



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0085236

(43) 공개일자 2007년08월27일

(21) 출원번호 10-2007-7006758

(22) 출원일자 2007년03월23일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년03월23일

(86) 국제출원번호 PCT/DK2005/000536

(87) 국제공개번호 WO 2006/021210

국제출원일자 2005년08월22일

국제공개일자 2006년03월02일

(30) 우선권주장 PA 2004 01271 2004년08월23일 덴마크(DK)
PA 2005 00989 2005년07월05일 덴마크(DK)

(71) 출원인 메다렉스, 인코포레이티드
미국 08540-1437 뉴저지주 프린스턴 스테이트 로드 707
젠팜 인터내셔널, 아이엔씨.
미국 캘리포니아 95035 밀피타스 코튼우드 드라이브 521

(72) 발명자 소렌센 안데르스 퍼
덴마크 디케이-3400 힐레로드 카알룬드스베쥐 24
벤피엘드 토마스 라스
덴마크 디케이-2100 코펜하겐 오 4. 구스타브 아돌프 그레이드 14
룬드그렌 엔스 딜링
덴마크 디케이-2920 살룟텐룬드 스코브베쥐 121
캠페 토마스 디.
미국 캘리포니아 94087 씨니베일 요크타운 디알. 1093

(74) 대리인 박장원

전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 뉴몰리신에 대한 결합원

(57) 요약

본 발명은 뉴몰리신에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 결합 도메인을 포함하는 항-용혈 결합원에 대한 것으로서, 특히 적어도 두 개의 결합 도메인을 갖는 결합원에 대한 것이며, 치료뿐만 아니라 진단 방법에 있어서 상기 결합원의 용도에 대한 것이다. 바람직한 구체예에서, 결합원은 항체, 이를 테면 인간 항체, 또는 그들의 단편이고, 그것은 이중특이적 항체일 것이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

뉴몰리신(Pneumolysin)에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 결합 도메인을 포함하는 분리된 항-용혈 결합원으로서, 여기에서 상기 결합 도메인은 서열번호 11의 아미노산 1-436에 대응하는 뉴몰리신의 N-말단 부분에 있는 에피토프를 인식하는 것인 분리된 항-용혈 결합원.

청구항 2.

제1항에 있어서, 여기에서 상기 결합 도메인은 서열번호 11의 아미노산 200-436에 대응하는 뉴몰리신의 부위에 있는 에피토프를 인식하는 것인 분리된 결합원.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 여기에서 분리된 결합원은 순수하게 분리된 결합원인 것인 분리된 결합원.

청구항 4.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합원은 항체 또는 항체의 면역학적 활성 단편 또는 항체의 단일 사슬로부터 선택되는 것인 분리된 결합원.

청구항 5.

제4항에 있어서, 여기에서 항체는 모노클로날 항체, 폴로클로날 항체 또는 모노클로날 항체들의 혼합물로부터 선택되는 것인 분리된 결합원.

청구항 6.

제1항에 있어서, 결합원은 뉴몰리신에 대해 단일특이적(monospecific)인 것인 분리된 결합원.

청구항 7.

제1항에 있어서, 여기에서 결합원은 뉴몰리신에 대해 특이적인 적어도 하나의 부분을 갖는 이중특이적(bispecific)인 것인 분리된 결합원.

청구항 8.

제1항에 있어서, 여기에서 결합원은 뉴몰리신에 대해 적어도 하나의 부분을 갖는 다중특이적(multispecific)인 것인 분리된 결합원.

청구항 9.

제1항에 있어서, 여기에서 결합원은 인간 항체 프레임워크(human antibody framework)에 의해 수행되는 것인 분리된 결합원.

청구항 10.

제1항에 있어서, 여기에서 결합원은 인간화 항체 프레임워크(humanised antibody framework)에 의해 수행되는 것인 분리된 결합원.

청구항 11.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 상기 결합원은 서열번호 27에 의해 포함되는 에피토프를 인식하는 것인 분리된 결합원.

청구항 12.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 상기 결합원은 서열번호 28, 29, 30 또는 31에 의해 포함되는 에피토프를 인식하는 것인 분리된 결합원.

청구항 13.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 상기 결합원은 서열번호 11에 의해 동정된 뉴몰리신의 아미노산 425-436에 의해 포함되는 에피토프를 인식하는 것인 분리된 결합원.

청구항 14.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합 도메인은 서열번호 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 또는 그들의 상동체(homologue)로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 분리된 결합원.

청구항 15.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합 도메인은 서열번호 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 10, 또는 그들의 상동체로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 분리된 결합원.

청구항 16.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합 도메인은 서열번호 10 또는 그들의 상동체에 의해 동정되는 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 분리된 결합원.

청구항 17.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합 도메인은 서열번호 8 또는 서열번호 17 또는 그들의 상동체에 의해 동정되는 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 분리된 결합원.

청구항 18.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합 도메인은 서열번호 9 또는 서열번호 18 또는 그들의 상동체에 의해 동정되는 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 분리된 결합원.

청구항 19.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합원은 두 개 이상의 다른 뉴모코커스 혈청형으로부터의 뉴몰리신에 결합할 수 있는 것인 분리된 결합원.

청구항 20.

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 상동체는 서열번호 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18로부터 선택되는 하나 이상의 서열에 대하여 적어도 60%의 동일성, 이를 테면 적어도 65%의 동일성, 이를 테면 적어도 70%의 동일성, 이를 테면 적어도 75%의 동일성, 이를 테면 적어도 80%의 동일성, 이를 테면 적어도 85%의 동일성, 이를 테면 적어도 90%의 동일성, 이를 테면 적어도 95%의 동일성, 이를 테면 적어도 98%의 동일성을 갖는 것인 분리된 결합원.

청구항 21.

제1항에 있어서, 여기에서 분리 상수는 5×10^{-9} M 미만, 이를 테면 1×10^{-9} M 미만인 것인 분리된 결합원.

청구항 22.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합원은 V_L 도메인에 위치하는 것인 분리된 결합원.

청구항 23.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합 도메인은 V_H 도메인에 위치하는 것인 분리된 결합원.

청구항 24.

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 결합 도메인은 결합원에 있는 상보성-결정 부위(CDR)로서 배열되는 것인 분리된 결합원.

청구항 25.

제3항에 있어서, 여기에서 항체의 단편은 Fab, Fab', F(ab)₂ 및 Fv로부터 선택되는 것인 분리된 결합원.

청구항 26.

전 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합원은 적어도 첫 번째 결합 도메인과 두 번째 결합 도메인을 포함하고, 상기 첫 번째 결합 도메인은 뉴몰리신에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 두 번째 결합 도메인은 상기 첫 번째 결합 도메인과는 다른 것인 결합원.

청구항 27.

제25항에 있어서, 여기에서 두 번째 결합 도메인은 포유동물의 단백질, 이를 태면 인간 단백질, 이를 태면 CD64 또는 CD89로부터 선택되는 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 분리된 결합원.

청구항 28.

제25항에 있어서, 여기에서 두 번째 결합 도메인은 포유동물의 세포, 이를 태면 인간 세포, 이를 태면 백혈구(leucocyte), 대식세포(macrophages), 임파구(lymphocytes), 호중성 세포(neutrophilic cell), 호염기 세포(basophilic cell), 및 호산 세포(eosinophilic cell)로부터 선택되는 세포에 특이적으로 결합할 수 있는 분리된 결합원.

청구항 29.

제26항에 있어서, 여기에서 두 번째 결합 도메인은 뉴모코커스(Pneumococcus) 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 분리된 결합원.

청구항 30.

제28항에 있어서, 여기에서 두 번째 결합 도메인은 첫 번째 결합 도메인과는 다른 뉴몰리신 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 분리된 결합원.

청구항 31.

제25항에 있어서, 여기에서 결합원은 두 개의 결합 도메인을 포함하는 것인 분리된 결합원.

청구항 32.

제30항에 있어서, 여기에서 두 개의 결합원은 스페이서 부위를 통해 연결되는 것인 분리된 결합원.

청구항 33.

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에서 정의된 결합원의 적어도 한 부분을 코딩하는 분리된 핵산 분자.

청구항 34.

제32항에서 정의된 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 35.

제33항에 있어서, 핵산 분자에 의해 코딩되는 항체의 발현을 조절하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 36.

제32항에서 정의된 핵산 분자를 포함하는 숙주세포.

청구항 37.

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에서 정의된 결합원을 발현하도록 설계된 세포주.

청구항 38.

개체에서 뉴모코커스와 관련된 질병 또는 장애를 측정하고 진단하는 방법으로서,

- 상기 개체로부터 생물학적 샘플을 제공하고,
- 상기 생물학적 샘플에 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에서 정의된 적어도 하나의 결합원을 첨가하고,
- 상기 생물학적 샘플에 결합된 결합원을 측정하여, 질병 또는 장애를 측정하거나 진단하는 것을 포함하는 방법.

청구항 39.

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에서 정의된 적어도 하나의 결합원을 포함하는 키트로서, 상기 항체가 표지된 것인 키트.

청구항 40.

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에서 정의된 적어도 하나의 결합원을 포함하는 약학 조성물.

청구항 41.

제39항에 있어서, 적어도 두 개의 다른 결합원을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 42.

약학 조성물의 생산을 위한 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에서 정의된 결합원의 용도.

청구항 43.

뉴모코커스 감염의 치료를 위한 약학 조성물의 생산을 위한, 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에서 정의된 결합원의 용도.

청구항 44.

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에서 정의된 결합원에 의해 인식되는, 서열번호 11의 아미노산 1-436으로 구성되는 뉴몰리신 펩타이드, 그들의 단편 또는 유사체.

청구항 45.

서열번호 27, 28, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36에 의해 동정되는 아미노산 서열을 포함하는, 뉴몰리신 펩타이드, 단편 또는 그들의 유사체.

청구항 46.

뉴몰리신 펩타이드를 포함하는 백신 조성물로서, 여기에서 뉴몰리신 펩타이드는 서열번호 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36 또는 그들의 유사체에 의해 동정되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 백신 조성물.

청구항 47.

제46항에 있어서, 어쥬번트를 더 포함하는 것인 백신.

청구항 48.

제46항에 있어서, 여기에서 뉴몰리신 펩타이드는 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에서 정의된 결합원에 의해 인식되는, 서열번호 11의 아미노산 425-436, 그들의 단편 또는 유사체를 포함하는 것인 백신.

청구항 49.

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 여기에서 뉴몰리신 펩타이드, 단편 또는 그들의 유사체는 최고 100, 이를 테면 80, 60, 40, 20, 15 또는 이를 테면 최고 12 아미노산에 의해 구성되는 것인 백신.

청구항 50.

뉴모코커스 감염의 예방적 치료를 위해 제46항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 백신 조성물의 용도.

명세서

기술분야

본 발명은 특히 뉴몰리신(Pneumolysin)에 결합할 수 있는 적어도 하나의 결합 도메인을 포함하는 결합원에 대한 것으로서, 상세하게는 적어도 두 개의 결합 도메인을 가지는 결합원에 대한 것이고, 치료용뿐만 아니라 진단 방법에 있어서 상기 결합원의 용도에 대한 것이다. 또한, 뉴몰리신 펩타이드 및 뉴몰리신 펩타이드를 포함하는 백신 조성물에 대한 것이다.

배경기술

스트렙토코커스 뉴모니에(폐렴연쇄구균, *Streptococcus pneumoniae*)는 생명을 위협하는 박테리아 감염의 주요 원인 중의 하나이다. 개발도상국에 있어서, 5세 이하의 수만 명의 어린이들이 매년 S. 뉴모니에로 죽을 것이라고 추측되어 왔다 (anonymous, 1985). 산업화된 세계에서, S. 뉴모니에 폐렴의 발병율은 100.000 명 당 5-10명이고, 치사율은 5-7%이다. S. 뉴모니에 수막염은 100.000 명당 1-2명에서 발병하며 30-40%의 치사율을 갖는다(Lee et al., 1997). S. 뉴모니에는 세균혈증(bacteremia)의 가장 빈번한 원인 중의 하나이다. S. 뉴모니에는 중이염(otitis media. App)을 앓고 있는 어린이로부터 분리되는 가장 빈번한 미생물이다. 6세 미만의 모든 어린이의 75%는 중이염을 앓게 될 것이다.

S. 뉴모니에는 쌍으로 자라며 짧은 사슬을 갖고 있는 그람-양성 박테리아이다. 그 표면은 세 개의 층으로 구성되어 있다: 캡슐, 세포벽 및 원형질막. 그 캡슐은 가장 두꺼운 층이며 성장하고 있는 S. 뉴모니에의 내부 구조를 완전히 감싸고 있다. 올리고사카라이드(폴리사카라이드)의 반복 단위의 폴리머들이 캡슐을 구성하고 있다. 다른 혈청형은 캡슐의 부분으로서 리비톨, 아라비티놀 또는 포스포릴-콜린을 포함하며, 이로 인하여 특정 혈청형이 되는 화학 구조가 초래된다. 세포벽은 테이코산(teichoic acid) 및 지질테이코산(lipoteichoic acid) 뿐만 아니라 펩타이드글리칸으로 구성된다. 원형질막은 그 세포를 감싸고 그것의 표면에 다양한 분자를 부착시키는 이중 인지질 막이다(Alonso De Velasco, 1995).

현재, S. 뉴모니에 캡슐의 다양성에 근거하여 90여 가지의 다양한 타입의 S.뉴모니에가 있는 것으로 알려져 있다. 그 캡슐은 S. 뉴모니에 감염의 중추적인 병인이다. 하나의 캡슐 타입에 대해 발생된 항체는 이 타입으로 인한 감염의 예방을 제공할 뿐, 다른 캡슐 타입을 갖는 감염을 예방하지 못한다. 현재 23가의 폴리사카라이드 백신이 가장 빈번한 혈청형의 60-85%이상을 예방할 수 있다.

뉴몰리신은 몇몇 그람-양성 박테리아의 주요 발병인자이며, 콜레스테롤-결합 특신 패밀리의 일원이다(de los Toyos et al., 1996). 그것은 고리-형태의 올리고머(포린, porins)를 형성함으로써 세포의 콜레스테롤-함유 멤브레인을 붕괴시키는 용해성 단백질이다(Bonev et al., 2001). 게다가, 뉴몰리신은 Fc 및 보체 단백질과 상호작용을 통해 비-특이적 방식으로 보체계를 활성화시킨다. 뉴몰리신의 독성은 뉴몰리신 유전자의 자리-지정 돌연변이유발(site-directed mutagenesis, Trp-433을 Phe으로 치환)에 의해 약독화될 수 있어 이로인하여 뉴몰리소이드(PdB, pneumolysoid)가 발현된다 (Alexander et al., 1994).

뉴몰리신은 테스트된 S. 뉴모니에 균주들 중에서 보존된 것으로 나타난다(Paton et al., 1983). S. 뉴모니에의 다른 균주들의 뉴몰리신 유전자에 기초하여 추론된 아미노산 서열은 >99%이 동일하다(Mitchell et al., 1990).

뉴몰리신에 대한 IgA는 성인(17명 중 17명) 및 어린이(261명 중 242명)의 타액에서 검출될 수 있다(Simell et al., 2001). 항-뉴몰리신 IgG는 2세 미만의 대부분의 어린이(1108명 중 803명) 및 모든 성인(325명 중 325명)에 있어서 EIA에 의해 측정될 수 있다(Rapola et al., 2000). 혈청전환(Seroconversion)은 캐리어 상태와 서로 관련되어 있는데, 즉, 비강인두 또는 중이 표본으로부터 배양된 S.뉴모니에로 감염된 어린이들은 거의 대부분 항-뉴몰리신 IgG 양성이다. ELISA 법을 이용한 다른 연구에서, IgG는 40명의 건강한 성인 중 7명에서 관측되었고, 만성 폐쇄 폐병(obstructive pulmonary disease) 환자 32명 중 17명에서 관측되었고, 폐렴구균성 폐렴(pneumococcal pneumonia) 환자 31명 중 13명에서 관측되었다 (Musher et al., 2001). 흥미롭게도, 폐렴과 세균혈증을 갖는 극히 적은 환자들이 세균혈증은 없으나 폐렴을 앓고 있는 환자들에 비교하여 측정가능한 IgG를 갖고 있었다(4/16 대 9/15). 이는 항-뉴몰리신 항체가 세균혈증으로 진행되는 폐렴을 예방할 수 있을 암시하고 있다.

발명의 상세한 설명

요약

본 발명은 특히 뉴몰리신에 결합할 수 있는 적어도 하나의 결합 도메인을 포함하는 항-용혈 결합원에 대한 것으로서, 여기에서 상기 결합원은 스트렙토코커스, 특히 스트렙토코커스 뉴모니에와 관련된 질병 및 장애를 예방 및 치료하기 위한 약학 조성물에 있어서 용도로서 적절하다.

따라서, 하나의 구체예에서, 본 발명은 특히 뉴몰리신에 결합할 수 있는 적어도 하나의 결합 도메인을 포함하는 분리된 결합원에 대한 것으로서, 상기 결합도메인은 뉴몰리신에 대하여 1×10^{-6} 의 분리 상수 K_d 를 갖는다. 바람직하게, 그 결합 도메인을 포함하는 결합원은 상기 정의된 분리 상수 K_d 를 갖는다.

높은 결합 강도로 인하여, 결합원은 약학 조성물에서의 용도로 적절하다. 게다가, 항응혈 활성을 갖는 좀더 많은 결합원들이 더욱 유익하다.

다른 측면에서, 본 발명은 적어도 첫 번째 결합원과 두 번째 결합을 포함하는 분리된 결합원에 대한 것으로서, 상기 첫번째 결합 도메인은 특히 뉴몰리신에 결합할 수 있다.

본 발명에 따른 결합원은 항체 또는 항체의 단편이 바람직하다. 이 항체는 당업자에게 잘 알려진 임의의 적절한 방법에 의해 생산될 수 있으나, 결합원의 적어도 일 부분은 재조합 방법을 통해 생산되는 것이 바람직하다.

따라서, 본 발명은 한 측면에서 상기에서 정의된 결합원의 적어도 일 부분을 코딩하는 분리된 핵산 분자, 뿐만 아니라 상기 정의된 그 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 상기 정의된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포에 대한 것이다.

또한 본 발명은 상기 정의된 결합원의 적어도 일부분을 발현하도록 조작된 세포주에 대한 것으로서, 더욱 바람직하게는 상기 정의된 전체 결합원을 발현하도록 조작된 것이다.

다른 측면에서, 본 발명은 개체에서 뉴모코커스(Pneumococcus, 폐렴구균)와 연관된 질병 또는 장애를 측정하거나 진단하는 방법에 대한 것으로서, 그 방법은 다음을 포함한다:

- 상기 개체로부터 생물학적 샘플을 제공하고
- 상기 생물학적 샘플에 상기에서 정의된 적어도 하나의 결합원을 첨가하고
- 상기 생물학적 샘플에 결합된 결합원을 측정하고, 이에 의해 그 질병 또는 장애를 측정 또는 진단하는 것.

또한, 그 방법에 있어서, 본 발명은 상기에서 정의된 적어도 하나의 결합원을 포함하는 키트에 대한 것으로서, 상기 결합원은 표지되어 있어 진단 방법에서 이용될 수 있다.

또 다른 측면에서 본 발명은 상기 정의된 적어도 하나의 결합원을 포함하는 약학 조성물에 대한 것이다.

게다가, 본 발명은 스트렙토코커스 뉴모니아와 관련된 장애 또는 질병, 이를 테면 폐렴(pneumonia), 수막염(meningitis) 및/또는 패혈증(sepsis)의 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물의 생산을 위한 상기 정의된 결합원의 용도에 대한 것이다.

또 다른 측면에서 본 발명은 스트렙토코커스 뉴모니아와 관련된 장애 또는 질병, 이를 테면 폐렴(pneumonia), 수막염(meningitis) 및/또는 패혈증(sepsis)을 앓고 있는 환자에게 상기 정의된 결합원의 유효량을 투여함으로써 치료 또는 예방하기 위한 방법에 대한 것이다.

또 다른 측면은 항-응혈 결합원에 의해 인지된 뉴몰리신 펩타이드 및 그 펩타이드를 포함하는 백신 조성물에 대한 것이다.

정의

친화도: 수용체와 그들의 리간드 사이의 결합 강도, 예를 들어 항체와 그것의 항원 사이의 결합 강도.

항원 항체 결합 강도(Avidity): 에피토프와 파라토프 사이 반응의 친화도, 및 항체와 항원의 수가(valencies) 모두에 관련된, 항체의 그것의 항원에 대한 기능적 결합 강도.

아미노산 잔기: 아미노산은 그것의 펩타이드 결합에서 폴리펩타이드의 화학적 소화(가수분해)로 형성된다. 여기에서 설명된 아미노산 잔기들은 "L" 이성질체 형태인 것이 바람직하다. 그러나, "D" 이성질체 형태의 잔기들은 폴리펩타이드가 목적으로 하는 기능적 성질을 보유하는 한, 임의의 L-아미노산 잔기로 치환될 수 있다. NH_2 는 폴리펩타이드의 아미노 말단에 존재하는 유리 아미노기를 말한다. COOH 는 폴리펩타이드의 카르복시 말단에 존재하는 유리 카르복실기를 말한다. 표준 폴리펩타이드로 유지함에 있어서, 아미노산 잔기를 위한 약어는 다음의 대응표에서 보여지고 있다.

대응표

기호		
1-문자	3-문자	아미노산
Y	Tyr	티로신
G	Gly	글라이신
F	Phe	페닐알라닌
M	Met	메티오닌
A	Ala	알라닌
S	Ser	세린
I	Ile	이소류이신
L	Leu	루이신
T	Thr	트레오닌
V	Val	발린
P	Pro	프롤린
K	Lys	라이신
H	His	히스티딘
Q	Gln	글루타민
E	Glu	글루탐산
Z	Glx	Glu 및/또는 Gln
W	Trp	트립토판
R	Arg	아르기닌
D	Asp	아스파르산
N	Asn	아스파라긴
B	Asx	Asn 및/또는 Asp
C	Cys	시스테인
X	Xaa	모름 또는 기타

여기에서 일반식으로 대표되는 모든 아미노산 잔기 서열들은 아미노 말단에서 카르복시 말단으로의 통상적인 방향으로 왼쪽에서 오른쪽 오리엔테이션을 갖는 것임을 인지하여야 한다. 추가로, "아미노산 잔기" 어구는 대응표에 기재된 아미노산 뿐만 아니라 변형되고 보통이 아닌 아미노산을 포함하도록 넓게 정의된다. 게다가, 아미노산 잔기 서열의 시작 또는 말단에서의 대시(dash)는 하나 이상의 아미노산 잔기의 다른 서열에의 펩타이드 결합 또는 아미노-말단기, 이를 테면 NH_2 또는 아세틸에 대한 또는 카르복시-말단기, 이를 테면 COOH 에 대한 공유 결합을 의미한다.

항체: 다양한 문법적인 형태에서의 항체란 용어는 여기에서 면역글로불린 분자와 본 발명의 조성물의 면역글로불린 분자, 즉 항체 결합 부위 또는 과라토프를 함유하는 분자의 면역학적 활성 부위를 언급하는 것으로 사용된다. 예시적인 항체 분자들은 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv로 당업계에서 알려진 부위를 포함하는 완전한 면역글로불린 분자, 실질적으로 완전한 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 부분이다. Fab의 도식도는 도 1에서 보여진다. 여기에서 사용되는 "항체" 용어는 또한 인간, 단사슬, 인간화된 항체, 뿐만 아니라 그런 항체의 결합 단편 또는 그런 항체의 변형체, 이를 테면 항체 분자로부터 유래된 적어도 하나의 항원 결합 결정소를 갖고 있는 다중특성(multispecific), 이중특성(bispecific) 및 키메릭 분자를 포함하는 것으로 의도된다.

항체 분류: 그들의 헤비 체인의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 다른 부류로 분류될 수 있다. 면역글로불린은 적어도 5개의 주요 부류가 있다: IgA, IgG, IgE, IgG 및 IgM, 그리고 이들의 몇몇은 다시 하위부류(이소타입)으로 분류될 수 있는데, 예를 들어 IgG-1, IgG-2, IgG-3 및 IgG-4; IgA-1 및 IgA-2이다. 면역글로불린의 다른 부류에 대응하는 헤비 체인 불변 도메인은 각각 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)로 불리운다. 항체의 라이트 체인은 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파(κ)와 람다(λ)로 불리는 두 개의 분명한 구별 타입 중 하나로 지정될 수 있다. 면역글로불린의 다양한 분류의 하위 유닛 구조 및 3차원 배열은 잘 알려져 있다.

항체 결합 부위: 항체 결합 부위는 항원이 특이적으로 결합(면역반응)하는 헤비 및 라이트 체인 가변 및 초가변 부위로 구성된 항체 분자의 구조적 부분이다. 그것의 다양한 형태에 있어서 면역반응이란 용어는 항원 결정소-함유 분자 및 전체 항체 분자 또는 그것의 부분과 같은 항체 결합 부위를 포함하는 분자 사이의 특이적 결합을 의미한다. 대안으로, 항체 결합 부위는 항원 결합 부위로 알려져 있다.

항-용혈: 용혈현상을 억제하는 능력. 여기에서 적혈구 상에서 뉴몰리신의 용혈 활성의 억제를 의미한다.

염기 쌍(bp): 이중나선 DNA 분자에 있어서 아데닌(A)과 티민(T) 또는 시토신(C)과 구아닌(G)과의 염합. RNA에 있어서, 우라실(U)은 티민을 대신한다.

결합원: 스트렙토코커스 뉴모니에 단백질 상의 에피토프에 결합할 수 있는 폴리펩타이드로서, 특히 뉴몰리신에 결합할 수 있다.

결합 도메인: 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위. 결합원은 다중특성이며, 두 개의 면역학적으로 구별되는 항원에 특이적으로 결합하는 두 개 이상의 결합 도메인을 포함한다.

키메라 항체: 가변 부위는 한 종의 동물로부터 유래하고, 불변 부위는 다른 종의 동물로부터 유래된 항체. 예를 들어, 키메라 항체는 쥐 모노클로날 항체로부터 유래한 가변 부위와 인간의 불변 부위를 갖는 항체가 될 수 있다.

상보적 염기: DNA 또는 RNA가 이중 나선 배열을 형성할 때 정상적으로 쌍을 이루는 뉴클레오타이드.

상보성 결정 부위 또는 CDR: 함께 항체 인식 및 결합 도메인을 형성하는 항체의 V-도메인에서의 부위.

상보적 뉴클레오타이드 서열: 결국 수소결합을 갖도록 특이적으로 혼성화되기 위해 다른 단일 가닥에 충분히 상보적인 DNA 또는 RNA의 단일 가닥 분자에서의 뉴클레오타이드의 서열

보존된: 미리선택된 서열의 정확한 보완을 위해 비-임의적으로 혼성화된다면, 미리선택된 (참고자료) 서열에 비하여 보존된 뉴클레오타이드 서열.

보존적 치환(Conservative Substitution): 여기에서 사용된 보존적 치환이라는 용어는 다른, 생물학적으로 유사한 잔기에 의해 아미노산 잔기가 대체되는 것을 지시한다. 보존적 치환의 예로는 다른 잔기를 소수성 잔기, 이를 테면 이소루이신, 발린, 루이신 또는 메티오닌으로의 치환, 다른 잔기를 하나의 극성 잔기로의 치환, 이를 테면 라이신을 아르기닌으로의 치환, 아스파르산을 글루탐산으로의 치환, 또는 아스파라긴을 글루타민으로의 치환 등이 있다. 보존적 치환의 용어는 또한 치환된 폴리펩타이드를 갖는 분자가 동일한 기능을 갖는다는 것을 조건으로 하여, 비치환된 모 아미노산을 대신하여 치환된 아미노산의 용도를 포함한다.

불변 부위 또는 불변 도메인 또는 C-도메인: 불변 부위는 그것에 보존적 치환을 포함할 수 있는 주어진 이소타입 내의 아미노산 잔기 서열을 포함하는 항체 분자의 구조적 부분을 의미한다. 대표적인 헤비 체인 면역글로불린 불변 부위는 CH1, CH2, CH3, CH4 및 CH5으로 당업계에 잘 알려진 면역글로불린의 부분이다. 대표적인 라이트 체인 면역글로불린 불변 부위는 CL로서 당업계에 알려진 면역글로불린 분자의 부분이다.

이체(Diabodies): 이 용어는 두 개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 의미하는 것으로서, 그 단편은 같은 폴리펩타이드 체인(V_H-V_L)에서 라이트 체인 가변 도메인(V_L)에 연결된 헤비 체인 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 동일한 체인에서 두 개의 도메인 사이에는 쌍을 형성하기에는 너무 짧은 링커를 이용하여, 도메인들은 다른 체인의 상보적인 도메인과 쌍이 되어 두 개의 항원-결합 부위를 형성하게 된다. 이체는 예를 들어 유럽특허 제EP 404,097호; 국제공개공보 제WO 93/11161호; 및 홀링거 등(Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, 1993)에서 더욱 자세하게 기재되어 있다.

