



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월26일

(11) 등록번호 10-1832499

(24) 등록일자 2018년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/25 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/569 (2017.01)

(21) 출원번호 10-2011-7019455

(22) 출원일자(국제) 2010년01월21일

심사청구일자 2015년01월20일

(85) 번역문제출일자 2011년08월22일

(65) 공개번호 10-2011-0119725

(43) 공개일자 2011년11월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/021610

(87) 국제공개번호 WO 2010/085539

국제공개일자 2010년07월29일

(30) 우선권주장

61/146,892 2009년01월23일 미국(US)

61/210,082 2009년03월13일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO1999032645 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 헨리 엠. 잭슨 파운데이션 포 더 어드밴스먼트

오브 밀리터리 메디신, 인코포레이티드

미국 20817 메릴랜드주 베데스다 스위트 100 록리  
지 드라이브 6720-에이

(72) 발명자

오'브라이언, 앤리슨

미국 20817 메릴랜드 베데스다 찰코트 로드 5514

펠톤-셀사, 안젤라

미국 20165 버지니아 스톤링 브랜디와인 코트  
20516

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 시가 독소 2형 단백질 기반 방법 및 조성물

### (57) 요 약

본 발명은 11E10 항체에 대한 Stx2 단백질 내 에피토프의 발견에 기반한 것이다. 본 발명은 11E10 단일클론 항체에 에피토프를 포함하는 비-전장 Stx2 폴리펩타이드를 함유하는 조성물을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 Stx2 단백질의 11E10 에피토프에 특이적인 항- Stx2 항체를 생산하는 방법을 특징으로 한다. 추가적으로, 본 발명은 시가 독소 관련 질병 (예, 용혈성 요독 증후군 및 대장균 및 시겔라 이질균 감염과 연관된 질병)을 보유하고 있거나 이의 발병 위험에 놓인 대상체를, 본 발명의 방법들을 이용하여 개발한 11E10 에피토프를 포함하는 폴리펩타이드 또는 항-Stx2 항체로 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다. 더욱이, 본 발명은 본 발명의 방법들을 이용하여 개발한 항체들을 이용하여 시료 내에서 Stx2를 검출하는 것을 특징으로 한다.

(72) 발명자

스미스, 마이클

미국 20904 메릴랜드 실버 스프링 캐슬 불러바드  
14134 아파트먼트 101

싱클레어, 제임스

미국 21230 메릴랜드 볼티모어 이. 기팅스 스트리  
트 106

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (i) 서열번호 1;
- (ii) 서열번호 1 및 2; 또는
- (iii) 서열번호 1, 2, 및 3; 및

#### 비-Stx2 단백질 스캐폴드

를 포함하고, Stx2의 항원성을 가지고, 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 서열번호 1; 서열번호 1 및 2; 또는 서열번호 1, 2 및 3은 상기 비-Stx2 단백질 스캐폴드 내에 삽입되어 있는 것인, 정제된 폴리펩타이드.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 스캐폴드가 Stx1 또는 그것의 단편을 포함하는 것인 정제된 폴리펩타이드.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 64-122와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 정제된 폴리펩타이드.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 변성독소화 상태인 정제된 폴리펩타이드.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 핵산 분자.

#### 청구항 6

제5항의 핵산 분자를 포함하는, 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 벡터.

#### 청구항 7

제6항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 8

- 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드로 인간을 제외한 포유동물을 면역화시키는 단계, 및
  - 시가(Shiga) 독소 2형 (Stx2) 단백질의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-Stx2 항체를 상기 포유동물의 조직 또는 상기 조직을 이용해서 만든 하이브리도마로부터 정제하는 단계
- 를 포함하는, 시가 독소 2형 (Stx2) 단백질의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-Stx2 항체를 생산하는 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 면역화시키는 단계가 항원보강제의 사용을 더 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 10

제8항에 있어서, 시험관 내 중화 분석법에서 Stx2 및 Stx1에 대하여 상기 항체를 스크리닝하는 단계를 더 포함하고, 여기서 Stx2의 세포독성 효과의 적어도 50%를 중화시키는 항체가 Stx2 단백질의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-Stx2 항체인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 시험관 내 중화 분석법에서 Stx2 및 Stx1에 대하여 상기 항체를 스크리닝하는 단계를 더 포함하고, 여기서 Stx2의 세포독성 효과의 적어도 50%를 중화시키는 항체가 Stx2 단백질의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-Stx2 항체인 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 포함하는, 대상체에서 시가 독소 매개 질병을 치료하거나 예방하기 위한 의약.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 시가 독소 매개 질병이 용혈성 요독 증후군 또는 대장균 (*E. coli*) 또는 시겔라 이질균 (*S. dysenteriae*) 감염과 연관된 질병인 의약.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

일반적으로 본 발명은 시가 독소 관련 질병을 치료하고 예방하는 기술분야에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002]

미국에서 시가 독소(Shiga toxin, Stx)-생산 대장균 (STEC)은 매년 약 110,000건의 감염의 원인이 되고 있다. 특히 혈청형이 O157:H7인, 장출혈성 대장균(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)은 Stx 매개 질병을 생성하는 것으로 유명한 STEC 소집단이다. Stx-생산 유기체 감염으로부터 가능한 합병증은 용혈성 요독 증후군(hemolytic uremic syndrome, HUS)으로, 이는 용혈성 빈혈, 혈전성 저혈소판증, 및 신부전을 특징으로 한다. HUS 보유자들의 경우 대략 5-10% 치사율을 보이며, 생존자들은 만성 신장 손상을 가질 수도 있다. 현재로서는 Stx 매개 질병과 싸우거나 예방하기 위한 FDA 승인 치료법 또는 백신이 없지만, 장래에 몇가지 유망한 방법이 있는바, Stx2에 결합해서 그것을 중화시키는 인간화된 단일클론 항체 및 중화반응을 유도하여 Stx1 또는 Stx2 또는 Stx1 및 Stx2의 치사 가능성으로부터 보호하는 키메라 StxA2/StxB1 변성독소(toxoid)이다.

[0003]

본질적으로 Stx에는 두 가지 주된 유형이 있는바, Stx/Stx1 및 Stx2이다. Stx는 시겔라 이질균(*Shigella dysenteriae*) 1형으로부터 생산되는 한편, Stx1 및 Stx2는 대장균(*Escherichia coli*)에서 생산된다. Stx1 및 Stx2는 거의 동일하며, A 서브유닛(subunit)에 있어서 단지 1개의 아미노산만 다르다. Stx1 및 Stx2의 성숙 A 및 B 서브유닛들은 각각 68 및 73% 유사성을 갖는다. 상기 아미노산 서열 차이에도 불구하고, Stx1 및 Stx2의 결정 구조는 매우 흡사하다 (도 1). 이 독소들은 다클론 항혈청에 의해 구별될 수 있는데, Stx1에 대하여 생성된 다클론 항혈청은 Stx2를 중화하지 않으며, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. Stx1 및 Stx2의 변이체들이 존재하며, Stx1c, Stx1d, Stx2c, Stx2d, Stx2d-활성형 (Stx2-act.), Stx2e, 및 Stx2f가 있다.

[0004]

시가 독소는 AB<sub>5</sub> 구조를 갖는 복잡한 홀로톡신(holotoxin)이다. 이의 활성 도메인 (A)는, 60S 리보솜 서브유닛의 28S rRNA에서 푸린을 제거하는 N-글리코시다아제를 함유하는데, 이 효소는 단백질 합성을 막아서, 궁극적으로 세포사를 유발한다. 상기 A 서브유닛은 약 32 kDa이고, 트립신이나 퓨린(furin)에 의해서 단백질분해되면서, 단일 이황화 결합으로 연결되어 있는 약 28 kDa A<sub>1</sub> 서브유닛과 약 5 kDa A<sub>2</sub> 웨타이드로 잘려진다. A<sub>1</sub> 서브유닛은 상기 활성 도메인을 포함하고, A<sub>2</sub> 웨타이드는 비공유 방식으로 상기 활성 도메인을 결합 (B) 도메인에 연결한다. 상기 (B) 도메인은 상기 A<sub>2</sub> 웨타이드의 C 말단이 가로지르는 오량체를 형성하는 5 개의 동일한 약 7.7 kDa 단량체로 이루어져 있다. 각각의 상기 B 서브유닛 단량체는 각 단량체 내에서 이황화 결합을 형성하는 2개의 시스테인 잔기를 갖고 있다. 상기 B 오량체는 진핵성 수용체 글리보트리아오실 세라마이드(globotriaosyl ceramide, Gb<sub>3</sub>) (Stx2e의 경우에는 Gb<sub>4</sub>임)에 결합한다.

[0005]

이 독소들에 대한 노출에 대해 알려진 결과에도 불구하고, 현재로서는 Stx-매개 질병을 위해 알려진 치료법이나 백신이 없다. 항생제를 사용하게 되면 박테리아로부터 독소 방출을 증대시킴으로써 상황을 악화시키게 된다. 이

에 따라, 시가 독소에 의해 형성되는 EHEC 감염 합병증들을 예방하거나 치료하기 위한 화합물이 요구되고 있다. 그러한 화합물은 감염된 대상체를 치료하고, CNS, 혈액, 및 신장에 대한 독소의 전신성 효과를 줄이는 데에 사용될 수 있을 것이다. 추가적으로, 이 독소가 중화될 수 있다면, 위장관 내에서 박테리아를 죽이기 위해 항생제를 안전하게 공급할 수 있을 것이다. STEC 감염에 대하여 항생제 처리하는 것은 금지되어 왔는데, 항생제가 독소 유전자를 운반하는 과자를 유도하게 되어서 독소 생산을 증가시킬 우려가 있기 때문이다. 그런 화합물은 또한 노출되었거나 고위험 대상체들을 EHEC 감염 전에 치료함으로써 감염 합병증들을 방지하는 데에도 사용될 수 있을 것이다. 이러한 대상체에는 탁아소 소아충 또는 양로원 장년충이 포함될 것이며, 이곳들에서 EHEC 설사 환자가 발견된 바 있다. 이런 대상체들은 EHEC 감염이 발병할 위험이 큼데, 종종 심각한 합병증을 동반하며, 이런 환경들에서 EHEC가 퍼지는 것은 특이한 일이 아니다.

