 진단제는 일반적으로 예컨대, 다양한 면역검정법과 같은 시험관내 진단제로 사용되는 것, 및 일반적으로 "항체-유도 이미징"으로 공지된 생체내 진단 프로토콜에 사용되는 것의 두 가지 부류에 포함된다. 항체에 대한 이의 부착 방법과 같이, 다수의 적절한 이미징제가 당업계에 공지되어 있다 (예컨대, 미국 특허 5,021,236, 4,938,948, 및 4,472,509 참조). 사용되는 이미징 모이어티는 상자성 이온, 방사성 동위원소, 형광색소, NMR-검출가능한 물질 및 X-선 이미징제일 수 있다.

[0333] 상자성 이온의 경우, 예컨대, 크롬 (III), 망가니즈 (II), 철 (III), 철 (II), 코발트 (II), 니켈 (II), 구리 (II), 네오디뮴 (III), 사마륨 (III), 이테르븀 (III), 가돌리늄 (III), 바나듐 (II), 터븀 (III), 디스프로슘 (III), 홀뮴 (III) 및/또는 에르븀 (III)과 같은 이온이 언급될 수 있으며, 가돌리늄이 특히 바람직하다. 예컨대, X선 이미징과 같은 다른 상황에서 유용한 이온은 란탄 (III), 금 (III), 납 (II), 및 특히 비스무트 (III)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0334] 치료 및/또는 진단 적용을 위한 방사성 동위원소의 경우, 아스타틴 ^{211}, ^{14}탄소, ^{51}크롬, ^{36}염소, ^{57}코발트, ^{58}코발트, 구리^{67}, ^{152}Eu, 갈륨^{67}, ^{3}수소, 아이오딘^{123}, 아이오딘^{125}, 아이오딘^{131}, 인듐^{111}, ^{59}철, ^{32}인, 레늄^{186}, 레늄^{188}, ^{75}셀레늄, ^{35}황, 테크니슘^{99m} 및/또는 이트륨^{90}이 언급될 수 있다. ^{125}I는 종종 특정 실시양태에서 사용하기에 바람직하며, 테크니슘^{99m} 및/또는 인듐^{111} 또한 이의 낮은 에너지 및 긴 범위 검출에 대한 적합성에 기인하여 종종 바람직하다. 본 개시내용의 방사성 표지된 모노클로날 항체는 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 생산될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 아이오딘화나트륨 및/또는 아이오딘화칼륨 및 예컨대, 차아염소산나트륨과 같은 화학적 산화제, 또는 예컨대, 락토퍼옥시다제와 같은 효소 산화제와의 접촉에 의해 아이오딘화될 수 있다. 본 개시내용에 따른 모노클로날 항체는 리간드 교환 프로세스, 예를 들어, 퍼테크네이트를 주석 용액으로 환원시키고, 환원된 테크네튬을 세파덱스 칼럼에서 킬레이트화하고, 항체를 이 칼럼에 적용함으로써 테크네튬^{99m}으로 표

지될 수 있다. 대안적으로, 직접 표지 기술은, 예컨대, 퍼테크네이트, 예컨대, $SNCl_2$와 같은 환원제, 예컨대, 소듐-포타슘 프탈레이트 용액과 같은 완충제 용액, 및 항체를 인큐베이션시킴으로써 사용될 수 있다. 금속 이온으로 존재하는 방사성 동위원소를 항체에 결합시키는 데 종종 사용되는 중간 작용기는 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA) 또는 에틸렌 디아민테트라아세트산 (EDTA)이다.

[0335] 접합체로서 사용하기 위한 형광성 표지의 비제한적인 예로는 알렉사(Alexa) 350, 알렉사 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), Cy3, Cy5,6-FAM, 플루오레세인 이소티오시아네이트, HEX, 6-JOE, 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린 514, 퍼시픽 블루(Pacific Blue), REG, 로다민 그린(Rhodamine Green), 로다민 레드(Rhodamine Red), 레노그라핀(Renographin), ROX, TAMRA, TET, 테트라메틸로다민, 및/또는 텍사스 레드(Texas Red)를 포함한다.

[0336] 본 개시내용에 따른 추가의 항체 타입은 주로 시험관내 사용을 목적으로 하는 항체이며, 여기서, 항체는 2차 결합 리간드 및/또는 발색 기질과의 접촉시 착색된 생성물을 생성하게 되는 효소 (효소 태그)에 연결된다. 적합한 효소의 예로는 우레아제, 알칼리성 포스파타제, (호스래디쉬) 히드로겐 퍼옥시다제 또는 글루코오스 옥시다제를 포함한다. 바람직한 2차 결합 리간드는 비오틴 및 아비딘 및 스트렙타비딘 화합물이다. 상기 표지의 사용은 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 및 4,366,241에 기술되어 있다.

[0337] 항체의 분자의 부위-특이적 부착에 대한 또 다른 공지된 방법은 항체와 합텐-기반 친화성 표지의 반응을 포함한다. 본질적으로, 합텐-기반 친화성 표지는 항원 결합 부위의 아미노산과 반응하여 이 부위를 파괴하고, 특정 항원 반응을 차단한다. 그러나, 이는 항체 접합체에 의한 항원 결합의 손실을 초래하기 때문에 유리하지 않을 수 있다.

[0338] 아지도 기를 함유하는 분자는 또한 저 강도 자외선에 의해 생성되는 반응성 니트렌 중간체를 통해 단백질에 대한 공유 결합을 형성하는 데 사용될 수 있다 (문헌 [Potter and Haley, 1983]). 특히, 퓨린 뉴클레오티드의 2-아지도 및 8-아지도 유사체는 미정제 세포 추출물에서 뉴클레오티드 결합 단백질을 식별하는 부위-특이적 포토프로브로 사용되었다 (문헌 [Owens & Haley, 1987]; [Atherton *et al.*, 1985]). 2-아지도 및 8-아지도 뉴클레오티드는 또한 정제된 단백질의 뉴클레오티드 결합 도메인을 맵핑하는 데 사용되었으며 (문헌 [Khatoon *et al.*, 1989]; [King *et al.*, 1989]; [Dholakia *et al.*, 1989]), 항체 결합제로 사용될 수 있다.

[0339] 항체의 이의 접합체 모이어티에 대한 부착 또는 접합을 위한 여러 방법이 당업계에 공지되어 있다. 일부 부착 방법은, 예를 들어, 디에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물 (DTPA); 에틸렌트리아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔술폰아미드; 및/또는 항체에 부착된 테트라클로로-3a-6a-디페닐글리쿠릴-3과 같은 유기 킬레이팅제를 이용한 금속 킬레이트 착체의 사용을 포함한다 (미국 특허 4,472,509 및 4,938,948). 모노클로날 항체는 예컨대, 글루타르알데히드 또는 페리오데이트와 같은 커플링제의 존재하에 효소와 반응할 수도 있다. 플루오레세인 마커가 있는 접합체는 상기 커플링제의 존재하에서 또는 이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조된다. 미국 특허 4,938,948에서, 유방 종양의 이미징은 모노클로날 항체를 사용하여 이루어지며, 검출가능한 이미징 모이어티는 예컨대, 메틸-p-히드록시벤즈이미데이트 또는 N-숙신이미딜-3-(4-히드록시페닐)프로피오네이트와 같은 링커를 사용하여 항체에 결합된다.

[0340] 다른 실시양태에서, 항체 결합 부위를 변경하지 않는 반응 조건을 사용하여 면역글로불린의 Fc 영역에 술프히드릴 기를 선택적으로 도입함으로써 면역글로불린을 유도체화하는 것 또한 유용하다. 이 방법론에 따라 제조된 항체 접합체는 개선된 수명, 특이성 및 감도를 나타내는 것으로 개시되어 있다 (미국 특허 5,196,066 (본원에서 참조로 포함)). 리포터 또는 이펙터 분자가 Fc 영역의 탄수화물 잔기에 접합되는 이펙터 또는 리포터 분자의 부위-특이적 부착도 문헌에 개시되었다 (문헌 [O'Shannessy *et al.*, 1987]). 이 접근법은 현재 임상 평가 중인 진단적 및 치료적으로 유망한 항체를 생산하는 것으로 보고되었다.

[0341] **V. 면역검출 방법**

[0342] 추가의 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 칸디다 및 이의 연관 항원을 결합, 정제, 제거, 정량화 및 다르게는 일반적으로 검출하기 위한 면역검출 방법에 관한 것이다. 이러한 방법이 전통적인 의미로 적용될 수 있지만, 다른 용도는 백신 및 기타 칸디다 스톡의 품질 관리 및 모니터링에 있을 것이며, 여기서, 본 개시내용에 따른 항체는 바이러스의 항원의 양 또는 완전성 (즉, 장기 안정성)을 평가하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 본 방법은 적절한/원하는 반응성 프로파일에 대해 다양한 항체를 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

[0343] 다른 면역검출 방법은 대상체에서 칸디다의 존재를 측정하기 위한 특정 검정법을 포함한다. 매우 다양한 검정법 포맷이 사용될 수 있지만, 구체적으로, 대상체로부터 수득된 체액, 예컨대, 타액, 혈액, 혈장, 가래, 정액 또는 소변에서 칸디다를 검출하는 데 사용되는 것이 사용될 수 있다. 특히, 정액은 칸디다를 검출하기 위한 실행가능한 샘플로 입증되었다 (문헌 [Purpura *et al.*, 2016]; [Mansuy *et al.*, 2016]; [Barzon *et al.*, 2016]; [Gornet *et al.*, 2016]; [Duffy *et al.*, 2009]; [CDC, 2016]; [Halfon *et al.*, 2010]; [Elder *et al.* 2005]). 검정법은 가정용 임신 테스트와 유사한 측면 유동 검정법 (하기 참조)을 포함하여 비의료용 (가정용)으로 유리하게 포맷될 수 있다. 이러한 검정법은 가족 구성원이 사용할 수 있게 하는 적절한 시약 및 설명서를 포함하는 키트 형태로 패키징될 수 있다.

[0344] 일분 면역검출 방법은 몇 가지만 예로 들자면, 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA), 방사선면역검정법 (RIA), 면역방사측정 검정법, 형광면역검정법, 화학발광 검정법, 생물발광 검정법, 및 웨스턴 블롯을 포함한다. 특히, 샘플 중 특정 기생충 에피토프에 대한 칸디다 항체의 검출 및 정량화를 위한 경쟁 검정법 또한 제공한다. 다양한 유용한 면역검출 방법의 단계는 예를 들어, 과학 문헌, 예컨대, 문헌 [Doolittle and Ben-Zeev (1999)], [Gulbis and Galand (1993)], [De Jager *et al.* (1993)], 및 [Nakamura *et al.* (1987)]에 기술되었다. 일반적으로, 면역결합 방법은 칸디다를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 수득하고, 경우에 따라, 면역복합체의 형성을 허용하기에 효과적인 조건하에서 샘플을 본 개시내용에 따른 1차 항체와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0345] 상기 방법은 샘플로부터 칸디다 또는 관련 항원을 정제하는 방법을 포함한다. 항체는 바람직하게는 칼럼 매트릭스 형태와 같은 고체 지지체에 연결될 것이고, 칸디다 또는 항원 성분을 함유하는 것으로 의심되는 샘플은 고정화된 항체에 적용될 것이다. 원치않는 구성요소는 칼럼으로부터 세척되고, 칸디다 항원은 고정화된 항체에 면역복합체가 된 상태 그대로 남고, 이어서, 칼럼으로부터 유기체 또는 항원을 제거하여 수집된다.

[0346] 면역결합 방법은 또한 샘플 중 칸디다 또는 관련 성분의 양을 검출 및 정량화하는 방법 및 결합 프로세스 동안 형성된 임의의 면역 복합체의 검출 및 정량화 방법도 포함한다. 여기서, 칸디다 또는 그 항원을 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 수득하고, 샘플을 칸디다 또는 이의 성분에 결합하는 항체와 접촉시킨 후, 특정 조건하에서 형성된 면역 복합체의 양을 검출하고, 정량화한다. 항원 검출 관점에서, 분석되는 생물학적 샘플은 예컨대, 조직 절편 또는 시료, 균질화된 조직 추출물, 혈액 및 혈청을 포함한 생물학적 유체 또는 분비물, 예컨대, 대변 또는 소변과 같이 칸디다 또는 칸디다 항원을 함유하는 것으로 의심되는 임의의 시료일 수 있다.

[0347] 면역 복합체 (1차 면역 복합체)의 형성을 허용하기에 충분한 기간 동안 그에 효과적인 조건하에서 선택된 생물학적 샘플을 항체와 접촉시키는 것은 일반적으로 단순히 항체 조성물을 샘플에 첨가하고, 항체가 존재하는 칸디다 또는 항원과 면역 복합체를 형성하기에, 특히, 그에 결합하기에 충분한 일정 기간 동안 혼합물을 인큐베이션시키는 것이 문제이다. 이 시점 후, 샘플-항체 조성물, 예컨대, 조직 절편, ELISA 플레이트, 도트 블롯 또는 웨스턴 블롯을 일반적으로 세척하여 비특이적으로 결합된 임의의 항체 종을 제거하여 1차 면역 복합체 내에서 특이적으로 결합된 항체만이 검출될 수 있도록 할 것이다.

[0348] 일반적으로, 면역복합체 형성의 검출은 당업계에 널리 공지되어 있고, 다수의 접근법의 적용을 통해 달성될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 예컨대, 방사성, 형광성, 생물학적 및 효소 태그와 같은 표지 또는 마커의 검출에 기초한다. 이러한 표지의 사용에 관한 특허로는 미국 특허 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 및 4,366,241을 포함한다. 물론, 당업계에 공지된 바와 같이, 예컨대, 2차 항체 및/또는 비오틴/아비딘 리간드 결합 배열과 같은 2차 결합 리간드의 사용을 통해 추가적인 이점을 찾을 수 있다.

[0349] 검출에 사용된 항체는 그 자체가 검출가능한 표지에 연결될 수 있고, 이어서, 단순히 상기 표지를 검출함으로써 조성물 내의 1차 면역 복합체의 양을 측정될 수 있게 할 것이다. 대안적으로, 1차 면역 복합체 내에서 결합되는 1차 항체는 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 2차 결합 리간드에 의해 검출될 수 있다. 이러한 경우, 2차 결합 리간드는 검출가능한 표지에 연결될 수 있다. 2차 결합 리간드는 그 자체가 종종 항체이고, 따라서, "2차" 항체로 지칭될 수 있다. 1차 면역 복합체는 2차 면역 복합체의 형성을 허용하기에 충분한 시간 동안 그에 효과적인 조건하에 표지된 2차 결합 리간드 또는 항체와 접촉된다. 이어서, 2차 면역 복합체는 일반적으로 비특이적으로 결합된 표지된 임의의 2차 항체 또는 리간드를 제거하기 위해 세척되고, 이어서, 2차 면역 복합체에 남아 있는 표지가 검출된다.

[0350] 추가 방법은 2단계 접근법에 의한 1차 면역 복합체의 검출을 포함한다. 예컨대, 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 항체와 같은 2차 결합 리간드는 상기 기술된 바와 같이 2차 면역 복합체를 형성하는 데 사용된다. 세척 후, 2차 면역 복합체는 면역 복합체 (3차 면역 복합체)의 형성을 허용하기에 충분한 기간 동안 그에 효과적인 조건하에서 다시 2차 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 3차 결합 리간드 또는 항체와 접촉된다. 3차 리간드 또는 항

체는 검출가능한 표지에 연결되고, 이렇게 형성된 3차 면역 복합체를 검출할 수 있다. 이 시스템은 원하는 경우, 신호 증폭을 제공할 수 있다.

[0351] 면역 검출의 한 방법은 2개의 상이한 항체를 사용한다. 1차 비오티닐화된 항체는 표적 항원을 검출하는 데 사용되고, 2차 항체는 복합체를 형성한 비오틴에 부착된 비오틴을 검출하는 데 사용된다. 본 방법에서, 시험하고자 하는 샘플을 먼저 제1 단계 항체를 포함하는 용액에서 인큐베이션시킨다. 표적 항원이 존재하는 경우, 항체의 일부는 항원에 결합하여 비오티닐화된 항체/항원 복합체를 형성한다. 이어서, 항체/항원 복합체는 스트렙타비딘(또는 아비딘), 비오티닐화된 DNA 및/또는 상보적인 비오티닐화된 DNA의 연속 용액에서 인큐베이션시킴에 따라 증폭되고, 각 단계는 항체/항원 복합체에 추가 비오틴 부위를 추가한다. 증폭 단계는 적합한 수준의 증폭이 달성될 때까지 반복되며, 이 시점에서 샘플은 비오틴에 대한 제2 단계 항체를 포함하는 용액에서 인큐베이션된다. 이 제2 단계 항체는 예를 들어, 발색 기질을 사용하는 조직효소학에 의해 항체/항원 복합체의 존재를 검출하는 데 사용할 수 있는 효소로 표지된다. 적절한 증폭으로 육안으로 볼 수 있는 접합체가 생성될 수 있다.