분리 상수, Kd: 수용체와 그들의 리간드 사이, 예를 들어 항체와 그것의 항원 사이의 결합(또는 친화 또는 항원항체결합력) 강도를 나타내는 측정. Kd가 작을 수록 결합력이 강하다.

하류(Downstream): 서열 전사 또는 해독 방향에 있어서 DNA 서열을 따라, DNA의 비-코딩 가닥을 따라 3'-에서 5'-방향 또는 RNA 전사체를 따라 5'-에서 3'-방향으로 이루어진다.

듀플렉스 DNA(Duplex DNA): 이중가닥의 염기쌍에 존재하는 각각의 상보적인 염기들 사이에 하나 이상의 수소 결합에 의해 서로 결합되어 있는 실질적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드 두 가닥을 포함하는 이중 가닥 핵산 분자. 염기쌍을 형성하는 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드 염기 또는 데옥시뉴클레오타이드 염기일 수 있으며, "듀플렉스 DNA"란 용어는 두 개의 DNA 가닥(ds DNA)를 포함하는 DNA-DNA 이중가닥 또는 하나의 DNA와 하나의 RNA 가닥을 포함하는 RNA-DNA 이중가닥을 의미한다.

융합 폴리펩타이드: 적어도 두 개의 폴리펩타이드 및 그 두 개의 폴리펩타이드가 하나의 연속된 폴리펩타이드로 작동가능하게 연결되도록 하는 연결 서열로 구성된 폴리펩타이드. 융합 폴리펩타이드에서 연결된 두 개의 폴리펩타이드는 통상적으로 두 개의 독립된 소스로부터 유래되고, 그러므로 융합 폴리펩타이드는 보통 자연에서 연결된 형태로 발견되지 않는 두 개의 연결된 폴리펩타이드를 포함한다.

Fv: V_H 과 V_L 을 포함하는 이중 체인 항체 단편

유전자: 뉴클레오타이드 서열이 RNA 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 것인 핵산. 유전자는 RNA 또는 DNA가 될 수 있다.

인간 항체 프레임워크: 항원 결합 부위와 인간 면역글로불린으로부터 유래된 분자의 필수적으로 모든 잔여 면역글로불린-유래 부분을 갖는 분자.

인간화 항체 프레임워크: 비-인간 종들의 면역글로불린으로부터 유래된 항원 결합 부위를 갖는 분자로서, 그 분자의 몇몇 또는 모든 잔여 면역글로불린-유래 부분은 인간 면역글로불린으로부터 유래된 것이다. 항원 결합 부위는 다음을 포함한다: 하나 이상의 인간 불변 도메인 상에 융합된 비-인간 면역글로불린의 완전 가변 도메인; 또는 가변 도메인에서 적절한 인간 프레임워크 부위로 이식된 하나 이상의 상보성 결정 부위(CDRs). 인간화 항체에 있어서, CDRs는 쥐 모노클로날 항체로부터 유래될 수 있으며, 그 항체의 다른 부위는 인간으로부터 유래된 것일 수 있다.

혼성화: 상보적인 염기 쌍들 사이에 수소 결합의 형성에 의해 이중가닥 또는 헤테로 이중가닥을 형성하기 위해 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열(핵산 가닥)의 접합. 그것은 경쟁적으로 억제될 수 있는 두 개의 상보적인 폴리뉴클레오타이드 사이의 특이적, 즉, 비-임의적 상호작용이다.

면역글로불린: IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD를 포함하는 혈청 항체.

면역글로불린 이소타입: 다른 H 체인을 갖는 Ig에 주어진 이름, 그 이름들은 IgG ($IgG_{1,2,3,4}$), IgM, IgA ($IgA_{1,2}$), sIgA, IgE, IgD이다.

면역학적 구별: 면역학적 구별이란 용어는 항체가 폴리펩타이드 중 하나에 특이적으로 결합하고 다른 폴리펩타이드에는 특이적으로 결합하지 않는 능력에 있어서, 두 개의 폴리펩타이드들 사이에서 구별하는 능력을 의미한다.

개체: 질병, 특히 하기에서 정의되는 감염 질환에 감염되기 쉬운 살아있는 동물 또는 인간. 주체는 항원 자극 및 성장 인자 자극에 반응할 수 있는 백혈구를 가지고 있는 개체이다. 바람직한 구체예에서, 그 주체는 포유동물이며, 인간 및 비-인간 포유동물, 이를 테면 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 염소, 말, 쥐 및 생쥐를 포함한다. 가장 바람직한 구체예에 있어서, 그 주체는 인간이다.

감염 질환: 하나 이상의 스트렙토코커스, 특히 스트렙토코커스 뉴모니애에 의해 감염되는 질병.

분리된: 그것의 자연적인 환경의 성분으로부터 동정되고, 분리되고/되거나 회수된, 여기에 개시된 다양한 결합원들, 폴리펩타이드들 및 뉴클레오타이드를 설명하는데 이용된다. 그것의 자연적 환경의 오염 물질 성분들은 통상적으로 폴리펩타이드의 진단 또는 치료적 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성(proteinaceous) 또는 비-단백질성 용질을 포함할 것이다. 바람직한 구체예에서, 폴리펩타이드는 정제될 것이다.

표지 및 지시의 의미: 다양한 문법적인 형태에서, 복합체의 존재를 지시하는 측정가능한 시그널을 생산하는데 직접적 또는 간접적으로 관련되어 있는 단일 원자 및 분자를 형성하는 것을 의미한다.

모노클로날 항체: 모노클로날 항체란 용어는 다양한 문법적인 형태로 특정 항원과 면역 반응을 할 수 있는 오직 한 종의 항체 결합 부위를 포함하는 항체 분자의 집단을 의미한다. 그러므로 모노클로날 항체는 통상적으로 그것과 면역반응을 하는 임의의 항원에 대하여 단일 결합 친화도를 나타낸다. 모노클로날 항체는 다른 항원에 대하여 각각 면역특이적인 다수의 항체 결합 부위를 갖는 항체 분자, 예를 들어 이중특성 모노클로날 항체를 포함할 수 있다.

다중결합(Multimeric): 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드 분자. 중합체는 이량체이고 두 개의 폴리펩타이드를 포함하고 중합체는 삼량체이고 세 개의 폴리펩타이드를 포함한다. 중합체는 동형(homomeric)이고 두 개 이상의 동일한 폴리펩타이드를 포함하거나 중합체는 이형(heteromeric)이고 두 개 이상의 비-동일한 폴리펩타이드를 포함한다.

핵산: 뉴클레오타이드의 폴리머, 단일 또는 이중 가닥임.

뉴클레오타이드: 당 일부(펜토스), 인산염 및 질소 함유 헤테로시클릭 염기로 구성되는 DNA 또는 RNA의 단량체 유닛. 염기는 글리코시드 탄소(펜토스의 1' 탄소)를 통해 당 부분에 연결되고 그 염기와 당의 조합이 뉴클레오타이드이다. 뉴클레오타이드가 펜토스의 3' 또는 5' 위치에 결합된 인산염 그룹을 포함할 때, 뉴클레오타이드로서 언급된다. 뉴클레오타이드가 작동가능하게 연결된 서열은 통상적으로 "염기 서열" 또는 "뉴클레오타이드 서열", 및 그들의 문법적 등가물로서 여기에서 언급되고, 일반식의 좌에서 우측의 오리엔테이션이 5'-말단에서 3'-말단의 통상적인 방향인 것에 의해 대표된다.

뉴클레오타이드 유사체: 구조적으로 A, T, G, C, 또는 U와 다른 퓨린 또는 피리미딘 뉴클레오타이드이지만, 핵산 분자에 있어서 정상 뉴클레오타이드를 대신할 정도로 충분히 유사하다.

뉴모코커스(Pneumococcus): 스트렙토코커스 뉴모니애와 동의어로 사용된다.

폴리클로날 항체: 폴리클로날 항체는 특정의 주어진 항원을 인식하는 항체 혼합물로서, 폴리클로날 항체들은 상기 항원 내의 다른 에피토프를 인식할 수 있다.

폴리뉴클레오타이드: 단일 또는 이중 가닥 뉴클레오타이드의 폴리머. 여기에서 사용된 것처럼, "폴리뉴클레오타이드" 및 그것의 문법적 등가물은 핵산의 모든 범위를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 통상적으로 두 개 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 리보뉴클레오타이드의 선형 가닥을 구성하는 핵산 분자를 언급한다. 정확한 크기는 많은 요인들에 따라 것이고, 당연계에서 잘 알려진 것처럼 그것을 사용하는 최상의 조건에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 프라이머, 프로브, RNA/DNA 단편, 올리고뉴클레오타이드 또는 "올리고"(상대적으로 짧은 폴리뉴클레오타이드), 유전자, 벡터, 플라스미드 등을 포함한다.

폴리펩타이드: 폴리펩타이드는 다름이 아니라 인접 아미노산 잔기들 사이의 아미드 결합인 결합을 포함하는 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 의미한다.

수용체: 수용체는 단백질, 글리코단백질 등과 같은 분자로서, 다른 분자에 특이적으로(비-임의적으로) 결합할 수 있다.

재조합 DNA(rDNA) 분자: 작동가능하게 연결된 두 개의 DNA 단편에 의해 생산된 DNA 분자. 그러므로 재조합 DNA 분자는 자연에서는 보통 함께 발견되지 않는 적어도 두 개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 하이브리드 DNA 분자이다. rDNA는 일반적인 생물학적 기원, 즉, 진화론적인 차이점을 가지고 있지 않으며 "이종기원(heterologous)"으로 불리워진다.

특이성: 특이성이란 용어는 폴리펩타이드에 있어서 일정 항원과 면역반응(특이적으로 결합하는) 잠재적인 항원 결합 부위의 수를 의미한다. 폴리펩타이드는 단일 폴리펩타이드일 수 있거나 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 결합된 두 개 이상의 폴리펩타이드일 수 있다. 폴리펩타이드는 단특이성일 수 있고 하나의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하거나, 폴리펩타이드는 이중특이성일 수 있으며 두 개의 면역학적으로 구별되는 항원에 특이적으로 결합하는 두 개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 그러므로, 폴리펩타이드는 동일 또는 다른 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 다수의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다.

혈청형: 많은 균주로 구성된 스트렙토코커스의 종들 중에서 다양한 특징들에 있어서 다른 것과 구분되는 박테리아의 동정. 보통 혈청형으로 정의되는 특징은 특정 항원 분자에 이용된다.

단일 사슬 항체 또는 scFv: 단일 사슬 항체란 용어는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 단일 폴리펩타이드를 의미한다. 게다가, 비록 Fv 단편의 H 및 L 사슬은 분리된 유전자에 의해 코딩되고, 그들은 펩타이드와 직접적으로 또는 펩타이드를 통해 연결될 수 있고, 예를 들어 합성 링커는 재조합 방법에 의해 그들을 단일 단백질 사슬(known as single chain anti-body, sAb; Bird et al. 1988 Science 242:423-426; and Huston et al. 1988 PNAS 85:5879-5883)로 만들 수 있다. 그런 단일 사슬 항체들은 또한 "항체" 용어내에 포함되고, 다중특성 결합 분자의 설계 및 처리에 있어서 결합 결정소로서 이용될 수 있다.

상류(Upstream): DNA 전사의 방향과 반대 방향으로, 그러므로 비-코딩 가닥상에서 5'에서 3' 또는 mRNA상에서 3'에서 5'의 방향.

수가(Valency): 수가란 용어는 폴리펩타이드에 있어서 잠재적인 항원 결합 부위, 즉 결합 도메인의 수를 의미한다. 폴리펩타이드는 단가일 수 있고 하나의 항원 결합 부위를 포함할 수 있거나 폴리펩타이드는 이가일 수 있고 두 개의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 추가적으로, 폴리펩타이드는 사가일 수 있으며 네 개의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 각 항원 결합 부위는 하나의 항원과 특이적으로 결합한다. 폴리펩타이드가 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함할 때, 각 항원 결합 부위는 동일 또는 다른 항원과 특이적으로 결합할 수 있다. 그러므로, 폴리펩타이드는 다수의 항원 결합 부위를 포함할 수 있고, 그러므로 다가(multivalent)이며 폴리펩타이드는 동일한 또는 다른 항원에 특이적으로 결합할 수 있다.

V-도메인: 가변 도메인은 항원 결합 부위를 형성하는 아미노산 잔기 서열을 포함하는 항체 분자의 구조적 부분이다. 대표적인 라이트 체인 면역글로불린 가변 부위는 당업계에서 V_L 로 알려진 면역글로불린 분자의 부분이다.

V_L : 라이트 체인의 가변 도메인.

V_H : 헤비 체인의 가변 도메인.

벡터: 세포에서 자가 복제가 가능하고 DNA 단편, 예를 들어 유전자 또는 폴리뉴클레오타이드가 부착 단편의 복제를 유발하도록 작동가능하게 연결될 수 있는 rDNA 분자. 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터는 여기에서 "발현 벡터"로서 언급된다. 특히 중요한 벡터들은 역전사 효소를 이용하여 생산된 mRNAs로부터의 cDNA(상보적인 DNA)의 클리닝을 가능하게 한다.

설명

상기 기재된 것처럼, 본 발명은 결합원, 특히 스트렙토코커스 뉴모니에 단백질, 더욱 특이하게는 뉴몰리신을 특이적으로 인식하고 결합할 수 있는 항체 또는 그들의 단편에 대한 것이다. 본 발명에 따른 결합원은 특히 스트렙토코커스 뉴모니에 의해 발병되는 질병의 치료에 특히 유용하고, 뿐만 아니라 진단 방법 및 박테리아 측정을 위한 키트에서도 사용될 수 있다. 뉴몰리신은 바람직하게는 도 2에서 보여진 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이다(서열번호 11).

그러므로, 본 발명에 따른 결합원은 바람직하게는 면역학적으로 활성화되어야만 하고, 예를 들어 항체로서, 이를 테면 항원에 결합할 수 있고 면역활성화된(immunoactive) 세포에 그 항원을 제시할 수 있어서 상기 항원의 식균 작용을 용이하게 할 수 있다.

특히, 결합원은 항체, 이를 테면 당업계에서 알려진 임의의 적절한 항체로서, 특히 여기에서 정의된 항체는 항체 또는 항체의 면역학적으로 활성화 단편 또는 단일 사슬 항체이다.

항체 분자들은 통상적으로 Y-형태의 분자로서 그 기본 유닛은 네 개의 폴리펩타이드, 두 개의 동일한 헤비 체인과 두 개의 동일한 라이트 체인으로 구성되고, 이들은 이황화 결합에 의해 서로 공유적으로 연결되어 있다. 이들 체인의 각각은 분리된 도메인으로 포개어져 있다. 헤비 체인과 라이트 체인 모두의 C-말단 부위는 서열에 있어 보존되어 있고, 이것은 C-도메인으로서, 불변 부위로 불리워진다. V-도메인으로 알려진 N-말단 부위는 서열이 가변적이어서 항체 특이성을 결정한 다. 항체는 그들의 V-도메인에 위치한 6개의 짧은 상보성-결정 부위를 통해 주로 항원을 특이적으로 인식하고 결합한다(도 1 참조).

본 발명에 따른 항체들은 뉴몰리신에 대한 강한 친화도를 가지고 있기 때문에 특별히 유용하다.

따라서, 본 발명에 따른 결합원은 뉴몰리신에 대해 분리상수 K_d 를 $1 \times 10^{-6}M$ 미만으로 가지는 결합 도메인을 갖는다. 더욱 바람직하게, 뉴몰리신에 대한 분리 상수 K_d 는 $1 \times 10^{-7}M$ 미만이고, 더욱 바람직하게는 $1 \times 10^{-8}M$ 미만이고, 더욱 바람직하게는 $5 \times 10^{-8}M$ 미만이고, 더욱 바람직하게는 $1 \times 10^{-9}M$ 미만이고, 더욱 바람직하게는 $5 \times 10^{-9}M$ 미만이고, 더욱 바람직하게는 $1 \times 10^{-10}M$ 미만이다.

뉴몰리신에 대한 결합원의 친화도는 바람직하게는 실시예 4에 기재된 것처럼 측정하는 것이 바람직하다.

결합원은 상기에서 정의된 것처럼 분리된 결합원이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 분리된, 순수 결합원이다.

항-용혈 활성

항용혈 활성을 갖는 결합원은 특히 스트렙토코커스 뉴모니아에 의해 유발된 질병의 치료에 적절한 것으로 고려된다. 이론에 결부되지 않아도, 항-용혈적 결합원의 뉴몰리신에 대한 결합은 뉴몰리신의 표적 세포의 멤브레인에서의 부착을 방해하는 것으로 믿어진다. 시험관 내(In vitro) 기능적 분석은 실험예 2 및 3에 기재된 것처럼 수행되는 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 결합원은 실시예 3에서 기재된 것과 같은 분석에 있어서 4000 ng/ml의 농도에서 적어도 50%로 용혈을 억제할 수 있다. 더욱 바람직하게 결합원은 실시예 3에서 기재된 것과 같은 분석에 있어서 4000 ng/ml의 농도에서 적어도 60%, 이를 테면 80, 이를 테면 85, 가장 바람직하게는 90%의 용혈을 억제한다.

본 발명에 따른 가장 바람직한 결합원은 실시예 3에서 기재된 것과 같은 분석에 있어서 160 ng/ml의 농도에서 적어도 50%의 용혈을 억제할 수 있다. 더욱 바람직하게, 결합원은 실시예 3에서 기재된 것과 같은 분석에 있어서 160 ng/ml의 농도에서 적어도 60%, 이를 테면 80, 이를테면 85, 가장 바람직하게는 90%의 용혈을 억제한다.

상보성-결정 부위

이론을 결부시키지 않아도, 고결합강도 및/또는 항-용혈 활성은 하기에서 보여지는 서열의 하나 이상의 다음 모티브를 갖는 결합 도메인 아미노산 서열으로 통합시킴으로써 유발되는 것으로 믿어진다.

구체예에서, 결합 도메인은 다음 군에서 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열 세트를 포함한다:

- 아미노산 서열 세트 서열번호 5 또는 그들의 상동체(homologue), 서열번호 6 또는 그것의 상동체, 및 서열번호 7 또는 그것의 상동체, 또는
- 아미노산 서열 세트 서열번호 14 또는 그것의 상동체, 서열번호 15 또는 그것의 상동체, 및 서열번호 16 또는 그것의 상동체, 또는

바람직하게, 결합원은 다음 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열 세트를 포함한다:

- 아미노산 서열 세트 서열번호 8 또는 그것의 상동체, 서열번호 9 또는 그것의 상동체, 및 서열번호 10 또는 그것의 상동체,
- 아미노산 서열 세트 서열번호 17 또는 그것의 상동체, 서열번호 18 또는 그것의 상동체, 및 서열번호 10.

상기 아미노산 서열 세트에 있어서, 아미노산 서열은 바람직하게는 CDR1, CDR2 및 CDR3로서 결합 도메인에서, 즉, 다른 아미노산 서열에 의해 떨어지게 배열된다.

더욱 바람직하게, 결합 도메인은 서열번호 5와 서열번호 8 또는 그들의 상동체로부터 선택된 서열을 포함하는 CDR1 부위를 포함하고/포함하거나 결합도메인은 서열번호 6 및 서열번호 9 또는 그들의 상동체로부터 선택되는 서열을 포함하는 CDR2 부위를 포함하고/포함하거나 결합 도메인은 서열번호 7 및 서열번호 10 또는 그들의 상동체로부터 선택된 서열을 포함하는 CDR3 부위를 포함한다.

부가적으로, 결합 도메인은 바람직하게 서열번호 14와 서열번호 17 또는 그들의 상동체로부터 선택된 서열을 포함하는 CDR1 부위를 포함하고/포함하거나 결합도메인은 서열번호 15 및 서열번호 18 또는 그들의 상동체로부터 선택되는 서열을 포함하는 CDR2 부위를 포함하고/포함하거나 결합 도메인은 서열번호 16 및 서열번호 10 또는 그들의 상동체로부터 선택된 서열을 포함하는 CDR3 부위를 포함한다.

여기에 기재된 출원인의 발견은 가변적인 헤비 체인의 서열이 용혈 활성에 중요한 것임을 암시한다. 그러므로 바람직한 구체예는 다음 군에서 선택되는 하나 이상의 서열을 포함하는 결합 도메인을 포함한다; 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 18 및 서열번호 10 또는 그들의 상동체. 특히 바람직하게는 서열번호 9 또는 서열번호 18 또는 그들의 상동체를 포함하는 결합 도메인이다. 가장 바람직하게는 서열번호 10 또는 그들의 상동체를 포함하는 결합 도메인이다.

그러므로, 결합 도메인의 가변 부분은 서열번호 3 및 서열번호 4 또는 그들의 상동체로부터 선택되는 서열을 포함하는 것이 특히 바람직하고, 여기에서 상동체는 여기의 다른 곳에서 정의된 것과 같다.

부가적으로, 결합 도메인의 가변 부분은 서열번호 12 및 서열번호 13 또는 그들의 상동체로부터 선택되는 서열을 포함하는 것이 바람직하고, 상동체는 여기 다른 곳에서 정의된 것과 같다.

바람직한 특정 구체예에서, 결합 도메인의 가변 라이트 체인은 서열번호 3 및 서열번호 12로부터 선택되는 서열을 포함하거나/포함하고 더욱 바람직하게 결합 도메인의 가변 헤비 체인은 서열번호 4 및 서열번호 13으로부터 선택되는 서열을 포함한다.

여기 기재된 상동체들 중 임의의 하나의 상동성은 상기 정의된 것처럼 뉴몰리신에 대한 분리 상수 K_d 를 갖는 하나 이상의 상동체를 포함하는 결합 도메인을 부여한다.

동일성 및 상동성

"동일성(Identity)" 용어는 서열을 정렬시키고 갭을 도입한 후에, 후보 서열들 중에서 그것과 비교되는 상동 서열의 잔기와 동일한 아미노산 잔기의 퍼센트를 의미하는 것으로 해석될 것으로서, 만약 전체 서열에 대한 최대 퍼센트 동일성을 성취하는 것이 필요하다면, 서열 동일성의 부분으로서 임의의 보존적인 치환은 고려되지 않는다. N- 또는 C-말단 신장 또는 삽입 어느 것도 동일성 또는 상동성을 감소시키는 것으로 해석될 수 없을 것이다. 배열을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당 업계에 잘 알려져 있다. 서열 동일성은 서열 분석 소프트웨어(예, Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Ave., Madison, Wis. 53705)을 이용하여 측정될 수 있다. 이 소프트웨어는 상동성의 정도를 다양한 치환, 삽입 및 다른 변형에 지정함으로써 유사한 서열을 매치시킨다.

여기에서 특정된 하나 이상의 서열의 상동체는 정의된 서열에 비교하여 하나 이상의 아미노산에 있어서 다양할 것이나, 동일한 기능을 수행할 수 있고, 즉, 상동체가 미리 결정된 서열의 기능적인 등가물로서 관찰될 것이다.

상기 기재된 것처럼, 여기에서 미리 결정된 서열의 임의의 상동체는 다음으로 정의될 수 있다:

- i) 미리 결정된 아미노산에 의해 인식될 수 있는 항원을 인식할 수 있는 아미노산을 포함하는 상동체, 및/또는
- ii) 항원에 선택적으로 결합할 수 있는 아미노산 서열을 포함하는 상동체로서, 여기에서 상기 항원은 또는 미리-결정된 서열에 의해 선택적으로 결합될 수 있는 것이고, 및/또는
- iii) 미리 결정된 서열, 이를 테면 서열번호 3, 4, 12 및 13을 포함하는 결합 도메인으로서 뉴몰리신에 대한 실질적으로 유사한 또는 더 높은 결합 친화도를 갖는 상동체.

상동체의 예는 미리 결정된 아미노산의 동일한 군내에서 하나 이상의 보존적인 아미노산 치환을 포함하는 하나 이상의 보존적인 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 다수의 보존적인 아미노산 치환을 포함하고, 여기에서 각 보존적인 치환은 미리 결정된 아미노산의 다른 군내의 치환에 의해 생성된다.

그러므로 상동체는 다른 것과 독립적으로 보존적 치환을 포함하고, 여기에서 상기 상동체의 적어도 하나의 글라이신(Gly)은 Ala, Val, Leu, 및 Ile으로 구성되는 아미노산 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 그것의 상동체의 적어도 하나의 알라닌(Ala)은 Gly, Val, Leu, 및 Ile으로 구성된 아미노산 군에서 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것과 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 상동체의 적어도 하나의 발린(Val)은 Gly, Ala, Leu, 및 Ile으로 구성된 아미노산 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 상동체의 적어도 하나의 루이신(Leu)은 Gly, Ala, Val, 및 Ile으로 구성되는 아미노산의 군에서 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 상동체의 적어도 하나의 이소루이신(Ile)은 Gly, Ala, Val 및 Leu으로 구성되는 아미노산 군에서 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 상동체의 적어도 하나의 아스파르트산(Asp)은 Glu, Asn, 및 Gln으로 구성되는 아미노산 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 상동체의 적어도 하나의 페닐알라닌(Phe)은 Tyr, Trp, His, Pro으로 구성되는 아미노산 군으로부터 선택되는 아미노산, 바람직하게는 Tyr 및 Trp으로 구성되는 아미노산 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 상동체의

적어도 하나의 상기 티로신(Tyr)은 Phe, Trp, His, Pro으로 구성된 아미노산 군으로부터 선택되는 아미노산, 바람직하게 Phe 및 Trp으로 구성된 아미노산 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 단편의 적어도 하나의 상기 아르기닌(Arg)은 Lys 및 His으로 구성된 아미노산 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 그것의 상동체의 적어도 하나의 라이신(Lys)은 Arg 및 His으로 구성된 아미노산 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 그것의 상동체의 적어도 하나의 상기 아스파라긴(Asn)은 Asp, Glu, 및 Gln으로 구성된 아미노산 군에서 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 그것의 상동체의 적어도 하나의 글루타민(Gln)은 Asp, Glu, 및 Asn으로 구성되는 아미노산 군에서 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 그것의 상동체의 적어도 하나의 프롤린(Pro)은 Phe, Tyr, Trp, 및 His으로 구성되는 아미노산 군에서 선택되는 아미노산으로 치환되고, 그것에 독립적으로, 그것의 상동체, 여기에서 상기 그것의 상동체의 적어도 하나의 시스테인(Cys)은 Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, 및 Tyr으로 구성되는 아미노산 군에서 선택되는 아미노산으로 치환된다.

보존적 치환은 바람직하게 미리 결정된 서열의 임의의 위치에 도입될 수 있다. 그러나 비-보존적 치환을 도입, 특히, 여기에 제한되지 않지만, 하나 이상의 임의의 위치에 비-보존적 치환을 도입하는 것이 바람직하다.

여기에서 서열의 기능적으로 동등한 상동체의 형성을 이끄는 비-보존적 치환은 예를 들어 i) 실질적으로 극성에 있어서 다르고, 예를 들어 Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, 또는 Gln과 같은 극성 부사슬을 갖는 잔기, 또는 Asp, Glu, Arg, 또는 Lys와 같은 전하를 띠는 아미노산을 가진 잔기, 또는 비-극성 아미노산이 전하를 띠거나 극성 잔기로 치환된 것인 잔기가 비-극성 부사슬(Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe 또는 Met)로 치환된 잔기; 및/또는

ii) Pro 또는 Gly의 치환 또는 Pro 또는 Gly의 다른 잔기에 의한 치환과 같은 폴리펩타이드 골격 오리엔테이션에 대한 그것의 효과에 있어서 실질적으로 다르고; 및/또는

iii) 실질적으로 전기적 전하에 있어서 다르고, 예를 들어, Lys, His 또는 Arg과 같이 양전하를 띠는 잔기가 Glu 또는 Asp와 같이 음전하를 띠는 잔기로의 치환(또는 그 역의 경우); 및/또는

iv) 실질적으로 입체 부피에 있어서 다른데, 예를 들어 음성 부사슬, 예를 들어 Ala, Gly 또는 Ser을 갖는 잔기를 His, Trp, Phe 또는 Tyr와 같은 거대한 잔기로의 치환이 있다.

아미노산의 치환은 하나의 구체예에서 그들의 소수성 및 친수성 수치와 전하, 크기 등을 포함하는 아미노산 부-사슬 치환체의 상대적인 유사성에 기초하여 만들어진다. 상기 다양한 특징들을 고려한 대표적인 아미노산 치환체는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 다음을 포함한다: 아르기닌과 라이신: 글루타민산염(glutamate)과 아스파레이트; 세린과 트레오닌; 글루타민과 아스파라긴; 및 발린, 루이신 및 이소루이신.