## 발명의 내용

### [0006] 발명의 요약

단일클론 항체 11E10는 Stx2의 A 서브유닛을 인식하고 그것의 세포독성을 중화시킨다. StxA1 및 StxA2 간의 68% 아미노산 (aa) 서열 유사성에도 불구하고, 상기 11E10 단일클론 항체는 StxA1에는 결합하지 않는다. 본 발명자들은 11E10 에피토프가 상기 StxA2 단량체 상의 세균데 영역에 걸쳐 있는 불연속적이거나, 또는 배좌의 (conformational), 에피토프를 망라한다는 사실을 발견하였다. 상기 세균데의 비유사영역에는, aa 42-49 (서열 번호 1), 96-100 (서열번호 2) 및 244-259 (서열번호 3)이 있는데, 상기 Stx2 A 서브유닛의 결정 구조 상에서 서로 근접하게 위치하는 것으로 나타나고 있다. 이에, 본 발명자들은 상기 11E10 에피토프가 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 서열 중에서 적어도 하나, 둘, 또는 세개 모두를 포함하는 것을 발견했다.

따라서, 본 발명은 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 아미노산 서열 중에서 적어도 하나, 둘, 또는 세개를 포함하는 폴리펩타이드를 특징으로 하고, 여기서 상기 폴리펩타이드는 전장(full length) Stx2가 아니다. 상기 폴리펩타이드는 적어도 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 폴리펩타이드는 서열 번호 1 및 2 또는, 더욱 바람직하게는, 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 일 실시양태에서는, 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 서열 중 하나 이상이 비-Stx2 단백질 스캐폴드(scaffold)에 삽입되어 있다. 특정 실시양태들에서, 상기 단백질 스캐폴드는 Stx1 또는 그것의 단편과 실질적으로 동일한 단백질, 예를 들면, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 단백질이다. 일 실시양태에서, 상기 단백질 스캐폴드는 Stx1, Stx, 또는 하나 이상의 보존적 점 돌연변이(conservative point mutation)를 갖는 Stx1이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하고 있다. 또 다른 실시양태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1, 2, 또는 3; 서열번호 1 및 2; 또는 서열번호 1, 2, 및 3을 포함하는 Stx2의 단편, 예를 들면, Stx2 폴리펩타이드 서열 중 아미노산 29-297, 아미노산 1-158, 또는 아미노산 29-128을 포함할 수도 있고, 여기서 상기 단편은 전장 Stx2가 아니다. 몇몇 실시양태에서, 상기 단편은 단백질 스캐폴드, 예를 들면, Stx 또는 Stx1 내로 삽입되어 있다.

본 발명은 또한 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열의 단편과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 상기 단편은 서열번호 8의 아미노산 64-122와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함하며, 적어도 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 더욱 포함한다. 바람직하게는, 상기 단편은 서열번호 2 또는 서열번호 2 및 3에 나타난 아미노산 서열을 더욱 포함한다. 상기 단편은 예를 들면, 20, 40, 59, 60, 150, 200, 219, 236, 250, 300, 또는 314개 아미노산 길이일 수도 있다. 특정 실시양태들에서, 상기 폴리펩타이드는 변성독소 상태이다. 상기에서 언급된 모든 폴리펩타이드는 용어 "본 발명의 폴리펩타이드" 내에 포함된다.

또한 본 발명은 핵산 분자를 포함하는데, 상기 핵산은 벡터 내 발현구조체에 연결되어 있으며, 여기서 이 벡터는 본 발명의 폴리펩타이드 중 어느 하나를 암호화하면서, 숙주 세포 내로 삽입된다.

관련된 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드 중 어느 하나를 사용하여 Stx2에 대한 면역 반응을 촉진하기 위한 조성물을 특징으로 한다. 바람직하게는, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 및 2 또는, 더욱 바람직하게는, 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 서열을 포함한다. 이를 실시예 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 항원보강제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다. 특정 실시양태들에서, 상기 조성물은 Stx1에 대한 면역 반응을 촉진하지 않는다.

또한 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드 중 어느 하나의 용도를 특징으로 한다 (예를 들면, 서열번호 1, 2, 또

는 3 종 적어도 하나, 둘, 또는 셋 모두에 나타난 아미노산 서열이 삽입된 Stx1 등의 단백질 스캐폴드). 이 웹 타이드들은 용혈성 요독 증후군을 포함한 시가 독소 관련 질병 및 대장균 및 시겔라 이질균 감염과 연관된 질병들에 대한 면역화 또는 치료에 유용할 수 있다. 일 실시양태에서, 상기 웹타이드는 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 Stx2의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-Stx2 항체 (예, 단일클론 및 다클론 항체) 또는 그 단편을 생산하는 방법을 특징으로 한다. 이런 항체들 또는 단편들은 Stx2에 특이적으로 결합하지만, Stx1에는 그렇지 않다. 본 방법은 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 서열 중 적어도 하나, 둘, 또는 셋을 포함하는 Stx2 단편 (즉, 전장 Stx2가 아님)을 포함하는 폴리웹타이드로 포유동물을 면역화하는 것을 포함하는데, 여기서 본 폴리웹타이드는 전장 Stx2를 포함하지 않는다. 바람직하게는 본 방법은 적어도 서열번호 1에 나타난 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 1 및 2에 나타난 서열, 및 더욱 바람직하게는 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 서열을 가지는 폴리웹타이드를 이용하는 것을 포함한다. 일 실시양태에서, 상기 웹타이드는 단백질 스캐폴드, 예를 들면 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 아미노산 서열 중 하나 이상이 삽입된, Stx1과 실질적으로 동일한 단백질을 포함한다. 본 방법은, 예를 들면 본원에 설명된 바와 같이 11E10 에피토프를 갖는 폴리웹타이드로 포유동물을 면역화시키는 것을 포함할 수도 있는데, 여기서 상기 폴리웹타이드는 전장 Stx2를 포함하고 있지 않다. 일 실시양태에서, 포유동물은 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리웹타이드로 면역화된다. 상기 방법들에 의해 생산된 항-Stx2 항체는 당업계에 공지되었거나 예를 들면 시험판내 중화 실험을 포함하여 본원에 설명된 표준 방법을 사용하여 스크리닝되어, Stx2에 특이적으로 결합하고 Stx1에는 그렇지 않은 항체를 동정할 수 있다. 면역원성 폴리웹타이드 및 이 폴리웹타이드를 제조하는 방법들 또한 이 폴리웹타이드를 암호화하는 핵산 분자와 함께 (이 핵산이 벡터 내 발현 구조체에 연결되는 곳, 및 이 벡터가 숙주 세포 내로 삽입되는 곳을 포함함), 본 발명의 연관된 측면들로서 포함된다.

[0013] 또한 본 발명은 Stx2의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하되, Stx2에 특이적으로 결합하고 Stx1에는 그렇지 않은 항-Stx2 항체 또는 그 단편을 특징으로 한다. 본 발명의 바람직한 항체는, 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 서열 중 하나, 둘, 또는 셋 모두를, 바람직하게는 적어도 서열번호 1을, 더욱 바람직하게는 적어도 서열번호 1 및 2를, 그리고 가장 바람직하게는 서열번호 1, 2, 및 3을 포함하는 에피토프에 결합한다. 상기 항체 에피토프는 아미노산 서열이 상기 단백질 스캐폴드 구조에 기반하여 근접한, 예를 들면 본원에서 설명된 키메라 단백질에서처럼 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 Stx2 서열 중 하나 이상이 Stx1과 실질적으로 동일한 단백질 스캐폴드 내로 삽입되어 있는, 배좌 에피토프일 수 있다. 상기 항체는 IgG, IgM, IgE, IgD, IgA, Fab, Fv, 단일클론 및 다클론 항체이거나, 항체 단편일 수 있으며, 본원에 설명된 방법들에 의해 개발된 것일 수 있다. 상기 항체는 바람직하게는 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 또는 1 pM 또는 그 이하의  $K_d$ 를 갖는 Stx2에 결합한다. 일 실시양태에서 본 발명의 항체는 11E10 항체가 Stx2 또는 상기 11E10 에피토프를 갖는 키메라 단백질에 결합하는 것을 억제하는데, 100 nM 내지 1 pM의  $K_d$  값으로 억제하는 것을 포함한다. 본 발명의 항체는 Stx2 가 진핵성 수용체 글리보트리아오실 세라마이드 (Gb3)에 결합하는 것을 억제할 수도 있다. 본 발명의 항-Stx2 항체는 구체적으로 하기 항체들 11E10, TMA-15, VTM1.1, 5C12 (5C12 인간 단일클론 항체 및 r5C12를 포함함), 6G3, 5H8, 11F11, 11G10, 2E1, 10E10, 1G3, 2F10, 3E9, 4H9, 5A4, 5F3, 5C11, 1A4, 1A5, BC5 BB12, DC1 EH5, EA5 BA3, ED5 DF3, GB6, BA4, 및  $\alpha$ Stx2 항체의 마우스, 인간화, 또는 키메라 형태를 배제한다. 본 발명은 본 발명의 항체 중 어느 하나를 생산하는 하이브리도마 세포주를 더 포함한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 항-Stx2 항체 중 어느 하나를 사용해서 생물학적 시료 (예, 조직, 세포, 세포 추출물, 체액, 및 생검 시료) 내에서 Stx2를 검출하는 방법을 특징으로 한다. 본 발명의 검출 방법은 ELISA, RIA, 웨스턴 블로트(Western blotting), 면역침강법(immunoprecipitation), 및 유세포분석(flow cytometry)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명은 시료 내 Stx2 동정을 기반으로 시가 독소-관련 질병에 대해 진단하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 시가 독소-관련 질병을 검출하기 위한 면역학적 시험 키트를 특징으로 하는데, 상기 키트는 본 발명의 항체와, 상기 항체 및 상기 시료 내 존재하는 Stx2 간의 상호작용을 검출하기 위한 수단을 포함한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 제공된 것 또는 상술한 방법들 중 어느 하나에 의해 생산된 것과 같은 항체를 사용하여 시가 독소 관련 질병을 치료하는 방법을 특징으로 한다. 시가 독소 관련 질병의 예로는 용혈성 요독 증후군(HUS) 및 대장균 및 시겔라 이질균 감염 연관 질병이 포함된다. 이 항체들은 다른 시가 독소 관련 단백질 (예, Stx1)에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하나 이들에만 한정되지 않는, 다른 치료법들과 함께 투여 가능하다.