[0352] 공지된 또 다른 면역검출 방법은 면역 PCR (중합효소 연쇄 반응) 방법론을 이용한다. PCR법은 비오티닐화된 DNA와 함께 인큐베이션시킬 때까지 칸토르(Cantor) 방법과 유사하지만, 다회 라운드의 스트렙타비딘 및 비오티닐화된 DNA 인큐베이션을 이용하는 대신, DNA/비오틴/스트렙타비딘/항체 복합체를 항체를 방출하는 낮은 pH 또는 높은 염 완충제로 세척한다. 이어서, 생성된 세척 용액을 사용하여 적합한 대조군과 함께 적절한 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행한다. 적어도 이론상으로는 PCR의 엄청난 증폭 능력과 특이성을 이용하여 단일 항원 분자를 검출할 수 있다.

[0353] **A. ELISA**

[0354] 면역검정법은 이의 가장 간단하고 직접적인 의미에서 결합 검정법이다. 특정 바람직한 면역검정법은 당업계에 공지된 다양한 타입의 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA) 및 방사선면역검정법 (RIA)이다. 조직 절편을 사용한 면역조직화학 검출도 특히 유용하다. 그러나, 검출이 이러한 기술에 제한되지 않고, 웨스턴 블롯팅, 도트 블롯팅, FACS 분석 등이 또한 사용될 수 있다는 것을 쉽게 이해할 것이다.

[0355] 한 예시적인 ELISA에서, 본 개시내용의 항체는 예컨대, 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트 내의 웰과 같이 단백질 친화성을 나타내는 선택된 표면 상에 고정화된다. 이어서, 칸디다 또는 칸디다 항원을 함유하는 것으로 의심되는 시험 조성물을 웰에 첨가한다. 결합, 및 비특이적으로 결합된 면역 복합체를 제거하기 위한 세척 후, 결합된 항원을 검출할 수 있다. 검출가능한 표지에 연결된 또 다른 항-칸디다 항체를 첨가하여 검출할 수 있다. 이러한 타입의 ELISA가 간단한 "샌드위치 ELISA"이다. 검출은 또한 제2 항-칸디다 항체를 첨가한 후, 2차 항체에 대해 결합 친화성을 갖는 것으로서, 검출가능한 표지에 연결되어 있는 3차 항체를 첨가함으로써 달성할 수 있다.

[0356] 또 다른 예시적인 ELISA에서, 칸디다 또는 칸디다 항원을 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 웰 표면에 고정시킨 후, 본 개시내용의 항-칸디다 항체와 접촉시킨다. 결합, 및 비특이적으로 결합된 면역 복합체를 제거하기 위한 세척 후, 결합된 항-칸디다 항체를 검출한다. 초기 항-칸디다 항체가 검출가능한 표지에 연결된 경우, 면역 복합체를 직접 검출할 수 있다. 다시, 면역 복합체는 1차 항-칸디다 항체에 대해 결합 친화성을 갖는 것으로서, 검출가능한 표지에 연결되어 있는 2차 항체를 사용하여 검출할 수 있다.

[0357] 사용되는 포맷과 상관없이, ELISA는 예컨대, 코팅, 인큐베이션 및 결합, 비특이적으로 결합된 종을 제거하기 위한 세척, 결합된 면역 복합체 검출과 같은 특정 기능을 공통적으로 가지고 있다. 이는 하기에서 설명된다.

[0358] 플레이트를 항원 또는 항체로 코팅할 때, 일반적으로 플레이트의 웰을 항원 또는 항체 용액과 함께 밤새도록 또는 지정된 시간 동안 인큐베이션시킬 것이다. 이어서, 플레이트의 웰을 세척하여 불완전하게 흡착된 물질을 제거하다. 이어서, 웰 중 남아있는 이용가능한 표면은 시험 항혈청과 관련하여 항원적으로 중성인 비특이적 단백질로 "코팅"된다. 이는 우혈청 알부민 (BSA), 카제인 또는 분유 용액을 포함한다. 코팅은 고정화 표면 상의 비특이적 흡착 부위를 차단하여, 표면에 대한 항혈청의 비특이적 결합으로 인한 배경을 감소킨다.

[0359] ELISA에서는 가능하게는 직접 절차보다 2차 또는 3차 검출 수단을 사용하는 것이 더 일반적일 수 있다. 따라서, 웰에 단백질 또는 항체를 결합시키고, 배경을 감소시키기 위해 비반응성 물질로 코팅하고, 비결합 물질을 제거하기 위해 세척한 후, 고정화 표면을 면역 복합체 (항원/항체) 형성을 허용하는 데 효과적인 조건에서 시험하고자 하는 생물학적 샘플과 접촉시킨다. 이어서, 면역 복합체의 검출은 표지된 2차 결합 리간드 또는 항체, 및 표지된 3차 항체 또는 3차 결합 리간드와 함께 2차 결합 리간드 또는 항체를 필요로 한다.

[0360] "면역 복합체 (항원/항체) 형성을 허용하는 데 효과적인 조건하에서"는 조건이 바람직하게는 항원 및/또는 항체

를 예컨대, BSA, 소 감마 글로불린 (BGG) 또는 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS)/트윈과 같은 용액으로 희석하는 것을 포함한다는 것을 의미한다. 상기 첨가되는 작용제는 또한 비특이적 배경의 감소를 돕는 경향이 있다.

[0361] "적합한" 조건은 또한 인큐베이션이 효과적인 결합을 허용하기에 충분한 온도 또는 기간 동안 진행된다는 것을 의미한다. 인큐베이션 단계는 전형적으로 약 1 내지 2 내지 4시간 등, 바람직하게는 약 25℃ 내지 27℃의 온도에서, 또는 약 4℃ 등에서 밤새도록 이루어질 수 있다.

[0362] ELISA의 모든 인큐베이션 단계 후에, 접촉된 표면을 세척하여 복합체를 형성하지 않은 물질을 제거한다. 바람직한 세척 절차는 예컨대, PBS/트윈 또는 보레이트 완충액과 같은 용액으로 세척하는 것을 포함한다. 시험 샘플과 원래 결합된 물질 사이의 특정 면역 복합체의 형성 및 후속 세척 후, 심지어 극소량의 면역 복합체의 존재도 측정될 수 있다.

[0363] 검출 수단을 제공하기 위해, 2차 또는 3차 항체는 검출을 허용하는 연관된 표지를 가질 것이다. 바람직하게, 이는 적절한 발색 기질과 함께 인큐베이션할 때 발색을 생성하는 효소일 것이다. 따라서, 예를 들어, 제1 및 제2 면역 복합체를 우레아제, 글루코스 옥시다제, 알칼리성 포스파타제 또는 히드로겐 퍼옥시다제 접합 합체와 함께 추가 면역 복합체 형성 발생을 촉진하는 기간 동안 및 그러한 조건하에 접촉시키거나, 또는 인큐베이션시키고자 할 것이다 (예컨대, PBS 함유 용액, 예컨대, PBS-트윈 중 실온에서 2시간 동안 인큐베이션).

[0364] 표지된 항체와 함께 인큐베이션시키고, 이어서, 비결합 물질을 제거하기 위해 세척한 후, 예컨대, 발색 기질, 예컨대, 우레아, 또는 브로모크레졸 퍼플, 또는 2,2'-아지노-디-(3-에틸-벤즈티아졸린-6-술폰산 (ABTS) 또는 H2O2, 효소 표지로서 퍼옥시다제의 경우, H_2O_2와 함께 인큐베이션시킴으로써 표지 양을 정량화한다. 이어서, 예컨대, 가시 스펙트럼 분광광도계를 사용하여 생성된 색상 정도를 측정하여 정량화한다.

[0365] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 경쟁 포맷의 사용에 관한 것이다. 이는 특히 샘플 중 칸디다 항체의 검출에 유용하다. 경쟁 기반 검정법에서, 양이 알려지지 않은 피분석물 또는 항체는 양이 알려진 표지된 항체 또는 피분석물을 대체할 수 있는 능력에 의해 측정된다. 따라서, 정량화가능한 신호 손실은 샘플 중 알려지지 않은 항체 또는 분석물의 양을 나타낸다.

[0366] 여기서, 본 발명자는 샘플 중 칸디다 항체의 양을 측정하기 위해 표지된 칸디다 모노클로날 항체를 사용하는 것을 제안한다. 기본 포맷은 양이 알려진 칸디다 모노클로날 항체 (검출가능한 표지에 연결)를 칸디다 항원 또는 입자와 접촉시키는 것을 포함할 것이다. 칸디다 항원 또는 유기체는 바람직하게는 지지체에 부착된다. 표지된 모노클로날 항체를 지지체에 결합한 후, 샘플을 첨가하고, 샘플 중 임의의 비표지 항체가 표지된 모노클로날 항체와 경쟁하여 이를 대체하도록 하는 조건하에서 인큐베이션시킨다. 손실된 표지 또는 남아있는 표지를 측정함으로써 (및 결합된 표지의 원래 양에서 상기 값을 공제함으로써), 얼마나 많은 비표지 항체가 지지체에 결합되어 얼마나 많은 항체가 샘플에 존재하는지를 측정할 수 있다.

[0367] **B. 웨스턴 블롯**

[0368] 웨스턴 블롯 (대안적으로, 단백질 면역블롯)은 조직 균질액 또는 추출물의 주어진 샘플 중 특정 단백질을 검출하는 데 사용되는 분석 기술이다. 이는 겔 전기영동을 사용하여 폴리펩티드의 길이에 의해 (변성 조건) 또는 단백질의 3차원 구조에 의해 (고유/비변성 조건) 천연 또는 변성된 단백질을 분리한다. 이어서, 단백질을 막 (전형적으로, 니트로셀룰로스 또는 PVDF)으로 옮기고, 여기서, 표적 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 프로빙 (검출)된다.

[0369] 샘플은 전체 조직 또는 세포 배양물로부터 채취될 수 있다. 대부분의 경우, 고형 조직을 먼저 블렌더를 사용하여 (부피가 더 큰 샘플인 경우), 균질화기를 사용하여 (부피가 더 작은 경우), 또는 초음파 처리에 의해 기계적으로 분해한다. 세포는 또한 상기 기계적 방법 중 하나를 사용하여 파단 개방할 수 있다. 그러나, 환경 샘플은 단백질의 공급원이 될 수 있는 바, 웨스턴 블롯팅은 오직 세포 연구로만 국한된다는 것에 주의하여야 한다. 다양한 계면활성제, 염 및 완충제를 사용하여 세포 용해를 촉진하고, 단백질을 가용화시킬 수 있다. 그 자체 효소에 의한 샘플의 분해를 방지하기 위해 프로테아제 및 포스파타제 억제제가 종종 첨가된다. 조직 제조는 단백질 변성을 피하기 위해 종종 저온에서 수행된다.

[0370] 샘플의 단백질은 겔 전기영동을 사용하여 분리된다. 단백질의 분리는 등전점 (pI), 분자량, 전하 또는 이들 인자의 조합에 의해 수행될 수 있다. 분리 성질은 샘플 처리 및 겔 성질에 의존한다. 이는 단백질을 측정하는 데 매우 유용한 방법이다. 단일 샘플로부터의 단백질을 2차원으로 펼치는 2차원 (2-D) 겔 또한 사용될 수 있다. 단백질은 1차원으로 등전점 (순전하가 중성인 pH)에 따라, 및 2차원으로 이의 분자량에 따라 분리된다.

[0371] 단백질이 항체 검출에 접근할 수 있도록 하기 위해, 겔 내에서 니트로셀룰로스 또는 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (PVDF)로 제조된 막으로 단백질을 이동시킨다. 막을 겔 위에 놓고, 그 위에 필터 페이퍼 스택을 놓는다. 전체 스택을, 단백질을 그와 함께 이동시키는 모세관 작용에 의해 페이퍼 위로 이동하는 완충제 용액에 놓는다. 단백질을 옮기는 또 다른 방법은 일렉트로블롯팅으로 불리는 것이며, 이는 전류를 사용하여 겔에서 PVDF 또는 니트로셀룰로스 막으로 단백질을 끌어당긴다. 단백질은 겔 내에서 그가 가진 조직을 유지하면서 겔 내에서 막으로 이동한다. 이 블롯팅 프로세스의 결과로서, 단백질을 검출을 위해 얇은 표면층에 노출시킨다 (하기 참조). 두 종류의 막은 이의 비특이적 단백질 결합 특성 (즉, 모든 단백질에 동등하게 잘 결합)에 대해 선택된다. 단백질 결합은 소수성 상호작용 뿐만 아니라, 막과 단백질 사이의 하전된 상호작용을 기반으로 한다. 니트로셀룰로스 막은 PVDF보다 저렴하지만, 훨씬 더 취약하고, 반복되는 프로빙에 잘 견디지 못한다. 겔에서 막으로의 단백질 전달의 균일성과 전반적인 효율성은 막을 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) 또는 폰소 S(Ponceau S) 염료로 염색함으로써 확인할 수 있다. 일단 전달되면, 표지된 1차 항체 또는 비표지 1차 항체를 사용하여 단백질을 검출한 후, 1차 항체의 Fc 영역에 결합하는 표지된 단백질 A 또는 표지된 2차 항체를 사용하여 간접 검출을 수행한다.

[0372] **C. 측면 유동 검정법**

[0373] 측면 유동 면역크로마토그래피 검정법으로도 공지된 측면 유동 검정법은, 판독 장비 지원의 실험실 기반 적용이 다수 존재하지만, 전문화된 고가 장비를 필요로 하지 않으면서, 샘플 (매트릭스) 중 표적 피분석물의 존재 (또는 부재)를 검출하기 위한 간단한 장치이다. 전형적으로, 이들 시험은 가정용 테스트, 현장 진료 테스트 또는 실험실 사용 용도의 자원이 적은 의료 진단으로 사용된다. 널리 보급되고, 잘 알려진 적용은 가정용 임신 테스트이다.

[0374] 이 기술은 예컨대, 다공성 종이 또는 소결된 중합체와 같은 일련의 모세관 베드를 기반으로 한다. 이 요소들은 각각 체액 (예컨대, 소변)을 자발적으로 운반하는 능력을 가지고 있다. 제1 요소 (샘플 패드)는 스폰지 역할을 하며, 과량의 샘플 유체를 보유한다. 일단 침지되고 나면, 유체는 제조업체가 소위 접합체라고 하는 건조된 포맷의 생체활성 입자 (하기 참조)를, 표적 분자 (예컨대, 항원)와 입자 표면에 고정화된 상기 표적 분자의 화학적 파트너 (예컨대, 항체) 간의 최적화된 화학 반응을 보장하는 모든 것을 함유하는 염-당 매트릭스에 저장한 것인 제2 요소 (접합체 패드)로 이동한다. 샘플 유체가 염-당 매트릭스를 용해하는 동안, 이는 또한 입자도 용해시키고, 다공성 구조를 통해 유동하면서, 한 번의 조합된 수송 작용으로 샘플 및 접합체 믹스도 용해시킨다. 이러한 방식으로, 피분석물은 제3 모세관 베드를 통해 더 멀리 이동하면서 입자에 결합한다. 이 물질에는 제조업체에 의해 제3 분자가 고정화된 영역 (종종 스트라이프로 명명)이 하나 이상 존재한다. 샘플-접합체 믹스가 이들 스트라이프에 도달할 때까지, 피분석물은 입자에 결합되어 있고, 제3 '포획' 분자는 복합체에 결합한다. 잠시 후, 점점 더 많은 유체가 스트라이프를 통과할 때, 입자는 축적되고, 스트라이프 영역의 색상은 변색된다. 전형적으로, 적어도 2개의 스트라이프가 존재하는데: 하나 (대조군)는 임의의 입자를 포획하여 반응 조건과 기술이 제대로 작동했다는 것을 보여주는 것이고, 또 다른 하나는 특정 포획 분자를 포함하고, 피분석물 분자가 고정화된 입자만을 포획한다. 상기 반응 구역을 통과한 후, 유체는 단순히 폐기물 용기 역할을 하는 최종 다공성 물질 - 윅(wick)-로 진입한다. 측면 흐름 시험은 경쟁 또는 샌드위치 검정법으로 작동할 수 있다. 측면 유동 검정법은 미국 특허 6,485,982에 개시되어 있다.