하나의 구체예에서, 결합 도메인은 서열번호 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17 및 18로부터 선택되는 서열과 적어도 60% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 상동체를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 결합 도메인은 서열번호 3, 4 12 및 13로부터 선택되는 서열과 적어도 60% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가지는 상동체를 포함한다.

더욱 바람직하게 상동체는 서열번호 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17 및 18, 또는 바람직하게 서열번호 3, 4 12 및 13으로부터 선택되는 서열과 적어도 65%, 이를테면 적어도 70% 동일성, 이를테면 적어도 75% 동일성, 이를테면 적어도 80% 동일성, 이를테면 적어도 85% 동일성, 이를테면 적어도 90% 동일성, 이를테면 적어도 95% 동일성, 이를테면 적어도 98% 동일성을 갖는 것이다.

더욱 바람직한 구체예에서, 상기 언급한 퍼센트는 서열번호 3, 4 12 및 13으로부터 선택된 서열과 비교하여 상동체 서열의 동일성과 관련된다.

에피토프(Epitopes)

본 발명에 따른 항-용혈 결합원은 서열번호 3, 4, 12 또는 13의 군에서 선택되는 서열을 포함하는 가변 부분을 갖는 항체에 의해 인식되는 에피토프를 인식하고 결합한다.

하나의 구체예에서, 항-용혈 결합원의 결합 도메인은 뉴몰리신의 N-말단 부분에 있는 에피토프를 인식한다. 바람직하게는 서열번호 11에 의해 동정된 뉴몰리신의 아미노산 1-436에 대응하는 N-말단 부분 내인 것이다. 결합 도메인에 의해 인

식되는 에피토프는 서열번호 11에 의해 동정된 뉴몰리신의 아미노산 50-436, 또는 바람직하게는 아미노산 100-436이 더욱 바람직하다. 특정 구체예에 있어서, 결합원에 의해 인식되는 에피토프는 서열번호 11에 의해 동정된 뉴몰리신의 아미노산 200-435 또는 300-435이내인 것이다.

본 발명의 결합원의 결합 도메인은 서열번호 27에 의해 동정된 아미노산 서열에 의해 포함되는 에피토프를 인식한다. 바람직한 구체예에서, 결합 도메인은 서열번호 28, 29, 30 및 31에 의해 포함되는 에피토프, 더욱 바람직하게는 서열번호 29와 30에 의해 포함되는 에피토프를 인식한다.

결합 도메인에 의해 인식되는 에피토프는 서열번호 11에 의해 동정되는 뉴몰리신의 아미노산 400-438, 바람직하게는 아미노산 420-436이내이다. 특정 구체예에 있어서, 결합원에 의해 인식되는 에피토프는 서열번호 11에 의해 동정된 뉴몰리신의 아미노산 422-436 또는 425-436 이내이다.

혈청형(Serotypes)

상기에서 설명한 것처럼, 스트렙토코커스 뉴모나에의 90여가지의 다른 혈청형이 동정되었다. 본 발명에 따른 결합원은 두 개이상의 다른 뉴모코커스 혈청형, 이를테면 세개 이상의 다른 뉴모코커스 혈청형, 이를테면 네 개이상의 뉴모코커스 혈청형, 이를테면 다섯 개이상의 뉴모코커스 혈청형으로부터의 뉴몰리신에 결합할 수 있다. 가장 바람직하게, 본 발명에 따른 결합원은 필수적으로 모든 혈청형으로부터의 뉴모코커스를 인식하고 결합할 수 있다.

모노클로날/폴리클로날 항체(Monoclonal/polyclonal antibodies)

본 발명의 하나의 구체예에서, 결합원은 항체이고, 여기에서 그 항체는 포유동물로부터 유래된 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 또는 모노클로날 항체의 혼합물이다. 바람직한 구체예에서, 결합원은 모노클로날 항체 또는 그들의 단편이다. 항체는 임의의 종류의 항체이다; 그러나 IgG 항체가 바람직하다. 더욱 바람직하게 항체는 IgG1 항체 또는 그들의 단편이다.

모노클로날 항체(Mab's)는 항체이며, 여기에서 모든 항체 분자가 유사하여, 동일한 에피토프를 인식한다. 모노클로날 항체는 일반적으로 하이브리도마 세포주에 의해 생산된다. 모노클로날 항체 및 항체-합성 하이브리도마 세포를 제조하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 항체-생산 하이브리도마는 예를 들어 항체-생산 B 림프구와 불사화 세포주 (immortalized cell line)의 융합에 의해 생산될 수 있다.

모노클로날 항체는 다음 단계에 의해 생산될 수 있다. 모든 과정에 있어서, 동물은 폴리클로날 항체의 생산을 위해 상기에서 기재된 것과 같은 항원, 이를테면 단백질(또는 그것의 펩타이드)로 면역화된다. 면역화는 통상적으로 면역학적으로 유능한 포유동물에게 면역원을 면역학적 유효량으로, 즉, 면역 반응을 생산하는데 충분한 양을 투여함으로써 성취된다. 바람직하게, 포유동물은 설치동물, 이를테면 토끼, 쥐 또는 생쥐이다. 포유동물은 기재된 것처럼 고 친화도의 항체 분자를 생성하기에 충분한 기간 동안 부스터 스케줄로 사육된다. 항체-생산 세포의 현탁액은 목적 항체를 분비하는 면역화된 각각의 포유동물로부터 제거된다. 고친화도의 항체를 생성하기에 충분한 시간 이후에, 동물(예, 생쥐)을 죽이고 항체-생산 임파구를 림프절, 비장 및 말초혈액 중 하나 이상으로부터 수득한다. 비장 세포가 바람직하고, 당업자에게 잘 알려진 방법을 이용하여 생리적 배지에서 개별 세포들을 기계적으로 분리할 수 있다. 항체-생산 세포는 생쥐 골수종 라인의 세포와 융합시켜 불사화시킨다. 생쥐 임파구는 생쥐의 상동 골수종과 안정하게 융합할 수 있게 해준다. 그러나 쥐, 토끼 및 개구리의 체세포 세포는 사용될 수 있다. 목적 항체-생산 동물의 비장 세포는 골수종 세포와 융합시킴으로써 불사화시키고, 일반적으로 융합제, 이를 테면 폴리에틸렌 글리콜의 존재하에서 융합시킨다. 융합 파트너로서 안정한 수많은 골수종 세포주의 어느 것이라도 표준 기술로 이용되고, 예를 들어 ATCC(American Type Culture Collection), Rockville, Md로부터 입수가능한 P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 또는 Sp2/O-Ag14 골수종 라인이 있다.

모노클로날 항체는 또한 당업자에게 잘 알려진 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. "조합 항체 디스플레이 (combinatorial antibody display)" 방법으로 언급되는 부가적인 방법이 특정 항원 특이성을 갖는 항체 단편을 동정하고 분리하는데 기여하였으며, 모노클로날 항체를 생산하는데 이용될 수 있다.

폴리클로날 항체는 특정한 일정 항원을 인식할 수 있는 항체 분자의 혼합물이고, 그러므로 폴리클로날 항체는 상기 항원내의 다른 에피토프를 인식할 수 있다. 일반적으로 폴리클로날 항체는 포유동물의 혈청에서 정제되고, 그 전에 항원으로 면역화된다. 폴리클로날 항체는 예를 들어 항체에서 언급된 임의의 방법에 의해 생산될 수 있다(A Laboratory Manual, By Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). 폴리클로날 항체는 임의의 적절한 포유동물 중, 이를테면 생쥐, 쥐, 토끼, 원숭이, 염소 및 양으로부터 유래된다.

특이성(Specificity)

결합원은 뉴몰리신에 대한 단일특이적이며, 여기에서 뉴몰리신에 대한 특이성은 결합원이 뉴몰리신과 면역반응을 한다는 것을 의미한다. 다른 구체예에서, 결합원은 뉴몰리신에 대해 적어도 하나의 특이적 부분을 갖는 이중특이적 또는 다중특이적이다.

단가 항체(Monovalent antibodies)

단일특이적 결합원은 단가일 것이고, 즉, 하나의 결합 도메인만을 가지고 있을 것이다.

단가 항체의 경우, 면역글로불린 불변 도메인 아미노산 잔기 서열은 당업계에서 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 알려진 항체 분자의 구조적 부분을 포함한다. 바람직하게는 당업계에서 C_L로 알려진 결합원이다. 바람직한 C_L 폴리펩타이드는 C_k 및 C_λ로 구성된 군에서 선택된다.

게다가, 불변 도메인이 헤비 또는 라이트 체인 불변 도메인(각각, C_H 또는 C_L)이 될 수 있는 한, 단가 결합원 조성물의 다양성은 본 발명에 의한 것으로 해석된다. 예를 들어, 라이트 체인 불변 도메인은 다른 라이트 체인 불변 도메인과, 또는 헤비 체인의 불변 도메인과 이황화 결합을 형성할 수 있다. 반대로, 헤비 체인 불변 도메인은 두 개의 독립적인 이황화 브릿지를 형성할 수 있어 다른 헤비 체인과 라이트 체인 모두와 연결될 수 있도록 하거나 헤비 체인의 폴리머를 형성할 수 있다.

그러므로, 다른 구체예에서, 본 발명은 단가 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 고려하는데, 여기에서 불변 체인 도메인 C는 적어도 하나의 이황화 다리를 형성할 수 있는 시스테인 잔기를 가지고 있고, 여기에서 그 조성물은 상기 이황화 다리에 의해 공유적으로 연결된 적어도 두 개의 단가 폴리펩타이드를 포함한다.

바람직한 구체예에서, 불변 체인 도메인 C는 C_L 또는 C_H일 수 있다. C가 C_L일 때, CL 폴리펩타이드는 바람직하게 C_k와 C_λ로 구성되는 군에서 선택된다.

다른 구체예에서, 본 발명은 상기에서처럼 단가 폴리펩타이드를 포함하는 결합원 조성물을 고려하는데, 여기에서 C가 이황화 다리를 형성할 수 있는 시스테인 잔기를 갖는 C_L은 제외되고, 그런 조성물은 상기 이황화 다리에 의해 공유적으로 연결된 두 개의 단가 폴리펩타이드를 포함한다.

다가(Multivalent)

본 발명의 또 다른 구체예에서, 결합원은 적어도 두 개의 결합 도메인을 갖는 다가 결합원이다. 결합 도메인은 동일한 리간드 또는 다른 리간드에 대하여 특이성을 가질 수 있다.

이중특이성을 포함한 다중특이성

바람직한 구체예에서, 본 발명은 다중특이적 결합원대한 것으로서, 적어도 두 개의 다른 존재에 대한 친화도를 가지고 결합할 수 있다. 다중특이적 결합원은 이중특이적 결합원을 포함할 수 있다.

하나의 구체예에서, 다중특이적 분자는 이중특이적 항체(BsAb)로서, 적어도 두 개의 다른 결합원, 적어도 하나는 항체 기원의 결합원을 담지한다.

본 발명의 이중특이적 분자는 또한 단일 사슬 이중특이적 분자가 될 수 있으며, 이를 테면 단일 사슬 이중특이적 항체, 하나의 단일 사슬 항체와 결합 도메인을 포함하는 단일 사슬 이중특이적 분자, 또는 두 개의 결합 도메인을 포함하는 단일 사슬 이중 특이적 분자이다. 다중특이적 분자는 또한 단일 사슬 분자가 될 수 있거나 적어도 두 개의 단일 사슬 분자를 포함할 수 있다.

이중 특이적을 포함하는 다중특이적 항체는 당업자에게 잘 알려진 적절한 임의의 방법에 의해 생산될 수 있다.

이중 특이적 전체 항체를 생성시키는 전통적인 접근은 목적 특이성을 갖는 항체를 각각 생산하는 두 개의 하이브리도마 세포주를 융합시키는 것이었다. 면역글로불린 헤비 및 라이트 체인의 임의적 연합때문에, 이들 혼성 하이브리도마는 최고 10개의 다른 헤비 및 라이트 체인 조합의 혼합물을 생산하고, 이중 오직 하나만이 이중특이적 항체이다. 그러므로, 이들 이중 특이적 항체는 정교한 과정으로 정제되어야만 하고, 그로인하여 목적 생산물의 수율이 감소될 수도 있다.

대안적인 접근은 경첩에서 또는 상기에서 기재된 것처럼 일반적으로 유도된 C-말단 Cys를 통해서 시스테인 잔기의 화학적 교차-연결에 의해 두 개의 항원 특이성을 시험관내(*in vitro*) 연결을 포함한다. 그럼 시험관 내 연합의 향상은 Fab's를 헤테로다이머의 형성을 촉진시키는 펩타이드와의 재조합 융합을 이용함으로써 성취되었다. 그러나, 이 방법에 있어서의 이중 특이적 생산물의 수율이 100%보다 훨씬 미미하였다.

시험관내 화학적 연합 단계를 포함시키지 않고, 이가 또는 이중특이적 항체 단편을 생산하기 위한 좀더 효율적인 접근은 홀리거 등(Holliger et al., 1993)에 의해 설명되었다. 이 접근은 박테리아로부터 분리된 scFv's가 종종 모노머와 다이머 모두로서 존재함을 관찰하는 이점을 갖는다. 이 관찰은 다른 사슬의 V_H 와 V_L 이 쌍을 이룰 수 있어, 다이머와 좀더 큰 복합체를 형성할 수 있음을 암시하였다. 홀리거 등에 의해 "디아바디(diabodies)"로 이름지어진 다이머 항체 단편은 사실 생체내(*in vivo*)에서 연합되는 작은 이가 항체 단편이다. "교차(crossover)" 사슬 V_H1-V_L2 와 V_H2-V_L1 을 형성하기 위한 두 개의 다른 항체 1 및 2의 V_H 와 V_L 연결에 의해 이량체화(dimerisation) 과정이 양 항체-결합 부위를 재연합에서 보여졌다. 두 개의 결합 부위의 친화도는 출발 scFv's와 동일한 것을 보여졌고, 또는 V_H 와 V_L 의 공유적으로 연결시키는 폴리펩타이드 링커가 제거되었을 때 10배 증가된 것으로 보여졌고, 그러므로 V_H 와 쌍을 이룬 것이 아닌, 직접적으로, 공유적으로 V_L 에 연결된 V_H 로 각각 구성된 두 개의 단백질을 생성시킨다. 이중 특이적 항체 단편을 생산하는 이런 전략은 또한 몇몇 특허출원에도 기재되었다. 특허출원 WO 94/09131(SCOTGEN LTD; priority date Oct. 15, 1992)은 이중특이적 결합 단백질로서, 그 결합 도메인이 두 개의 사슬에서 존재하거나 scFv에서 연결되는 V_H 와 V_L 부위 모두로부터 유래된 것이며, 반면에 다른 융합된 항체 도메인, 예를 들어 C-말단 불변 도메인이 다이머 구조를 안정화시키기 위해 사용되었다. 특허출원 94/13804 (CAM-BRIDGE ANTIBODY TECHNOLOGY/MEDICAL RESEARCH COUNCIL; first priority date Dec. 4, 1992)은 서로서로 연합할 수 없는 V_H 와 V_L 을 포함하는 폴리펩타이드에 대한 것으로서, 그것에 의해 V-도메인은 링커로, 또는 링커없이 연결될 수 있다.

말렌더 및 보스(Mallender and Voss, 1994, (또한 특허 출원 WO 94/13806에서도 기재됨; DOW CHEMICAL CO; priority date Dec. 11, 1992))은 E. coli에서의 단일-사슬 이중 특이적 항체의 생체내 생산을 보고하였다. 이가 단백질의 이중특이성은 구별되는 특이성을 갖고 있고, 유연한 폴리펩타이드 링커에 의해 유전적 수준에서 서로 연결되는 두 개의 미리 생산된 단가 scFv 분자에 기초하였다. 통상적으로, 단일-사슬 항체 단편이 언급될 때는 언제나, 폴리펩타이드 링커가 존재하거나 부재일 때 하나의(대응되는) 라이트 체인에 연결된 하나의 헤비 체인으로 구성되는 단일 분자가 관련된다. "디아바디" 접근(Holliger et al., (1993) 및 특허 출원 WO 94/09131)을 통해 또는 "이중 scFv" 접근Mallender and Voss, 1994 및 특허출원 WO 94/13806)에 의해 이가 또는 이중특이적 항체 단편을 제조할 때, 다시 V_H 가 (대응하는) V_L 에 연결된다.

상기에서 기재된 다중특이적 분자는 수많은 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 모든 특이성은 동일한 벡터에서 코딩되거나 동일한 숙주 세포에서 발현 및 조합될 수 있다. 다중-특이적 분자가 $mAb \times mAb$, $mAb \times Fab$, $Fab \times F(ab')_2$ 또는 리간드 $\times$ Fab 융합 단백질일 경우에, 이 방법이 특히 유용하다. 이가 또는 다가 항체를 제조하는 다양한 방법들이 예를 들어, 미국 특허 번호 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; 및 5,482,858에 기재되어 있다.

본 발명에 따른 이중특이적 또는 다중특이적 결합원을 이용함으로써 본 발명은 단일특이적/단가 결합원과 비교하여 몇몇 이점을 제공한다.

이중특이적/다중특이적 결합원은 스트렙토코커스 단백질, 특히 뉴몰리신을 특이적으로 인식하고 결합할 수 있는 첫 번째 결합 도메인을 가지고, 여기에서 다른 결합 도메인(들)은 다른 목적으로 이용될 수 있다:

하나의 구체예에서, 적어도 하나의 다른 결합 도메인은 스트렙토코커스 단백질에 결합하기 위해 이용되고, 이를 테면 첫 번째 결합 도메인과 비교하여 동일한 스트렙토코커스 단백질 상의 다른 에피토프에 결합하는데 이용된다. 그것에 의해 스트렙토코커스 종에 대한 특이성이 증가될 뿐만 아니라 결합원의 항원항체결합력(avidity)이 증가될 수 있다.

다른 구체예에서, 적어도 하나의 다른 결합 도메인은 포유동물 세포, 이를 테면 인간 세포에 특이적으로 결합하기 위해 이용될 수 있다. 적어도 다른 결합 도메인은 치료방법에 있어서 결합원의 효과를 증가시키기 위하여, 면역활성화된 세포, 이를테면 백혈구, 대식세포, 임파구, 호염기세포(basophilic cell), 및/또는 호산세포(eosinophilic cell)에 결합할 수 있다. 이는 적어도 하나의 다른 결합 도메인이 포유동물의 단백질, 이를 테면 인간 단백질, 이를테면 임의의 클러스터 분화 단백질(cluster differentiation protein, CD), 특히 CD64 및/또는 CD89로부터 선택되는 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것을 확립함으로써 성취될 수 있다. CD64 특이성을 갖는 이중특이적 항체를 생산하는 방법은 Medarex, Inc.의 US 6,071,517에 기재되어 있다.

여기에서 사용된 "작용 세포(effector cell)"는 백혈구 또는 임파구인 면역 세포를 의미한다. 특정 작용 세포는 특정 Fc 수용체를 발현하고 특정 면역 기능을 수행한다. 예를 들어, 단핵세포(monocyte), 대식세포(macrophages), 중성구(neutrophils), 호산구(eosinophils) 및 CD89 수용체를 발현하는 임파구는 표적 세포의 특이적 죽음, 항원을 면역계의 다른 구성성분에 제시하거나 항원을 제시하는 세포에 결합하는데 관련한다.

인간화 항체 프레임워크(Humanised antibody framework)

비-인간 "외래" 에피토프는 치료받는 개체에서 면역반응을 도출할 수 있기 때문에, 인간을 치료함에 비-인간 항체를 사용하는 것이 항상 바람직한 것은 아니다. 비-인간 항체와 관련된 문제를 제거하거나 최소화하기 위하여, 키메라 항체 유도체, 즉, 결정소를 결합하는 비-인간 Fab 가변 부위가 인간 불변 부위(Fc)와 결합되는 "인간화" 항체 분자를 설계하는 것이 바람직하다. 그런 항체들은 상기 기재된 모노클로날 및 폴리클로날 항체의 균등한 항원 특이성과 친화도를 특징으로 가지고, 인간에게 투여되었을 때 덜 면역원성이어서, 치료받는 개체에 의해 더 관용적이 된다.

따라서, 하나의 구체예에서 결합원은 인간화 항체라 불리우는 인간화 항체 프레임워크를 수행하는 결합 도메인을 갖는다.

인간화 항체는 일반적인 키메라 항체에서 인간 항체로부터 유래된 부위 및 비-인간 항체로부터 유래된 부위, 이를 테면 설치 동물의 항체로부터 유래된 부위를 포함하고 있다. 인간화(또한 Reshaping 또는 CDR-grafting으로 불리워 진다)는 이 중 소스(보통 설치 동물)로부터의 모노클로날 항체(mAbs)의 면역성을 감소시키고, 인간 면역글로불린과의 상동성을 증가시키고, 인간 면역계의 활성화를 개선시키는 기술로서 잘 확립되어 있다. 그러므로, 인간화 항체는 통상적으로 인간항체로서, 몇몇 CDR 잔기 및 가능하게 몇몇 프레임워크 잔기들이 설치동물 항체에서 유사한 부위로부터의 잔기에 의해 치환된다.

인간화 항체는 항체 및 다른 우세한 생물학적 성질에 대한 높은 친화도를 보유하고 있다는 것이 더 중요하다. 이 목표를 성취하기 위하여, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 모서열(parental sequence)과 인간화 서열의 삼차원 모델을 이용하여 모서열과 다양한 개념적 인간화 생산물의 분석 과정에 의해 제조된다. 삼차원 면역글로불린 모델은 보통 입수가능하고 당업자에게는 친숙한 것이다. 컴퓨터 프로그램은 선택된 후보 면역글로불린 서열의 예상 삼차원 배열 구조를 그리고 도시하는 것이 가능하다. 이 디스플레이를 관찰하는 것으로 인하여 후보 면역글로불린 서열의 작용에 있어서 확실한 잔기의 역할 분석이 가능하고, 즉 그것의 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석이 가능하게 한다. 이런 방법으로, FR 잔기들이 선택될 수 있고 수혜자와 수입(import) 서열로 결합될 수 있어, 비록 그것이 항원 결합에 직접적으로 그리고 가장 실질적으로 영향을 미치는 CDR 잔기이긴 하지만, 목적 항체의 특징, 이를 테면 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 최대화가 된다.

하나의 항체의 완전한 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 부위가 있는 키메라 항체를 생산하는 것과 관련된 인간화 MAbs를 위한 하나의 방법은 두 번째 항체로부터 유래된 불변 도메인, 바람직하게 인간 항체에 융합시키는 것이다. 그런 키메라화 과정을 수행하는 방법은 예를 들어 유럽 특허 EP-A-0 120 694 (Celltech Limited), EP-A-0 125 023 (Genen-tech Inc.), EP-A-0 171 496 (Res. Dev. Corp. Japan), EP-A-0173494 (Stanford University) 및 EP-A-0 194 276 (Celltech Limited)에 기재되어 있다. 항체 인간화의 좀더 복잡한 형태는 가변 부위 도메인을 재-디자인하는 것과 관련있어 비-인간 항체 결합 부위를 구성하는 아미노산이 인간 항체 가변 부위의 프레임워크로 통합된다(Jones et al., 1986).

본 발명의 인간화 항체는 인간 항체의 CDR의 임의의 부위를 비-인간 항체로부터 유래된 CDR로 치환시킬 수 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 윈터(Winter)는 본 발명의 인간화 항체 제조에 이용될 수 있는 방법을 설명하고 있고(영국 특허 출원 번호 GB 2188638A, 출원일 1987년 3월 26일), 이는 참고자료로서 특별히 통합되어 있다. 인간 CDRs는 하기 실시예에서 기재된 것처럼 올리고뉴클레오타이드 자리-지정 돌연변이유발(site-directed mutagenesis)을 이용하여 비-인간 CDRs로 치환시킬 수 있다.

실시예에서처럼, 본 발명의 인간화 항체는 하기 간단한 설명에서 기재된 것과 같은 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는 다음 공정에 의해 제조될 수 있다:

- (a) 통상적인 기술에 의해 CDRs와 항체 결합 특이성을 보유하는데 필요한 가변 도메인 프레임워크 부위의 최소 부분이 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 것을 갖는 항체 헤비 체인을 코딩하는 DNA 서열을 갖는 오페론을 포함하는 발현 벡터를 작제하고, 항체 체인의 잔여 부분은 인간 면역글로불린으로부터 유래된 것이며, 그것에 의해 본 발명의 벡터를 생산하고;
- (b) 통상적인 기술에 의해, CDRs와 수여자의 항체 결합 특이성을 보유하는데 필요되는 가변 도메인 프레임워크 부위의 최소 부분이 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 것을 갖는 상보적인 항체 라이트 체인을 코딩하는 DNA 서열을 갖는 오페론을 포함하는 발현 벡터를 작제하고, 항체 체인의 잔여 부분은 인간 면역글로부터 유래도니 것이고, 그것에 의해 본 발명의 벡터를 생산하고;
- (c) 통상적인 기술에 의해 그 발현 벡터들을 숙주 세포로 트랜스펙트시켜 본 발명의 트랜스펙트된 숙주 세포를 생산하고; 및
- (d) 통상적인 기술에 의해 그 트랜스펙트된 세포를 배양하여 본 발명의 인간화 항체를 생산한다.

숙주 세포는 본 발명의 두 개의 벡터, 라이트 체인 유래 폴리펩타이드를 코딩하는 오페론을 포함하는 첫 번째 벡터와 헤비 체인 유래 폴리펩타이드를 코딩하는 오페론을 포함하는 두 번째 벡터들로 공동 트랜스펙트될 수 있다. 두 개의 벡터는 다른 선별 마커를 포함하고, 그러나 만약 그렇지 않으면, 항체 헤비와 라이트 체인 코딩 서열로 분리되고, 가능한한 헤비와 라이트 체인 폴리펩타이드의 동일한 발현을 하게 한다. 부가적으로, 라이트 및 헤비 체인 폴리펩타이드 모두를 코딩하는 서열을 포함하는 벡터인 단일 벡터가 이용될 수 있다. 라이트 및 헤비 체인을 위한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA 또는 양자 모두를 포함할 수 있다.

본 발명의 변형된 항체를 발현시키기 위해 사용되는 숙주 세포는 박테리아 세포, 이를 테면 E.coli, 또는 진핵생물 세포가 될 수 있다. 특히 본 목적에 잘 맞는 포유동물 세포, 이를테면 골수종 세포(myeloma cell) 또는 중국 햄스터 난소 세포가 사용될 수 있다.

본 발명의 벡터들을 작제하는 일반적인 방법들, 본 발명의 숙주 세포를 생산하는데 필요한 트랜스펙션 방법들 및 숙주세포로부터 본 발명의 항체를 생산하는데 요구되는 배양 방법들은 모두 통상적인 기술이다. 또한, 한번 생산되면, 본 발명의 인간화 항체는 하기 기재된 표준 과정에 따라 정제될 수 있다.

인간 항체 프레임워크(Human antibody framework)

좀더 바람직한 구체예에서, 본 발명은 결합원에 대한 것으로, 여기에서 결합원은 인간 항체 프레임워크에 의해 수행된다. 즉, 여기에서 항체는 인간화 항체보다 더 인간 펩타이드 서열의 좀더 큰 정도를 갖는다.

인간 단백질에 대한 직접적인 인간 mAb 항체는 쥐 면역계보다 완전한 인간 면역계를 수반하는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 생산될 수 있다. 목적 항원으로 면역화된 이들 트랜스제닉 마우스로부터의 스피레노사이트(Splenocyte)는 인간 단백질로부터의 에피토프를 위한 특이적 친화도를 갖는 인간 mAbs를 분비하는 하이브리도마를 생산하는데 이용된다(see, e.g., Wood et al. International Application WO 91/00906, Kucherlapati et al. PCT publication WO 91/10741; Lonberg et al. International Application WO 92/03918; Kay et al. International Application 92/03917; Lonberg, N. et al. 1994 Nature 368:856-859; Green, L. L. et al. 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S. L. et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggeman et al. 1993 Year Immunol 7:33-40; Tuaillon et al. 1993 PNAS 90:3720-3724; Bruggeman et al. 1991 Eur J Immunol 21:1323-1326).

그런 트랜스제닉 마우스는 Abgenix, Inc., Fremont, Calif., 및 Medarex, Inc., Annandale, N.J.로부터 입수할 수 있다. 키메라 및 생식-계열 돌연변이 마우스에 있어서 항체 헤비-체인 결합 부위(IH) 유전자의 동종접합(homozygous) 결실이 내인성 항체 생산의 완전한 억제제를 초래한다. 그런 생식-계열 돌연변이 마우스에 있어서 인간 생식-계열 면역글로불린 유전자 배열의 이전이 항원이 있을 때 인간 항체의 생산을 유발할 것이다(see, e.g., Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol.