- [0016] "11E10 에피토프"란, 선형 구조에 기인해서든지 삼차원 구조에 기인해서든지, 11E10 항체에 대한 결합 부위를 형성하는 아미노산 서열을 의미한다. 이 용어는 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 서열 중 하나, 둘, 또는 셋(예, 서열번호 1 및 2 또는 서열번호 1, 2, 및 3)과 동일하거나 실질적으로 동일한 서열을 포함하는, 임의의 비-전장 Stx2 단백질을 포함할 수도 있다. 바람직한 실시양태들에서, 상기 11E10 에피토프는 서열번호 1 및 2 또는 1, 2 및 3을 포함한다. 11E10 에피토프를 포함하는 단백질의 일례는 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단백질이다.
- [0017] 용어 "Stx2의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체" 또는 "11E10 에피토프-특이적 항체"란 100 nM 내지 1 pM의  $K_d$  값으로 상기 11E10 에피토프를 포함하는 단백질에 결합하는 항체를 의미한다. 그런 항체들은 또한 상기 Stx1 단백질에 대한 결합을 거의 또는 전혀 탐지할 수 없는 것을 특징으로 한다 (예, Stx1 경우, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM 또는 그 이상의  $K_d$  값을 가짐). 항체 친화도는 표면 플라즈몬 공명법(surface plasmon resonance based assay), 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA), 및 경합법(competition assay)(예, RIA)을 포함하지만 이들에만 한정되지 않는, 당업계에 공지된 임의의 분석법을 사용하여 결정할 수도 있다. 또한, 상기 항체는 본원에 설명된 바와 같이 시험관 내 중화 분석법에 이용될 수도 있다. 상기 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체는 본원에 설명되었거나 당업계에 공지된 분석법들을 이용해서 Stx2의 세포독성 효과를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 또는 그 이상까지 중화시킬 수도 있다. 본 용어는 구체적으로 하기 항-Stx2 항체의 마우스, 키메라, 인간화 또는 인간 형태를 배제한다: 11E10, TMA-15, VTM1.1, 5C12 (5C12 인간 단일클론 항체 및 r5C12 (문헌 [아키요시 및 치포리(Akiyoshi and Tzipori) (2005) *Infect. Immun.* 73:4054-4061]) 포함), 6G3, 5H8, 11F11, 11G10, 2E1, 10E10 (문헌 [페레라(Perera) 등 (1988) *J. Clin. Microbiol.* 26:2127-2131]), 1G3, 2F10, 3E9, 4H9, 5A4, 5F3, 5C11, 1A4, 1A5 (문헌 [마(Ma) 등 (2008) *Immunol. Lett.* 121:110-115 (2008)]), BC5 BB12, DC1 EH5, EA5 BA3, ED5 DF3, GB6, BA4 (문헌 [다운스(Downes) 등 (1988) *Infect. Immun.* 56:1926-1933]), c a Stx2 항체, 문헌 [스미스(Smith) 등 (2006) *Vaccine* 24:4122-4129]에 설명된 항체, 문헌 [도노휴-롤프(Donohue-Rolfe) 등 (1999) *Infect Immun.* 67:3645-364]에 설명된 항체, 및 문헌 [셰오란(Sheoran) 등 (2003) *Infect Immun.* 71:3125-3130]에 설명된 항체.
- [0018] "결합을 억제한다"란, 예를 들면, 본원에 설명된 웨스턴 블로트이나 당업계에 공지된 ELISA 또는  $Gb_3$  수용체 결합 분석법으로 측정하였을 때, 하나의 단백질의 다른 단백질에 대한 결합을 적어도 50%, 바람직하게는 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상까지 감소시키는 것을 의미한다.
- [0019] 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되며, 단일클론 항체 (전장 단일클론 항체를 포함함), 다클론 항체, 다중특이성 항체 (예, 이중특이성 항체), 또는 항체 단편을 포함하는데, 단, 이런 분자들은 원하는 생물학적 활성을 갖는다(예, 본원에 설명된 것과 같은 상기 Stx2 독소의 중화).
- [0020] 본원에 사용된 바, "정제된" 또는 "분리된"이란 그 본래 환경의 구성요소로부터 동정되고 분리 및/또는 회수된 단백질을 가리킨다. 그 본래 환경의 오염 요소들은 일반적으로 상기 단백질에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해하게 되는 물질들이며, 효소, 호르몬, 및 기타 단백성 또는 비-단백성 용질들을 포함할 수도 있다.
- [0021] "변성독소화된(toxoided)"이란, 예를 들면 돌연변이, 접합, 또는 가교에 의해서 항원성을 유지시키면서 세포독성을 줄이는 식으로 변경된 것을 의미한다. Stx2의 변성독소화된 형태에는 포름알데히드 및 글루타르알데히드 처리된 Stx2 및 Y77S 돌연변이 보유 Stx2가 포함된다. 변성독소화된 Stx 단백질의 기타 비한정적 예에는 Y77S 및 E167Q 돌연변이 보유 Stx2 (문헌 [웬(Wen) 등 (2006) *Vaccine* 24: 1142-1148]), E167D 및 6 히스티딘 태그 보유 Stx2 (문헌 [로빈슨(Robinson) 등 (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:9667-9672]), Y77S, E167Q, 및 R170L 돌연변이 보유 StxA2/StxB1 변성독소 (문헌 [스미스(Smith) 등, *Vaccine* 24:4122-4129 (2006)])가 있다. 다른 예들은 문헌 [고돈(Gordon) 등 (1992) *Infect. Immunol.* 60(2):485-490]에 설명되어 있다.
- [0022] "비-전장(non-full length) Stx2"란 전장 Stx2 폴리펩타이드 보다 아미노산을 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60% 미만, 또는 더 적게 포함하는 단백질을 의미한다. 비-전장 Stx2의 예에는 서열번호 4-8에 나타난 아미노산 서열이 포함되지만 이들에만 제한되는 것은 아니다. 다른 예로는 예를 들면 도 1a에 제시된 키메라 폴리펩타이드를 비롯하여, Stx2의 29-297, 1-158, 또는 29-128 아미노산을 포함하거나 이들로 이루어진 폴리펩타이드가 있다. 야생형 Stx1, Stx2의 A 서브유닛 또는 본 출원 내에 설명된 키메라 독소들은 모두, 제거되어서 성숙 A 서브유닛 단백질을 생성하는 22개 아미노산 선도서열을 갖는다.
- [0023] 본 명세서를 위해서 용어 "전장(full-length) Stx2" 및 Stx2 단편들의 아미노산 번호는 전장 성숙 StxA2 서브유

닛을 참조로 한 것이다. 이 성숙 A 서브유닛은 이후 트립신이나 퓨린에 의해서 A1 단편 (N-말단의 약 248 아미노산) 및 A2 웨타이드 (C-말단의 약 50 아미노산)으로 비대칭적으로 잘린다. 상기 A 서브유닛은, 천연형이든 키메라 형태이든지, 홀로톡신 측면으로 존재하는 것이 일반적이다; 그러나, 단독 발현시 (예, B 서브유닛 없이), A 서브유닛 또는 그 단편은 상기 11E10 에피토프에 대한 면역 반응을 유도할 수 있을 것이다.

[0024] 본원에 사용된 바, 용어 "단백질 스캐폴드" 또는 "스캐폴드"는 그 안에 이종 단백질의 하나 이상의 아미노산 서열, 예를 들면 서열번호 1, 2, 또는 3에 나타난 Stx2 아미노산 서열이 삽입된 단백질 구조를 가리킨다. 바람직하게는, 단백질 스캐폴드의 삼차원 구조가 공지되어 있고, 상기 이종 단백질의 단편은 전략적 위치, 예를 들면 표면이 노출된 루프 또는 상기 단백질 스캐폴드와 상기 이종 단백질 간에 구조적 상동성을 지닌 영역에 삽입된다. Stx2의 단편 삽입은, 상기 단백질 스캐폴드의 특정 서열, 예를 들면 삽입될 서열과 구조적 상동성을 지닌 서열의 선택적 제거를 수반할 수도 있다. 본 예시에서, 단백질 스캐폴드에서 제거되지 않은 서열은 예를 들면 Stx1인 또 다른 단백질에 대한 서열 동일성 백분율을 결정하기 위해 사용될 수도 있다. 단백질 스캐폴드로서 사용된 예시적 단백질은 Stx 또는 Stx1 (본원에 설명됨), 녹색 형광 단백질 (문헌 [아베디(Abedi) 등 (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:623-630]), 및 세포독성 T-림프구-연관 항원 4 (CTLA-4) (문헌 [후프톤(Hupton) 등 (2000) *FEBS lett.* 475:225-231])다. 단백질 스캐폴드들은 구체적으로는 단백질 태그, 예를 들면, 그 말단에 이종 단백질 서열이 융합되어 있는, FLAG 에피토프 또는 글루타치온-S-전이효소를 배제시킨다.