[0375] **D. 면역조직화학법**

[0376] 본 개시내용의 항체는 또한 면역조직화학법 (IHC)에 의한 연구를 위해 제조된 신선-냉동 및/또는 포르말린-고정, 파라핀-포매 조직 블록 둘 모두와 함께 사용될 수 있다. 이러한 미립자 시료로부터 조직 블록을 제조하는 방법은 다양한 예후 인자에 대한 이전의 IHC 연구에서 성공적으로 사용되었으며, 당업자에게 잘 알려져 있다 (문헌 [Brown *et al.*, 1990]; [Abbondanzo *et al.*, 1990]; [Allred *et al.*, 1990]).

[0377] 간략하면, 냉동된 절편은 작은 플라스틱 캡슐 중 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS)에 실온에서 냉동 "분쇄된" 조직 50ng을 재수화시키고/거나; 원심분리에 의해 입자를 펠릿화하고/거나; 점성 포매 매질 (OCT)에 이들을 재현탁시키고/거나; 캡슐을 도립시키고/거나, 원심분리에 의해 다시 펠릿화하고/거나; -70℃이소펜탄에서 급냉시키고/거나; 플라스틱 캡슐을 절단하고/거나, 조직의 냉동 실린더를 제거하고/거나; 저온유지장치 마이크로톰 척에 조직 실린더를 고정시키고/거나; 캡슐로부터 25-50개의 연속 절편을 절단함으로써 제조될 수 있다. 대안적으로, 전체 냉동 조직 샘플은 연속 절편 절단에 사용될 수 있다.

[0378] 영구 절편은 플라스틱 마이크로원심분리 튜브에서 50 mg 샘플의 재수화; 펠릿화; 4시간 고정 동안 10% 포르말린에 재현탁; 세척/펠릿화; 따뜻한 2.5% 아가에 재현탁; 펠릿화; 빙수에서 냉각시켜 아가를 경화시키는 단계; 튜

브로부터 조직/아가 블록을 제거하는 단계; 파라핀에 블록을 침투 및/또는 포매시키는 단계; 및/또는 최대 50개의 연속 영구 절편을 절단하는 단계를 포함하는 유사한 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 전체 조직 샘플은 대체될 수 있다.

[0379] **E. 면역검출 키트**

[0380] 추가의 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기술된 면역검출 방법과 함께 사용하기 위한 면역검출 키트에 관한 것이다. 항체는 칸디다 또는 칸디다 항원을 검출하는 데 사용될 수 있는 바, 항체는 키트에 포함될 수 있다. 따라서, 면역검출 키트는 적합한 용기 수단에 칸디다 또는 칸디다 항원에 결합하는 1차 항체, 및 임의적으로 면역검출 시약을 포함할 것이다.

[0381] 특정 실시양태에서, 칸디다 항체는 예컨대, 칼럼 매트릭스 및/또는 마이크로타이터 플레이트의 웰과 같은 고체 지지체에 미리 결합되어 있을 수 있다. 키트의 면역검출 시약은 주어진 항체와 회합되거나, 연결된 검출가능한 표지를 포함하여 다양한 형태 중 어느 한 형태를 취할 수 있다. 2차 결합 리간드와 회합되거나, 또는 그에 부착된 검출가능한 표지 또한 사용될 수 있다. 예시적인 2차 리간드는 1차 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 2차 항체이다.

[0382] 본 키트에 사용하는 데 적합한 추가의 면역검출 시약은, 검출가능한 표지에 연결된, 2차 항체에 대해 결합 친화성을 갖는 3차 항체와 함께 1차 항체에 대해 결합 친화성을 갖는 2차 항체를 포함하는 2 성분 시약을 포함한다. 상기 언급된 바와 같이, 다수의 예시적인 표지가 당업계에 공지되어 있고, 이러한 모든 표지는 본 개시내용과 관련하여 사용될 수 있다.

[0383] 키트는 검출 검정을 위한 표준 곡선을 제작하는 데 사용될 수 있는 바와 같이, 표지 또는 비표지와 상관없이, 적합하게 분취된 칸디다 또는 칸디다 항원 조성물을 추가로 포함할 수 있다. 키트는 항체-표지 접합체를 완전히 접합된 형태로, 중간체 형태로 또는 키트 사용자가 접합시키고자 하는 별도의 모이어티로 포함할 수 있다. 키트의 구성요소는 수성 매질 또는 동결건조된 형태로 패키징될 수 있다.

[0384] 키트의 용기 수단은 일반적으로 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 수단을 포함할 것이며, 그 안에 항체가 놓일 수 있거나, 바람직하게는 적합하게 분취될 수 있다. 본 개시내용의 키트는 또한 전형적으로 상업적 판매를 위해 밀폐된 공간에 항체, 항원, 및 임의의 다른 시약 용기를 포함하기 위한 수단을 포함할 것이다. 이러한 용기는 원하는 바이알이 유지되는 주입 또는 취입 성형 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

[0385] **F. 백신 및 항원 품질 관리 검정법**

[0386] 본 개시내용은 또한 샘플 중 진균 항원의 항원 완전성 (예컨대, 관련되거나, 또는 천연의 항원 또는 면역원성 구조를 나타내는 항원의 능력)을 평가하는 데 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 항체 및 항체 단편의 용도에 관한 것이다. 백신과 같은 생물학적 의약품은 일반적으로 분자적으로 특징화될 수 없다는 점에서 화학 약물과 다르며; 항체는 상당히 복잡한 큰 분자이며, 제조에 따라 광범위하게 변할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이는 또한 이의 생이 시작되는 시점에 있는 아동을 비롯한, 건강한 개체에게 투여되고, 따라서, 본인에게 해를 끼치지 않으면서, 생명을 위협하는 질환을 예방하거나 치료하는 데 효과적이라는 것을 보장하기 위해서는 이의 품질이 강하게 강조되어야 한다.

[0387] 백신 생산 및 유통의 세계화가 증가하면서 공중 보건 문제를 더 잘 관리할 수 있는 새로운 가능성이 열렸지만, 다양한 공급원에서 조달된 백신의 동등성과 호환성에 대한 질문도 제기되었다. 출발 물질, 생산 및 품질 관리 테스트의 국제 표준화, 이러한 제품이 제조 및 사용되는 방식에 대한 규제 감독에 대한 높은 기대치 설정은 따라서 지속적인 성공을 위한 초석이 되었다. 그러나, 이 분야는 여전히 끊임없이 변화하는 분야로 남아 있으며, 이 분야의 지속적인 기술 발전은 가장 오래된 공중 보건 위협 뿐만 아니라, 새로운 위협 - 말라리아, 유행성 인플루엔자, HIV 등 - 에 맞서 강력한 새 무기를 개발할 것을 약속하고, 또한 제품이 달성가능한 최고 품질 기준을 계속 충족하도록 제조업체, 규제 당국 및 광범위한 의료 커뮤니티에 큰 압력을 가한다.

[0388] 따라서, 임의의 공급원으로부터 또는 제조 프로세스 동안 중 어느 시점에서든 항원 또는 백신을 수득할 수 있다. 따라서, 품질 관리 프로세스는 진균 항원에 대한 본원에 개시된 항체 또는 단편의 결합을 확인하는 면역검정법을 위한 샘플을 제조하는 것으로 시작될 수 있다. 상기 면역검정법은 본 문서의 다른 부분에 개시되어 있으며, 이들 중 임의의 것은 항원의 구조적/항원 완전성을 평가하는 데 사용될 수 있다. 항원적으로 정확하고, 무손상인 항원을 허용가능한 양으로 포함하는 샘플을 찾기 위한 표준은 규제 기관에 의해 확립될 수 있다.

[0389] 항원 완전성이 평가되는 또 다른 중요한 실시양태는 저장 수명 및 보관 안정성을 결정하는 것이다. 백신을 포함한 대부분의 의약은 시간이 경과하면서 질이 저하될 수 있다. 따라서, 시간이 경과함에 따라 예컨대, 백신 중 항원이 대상체에게 투여될 때 더 이상 항원성이 아니거나, 면역 반응을 생성할 수 없도록 분해 또는 불안정화하는 정도를 결정하는 것이 중요하다. 또한, 항원적 무손상 항원을 허용가능한 양으로 함유하는 샘플을 찾기 위한 표준은 규제 기관에 의해 확립될 수 있다.

[0390] 특정 실시양태에서, 진균 항원은 1 초과의 보호 에피토프를 함유할 수 있다. 이러한 경우, 1 초과의 항체, 예컨대, 2, 3, 4, 5개 이상의 항체의 결합을 확인하는 검정법을 사용하는 것이 유용한 것으로 입증될 수 있다. 이러한 항체는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합하여 서로 인접하거나 심지어 중첩된다. 다른 한편, 이들은 항원의 이질적인 부분으로부터 별개의 에피토프를 나타낼 수 있다. 다중 에피토프의 완전성을 검사하여 항원의 전체 완전성에 대한 보다 완전한 픽처와 보호 면역 반응을 생성하는 능력을 결정할 수 있다.

[0391] 본 개시내용에 기술된 바와 같은 항체 및 이의 단편은 또한 보호 칸디다 항체의 존재를 검출함으로써 백신접종 절차의 효능을 모니터링하기 위한 키트에서 사용될 수 있다. 본 개시내용에 기술된 바와 같은 항체, 항체 단편, 또는 이의 변이체 및 유도체는 또한 원하는 면역원성을 갖는 백신 제조를 모니터링하기 위한 키트에서 사용될 수 있다.

[0392] **VI. 실시예**

[0393] 하기 실시예는 바람직한 실시양태를 설명하기 위해 포함된다. 하기 실시예에 개시된 기술은 실시양태의 실시에서 잘 작용하도록 발명자가 발견한 기술을 나타내고, 따라서, 그 실시를 위한 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해되어야 한다. 그러나, 당업자는 본 발명에 비추어, 개시되는 특정 실시양태에서 많은 변경이 이루어질 수 있고, 본 개시내용의 정신 및 범주로부터 벗어남 없이, 유사하거나 유사한 결과를 여전히 얻을 수 있다는 것을 인식하여야 한다.

[0394] **실시예 1 - 인간 혈청 샘플 중 FBA 및 MET6 펩티드에 대한 항체의 존재 및 인간 모노클로날 항체의 분자 클로닝**

[0395] **물질 및 방법**

[0396] ELISA 스크리닝. 96 웰 검정 플레이트의 웰을 실온에서 90 min 동안 Fba (서열 번호: 40) 또는 MET6 (서열 번호: 38) 펩티드로 코팅하였다. 펩티드를 100 mM 중탄산 Na (pH 9.6) 중 1 ㎍/ml로 희석하였다. 이어서, 플레이트를 세척하고, 0.5% 트윈 20™, 4% 유청 단백질 및 10% 우태아 혈청을 포함하는 PBS (포스페이트 완충처리된 염수, pH 7.4) (차단 완충제)로 30 min 동안 차단하였다. 혈청을 열 불활성화시키고, 차단 완충제 중에서 희석하고, 1:100 희석률로 시험하였다. 100 ㎕의 각 혈청 샘플을 펩티드로 코팅되거나, 또는 코팅되지 않은 웰에서 실험하에 90 min 동안 인큐베이션시켰다. MAb 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11) 및 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13)를 양성 대조군으로 사용하였다. 웰을 PBS + 0.5% 트윈 20™으로 세척하고, HRP 접합된 염소 항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch))의 차단 완충제 중에서 1:2000 희석률로 60 min 동안 인큐베이션시켰다. 웰을 PBS + 0.5% 트윈 20™으로 세척하고 TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)-H_2O_2로 발색시켰다. 1 M 인산으로 반응을 정지시키고, 450 nm에서 흡광도로 색상을 판독하였다.

[0397] 기억 B 세포 자극 및 인간 MAb의 분자 클로닝. CD2+, CD14+ 및 CD16+ 비-B 세포의 PBMC를 고갈시킨 후, 면역자기 비드를 사용하여 CD27+ B 세포를 양성으로 선택하여 기억 B 세포를 정제하였다 (문헌 [Robinson et al., 2016]). MS40L 피더 세포, 이스코브 변형된 둘베코 배지 10% FCS, CpG, IL-2 및 IL-21을 함유하는 다중 웰 플레이트의 웰에서 기억 B 세포를 배양하였다. MS40L은 뮤린 기질 세포주 MS5에서 유래되었고, 인간 CD40L을 발현하도록 조작되었다 (문헌 [Luo et al., 2009]). MS40L 세포는 강건한 기억 B 세포 성장을 지원한다. 각 웰에서 B 세포의 거의 클론 자극을 달성하도록 B 세포를 낮은 세포 밀도로 시딩하였다. 2주째, 배양액을 칸디다 펩티드와 반응하는 IgG 항체에 대해 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 항체 양성 웰 중 세포를 수거하고, 구아니딘 용해 완충제 (앰비온 RNA쿠어스 단리 키트(Ambion RNAqueous isolation Kit))에 보관하였다. 이어서, B 세포로부터 정제된 RNA를 역전사하여 cDNA를 제조하였다 (문헌 [Tiller et al., 2008]). 이어서, 네스티드 PCR을 수행하여 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 증폭시킨 후, 이어서, 기술된 바와 같이 중쇄 및 경쇄 발현 벡터 내로 삽입하였다 (문헌 [Robinson *et al.*, 2016]). 이어서, 매칭된 쌍의 중쇄 및 경쇄 벡터를 293T 세포에 형질감염시켰다. 48시간 후 배양 상청액을 펩티드 결합 항체에 대하여 시험하였다. 동일한 B 세포 배양물로부터의 중쇄 및 경쇄 유전자의 다중 클론으로 교차 형질감염을 수행하여 생성물이 VH 및 VL 유전자로 클로닝되었는지 확인하였다. 일단 Mab를 생성하는 최종의 HC 및 LC 플라스미드 쌍이 확인되고 나면, HC 및 LC 유전자를 시퀀싱하고, 293T 세포의 일시적으로 형질감염된 배양물에서 소규모 항체 생산을 사용하여 시험관내 MAb의 추가 특징화를 허용하는 정제

된 MAb를 생산하였다 (문헌 [Costin *et al*, 2013; Robinson *et al*., 2016]).

[0398] **결과 및 고찰**

[0399] 10개의 인간 혈청 샘플을 Fba (서열 번호: 40) 또는 MET6 (서열 번호: 38) 펩티드에 결합하는 항체의 존재에 대해 시험하였다. 도 1에 제시된 바와 같이, 샘플 중 일부는 Fba 펩티드 (서열 번호: 40)에 대한 항체의 존재에 대해 양성인 반면, 일부는 두 펩티드 모두에 대한 항체에 대해 양성인 것으로 나타났고, 이는 Fba 펩티드 (서열 번호: 40) 또는 MET6 펩티드 (서열 번호: 38)를 인식하는 항-펩티드 항체가 인간에 존재한다는 것을 입증하는 것이다.

[0400] **실시예 2 - 경쟁 ELISA에 의한 FBA 및 MET6 펩티드에 대한 인간 모노클로날 항체의 특이적 결합 입증**

[0401] **물질 및 방법**

[0402] 항체 생산 및 정제. 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13) 또는 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)의 중쇄 및 경쇄를 발현하는 매칭된 플라스미드 쌍 (또는 이중 발현 플라스미드)으로 프리스타일™ 293 세포를 일시적으로 형질감염시키고, 세포를 제조사의 설명서 (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))에 따라 8% CO_2하에 30℃에서 프리스타일™ 배지 중에서 인큐베이션시켰다. BLITZ 간섭계 (포르테바이오(ForteBio))에서 항-인간 생물층 간섭법 팁 (포르테바이오)을 이용하여 면역글로불린 생산을 모니터링하였다. 항체 생산이 정체 상태일 때, 6,000 g로 10 min 동안 원심분리하여 세포 상청액을 수확한 후, 이어서, 여과 멸균시켰다. 패스트 플로우 단백질 G(Fast Flow Protein G) (GE 라이프 사이언시스(GE Life Sciences)) 친화성 크로마토그래피에 의해 IgG를 정제하였다. 세정된 상청액을 연동 펌프를 사용하여 패스트 플로우 단백질 G 세파로스의 1 ml 칼럼에 적용하고, 칼럼을 통해 2-3회 리사이클링하였다. 이어서, 칼럼을 10 부피의 PBS로 세척하고, 결합된 IgG를 0.1 M 글리신 완충제 (pH 2.0)로 칼럼으로부터 용출시켰다. 1/10 부피의 1 M 트리스 완충제 (pH 8.0)를 첨가하여 용출된 분획을 중화시켰다. 이어서, 원심 한외여과기 (30-50,000 MWCO; 아미콘(Amicon))를 사용하여 용출된 단백질을 대략 1 mg/ml 단백질 농도로 농축시키고, PBS에 대해 투석하고, 여과 멸균하고, 4℃에서 보관하였다.