7:33 (1993); and Duchosal et al. Nature 355:258 (1992). Human antibodies can also be derived from phage-display libraries (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Vaughan, et al., Nature Biotech 14:309 (1996)).

단편(Fragments)

본 발명의 하나의 구체예에서, 결합원은 항체의 단편이고, 바람직하게 항원 결합 단편 또는 가변 부위이다. 본 발명에 유용한 대표적인 항체 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편을 포함한다. 항체의 파파인 소화(Papain digestion)가 Fab 단편이라 불리우는, 각각 단일 항원 결합부위를 가지는 두 개의 동일한 항원 결합 단편과 잔기 "Fc" 단편을 생산하는데, 소위 그것의 결정화 능력을 위한 것이다. 펩신 처리가 교차-연결 항원이 가능한 두 개의 항원 결합 단편과 나머지 다른 단편(pFc'로 불리워짐)을 갖는 F(ab')₂ 단편을 생산한다. 추가적인 단편은 디아바디, 선형 항체, 단-사슬 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함할 수 있다.

항체 단편 Fab, Fv 및 scFv는 항체 단편이 오직 단일 항원-결합 부위를 담지한다는 점에 있어서 전체 항체와는 다르다. 두 개의 결합 부위를 가진 재조합 단편들은 여러가지 방법으로 제조되는데, 예를 들어, Fv의 V_H의 C-말단Cumber et al., 1992), 또는 scFv의 V_L의 C-말단에서(Pack and Pluckthun, 1992), 또는 Fab's의 힌지 시스템 잔기를 통해(Carter et al., 1992) 도입된 시스템 잔기의 화학적 교차-연결에 의해 제조된다.

바람직한 항체 단편은 그것의 항원 또는 수용체에 선택적으로 결합하는 항체의 몇가지 또는 필수적으로 모든 능력을 보유한다. 몇몇 바람직한 단편들은 다음과 같이 정의된다:

(1) Fab는 항체 분자의 단가 항원-결합 단편을 포함하는 단편이다. Fab 단편은 파파인 효소로 전체 항체를 완전한 라이트 체인과 하나의 헤비 체인의 부분으로 소화시켜 생산될 수 있다.

(2) Fab'는 항체 분자의 단편이며, 완전한 라이트 체인과 헤비 체인 부분을 수득하도록 전체 항체를 펩신으로 처리한 후 환원시켜 수득될 수 있다. 두 개의 Fab' 단편은 항체 분자마다 수득된다. Fab' 단편은 항체 힌지 부위로부터의 한 개이상의 시스템을 포함하는 헤비 체인 CH1 도메인의 카르복실 말단에서의 몇몇 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과는 구별된다.

(3) (Fab')₂는 연속적인 환원없이 펩신 효소로 전체 항체를 처리함으로써 수득될 수 있다. (Fab')₂는 두 개의 이황화 결합에 의해 서로 연결된 두 개의 Fab' 단편의 다이머이다.

(4) Fv는 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이 부위는 하나의 헤비 및 하나의 라이트 체인 가변 도메인이 타이트하게, 비-공유적 연합(V_H-V_L 다이머)으로 구성되어 있다. 이 구성에 있어서 각 가변 도메인의 세 개의 CDRs는 V_H-V_L 다이머의 표면상에서 항원 결합 부위를 정하기 위해 상호작용한다. 총괄적으로, 6개의 CDRs는 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 비록 전체 결합 부위에 비해 친화도 낮더라도 단일 가변 도메인조차도 항원을 인식하고 결합한다.

본 발명의 하나의 구체예에서, 항체는 라이트 체인의 가변 부위, 헤비 체인의 가변 부위를 포함하는 일반적으로 설계되는 분자로 정의되고, 유전학적으로 융합된 단일 사슬 분자로서 적절한 폴리펩타이드 링커에 의해 연결된 단일 사슬 항체("SCA")이다. 그런 단일 사슬 항체는 또한 "단일-사슬 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편으로서 언급된다. 일반적으로, Fv 폴리펩타이드는 sFv가 항원 결합을 위한 목적 구조를 형성하도록 하는 V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 더 포함한다.

본 발명에 따른 항체 단편은 당업자에게 잘 알려진 적절한 임의의 방법에 의해 생산될 수 있다. 몇가지 미생물 발현계가 활성 항체 단편을 생산하기 위해 이미 개발되었다. 예를 들어, 다양한 숙주, 이를테면 E. coli(Better et al., 1988, Skerra and Pluckthun, 1988, Carter et al., 1992), 효모(Horwitz et al., 1988), 및 사상 진균 트리코테르마 러세이(Nyyssonen et al., 1993)에서의 Fab 생산이 기재되어 있다. 이들 대체적인 시스템에서 획득되는 재조합 단백질은 상대적으로 높거나(고밀도 세포 발효에서의 E. coli의 원형질막 주위 공간으로 분비되는 Fab는 1-2 g/l이다, Carter et al., 1992), 또는 더 낮은 수준, 예를 들어 발효조의 효모에서 Fab가 약 0.1 mg/l이거나(Horwitz et al., 1988), 발효조에서 트리코테르마에 있어서 융합 단백질 CBHI-Fab의 경우 150 mg/l이고 Fab의 경우 1 mg/l이고(Nyyssonen et al., 1993), 그런 생산은 포유 동물 세포(하이브리도마, 골수종, CHO)에서의 전체 항체 생산에 비교하여 매우 값싸다.

단편은 Fab's 또는 Fv's로 생산로서 생산될 수 있으나, 추가적으로 V_H 와 V_L 가 유연한 폴리펩타이드 링커에 의해 서로서로 유전학적으로 연결될 수 있음이 보여지고, 그런 조합은 scFv로서 알려져 있다.

분리된 핵산 분자/벡터/숙주 세포

한 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 결합원의 적어도 일 부분을 코딩하는 분리된 핵산 분자에 대한 것이다. 하나의 구체예에서, 핵산 분자는 라이트 체인을 코딩하고, 다른 핵산은 헤비 체인을 코딩한다. 두 개의 핵산 분자는 분리될 수 있거나 그들은 하나의 핵산 분자로 융합될 수 있으며, 임의적으로 링커 서열에 의해 떨어져 있을 수 있다. 특히, 항체 단편과의 관계에 있어서, 핵산 분자는 전체 결합원을 코딩할 수 있다; 그러나 결합원의 디자인에 의존하여 이들은 몇몇 좀더 큰 결합원에 적절하다. 핵산 분자는 바람직하게 DNA 서열이고, 더욱 바람직하게 그것의 상류와 핵산 분자가 숙주 세포에서 배열될 때 결합원의 발현을 촉진시키는 조절 요소를 포함하는 DNA 서열이다.

따라서, 하나의 구체예에서, 본 발명은 다음으로 구성된 군에서 선택되는 폴리뉴클레오타이드에 대한 것이다:

i) 실시예 6의 뉴클레오타이드 서열로부터 선택되는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드,

서열번호 3, 4, 12 또는 13의 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 결합원을 포함하는 폴리뉴클레오타이드,

ii) 폴리뉴클레오타이드 i)에 의해 코딩되는 폴리펩타이드 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드로서, 여기에서 상기 단편은

a) ii)의 결합원에 의해 인식될 수 있는 항원을 인식할 수 있고/있거나,

b) 항원에 선택적으로 결합할 수 있는 것으로서, 여기에서 상기 항원은 ii)의 결합원에 의해 선택적으로 결합될 수 있고/있거나,

c) 서열번호 3, 4, 12 또는 13과 같은 미리결정된 서열을 포함하는 결합도메인으로서 뉴몰리신에 대하여 실질적으로 동일하거나 더 높은 결합 친화도를 갖는 것이고,

iii) 상기 i), ii), iii) 중 어느 하나에서 정의된 폴리뉴클레오타이드와 엄격한 조건하에서 혼성화되고, 상기 iii)에서 정의된 폴리펩타이드를 코딩하는 상보적인 가닥인 폴리뉴클레오타이드,

iv) i) 내지 iv)중 어느 하나에서 정의된 뉴클레오타이드 서열로 변성되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드,

및 그런 폴리뉴클레오타이드의 상보적인 가닥.

본 발명은 상기 정의된 핵산 분자를 포함하는 벡터에 대한 것으로서, 하나의 핵산당 하나의 벡터이거나 동일한 벡터내에 두 개이상의 핵산이 포함된다. 벡터는 바람직하게 핵산 분자에 의해 코딩되는 항체 발현을 조절하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

다른 측면에서, 본 발명은 상기에서 정의된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포에 대한 것이다.

또한, 본 발명은 상기 정의된 결합원을 발현하도록 설계된 세포주에 대한 것으로서, 예를 들어 쥐의 임파구의 하이브리도마인 세포주 및 불사화된 세포주이다. 세포주는 임의의 적절한 세포주일 수 있으나, 세포주 P3가 바람직하다. 다른 구체예에서, CHO 세포주가 바람직하다.

결합원의 정제

본 발명에 따른 결합원을 생산한 후에는 바람직하게 정제된다. 사용되는 정제 방법은 필수적 순도, 항체의 소스, 항체를 위한 목적 용도, 항체가 생산되는 중, 항체의 부류를 포함하는 몇가지 인자들에 의존하며, 항체가 모노클로날 항체일 경우에는 항체의 서브클래스이다.

항체를 포함하는 폴리펩타이드를 정제하는 임의의 적절한 통상적인 방법은 침전 및 컬럼 크로마토그래피를 포함하고, 이는 교차-흐름 여과(cross-flow filtration), 암모늄 설페이트 침전, 친화 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 정제 분야에서 당업자에게 잘 알려진 방법들이 이용될 수 있다.

항-면역글로불린 항체로 항체를 정제하는 방법은 단일 정제 공정 또는 연속 정제 공정이 될 수 있다. 단일 및 연속 정제 방법은 정제 분야에서 잘 알려져 있다. 단일-단계 정제 공정에 있어서, 항체는 단일 항-면역글로불린 항체에 의해 특이적으로 결합된다. 비-특이적으로 결합된 분자들은 세척 단계에서 제거되고 특이적으로 결합된 분자들은 특이적으로 용리된다. 연속 정제 공정에 있어서, 항체는 첫번째 항-면역글로불린 항체에 특이적으로 결합되고, 비-특이적으로 결합된 분자들은 세척 단계에서 제거되고, 특이적으로 결합된 분자들은 특이적으로 용리된다. 첫번째 항-면역글로불린 항체로부터의 용리액은 그때 두번째 항-면역글로불린 항체에 특이적으로 결합된다. 비-특이적으로 결합된 분자는 세척단계에서 제거되고, 특이적으로 결합된 분자들은 특이적으로 용리된다. 바람직한 구체예에서, 항체는 헤비 및 라이트 체인 불변 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 항체로 구성된 군에서 선택되는 첫번째 및 두번째 항-면역글로불린 항체에 의해 연속적으로 정제된다.

보통 사용되는 정제 방법은 친화 크로마토그래피로서, 정제되는 항체는 단백질 A, 단백질 G 또는 항-면역글로불린 항체에 의해 결합된다. 또 다른 친화 크로마토그래피 방법은 당업자에게 잘 알려진 것으로서 그것의 각각의 항원에 항체의 특이적 결합이다.

특히, 이중특이적 항체를 포함하여 다중 특이적 항체의 경우, 연속 정제 공정이 이용될 수 있으며, 여기에서 두 개이상의 가변 도메인을 포함하는 이중 특이적 항체는 첫번째 항원에 특이적으로 결합하고, 그 이후에 두번째 항체에 특이적으로 결합한다.

부가적인 구체예에 있어서, 두 개이상의 가변 부위를 포함하는 이중특이적 항체는 첫번째 정제 단계에서 항체가 첫번째 항원에 특이적으로 결합하고, 두번째 정제 단계에서 두번째 항체에 특이적으로 결합함으로써 연속 정제에 의해 정제된다.

항-면역글로불린 항체로 항체를 정제하는 방법은 단일 정제 공정이거나 연속 정제 공정일 수 있다. 단일 및 연속 정제 방법은 정제 분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 단일-단계 정제 공정에 있어서, 항체는 단일 항-면역글로불린 항체에 의해 특이적으로 결합된다. 비-특이적으로 결합된 분자들은 세척 단계에서 제거되고 특이적으로 결합된 분자들은 특이적으로 용리된다. 연속 정제 공정에 있어서, 항체는 첫번째 항-면역글로불린 항체에 특이적으로 결합되고, 비-특이적으로 결합된 분자들은 세척 단계에서 제거되고, 특이적으로 결합된 분자들은 특이적으로 용리된다. 첫번째 항-면역글로불린 항체로부터의 용리액은 그때 두번째 항-면역글로불린 항체에 특이적으로 결합된다. 비-특이적으로 결합된 분자들은 세척단계에서 제거되고, 특이적으로 결합된 분자들은 특이적으로 용리된다. 바람직한 구체예에 있어서, 항체는 헤비 및 라이트체인 불변 부위에 특이적으로 결합하는 항체로 구성된 군에서 선택되는 첫번째 및 두번째 항-면역글로불린 항체에 의해 연속적으로 정제된다. 더욱 바람직한 구체예에 있어서, 항체는 IgG의 헤비 체인 불변 부위 및 카파 및 람다의 라이트 체인 불변 부위에 특이적으로 결합하는 항체로 구성되는 군에서 선택되는 첫번째 및 두번째 항-면역글로불린 항체에 의해 연속적으로 정제된다. 좀더 바람직한 구체예에 있어서, 항-면역글로불린 항체는 카파 및 람다의 라이트 체인 불변 부위에 특이적으로 결합하는 항체로 구성된 군에서 선택된다.

진단 방법

본 발명은 또한 진단 시스템, 특히 키트 형태로 기재하는데, 이는 여기에서 기재된 진단 방법에 따라 박테리아의 존재, 바람직하게는 측정하는 것이 바람직한 것인 생물학적 샘플에서의 스트렙토코커스의 존재, 특히 스트렙토코커스 뉴모니에의 존재여부를 분석하기 위한 것이다.

진단 시스템은 적어도 한 번의 분석에서 수행되기에 충분한 양으로 본 발명에 따른 결합원 조성물을 포함하고, 바람직하게 분리되게 포장된 시약으로서, 더욱 바람직하게 사용을 위한 지시도 또한 포함한다.

생물학적 샘플은 조직, 조직 추출물, 수액 샘플 또는 체액 샘플, 이를 테면 피, 혈장 또는 혈청이 될 수 있다.

패키지는 본 발명의 결합원을 고정시킬 수 있는 고체 매트릭스 또는 물질, 이를 테면 유리, 플라스틱(예, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 또는 폴리카르보네이트), 종이, 호일 등의 사용을 의미한다. 그러므로, 예를 들어, 패키지는 계획되어 표지된 결합원 제조물의 밀리그램 정량을 포함하기 위해 사용되는 유리병(glass vial)이 될 수 있거나, 그것은 계획되어 표지된 결합원의 미생물 정량이 효과적으로 첨부된, 즉 리간드를 결합할 수 있도록 연결된 마이크로티터 플레이트 웰이 될 수 있다.

"사용을 위한 지시"는 통상적으로 시약 농도를 나타내는 실재적인 표현 또는 적어도 하나의 분석 방법 변수, 이를 테면 시약, 첨부된 샘플의 상대적인 양, 시약/샘플 첨가물을 위한 유지 시간, 온도, 버퍼 조건 등을 포함한다.

본 발명의 진단 시스템은 바람직하게 또한 미리선택된 리간드와 복합체를 이루는 결합원을 포함하는 결합 반응 복합체의 형성을 신호할 수 있는 표지 또는 지시 수단을 포함한다.

임의의 표지 또는 지시 수단은 발현된 폴리펩타이드, 또는 진단 방법에서 사용되는 파아지 입자에 연결되거나 통합될 수 있다. 그런 표지는 임상 진단 화학에서 잘 알려진 것이다.

표지 수단은 면역형광 추적에 유용한 플루오로크롬(염색)을 형성하기 위해 그것을 변형시키지 않고 항체 또는 항원에 화학적으로 결합하는 형광 표지제가 될 수 있다. 적절한 형광 표지제는 플루오로크롬, 이를 테면 FIC(fluorescein isocyanate), FITC(fluorescein isothiocyanate), DANSC(5-dimethylamine-1-naphthalenesulfonyl chloride), TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate), 리사민(lissamine), RB 200 SC(rhodamine 8200 sulphonyl chloride) 등이 있다. 면역형광분석기술의 기재는 여기에 참고자료로서 통합된 델루카(DeLuca, "Immunofluorescence Analysis", in Antibody As a Tool, Marchalonis, et al., eds., John Wiley & Sons, Ltd., pp. 189-231, 1982)에서 발견된다.

바람직한 구체예에서, 지시 그룹은 효소, 이를 테면, HRP(horseradish peroxidase), 글루코오스 산화제 등이 있다. 주된 지시 그룹이 HRP 또는 글루코오스 산화제인 경우에, 추가 시약이 수용체-리간드 복합체(면역반응체)가 형성되는 사실을 시각화하기 위해 요구된다. 그런 HRP를 위한 추가 시약은 과산화수소 및 산화 염색 전구체, 이를테면 디아미노벤지딘(diaminobenzidine)을 포함한다. 글루코오스 산화제에 유용한 추가 시약은 ABTS(2,2'-amino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-G-sulfonic acid)이다.

방사성 요소가 또한 유용한 표지 시약이 되고, 여기에서 사용된다. 대표적인 방사능표지제는 감마선 방사를 생산하는 방사성 요소이다. 그 자체로 감마선을 방사하는 요소, 이를 테면 ^{124}I , ^{125}I , ^{128}I , ^{132}I 및 ^{51}Cr 은 감마선 방사-생산 방사능 요소 지시 그룹의 한 클래스를 대표한다. 특히 ^{125}I 이 바람직하다. 유용한 표지 수단의 다른 그룹은 그 자체로 양전자를 방사하는 ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O 및 ^{13}N 와 같은 요소이다. 그렇게 방사된 양전자는 동물의 몸에서 존재하는 전자와 마주칠 때 감마선을 생산한다. 또한 베타 방사체, 이를 테면 ^{111}In 듐 또는 ^3H 이 유용하다.

표지의 연결, 즉, 폴리펩타이드 및 단백질 또는 파아지의 표지는 당분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 단백질은 배양 배지에 있는 성분으로 제공되는 방사성동위원소-함유 아미노산의 물질대사적 통합에 의해 표지될 수 있다. 예를 들어 갈프레 등(Galfre et al., Meth. Enzymol., 73:3-46, 1981)을 참조하라. 단백질 접합 또는 활성화된 기능기를 통한 커플링 기술을 특히 적용할 수 있다. 예를 들어, 우라메스 등(Aurameas, et al., Scand. J. Immunol., Vol. 8 Suppl. 7:7-23, 1978), 로드웰 등(Rodwell et al., Biotech., 3:889-894, 1984), 및 미국특허번호 4,493,795을 참조하라.

진단 시스템은 또한 특정 결합제, 바람직하게는 분리된 패키지로서 포함할 수 있다. "특정 결합제"는 본 발명의 결합원 중에 선택적으로 결합할 수 있는 분자 또는 그런 종을 함유하는 복합체이지만, 본 발명의 결합원 그 자체는 아니다. 대표적인 특정 결합제는 항체 물질, 보체 단백질 또는 그들의 단편, S. 아우레우스 단백질 A 등이다. 바람직하게 특정 결합제는 그 종이 복합체의 일부로서 존재할 때 결합원 중에 결합한다.

바람직한 구체예에서, 특정 결합제는 표지되었다. 그러나, 진단 시스템이 표지되지 않은 특정 결합제를 포함할 때, 그 결합제는 통상적으로 증폭 수단 또는 시약으로서 이용된다. 이들 구체예에서, 표지된 특정 결합제는 증폭 수단이 시약 중-함유 복합체에 결합될 때 증폭 수단에 특이적으로 결합할 수 있다.

본 발명의 진단 키트는 수액 샘플에서 미리선택된 리간의 정량 측정을 위해 "ELISA" 형식으로 이용될 수 있다. "ELISA"는 고체상에 결합된 항체 또는 항원과 샘플에 존재하는 항원의 양을 측정하고 정량하기 위한 효소-항원 또는 효소-항체 접합체를 이용하는 효소 면역 측정 분석을 의미하고, 본 방법에도 쉽게 이용될 수 있다.

그러므로, 몇몇 구체예에서, 본 발명의 결합원은 대상 진단 시스템에서 패키지를 포함하는 고체 지지체를 형성하기 위한 고체 매트릭스에 첨가될 수 있다.

시약은 통상적으로 단백질에 적용할 수 있는 첨부의 다른 모드일 지라도 수성 배지로부터 흡착에 의해 고체 매트릭스에 부착되고, 폴리펩타이드가 사용될 수 있으며 이는 당업자에게 잘 알려져 있다. 대표적인 흡착 방법은 여기에 기재되었다.

유용한 고체 매트릭스는 또한 당업계에 잘 알려져 있다. 그런 물질은 물에 불용성이고, Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, N.J.)의 세파텍스 상표로서 입수할 수 있는 교차-연결된 텍스트란; 아가로스; 북시카고 III.의 Abbott Laboratories로부터 입수할 수 있는 직경 약 1 마이크로에서 5 밀리미터인 폴리스틸렌 비즈의 비즈; 폴리비닐 클로라이드, 폴리스티렌, 교차-연결된 폴리아크릴아미드, 니트로셀룰로오스- 또는 나일론-기초 편물, 이를 테면 시트, 스트립 또는 패들; 또는 튜브, 플레이트 또는 마이크로티터 플레이트의 웰, 이를 테면 폴리스틸렌 또는 폴리비닐클로라이드로부터 제조된 것들을 포함한다.

여기 기재된 임의의 진단 시스템의 결합원 중, 표지된 특정 결합제 또는 증폭 시약은 액체 분산 또는 실질적으로 건조 분말, 예를 들어 동결건조된 형태로서 용액으로 제공될 수 있다. 지시 수단이 효소일 때, 효소의 기질은 또한 시스템의 분리된 패키지에서 제공될 수 있다. 고체 지지체, 이를 테면 그 전에 설명한 마이크로티터 플레이트 및 하나 이상의 버퍼가 이 진단 분석 시스템에서 분리된 패키지 요소로 포함될 수 있다.

진단 방법

본 발명은 또한 통상적으로 생물학적 샘플에 존재하는 스트렙토코커스, 특히 스트렙토코커스 뉴모니에의 존재, 바람직하게는 양을 측정하기 위한 다양한 분석 방법을 고려한다.

따라서, 본 발명은 다음을 포함하는 개체에서 뉴모코커스와 연관된 질병 또는 장애를 측정 또는 진단하는 방법에 대한 것이다:

- 상기 개체로부터의 생물학적 샘플을 제공하고,
- 상기 생물학적 샘플에 상기 정의된 적어도 하나의 결합원을 첨가하고,
- 상기 생물학적 샘플에 결합된 결합원을 측정하여 질병 또는 장애를 측정 또는 진단하는 것.

결합된 결합원은 샘플에서 스트렙토코커스의 양으로 직접적으로 또는 간접적으로 측정될 수 있다.

당업자는 본 발명의 결합 시약이 그것의 양이 샘플에서의 리간의 양과 관련이 있는 결합 반응생산물을 형성하는데 이용될 수 있음이 임상 진단 화학 과정에서는 잘 알려져 있는 것임을 이해할 것이다. 그러므로, 대표적인 분석 방법이 여기에 기재되어 있지만, 본 발명이 여기에 제한받지 않는다.

경쟁적 또는 비경쟁적인 다양한 이중 및 동중 프로토콜이 본 발명의 분석 방법을 수행함에 이용될 수 있다.

결합 조건은 수용체의 리간-결합 활성을 유지한다. 그러한 조건은 약 4 내지 50°C의 온도 범위, 약 5 내지 9의 pH 값 범위, 및 증류수의 이온 세기부터 이온 세기 약 1 몰랄의 염화 나트륨의 이온세기까지 다양한 이온 세기를 포함한다.

측정 단계는 면역학 분야에 잘 알려진 것처럼, 복합체 또는 결합 시약(복합체의 수용체 성분)에 대한 것이다. 그러므로, 2차 결합 시약, 이를 테면 수용체에 대한 특이적인 항체가 이용될 수 있다.

부가적으로, 복합체는 표지된 수용체 분자를 사용하여 측정될 수 있으며, 그로 인하여 표지된 복합체가 제조될 수 있다. 이 경우의 측정은 복합체에 존재하는 표지를 측정하는 것을 포함한다.

또 진단 방법은 리간드에 교차 연결되는 본 발명의 일 구체예의 결합원 조성물의 다가를 이용할 수 있으며, 그것에 의해 다중 리간드 및 폴리펩타이드의 응집을 형성하고, 침전성의 응집체를 생산한다. 이 구체예는 면역 침전의 잘 알려진 방법

과 비교된다. 이 구체예는 결합 조건 하에서 결합 첨부물을 형성하기 위하여 본 발명의 결합원 조성물을 샘플에 첨부시키는 단계, 형성된 결합 복합체를 분리하는 분리 단계로 구성된다. 통상적으로, 분리는 첨부물로부터 응집체를 제거하기 위하여 원심분리 또는 여과에 의해 성취된다. 결합 복합체의 존재는 측정되는 미리선별된 리간드의 존재를 의미한다.

약학 조성물

바람직한 측면에서, 본 발명은 여기 기재된 치료 방법을 실천하기에 유용한 약학 조성물을 고려한다. 본 발명의 약학 조성물은 여기 기재된, 활성 성분으로서 거기에 용해되거나 분산되는 적어도 한 종의 결합원과 함께 생리학적으로 관용적인 캐리어를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 약학 조성물은 치료 목적이 면역 반응을 유발하는 것이 아닌 한, 치료목적으로 인간 개체에 투여될 때에는 면역원성이 아니다.

하나의 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 적어도 하나의 결합원을 포함하는 약학 조성물에 대한 것이다. 바람직한 구체예에서, 약학 조성물은 치료 효과를 증진시키기 위하여 상기 정의된 적어도 두 개의 다른 결합원을 포함한다.

여기 사용된 것처럼, 조성물, 캐리어, 희석제 및 시약으로 언급되는 "약학적으로 허용가능한", "생리학적으로 관용적인" 및 그들의 문법적 변형의 용어는 교환적으로 이용되고, 목적하지 않는 생리적인 효과의 생산, 이를 테면 구역질(nausea), 어지럼증(dizziness), 급성위연동이상항진(gastric upset) 등 없이 인간에게 투여될 수 있는 물질을 대표한다.

거기에 용해되거나 분산되는 활성 성분을 포함하는 약학 조성물의 제조는 당업계에 잘 이해되어 있다. 통상적으로 그런 조성물은 멸균 주입가능물질로서, 액체 용액 또는 현탁액, 수성 또는 비-수성용액으로서 제조된다; 그런, 사용하기 전에 액체로서, 용액 또는 현탁액을 위해 적절한 고체 형태 또한 제조될 수 있다. 제조는 또한 유효될 수 있다.

활성 성분은 활성성분과 약학적으로 허용가능하고 용화될 수 있는 부형제와 여기에 기재된 치료 방법에서 사용되기 위한 적절한 양으로 혼합될 수 있다. 적절한 부형제는, 예를 들어, 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 그들의 조합이다. 추가로, 만약 필요하다면, 조성물은 보조 물질, 이를 테면 습윤제 또는 유효제, pH 버퍼제 등, 활성 성분의 효과를 증강시키는 보조물질 극소량을 포함할 수 있다.

본 발명의 약학 조성물은 그들의 성분의 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은 무기산, 이를 테면 염산 또는 인산, 또는 아세트산, 타르타르산, 만델린산 등과 같은 유기산과 함께 형성되는 산부가염(폴리펩타이드의 유리아미노기와 형성됨)을 포함한다. 유리 카르복실기와 함께 형성되는 염 또한 무기 염기, 이를 테면 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 철 수산화물(ferric hydroxides), 및 유기 염기, 이를 테면 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래될 수 있다.

생리학적으로 관용적인 캐리어는 당업계에 잘 알려져 있다. 대표적인 액체 캐리어는 활성성분과 물 외에 어떤 물질도 포함하지 않는 멸균 수용액이거나, 생리학적 pH 수치에서의 소듐 포스페이트, 생리적 식염수 또는 양자 모두, 이를 테면 인산염-완충된 식염수를 포함하는 멸균 수용액이다. 또한 수성 캐리어는 하나 이상의 버퍼 염, 뿐만 아니라 나트륨 및 칼륨 클로라이드, 텍스트로스, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 다른 용질을 포함할 수 있다.

액체 조성물은 또한 물이 배제된 액상을 포함한다. 그런 추가적인 액상의 대표적인 예를 글라이세린, 면실유와 같은 식물성 오일, 에틸 올레이트와 같은 유기 에스테르, 및 물-오일 에멀전이다.