[0025] "실질적으로 동일한"이란, 예를 들면 아래에 설명된 방법들을 사용하여, 최적 배열되었을 때, 예를 들면 Stx2, Stx1, 또는 서열번호 8에 나타난 것 같은 키메라 단백질인 제2 핵산 또는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 공유하는, 핵산 또는 아미노산 서열을 의미한다. "실질적 동일성"은 전장 서열, 에피토프 또는 면역원성 웨타이드, 기능성 도메인, 암호화 및/또는 조절 서열, 엑손, 인트론, 프로모터, 및 개놈 서열과 같은 다양한 종류 및 길이의 서열을 가리키기 위해서 사용될 수도 있다. 두 개의 폴리웨타이드 또는 핵산 서열 간의 동일성 백분율은 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방식, 예를 들면 스미스 워터만 배열(Smith Waterman Alignment) (문헌 [스미스(Smith), T. F. 및 M. S. 워터만(Waterman) (1981) *J. Mol. Biol.* 147:195-7]); GeneMatcher Plus<sup>TM</sup> (문헌 [슈와츠와 데이호프(Schwarz and Dayhoff) (1979) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Dayhoff, M.O., Ed pp 353-358])에 통합된 것과 같은 "베스트 펫(Best Fit)" (문헌 [스미스 앤드 워터만(Smith and Waterman) (1981) *Advances in Applied Mathematics*, 482-489]); BLAST 프로그램 (Basic Local Alignment Search Tool (문헌 [알트슐(Altschul), S. F., W. 기쉬(Gish), 등 (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10]), BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL, 또는 메가일라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어 등 공개적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어로 결정된다. 추가적으로, 당업자들이라면 비교되고 있는 서열의 길이 대비 최대한의 배열을 달성하는 데에 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 배열 측정을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 일반적으로, 단백질의 경우, 비교 서열의 길이는 상기 단백질의 적어도 5개 아미노산, 바람직하게는 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 또는 315개 아미노산 또는 그 이상으로 총 길이까지일 수 있다. 핵산의 경우, 비교 서열의 길이는 일반적으로 상기 핵산 분자의 적어도 15, 75, 150, 300, 450, 600, 900, 또는 945개 뉴클레오티드 또는 그 이상으로 총 길이까지일 수 있다. DNA 서열을 RNA 서열과 비교할 때에 서열 동일성을 결정하기 위해서, 티민 뉴클레오티드가 우라실 뉴클레오티드에 대응되는 것은 이해될 것이다. 일 실시양태에서, 단백질, 예를 들면, 시가 독소 단백질의 성숙 A 서브유닛의 서열 동일성은 서열번호 8의 단편의 길이에 대하여, 예를 들면 서열번호 8의 64 내지 122 또는 64 내지 282 아미노산으로부터 측정 가능하다. 아미노산 서열의 경우, 일반적으로 보존적 치환에는 하기 그룹 이내에서의 치환이 포함된다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 라이신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신.

[0026] "단편(fragment)"이란, 기준 핵산 분자 또는 폴리웨타이드의 전체 길이의 100% 미만, 바람직하게는 적어도 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%를 포함하는 폴리웨타이드 또는 핵산 분자의 일부분을 의미한다. 하나의 단편은 예를 들면, 10, 15, 75, 150, 300, 450, 600, 900, 또는 945개 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 4, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 315개 아미노산 또는 그 이상을 포함할 수도 있다. 시가 독소 1형 또는 시가 독소 2형 단백질의 단편은 상기 전장 단백질보다 적은 임의의 부분, 예를 들면 4, 5, 8, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 315개, 또는 그 이상의 아미노산 길이의 단편을 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 단편은 서열번호 8의 64 내지 122 또는 64 내지 282 아미노산을 포함한다.

[0027] "시가 독소 관련 질병"은 시가 독소를 발현하는 병원균으로부터 야기되는 임의의 질병을 의미한다. 용어 "시가 독소 관련 질병" 용혈성 요독 증후군, 세균성이질, 및 시가 독소-생산 대장균 및 시겔라 이질균 감염에 기인한

질병을 포함하는 것으로 의도되었다.

### 도면의 간단한 설명

[0028]

도 1a는 초기 하이브리드 Stx1/Stx2 A 서브유닛을 도시한다. Stx1은 검은색으로 나타나 있고, Stx2는 흰색으로 표시되어 있다. 키메라 독소들의 명칭이 각각의 키메라 단백질의 좌측에 제시되어 있고, Stx2의 영역들은 키메라 A 서브유닛 아래에 나열되어 있다.

도 1b는 토끼 항-Stx1 및 항-Stx2 다클론 11E10 (상단 패널) 또는 단일클론 11E10 (하단 패널)으로 프로브시킨, Stx1, Stx2 및 초기 키메라 독소에 대한 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 1 및 2 레인은 25 ng의 정제된 Stx1 또는 Stx2를 각각 함유하고 있다. 3 내지 8 레인은 다음과 같은 키메라 독소를 함유하고 있다: 3 레인, Stx1(2A<sub>29-297</sub>); 4 레인, Stx1(2A<sub>1-158</sub>); 5 레인, Stx1(2A<sub>29-128</sub>); 6 레인, Stx1(2A<sub>29-76</sub>); 7 레인, Stx1(2A<sub>42-76</sub>); 8 레인, Stx1(2A<sub>42-49</sub>).

도 1c는 11E10 단일클론 항체에 의한 초기 키메라 독소의 중화 백분율을 보여준다. 상기 중화 데이터는 전장 Stx2의 중화 %가 100% (실제 중화 % = 65%)에 맞춰지도록 정규화되었고, 나머지 독소들에 대한 중화 수준은 상기 정규화된 전장 Stx2 중화에 대한 백분율로 주어진다. 오차 선들은 상기 정규화된 값들의 표준 오차를 나타낸다.

도 2a는 11E10 단일클론 항체 에피토프를 포함하는 세 개의 영역에서의 StxA1 및 StxA2의 아미노산 배열을 보여준다. 검은색과 회색 아미노산들은 각각 보존 및 비-보존 아미노산들을 나타내고; 점들은 동일한 잔기들을 나타낸다. 11E10 단일클론 항체 에피토프의 세 개의 영역은 다음과 같다: A 영역 (StxA2 잔기 42-49), B 영역 (StxA2 잔기 96-100); C 영역 (StxA2 잔기 244-259). 본 배열에서 나타난 아미노산 번호는 StxA1 성숙 단백질에 대한 것이다. StxA1은 185번 위치에 추가(extra) 아미노산을 갖는다; 이러한 추가로 인해 StxA2에서 상기 에피토프 C 영역이 Stx1의 대응하는 영역에 비해 하나의 수가 차이나게 된다.

도 2b는 11E10 단일클론 항체 에피토프의 세 개 영역을 제외하고, Stx2 A<sub>1</sub> 및 B 서브유닛을 밝은 회색으로 보여주는 Stx2 결정 구조의 리본 다이어그램을 보여준다. 영역 A (녹색), B (청색), 및 C (시안색)는 각각 검은색, 회색, 그리고 흰색 화살표로 표시되어 있다. A<sub>2</sub> 웅타이드는 검은색으로 나타나 있고, 활성 부위 (적색)는 별표로 표시되어 있다.

도 2c는 Stx2 결정 구조에 대한 공간채움 도시이다. A, B, 및 C 영역은 화살표로 표시되어 있다.

도 3a는 키메라 A 서브유닛을 함유하는 제2 세대 키메라 독소들을 도시하고 있다. Stx1은 검은색으로 나타나 있고, Stx2는 흰색으로 보여진다. 키메라 독소들의 명칭은 각각의 키메라 단백질의 좌측에 나타나 있고, Stx2의 영역들은 키메라 A 서브유닛 아래에 나열되어 있다. A, B, 및 C 영역은 각각 StxA2의 아미노산 42-49 (서열번호 1), 96-100 (서열번호 2), 244-259 (서열번호 3)을 지칭한다.

도 3b는 토끼 항-Stx1 (상단 패널) 또는 11E10 단일클론 항체 (하단 패널)으로 프로브시킨, Stx1, Stx2 및 5개의 2 세대 키메라 독소에 대한 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 1 레인은 25 ng의 정제된 Stx2를 함유하고 있다. 2 내지 6 레인은 다음과 같은 키메라 독소를 함유하고 있다: 2 레인, Stx1 +A; 3 레인, Stx1 +AB; 4 레인, Stx1 +AC; 5 레인, Stx1 +BC; 6 레인, Stx1 +ABC.

도 3c는 11E10 단일클론 항체에 의한 제2 세대 하이브리드 독소의 중화를 보여준다. Stx2 중화 수준은 도 1c에서처럼 100%로 정규화되었다. 오차 선들은 상기 정규화된 값들의 표준 오차를 나타낸다.

도 4A는 11E10 단일클론 항체와 함께 Stx2 및 Stx2 변이체의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 1 레인은 25 ng의 정제된 Stx2를 함유하고 있다. 2 내지 5 레인은 다음과 같은 독소를 함유하고 있다: 2 레인, Stx2c; 3 레인, Stx2d; 4 레인, Stx2d<sub>act</sub>; 5 레인, Stx2e. 본 웨스턴 블롯은 토끼 항-Stx2 다클론 항체 (상단 패널) 또는 단일클론 항체 11E10 (하단 패널)으로 프로브되었다.

도 4B는 Stx2 변이체의 11E10에 의한 중화 백분율을 보여준다. Stx2 중화 수준은 도 1c에서처럼 100%로 정규화되었다. 오차 선들은 상기 정규화된 값들의 표준 오차를 나타낸다.

도 5는 토끼 망상적혈구 용해물에서 루시페라제 mRNA의 번역에 의해 측정한 단백질 합성 억제를 도시한다. 0.2 ng 분취량(aliquot)의 정제된 Stx2를 0, 0.2, 또는 2 ng의 11E10과 혼합하고, 망상적혈구 용해물에 첨가하였다.

단백질 합성 억제는 루시페라제 mRNA의 번역 감소로 지시되었으며, 독소-처리 용해물을 루시페라아제 기질에 첨가한 후에 생물발광에 의하여 측정되었다. 아이소타입-매칭된(isotype-matched) 무관한 항체 13C4의 2 ng 시료를 음성 대조군으로서 2 ng Stx2와 혼합하였다. 오차 선들은 평균 비율의 표준 오차로부터 산출된 95% 신뢰구간을 나타낸다. 양측 스튜던트 t-검정 (two-tailed Student's t-Test)에서 유래한 화률(p-value)은 생물발광 신호에 있어서 항체가 있거나 없는 시료들 간에 유의미한 차이를 표시한다 ( $p < 0.005$ ).