[0403] ELISA. 간략하면, Fba (서열 번호: 40) 또는 MET6 펩티드 (서열 번호: 38)를 코팅 완충제 (4 ㎍/ml) 중에 용해시키고, 용액을 사용하여 96-웰 ELISA 플레이트를 코팅하였다 (100 ml, 실온에서 1h 동안 및 4℃에서 밤새도록). 웰을 PBS로 2회 세척하고, 1% 우혈청 알부민/PBS, 200 ml)로 차단하였다. 항체1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13) 또는 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)를 PBS + 1% BSA에 용해된 동족 펩티드 Fba (서열 번호: 40) 또는 MET6 (서열 번호: 38) 펩티드 (억제제)와 200 ㎍/ml 내지 3.125 ㎍/ml 농도로 혼합하였다. 생성된 각 농도의 용액을 Fba 코팅된 또는 MET6 코팅된 마이크로타이터 웰에 삼중으로 첨가하고, 37℃에서 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 웰을 PBS + 0.5% 트윈 20™으로 3회, PBS로 1회 세척하고, 마우스 항-인간 IgG HRP (시그마(Sigma), A5420) (PBS + 0.5% 트윈 20™ 중 1:3,000으로 희석) 100 ㎕를 첨가하고, 37℃에서 1 h 동안 인큐베이션시켰다. 웰을 PBS로 3회 세척한 후, 기질 용액 (0.05 M 포스페이트-시트레이트 완충제 (pH 5.0) 25 ml, *O*-페닐렌디아민 50 mg/ml (시그마), 및 30% H_2O_2 10 ㎕)을 첨가하였다. 10-20 min 동안 색상이 발색되도록 하고, 100 ㎕의 2 M H_2SO_4를 정지시키고, 492 nm에서 판독하였다 (마이크로타이터 플레이트 판독기, 모델 450; 바이오-래드(Bio-Rad: 미국 캘리포니아주 리치몬드)). 억제제가 없는 항체를 함유하는 웰 대비로 억제율(%)을 계산하였다.

[0404] **결과 및 고찰**

[0405] 도 2 및 도 3, 둘 모두에 제시된 바와 같이, 첨가된 유리 펩티드는 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13) 및 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)의 결합에 대해 결합된 펩티드와 경쟁하였다. 상기 결과는 항체의 이의 동족 펩티드에 대한 결합이 특이적이라는 것을 입증하는 것이다.

[0406] **실시예 3 - 생물층 간섭법 (BLI)에 의한 1.10C 및 1.11D의 이의 동족 펩티드에 대한 결합 친화도 측정**

[0407] **물질 및 방법**

[0408] 생물층 간섭법. 25℃하에 옥테트(Octet) HTX에서 결합 실험을 수행하였다. 스트렙타비딘 (SA) 바이오센서를 검정 완충제 (0.1% BSA, 0.02% 트윈-20을 포함하는 PBS (pH 7.4)) 중에 수화시키고, 검정 완충제 중 0.01 ㎍/mL의 비오티닐화된 펩티드 (Fba-비오틴, seq ID 41; Met6-비오틴, seq ID 39)를 스트렙타비딘 (SA) 바이오센서 상에 로딩하였다. 결합이 평형에 도달하도록 15분 동안 로딩된 센서를 동족 IgG의 연속 희석액 (상기 실시예 2

에서와 같이 정제; 300 nM 시작, 1:3 희석, 개 포인트)에 침지시켰다. 1가 (1:1) 결합 모델을 사용하여 동역학적 상수를 계산하였다. 정상-정상 분석 또한 사용함으로써 하기 모델 방정식을 사용하여 동족 펩티드에 대한 항체 결합의 친화도를 추정하였다:

[0409] $$Req=Rmax*C/(C+kD)$$

[0410] 여기서, Req는 회합 동안 890-895초 사이의 평균 반응 수준이고, Rmax는 예상 최대 반응 수준이고, kD는 친화도, C는 항체 농도이다.

[0411] **결과 및 고찰**

[0412] 동역학적 측정값은 인간 항체 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)의 Fba 펩티드 (Fba-비오틴, 서열 번호: 41)에 대한 결합에 대한 kD는 대략 5.8×10^{-8}인 반면, 인간 항체 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13)의 MET6 펩티드 (MET6-비오틴, 서열 번호: 39)에 대한 결합에 대한 kD는 대략 1.8×10^{-7}이라는 것을 보여주는 것이다 (도 4). 정상-상태 측정값을 통해 Fba 펩티드 (Fba-비오틴, 서열 번호: 41)에 대한 결합에 대한 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 11)의 kD는 대략 7.7×10^{-8}이고, MET6 펩티드 (MET6-비오틴, 서열 번호: 39)에 대한 결합에 대한 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13)의 kD는 대략 3.1×10^{-7}인 것으로 밝혀졌다 (도 5).

[0413] **실시예 4 - 생물층 간섭법에 의한 1.10C 및 1.11D의 전장 재조합 단백질 MET6 및 FBA에 대한 결합 입증**

[0414] **물질 및 방법**

[0415] 알비칸스 및 C. 아우리스 전장 재조합 Fba 및 MET6 생성. 기술된 바와 같이 (문헌 [Li *et al.*, 2013]) Fab에 cDNA를 생성하였고, 벡터 pRSET A (인비크로겐(Invitrogen))를 사용하여 클로닝하였다. 상기 유도성 발현 벡터는 6-히스티딘 (6-His) 아미노 말단 태그가 있는 재조합 부분을 생성한다. 6-His-태그부착된 재조합 단백질의 발현을 위해 특수 디자인된 E. 콜라이 균주인 NiCo21(DE3) 단백질 생산 균주 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))를 생성된 발현 벡터로 형질전환시켰다. C. 알비칸스로부터의 MET6 유전자 서열 (NCBI 참조 서열: XM_713126.2)을 화학적으로 합성하고 (진스크립트(Genscript)), pRSET A로 서브클로닝하였다.

[0416] 전장 재조합 Fba 또는 MET6을 함유하는 박테리아 상청액 제조. pRSET A MET6 또는 pRSET A Fba로 형질전환되고, 250 RPM으로 진탕시키면서, 37℃하에 SOB에서 성장된 NiCo21(DE3) 세포의, SOB (H_2O_2 중 2% w/v 트립톤, 0.5% w/v 효모 추출물, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$)에서 제조된 밤새도록 배양된 배양물을 250 RPM으로 진탕시키면서, 37℃에서 O.D.가 0.1이 될 때까지 희석시켰다. 배양물의 O.D.가 0.4 내지 0.6에 도달하였을 때, 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드 (IPTG)를 100 μM에 첨가하고, 배양물을 추가로 12 hr 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 6,000 X g로 100 min 동안 원심분리하여 박테리아 세포를 수확하였다. 배양물 상청액을 흡인하여 폐기하고, 세포 펠릿을 셀라이틱 B(CellLytic B)™ (시그마) (1 ml/25 ml의 원래 박테리아 배양물)에 재현탁시켰다. 추출 현탁액을 실온에서 15 min 동안 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션시켰다. 추출 후, 현탁액을 16,000 X g로 10분 동안 원심분리하여 불용성 물질을 펠릿화하였다. 상청액을 조심스럽게 제거하고, 분취하고, 사용할 때까지 -20℃에서 동결시켰다.

[0417] Fba BLI 분석. 정제된 인간 모노클로날 항체 (HuMAb)의 전장 C. 알비칸스 및 C. 아우리스 Fba 단백질에 대한 검출가능한 결합을 포르테바이오 BLITz 장치 (소프트웨어: BLITz Pro 1.2)를 사용하여 달성하였다. 시작하기 전, 안티-펜타-His(Anti-Penta-His) 센서 (HisK 센서; 포르테바이오)를 동역학적 완충제(Kinetics Buffer) (PBS + 0.1% BSA + 0.02% 트윈20) 중에서 수화시켰다. 동역학적 완충제에서 기준선 단계 후, 전장 His-태그부착된 Fba 단백질 (C. 알비칸스 또는 C. 아우리스)을 동역학적 완충제로 1:1로 희석된 미정제 박테리아 발현 상청액을 사용하여 센서 팁 상에 로딩하였다. 동역학적 완충제를 사용하여 2차 기준선 단계를 수행하였다. 이어서, PBS w/ 동역학적 완충제 중 정제된 HuMAb 1.11D (상기 실시예 2에서와 같이 제조; 항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)를 함유하는 용액 (conc = 100 ug/mL)에 침지된 로딩된 팁을 이용하여 회합 단계를 수행하였고; 신호의 플러스 증가는 항체 결합을 나타낸다. 마지막으로, 팁을 해리 단계를 위해 동역학적 완충제로 다시 전이시켰다. HuMAb 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)는 단순히 HisK 센서를 인식하지 못했고, 팁 상에 로딩된 종은 박테리아 상청액으로부터 유래된 것이 아닌 것을 보여주기 위해, (비-형질전환된 박테리아 상청액만을 사용하고) His-Fba 로딩 단계를 생략하여 음성 대조군을 실행하였다. 추가로, 1.11D 항체는 Fba 로딩된 팁에 특이적으로 결합한다는 것을 보여주기 위해, 같은 농도 (100 μg/mL)의 HuMAb 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12

및 서열 번호: 13)를 회합 단계에서 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0418] MET6 BLI 분석. 정제된 인간 모노클로날 항체 (HuMAb)의 전장 C. 알비칸스 Met6 단백질 (NCBI 참조 서열: XM_713126.2)에 대한 검출가능한 결합을 포르테바이오 BLITz 장치 (소프트웨어: BLITz Pro 1.2)를 사용하여 달성하였다. 시작하기 전, 안티-펜타-His 센서 (HisK 센서; 포르테바이오)를 동역학적 완충제 [PBS + 0.1% BSA + 0.02% 트윈20] 중에서 수화시켰다. 동역학적 완충제에서 기준선 단계 후, 전장 His-태그부착된 Met6 단백질 (C. 알비칸스)을 동역학적 완충제로 1:1로 희석된 미정제 박테리아 발현 상청액을 사용하여 센서 팁 상에 로딩하였다. 동역학적 완충제를 사용하여 2차 기준선 단계를 수행하였다. 이어서, PBS w/동역학적 완충제 중 정제된 HuMAb 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13)를 함유하는 용액 (conc = 100 ug/mL)에 침지된 로딩된 팁을 이용하여 회합 단계를 수행하였고; 신호의 플러스 성장은 항체 결합을 나타낸다. 마지막으로, 팁을 해리 단계를 위해 동역학적 완충제로 다시 전이시켰다. HuMAb 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13)는 단순히 HisK 센서를 인식하지 못했고, 팁 상에 로딩된 종은 박테리아 상청액으로부터 유래된 것이 아닌 것을 보여주기 위해, (비-형질전환된 박테리아 상청액만을 사용하고) 로딩 단계에서 His-Met6을 생략하여 음성 대조군을 실행하였다. 추가로, 1.10C 항체는 Met6 로딩된 팁에 특이적으로 결합한다는 것을 보여주기 위해, 같은 농도 (100 μg/mL)의 HuMAb 1. 11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)를 회합 단계에서 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0419] **결과 및 고찰**

[0420] 본 결과는 인간 항체 1.10C (항-MET6; 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13 및 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)가 각각 C. 알비칸스 (도 6, 상단 및 도 7)로부터의 천연 재조합 MET6 및 Fba 단백질에 특이적으로 결합하고, 1.11D (항-Fba; 서열 번호: 10 및 서열 번호: 11) 또한 비록 C. 알비칸스 펩티드와 비교하여 C. 아우리스 펩티드의 상동성은 감소되어 있지만 (표 6), C. 아우리스로부터의 재조합 Fba도 결합한다는 것 (도 7)을 보여준다. 추가로, 본 결과는 Fba (Fba, 서열 번호: 40) 및 MET6 (MET6, 서열 번호: 38) 펩티드 에피토프가 천연 단백질에서의 항체 결합에 접근가능하다는 것을 입증한다.

[0421] **실시예 5 - 파종성 칸디다증의 마우스 치사 모델에서 인간 모노클로날 항체의 효능 평가.**

[0422] **물질 및 방법**

[0423] 칸디다 균주. 아졸-저항성 (Erg11 Y132F) 남아메리카 균주인 C. 알비칸스 SC5314 (ATCC) 및 C. 아우리스 AR-0386 (CDC)을 37℃하에 글루코스-효모 추출물-펩톤 브로쓰에서 정지상 효모 세포로서 성장시키고, 세척하고, 둘베코스 PBS (DPBS; 시그마) 중에 적절한 세포 농도 (C. 알비칸스, 5 x 10^6/ml; C. 아우리스, 1 x 10^9/ml)로 현탁시키고, 기술된 바와 같이, 이를 사용하여 마우스에 정맥내로 (i.v.) 감염시켰다 (문헌 [Han and Cutler, 1995]; [Han *et al.*, 2000]).

[0424] 마우스 계통. 근친교배 마우스 계통 C57BL/6 또는 A/J (NCI 동물 생산 프로그램(NCI Animal Production Program) 또는 할란(Harlan)), (암컷; 5 내지 7주령)를 사용하였다. 뉴올리언스의 루이지애나 건강 과학 센터(Louisiana Health Sciences Center in New Orleans)에서 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC: Institutional Animal Care & Use committee) 규정에 의해 승인된 프로토콜에 따라 마우스를 유지 및 처리하였다.

[0425] 진균 챌린지 및 보호 평가. 6 내지 8주령된 C57BL/6 마우스 또는 A/J)를 본 연구에서 사용하였다. 3마리로 이루어진 마우스 군을 함께 멸균 케이지에 하우징하고, 멸균 사료 및 물을 무제한 제공하였다. 0일째, C. 알비칸스 3153A 세포 (0.1 ml DPBS 중 5 x 10^5 CFU) 또는 C. 아우리스 (0.1 ml DPBS 중 1 x 10^8 CFU)로의 i.v. 챌린지 4시간 전에 최대 0.5 ml의 정제된 모노클로날 항체 (상기 실시예 2에서와 같이 제조)의 단일 주사에 의해 마우스 군 (항체당 1개 군)에 i.p. 주사하였다. 35일 (C. 알비칸스) 또는 40일 (C. 아우리스) 동안 동물의 생존을 모니터링함으로써 보호를 평가하였다. 무기력하고, 사료 또는 물에 무관심하고, 핑거 프로빙에 반응하지 않는 것으로 정의되는 빈사 상태의 발생에 대해 마우스를 모니터링하였다. 마우스가 빈사 상태로 간주되었을 때, 이를 희생시켰다. 비교를 위해, 한 군은 DPBS를 받은 반면, 또 다른 군은 항진균제 플루코나졸™을 받았다. 생존을 평가하고, 대조군과 비교하였다.

[0426] **결과 및 고찰**

[0427] 본 결과는 항-펩티드 항체 1.10C 및 1.11D가 C57B/L6 마우스 파종성 칸디다증 모델에서 C. 알비칸스에 의한 사망으로부터 마우스를 보호하고 (도 8), 단일 용량의 1.10C가 표준 치료인 항진균제 플루코나졸™보다 더 우수한

보호를 제공하였다는 것을 입증한다. 추가로, 1.11D는 뚜렷한 용량 반응을 보였고 (도 8), 두 항체를 모두 포함하는 칵테일은 완전한 보호를 제공하였다. A/J 호중구감소성 마우스 파종성 칸디다증 모델에서 C. 아우리스의 경우, 개별 항체만을 단독으로 사용하였을 때, 제한된 보호가 관찰된 반면, 두 항체를 모두 포함하는 칵테일은 마우스의 보호를 증진시켰다 (도 9).

[0428] **실시예 6 -MET6에 대한 파라토프 맵핑**

[0429] 문헌 [Kelley *et al., Nature Protocols* 10, 845-858 (2015)]에 의해 단백질 모델링, 예측 및 분석을 위한 The Phyre2 웹 포털에 따라 Met6 항체 2B10에 대한 단백질 모델링을 수행하였다 (도 10-11).