약학 조성물은 본 발명의 결합원을 통상적으로 전체 약학 조성물 중량 당 항체의 적어도 0.1 중량 퍼센트의 양을 포함한다. 중량 퍼센트는 전체 조성물에 대한 항체 무게의 비율이다. 그러므로, 예를 들어, 0.1 중량 퍼센트는 전체 조성물 100g 당 항체 0.1g이다.

본 발명은 또한 본 발명의 항체를 포함하는 약제 또는 약학 조성물의 제조방법에 대한 것으로서, 스트렙토코커스, 특히 스트렙토코커스 뉴모니애와 관련된 질환 또는 장애, 이를 테면 폐렴(pneumonia), 수막염(meningitis) 및 패혈증(sepsis)에 사용되는 약제으로서, 생리학적으로 허용가능한 캐리어와 함께 상기 기재된 적어도 하나의 결합원을 첨부하는 것을 포함한다.

게다가, 본 발명은 스트렙토코커스, 특히 스트렙토코커스 뉴모니애와 관련된 질병 또는 장애, 이를 테면 폐렴, 수막염 및 패혈증의 치료를 위한 약학 조성물의 생산을 위한 상기 정의된 결합원의 용도에 대한 것이다.

약학 조성물은 항생제, 이를 테면 β -락탐, 세팔로스폴린(cephalosporin), 페니실린 및 아미노글리코시드(aminoglycosides)로부터 선택되는 항생제를 더 포함하고/하거나 면역 자극제, 이를 테면 사이토카인, 인터페론, 성장 인자, 예를 들어 GCSF 또는 GM-CSF를 더 포함하는 키트-인-파트가 될 수 있다. 그 키트-인-파트는 동시에, 연속적으로 또는 분리하여 투여되기 위해 사용될 수 있다.

게다가, 약학 조성물은 스트렙토코커스 단백질 뉴몰리신과 조합하여 본 발명에 따른 결합원을, 특히 백신으로서 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 결합원과 뉴몰리신 단백질과의 결합에 의해, 조성물 제품의 면역성 성질이 뉴몰리신 단백질 그 자체에 비하여 더 탁월한 것이 밝혀졌다. 이는 뉴몰리신 단백질이 결합원에 의해 면역계에 제시된다는 사실 때문일 것이다.

다른 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 스트렙토코커스 뉴모니아에 대한 다른 항체, 이를 테면 다른 항-뉴몰리신 항체, 예를 들어 비-용혈 항-뉴몰리신 항체와 결합된다.

본 발명에 따른 항체는 또한 국제 특허 출원 번호 PCT/DK2004/000492에서 기재된 항-PsaA 항체일 수 있다.

치료 방법

본 발명에 따른 결합원은 그들의 높은 친화도 및 특이성으로 인하여 특히 치료방법에 유용하다. 따라서, 결합원은 스트렙토코커스, 특히 스트렙토코커스 뉴모니아로 인한 질병 또는 장애, 이를 테면 폐렴, 수막염 및 패혈증에 대한 면역치료법적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 결합원과 연결하여 여기에서 이용되는 "면역치료법적으로(immunotherapeutically)" 또는 "면역치료(immunotherapy)" 용어는 치료적 투여 뿐만 아니라 예방적 투여 모두를 의미한다. 그러므로, 결합원은 질병의 가능성 및/또는 심각성을 완화시키기 위하여 위험성이 높은 환자에게 투여될 수 있고, 이미 감염된 것으로 밝혀진 환자에게 투여되거나 감염의 위험에 노출된 환자에게 투여될 수 있다.

본 발명의 결합원의 투여를 위한 1회량의 범위는 그 질병의 징후가 완화되거나 감염의 가능성이 낮아지는 정도의 목적 효과를 나타내기에는 충분히 큰 양이다. 일반적으로, 1회 투여량은 환자의 나이, 상태, 성별 및 질병의 정도에 따라 다양할 것이고, 당업자에 의해 결정될 수 있다. 1회 투여량은 임의의 합병증이 있는 경우 각 의사에 의해 조정될 수 있다.

본 발명의 치료적 유효량은 통상적으로 항체의 양으로서, 생리적으로 관용적인 조성물로 투여될 때 약 밀리리터(μl)당 0.1 마이크로그램(μg) 내지 약 100μg/ml, 바람직하게는 약 1μg/ml 내지 약 5μg/ml, 보통은 약 5μg/ml의 혈장 농도가 되기에 충분한 양이다. 달리 말하면, 1회 투여량은 0.1 mg/kg에서 약 300mg/kg, 바람직하게 약 0.2mg/kg 내지 200mg/kg, 가장 바람직하게는 약 0.5mg/kg 내지 약 20mg/kg으로 다양할 수 있으며, 매일 한번 이상 투여되거나 하루 또는 몇일 동안 투여될 수 있다.

본 발명의 결합원은 주사 또는 점진적인 주입에 의해 비경구적으로 투여될 수 있다. 비록 감염이 국부적이어서, 약학 조성물의 정맥내 투여에 의해 종종 치료되고, 다른 조직 및 전달 수단이 조직을 치료하는 것이 질병을 완화시킬 가능성이 있다면 고려된다. 그러므로, 본 발명의 항체는 비경구적으로, 이를 테면 정맥내로, 복막내로, 근육내로, 피하조직으로, 장내로(intracavity), 경피적으로(transdermally)으로 투여될 수 있고, 연동 수단에 의해 전달될 수 있다.

본 발명의 결합원을 포함하는 약학 조성물은 통상적으로 정맥내로 투여되고, 예를 들면 단위 투여량의 주사에 의해서이다. 본 발명의 약학조성물에 참고적으로 사용될 때 "단위 투여량(unit dose)" 용어는 대상에 단일 투여량으로서 적절한, 신체적으로 분리된 단위를 의미하고, 각 단위는 필요적 희석제, 즉, 캐리어 또는 베히클과 관련하여 목적 치료 효과를 나타내도록 계산된 활성 물질의 미리결정된 정량을 포함한다.

치료방법은 또한 상기 정의된 키트-인-파트의 용도를 포함할 수 있다.

수동 면역 보호(Passive immune protection)

결합원은 특히 수동 면역 보호에 유용한데, 결합원은 뉴몰리신의 활동을 무력화시킨다. 결합원은 실시예 1에 기재된 분석에서 평가될 수 있다. 그 분석의 결과는 뉴몰리신에 대한 결합원의 투여가 쥐에 있어서 S. 뉴모니아 감염시에 생존을 연장시킬 수 있으며, 수동 면역 보호를 유도함을 증명한다.

능동 면역 보호(Active immune protection)

본 발명의 항원 에피토프는 뉴몰리신에 대해 유도된 포유동물에 있어서 면역학적 반응을 자극하기 위한 백신으로 이용될 수 있으며, 포유동물은 예를 들어 쥐, 개, 고양이, 백조, 말, 소태아 등이며, 바람직하게는 인간이다. 그런 반응은 뉴몰리신 특이적 항체의 유도를 포함한다. 본 발명의 항원적 에피토프에 대해 유도된 항체는 상기 기재된 것처럼 뉴몰리신의 기능을 억제할 수 있고, S. 뉴모니아에 의해 유발된 감염을 치료 및 예방하는데 이용될 수 있다.

뉴몰리신 펩타이드

한 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 결합원에 의해 인식되는 에피토프를 포함하는 뉴몰리신 펩타이드에 대한 것이다. 바람직하게, 뉴몰리신 펩타이드, 단편 또는 유사체는 서열번호 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36에 의해 동정된 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명에 따른 뉴몰리신 펩타이드는 서열번호 11의 아미노산 1-436으로 구성되는 펩타이드이다. 또 서열번호 11의 아미노산 1-436으로 구성되는 뉴몰리신 펩타이드의 단편 또는 유사체가 포함되고, 이는 서열번호 11에 의해 동정된 뉴몰리신의 아미노산 50-436, 또는 더 바람직하게 아미노산 100-436을 포함하는 단편을 포함한다. 특정 구체예에서, 뉴몰리신 펩타이드는 서열번호 11에 의해 동정된 뉴몰리신의 아미노산 200-436 또는 300-436을 포함한다. 뉴몰리신 펩타이드의 유사체 또는 상동체는 상기 기재된 결합원에 대하여 상동적인 것으로서 정의될 수 있다.

뉴몰리신 펩타이드, 단편 또는 유사체는 서열번호 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36에 의해 동정된 아미노산 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 뉴몰리신 펩타이드는 최고 100, 이를 테면 80, 60, 40, 30, 25, 20, 15 또는 이를 테면 12 아미노산으로 구성되는 것이 바람직하다. 뉴몰리신 펩타이드는 적어도 12, 이를 테면 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80, 이를 테면 적어도 100 아미노산에 의해 구성되는 것이 바람직하다.

특정 구체예에서, 뉴몰리신 펩타이드 단편은 서열번호 27, 29, 30, 31 또는 32에 의해 동정된다.

뉴몰리신 펩타이드는 면역계를 자극할 수 있는 항원 에피토프로서 사용될 수 있다.

백신 조성물

본 발명에 따른 백신 조성물은 활성제와 함께 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 캐리어, 바람직하게 인간에게 투여하기에 허용가능한 것의 부가물에 의해, 잘 알려진 방법에 따라 제제화될 수 있다. 그런 부형제, 캐리어 및 제제화 방법의 예로는 예를 들어 레밍턴의 약학 과학(Maack Publishing Co, Easton, PA)에서 찾아볼 수 있다. 효과적 투여에 적절한 약학적으로 허용가능한 조성물을 제제화하기 위해, 그런 조성물은 본 발명에 따라 유효량의 뉴몰리신 펩타이드 또는 그것의 유사체를 포함할 것이다.

본 발명에 따른 백신 조성물은 치료적 유효량으로 개체에 투여될 수 있다. 유효량은 개체의 상태, 몸무게, 성별 및 나이 등의 요인의 다양성에 따라 달라질 것이다. 다른 요인으로는 투여 형태를 포함한다.

다음으로, 백신 조성물은 면역반응을 자극하는 것을 포함하는 치료적 용도를 위해 유용한 조성물을 포함하는 것을 의미한다.

백신 또는 면역원성 조성물을 획득하기 위하여, 뉴몰리신 펩타이드 또는 유사체 분자를 어쥬번트, 면역자극 성분 및/또는 캐리어와 같은 다양한 물질과 결합하는 것이 필요될 것이다. 어쥬번트는 특정 면역 반응을 강화시키는 백신 조성물에 포함된다.

그런 어쥬번트는 당업자에게 잘 알려진 어쥬번트 효과를 포함하는 임의의 조성물일 것이다. 예를 들어 그런 어쥬번트는 미네랄, 박테리아, 식물, 합성 또는 숙주 기원일 수 있으며, 또는 워터 에멀전에서의 오일이 될 수 있다.

어쥬번트는 다음 군에서 선택될 수 있다: $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, 실리카(silica), 알룸(alum), $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, 카올린(kaolin), 탄소(carbon), 수산화 알루미늄(aluminum hydroxide), 뮤라밀 디펩타이드(muramyl dipeptides), N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-DMP), N-아세틸-노르누라밀-L-알라닌-D-이소글루타민(CGP 11687, 또한 nor-MDP으로 언급됨), N-아세틸뮤라미놀-L-알라닌-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포틸옥시)-에틸아민(CGP 19835A, 또한 MTP-PE으로 언급됨), 2% 식염수/트윈-80.RTM. 에멀전에서의 RIBI(MPL+ TDM+ CWS), 리포폴-사카로이드(lipopoly-saccharides) 및 그것의 다양한 유도체이고, 지질 A, 프로인드 완전 어쥬번트(FCA), 프로인드 불완전 어쥬번트, 머크 어쥬번트 65, 폴리뉴클레오타이드(예

를 들어, 폴리 IC 및 폴리 AU 산), 마이코박테리움으로부터의 왁스 D, 결핵(tuberculosis), 코리네박테리움 파르툼에서 발견되는 물질, 보데텔라 펠투스시스(Bordetella pertussis) 및 브루셀라 속의 일원들, 리포솜 또는 다른 지질 에멀전, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN (US 58767 및 5,554,372을 참조), 지질 A 유도체, 콜레라톡신 유도체, HSP 유도체, LPS 유도체, 합성 펩타이드 매트릭스 또는 GMDP, 인터루킨 1 및 인터루킨 2를 포함한다.

수많은 어쥬번트들이 기재되었고 실험실 동물, 이를 테면 생쥐, 쥐 및 토끼들에서 항체 생성을 위해 사용될 수 있다. 그런 세팅에 있어서, 부작용의 관용이 주목적이 강한 항체 반응을 획득하는 것보다 훨씬 더 크다.

약학에서의 용도 및 그 용도를 위한 접근을 위해, 필수적으로 인간에서 사용되기 위하여, 어쥬번트를 포함하는 백신 조성물의 성분들이 잘 특징지어질 것이 필요하다. 그 조성물은 임의의 역반응, 이를 테면 육아종(granuloma), 고름집(abscesse) 또는 열의 위험이 최소일 것이 또한 요구된다.

더 바람직한 구체예에서, 백신 조성물은 인간 주체를 위해 투여되는 것이 적절하고, 그러므로 바람직한 어쥬번트는 인간 주체에 투여되는 것이 적절하다.

치료적 백신에 있어서 유용한 어쥬번트는 미네랄 염, 이를 테면 수산화 알루미늄(aluminium hydroxide) 및 알루미늄 또는 칼슘 포스페이트 겔, 오일 에멀전, 및 MF59 (워터 에멀전에서 오일을 안정화시키는 마이크로유동체화된 세정제), QS21 (정제된 사포닌), AS02 (SBAS2, 오일-내-워터 에멀전 + 모노-포스포릴 지질 A(MPL) + QS21), 몬타나이드 ISA 51 및 ISA-720 (오일 에멀전에서 물을 안정화시킴), 어쥬번트 65 (피넛 오일, 만나이드 모노올레이트 및 알루미늄 모노스테아레이트를 포함), RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Utah)과 같은 제형에 기초한 계면활성제, 미립자 어쥬번트, 이를 테면 비로솜(virosomes, 인플루엔자 헵마글루티닌을 통합시키는 단층 리포솜 베히클(unilamellar liposomal vehicles incorporating influenza haemagglutinin), AS04 (MPL을 갖는 AI 염), ISCOMS (사포닌과 지질(이를 테면 콜레스테롤)의 복합체로 구조됨), 폴리에타이드 코-글라이코라이드(PLG), 미생물 유도체(천연 및 합성), 이를 테면 모노포스포릴 지질 A (MPL), 데톡스(MPL + M. Phlei 세포벽 스켈레톤), AGP (RC-529 (합성 아실화된 모노사카라이드), DC_{chol} (리포솜으로 스스로 조직가능한 리포이드성 면역자극제), OM-174 (지질 A 유도체), CpG 모티프(면역자극적인 CpG 모티프를 함유하는 합성 올리고뉴클레오타이드), 비-톡신 어쥬번트 효과를 갖는 변형된 박테리아 독소, LT 및 CT, 내생적 인간 면역조절제, 예를 들어, hGM-CSF 또는 hIL-12 또는 이뮤-덱틴(C3d 직렬 분석), 금 입자와 같은 활성이 없는 베히클이 있다.

몇몇 구체예에서, 백신 조성물은 하나 이상의 추가적인 면역 자극 성분을 더 포함한다. 이들은 여기에 제한되지 않고, 뮤라밀디펩타이드(muramyl dipeptide, MDP); 예를 들어, N-아세틸-뮤라밀-L-알라닌-D-이소글루타민(ala-MDP), N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닌-D-이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸-노르-뮤라밀-L-알라닌-D-이소글루타민(CGP 11637, nor-MDP) 및 N-아세틸-뮤라밀-L-알라닌-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글라이세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민(CGP 19835A, MTP-PE), 디메틸글라이신, 터프트신(tuftsine), 및 트레할로스 디마이크로레이트, 모노포스포릴-지질 A (MPL), 및 N-포르밀-Met-Leu-Phe와 같은 트리펩타이드를 함유하는 포르밀-메티오닌을 포함한다. 그런 화합물은 시그마 화학 회사(St. Louis, MO) 및 RIBI ImmunoChem Research, Inc. (Hamilton, MT)로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

캐리어는 어쥬번트와 독립적으로 존재할 수 있다. 캐리어의 기능은 예를 들어 그들의 활성 또는 면역원성을 증가시키기 위해, 안정성을 부여하기 위해, 생물학적 활성을 증가시키기 위해, 또는 혈청 반감기를 증가시키기 위해 특히 설비된 단편의 분자량을 증가시키는 것일 수 있다. 캐리어는 당업자에게 잘 알려진 임의의 적절한 캐리어가 될 수 있다. 캐리어 단백질은 여기에 제한되지는 않지만 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet haemocyanin), 혈청 단백질, 이를 테면 트랜스페린, 소혈청 알부민, 인간 혈청 알부민, 티로글루불린 또는 오브알부민, 면역글로불린 또는 호르몬, 이를 테면 인슐린 또는 팔미트산이 될 수 있다. 인간의 면역화를 위하여, 캐리어는 인간에게 안전하게 받아들일 수 있는 생리학적으로 허용가능한 캐리어이어야만 한다. 그러나, 파상풍 독소이드 및/또는 디프테리아 독소이드는 본 발명의 일 구체예에서 적절한 캐리어이다. 부가로, 캐리어는 세파로스와 같은 텍스트란이다.

일 구체예에서, 백신 조성물은 서열번호 27, 28, 29, 30, 31 또는 32로 동정된 아미노산 서열을 포함하는 뉴몰리신 펩타이드를 포함한다. 서열번호 29, 30 또는 31에 의해 동정된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는 백신이 바람직하다. 특히 바람직한 것은 서열번호 11에 의해 동정된 뉴몰리신의 00-436, 422-436 또는 425-436 아미노산을 포함하는 펩타이드이다.

뉴몰리신 펩타이드는 최고 100, 이를 테면 80, 60, 40, 20, 15, 12, 10, 8 또는 이를 테면 6개의 아미노산에 의해 구성되는 것이 바람직하다. 뉴몰리신 펩타이드는 적어도 6개, 이를 테면 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80, 또는 이를 테면 적어

도 100 아미노산에 의해 구성되는 것이 더 바람직하다. 일 구체예에서, 백신 조성물은 서열번호 27, 28, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36에 의해 동정된 적어도 하나의 뉴몰리신 펩타이드를 포함한다. 서열번호 28, 29, 30 또는 31에 의해 동정된 펩타이드를 포함하는 백신이 바람직하다. 특히 바람직한 것은 서열번호 11에 의해 동정된 뉴몰리신의 423-438, 424-437, 425-436 또는 426-436의 아미노산으로 동정된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이다.

면역반응을 자극할 수 있는 백신 조성물이 바람직하다. 백신 조성물은 투여될 때 항체 반응을 유도할 수 있는 것이 특히 적절하다. 가장 바람직한 것은 뉴몰리신의 용해 활성을 억제할 수 있는 항체 생산을 유도함으로써, 뉴몰리신 억제 반응을 유도할 수 있는 백신이다. 다른 바람직한 구체예는 뉴몰리신의 식균작용을 강화시킬 수 있는 항체를 유도한다. 그런 항체는 여기 기재된 결합원으로서 가변 부위를 포함함으로써 특징될 수 있다.

도면의 상세한 설명

도 1. Fab 단편의 도식도

V_L , CDR1, CDR2, CDR3 과 V_H , CDR1, CDR2, CDR3로 구성된 항원 포켓을 나타낸다.

도 2. 서열번호 11을 갖는 뉴몰리신 아미노산 서열.

진뱅크 번호 X52474의 서열에 대응하는 뉴몰리신의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 3. 항-뉴몰리신의 라이트 체인 및 헤비 체인 가변 단편.

도 3A는 가변 라이트 및 헤비 체인의 일차 서열과 항체 26-5F12.1의 상보성 결정 부위를 포함한다. 도 3B는 가변 라이트 및 헤비 체인의 일차 서열과 항체 26-23C 2.2의 상보성 결정 부위를 포함한다. 도 3C는 가변 라이트 및 헤비 체인의 일차 서열과 항체 22-1C11의 상보성 결정 부위를 포함한다. 서열은 실시예 6에 기재된 것과 같이 수득하였다.

도 4. 뉴모코커스 및 항체로 접종시킨 마우스의 생존 다이어그램.

뉴모코커스 D39 단독으로 주사 또는 페니실린 및/또는 뉴몰리신 항체(26-5F12)의 조합으로 주사된 마우스의 생존을 실시예 1에 기재된 것처럼 접종 후 24시간 동안 평가하였다.

도 5. 뉴몰리신 항체의 항-용혈 활성

뉴몰리신 항체의 항-용혈 활성을 실시예 3에서 기재된 것처럼 적혈구의 뉴몰리신 매개 용해에 대한 억제 효과를 평가함으로써 분석하였다. 3개의 항체들(26-5F12, 26-23C 2 및 22-6E6)이 특히 효과적이다.

도 6. 에피토프 맵핑을 위한 펩타이드.

에피토프 맵핑을 위한 뉴몰리신의 아미노산 서열 419-446과 다양한 펩타이드 서열의 개관.

도 7. 뉴몰리신 항체 에피토프.

도 7A 및 도 7B는 항체 에피토프의 동정과 관련된 실시예 7에 기재된 것과 같이 수득된 결과를 그래프로 그린 것이다.

도 8. 26-5F12 클론의 분리

도 8A는 26-5F12 하이브리도마 세포로부터 분리한 전체 RNA를 나타낸다. 그 RNA는 헤비 체인과 라이트 체인 가변 부위의 cDNA 합성을 위해 이용되었다. PCR 산물은 도 8B에서 나타낸다. 양성 변형체를 클로닝한 후에는 콜로니 PCR을 이용하여 동정하였다(도 8C).

도 9. 26-23C2 클론의 분리

도 9A는 26-23 C2 하이브리도마 세포로부터 분리한 전체 RNA를 나타낸다. RNA는 헤비 체인과 라이트 체인 가변 부위의 cDNA 합성을 위해 사용하였다. PCR 산물은 도 9B에서 나타내었다. 양성 변형체를 클로닝한 후에는 콜로니 PCR을 이용하여 동정하였다(도 9C).

도 10. 22 1C11 클론의 분리

22 1C11 하이브리도마 세포로부터 분리한 전체 RNA는 헤비 체인과 라이트 체인 가변 부위의 cDNA 합성을 위해 사용하였다. PCR 산물은 도 10BA에서 보여진다. 양성 변형체를 클로닝한 후에는 콜로니 PCR을 이용하여 동정하였다(도 10B).

도 11. 26-5F12, 26-23C2 및 22 1C11의 CDR 서열

26-5F12, 26-23 C2 및 22 1C11의 라이트 및 헤비 체인 CDR's의 서열을 정렬하였다. 22 1C11 헤비 체인의 CDR 2 및 CDR3이 26-5F12 과 26-23의 서열로부터 갈라지는 반면에, C2 26-5F12 및 26-23C2의 헤비 체인은 거의 동일하다.

실시예

본 발명은 하기 실시예를 통해 더 자세히 설명된다; 그 실시예들은 본 발명을 제한하는 것으로서 해석되지는 않는다.

실시예 1

뉴모코커스 D39(타입 2)로 접종된 트랜스제닉 암컷 마우스의 생존에 있어서 항체와 페니실린의 효과 연구

물질

·82마리의 트랜스제닉 암컷 마우스(M-B 프로젝트 번호 #249, 프로젝트 이름 CD64, 약 8-12주된 마우스)

·0.9% 식염수 (AAS)

·PBS pH 7.4

·시린지(Syringes)

·바늘

·5% 블러드 플레이트(blood plates)

·여과된 소태아 브루스

·페니실린이 첨가된 용매

·페니실린 1 밀리온 IU (Løven D6726), 10 mg/마우스 ~40 mg/ml

균주: 뉴모코커스 D39 (타입 2) (F1/S1/Æ2)

항체:

PdB26-5F12.1, 1.0 mg/ml 040520

OmpA6-4B6.1, 1.38 mg/ml

방법:

-24 시간: 뉴모코커스 균주는 3×5% 블러드 플레이트상에 씨딩하고 35℃/CO₂에서 배양하였다.

0 시간: 뉴모코커스 균주는 여과된 브루스로 108 CFU/ml (cf. MU/F074-01)이 되도록 현탁시키고 2×10^5 CFU/ml (59.88 ml의 PBS에서 120 μ l 10^8 CFU/ml)이 되도록 희석하였다.

항체는 200 μ g/ml로 희석하였다:

3.00 ml의 PdB26-5F12.1 + 12.00 ml의 PBS

2.17 ml의 OmpA6-4B6.1 + 12.83 ml의 PBS

마우스는 박테리아(0.5 ml i.p.)와 항체(0.5 ml i.p.)로 처리하였다.

18 시간: 페니실린: 1 앰플은 페니실린 ~200 mg/ml이 첨가된 3ml 용매에서 희석하였다; 또 희석: 3 ml “200 mg/ml” + 12.00 ml의 식염수 ~40 mg/ml.

항체는 200 μ g/ml로 희석하였다:

3.00 ml의 PdB26-5F12.1 + 12.00 ml의 PBS

2.17 ml의 OmpA6-4B6.1 + 12.83 ml의 PBS

마우스는 페니실린(0.25 ml s.c.) 및 항체(0.5 ml i.p.)로 처리하였다.

48시간: 페니실린: 1 앰플은 페니실린 ~200 mg/ml가 첨가된 3ml의 용매로 희석하였다; 또 희석: 3 ml “200 mg/ml” + 12.00 ml의 식염수 ~40 mg/ml.

마우스는 페니실린(0.25 ml s.c.)으로 처리되었다.

	Cage no.	No. of mice	0 hours	18 hours	48 hours
Grp 1	1	5	Bacteria + 5F12.1	5F12.1 + PEN	PEN
	2	5			
	3	4			
Grp 2	4	5	Bacteria + 5F12.1	5F12.1	
	5	5			
	6	4			
Grp 3	7	5	Bacteria + 6-4B6	6-4B6 + PEN	PEN
	8	5			
	9	4			
Grp 4	10	5	Bacteria + 6-4B6	6-4B6	
	11	5			
	12	4			
Grp 5	13	5	Bacteria	PEN	PEN
	14	5			
	15	3			
Grp 6	16	5	Bacteria		
	17	5			
	18	3			

실험을 지속시키기 위해 다음 날의 오전 및 오후: 마우스들은 스케일 1-4에 따라 점수를 매겼다.

inoculate	undiluted	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	CFU/ml
Pn. D39	∞	∞	i.t.	12/20	4/2		8.0×10^5

결과

마우스의 생존은 24시간에 평가되었다. 26-5F12.1을 이용하여 수행한 실험의 결과는 도 4에서 요약되었으며, 24시간에 생존이 증가함을 보여준다.

실시예 2

배양 상청액의 항체에서의 항-용혈 성질의 측정

설명:

뉴몰리신에 대한 항체는 뉴몰리신의 용해 효과를 억제할 수 있다. 용해 효과는 혈청의 존재하에서 파괴되어, 항체에 결합하고 항-용혈 분석 수행 전에 세척에 의해 혈청을 제거하는 것이 필수적이다.

장비:

배양기 37℃

피펫

원심분리사

ELISA 리더, BIO-TEK EL 800

디지털 카메라, Canon Powershot S20

물질:

팁스(Tips)

시약 접시(Reagent tray)

플레이트 커버

96-웰 마이크로웰 플레이트(Nunc 260836 - 플랫 바닥)

리액티-결합 단백질 G 코팅된 마이크로웰 스트립(Reacti-Bind Protein G coated microwell strips), Pierce no. 15133

시약:

Rec. PdB, PBS w.10 mM DTT에서 4 µg/ml로 희석

DTT(Dithiothreitol)

PBS, pH 7.4

Dem. H₂O

Alsever's Fluid에서의 양 적혈구 50%, SSI no. 29431

비표:

PBS pH 7.4

0.05% 트윈 20을 갖는 PBS pH 7.4

대조구:

캐칭:

음성: 0.05% 트윈 20을 갖는 PBS pH 7.4

용혈: 0.05% 트윈 20을 갖는 PBS pH 7.4

높은 양성: PBS에서 10 µg/ml로 희석시킨 PdB22-6E6

낮은 양성: PBS에서 2 µg/ml로 희석시킨PdB22-6E6

샘플:

샘플들은 1-5 µg/ml로 예상되는 항체 농도를 갖는 희석되지 않는 배양 상청액이다.