도 6A-6J는 단일클론 항체 11E10가 베로(Vero) 세포에서 Stx2의 총 세포내 분포를 변경시킨다는 것을 보여준다. Stx2를 PBS (A, H-J) 또는 11E10 (B, C 및 E-G)과 혼합하고 나서, 베로 세포에 6h 동안 첨가하였다. 대조군으로서, 11E10을 Stx2 부존재 상태에서 베로 세포에 첨가하였다 (D). 독소는 Stx2에 대한 다클론 항체, 이어서 AlexaFluor 488와 접합된 이차 항체로 검출되었으며 (A 및 B), 11E10은 AlexaFluor 488와 접합된 항-마우스 IgG로 검출되었다 (C 및 D). 초기 엔도좀 마커 EEA1와의 Stx2 공동국소화는 독소화된 세포의 더블 라벨링으로 평가되었다. 11E10 항체 존재 (E 패널) 및 부존재 (H 패널) 상태에서 Stx2 분포는 항-Stx2 단일클론 11F11 및 녹색 형광 이차 항체로 가시화되었다. 엔도좀 마커 EEA1의 분포는 염소 항-EEA1 및 적색 형광 이차 항체로 가시화되었다 (F 및 I 패널). 이들 염색 패턴을 중첩시켰으며 (G 및 J 패널), 엔도좀과 독소의 공동국소화는 황색-오렌지색의 유색화에 의해 지시되었고, 화살표로 표시되었다.

도 7A-7D는 Stx2 영역 A (서열번호 1) (도 7A), Stx2 영역 B (서열번호 2) (도 7B), Stx2 영역 C (서열번호 3) (도 7C), 및 Stx2e 영역 B (서열번호 19) (도 7D)의 아미노산 서열을 보여준다.

도 8A는 Stx1+A 키메라 (서열번호 4)의 아미노산 서열을 보여준다. 가공된 선도 서열이 밑줄로 표시되고, Stx2 A 영역은 굵게 밑줄 표시되어 있다. 가공되지 않은 단백질은 315개 아미노산 길이이며; 성숙 단백질은 293개 아미노산 길이이다.

도 8B는 Stx1+AB 키메라 (서열번호 5)의 아미노산 서열을 보여준다. 가공된 선도 서열이 밑줄로 표시되고, Stx2 A 및 B 영역은 굵게 밑줄 표시되어 있다. 가공되지 않은 단백질은 315개 아미노산 길이이며; 성숙 단백질은 293개 아미노산 길이이다.

도 8C는 Stx1+AC 키메라 (서열번호 6)의 아미노산 서열을 보여준다. 가공된 선도 서열이 밑줄로 표시되고, Stx2 A 및 C 영역은 굵게 밑줄 표시되어 있다. 가공되지 않은 단백질은 315개 아미노산 길이이며; 성숙 단백질은 293개 아미노산 길이이다.

도 8D는 Stx1+BC 키메라 (서열번호 7)의 아미노산 서열을 보여준다. 가공된 선도 서열이 밑줄로 표시되고, Stx2 B 및 C 영역은 굵게 밑줄 표시되어 있다. 가공되지 않은 단백질은 315개 아미노산 길이이며; 성숙 단백질은 293개 아미노산 길이이다.

도 8E는 Stx1+ABC 키메라 (서열번호 8)의 아미노산 서열을 보여준다. 가공된 선도 서열이 밑줄로 표시되고, Stx2 A, B 및 C 영역은 굵게 밑줄 표시되어 있다. 가공되지 않은 단백질은 315개 아미노산 길이이며; 성숙 단백질은 293개 아미노산 길이이다.

도 9A는 StxA1 출발 코돈에서 시작하고 StxB1 정지 코돈에서 종료되는 Stx1 오페론의 DNA 서열을 보여준다 (서열번호 9).

도 9B는 StxA1 출발 코돈에서 시작하고 StxA1 정지 코돈에서 종료되는 StxA1 오페론의 DNA 서열을 보여준다 (서열번호 10).

도 9C는 StxB1 출발 코돈에서 시작하고 StxB1 정지 코돈에서 종료되는 StxB1 오페론의 DNA 서열을 보여준다 (서열번호 11).

도 10A는 StxA1의 아미노산 서열을 보여준다 (서열번호 12). 가공된 선도 서열이 밑줄로 표시되어 있다. 가공되지 않은 단백질은 315개 아미노산 길이이며; 성숙 단백질은 293개 아미노산 길이이다.

도 10B는 StxB1의 아미노산 서열을 보여준다 (서열번호 13). 가공된 선도 서열이 밑줄로 표시되어 있다. 가공되지 않은 단백질은 89개 아미노산 길이이며; 성숙 단백질은 69개 아미노산 길이이다.

도 11A는 StxA2 출발 코돈에서 시작하고 StxB2 정지 코돈에서 종료되는 Stx2 오페론의 DNA 서열을 보여준다 (서열번호 14).

도 11B는 StxA2 출발 코돈에서 시작하고 StxA2 정지 코돈에서 종료되는 StxA2의 DNA 서열을 보여준다 (서열번호 15).

도 11C는 StxB2 출발 코돈에서 시작하고 StxB2 정지 코돈에서 종료되는 StxB2의 DNA 서열을 보여준다 (서열번호 16).

도 12A는 StxA2의 아미노산 서열을 보여준다 (서열번호 17). 가공된 선도 서열이 밑줄로 표시되어 있다. 가공되지 않은 단백질은 319개 아미노산 길이이며; 성숙 단백질은 297개 아미노산 길이이다.

도 12B는 StxB2의 아미노산 서열을 보여준다 (서열번호 18). 가공된 선도 서열이 밑줄로 표시되어 있다. 가공되지 않은 단백질은 89개 아미노산 길이이며; 성숙 단백질은 70개 아미노산 길이이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 일반적으로 본 발명은 Stx2 단백질의 11E10 에피토프를 발견한 것과 관련한 조성물 및 방법을 특징으로 한다. 본 발명자들은 11E10 에피토프가 서열번호 1, 2, 및 3에 나타난 서열들 중 적어도 하나, 둘, 또는 셋을 포함한다는 것을 발견해냈다. 본 발명의 조성물과 방법들은 시가 독소-관련 질병의 검출, 치료, 또는 예방에 유용할 수도 있다. 예를 들면, 시가 독소 관련 질병 (예, 용혈성 요독 증후군 및 대장균 및 시겔라 이질균 감염과 연관된 질병들)을 가지고 있거나 발병 위험에 놓인 대상체를 11E10 에피토프 함유 웹타이드 또는 Stx2 단백질의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체로 치료할 수 있다.

#### I. 정후

[0031] 시가 독소 관련 질병들에는, 시가 독소 생산 시겔라 이질균 또는 장출혈성 대장균(EHEC), 특히 혈청형 0157:H7에 의한 감염이 원인이 되는 것들이 포함된다. 이러한 감염으로부터 종종 용혈성 요독 증후군(HUS)이 야기되는데, 이는 용혈성 빈혈, 혈전성 저혈소판증, 및 신부전을 특징으로 한다.

[0032] 본 발명의 화합물 및 방법들은 시가 독소 관련 질병을 보유하고 있거나 발병 위험에 처한 대상체를 치료하는 데에 유용하다. 이러한 대상체에는 탁아소 소아충 또는 양로원 장년충이 포함될 것이다. 하나의 예에서, 대상체는 EHEC 설사 환자가 발견된 탁아소 또는 양로원에 있는 대상체이다. 이 예시에서, 대상체는 이 질병이 발병했을 수도 있고 아닐 수도 있다. 본 발명의 방법 및 조성물들은 EHEC에 감염된 대상체에서의 감염을 치료하고, 다른 감염된 대상체들을 검출하고, 탁아소 또는 양로원에서 EHEC가 퍼지는 것을 예방하는 데에 사용될 수도 있다.

#### II. 항체

[0034] 본 발명은 시가 독소 2형 (Stx2) 단백질의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체의 생산 및 항체 자체를 포함한다. 바람직하게는, 이러한 항체는 Stx1에 검출가능하게 결합하지 않는다. 표적 단백질을 인식하고 특이적으로 결합하는 항체의 독특한 능력은 시가 독소-생산 대장균 (STEC)과 관련된 질병들을 진단하고 치료하기 위한 접근법을 모두 제공한다. 본 발명은 다클론 및 단일클론 항체, 항-유전자형 항체(anti-idiotypic antibodies), 쥐과(murine) 및 기타 포유동물 항체, 항체 단편, 이중특이성 항체, 항체 이량체 또는 사량체, 단체 항체 (예, scFv 및 항원-결합 항체 단편, 예컨대 Fab, 디아바디, 및 Fab'의 단편), 항체 결합 영역 기반 재조합 결합 영역, 키메라 항체, 영장류화(primatized) 항체, 인간화 항체 및 완전 인간 항체(fully human antibodies), 도메인 제거 항체(domain deleted antibodies), 및 검출가능 마커 표지, 또는 독소 또는 방사성 핵종(radionuclide) 커플링 항체를 포함하지만, 이들에만 한정되지 않는 항체의 생산을 제공한다. 이런 항체들은 당업계에 공지된 기존의 방법들을 이용해서 생산된다. 일 측면에서, 본 발명은 Stx2의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 또는 항체 단편을 제조하는 것을 포함하는데, 여기서 제조는 서열번호 1, 2, 또는 3에 나타난 서열들로부터 선택된 적어도 하나, 둘, 또는 세 개의 서열을 함유하는 폴리펩타이드를 이용하는 것을 포함한다. 하나의 예시는 서열번호 8에 나타난 단백질이다.

#### 다클론 항체

[0036] 다클론 항체는 항원을 주입하고 적정 간격으로 후속적으로 부스팅시키는 것에 의해서 토끼나 다른 동물을 면역화시켜서 제조할 수 있다. 동물들을 출혈시키고, 혈청을 일반적으로 ELISA에 의해서, 정제 단백질에 대해서 검정한다.