[0430] **2B10 VH (가변 영역 중쇄) 아미노산 서열:**

[0431] MGWSYIILFLLATATRVHSQVQLQQPGAEVVRPGASVKVSCKASGYTVSSYWMSW
VKQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV
YYCARTAASFDYWGQGTTLTVSS (서열 번호: 61)

[0432] 2B10 VH의 3D 모델 (도 10)에 대한, 정보는 하기 링크에서 검색할 수 있다:

[0433] https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fwww.sbg.bio.ic.ac.uk%2

[0434] Fphyre2%2Fphyre2_output%2Fcb0eb006b7305071%2Fsummary.html&data=02%7C01%7

[0435] Chxin%40lsuhsc.edu%7Cda1cb96339c5434eb12408d70af98ac5%7C3406368982d44e89a3281a

[0436] b79cc58d9d%7C0%7C0%7C636989939222115355&sdata=ZGX4T30tgM1IcNbAnWWBt

[0437] pkTqJkwiFldJiHeyfRKjEo%3D&reserved=0

[0438] **2B10 VL (가변 영역 경쇄) 아미노산 서열:**

[0439] MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNSYL
HWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDLGVYFCSQS
THVPFTFGSGTKLEIK (서열 번호: 62)

[0440] 2B10 VL의 3D 모델 (도 11)에 대한, 정보는 하기 링크에서 검색할 수 있다:

[0441] https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fwww.sbg.bio.ic.ac.uk%2

[0442] Fphyre2%2Fphyre2_output%2Fd7ca058a43f777c0%2Fsummary.html&data=02%7C01%7

[0443] Chxin%40lsuhsc.edu%7C9925559d95ac4b6cc5e008d70b04fb3b%7C3406368982d44e89a3281a

[0444] b79cc58d9d%7C0%7C0%7C636989988376463149&sdata=Q%2Fbdj3r%2Fy2znuqy0Ru2

[0445] D1hWkqrKDBWeaiS9VpcZVPa0%3D&reserved=0

[0446] 파라톱 - 항원 결합 영역 확인 (ABR)

[0447] **Met6 펩티드에 대해 특이적인 마우스 mAb 2B10C1, 인간 버전의 2B1011C는 1.10C. 2B1011C V 서열이다:**

[0448] **중쇄: DNA 서열 (405 bp)** (*리더 서열*-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4):

[0449] *ATGGGATGGAGCTATATCATCCTCTTCTTGTTAGCAACAGCTACACGTGTCCACTCC*CA
GGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGGTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGGTCAGCAGCTACTGGATGAGCTGGGTT
AAGCAGAGGCCGGAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTACGAT
AGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCATATTGACTGTAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTG
CGGTCTATTACTGTGCAAGGACGGCCGCTTCGTTTGACTATTGGGGCCAAGGCAC
CACTCTCACAGTCTCCTCA (서열 번호: 63)

[0450] **중쇄: 아미노산 서열 (135 AA)** (*리더 서열*-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4):

*MGWSYIILFLLATATRVHS*QVQLQQPGAEVVRPGASVKVSCKASGYTVSSYWMSWVK QRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARTAASFDYWGQGTTLTVSS (서열 번호: 61)

[0451]

[0452] **경쇄: DNA 서열 (393 bp)** (*리더 서열*-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4):

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTG ATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGC CTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACTCCTAT TTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGAC AGATTTCACACTCAATATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTC TGCTCTCAAAGTACACATGTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAA TAAAA (서열 번호: 64)

[0453]

[0454] **경쇄: 아미노산 서열 (131 AA)** (*리더 서열*-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4):

*MKLPVRLLVLMFWIPASSS*DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNSYLH WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDLGVYFCSQST HVPFTFGSGTKLEIK (서열 번호: 62)

[0455]

[0456] **파라톰_1_2B10VH (중쇄)**

MGWSYIILFLLATATRVHSQVQLQQPGAEVVRPGASVKVSCKASGYTVSSYWMSW VKQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YC*ARTAASFDY*WGQGTTLTVSS (서열 번호: 65)

[0457]

[0458] ABR2: WIGRIDPYDSETHY (서열 번호: 65의 위치 66-79)

[0459] ABR3: *ARTAASFDY* (서열 번호: 65의 위치 115-123)

[0460] **범례: 중쇄: ABR1** ABR2 *ABR3*

[0461] **파라톰_1_2B10VL (경쇄)**

MKLPVRLLVLMFWIPASSS**DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNSY LH**WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDLGVYFC*SQ STHVPF*TFGSGTKLEIK (서열 번호: 62)

[0462]

[0463] ABR1: **DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNSYLH** (서열 번호: 62의 위치 20-58)

[0464] ABR2: KLLIYKVSNRFS (서열 번호: 62의 위치 69-80)

[0465] ABR3: *SQSTHVPF* (서열 번호: 62의 위치 113-120)

[0466] **범례: 경쇄: ABR1** ABR2 *ABR3*

[0467] **실시예 7 -FBA에 대한 파라토프 맵핑**

[0468] 문헌 [Kelley *et al.*, *Nature Protocols* 10, 845-858 (2015)]에 의해 단백질 모델링, 예측 및 분석을 위한 The Phyre2 웹 포털에 따라 Fba 항체 2B10에 대한 단백질 모델링을 수행하였다 (도 12-13).

[0469] **2D5 VH (가변 영역 중쇄) 아미노산 서열:**

[0470] MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFSSYTMHW
VKRPGQGLEWIGYINPSSGYTDYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCRLYDNYDYYAMDYWGQGTSVTVSS (서열 번호: 66)

[0471] 2D5 VH의 3D 모델 (도 12)에 대한, 정보는 하기 링크에서 검색할 수 있다:

[0472] https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fwww.sbg.bio.ic.ac.uk%2

[0473] Fphyre2%2Fphyre2_output%2F51d51f35dfcbf7d6%2Fsummary.html&data=02%7C01%7

[0474] Chxin%40lsuhsc.edu%7C88757e5de4324dd8eb8308d70b8ad368%7C3406368982d44e89a3281

[0475] ab79cc58d9d%7C0%7C0%7C636990563218376621&sdata=YJ%2Fij5kU6KA7rYQVFiiA

[0476] %2FxvLmG8HkSGGSsRwsxbTVvw%3D&reserved=0

[0477] **2D5 VL (가변 영역 경쇄) 아미노산 서열:**

[0478] M D S Q A Q V L I L L L L W V S G T C G D I V M S Q S P S S L A V S A G E K V T M
S C K S S Q S L L N S R I R K N L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V
P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A D D L A V Y Y C K Q Y N L L T F G A G T
K L E L K (서열 번호: 67)

[0479] 2D5 VL의 3D 모델 (도 13)에 대한, 정보는 하기 링크에서 검색할 수 있다:

[0480] https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fwww.sbg.bio.ic.ac.uk%2

[0481] Fphyre2%2Fphyre2_output%2F2c8a7c40d54a69f5%2Fsummary.html&data=02%7C01%7

[0482] Chxin%40lsuhsc.edu%7C2b496735c49c4acf569b08d70b8b7f17%7C3406368982d44e89a3281a

[0483] b79cc58d9d%7C0%7C0%7C636990566093014306&sdata=%2B%2B%2FBVCYeGv35A2

[0484] Urqvt7tDr%2BbvLEHbI9OfLYVZZwQuY%3D&reserved=0

[0485] **파라톰 - 항원 결합 영역 확인 (ABR)**

[0486] **Fba 펩티드에 특이적인 마우스 mAb 2D5F7, 인간 버전의 2D5F7은 1.11D이다.**

[0487] **중쇄: DNA 서열 (420 bp)** (*리더 서열*-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4):

[0488] *ATGGAAAGGCACTGGATCTTTCTCTTCCTGTTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCC*CA
GGTCCAGCTGCAGCAGTCTGCAGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAA
GATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAGTAGCTACACGATGCACTGGGTA
AAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCAGT
GGATATACTGATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGACCACATTGACTGCAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCT
GCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATATGATAACTACGATTACTATGCTATGGACT
ACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (서열 번호: 68)

[0489] **중쇄: 아미노산 서열 (140 AA)** (*리더 서열*-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4):

[0490] *MERHWIFLFLLSVTAGVHS*QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFSSYTMHWV
KQRPGQGLEWIGYINPSSGYTDYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCARLYDNYDYYAMDYWGQGTSVTVSS (서열 번호: 69)

[0491] **경쇄: DNA 서열 (396 bp)** (*리더 서열*-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4):

ATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGCTATGGGTATCTGGTACCTGTGG
GGACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAG
GTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAATAGTAGAATCCGAAAG
AACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCT
ACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGATGACCTGGCAGTT
TATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
AGCTGAAA (서열 번호: 70)

[0492]

[0493] **경쇄: 아미노산 서열 (132 AA)** (*리더 서열*-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4):

*MDSQAQVLILLLLWVSGTCG*DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRIRKNYL
AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQADDLAVYYCKQ
SYNLLTFGAGTKLELK (서열 번호: 71)

[0494]

[0495] **파라톰_1_2D5_VH (중쇄)**

MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFSSYTMHW
VKQRPGQGLEWIGYINPSSGYTDYNQKFKDKTTLTAKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCA*RLYDNYDYYAMDY*WGQGTSVTVSS (서열 번호: 72)

[0496]

[0497] ABR2: WIGYINPSSGYTDY (서열 번호: 72의 위치 66-79)

[0498] ABR3: *RLYDNYDYYAMDY* (서열 번호: 72의 위치 116-128)

[0499] **범례: 중쇄: ABR1** ABR2 *ABR3*

[0500] **파라톰_1_2D5VL (경쇄)**

MDSQAQVLILLLLWVSGTC**GDIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRIRK**
NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQADDLAVYY
C*KQSYNLL*TFGAGTKLELK (서열 번호: 71)

[0501]

[0502] **ABR1: GDIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRIRKNYLA (20-60)**

[0503] ABR2: LLIYWASTRES (서열 번호: 71의 위치 72-82)

[0504] ABR3: *KQSYNLL* (서열 번호: 71의 위치 115-121)

[0505] **범례: 경쇄: ABR1** ABR2 *ABR3*

[0506] **실시예 8 - 항체 결합 동역학적 성질**

[0507] 25℃하에 포르테바이오 BLITz 이중층 간섭계를 이용하여 결합 실험을 수행하였다. 스트렙타비딘 (SA) 바이오센서를 검정 완충제 (0.1% BSA, 0.02% 트윈-20을 포함하는 PBS (pH 7.4)) 중에 수화시키고, 검정 완충제 중 0.01 μg/mL의 비오티닐화된 펩티드 (Fba-비오틴 또는 Met6-비오틴)를 스트렙타비딘 (SA) 바이오센서 상에 로딩하였다. 로딩된 센서를 동족 IgG의 연속 희석액에 침지시켰다.

[0508] 항체 생산을 위해, 1.10C (항-Met6) 또는 1.11D (항-Fba)의 중쇄 및 경쇄를 발현하는 매칭된 플라스미드 쌍으로 프리스타일™ 293 세포를 일시적으로 형질감염시키고, 분비된 IgG를 패스트 플로우 단백질 G (GE 라이프 사이언시스) 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0509] 25℃하에 포르테바이오 BLITz 이중층 간섭계를 이용하여 결합 실험을 수행하였다. 스트렙타비딘 (SA) 바이오센서를 검정 완충제 (0.1% BSA, 0.02% 트윈-20을 포함하는 PBS (pH 7.4)) 중에 수화시키고, 검정 완충제 중 0.01 μg/mL의 비오티닐화된 펩티드 (Fba-비오틴 또는 Met6-비오틴)를 스트렙타비딘 (SA) 바이오센서 상에 로딩하였다. 로딩된 센서를 동족 IgG의 연속 희석액에 침지시켰다.

[0510] 항체 생산을 위해, 인간 항-Met6 또는 항-Fba 항체의 중쇄 및 경쇄를 발현하는 매칭된 플라스미드 쌍으로 프리스타일™ 293 세포를 일시적으로 형질감염시키고, 분비된 IgG를 패스트 플로우 단백질 G (GE 라이프 사이언시스) 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 표 8에 제시된 결과는 항체가 1 x 10^7 이상의 결합 친화도 (kD)로 이의 동족 펩티드에 결합한다는 것을 입증한다.

표 1

항체 가변 영역에 대한 뉴클레오티드 서열

클론	가변 서열 영역	서열 번호:
1.11D 중쇄	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCTTGTTCAGCCTCTGGGTTCACCTTTAGAACCTATGCCATGAGC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTCTCAGTTATTAGTC GTAGTGGTGATACCACCTACCACACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATC TCCAGAGACAATTCCAGGAACGCGCTGTATCTGCAATTGGACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCCTTATATTACTGTGCGAAAACAGGTAATATGGCAGTAGG TGACCGAAGGACAAACTACTCCTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	1
1.11D 경쇄	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCTTCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAAGTACTGGTTGGCCTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCATCTAATT TGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATT CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCGGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCA ACAGTATAATAGTTACCCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCACGGTGGAGATC AAA	2
1.10C 중쇄	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTAAAGCATCTGGATTCAATTTCACTAACTCCTGGATGAGTTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGTCGTATTAAAAGTGAGTCTGATG GTGGGGCAACACGCTACGCTGCACCCGTTACGGGAAGGTTTTCCATCTCCAGAGATG ATTCAAGAGACATGCTGTTTCTGCAAATGAACAGTCTGACAACCGACGACACAGCGA TGTATTATTGTACTACAAATAAGGTGACTACAAATTATTGGGGCCAGGGAACGCTGG TCACCGTCTCATCA	3
1.10C 경쇄	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGTCACCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAG GGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTCTTTTATACAGCTCCGACAATG AGAACTACTTAACTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGTTGCTC ATTTACTGGGCGTCTGTCCGAGAATCCGGGATTCCTGACCGATTCATTGGCAG CGGGTCTGTGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAATGTGCAGGCTGAAGATG TGGCAGTTTATTACTGTCAACAATTTCGCTATACTCCTCTGACTTTTGGCCAGG GGACCACGCTTGAGATCAAA	4
1.14M 중쇄	GAGGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAGGCCTGGGGCCTCA GTGAGGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAGCTTCACCCTCTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCCTGGCCAAGGACTCGAGTGGCTGGGATGGATCAA CCCTAAAACTGGTGACGTCAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCTCCT TGACCAGGGATACGAGAATGAACACAGCCTACTTGGACTTGACGAGGCTGAG ATCTGACGACACGGCCCGCTACTACTGTTTGAGGGCTTTTGATCTGTGGGGCC GAGGGACAATGATCATCGTCTCCTCA	5

[0511]

1.14M 경쇄	CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAAACGGC CAGGATCACCTGCTCTGGAGATACATTGGCAAAGAAATATGCTTATTGGTACC AGCAGAAGTCAGGCCAGGCCCCTGTTCTGGTCATCCAAGACGACACCAAGCG ACCCTCCGGGATCCCTCAGCGATTCTCTGGCTCAAGCTCAGGGACAATGGCCA CCTTGACTATAAGTGCGGCCCAGGTGGAGGATGAAGCTGACTACCACTGCTT CTCAACAGATGATAGTGGAAATCCTGAGGGCCTCTTCGGCGGAGGAACCAAA CTGACCGTCCTAAGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTG	6
6.6K 중쇄	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACTTCATTAGTTATGGCATGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTATTTCAT ATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGACCGAGGCTTACGTGGAAACAG CTATGGTCCCCCAGTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	7
6.6K 경쇄	TCTTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAAACGGC CAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCATTGCCAAAAGAATATGCTTATTGGTACC AGCAGAAGTCAGGCCAGGCCCCTGTGGTGGTCATCTATGAAGACAGCAAACG ACCCTCCGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAATGGCCA CCTTGACTATCAGTGGGGCCCAGGTGGAGGATGAAGCTGACTACCACTGTTA CTCAACAGACAGCAGTGGTAATCCCGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC GTCCTA	8
1.B10 중쇄	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCC CTTAGACTTTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCATTTTCAGTAACGCCTGGATGAAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAA AGAGAAAGTGATAGTGGGACAACAGACTACGGTGCAGCCGTGAAAGGCAGA TTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAATACACGCTGTATCTGCAAATGAACAG CCTGAAAACCGACGACACAGCCGTTTATTACTGTACCACAGGGTGGGCTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	42
1.B10 경쇄	CTGATTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAGACGGCCAGGATCA CCTGCTCTGGAGATGCATTGCCAAACAAATATGCTTATTGGTACCAGCAGAAG CCAGGCCAGGCCCCTTCTGTGGTGATGTTTAGAGACAATGAGAGACCCTCAG GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAACAGTCACGTTGACC ATCAGTGGAGTCCAGGCAGAAGACGAGTCTGACTTTTATTGTCAATCCACAGA CAGTAATGGTGCTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	43