과정:

스트립은 PBS/0.05% 트윈에서 3회 세척하였다. PBS/0.05%Tw20의 50 µl/well을 첨가하고, 희석되지 않는 배양 상청액 50 µl/well 또는 대조구 50 µl/well을 첨가하였다. 실온에서 1시간 배양하였다. PBS(트윈 20 불포함)으로 4회 세척하였다. 50 µl의 PBS가 각 웰에 첨가되고, A1-B1는 100 µl/well 첨가되었다. 재조합 PdB는 미리-가열된 PBS에서 4 µg/ml로 희석하고, 10 mM DTT로 37℃에서 15분 동안 활성화시켰다. 활성화된 PdB의 50 µl/well 첨가하고, A1-B1의 경우엔 제외하였다. 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 양 적혈구는 PBS로 3회 세척하고, PBS에서 2% vol/vol으로 재현탁시켰다. 각 웰에 50 µl을 첨가하고 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 플레이트를 1000×g에서 5분 동안 원심분리하였다. 그 플레이트의 디지털 이미지를 수득하였다. 플랫-바닥의 마이크로 웰에 100µl의 상청액을 조심스럽게 트랜스퍼하고 OD를 405 nm에서 읽었다.

스트립 번호	1	2	3	4
A	음성	샘플 1	샘플 5	샘플 9
B	음성	샘플 1	샘플 5	샘플 9
C	용혈	샘플 2	샘플 6	샘플 10
D	용혈	샘플 2	샘플 6	샘플 10
E	높은 양성	샘플 3	샘플 7	샘플 11
F	높은 양성	샘플 3	샘플 7	샘플 11
G	낮은 양성	샘플 4	샘플 8	샘플 12
H	낮은 양성	샘플 4	샘플 8	샘플 12

실시예 3

뉴몰리신의 용혈 활성을 억제하는 항체 능력의 측정

설명:

뉴몰리신에 대한 정제된 항체는 적혈구에서 보여지는 용해 효과를 억제할 수 있고, 이는 항체 스크리닝을 위한 기능적 분석을 대표한다.

장비:

배양기 37℃

피펫

원심분리기

엘리사 리더, BIO-TEK EL 800

디지털 카메라, Canon Powershot S20

물질:

팁스

시약 접시

플레이트 커버

96-웰 마이크로웰 플레이트(Nunc 260170 - U-shaped)

96-웰 마이크로웰 플레이트(Nunc 260836 - flat bottom)

시약:

Rec. 뉴몰리신(PLY) 또는 Rec. 뉴몰리소이드(PdB)

PBS에서 10 µg/ml으로 희석된 PdB Lot #P01103 0.2 mg/ml

DTT(Dithiothreitol)

PBS, pH 7.4

Dem. H₂O

Alsever's Fluid에서 양 적혈구 50%, SSI no.29431

버퍼:

PBS pH 7.4

10mM DTT을 갖는 PBS

샘플:

정제된 항체 샘플들은 PBS에서 희석되었다.

과정:

용혈 중점 결정:

PLY 또는 PdB의 각 새로운 배치에서 결정된다. 모든 샘플들은 3배로 수행되었다. 대조군들은 :

공백(Blank): 100 μ l 버퍼 (0% 용혈)

전체: 100 μ l Dem. H₂O (100% 용혈)

PLY/PdB의 희석 시리즈는 PBS w. 10 mM DTT에서 준비하였다: 40-20-10-5-2,5-1,25-0,625-0,3125 μ g/ml. 각 웰에 100 μ l을 첨가하고 37°C에서 15분 동안 배양하였다. 양 적혈구(50%)는 PBS로 세번 세척되고 2% vol/vol으로 복구하였다. 각 웰에 50 μ l을 첨가하고 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 1000 $\times$ g에서 5분 동안 원심분리하였다. 그 플레이트의 디지털 이미지를 수득하였다.

100 μ l 상청액을 플랫 바닥 마이크로웰 플레이트로 트랜스퍼하고 405nm에서 읽었다. 90%의 용혈을 발생하는 뉴몰리신 농도의 두배가 억제 분석에서 표준 농도로 이용되었다.

억제 분석:

모든 테스트들은 두번 라운드-바텀 마이크로웰 플레이트에서 수행되었다.

대조구들은:

공백(Blank)= 100 μ l PBS

총 용혈 = 100 μ l dem. H₂O

음성 = 50 μ l 뉴몰리신 + 50 μ l PBS

뉴몰리신: 20 μ g/ml = 1 μ g/well으로 희석시킨 PdB 031201 0.5 mg/ml을 채웠다.

PLY/PdB는 미리 가열된 PBF로 희석되고 10mM DTT(최종 농도)로 37°C에서 15분 동안 활성화시켰다. 50 μ l 항체 희석액이 각 웰에 첨가되고 활성화된 PLY/PdB의 50 μ l을 첨가하였다. 그 플레이트는 37°C에서 30분 동안 배양시켰다. 양 피는 PBS로 세번 세척하고 2% vol/vol으로 복구되었다. 각 웰에 50 μ l을 첨가하고 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 1000 $\times$ g에서 5분 동안 원심분리하였다. 그 플레이트의 디지털 이미지를 수득하였다. 상청액의 100 μ l을 두번째 플랫 바텀 마이크로웰 플레이트(플레이트 2)에 트랜스퍼하고 405 nm(예는 표 1에서 보여진 것이다)에서 읽었다. 역가는 50% 용혈을 억제하는 항체 희석액으로 결정하고 하기 표 4에 포함되었다.

샘플:

모든 정제된 항체들은 PBS에서 500 μ g/ml로 희석시켰다.

S1= Ra-a-뉴몰리신

S2= OmpA17-10C7 031024

S3= 22-6E6.5 040224

S4= 26-5F12.1 040520

S5= 26-23C2.2 040319

S6= 26-18G8.2 040319

S7= 26-30H10.2 040319

S8= 28-10E7.2 040514

S9= 26-14G4 040305

S10= 13-2E12.1 031105

S11= 22-1C11.1 031211

플레이트 구성

플레이트 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
A	Blank	500 µg/ml										
B	Blank	100 µg/ml										
C	Total	20 µg/ml										
D	Total	4 µg/ml										
E	Negative	800 ng/ml										
F	Negative	160 ng/ml										
G		32 ng/ml										
H		6 ng/ml										

플레이트 2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
A	Blank	500 µg/ml										
B	Blank	100 µg/ml										
C	Total	20 µg/ml										
D	Total	4 µg/ml										
E	Negative	800 ng/ml										
F	Negative	160 ng/ml										
G		32 ng/ml										
H		6 ng/ml										

샘플 1 내지 11과 관련된 데이터는 하기 표에서 보여진다.

[표 1]

405nm에서의 OD

Blank	0,05										
Total	1,15										
Negative	1,18										
Sample no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Antibody, ng/ml	Ra-a-Pneumolysi	OmpA17-10C7	22-6E6.5	26-5F12.1	26-23C2.2	26-18G8.2	26-30H10.2	28-10E7.2	26-14G4	13-2E12.1	22-1C11.1
500000	1,15	1,23	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	1,17	1,23
100000	1,15	1,16	0,08	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	1,11	1,18
20000	1,14	1,17	0,06	0,05	0,04	0,04	0,05	0,07	0,05	1,13	1,16
4000	1,14	1,16	0,04	0,06	0,04	0,14	0,04	0,68	0,12	1,12	1,15
800	1,14	1,17	0,09	0,09	0,06	0,92	0,11	1,03	0,70	1,13	1,15
160	1,11	1,17	0,13	0,09	0,06	1,09	1,06	1,11	1,15	1,12	1,14
32	1,11	1,13	1,09	1,13	1,08	1,15	1,12	1,14	1,14	1,13	1,16
6	1,14	1,16	1,15	1,15	1,13	1,14	1,12	1,17	1,19	1,14	1,16

용혈 %는 수득된 데이터(표 1)로부터 계산되고 그 결과는 하기 표 2에서 보여진다.

[표 2]

용혈 %

	Ra-a-PdB	Dummy	22-6E6.5	26-5F12.1	26-23C2.2	26-18G8.2	26-30H10.2	28-10E7.2	26-14G4	13-2E12.1	22-1C11.1
6	96	98	97	97	96	96	95	99	100	96	98
32	94	96	92	95	91	97	95	96	96	96	98
160	94	99	11	8	5	92	90	94	97	95	96
800	96	99	7	8	5	78	9	87	59	95	98
4000	97	98	4	5	3	12	4	58	10	95	97
20000	96	99	5	4	4	3	5	6	4	95	98
100000	98	98	7	4	4	4	4	4	5	94	99
500000	97	104	4	5	4	4	5	4	5	99	104

억제 %는 수득된 데이터(표 2)로부터 계산되고 그 결과는 하기 표 3에서 보여진다.

[표 3]

용혈의 억제 %

	Ra-a-PdB	Dummy	22-6E6.5	26-5F12.1	26-23C2.2	26-18G8.2	26-30H10.2	28-10E7.2	26-14G4	13-2E12.1	22-1C11.1
6	3,9	1,7	2,8	3,0	4,1	3,7	5,2	1,3	-0,4	3,7	1,9
32	5,8	4,2	7,6	4,8	8,9	2,7	5,1	4,0	3,6	4,4	2,1
160	5,9	1,3	89,1	92,5	95,1	7,7	10,1	5,8	3,0	5,4	3,6
800	3,6	1,3	92,5	92,1	94,7	21,9	90,9	13,0	40,9	4,6	2,5
4000	3,3	2,0	96,3	95,1	96,8	88,0	96,4	42,3	90,0	5,2	2,6
20000	4,1	0,7	94,7	96,1	96,4	96,6	95,5	94,3	95,9	4,6	1,9
100000	2,5	1,7	92,9	96,1	96,1	96,2	96,2	95,7	95,4	6,3	0,7
500000	3,0	-3,7	95,5	95,4	95,5	95,7	95,4	95,5	95,2	0,9	-4,0

그 결과의 그래픽 도해는 도 5에서 나타난다.

항체의 역가는 상기 나타난 데이터에 기초하여 결정되었고 이는 하기 표 4에서 요약하였다.

[표 4]

선택된 항체의 역가

Mab 0,5 μ g/ml	항 용혈 활성 ED50, ng/ml
17-10C7.1	>500
22-6E6.5	<0.100
26-5F12.1	<0.100
26-23C2.2	<0.100
13-2E12.1	>500
22-1C11.1	>500
27-11A8	>500
28-10E7.2	>500

실시예 4

항-뉴몰리신 HuMabs의 친화도 특징

항체항원결합력 측정은 항원이 코팅된 표면에서 mAbs의 한 농도를 흘림으로써 수행하였다.

방법 및 물질:

칩 상에 코팅된 물질: 단백질-G 칩 타입: CM5. 칩은 2003년 9월 16일자에 준비하였다.

코팅 밀도: FC1 & 3 = blank, FC2= 6286 RUs, FC4 = 6700RUs

코팅 농도: 단백질 농도 = 5 μ g/mL, 희석 버퍼 = 소듐 아세테이트, pH = 4.5

런닝 버퍼: HBS-EP.

시약:

항체(정제됨):

1. 4E8 0.94 mg/mL
2. 22-6E6 2.50 mg/mL
3. 26-23C2 3.40 mg/mL
4. 26-5F12 1.26 mg/mL
5. 22-1C11 5.80 mg/mL
6. 13-2E12 1.03 mg/mL
7. 10-3G7.2 1.10 mg/mL
8. 10-5G3.3 0.82 mg/mL
9. 10-14A5.2 0.91 mg/mL
10. 10-5G3.2 1.14 mg/mL

항원: 0.6 mg/mL, 57kDa (전장 w/ His-tag)

실험 조건:

캡처 (Ab) 농도: 20ug/mL 농도, 200 uL @ 50 uL/min 흐름 속도

결합 시간: 4분.

분리 시간: 20분.

칩의 재생성: 50mM NaOH + 75 NaCl @ 75uL/min 흐름 속도의 17uL의 한번 적용량

결과:

이 실험으로부터 최적 친화도 및 속도 상수는 하기 표 1에 목록되었다. 결합과 분리의 첫번째 몇 초는 친화도와 속도 상수를 획득하기 위해 1:1 랑그뮈르 모델(Langmuir model)로 맞추어졌다.

Sample ID	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	$K_{on} \times 10^5$ (1/Ms)	$K_{off} \times 10^{-4}$ (1/s)
4E8	0.22	11.6	2.5
22-6E6	0.31	13	4.0
26-23C2	0.69	5.2	3.6
26-5F12	0.82	5.3	4.3
22-1C11	11.7	0.62	0.7
13-2E12	24.7	1.24	3.1
10-3G7.2	0.66	0.95	30.6
10-5G3.3	1.1	0.39	0.44
10-14A5.2	28.7	0.71	20.3
10-5G3.2	0.66	0.41	0.27

표 1. 뉴몰리신 항체의 친화도와 속도 상수

실시예 5

항-CD64 × 항-뉴몰리신 5-9A7 이중 특이적 항체의 생성

HuMAbs, 항-CD64 (88.53), 및 항-뉴몰리신의 각각의 $F(ab')_2$ 단편을 펩신 소화에 의해 생성하고 슈퍼텍스 200 겔 여과 크로마토그래피에 의해 균질하게 정제하였다. 크기 배제 HPLC를 수행하고, $F(ab')_2$ 단편 모두의 분석 타입은 >95% 순수하다.

88.53의 Fab' 단편은 MEA(mercaptoethanolamine)로 $F(ab')_2$ 단편의 헤피 체인 사이의 이황화 결합을 조심스럽게 환원시켜 생성하였다. 정확한 환원 조건은 소규모 실험에서의 접합 전에 결정하였다. 크기 배제 HPLC를 수행하고, 88.53 Fab'의 이 타입 분석은 >90%이 순수하다.

88.53의 Fab' 단편은 G-25 컬럼 크로마토그래피에 의해 유리 MEA로부터 분리하였다. Fab' 단편은 DTNB로 배양하여 Fab-TNB 접합체를 생성하였다.

항-뉴몰리신 항체의 Fab' 단편은 MEA(mercaptoethanolamine)로 $F(ab')_2$ 단편의 헤피 체인 사이의 이황화 결합을 조심스럽게 환원시켜 생성하였다. 정확한 환원 조건은 소규모 실험에서의 접합 전에 결정하였다. 크기 배제 HPLC를 수행하고, Fab' 단편의 이 타입 분석은 >90% 순수하다.

Fab' 단편은 G-25 컬럼 크로마토그래피에 의해 유리 MEA로부터 분리하고 88.53 Fab-TNB와 1:1 몰랄 비율로 실온에서 하룻밤 동안 혼합하였다.

이중 특이적 항체는 슈퍼텍스 200 크리 배제 크로마토그래피에 의해 Fab' 분자를 오염시키는 것으로부터 정제하고, 정제된 분자는 HPLC로 분석하였다.

대조구로서, 항-CD64 × 항-CD89 이중 특이적 항체를 생성하였다. HuMAbs, 항-CD64 (88.53), 및 항-CD89 (14A8)의 각각의 F(ab')₂ 단편들은 펩신 소화로 생성하고, 슈퍼텍스 200 겔 여과 크로마토그래피에 의해 균질하게 정제하였다. 크기 배제 HPLC를 수행하고, F(ab')₂ 단편들의 모두의 이 타입 분석은 >95% 순수하다.

88.53 의 Fab' 단편은 MEA(mercaptoethanolamine)로 F(ab')₂ 단편의 헤피 체인 사이의 이황화 결합을 조심스럽게 환원시켜 생성하였다. 정확한 환원 조건은 소규모 실험에서의 접합 전에 결정하였다. 크기 배제 HPLC를 수행하고, 88.53 Fab 분석의 이 타입은 >90% 순수이다.

88.53 의 Fba' 단편은 G-25 컬럼 크로마토그래피에 의해 유리 MEA로부터 분리하였다. Fab' 단편은 DTNB 16a 및 16b로 배양하여 Fab-TNB 접합체를 생성하였다.

14A8의 Fab' 단편은 MEA(mercaptoethanolamine)로 F(ab')₂ 단편의 헤피 체인 사이의 이황화 결합을 조심스럽게 환원시켜 생성하였다. 정확한 환원 조건은 소규모 실험에서의 접합 전에 결정하였다. 크기 배제 HPLC를 수행하고, 14A8 Fab' 분석의 이 타입은 >90% 순수이다.

14A8의 Fab' 단편은 G-25 컬럼 크로마토그래피에 의해 유리 MEA로부터 분리하고, 88.53 Fab-TNB과 1:1 몰랄 비율로 실온에서 하룻밤 동안 혼합하였다.

이중 특이적 항체는 슈퍼텍스 200 크기 배제 크로마토그래피에 의해 Fab' 분자를 오염시키는 것으로부터 정제하고, 정제된 분자는 HPLC 분석 하였다. 88.53 x 14A8 이중 특이적 항체는 거의 균질하게 정제되었다.

항-CD64 × 항-뉴몰리신 이중 특이적 항체의 결합 특이성의 특징 - 이중 특이적 ELISA

1. 엘리사 플레이트는 재조합 뉴몰리신, 50 μ l/ml, 5 μ l/ml으로 코팅하고, 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다.
2. 그 플레이트는 PBS에서 5% BSA로 차단하였다.
3. 이중 특이적 항체의 적정을 플레이트에 첨가하였다. 대조구는 항-CD64×항-CD89 이중 특이적(대조구 이중특이적)과 항-CD64 Ab, 88.53 또는 항-뉴몰리신 항체의 F(ab')₂ 단편을 포함한다.
4. 그 플레이트는 그 때 인간 IgM의 Fc 부분에 연결된 용해성 CD64로 구성되는 융합 단백질을 포함하는 상청액으로 배양하였다.
5. 그 플레이트는 최종적으로 알칼린 포스페이트 표지도니 염소 항-인간 IgM 항체로 배양하였다. 양성 웰은 알칼린 포스페이트 기질로 측정되었다.

항-CD64×항-뉴몰리신 이중 특이적 항체의 결합 특이성 특징- 인간 CD64-트랜스제닉 마우스 상의 CD64에의 결합

CD64 트랜스제닉 마우스 또는 비-트랜스제닉 리터메이트(littermate)로부터 혈액을 취하여 88.53×항-뉴몰리신 이중 특이적 항체로 30 μ l/ml의 농도로 30분 동안 실온에서 배양하였다. 그 혈액은 세척하여 FITC 표지된 항-인간 IgG 항체로 30분 동안 실온에서 배양하였다. 적혈구는 용해되고 잔여 백혈구는 플로우 사이토메트리에 의해 염색으로 분석하였다. 임파구, 단핵세포 및 중성구 집단에 대응하는 부위는 게이트되고 각각 분석되었다.

인간 CD64는 단핵세포 상에서 발현되고, 더 좁은 범위에서, CD64 트랜스제닉 마우스의 중성구에서 발현되었다. 인간에서 처럼, CD64는 트랜스제닉 마우스의 임파구에 의해 발현되지 않는다. 이중 특이적 항체는 CD64 트랜스제닉 단핵세포 및 중성구에 결합하지만, 비-트랜스제닉 마우스로부터 유래된 임의의 세포에는 결합하지 않는다.

실시예 6

모노클로날 항체의 시퀀싱

본 발명에 따른 DNA 코딩 항체는 항체 26-5F12.1를 위해 하기 기재된 것처럼 시퀀싱된다.

총 RNA는 STAT60 시약(BioGenesis)을 이용하여 하이브리도마 세포로부터 분리되고, PCR에서의 주형으로서 이용되기 위해 cDNA로 전환된다. 아가로스 겔 분석은 펠릿으로부터 추출된 RNA의 고수율을 보여주었다(도 8A).

cDNA는 RNA로부터 만들어졌다. 헤비 체인과 라이트 체인 가변 부위는 Amersham Biosciences로부터의 헤비 프라이머 및 라이트 프라이머 믹스를 이용하여 증폭되었다. PCR 산물은 트리스-아세트레이트-EDTA 아가로스 겔 상에서 분석되었다. cDNA상의 이들 프라이머를 이용한 PCR은 도 8B에서 보여지는 밴드를 주었다.

PCR 산물의 직접적인 클로닝은 약학 형질전환 효율성을 주어, PCR 산물은 겔 정제되고 클론되었다. PCR에서의 양성 샘플들은 TOPO TA 클로닝 키트(Invitrogen)에서의 pCR4-TOPO 벡터로 클로닝되었다.

정제된 V_L 및 V_H PCR 산물들은 시퀀싱 벡터로 클론되고, 양성 형질전환체는 콜로니 PCR에 의해 측정되었다(도 8C).

모든 양성 클론들을 각 체인을 위해 수집하고(보통 3개) 모든 순방향 및 역방향 시퀀싱 프라이머로 시퀀싱되었다. 그 클론들은 BigDye V3.1 DNA 시퀀싱 키트(Applied Biosystems)로 디데옥시법(dideoxy method)에 의해 시퀀싱되었다.

모노클로날 항체 26-5F 12.1의 가변 헤비 체인을 위한 5개의 정확한 클론 및 가변 라이트 체인을 위한 7개의 클론을 동정한 시퀀싱 분석. 이들 클론 각각의 DNA와 단백질 서열은 하기에서 보여진다.

모노클로날 항체 26-5F 12.1 시퀀싱 결과

26-5F 12.1 V_H 클론 4 DNA 서열

AGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-5F 12.1 V_H 클론 4 단백질 서열

VQLQESGAEVKKPGASVKVSCITASGYIFTSYAIIHWVRQAPGQRLEW **Met** GWINA
GYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY **Met** ELSSLRSEDTAVYYCARRGQQQLAF
DYWGQGTTTVTVSS

26-5F 12.1 V_H 클론 3 DNA 서열

AGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-5F 12.1 V_H 클론 3 단백질 서열

VKLQESGAEVKKPGASVKVSCITASGYIFTSYAIIHWVRQAPGQRLEW **Met** GWINA
GYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY **Met** ELSSLRSEDTAVYYCARRGQQQLAF
DYWGQGTTTVTVSS

26-5F 12.1 V_H 클론 6 DNA 서열

AGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-5F 12.1 V_H 클론 6 단백질 서열

VKLQQSGAEVKKPGASVKVSCITASGYIFTSYAIIHWVRQAPGQRLEW **Met** GWINA
GYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY **Met** ELSSLRSEDTAVYYCARRGQQQLAF
DYWGQGTTTVTVSS

26-5F 12.1 V_H 클론 15 DNA 서열

AGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-5F 12.1 V_H 클론 15 단백질 서열

VKLQQSGAEVKKPGASVKVSCITASGYIFTSYAIHWVRQAPGQRLEW **Met** GWINA
GYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY **Met** ELSSLRSEDTAVYYCARRGQQLAF
DYWGQGTTT V T V S

26-5F 12.1 V_H 클론 10 DNA 서열

AGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-5F 12.1 V_H 클론 10 단백질 서열

VKLQESGAEVKKPGASVKVSCITASGYIFTSYAIHWVRQAPGQRLEW **Met** GWINA
GYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY **Met** ELSSLRSEDTAVYYCARRGQQLAF
DYWGQGTTT V T V S S

26-5F 12.1 V_L 클론 2 DNA 서열

GACATCCAGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTC

26-5F 12.1 V_L 클론 2 단백질 서열

DIQ **Met** TQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGAS
SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKLEIK
R

26-5F 12.1 V_L 클론 3 DNA 서열

GACATCCAGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTC

26-5F 12.1 V_L 클론 3 단백질 서열

DIQ **Met** TQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGAS
SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKLEIK
R

26-5F 12.1 V_L 클론 4 DNA 서열

GACATCCAGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTC

26-5F 12.1 V_L 클론 4 단백질 서열

DIQ **Met** TQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGAS
SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKLEIK
R

26-5F 12.1 V_L 클론 5 DNA 서열

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTC

26-5F 12.1 V_L 클론 5 단백질 서열

DIQ **Met** T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S
S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P F T F G P G T K L E I K
R

26-5F 12.1 V_L 클론 6 DNA 서열

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTC

26-5F 12.1 V_L 클론 6 단백질 서열

DIQ **Met** T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S
S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P F T F G P G T K L E I K
R

26-5F 12.1 V_L 클론 10 DNA 서열

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTC

26-5F 12.1 V_L 클론 10 단백질 서열

DIQ **Met** T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S
S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P F T F G P G T K L E I K
R

26-5F 12.1 V_L 클론 12 DNA 서열

GACATCCAGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTC

26-5F 12.1 V_L 클론 12 단백질 서열

DIQ **Met** T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S
S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P F T F G P G T K L E I K
R

모노클로날 항체 26-5F 12.1 일치 서열

V_H 일치 단백질 서열

V K L Q E S G A E V K K P G A S V K V S C T A S G Y I F T S Y A I H W V R Q A P G Q R L E W **Met** G W I N A
G Y G N T K Y S Q K F Q G R V S I T R D K S A S T A Y **Met** E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R G Q Q L A F
D Y W G Q G T T V T V S S

V_L 일치 단백질 서열

DIQ **Met** T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S
S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P F T F G P G T K L E I K
R

26-5F 12.1의 가변 라이트 및 헤비 체인의 서열은 도 3A에서 보여지고, CDRs의 서열 또한 포함되어 있다.

모노클로날 항체 26-23 C2.2 시퀀싱 분석

RNA는 상기 기재된 것처럼 고수율로 추출되었다(도 9A).

cDNA는 RNA로부터 생성되었다. V_L 부위를 증폭시키기 위해 준비하였던 초기 PCR 반응은 성공적이지 못했다. 새로운 프라이머를 분리된 반응에서 V_H 및 V_L 을 증폭하기 위해 주문하였다. 오리지널 cDNA상에서 이들 프라이머를 이용한 PCR은 도 9B에서 보여진 V_H 및 V_L 밴드를 보여주었다.

정제된 V_H 및 V_L PCR 산물은 시퀀싱 벡터로 클론되었고 양성 형질전환체는 콜로니 PCR에 의해 측정되었다(도 9C).

V_H 및 V_L 클론은 선택하고 시퀀싱하였다. 5개의 V_H 클론과 3개의 V_L 클론의 서열은 하기에서 보여진다.

모노클로날 항체 26-23 C2.2 시퀀싱 결과

26-23 C2.2 V_H 클론 1 DNA 서열

AGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-23 C2.2 V_H 클론 1 아미노산 서열

VKLQESGAEVKKPGASVKVSC TASGYIFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY
GQGTTVTVSS

26-23 C2.2 V_H 클론 2 DNA 서열

AGGTGAAACTGCAGCTGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-23 C2.2 V_H 클론 2 아미노산 서열

VKLQLSGAEVKKPGASVKVSC TASGYIFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY
GQGTTVNVSS

26-23 C2.2 V_H 클론 3 DNA 서열

AGGTCAAACCTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-23 C2.2 V_H 클론 3 아미노산 서열

VKLQESGAEVKKPGASVKVSC TASGYIFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY
GQGTTVTVSS

26-23 C2.2 V_H 클론 4 DNA 서열

AGCTCAAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-23 C2.2 V_H 클론 4 아미노산 서열

LKLQESGAIEVKKPGASVKVSTASGYIFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY
GQGT TVTVSS

26-23 C2.2 V_H 클론 5 DNA 서열

AGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

26-23 C2.2 V_H 클론 5 아미노산 서열

VQLQESGAIEVKKPGASVKVSTASGYIFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY

26-23C 2.2 V_L 클론 2 DNA 서열

GACATCCGGGTGACCCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATACAGGGCCAGCA

26-23C 2.2 V_L 클론 2 단백질 서열

DIRVTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYTHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE

26-23C 2.2 V_L 클론 3 DNA 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATACAGGGCCAGCA

26-23C 2.2 V_L 클론 3 단백질 서열

DIQMTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE

26-23C 2.2 V_L 클론 4 DNA 서열

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATACAGGGCCAGCA

26-23C2.2 V_L 클론 4 단백질 서열

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE

모노클로날 항체 26-23C2.2 일치 서열

V_H 일치 DNA 서열

AGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCACGGCTTCTGGATA

V_H 일치 아미노산 서열

VKLQESGAIEVKKPGASVKVSTASGYIFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKYSQKFQGRVSITRDKSASTAY
GQGT TVTVSS

V_L 일치 DNA 서열

GACATCCAGDTGACCCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATACAGGGCCAGCA

V_L 일치 아미노산 서열

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSY**M**HWNQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE

26-23C2의 가변 라이트 및 헤비 체인의 서열은 도 3B에서 보여지며, 여기에서 CDRs의 서열 또한 포함된다.

모노클로날 항체 22 1C 11 시퀀싱 분석

cDNA는 RNA로부터 생성된다. 모노클로날 항체 DNA의 V_H 및 V_L 부위를 증폭시키기 위한 PCR 반응은 도 10A에서 보여준 밴드를 보여주었다.

정제된 V_H 및 V_L PCR 산물은 시퀀싱 벡터로 클론되었고, 양성 형질전환체는 콜로니 PCR에 의해 측정되었다(도 10B):

7개의 V_H 및 6개의 V_L 클론들을 각 체인을 위해 선택하고 정방 및 역방 시퀀싱 프라이머 모두로 시퀀싱하였다. 모노클로날 항체 22-1C11의 V_H 체인을 위한 5개의 정확한 클론을 동정한 시퀀싱 분석.