[0037] 상기 항원 및 항원보강제를 수 회 피하(sc) 또는 복강내(ip) 주사하여 동물에서 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 다클론 항체를 일으킬 수 있다. 이중기능성 또는 유도체화 제제 (예, 말레이미도벤조일 설포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-하이드록시숙신이미드 (라이신 잔기를 통함), 글루타르알데히드, 또는 무수 숙신산)를 사용하여, 11E10 에피토프 함유 웹타이드를 면역화 대상 종 내에서 면역원성인 단백질에 접합시키는 데에 유용할 수도 있다 (예, 열쇠구멍 샷갓조개 해모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 일부

민, 소 티로글로불린(bovine thyroglobulin), 또는 대두 트립신 억제자(soybean trypsin inhibitor)).

[0038] 예를 들면, 1  $\mu\text{g}$  내지 1  $\text{mg}$ 의 웨პ타이드 또는 접합체 (각각 토끼 또는 마우스용)를 3배 부피의 프로인트 완전 항원보강제와 조합하고, 상기 용액을 복수의 부위에 피내(intradermal) 주사함으로써, 동물들을 상기 11E10 애피토프, 면역원성 접합체, 또는 유도체에 대하여 면역화시킬 수 있다. 한달 후에 프로인트 완전 항원보강제 내의 웨პ타이드 또는 접합체의 원래 양의 1/5 내지 1/10으로, 복수의 부위에 피하 주사함으로써 상기 동물들을 부스팅시킨다. 7 내지 14일 후에 상기 동물들을 출혈시키고, 혈청을 상기 항원 또는 그 단편에 대한 항체 역가에 대해 검정한다. 상기 역가가 고평부(plateau)에 달할 때까지 동물들을 부스팅시킨다. 바람직하게는, 상기 동물은 동일한 폴리웨პ타이드의 접합체이지만, 상이한 단백질에 접합된 것 및/또는 상이한 가교 시약을 통해서 접합된 것으로 부스팅시킨다. 접합체들은 또한 재조합 세포 배양물에 단백질 융합으로 형성될 수도 있다. 또한, 면역 반응을 촉진하기 위해 명반(alum) 등의 응집제가 적절하게 사용된다.

[0039] 키메라, 인간화, 또는 완전 인간 다클론 항체들은 인간 면역글로불린 유전자들이 이식된 동물에서 생산되거나, 2 이상의 Stx2 반응성 B-림프구를 대상체에게서 분리하여 출발물질로 사용함으로써 생산될 수도 있다.

[0040] 다클론 항체들은, 단일클론 항체를 공급하기 위해서, 필요하다면 반복적으로, (구조적으로 제한된 항원 웨პ타이드에 대한 친화도를 통해서 등) 정제되고 선별될 수도 있다. 대안적으로든지 추가적으로, 림프구로부터 단일 항체를 암호화하는 핵산을 클로닝해내는 것이 이용될 수도 있다.

#### 단일클론 항체

[0042] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 단일클론 항체는 실질적으로 동종인 단일클론 항체 집단으로부터 획득된다 (즉, 상기 집단에 포함된 개별 항체들은 극소량 존재할지도 모르는 가능한 자연발생 돌연변이를 제외하면 동일하다). 따라서, 단일클론이라는 용어는 항체의 특성이 별개의 항체들의 혼합체가 아닌 것을 나타낸다.

[0043] 단일클론 항체는 당업계에 공지된 방법, 예를 들면 콜러(Kohler)와 밀스테인(Milstein)의 하이브리도마 방법에 의해, 면역화된 마우스의 비장세포(splenocyte)를 계속 복제하는 종양 세포, 예를 들면 골수종이나 림프종 세포와 융합시킴에 의해서 제조 가능하다. (문헌 [콜러(Kohler)와 밀스테인(Milstein) (1975) *Nature* 256: 495 - 497]; [굴프레(Gulfre)와 밀스테인(Milstein) (1981) *Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques* 73: 1 - 46, Langone and Banatis eds., Academic Press]). 그리고 나서, 한계 희석법에 의해 하이브리도마 세포들을 클로닝하고, 상층액을 항체 생산을 위해서 ELISA, RIA, 또는 생물검정법으로 검정한다. 또 다른 실시양태에서, 단일클론들은 재조합 DNA 방법에 의해 형성될 수도 있다.

[0044] 상기 11E10 애피토프에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 (Mab)를 제조하기 위해서는, 배양 내 연속 세포주들에 의한 항체 분자들의 생산을 제공하는 임의의 기술이 사용될 수도 있다. 예를 들면, 콜러(Kohler)와 밀스테인(Milstein)에 의해 처음 개발된 하이브리도마 기술 (상기 문헌 (1975), 및 문헌 [콜러(Kohler)와 밀스테인(Milstein) (1976) *Eur J Immunol.* 6: 511 - 519]; [콜러(Kohler) 등 (1976) *Eur J Immunol.* 6: 292 -295]; [해멀링(Hammerling) 등 (1981)의 *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., pp. 563 - 681], 및 트리오마(trioma) 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술 (문헌 [코즈보(Kozbor) 등 (1983) *Immuno Today* 4: 72 - 79]), 및 인간 단일클론 항체 생산용 EBV-하이브리도마 기술 (문헌 [콜(Cole) 등 (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96]). 이러한 항체들은 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD 및 그들의 임의의 서브클래스를 포함하는 임의의 면역글로불린 클래스 중의 것일 수도 있다. 본 발명에서 상기 Mab를 생산하는 하이브리도마는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 배양될 수도 있다. 본 발명의 추가 실시양태에서, 단일클론 항체는 당업계에 공지된 기술을 이용하여 무균 동물(germ-free animal)에서 생산될 수 있다.

[0045] 일반적으로, 마우스나 햄스터 등의 기타 적당한 숙주 동물이 상기 11E10 애피토프를 포함하는 폴리웨პ타이드로 면역화되어, 면역화를 위해 사용되는 항원 또는 그 단편에 특이적으로 결합 가능한 항체를 생산하거나 이를 생산할 능력이 있는 림프구들을 유도한다. 대안으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화된다.

[0046] 면역화된 숙주 동물 (예, 마우스)의 비장세포를 추출하고, 폴리에틸렌 글리콜 같은 적정한 융합 보조제(fusing agent)를 사용해서 적절한 세포주, 예를 들면, 골수종 세포주와 융합시켜서, 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [고딩(Goding) (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59 - 103, Academic Press]). 임의의 적절한 골수종 세포주를 본 발명에 따라 사용할 수도 있다; 그러나, 바람직한 골수종 세포는 효과적으로 융합하고, 선별된 항체-생산 세포에 대해서 안정적으로 고수준의 항체 생산을 지원하고, HAT 배지 등의 배지에 민감한 것들이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 젖과 골수종 세포주, 예를 들면 미국

캘리포니아 샌디에고의 소크 연구소(Salk Institute) 세포 공급 센터(Cell Distribution Center)로부터 입수가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양에서 유래한 것들, 및 미국 메릴랜드 록크빌의 ATCC로부터 입수가능한 SP-2 세포들이다.

[0047] 이와 같이 준비한 하이브리도마 세포를 씨딩하고(seed), 바람직하게는 융합되지 않은 부모 골수종 세포의 생장과 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 포함하고 있는 적절한 배양배지에서 생장시킬 수 있다. 그런 다음, 상기 하이브리도마 세포가 보존되고 있는 선별 및/또는 배양 배지를 통해 획득한 하이브리도마 세포를 상기 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체의 생산 여부를 식별하기 위해 검정할 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 단일클론 항체의 결합 특이성을 면역침강법에 의하거나, 방사면역검정(RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA) 등 시험관 내 결합 검정에 의해, 또는 바이아코어(Biacore) 기기를 이용해서 결정한다. 단일클론 항체의 결합 친화성은, 예를 들면 문슨(Munson)과 로드바드(Rodbard)의 스캐챠드 분석(Scatchard analysis) (문헌 [(1980) *Anal Biochem.* 107: 220 - 239])에 의해 결정할 수 있다.

[0048] 원하는 특이성, 친화성, 및/또는 활성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 식별한 후, 한계 희석 절차에 의해서 클론을 이차 클로닝하고, 표준 방법(고딩, 상기 참조)에 의해서 생장시킬 수도 있다. 추가적으로, 상기 하이브리도마 세포를 동물의 복수 종양(ascites tumor) 같은 생체 내에서 생장시킬 수도 있다. 단백질 A-세파로오스(Sepharose), 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite) 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석, 또는 친화도 크로마토그래피 등의 기준의 면역글로불린 정제 공정을 이용하여, 상기 이차클론에 의해 분비된 단일클론 항체를 상기 배양 배지, 복수액, 또는 혈청으로부터 적절하게 분리시킨다.

[0049] 본 발명의 단일클론 항체를 암호화하는 DNA는 기준의 절차(예, 젖과 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함)를 이용해서 쉽게 단리되고 서열결정된다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 작용한다. 일단 단리되고 나면, 상기 DNA는 발현 벡터 내에 놓일 수도 있는데, 이 벡터는 대장균 세포, COS 세포, 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary, CHO) 세포, 또는 다른 방식으로는 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포 등의 숙주 세포 내로 형질감염되고, 상기 재조합 숙주 세포 내에서 단일클론 항체의 합성을 획득하게 된다(예, 문헌 [스케라(Skerra) 등 (1993) *Curr Opin Immunol.* 5: 256 - 262] 및 [플럭吞(Pluckthun) (1992) *Immunol Rev.* 130: 151 - 188] 참조).