[0512]

6.11C 중쇄	CAGGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA GTTCAAGTTTCCTGCAGGACATCTGGATACACCTTTATTAATTATTTTATGCAC TGGGTGCGACAGGCCCCTGGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAAC CCTAATGGTGGTAAGACAAGATACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGACTCACCG TGACCAGGGACACGTCCACCAACACTGTCTACGTGGAACTGAGCAATCTGAG ATATGAGGACACGGGCCTCTATTTCTGCGCGAGAGATCCGGAGGGGGAAGT GGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	44
6.11C 경쇄	TCCCATGAACTGACACAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAGACGG CCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCACTGTCAAAGCAATATGCTTATTGGTAT CAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGGTGGTGATATATAAAGACAATGAG AGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAGTTCAGGCACAACAGT CACATTGACCATCACTGGAGTCCAGGCAGAAGACGAGGCTGACTATTATTGTC AATCAACAGACACCAGTCGTGCTTATTATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTC ACCGTCTTA	45

[0513]

표 2

항체 가변 영역에 대한 단백질 서열

클론	가변 서열	서열 번호
1.11D 중쇄	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFRTYAMSWVRQAPGKG LQWVSVISRSGDTTYHTDSVKGRFTISRDNSRNALYLQLDSLRAE DTALYYCAKTGNMAVGDRRTNYSYYYMDVWGKGTTVTVSS	10
1.11D 경쇄	DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIKYWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLRPDDFATYYCQQYN SYPLTFGGGTVEIK	11
1.10C 중쇄	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCKASGFNFTNSWMSWVRQAPGK GLEWLGRIKSESDGGATRYAAPVTGRFSISRDDSRDMLFLQMNSL TTDDTAMYYCTTNKVTTNYWGQGTLVTVSS	12
1.10C 경쇄	DIVMTQSPVTLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSDNENYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASVRESGIPDRFIGSGSVTDFTLTINNVQAEDVAV YYCQQFRYTPLTFGQGTTLEIK	13
1.14M 중쇄	EVQLVESGAEVKRPGASVRVSCKASGYSFTLYYMHWVRQAPGQ GLEWLGWINPKTGDVKYAQKFQGRVSLTRDTRMNTAYLDLTRL RSDDTARYYCLRAFDLWGRGTMIIVSS	14
1.14M 경쇄	LPVLTQPPSVSVSPGQTARITCSGDTLAKKYAYWYQQKSGQAPV LVIQDDTKRPSGIPQRFSGSSSGTMATLTISAAQVEDEADYHCFST DDSGNPEGLFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTL	15
6.6K 중쇄	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFNFISYGMHWVRQAPGKG LEWVALISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCATEAYVETAMVPQYWGQGTLVTVSS	16
6.6K 경쇄	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKEYAYWYQQKSGQAPVV VIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYHCYSTD SSGNPVFGGGTKLTVL	17
1.B10 중쇄	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFSNAWMNWVRQAPGK GLEWVGRIKRESDSGTTDYGAAVKGRFTISRDDSKYTLYLQMNS LKTDDTAVYYCTTGWADYWGQGTLVTVSS	46

[0514]

1B10 경쇄	LIQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPNKYAYWYQQKPGQAPSVVMF RDNERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDESDFYCQSTDSNG AWVFGGGTKLTVL	47
6.11C 중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVQVSCRTSGYTFINYFMHWVRQAPGQ GLEWMGIINPNGGKTRYAQKFQGRLTVTRDTSTNTVYVELSNLR YEDTGLYFCARDPEGEVGFDYWGQGTQVTVSS	48
6.11C 경쇄	SHELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALSKQYAYWYQQKPGQAPV VVIYKDNERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTITGVQAEDEADYYCQST DTSRAYYVFGTGTKVTVL	49

[0515]

표 3

CDR 중쇄 서열			
항체	CDRH1 (서열 번호:)	CDRH2 (서열 번호:)	CDRH3 (서열 번호:)
1.11D	GFTFRTYA (18)	ISRSGDTT (19)	AKTGNMAVGDRRT (20)
1.10C	GFNFTNSW (21)	IKSESDGGAT (22)	TTNKVTTNY (23)
1.14M	GYSFTLYY (24)	INPKTGDV (25)	LRAFDL (26)
6.6K	GFNFISYG (27)	ISYDGSNK (28)	ATEAYVETAMVPQY (29)
1.B10	GFIFSNAW (50)	IKRESDSGTT (51)	TTGWADY (52)
6.11C	NYFMH (53)	IINPNGGKTRYAQKFQG (54)	DPEGEVGFDY (55)

[0516]

표 4

CDR 경쇄 서열			
항체	CDRH1 (서열 번호:)	CDRH2 (서열 번호:)	CDRH3 (서열 번호:)
1.11D	QSIKYW (30)	KAS	QQYNSYPLT (31)
1.10C	QSLLYSSDNENY (32)	WAS	QQFRYTPLT (33)
1.14M	TLAKKY (34)	DDT	FSTDDSGNPEGL (35)
6.6K	ALPKEY (36)	EDS	YSTDSSGNPV (37)
1B10	ALPNKY (56)	RDN	QSTDSNGAWV (57)
6.11C	SGDALSKQYAY (58)	KDNERPS (59)	QSTDTSRAYYV (60)

[0517]

표 5

펩티드 서열	
명칭	펩티드 (서열 번호:)
MET6	PRIGGQRELKKITE (38)
MET6-비오틴	PRIGGQRELKKITEPGGSGGSGK- 비오틴 (39)
Fba	YGKDVKDLFDYAQE (40)
Fba-비오틴	YGKDVKDLFDYAQEGGSGGSGK- 비오틴 (41)

[0518]

표 6

항체/펩티드 명칭			
클론	중쇄/경쇄 (서열 번호:)	명칭	펩티드 (서열 번호:)
1.10C	(12/13)	MET6	PRIGGQRELKKITE (38)
6.6K	(16/17)	MET6	PRIGGQRELKKITE (38)
1.B10	(46/47)	MET6	PRIGGQRELKKITE (38)
1.11D	(10/11)	Fba	YGKDVKDLFDYAQE (40)
1.14M	(14/15)	Fba	YGKDVKDLFDYAQE (40)
6.11C	(48/49)	Fba	YGKDVKDLFDYAQE (40)

[0519]

표 7

인간 병원체인 칸디다 종 사이의 FBA 및 MET6 펩티드 서열의 상동성		
칸디다 종	**Fba** 펩티드 (서열 번호 40:)	**MET6** 펩티드 (서열 번호 38:)
칸디다 알비칸스	100%	100%
칸디다 글라브라타	이용불가	85%
칸디다 파라프실로시스	100%	100%
칸디다 트로피칼리스	91%	100%
칸디다 듀블리니엔시스	100%	100%
칸디다 크루세이	100%	100%
칸디다 아우리스	85%	79%

[0520]

표 8

HuMAb 칸디다 항체에 대한 BLITz 동역학적 데이터 요약 (오토이뮨 테크놀러지즈(Autoimmune Technologies))

#	실행일	ID 코드	Ab 타입	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	BLITz 팁	로딩된 항원	코멘트 특이성
1	11/28/18	1.11D	HuMAb	1.98E-08	3.80E+04	7.30E-04	Strep (SA)	btn-Fba 펩티드	Fba
2	12/3/18	1.10C	HuMAb	1.80E-07	3.10E+04	5.50E-03	Strep (SA)	btn-Met6 펩티드	Met6
3	10/2/19	1.B10	HuMAb	3.10E-08	2.10E+05	6.40E-03	Strep (SA)	btn-Met6 펩티드	Met6
4	10/10/19	6.6K	HuMAb	1.60E-07	7.50E+04	1.20E-02	Strep (SA)	btn-Met6 펩티드	Met6
5	6/18/20	6.11C	HuMAb	1.20E-07	4.90E+05	6.00E-02	Strep (SA)	btn-Fba 펩티드	Fba

[0521]

[0522] * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

[0523] 본원에 개시되고, 청구된 모든 조성물 및 방법은 본 발명에 비추어 과도한 실험 없이 제조 및 수행될 수 있다. 본 개시내용의 조성물 및 방법이 바람직한 실시양태의 관점에서 설명되었지만, 본 개시내용의 개념, 정신 및 범주를 벗어남 없이 본 조성물 및 방법에, 및 본원에 기술된 방법의 단계에서 또는 그 단계의 순서에서 변형이 적용될 수 있다는 것이 당업자에게 자명할 것이다. 더욱 구체적으로, 화학적으로 및 생리학적으로 모두 관련된 특정 작용제는 동일하거나 유사한 결과를 달성하면서, 본원에 기술된 작용제 대신으로 대체될 수 있다는 것이 자명할 것이다. 당업자에게 자명한 상기와 같은 모든 유사한 치환 및 수정은 첨부된 청구범위에 의해 제시된 바와 같이 본 개시내용의 정신, 범주 및 개념 내에 있는 것으로 간주되어야 한다.

[0524] **VII. 참고문헌**

[0525] 하기 참고문헌은 해당 참고문헌이 예시적인 절차적인 세부 사항 또는 본원에 기재된 것들을 보충하는 다른 세부 사항을 제공하는 정도로 본원에서 참조로 구체적으로 포함된다.

미국 특허 3,817,837
미국 특허 3,850,752
미국 특허 3,939,350
미국 특허 3,996,345
미국 특허 4,196,265
미국 특허 4,275,149
미국 특허 4,277,437
미국 특허 4,366,241
미국 특허 4,472,509
미국 특허 4,554,101
미국 특허 4,680,338
미국 특허 4,816,567
미국 특허 4,867,973
미국 특허 4,938,948
미국 특허 5,021,236
미국 특허 5,141,648
미국 특허 5,196,066
미국 특허 5,563,250
미국 특허 5,565,332
미국 특허 5,856,456
미국 특허 5,880,270
미국 특허 6,485,982
"Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
Abbondanzo *et al.*, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990.
Allred *et al.*, *Arch. Surg.*, 125(1), 107-113, 1990.
Atherton *et al.*, *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.
Barzon *et al.*, *Euro Surveill*. 2016 Aug 11; 21(32).
Beltramello *et al.*, *Cell Host Microbe* 8, 271-283, 2010.
Brown *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 12;130(1), :111-121, 1990.

[0526]

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.

Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.

Casadevall *et al.*, *Cur. Opin. Micro.* 5:386-391, 2002.

Chowdry et al., *Emerg. Infect. Dis.*, 19 :1670-1673, 2002

Costin *et al.*, *J. Vorol.* 71:5069-5079, 2013.

De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.

Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.

Diamond *et al.*, *J Virol* 77, 2578-2586, 2003.

Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.

Duffy *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543, 2009.

Elder *et al.* Infections, infertility and assisted reproduction. Part II: Infections in reproductive medicine & Part III: Infections and the assisted reproductive laboratory. Cambridge UK: Cambridge University Press; 2005.

Gancedo *et al.*, *Micro. Mol. Bio. Rev.* 80:765-777, 2016.

Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

Gornet *et al.*, *Semin Reprod Med.* 2016 Sep; 34(5):285-292. Epub 2016 Sep 14.

Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993.

Halfon *et al.*, *PLoS ONE* 2010; 5 (5) e10569

Han and Cutler, *Infet. Immun.* 63:2714-2719, 1995

Han *et al.*, *Onfet. Immun.* 68 :1649-1654, 2000.

Henderson and Martin, *Infect. Immun.*, 79:3476-3491, 2011.

Hessell *et al.*, *Nature* 449, 101–4, 2007.

Karwa and Wargo, *Ann. Pharmacother.*, 43:1818-1823, 2009

Khatoon *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.

Kim and Sudbery, *J. Microbiol.*, 49:171-177, 2011

King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.

Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6, 511-519, 1976.

Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975.

Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.

Li *et al.*, *BMC Infect. Diseas.*, 13(1):253-261, 2013.

Low and Rotstein, *F1000 Medicine Reports*, 3(14), 2011.

Luo *et al.*, *Blood*, 113 :1422-1431, 2009.

[0527]

Luo, *et al.*, *J. Immunol.* 185 :2164-2173, 2010.

Mansuy *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1106-7.

Medrano-Diaz, *et al.*, *Microbiol. Pathogen.*, 124:21-29, 2018.

Nakamura *et al.*, *In*: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987.

O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.

Persic *et al.*, *Gene* 187:1, 1997.

Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.

Purpura *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1107-8. Epub 2016 Sep 19.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 3:624-652, 1990.

Richie *et al.*, *Antimirob. Agents Chemo.*, 56 :3963-3964, 2012.

Robinson *et al.*, *Nat. Commun.* 7 :11544, 2016 May 10.

Rudkin *et al.*, *Nat. Commun.* 9 :5288, 2018.

Tang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28324-28330, 1996.

Tiller *et al.*, *Immunol. Methods* 329:112-124, 2008.

Turner and Butler, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 4(9), 2014.

Wawrzynczak & Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

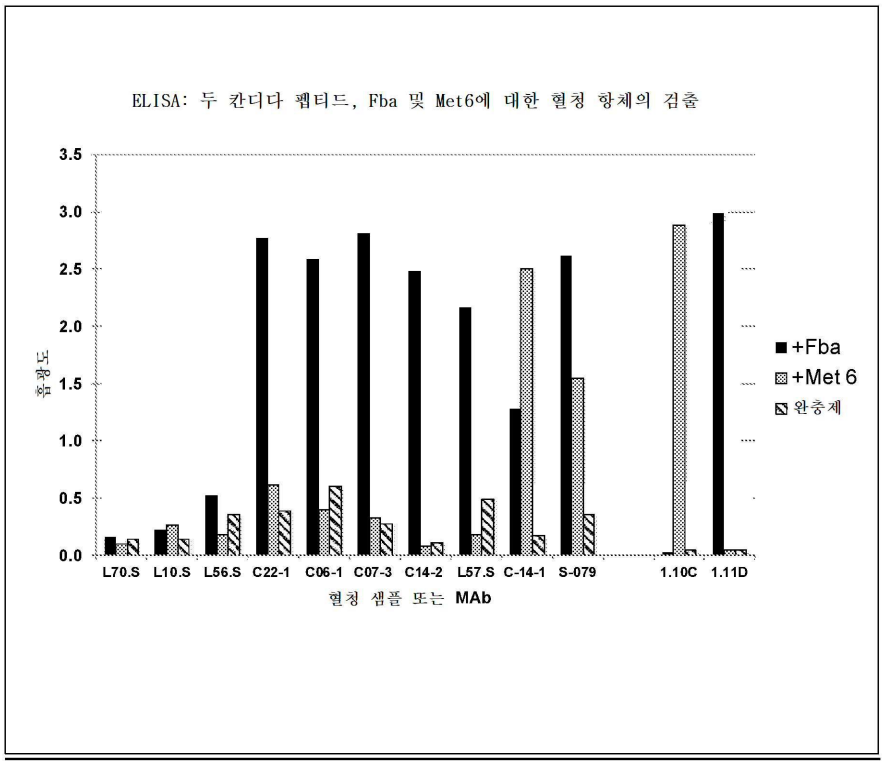
Xin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 105 :13526-1353, 2008.

Yu *et al.*, *J Immunol Methods* 336, 142-151, doi:10.1016/j.jim.2008.04.008, 2008.