V_L 시퀀싱은 퀄리티가 낮았다. 또 다른 6개의 클론들이 선택되고 총 6개의 클론들로부터 일치 서열을 획득하기 위해 시퀀싱하였다.

양성 V_H 및 V_L 클론을 위한 DNA 및 단백질 서열은 하기에서 보여진다.

모노클로날 항체 22-1C 11 시퀀싱 결과

22-1C 11 V_H 클론 1 DNA 서열

AGGTGCAACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCCTCA

22-1C 11 V_H 클론 1 아미노산 서열:

VQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG**M**HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADFKVGRFTISRDNKNTLYLQ

22-1C 11 V_H 클론 2 DNA 서열

AGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGCCCAGCCTGGGAGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCCTCA

22-1C 11 V_H 클론 2 아미노산 서열:

VKLQESGGGVAQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG**M**HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADFKVGRFTISRDNKNTLYLQ

22-1C 11 V_H 클론 3 DNA 서열

AGGTCCAACCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCCTCA

22-1C 11 V_H 클론 3 아미노산 서열

VQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG**M**HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADFKGRFTISRDN SKNTLYLQ

22-1C 11 V_H 클론 4 DNA 서열

AGGTCAAAC TGCAGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCCTCA

22-1C 11 V_H 클론 4 아미노산 서열

VKLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG**M**HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADFKGRFTISRDN SKNTLYLQ

22-1C 11 V_H 클론 8 DNA 서열

AGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCCTCA

22-1C 11 V_H 클론 8 아미노산 서열

VKLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG**M**HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADFKGRFTISRDN SKNTLYLQ

22-1C 11 V_L 클론 3 DNA 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAAATCAAACGG

22-1C 11 V_L 클론 3 아미노산 서열

DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISSELPEDFAV

22-1C 11 V_L 클론 6 DNA 서열

ACACAGTNTCCNGCCNCCCTGTNTTNGTCTNCAGNGGAAAGANCCACCCTNTCCNGCAGGNCCAGTCANAGTGTTNGC

낮은 퀄리티의 서열.

22-1C 11 V_L 클론 7 DNA 서열

GACATCCAGATGACCCAGTTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA

22-1C 11 V_L 클론 7 아미노산 서열

DIQMTQFQPPCLCLQGKEPPSPAGPVRVLAAT*PGTNRNLARLPGSSSMHPTGPLASQPGSVAVGLGQTSLSPSAA*SLKILQ

22-1C 11 V_L 클론 11 DNA 서열

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTNCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCNGCAGGNCCAGTC

낮은 퀄리티의 서열.

22-1C 11 V_L 클론 12 DNA 서열

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTC

22-1C 11 V_L 클론 12 아미노산 서열

DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV

22-1C 11 V_L 클론 14 DNA 서열

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTC

22-1C 11 V_L 클론 14 아미노산 서열

DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV

모노클로날 항체 22-1C 11 일치 서열

V_H 일치 DNA 서열

AGGTGAAACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGAT

V_H 일치 아미노산 서열

VKLQESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSGNKKYADFVKGRFTISRDNKNTLYLQ

V_L 일치 DNA 서열

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTC

V_L 일치 아미노산 서열

DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV

22-1C11의 가변 라이트 및 헤비 체인의 서열은 도 3C에서 보여지며, CDRs의 서열 또한 포함되어 있다.

26-5F12, 26-23 C2 및 22 1C11의 CDR 서열의 배열은 도 11에서 보여진다.

실시예 7

에피토프의 위치 측정의 동정

뉴몰리신의 28 아미노산 잔기를 대표하는 12 아미노산의 뉴몰리신의 합성 펩타이드 단편을 생산하였다. 그 펩타이드는 적어도 8개의 아미노산 잔기가 이웃 단편과 오버랩된다. 그 펩타이드는 도 6에서 보여진다. 단편에 결합된 항체는 하기 기재된 것처럼 표준 엘리사 분석으로 테스트되었다. 사용된 모든 단편은 이중특이적 펩타이드이다.

장비:

37℃에서의 배양기

피펫

엘리사 리더

물질:

팁스

시약 접시

플레이트 커버

리액티-결합 스트렙타비딘 HBC 코팅된 96-웰 마이크로-웰 플레이트(Pierce)

시약:

토끼-α-인간 IgG HRP (DAKO P0214)

OPD (o-페닐렌디아민)

버퍼:

세척 및 희석 버퍼: 0.05% 트윈 20 갖는 PBS

차단 버퍼: 2 % SMP (skimmed milk powder)이 첨가된 세척 버퍼

대조구

음성: 공백(blank)

음성: PsaA 펩타이드 9144 비오틴-KDPNNKEFYEKNLKEYTDKLDKLDK-NH₂, 1 mg/ml 040630

양성: PLY 펩타이드 10146 비오틴-ECTGLAWWWRT-OH, 5 mg/ml

펩타이드:

Peptide "GNT-01" 비오틴-RECTGLAWWWR-OH, 5 mg/ml

Peptide "GNT-02" 비오틴-IRECTGLAWWW-OH, 5 mg/ml

Peptide "GNT-03" 비오틴-KIRECTGLAWEW-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-04" 비오틴-VKIRECTGLAWE-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-05" 비오틴-SVKIRECTGLAW-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-06" 비오틴-LSVKIRECTGLA-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-061" 비오틴-NLSVKIRECTGL-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-062" 비오틴-RNLSVKIRECTG-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-07" 비오틴-CTGLAWEWWRTV-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-08" 비오틴-TGLAWEWWRTVY-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-09" 비오틴-GLAWEWWRTVYE-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-10" 비오틴-LAWEWWRTVYEK-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-13" 비오틴-EWWRTVYEKTDL-OH, 50 µg/ml

Peptide "GNT-14" 비오틴-WWRTVYEKTDLP-OH, 50 µg/ml

과정

코팅된 플레이트는 웰 당 세척 버퍼 3 x 300µl로 린스되었다. 모든 펩타이드는 PBS에서 2,5 µg/ml로 희석되었다. 100 µl가 웰 당 첨가되고, 플레이트들은 실온에서 1시간 동안 배양되었다. 구성은 하기에서 보여진다.

플레이트는 웰 당 3 x 200 µl의 세척 버퍼로 흐르듯이 린스되었고, 2 % SMP를 포함하는 세척 버퍼로 실온에서 30분동안 차단하였다. 연속적으로 각 웰은 세척버퍼 3 x 200 µl로 린스되었다. 모든 Mabs는 0.5 µg/ml로 희석되고, 100 µl이 웰 당 첨가되고, 플레이트는 37℃에서 1시간 동안 배양되었다. 항체는 하기에서 보여지는 것처럼 적용되었다.

플레이트는 웰 당 세척 버퍼 2 x 200µl을 이용하여 린스하였다. 두번째 항체 토끼-α-인간 IgG HRP (DAKO P0214)은 차단 버퍼로 1:2000로 희석되었고, 100 µl이 각 웰당 첨가되었고, 그 플레이트는 37℃에서 30분 동안 배양되었다.

각 웰은 세척 버퍼 3 x 200 µl로 린스되고, 30분 동안 OPD로 발진하였다. 이들 실험은 독립적으로 수행되고 그 결과는 하기에서 요약하였다. 플레이트 1의 결과의 개관은 도 7A에서 보여지고, 플레이트 2의 결과는 도 7B에서 보여진다.

플레이트 구성(플레이트 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-07	GNT-08	GNT-13	GNT-14
B	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-07	GNT-08	GNT-13	GNT-14
C	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-07	GNT-08	GNT-13	GNT-14
D	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-07	GNT-08	GNT-13	GNT-14
E	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-07	GNT-08	GNT-13	GNT-14
F	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-07	GNT-08	GNT-13	GNT-14
G	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-07	GNT-08	GNT-13	GNT-14
H	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-07	GNT-08	GNT-13	GNT-14

플레이트 구성(플레이트 2)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-03	GNT-04	GNT-05	GNT-06	GNT-061	GNT-062	GNT-07
B	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-03	GNT-04	GNT-05	GNT-06	GNT-061	GNT-062	GNT-07
C	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-03	GNT-04	GNT-05	GNT-06	GNT-061	GNT-062	GNT-07
D	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-03	GNT-04	GNT-05	GNT-06	GNT-061	GNT-062	GNT-07
E	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-03	GNT-04	GNT-05	GNT-06	GNT-061	GNT-062	GNT-07
F	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-03	GNT-04	GNT-05	GNT-06	GNT-061	GNT-062	GNT-07
G	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-03	GNT-04	GNT-05	GNT-06	GNT-061	GNT-062	GNT-07
H	Blank	P9144	P10146	GNT-01	GNT-02	GNT-03	GNT-04	GNT-05	GNT-06	GNT-061	GNT-062	GNT-07

플레이트 구성(계속된 플레이트 2)

	13	14	15	16	17
A	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT-14
B	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT-14
C	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT-14
D	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT-14
E	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT-14
F	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT-14
G	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT-14
H	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT-14

양 플레이트를 위한 항체 구성

A	17-10C7.1
B	22-6E6.5
C	26-5F12.1
D	26-23C2.2
E	13-2E12.1
F	22-1C11.1
G	27-11A8
H	28-10E7.2



엘리사 리딩(플레이트 1)

Mab	Blank	PsaA pept.	PLY Pept.	GNT- 01	GNT- 02	GNT- 07	GNT- 08	GNT- 13	GNT- 14
17-10C7.1	0,11	0,08	0,21	0,24	0,35	0,15	0,28	0,08	0,09
17-10C7.1	0,08	0,08	0,30	0,37	0,42	0,19	0,35	0,08	0,09
17-10C7.1	0,10	0,06	0,22	0,27	0,32	0,12	0,24	0,07	0,07
22-6E6.5	0,10	0,09	2,17	1,56	3,00	0,17	0,63	0,09	0,10
22-6E6.5	0,09	0,08	3,00	2,25	3,00	0,36	0,64	0,09	0,08
22-6E6.5	0,08	0,07	3,00	2,83	3,00	0,53	0,80	0,08	0,07
26-5F12.1	0,09	0,09	2,56	1,68	3,00	0,21	0,89	0,09	0,09
26-5F12.1	0,08	0,08	3,00	2,98	3,00	0,47	1,09	0,09	0,09
26-5F12.1	0,08	0,07	3,00	3,00	3,00	0,60	1,23	0,09	0,08
26-23C2.2	0,08	0,08	0,30	0,29	2,80	0,14	0,29	0,07	0,08
26-23C2.2	0,08	0,08	0,52	0,49	3,00	0,23	0,38	0,08	0,08
26-23C2.2	0,09	0,07	0,55	0,50	3,00	0,18	0,26	0,07	0,07
13-2E12.1	0,08	0,09	0,20	0,23	0,35	0,13	0,27	0,08	0,08
13-2E12.1	0,08	0,08	0,29	0,37	0,41	0,18	0,36	0,08	0,08
13-2E12.1	0,07	0,06	0,20	0,26	0,33	0,14	0,22	0,07	0,07
22-1C11.1	0,19	0,16	1,09	0,72	2,05	0,24	0,71	0,11	0,10
22-1C11.1	0,11	0,10	1,71	1,16	2,51	0,58	0,91	0,12	0,10
22-1C11.1	0,22	0,19	2,24	1,70	3,00	1,01	1,52	0,25	0,22
27-11A8	0,09	0,08	1,99	0,92	3,00	0,15	0,34	0,08	0,09
27-11A8	0,08	0,08	3,00	1,53	3,00	0,29	0,41	0,09	0,08
27-11A8	0,08	0,07	3,00	1,84	3,00	0,28	0,32	0,07	0,07
28-10E7.2	0,08	0,08	0,23	0,27	0,39	0,14	0,30	0,08	0,09
28-10E7.2	0,08	0,08	0,35	0,42	0,47	0,21	0,37	0,09	0,08
28-10E7.2	0,07	0,06	0,26	0,32	0,38	0,16	0,26	0,07	0,08

플레이트 1의 엘리사 리딩으로부터의 결과 개관:

Sequence		KDPNNKEFYKLNKEYTDK LDKLDK	ECTGLAWEVWRT	RECTGLAWEVWR	IRECTGLAWEVW	CTGLAWEVWRTV	TGLAWEVWRTVY	EWVRTVYEKTDL	WVRTVYEKTDLP
Mab 0,5 µg/ml	Blank	PsaA pept.	PLY Pept.	GNT- 01	GNT- 02	GNT- 07	GNT- 08	GNT- 13	GNT- 14
17-10C7.1	0,11	0,08	0,21	0,24	0,35	0,15	0,28	0,08	0,09
22-6E6.5	0,10	0,09	2,17	1,56	>3	0,17	0,63	0,09	0,10
26-5F12.1	0,09	0,09	2,56	1,68	>3	0,21	0,89	0,09	0,09
26-23C2.2	0,08	0,08	0,30	0,29	2,80	0,14	0,29	0,07	0,08
13-2E12.1	0,08	0,09	0,20	0,23	0,35	0,13	0,27	0,08	0,08
22-1C11.1	0,19	0,16	1,09	0,72	2,05	0,24	0,71	0,11	0,10
27-11A8	0,09	0,08	1,99	0,92	>3	0,15	0,34	0,08	0,09
28-10E7.2	0,08	0,08	0,23	0,27	0,39	0,14	0,30	0,08	0,09

플레이트 2의 엘리사 리딩:

Mab	Blank	PsaA pept.	PLY Pept.	GNT- 01	GNT- 02	GNT- 03	GNT- 04	GNT- 05	GNT- 06	GNT- 061	GNT- 062	GNT- 07
17-10C7.1	0,062	0,077	0,119	0,117	0,185	0,081	0,077	0,08	0,072	0,077	0,088	0,071
22-6E6.5	0,072	0,074	2,25	2,175	*****	2,111	0,235	0,133	0,096	0,151	0,109	0,108
26-5F12.1	0,071	0,069	OUT	OUT	*****	2,814	0,262	0,154	0,104	0,152	0,107	0,132
26-23C2.2	0,068	0,061	1,112	0,764	*****	0,711	0,133	0,108	0,089	0,112	0,096	0,094
13-2E12.1	0,067	0,065	0,128	0,118	0,171	0,078	0,074	0,075	0,069	0,072	0,077	0,08
22-1C11.1	0,567	0,539	1,577	1,274	OUT	1,103	0,748	0,816	0,56	0,61	0,844	0,681
27-11A8	0,082	0,073	OUT	1,699	*****	0,938	0,15	0,148	0,088	0,158	0,112	0,113
28-10E7.2	0,074	0,08	0,174	0,166	0,251	0,127	0,098	0,097	0,086	0,098	0,107	0,089

계속된 플레이트 2의 엘리사 리딩:

Mab	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT- 14
17-10C7.1	0,083	0,065	0,07	0,062	0,068
22-6E6.5	0,323	0,322	0,09	0,089	0,088
26-5F12.1	0,761	0,293	0,09	0,09	0,092
26-23C2.2	0,16	0,105	0,076	0,076	0,086
13-2E12.1	0,085	0,067	0,066	0,066	0,074
22-1C11.1	0,73	0,475	0,403	0,264	0,257
27-11A8	0,175	0,095	0,076	0,071	0,076
28-10E7.2	0,106	0,081	0,071	0,072	0,072

플레이트 2의 엘리사 리딩으로부터의 결과 개관:

Sequence		KDPNNKEFYKLNK EYTDKLDKDK	ECTGLAWEWWRT	RECTGLAWEWWR	IRECTGLAWEWW	KIRECTGLAWEW	VKIRECTGLAWE	SVKIRECTGLAW	LSVKIRECTGLA	NLSVKIRECTGL	RNLSVKIRECTG	CTGLAWEWWRTV
Mab 0,5 µg/ml	Blank	PsaA pept.	PLY Pept.	GNT- 01	GNT- 02	GNT- 03	GNT- 04	GNT- 05	GNT- 06	GNT- 061	GNT- 062	GNT- 07
17-10C7.1	0,06	0,08	0,12	0,12	0,19	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,09	0,07
22-6E6.5	0,07	0,07	2,25	2,18	>3	2,11	0,24	0,13	0,10	0,15	0,11	0,11
26-5F12.1	0,07	0,07	>3	>3	>3	2,81	0,26	0,15	0,10	0,15	0,11	0,13
26-23C2.2	0,07	0,06	1,11	0,76	>3	0,71	0,13	0,11	0,09	0,11	0,10	0,09
13-2E12.1	0,07	0,07	0,13	0,12	0,17	0,08	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08
22-1C11.1	0,57	0,54	1,58	1,27	>3	1,10	0,75	0,82	0,56	0,61	0,84	0,68
27-11A8	0,08	0,07	>3	1,70	>3	0,94	0,15	0,15	0,09	0,16	0,11	0,11
28-10E7.2	0,07	0,07	>3	>3	>3	2,81	0,26	0,15	0,10	0,15	0,11	0,13

계속된 플레이트 2:

Sequence	TGLAWEWWRTVY	GLAWEWWRTVE	LAWWEWWRTVEK	EWRTVEKTDL	WWRTVEKTDLP
Mab 0,5 µg/ml	GNT-08	GNT-09	GNT-10	GNT-13	GNT-14
17-10C7.1	0,08	0,07	0,07	0,06	0,07
22-6E6.5	0,32	0,32	0,09	0,09	0,09
26-5F12.1	0,76	0,29	0,09	0,09	0,09
26-23C2.2	0,16	0,11	0,08	0,08	0,09
13-2E12.1	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07
22-1C11.1	0,73	0,48	0,40	0,26	0,26
27-11A8	0,18	0,10	0,08	0,07	0,08
28- 10E7.2	0,11	0,08	0,07	0,07	0,07

그 결과의 그래픽 도식은 도 7A 및 7B에서 보여진다.

참고자료

- Alexander, J.E., R.A. Lock, C.A.M. Peeter, J.T. Poolman, P.W. Andrew, T.J. Mitchell, D. Hansman, and J.C. Paton.** 1994. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine sero-types of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 62:5683
- AlonsoDeVelasco, E.** *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol.Rev.*1995.Dec. 59:591-603.
- Anonymous.** 1985. Acute respiratory infections in under fives: 15 million deaths a year. *Lancet* 2:699-701.
- Barry, A.M., R.A. Lock, D. Hansman, and J.C. Paton.** 1989. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 57:2324-2330
- Benton et al.** 1997. Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5 and 6 are not attributable to differences in Pneumolysin production. *Infect. Immun.* 65:1237-1244.
- Bonev, B.B., Gilbert, R.J.C., Andrew, P.W. et al.** 2001. Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *J. Biol. Chem.* 276(8):5714-5719.
- Camara, M., G.J. Boulnois, P.W. Andrew, and T.J. Mitchell.** 1994. A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect.Immun.* 62:3688-3695.
- Crain MJ, et al.** Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.*1990.Oct. 58:3293-3299.
- de los Toyos JR, et al.** Functional analysis of pneumolysin by use of monoclonal antibodies. *Infect.Immun.*1996.Feb. 64:480-484.
- Kuo, J., M. Douglas, H.K. Ree, and A.A. Lindberg.** 1995. Characterization of a recombinant pneumolysin and its use as a protein carrier for pneumococcal type 18C conjugate vaccines. *Infect.Immun.* 63:2706-2713.
- Lee CJ, et al.** Immunologic epitope, gene, and immunity involved in pneumococcal glyco-conjugate. *Crit.Rev.Microbiol.*1997. 23:121-142.
- Lock, R.A., J.C. Paton, and D. Hansman.** 1988. Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microb.Pathog.* 5:461-467.
- Lomholdt, H.** 1995. Evidence of recombination and an antigenically diverse immunoglobulin A1 protease among strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 63:4238-4243.
- McDaniel LS, et al.** Monoclonal antibodies against protease-sensitive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J.Exp.Med.*1984.Aug.1. 160:386-397.
- McDaniel LS, et al.** PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect.Immun.*1991.Jan. 59:222-228.
- Mitchell, T.J., F. Mendez, J.C. Paton, P.W. Andrew, and G.J. Boulnois.** 1990. Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* type 1 and 2. *NucleicAcids.Res.* 18:4010
- Musher, D.M., Mediwalla, R., Phan, H.M. et al.** 2001. Nonspecificity of assaying for IgG antibody to pneumolysin in circulating immune complexes as a means to diagnose pneumococcal pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 32:534-538.
- Paton, J.C., R.A. Lock, and D. Hansman.** 1983. Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 40:548

Paton, J.C., R.A. Lock, C.J. Lee, J.P. Li, A.M. Barry, T.J. Mitchell, P.W. Andrew, D. Hansman, and G.J. Boulnois. 1991. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to Strepto-coccus pneumoniae type 19F polysaccharide. Infect.Immun. 59:2297-2304.

Rapola, S., Jannti,V., Haikala,R., Carlone,G.M., Sampson,J.S., Briles,D.E., Paton,J.C., Takala,A.K., Kilpi,T.M., and Kayhty,H. 2000. Natural development of anti-bodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A, and pneumolysin in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. J.Infect.Dis. 182:1146-1152.

Simell, B., Korkeila,M., Pursiainen,H., Kilpi,T.M., and Kayhty,H. 2001. Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal sur-face adhesin A, pneumolysin, and pneumococcal surface protein A in chil-dren. J.Infect.Dis. 183:887-896.

Sorensen, U.B. Pneumococcal polysaccharide antigens: capsules and C-polysaccharide. An immunochemical study. Dan.Med.Bull.1995.Feb. 42:47-53.

Swiatlo, E., M.J. Crain, L.S. McDaniel, A. Brooks-Walter, T.J. Coffey, B.G. Spratt, D.A. Morrison, and D.E. Briles. 1996. DNA polymorphisms and variants penicil-lin-binding proteins as evidence that relatively penicillin-resistant pneumo-cocci in Western Canada are clonally related. J.Infect.Dis. 174:884-888.

Tai, S.S., T.R. Wang, and C.J. Lee. 1997. Characterization of hemin binding activity of Streptococcus pneumoniae. Infect.Immun. 65:1083

Talkington DF, et al. A 43-kilodalton pneumococcal surface protein, PspA: isolation, protec-tive abilities, and structural analysis of the amino-terminal sequence. In-fect.Immun.1991.Apr. 59:1285-1289.

도면의 간단한 설명

도 1은 Fab 단편의 개략도이다.

도 2는 서열번호 11을 갖는 뉴몰리신 아미노산 서열이다.

도 3은 항-뉴몰리신의 라이트 체인과 가변 단편인 헤비 체인이다.

도 4는 뉴모코커스(폐렴연쇄구균) 및 항체로 접종된 쥐를 위한 생존 도식도이다.

도 5는 뉴몰리신 항체의 항용혈 활성이다.

도 6은 에피토프 맵핑을 위한 펩타이드이다.

도 7은 뉴몰리신 항체 에피토프의 결정을 위한 그래픽 일러스트레이션이다.

도 8은 26-5F12 클론의 분리이다.

도 9는 26-23 C2 클론의 분리이다.

도 10은 22 1C11의 분리이다.

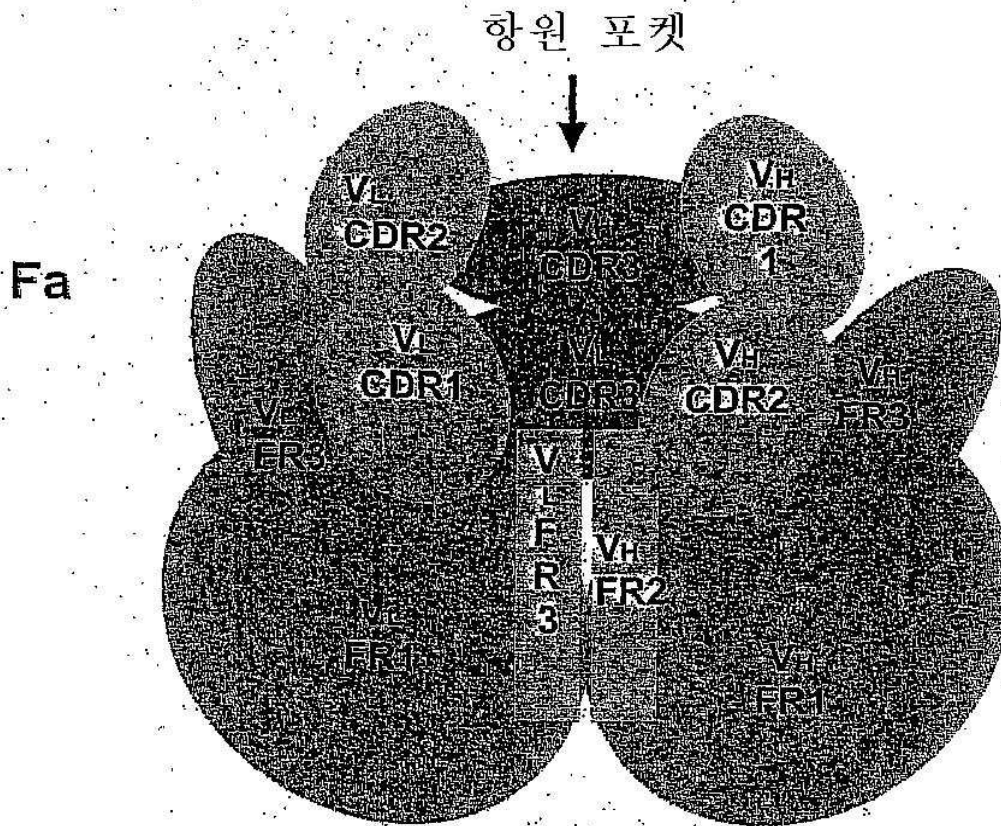
도 11은 26-5F12, 26-23C2 및 22-1C11의 CDR 서열이다.