[0050] 또한 상기 DNA는, 예를 들면 상동성 젖과 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 암호화 서열 중 전부 또는 일부로 치환함에 의해서나 (문헌 [모리슨(Morrison) 등 (1984) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 81: 6851 - 6855]), 비-면역글로불린 폴리펩타이드에 대한 암호화 서열 중 전부 또는 일부를 상기 면역글로불린 암호화 서열에 공유결합식으로 연결함에 의해서, 변형될 수도 있다. 그런 방식으로, 항-11E10 에피토프 단일클론 항체의 결합 특이성을 갖는 키메라 또는 혼성 항체를 제조한다. 일반적으로 이런 비-면역글로불린 폴리펩타이드를 본 발명의 항체의 불변 도메인으로 치환하거나, 본 발명의 항체의 하나의 항원-결합 부위 중 가변 도메인으로 치환해서, 본 발명에 따른 11E10 에피토프에 대해 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위와, 다른 항원에 대해 특이성을 갖는 또 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 이가 항체를 형성시킨다.

### 변형 항체

[0052] 본 발명의 변형 항체로는, 키메라 단일클론 항체(예, 인간-마우스 키메라), 인간 단일클론 항체, 및 인간화 단일클론 항체가 포함되지만, 이들에만 한정되는 것은 아니다. 키메라 항체는 다양한 부위들이 상이한 동물종으로부터 유도된 분자로서, 예를 들면 인간 면역글로불린 불변 영역과 젖과 mAb로부터 유도된 가변 영역을 가지는 것들이다(예, 미국특허번호 4,816,567 및 4,816,397 참조). 비-인간(예, 젖과) 항체의 인간화된 형태는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬, 또는 그들의 단편(예, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 기타 항체의 항원-결합 이차서열)으로, 이들은 비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 최소한의 서열, 예를 들면 비-인간 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결합 영역(CDR) 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 골격 영역(framework region)을 포함하고 있다(미국특허번호 5,585,089 참조).

[0053] 인간화 항체는 수용자의 상보성-결합 영역(CDR) 유래 잔기들이 바람직한 특이성, 친화성, 및 성능을 갖는 마우스, 랫 또는 토끼 등의 비-인간 종(공여자 항체)의 CDR 유래 잔기들로 대체된, 인간 면역글로불린(수용자 항체)를 포함한다. 몇몇 예시에서, 상기 인간 면역글로불린의 Fv 골격부 잔기들은 대응하는 비-인간 잔기들로 대체된다. 또한 인간화 항체는 상기 수용자 항체에서나 이입된 CDR 또는 골격부 서열 어디에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 일반적으로, 상기 인간화 항체는 실질적으로 가변 도메인 중 최소한 하나, 보통은 두개 중 전부를 포함하는데, 이 도메인에서 상기 CDR 영역의 전부 또는 실질적 전부는 비-인간 면역글로불린의

그것들에 상당하고, 상기 골격부 (FR) 영역의 전부 또는 실질적 전부는 인간 면역글로불린 공통 서열(consensus sequence)의 그것들이다. 또한 상기 인간화 항체는 최적으로서는 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분, 일반적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분을 포함할 것이다.

[0054]

키메라 및 인간화 단일클론 항체는 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술, 예를 들면 WO 87/02671; EP 184,187; EP 171,496; EP 173,494; WO 86/01533; US 4,816,567; EP 125,023; 문헌 [베테르(Better) 등 (1988) *Science* 240: 1041 - 1043]; [리우(Liu) 등 (1987) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 84: 3439 - 3443]; [리우(Liu) 등 (1987) *J Immunol.* 139: 3521 - 3526]; [선(Sun) 등 (1987) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 84: 214 - 218]; [니시무라(Nishimura) 등 (1987) *Cancer Res.* 47: 999 - 1005]; [우드(Wood) 등 (1985) *Nature* 314: 446 - 449]; [쇼우(Shaw) 등 (1988) *J Natl Cancer Inst.* 80: 1553 - 1559]; [모리슨(Morrison) (1985) *Science* 229: 1202 - 1207]; [오이(Oi) 등 (1986) *Biotechniques.* 4: 214]; US 5,225,539]; [존스(Jones) 등 (1986) *Nature* 321: 552 - 552]; [베르흐이안(Verhoeven) 등 (1988) *Science* 239: 1534]; 및 [베이들러(Beidler) 등 (1988) *J Immunol.* 141: 4053 - 4060]에 설명된 방법들에 의해 생산 가능하다. 인간화 항체 및 이와 관련된 방법에 대한 심층 논의는 하기를 참조하도록 한다.

[0055]

재조합 항체를 생성하기 위한 또 다른 매우 효율적인 수단은 문헌 [뉴먼(Newman) (1992) *Biotechnology*. 10: 1455 - 1460]에 개시되어 있다. 또한 미국특허번호 5,756,096; 5,750,105; 5,693,780; 5,681,722; 및 5,658,570를 참조한다.

[0056]

비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 주지되어 있다. 인간화는 본질적으로 상술한 바와 같은 윈터(Winter)와 동료 연구자들 (문헌 [Jones 등 (1986) *Nature* 321: 522 - 525]; [리히만(Riechmann) 등 (1988) *Nature* 332: 323 - 327]; [베르흐이안(Verhoeven) 등 (1988) *Science* 239: 1534 - 1536] 포함)의 방법을 따라서 수행될 수도 있는데, 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 대응하는 인간 항체 서열에 치환시키는 것에 의한다. 따라서, 이런 인간화 항체는 키메라 항체이다 (미국특허번호 4,816,567 및 6,331,415 참조). 실제로, 인간화 항체는 몇몇 CDR 잔기들과 가능하게 몇몇 골격부 (FR) 잔기들이 설치류 항체 내 유사 부위로부터의 잔기들에 의해서 치환되어 있는 인간 항체들인 것이 일반적이다.

[0057]

상기 인간화 항체를 만드는 데 사용되는 인간 가변 도메인의 선택은, 경쇄 및 중쇄 모두, 항원성을 줄이기 위해서 매우 중요하다. 소위 최적의 방법에 따라서, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 그런 다음 설치류의 것과 가장 가까운 인간 서열을 상기 인간화 항체를 위한 인간 골격부 (FR)로 수용한다. (문헌 [심스(Sims) 등 (1993) *J Immunol.* 151: 2296 - 2308]; [코티아 및 레스크(Chothia and Lesk) (1987) *J Mol Biol.* 196: 901 - 917]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 소그룹 중 모든 인간 항체의 공통 서열에서 유도된 특정한 골격부를 이용한다. 동일한 골격부를 여러가지 상이한 인간화 항체 용으로 사용할 수도 있다. (문헌 [카터(Carter) 등 (1992) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 89: 4285 - 4289]; [프레스타(Presta) 등 (1993) *J Immunol.* 151: 2623 - 2632]).

[0058]

또한 항체들은 상기 항원에 대한 높은 친화성 (즉, Stx2의 11E10 에피토프) 및 기타 우호적인 생물학적 특성들을 보유하면서 인간화되는 것이 바람직하다. 이 목표를 달성하기 위해서 인간화 항체들은 부모 서열 및 인간화 서열에 대한 삼차원 모델을 이용한 부모 서열 및 다양한 개념적 인간화 산물들에 대한 분석을 통해서 준비된다. 삼차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 이용 가능하며, 당업자들에게 익숙하다. 선별된 후보 면역글로불린 서열의 개연성 있는 삼차원 입체형태 구조를 도시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다. 이러한 디스플레이를 관찰함으로써 상기 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기들의 잠재적 역할에 대한 분석, 즉, 상기 후보 면역글로불린이 그것의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기들에 대한 분석이 가능해진다. 이런 식으로, 상기 공통 및 이입 서열로부터 FR 잔기들을 선별하고 조합해서, 원하는 항체 특성, 예를 들면 표적 항원(들)에 대한 친화성 증가를 달성한다. 일반적으로, CDR 잔기들이 직접적이면서 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 미치는 것과 연관된다.

[0059]

완전 인간 항체는 인간 대상체에 대한 치료적 처치에 유용하다. 그런 항체는 예를 들면, 트랜스제닉 마우스를 이용해서 생산될 수도 있는데, 이 마우스는 내인성 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자를 발현할 수 없지만, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자는 발현할 수 있다. 상기 트랜스제닉 마우스는 선별된 항원, 예를 들면 상기 11E10 에피토프를 포함하는 폴리펩타이드로 보통의 방법으로 면역화될 수도 있다. 예를 들면, PCT 공개번호 WO 94/02602, WO 00/76310; 미국특허번호 5,545,806; 5,545,807; 5,569,825; 6,150,584; 6,512,097; 및 6,657,103; 문헌 [자코보비츠(Jakobovits) 등 (1993) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 90: 2551]; [자코보비츠(Jakobovits) 등 (1993) *Nature* 362: 255 - 258]; [브루게만(Bruggemann) 등 (1993) *Year in Immunol.* 7: 33 - 40]; [멘데즈

(Mendez) 등 (1997) *Nat Gene.* 15: 146 - 156], 및 [그린(Green)과 자코보비츠(Jakobovits) (1998) *J Exp Med.* 188: 483 - 495].

[0060] 또한 인간 단일클론 항체를 상기 하이브리도마 기술로 만들 수 있다. 인간 단일클론 항체 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이형골수종 세포주가 예를 들면, 문헌 [코즈보어(Kozbor) (1984) *J Immunol.* 133: 3001 - 3005]; [브로듀(Brodeur) 등 (1987) *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51 - 63, Marcel Dekker, Inc., New York]; 및 [뵈르너(Boerner) 등 (1991) *J Immunol.* 147: 86 - 95]에 설명되어 있다.

[0061] 또한 가이드된 선별법으로 지칭되는 기술을 이용하여 선별된 에피토프를 인식하는 완전 인간 항체를 생성할 수도 있다. 이 접근에 있어선, 선별된 비-인간 단일클론 항체, 예를 들면 마우스 항체를 동일한 에피토프를 인식하는 완전 인간 항체의 선별을 가이드하는 데에 사용한다 (문헌 [제스퍼(Jespers) 등 (1994) *Biotechnology*. 12: 899 - 903]).

[0062] 단체 Fv 및 항체를 생산하기 위해 사용 가능한 기술들의 예시로서 미국특허번호 4,946,778 및 5,258,498; 문헌 [휴스턴(Huston) 등 (1991) *Meth Enzymol.* 203: 46 - 88]; [슈(Shu) 등 (1993) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 90: 7995 - 7999]; 및 [스케라(Skerra) 등 (1988) *Science* 240: 1038 - 1040]에서 설명한 것들이 있다.