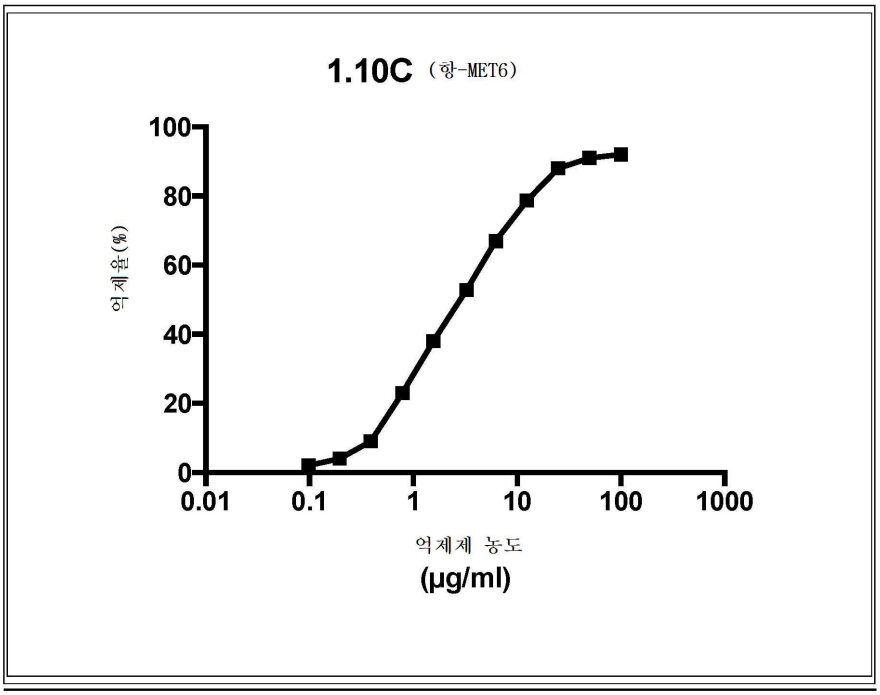
[0528]

도면

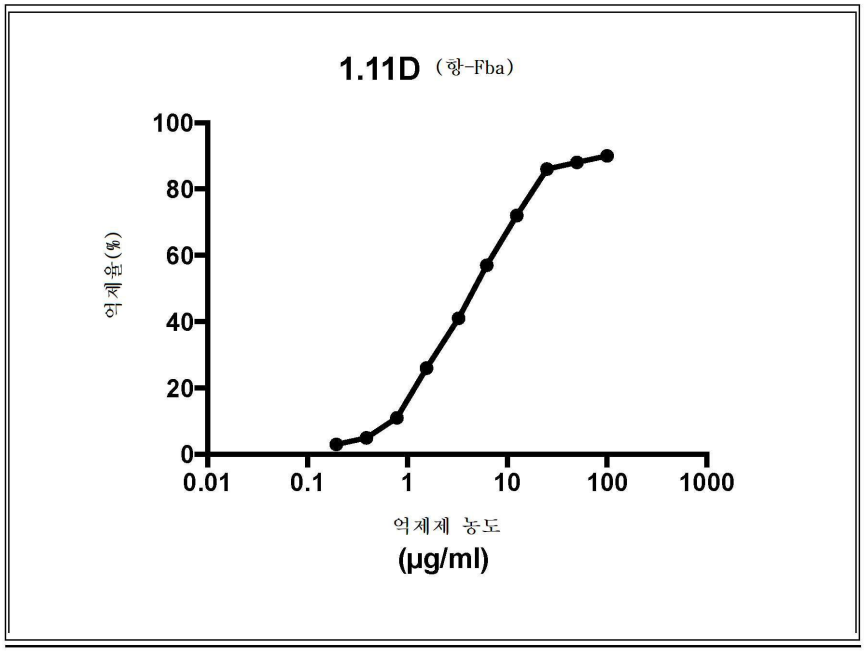
도면1



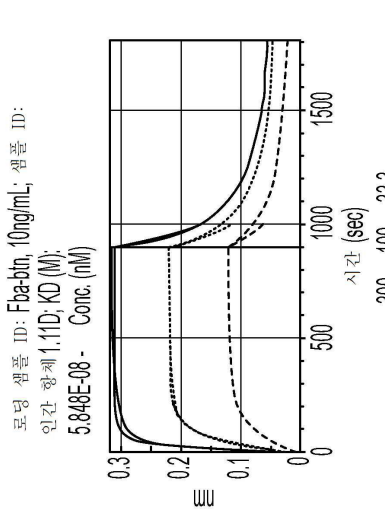
도면2

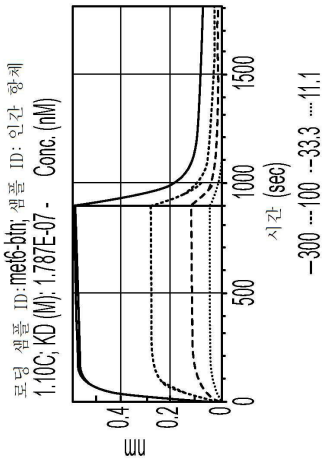

1.10C (항-MET6)
억제율(%)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
억제제 농도
(μg/ml)

도면3


1.11D (항-Fba)
억제율(%)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
억제제 농도
(μg/ml)

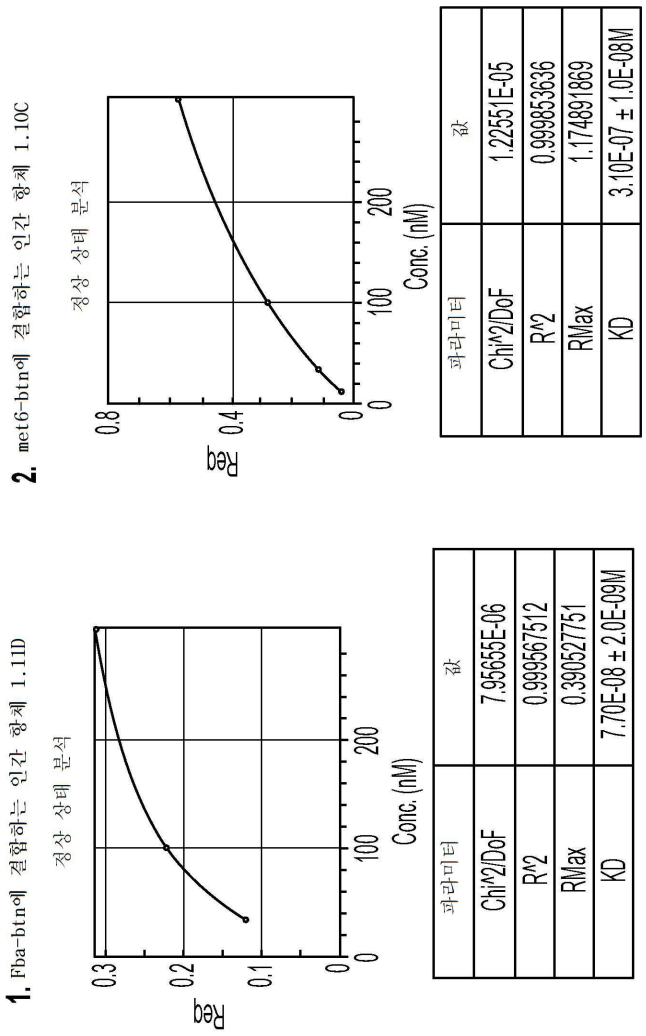
도면4





로딩 샘플 ID	샘플 ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	전체 X^2	전체 R^2
Fba-btn, 10ng/ml	인간 항체 1.11D	5.85E-08	1.11E+05	6.46E-03	0.0998	0.9954
mel6-btn	인간 항체 1.10C	1.79E-07	6.95E+04	1.24E-02	0.14	0.9991

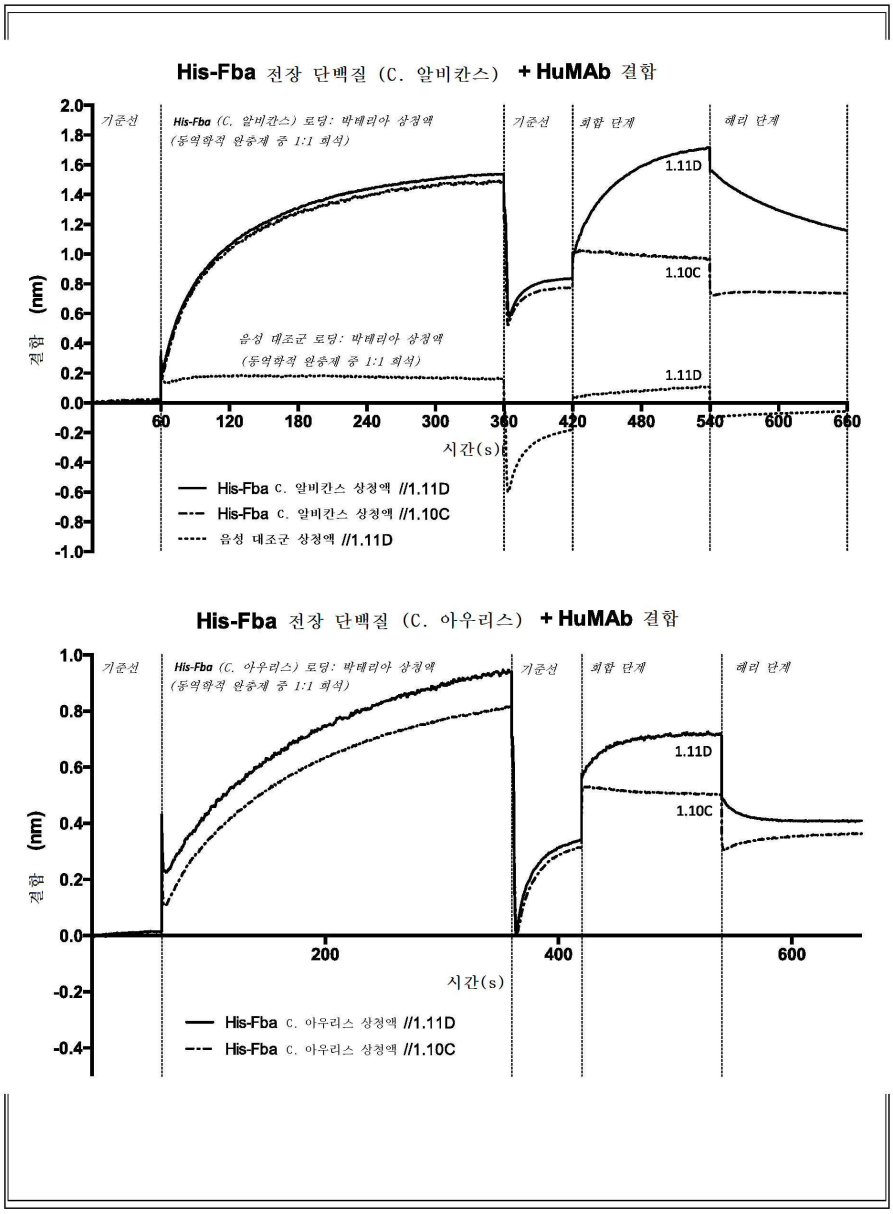
도면5



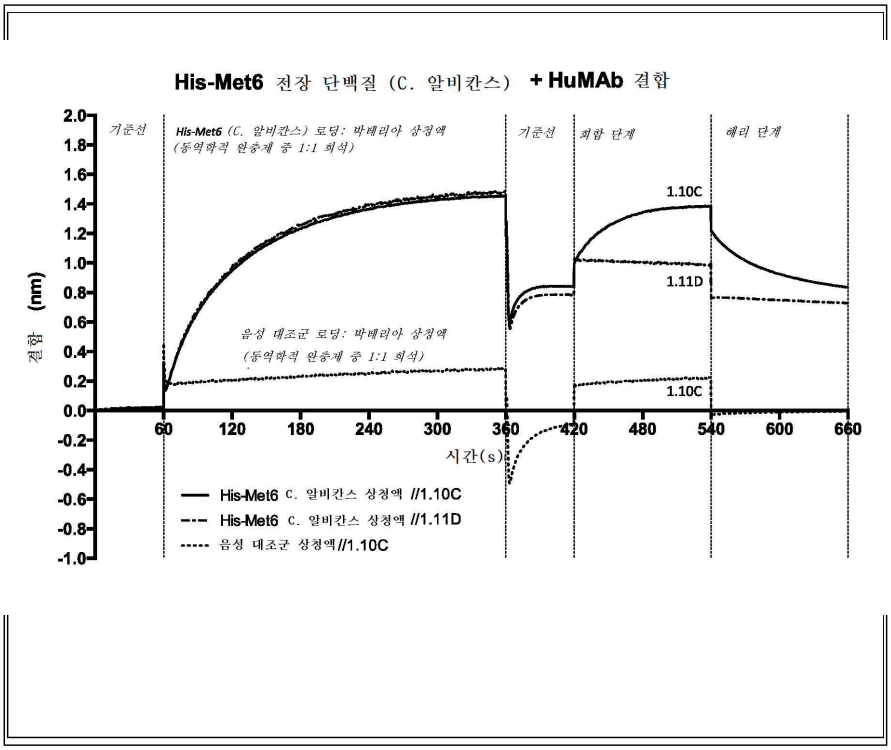
파라미터	값
Chi^2/DoF	7.95655E-06
R^2	0.999567512
RMax	0.390527751
KD	7.70E-08 ± 2.0E-09M

파라미터	값
Chi^2/DoF	1.22551E-05
R^2	0.999853636
RMax	1.174891869
KD	3.10E-07 ± 1.0E-08M

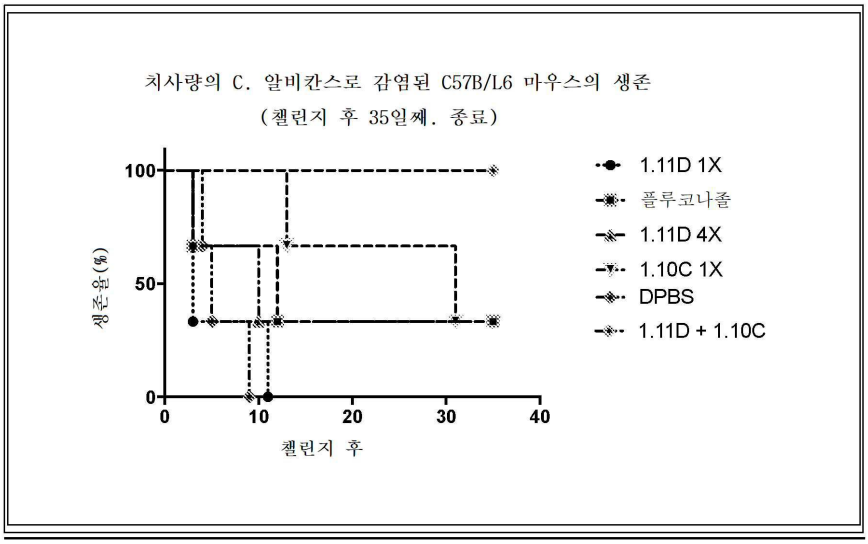
도면6


His-Fba 전장 단백질 (C. 알비칸스) + HuMAb 결합
기준선
His-Fba (C. 알비칸스) 로딩: 박테리아 상청액
(동역학적 완충제 중 1:1 희석)
기준선
회합 단계
해리 단계
1.11D
1.10C
음성 대조군 로딩: 박테리아 상청액
(동역학적 완충제 중 1:1 희석)
1.11D
결합 (nm)
시간(s)
His-Fba C. 알비칸스 상청액 //1.11D
His-Fba C. 알비칸스 상청액 //1.10C
음성 대조군 상청액 //1.11D
His-Fba 전장 단백질 (C. 아우리스) + HuMAb 결합
기준선
His-Fba (C. 아우리스) 로딩: 박테리아 상청액
(동역학적 완충제 중 1:1 희석)
기준선
회합 단계
해리 단계
1.11D
1.10C
결합 (nm)
시간(s)
His-Fba C. 아우리스 상청액 //1.11D
His-Fba C. 아우리스 상청액 //1.10C

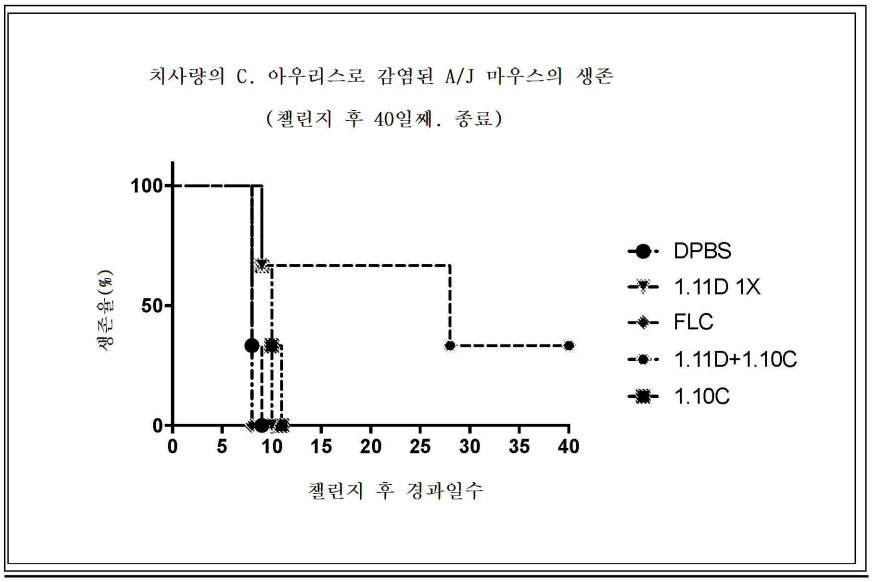
도면7


His-Met6 전장 단백질 (C. 알비칸스) + HuMAb 결합
기준선
His-Met6 (C. 알비칸스) 로딩: 박테리아 상청액
(동역학적 완충제 중 1:1 희석)
기준선
회합 단계
해리 단계
1.10C
1.11D
음성 대조군 로딩: 박테리아 상청액
(동역학적 완충제 중 1:1 희석)
1.10C
결합 (nm)
시간(s)
His-Met6 C. 알비칸스 상청액 //1.10C
His-Met6 C. 알비칸스 상청액 //1.11D
음성 대조군 상청액//1.10C