서열목록

- 서열번호 1: 뉴몰리신의 425-436 아미노산
- 서열번호 2: 뉴몰리신의 423-438 아미노산
- 서열번호 3: 26-5F12.1의 가변 라이트 체인
- 서열번호 4: 26-5F12.1의 가변 헤비 체인
- 서열번호 5: 26-5F12.1의 CDR 1 라이트 체인
- 서열번호 6: 26-5F12.1의 CDR 2 라이트 체인
- 서열번호 7: CDR 3 light chain 26-5F12.1
- 서열번호 8: 26-5F12.1의 CDR 1 헤비 체인
- 서열번호 9: 26-5F12.1의 CDR 2 헤비 체인
- 서열번호 10: 26-5F12.1 및 26-23C2.2의 CDR 3 헤비 체인
- 서열번호 11: 뉴몰리신 서열
- 서열번호 12: 26-23C2.2의 가변 라이트 체인
- 서열번호 13: 26-23C2.2의 가변 헤비 체인
- 서열번호 14: 26-23C2.2의 CDR 1 라이트 체인
- 서열번호 15: 26-23C2.2의 CDR 2 라이트 체인
- 서열번호 16: 26-23C2.2의 CDR 3 라이트 체인
- 서열번호 17: 26-23C2.2의 CDR 1 헤비 체인
- 서열번호 18: 26-23C2.2의 CDR 2 헤비 체인
- 서열번호 19: 22-1C11의 가변 라이트 체인
- 서열번호 20: 22-1C11의 가변 헤비 체인
- 서열번호 21: 22-1C11의 CDR 1 라이트 체인
- 서열번호 22: 22-1C11의 CDR 2 라이트 체인
- 서열번호 23: 22-1C11의 CDR 3 라이트 체인
- 서열번호 24: 22-1C11의 CDR 1 헤비 체인
- 서열번호 25: 22-1C11의 CDR 2 헤비 체인
- 서열번호 26: 22-1C11의 CDR 3 헤비 체인

도면

도면1



CDR: 상보성 결정 부위
 FR: 프레임 부위
 VL: 가변 라이트 체인
 VH: 가변 헤비 체인

도면2

뉴몰리신 (Genebank no. X52474)

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVIERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPG
 ALLVWDETLENNPTLLAVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNV
 PARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVKNPGDVFQD
 TVTVEDLKQRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNTEVKA
 VILGGDPSSGARVVTGKVDMMVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSLRDNVVATFQNSTDYVETKVTAARN
 GDLLLDHSGAYVAQYYITWDELSYDHQGKEVLTPKAWDRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGL
 AWEWWRTVYEKTDLPVLRKRTISIWGTTLYPQVEDKVEND (서열번호 11)

도면3A

26-5F12.1

가변 라이트 체인 일차 단백질 서열

DIQMTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SCR~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKLEIKR (SEQ ID
NO 3)

가변 헤비 체인 일차 단백질 서열

VKLQESGAEVKKPGASVKV~~SCT~~ASGYIFTSYAIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNT
KYSQKFQGRVSITRDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRRGQQLAFDYWGQGTTVT
VSS (SEQ ID NO 4)

상보성 결정 부위

라이트 체인 :

CDR1: RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO 5)
CDR2: GASSRAT (SEQ ID NO 6)
CDR3: QQYGSS (SEQ ID NO 7)

헤비 체인 :

CDR1: SYAIH (SEQ ID NO 8)
CDR2: WINAGYGNTKYSQK (SEQ ID NO 9)
CDR3: RGQQLAFDYWGQGTTVT (SEQ ID NO 10)

도면3B

26-23C 2.2

가변 라이트 체인 일차 단백질 서열

**DIQLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSMHWNQKPGQPPRLLIYLVSNL
ESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPRWKSK (SEQ ID
NO 12)**

가변 헤비 체인 일차 단백질 서열

**VKLQESGAIEVKKPGASVKVSCASGYIFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGN
TKYSQKFQGRVSITRDKSASTAYMELTSRSEDTAVYYCARRGQQLAFDYWGQGTTV
TVSS (SEQ ID NO 13)**

상보성 결정 부위

라이트 체인 :

CDR1: RASKSVSTSGYS (SEQ ID NO 14)
CDR2: LVSNNLES (SEQ ID NO 15)
CDR3: QHIREL (SEQ ID NO 16)

헤비 체인 :

CDR1: SYAMH (SEQ ID NO 17)
CDR2: WINAGYGNTKYSQK (SEQ ID NO 18)
CDR3: RGQQLAFDYWGQGTTVT (SEQ ID NO 10)

도면3C

22-1C11

가변 라이트 체인 일차 단백질 서열

DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDDASNRATGI
 PARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQCSNWHPTFGQGTKLEIKR (SEQ ID
 NO 19)

가변 헤비 체인 일차 단백질 서열

VKLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN
KYYADFVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGNYYGLGSSFYYYGMD
VWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO 20)

상보성 결정 부위

라이트 체인 :

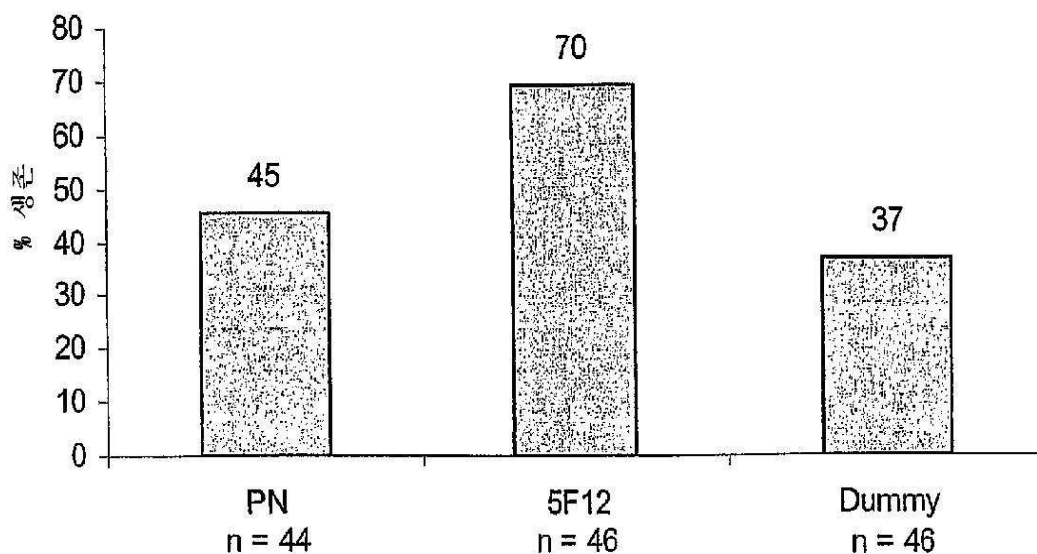
CDR1: RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 21)
 CDR2: DASNRAT (SEQ ID NO 22)
 CDR3: QQCSNW (SEQ ID NO 23)

헤비 체인 :

CDR1: SNYGMH (SEQ ID NO 24)
 CDR2: VIWYDGSNKYYADF (SEQ ID NO 25)
 CDR3: SFYYYGMDVWGQGT TVT (SEQ ID NO 26)

도면4

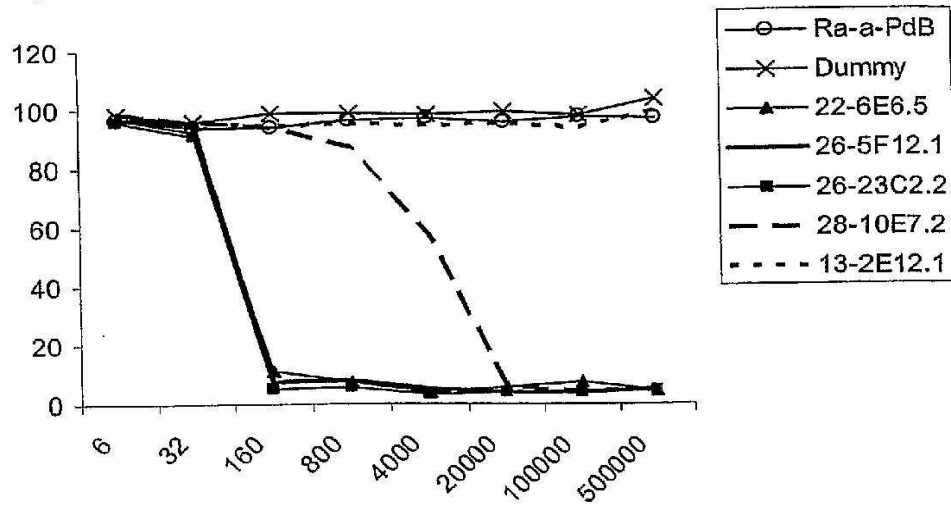
24 시간 생존



도면5

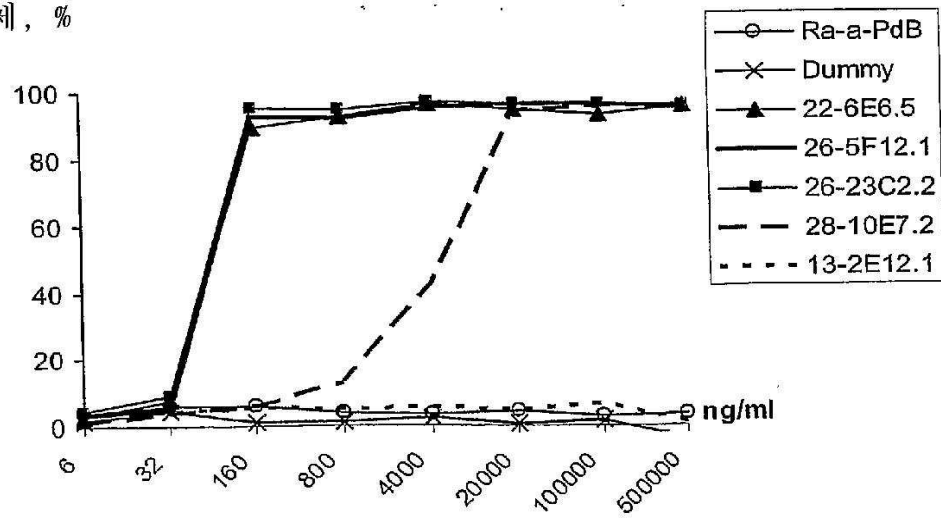
A

용혈, %



B

억제, %



도면6

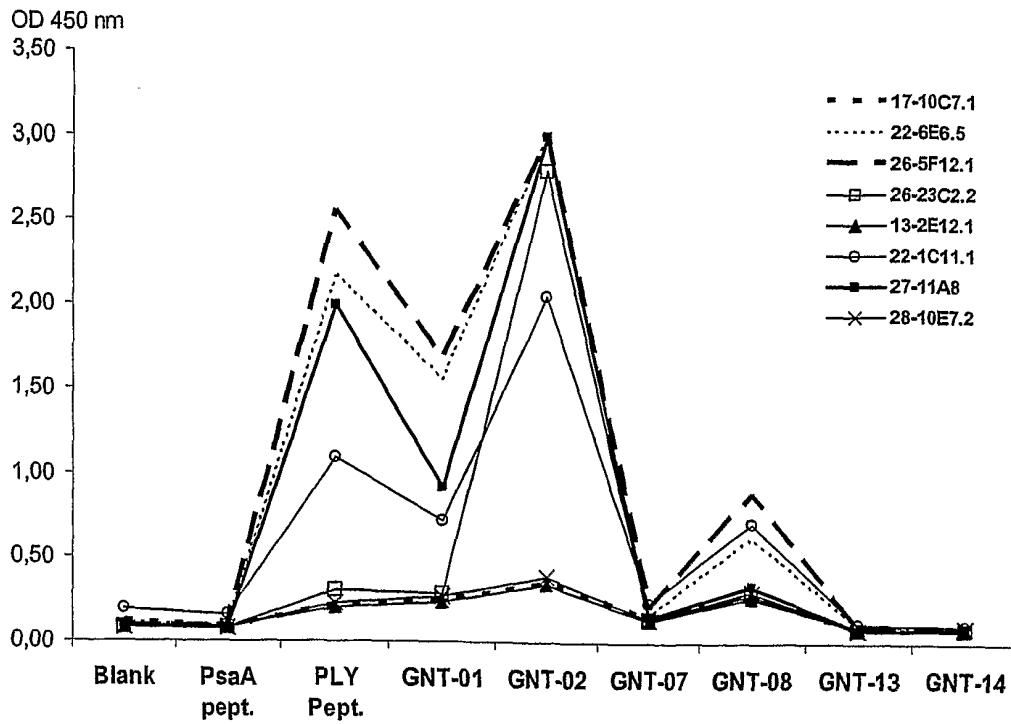
Peptides for epitope mapping

Selected sequence

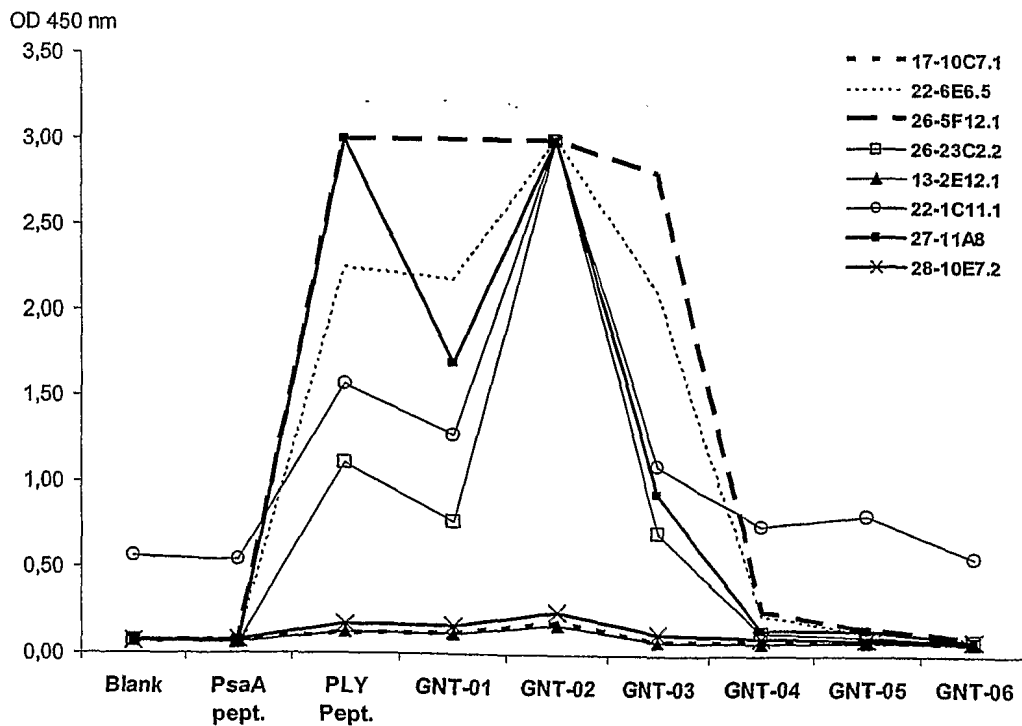
	RNLSVKIRECTGLAWWWRTVYEKTDLP (SEQ ID NO 27)
	1 12
Consensus	ECTGLAWWWRT (SEQ ID NO 28)
GNT-01	RECTGLAWWWR (SEQ ID NO 29)
GNT-02	IRECTGLAWWW (SEQ ID NO 30)
GNT-03	KIRECTGLAWEW (SEQ ID NO 31)
GNT-04	VKIRECTGLAW (SEQ ID NO 32)
GNT-05	SVKIRECTGLAW (SEQ ID NO 33)
GNT-06	LSVKIRECTGLA (SEQ ID NO 34)
GNT-061	NLSVKIRECTGL (SEQ ID NO 35)
GNT-062	RNLSVKIRECTG (SEQ ID NO 36)
GNT-07	CTGLAWWWRTV (SEQ ID NO 37)
GNT-08	TGLAWWWRTVY (SEQ ID NO 38)
GNT-09	GLAWWWRTVYE (SEQ ID NO 39)
GNT-10	LAWWWRTVYEK (SEQ ID NO 40)
GNT-13	WWRTVYEKTDL (SEQ ID NO 41)
GNT-14	WWRTVYEKTDLP (SEQ ID NO 42)

Consensus	ECTGLAWWWRT
GNT-01	RECTGLAWWWR
GNT-02	IRECTGLAWWW
GNT-03	KIRECTGLAWEW
GNT-04	VKIRECTGLAW
GNT-05	SVKIRECTGLAW
GNT-06	LSVKIRECTGLA
GNT-061	NLSVKIRECTGL
GNT-062	RNLSVKIRECTG
GNT-07	CTGLAWWWRTV
GNT-08	TGLAWWWRTVY
GNT-09	GLAWWWRTVYE
GNT-10	LAWWWRTVYEK
GNT-13	WWRTVYEKTDL
GNT-14	WWRTVYEKTDLP

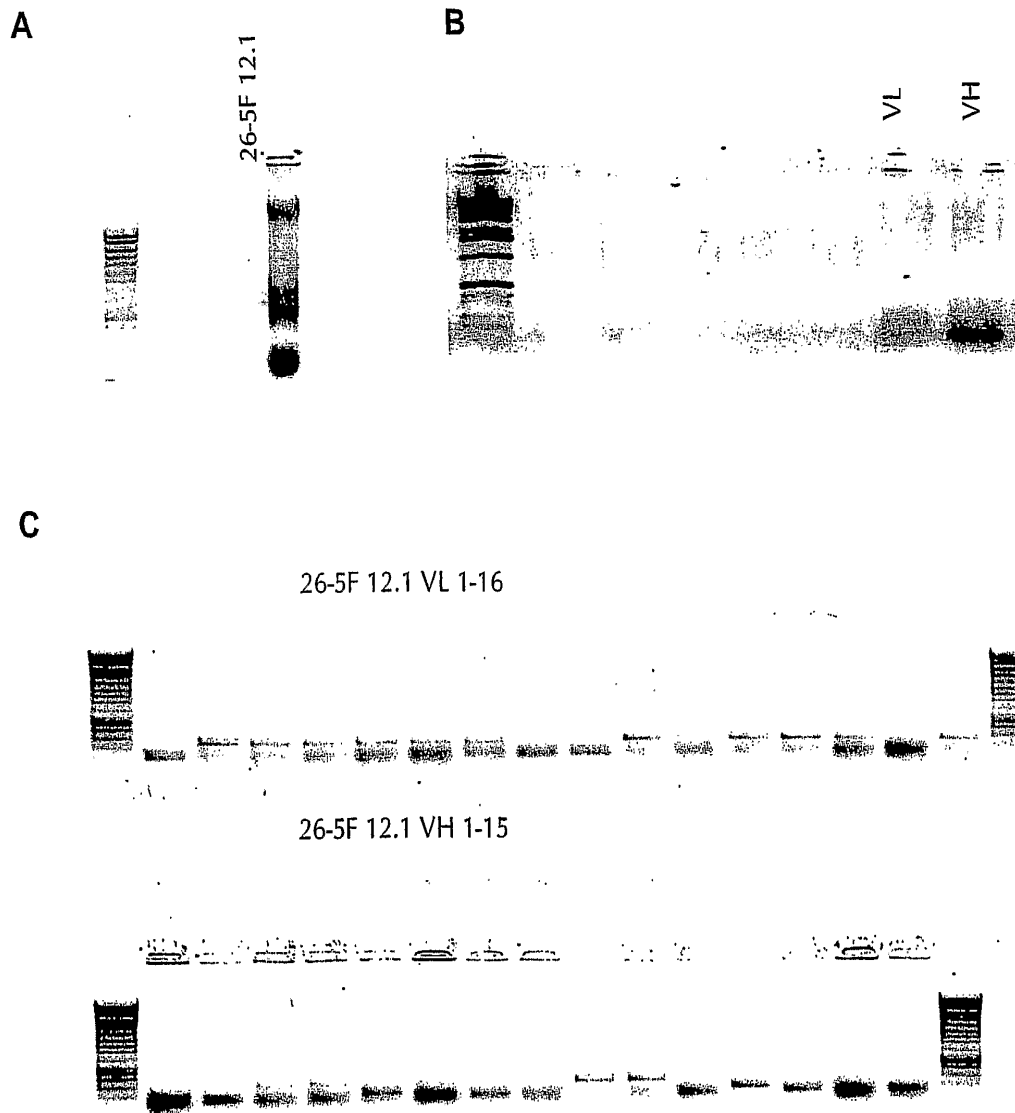
도면7A



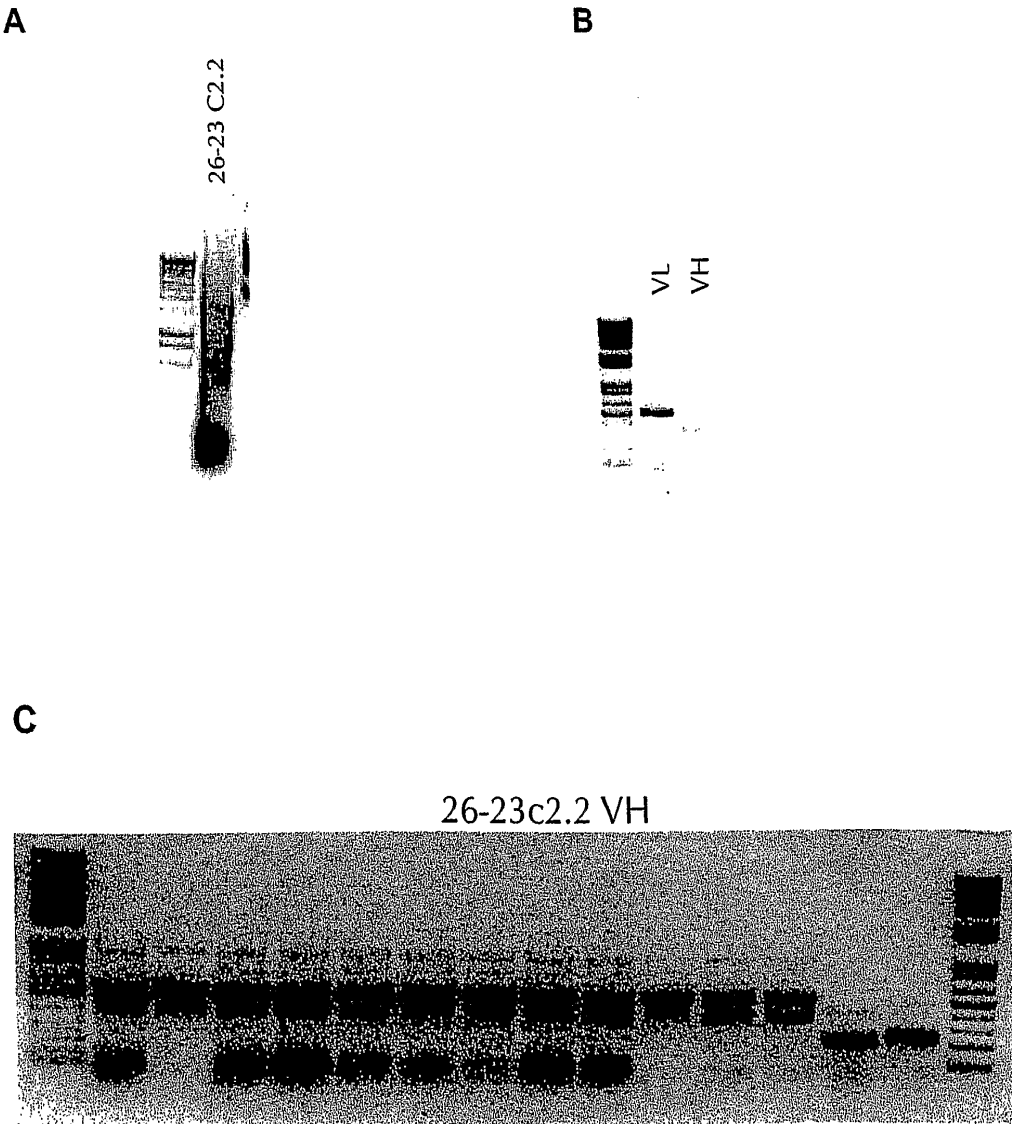
도면7B



도면8

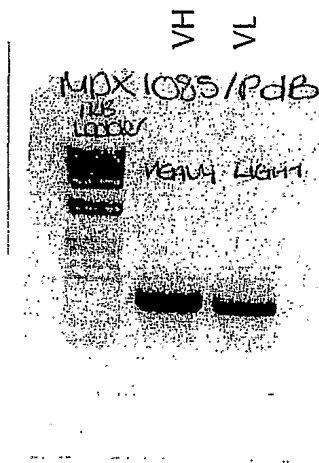


도면9

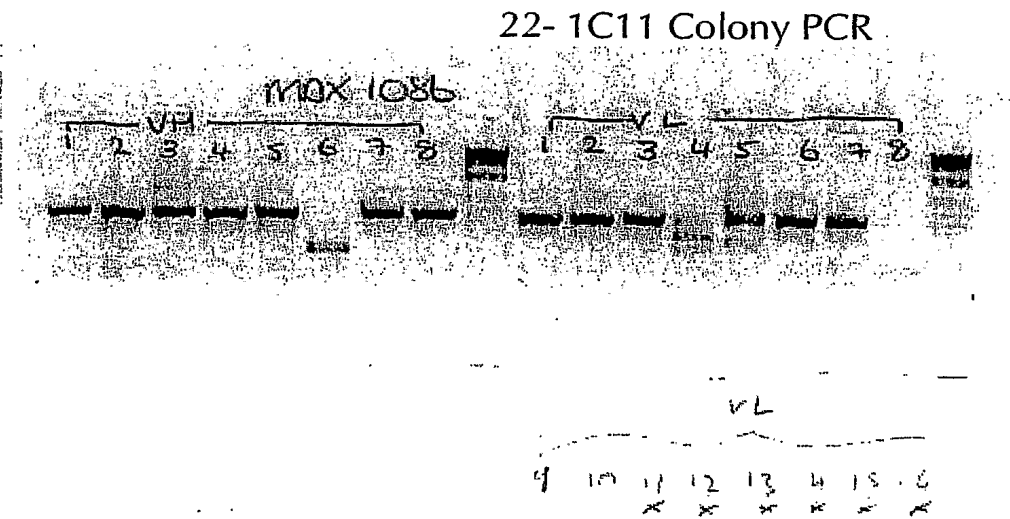


도면10

A



B



도면11

Light chain, V_K:

26-5F12 CDR1:	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO 5)
26-23C2 CDR1:	RASKSVSTSGYS (SEQ ID NO 14)
22-1C11 CDR1:	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO 21)
26-5F12 CDR2:	GASSRAT (SEQ ID NO 6)
26-23C2 CDR2:	LVSNNLES (SEQ ID NO 15)
22-1C11 CDR2:	DASNRAT (SEQ ID NO 22)
26-5F12 CDR3:	QQYGSS (SEQ ID NO 7)
26-23C2 CDR3:	QHIREL (SEQ ID NO 16)
22-1C11 CDR3:	QQCSNW (SEQ ID NO 23)

Heavy chain, V_H:

26-5F12 CDR1:	SYAIH (SEQ ID NO 8)
26-23C2 CDR1:	SYAMH (SEQ ID NO 17)
22-1C11 CDR1:	SNYGMH (SEQ ID NO 24)
26-5F12 CDR2:	WINAGYGNTKYSQK (SEQ ID NO 9)
26-23C2 CDR2:	WINAGYGNTKYSQK (SEQ ID NO 18)
22-1C11 CDR2:	VIWYDGSNKYYADF (SEQ ID NO 25)
26-5F12 CDR3:	RGQQLAFDYWGQGTTVT (SEQ ID NO 10)
26-23C2 CDR3:	RGQQLAFDYWGQGTTVT (SEQ ID NO 10)
22-1C11 CDR3:	SFYYYGMDVWGQGTTVT (SEQ ID NO 26)

서열목록

<110> Genesto A/S

<120> Binding member towards Pneumolysin

<150> DK PA 2004 01271

<151> 2004-08-23

<150> DK PA 2005 00989

<151> 2005-07-05

<160> 26

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Ile Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp
 1 5 10

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Val Lys Ile Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variable light chain 26-5F12.1

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 4
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variable light chain 26-5F12.1

<400> 4
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
 35 40 45
 Trp Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 50 55 60
 Gly Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Arg Gly Gln Gln Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR1 light chain 26-5F12.1

<400> 5
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 light chain 26-5F12.1

<400> 6

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 light chain 26-5F12.1

<400> 7

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR 1 heavy chain 26-5F12.1

<400> 8

Ser Tyr Ala Ile His

1 5

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 heavy chain 26-5F12.1

<400> 9

Trp Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys

1 5 10

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR3 heavy chain 26-5F12.1

<400> 10
 Arg Gly Gln Gln Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 1 5 10 15

Thr

<210> 11
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met Asn Tyr Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu Ser Ile Glu Asn Arg Phe
 20 25 30

Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg
 35 40 45

Lys Lys Arg Ser Leu Ser Thr Asn Thr Ser Asp Ile Ser Val Thr Ala
 50 55 60

Thr Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val Asp Glu
 65 70 75 80

Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala Val Asp Arg Ala Pro
 85 90 95

Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe
 100 105 110

Leu Gln Val Glu Asp Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn
 115 120 125

Asp Leu Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn Val
 130 135 140

Pro Ala Arg Met Gln Tyr Glu Lys Ile Thr Ala His Ser Met Glu Gln

145		150		155		160
Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu						
		165		170		175
Asp Ile Asp Phe Asn Ser Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile						
		180		185		190
Val Asn Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys						
		195		200		205
Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu Asp Leu Lys						
		210		215		220
Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu Val Tyr Ile Ser Ser Val						
		225		230		235
						240
Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser						
		245		250		255
Asp Glu Val Glu Ala Ala Phe Glu Ala Leu Ile Lys Gly Val Lys Val						
		260		265		270
Ala Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu Val Lys						
		275		280		285
Ala Val Ile Leu Gly Gly Asp Pro Ser Ser Gly Ala Arg Val Val Thr						
		290		295		300
Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe						
		305		310		315
						320
Thr Ala Asp His Pro Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu						
		325		330		335
Arg Asp Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val Glu						
		340		345		350
Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu Leu Asp His Ser						
		355		360		365
Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile Thr Trp Asp Glu Leu Ser Tyr						
		370		375		380
Asp His Gln Gly Lys Glu Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn						
		385		390		395
						400
Gly Gln Asp Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly						
		405		410		415
Asn Val Arg Asn Leu Ser Val Lys Ile Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala						
		420		425		430

Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Tyr Glu Lys Thr Asp Leu Pro Leu Val
435 440 445

Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gln Val
450 455 460

Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp
465 470

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light chain 26-23C2.2

<400> 12

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Arg Trp Lys Ser Lys
100 105 110

<210> 13

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy chain 26-23C2.2

<400> 13
Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Ala
20 25 30
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
35 40 45
Trp Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
50 55 60
Gly Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80
Glu Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Arg Gly Gln Gln Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 light chain 26-23C2.2

<400> 14
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 light chain 26-23C2.2

<400> 15
Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> CDR3 light chain 26-23C2.2

<400> 16
 Gln His Ile Arg Glu Leu
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR1 heavy chain 26-23C2.2

<400> 17
 Ser Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR 2 heavy chain 26-23C2.2

<400> 18
 Trp Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys
 1 5 10

<210> 19
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variable light chain 22-1C11

<400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Ser Asn Trp His Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 20
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variable heavy chain 22-1C11

<400> 20
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
 20 25 30
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 35 40 45
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Phe Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Leu Gly Ser Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met

100

105

110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 light chain 22-1C11

<400> 21
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 light chain 22-1C11

<400> 22
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 light chain 22-1C11

<400> 23
Gln Gln Cys Ser Asn Trp
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 heavy chain 22-1C11

<400> 24

Ser Asn Tyr Gly Met His

1 5

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 heavy chain 22-1C11

<400> 25

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Phe

1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 heavy chain 22-1C11

<400> 26

Ser Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

1 5 10 15

Thr