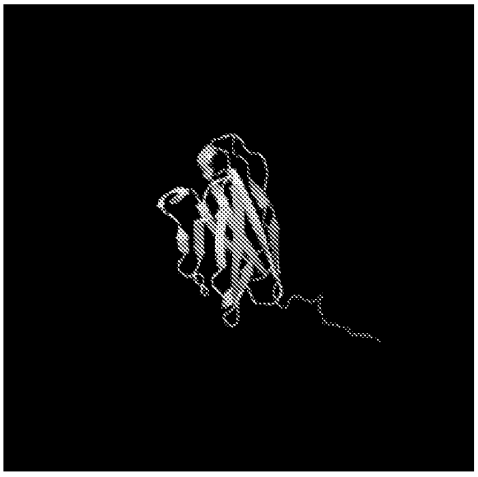
도면8


치사량의 C. 알비칸스로 감염된 C57B/L6 마우스의 생존
(챌린지 후 35일째. 종료)
생존율(%)
챌린지 후
1.11D 1X
플루코나졸
1.11D 4X
1.10C 1X
DPBS
1.11D + 1.10C

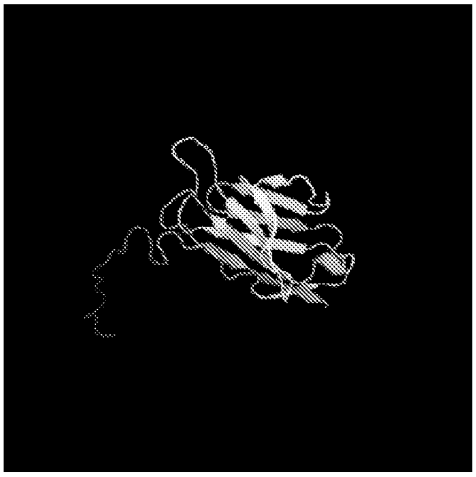
도면9


치사량의 C. 아우리스로 감염된 A/J 마우스의 생존
(챌린지 후 40일째. 종료)
100
50
0
생존율(%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
챌린지 후 경과일수
DPBS
1.11D 1X
FLC
1.11D+1.10C
1.10C

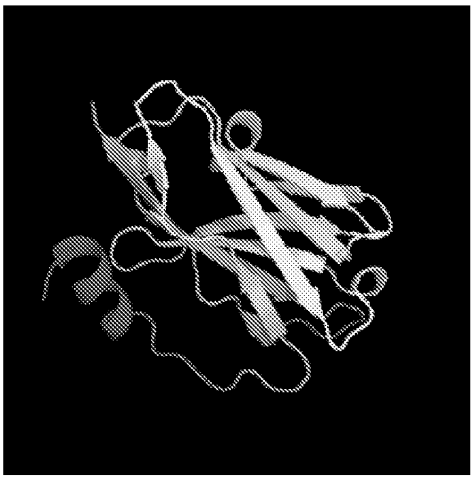
도면10



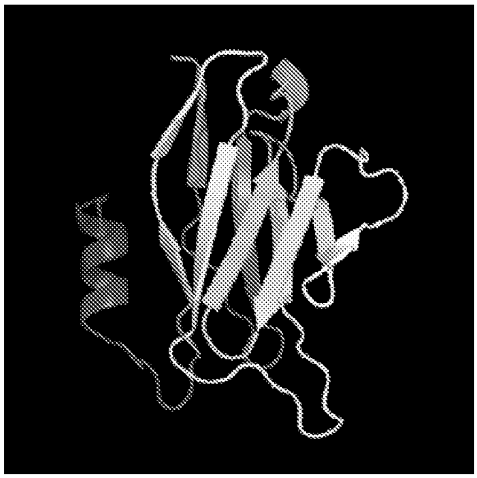
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND
THE BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE
AUTOIMMUNE TECHNOLOGIES, LLC

<120> ANTIBODIES TO CANDIDA AND USES THEREOF

<130> TULA.P0003WO

<140> not yet assigned

<141> 2020-07-28

<150> US 62/879,894

<151> 2019-07-29

<150> US 62/879,912

<151> 2019-07-29

<160> 72

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 1

gaagtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcttgttcag cctctgggtt cacctttaga acctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctgcagtg ggtctcagtt attagtcgta gtggtgatac cacctaccac 180

acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaggaa cgcgctgtat 240

ctgcaattgg acagcctgag agccgaggac acggccttat attactgtgc gaaaacaggt 300

aatatggcag taggtgaccg aaggacaaac tactcctact actacatgga cgtctggggc 360

aaagggacca cggtcaccgt ctcctca 387

<210> 2

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 2

gatattgtga tgactcagtc tccttccacc ctgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gagtattaag tactggttgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcatctaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcggcct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccccctcac tttcggcgga 300

gggaccacgg tggagatcaa a 321

<210> 3

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 3

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtaaag catctggatt caatttcact aactcctgga tgagttgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg gactggagtg gctgggtcgt attaaaagtg agtctgatgg tggggcaaca 180

cgctacgctg cacccgttac gggaaggttt tccatctcca gagatgattc aagagacatg 240

ctgtttctgc aaatgaacag tctgacaacc gacgacacag cgatgtatta ttgtactaca 300

aataaggtga ctacaaatta ttggggccag ggaacgctgg tcaccgtctc atca 354

<210> 4

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 4

gacattgtga tgactcagtc tccagtcacc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca agtccagcca gagtctttta tacagctccg acaatgagaa ctacttaact 120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagttgctca tttactgggc gtctgtccga 180

gaatccggga ttcctgaccg attcattggc agcgggtctg tgacagattt cactctcacc 240

atcaacaatg tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaatt tcgctatact 300

cctctgactt ttggccaggg gaccacgctt gagatcaaa 339

<210> 5

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 5

gaggttcagc tggtggagtc tggggctgag gtgaagaggc ctggggcctc agtgagggtc 60

tcctgcaagg cttctggata cagcttcacc ctctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggccaag gactcgagtg gctgggatgg atcaacccta aaactggtga cgtcaaatat 180

gcacagaagt ttcagggcag ggtctccttg accagggata cgagaatgaa cacagcctac 240

ttggacttga cgaggctgag atctgacgac acggcccgct actactgttt gagggctttt 300

gatctgtggg gccgagggac aatgatcatc gtctcctca 339

<210> 6

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 6

ctgcctgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60

acctgctctg gagatacatt ggcaaagaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120

caggcccctg ttctggtcat ccaagacgac accaagcgac cctccgggat ccctcagcga 180

ttctctggct caagctcagg gacaatggcc accttgacta taagtgcggc ccaggtggag 240

gatgaagctg actaccactg cttctcaaca gatgatagtg gaaatcctga gggcctcttc 300

ggcggaggaa ccaaactgac cgtcctaagt cagcccaagg ctgccccctc ggtcactctg 360

<210> 7

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 7

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caacttcatt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atttcatatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgc gaccgaggct 300

tacgtggaaa cagctatggt cccccagtac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 8

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 8

tcttatgagc tgactcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60

acctgctctg gagatgcatt gccaaaagaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120

caggcccctg tggtggtcat ctatgaagac agcaaacgac cctccgggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag 240

gatgaagctg actaccactg ttactcaaca gacagcagtg gtaatcccgt gttcggcgga 300

gggaccaagc tgaccgtcct a 321

<210> 9

<400> 9

000

<210> 10

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

Ala Lys Thr Gly Asn Met Ala Val Gly Asp Arg Arg Thr Asn Tyr Ser
100 105 110
Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125
Ser

<210> 11
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 11
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 12

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

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

20 25 30

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

Gly Arg Ile Lys Ser Glu Ser Asp Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Thr Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asp Met
65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asn Lys Val Thr Thr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Val Arg Glu Ser Gly Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Asn Asn Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Lys Thr Gly Asp Val Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Ser Leu Thr Arg Asp Thr Arg Met Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Asp Leu Thr Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys

85 90 95

Leu Arg Ala Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Met Ile Ile Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 15

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Thr Leu Ala Lys Lys Tyr Ala

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Gln
35 40 45

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

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ala Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Phe Ser Thr Asp Asp Ser Gly Asn Pro

85 90 95

Glu Gly Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro
100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu
115 120

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Glu Ala Tyr Val Glu Thr Ala Met Val Pro Gln Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 17
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

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

65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn Pro
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr Ala

1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 19

Ile Ser Arg Ser Gly Asp Thr Thr

1 5

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 20

Ala Lys Thr Gly Asn Met Ala Val Gly Asp Arg Arg Thr

1 5 10

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 21

Gly Phe Asn Phe Thr Asn Ser Trp

1 5

<210

> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 22

Ile Lys Ser Glu Ser Asp Gly Gly Ala Thr

1 5 10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 23

Thr Thr Asn Lys Val Thr Thr Asn Tyr

1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 24

Gly Tyr Ser Phe Thr Leu Tyr Tyr

1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 25

Ile Asn Pro Lys Thr Gly Asp Val

1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 26

Leu Arg Ala Phe Asp Leu

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 27

Gly Phe Asn Phe Ile Ser Tyr Gly

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 28

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 29

Ala Thr Glu Ala Tyr Val Glu Thr Ala Met Val Pro Gln Tyr

1 5 10

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223

> Synthetic peptide

<400> 30

Gln Ser Ile Lys Tyr Trp

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 31

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 32

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asp Asn Glu Asn Tyr

1 5 10

<210> 33

<211> 9

<212>

PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 33

Gln Gln Phe Arg Tyr Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 34

Thr Leu Ala Lys Lys Tyr

1 5

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 35

Phe Ser Thr Asp Asp Ser Gly Asn Pro Glu Gly Leu

1 5 10

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 36

Ala Leu Pro Lys Glu Tyr

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 37

Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn Pro Val

1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 38

Pro Arg Ile Gly Gly Gln Arg Glu Leu Lys Lys Ile Thr Glu

1 5 10

<210> 39

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 39

Pro Arg Ile Gly Gly Gln Arg Glu Leu Lys Lys Ile Thr Glu Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Lys

20

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 40

Tyr Gly Lys Asp Val Lys Asp Leu Phe Asp Tyr Ala Gln Glu

1 5 10

<210> 41

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 41

Tyr Gly Lys Asp Val Lys Asp Leu Phe Asp Tyr Ala Gln Glu Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Ser Gly Lys

20

<210> 42

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 42

gaggtgcagc tggtgcagtc tggaggaggc ttggtaaagc ctgggggtc ccttagactt 60

tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt aacgcctgga tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagag aaagtgatag tgggacaaca 180

gactacggtg cagccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaatacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gacgacacag ccgtttatta ctgtaccaca 300

gggtgggctg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 43

<211> 312

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 43

ctgattcagc caccctcggt gtcagtgtcc ccaggacaga cggccaggat cacctgctct 60

ggagatgcat tgccaaacaa atatgcttat tggtaccagc agaagccagg ccaggcccct 120

tctgtggtga tgtttagaga caatgagaga ccctcaggga tccctgagcg attctctggc 180

tccagctcag ggacaacagt cacgttgacc atcagtggag tccaggcaga agacgagtct 240

gacttttatt gtcaatccac agacagtaat ggtgcttggg tgttcggcgg agggaccaag 300

ctgaccgtcc ta 312

<210> 44

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 44

caggtgcagt tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agttcaagtt 60

tcctgcagga catctggata cacctttatt aattatttta tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctgggcaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta atggtggtaa gacaagatac 180

gcacagaagt tccagggcag actcaccgtg accagggaca cgtccaccaa cactgtctac 240

gtggaactga gcaatctgag atatgaggac acgggcctct atttctgcgc gagagatccg 300

gaggggggaag tgggctttga ctactggggc cagggaaccc aggtcaccgt ctcctca 357

<210> 45

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 45

tcccatgaac tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60

acctgctctg gagatgcact gtcaaagcaa tatgcttatt ggtatcagca gaagccaggc 120

caggcccctg tggtggtgat atataaagac aatgagaggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccagttcagg cacaacagtc acattgacca tcactggagt ccaggcagaa 240

gacgaggctg actattattg tcaatcaaca gacaccagtc gtgcttatta tgtcttcgga 300

actgggacca aggtcaccgt ctta 324

<210> 46

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 46

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Ala

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Arg Ile Lys Arg Glu Ser Asp Ser Gly Thr Thr Asp Tyr Gly Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Gly Trp Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 47

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 47

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

1 5 10 15

Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Asn Lys Tyr Ala Tyr Trp Tyr

20 25 30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Val Val Met Phe Arg Asp Asn

35 40 45

Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Tyr Cys Gln Ser Thr Asp Ser Asn Gly Ala Trp Val Phe Gly

85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Val Ser Cys Arg Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Lys Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Asn Leu Arg Tyr Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Glu Gly Glu Val Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 49

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 49

Ser His Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Ser Lys Gln Tyr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 50

Gly Phe Ile Phe Ser Asn Ala Trp

1 5

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 51

Ile Lys Arg Glu Ser Asp Ser Gly Thr Thr

1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 52

Thr Thr Gly Trp Ala Asp Tyr

1 5

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 53

Asn Tyr Phe Met His

1 5

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 54

Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Lys Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 55

Asp Pro Glu Gly Glu Val Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 56

Ala Leu Pro Asn Lys Tyr

1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 57

Gln Ser Thr Asp Ser Asn Gly Ala Trp Val

1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 58

Ser Gly Asp Ala Leu Ser Lys Gln Tyr Ala Tyr

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 59

Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 60

Gln Ser Thr Asp Thr Ser Arg Ala Tyr Tyr Val

1 5 10

<210> 61

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 61

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Leu Ala Thr Ala Thr Arg

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Met Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 62

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 62

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu

35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Asn Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys

100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu

115 120 125

Glu Ile Lys

130

<210> 63

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 63

atgggatgga gctatatcat cctcttcttg ttagcaacag ctacacgtgt ccactcccag 60

gtccaactgc agcagcctgg ggctgaggtg gtgaggcctg gggcttcagt gaaggtgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac ggtcagcagc tactggatga gctgggttaa gcagaggccg 180

gagcaaggcc ttgagtggat tggaaggatt gatccttacg atagtgaaac tcactacaat 240

caaaagttca aggacaaggc catattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag gacggccgct 360

tcgtttgact attggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

<210> 64

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 64

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat 60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacac agtaatggaa actcctattt acattggtac 180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caatatcagc 300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccattc 360

acgttcggct cggggacaaa gttggaaata aaa 393

<210> 65

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 65

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Leu Ala Thr Ala Thr Arg
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Val
35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Met Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Lys Ser Ser Ser Thr
85 90 95

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Thr Ala Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser
130

<210> 66

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 66

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

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Lys Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln

65 70 75 80

Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Arg Leu Tyr Asp Asn Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 67

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45

Leu Leu Asn Ser Arg Ile Arg Lys Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Asp Asp Leu Ala Val Tyr Tyr

100 105 110

Cys Lys Gln Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu

115 120 125

Leu Lys

130

<210> 68

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 68

atggaaaggc actggatctt tctcttcctg ttgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag 60

gtccagctgc agcagtctgc agctgaactg gcaagacctg gggcctcagt gaagatgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac ctttagtagc tacacgatgc actgggtaaa acagaggcct 180

ggacagggtc tggaatggat tggatacatt aatcctagca gtggatatac tgattacaat 240

cagaagttca aggacaagac cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

caactgagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag actatatgat 360

aactacgatt actatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 420

<210> 69

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 69

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

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Tyr Asp Asn Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 70

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 70

atggattcac aggcccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120

atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aatagtagaa tccgaaagaa ctacttggct 180

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

atcagcagtg tgcaggctga tgacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 360

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 396

<210> 71

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 71

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

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

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Asp Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Leu Lys
130

<210> 72

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 72

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Tyr Asp Asn Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135