[0063] 이와 달리, 파지 디스플레이 기술(phage display technology) (문헌 [맥카퍼티(McCafferty) 등 (1990) *Nature* 348: 552 - 553])을 시험관 내에서 비-면역화 공여자 유래 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 저장소로부터 인간 항체 및 항체 단편을 생산하기 위해 사용할 수 있다. 파지 디스플레이에는 다양한 형태로 수행 가능하다. 예를 들면, 문헌 [존슨(Johnson)과 치스웰(Chiswell) (1993) *Curr Opin Struct Biol.* 3: 564 - 571]을 참조할 수 있다. 다양한 V-유전자 세그먼트들의 공급원이 파지 디스플레이를 위해 사용 가능하다. 문헌 [클락슨(Clackson) 등 (1991) *Nature* 352: 624 - 628]에서는, 면역화된 마우스의 비장에서 유래한 V 유전자들의 소규모 랜덤 조합 라이브러리로부터 다양한 안티-옥사졸론 항체들의 집합체를 단리시켰다. 비-면역화 인간 공여자 유래 V 유전자 저장소를 구축할 수 있으며, 다양한 항원들의 집합체에 대한 항체를 본질적으로 문헌 [막스(Marks) 등 (1991) *J Mol Biol.* 222: 581 - 597], 또는 [그리피스(Griffith) 등 (1993) *EMBO J.* 12: 725 - 734]에서 설명된 기술을 따라서 단리할 수 있다.

[0064] 본 발명은 상기 11E10 에피토프를 포함하는 단백질에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자의 기능적으로-활성이 있는 단편, 유도체 또는 유사체를 제공한다. 이 맥락에서 기능적으로-활성이 있다는 것은 상기 단편, 유도체, 또는 유사체가 상기 단편, 유도체 또는 유사체가 유래된 항체에 의해 인식되는 동일한 항원을 인식하는, 안티-안티-유전자형 항체 (즉, 4가 항체)를 유도할 수 있음을 의미한다. 구체적으로, 바람직한 실시양태에서, 상기 면역글로불린 분자의 유전자형의 항원성은 상기 항원을 특이적으로 인식하는 CDR 서열의 C-말단인, 골격부와 CDR 서열의 결실에 의해서 강화될 수도 있다. 어떤 CDR 서열이 항원에 결합하는지를 결정하기 위해서, 상기 CDR 서열을 함유하는 합성 웨بت아이드를 당업계에 공지된 임의의 결합 분석법에 의해 상기 항원과 함께 결합 분석법에 사용할 수 있다.

[0065] 본 발명은 F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, 및 scFv 등이지만, 이들에만 한정되지 않는 항체 단편을 제공한다. 특이적 에피토프를 인식하는 항체 단편을 공지 기술, 예를 들면 웨신 또는 파파인-매개 절단법에 의해 생성할 수도 있다.

[0066] 또한 본 발명은 본 발명의 항체들의 중쇄 및 경쇄 이량체, 또는 Fv 또는 단체 항체(SCA) 등 그들의 최소한의 단편 (예, 미국특허번호 4,946,778; 문헌 [버드(Bird) (1988) *Science* 242: 423 - 42]; [허스톤(Huston) 등 (1988) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 85: 5879 - 5883]; 및 [와드(Ward) 등 (1989) *Nature* 334: 544 - 54]에 설명된 것과 같음), 또는 본 발명의 항체와 같은 특이성을 갖는 임의의 다른 분자를 제공한다. 단체 항체는 아미노산 브릿지를 경유해서 상기 Fv 영역의 중쇄 및 경쇄 단편을 연결함에 의해서 형성되며, 그 결과 단체 폴리 웨بت아이드가 형성된다. 대장균 내 기능성 Fv 단편의 어셈블리에 대한 기술이 사용될 수도 있다 (문헌 [스케라(Skerra) 등 (1988) *Science* 242: 1038 - 1041]).

[0067] 이와 다르게는, 상기 항체의 적어도 Fab 부위를 암호화하는 클론이 Fab 발현 라이브러리를 특이적 항원에 결합하는 Fab 단편의 클론들에 대해서 스크리닝함에 의하거나 (예, 문헌 [후즈(Huse) 등 ((1989) *Science* 246: 1275 - 1281]에서 설명한 것과 같음) 항체 라이브러리를 스크리닝함에 의해서 (문헌 [클락슨(Clackson) 등 (1991) *Nature* 352: 624 - 628] 및 [한스(Hanes) 와 플럭스(Pluckthun) (1997) *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 94: 4937 - 4942] 참조) 획득될 수도 있다.

- [0068] 다른 실시양태들에서, 본 발명은 본 발명의 면역글로불린의 융합 단백질, 또는 그것의 기능적으로 활성이 있는 단편을 제공한다. 하나의 예에서, 상기 면역글로불린은 상기 면역글로불린이 아닌 또 다른 단백질 (또는 그것의 일부분, 바람직하게는 상기 단백질의 최소한 10, 20 또는 50개 아미노산 부분)의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에서 공유결합에 의해서 융합된다 (예, 웨타이드 결합). 바람직하게는 상기 면역글로불린, 또는 그것의 단편은 불변 도메인의 N-말단에서 다른 단백질에 공유적으로 연결된다. 상술한 바와 같이, 이러한 융합 단백질은 정제를 촉진하고, 생체 내 반감기를 늘리고, 면역 시스템에 대한 상피 배리어를 가로지르는 항원의 전달을 촉진시킬 수도 있다.
- [0069] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 조성물 및 풀(pool)을 형성한 항체, 항체 단편, 및 본원에 설명된 기타 항체 변이체의 용도를 제공한다. 예를 들면, 둘 이상의 단일클론들이 이용을 위해 풀을 형성할 수도 있다. 하나의 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Stx 또는 Stx1에 특이적으로 결합하는 항체와 함께 풀을 형성한다.
- [0070] **치료적 투여**
- [0071] 또한 본 발명은 상기 방법들을 이용해서 개발된 항체 (예, Stx2의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체)를 시가 독소 관련 질병을 보유하고 있거나 이의 발병 위험에 놓인 대상체에게 투여하는 것을 특징으로 한다.
- [0072] 본 발명의 항체는 양호한 의료 실무에 따른 방식으로 제형화, 투약, 및 투여될 것이다. 이런 맥락에서 고려 대상 요소로는 치료 중인 특정 질환, 치료 중인 특정 대상체, 개개의 대상체의 임상 상태, 상기 장애의 원인, 작용제 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료 실무자들에게 알려진 기타 요소들이 있다. 투여 대상인 Stx2의 11E10 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체의 치료상 유효한 양은 이런 고려대상들에 의해 조절될 것이며, 시가 독소 관련 질병, 또는 이와 연관된 증상들을 예방, 감쇠, 치료, 또는 안정화하기 위해 필요한 최소한의 양이다. 상기 11E10 에피토프에 특이적인 항체는 시가 독소 관련 질병을 예방하거나 치료하기 위해 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께, 반드시 그런 것은 아니지만, 선택적으로 제형화된다. (예, 13C4를 포함하여, Stx1에 특이적인 항체, 또는 그것의 인간화 또는 키메라 유도체). 이런 다른 작용제의 유효한 양은 상기 제형에 존재하는 Stx2의 11E10 에피토프에 특이적인 항체의 양, 장애 또는 치료의 종류, 및 상술한 기타 요소들에 따라 달라진다.
- [0073] 상기 항체는 비경구, 피하, 복강내, 폐내, 및 비강내 수단을 포함하는, 적정 수단에 의해 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 또는 피하 투여가 포함된다. 추가적으로, 상기 항체는 맥박 주입 (pulse infusion), 특별히 항체의 투여량을 줄이면서 적절하게 투여된다. 바람직하게 상기 투약은 부분적으로는 상기 투여가 일시적인지 장기적인지에 따라서, 주사, 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사로 제공된다.
- [0074] **III. 백신**
- [0075] 본 발명은 Stx2 단백질에 대한 면역 반응을 촉진하기 위한 조성물을 특징으로 한다.
- [0076] 시가 독소 관련 질병을 보유하고 있거나 이의 발병 위험에 놓인 개체들은 본 발명의 11E10 에피토프 함유 조성물 (예, 백신)을 투여해서 치료 가능한데, 여기서, 폴리웨타이드는 전장 Stx2 폴리웨타이드 또는 가공된 StxA2 서브유닛을, 바람직하게는 면역원성으로 유효한 양으로 포함하지 않는다. 상기 조성물은 예방차원 및/또는 치료 차원으로 투여 가능하다.
- [0077] 다양한 종류의 백신이 업계에 알려진 표준 공정들에 따라서 개발될 수 있다. 예를 들면, 백신은 웨타이드-기반 (예를 들면, 문헌 [스미스(Smith) 등 (2006) *Vaccine* 24:4122-4129] 참조), 핵산-기반 (예, 문헌 [벤파코어 (Bentacor) 등, "DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* 1 (EHEC) Shiga-like toxin 2 (Stx2) A2 and B subunits confers protective immunity to Stx challenge in the murine model" *Clin. Vaccine Immunol.* (인쇄 전 온라인 출판, PMID 19176691)] 참조), 박테리아- 또는 바이러스-기반 백신일 수도 있다. 11E10 에피토프를 포함하는 폴리웨타이드 또는 상기 폴리웨타이드를 암호화하는 핵산을 함유하는 백신 제제는 안정화제를 포함하여 다양한 기타 성분을 함유할 수도 있다. 또한 상기 백신은 하나 이상의 적절한 항원보강제를 포함하거나 이와 동시투여될 수 있다. 백신 내 11E10 에피토프 포함 폴리웨타이드 대비 항원보강제의 비율은 당업자들에 의해서 표준 방법을 이용하여 결정될 수도 있다.
- [0078] 또 다른 실시양태에서, 웨타이드 백신은 11E10 에피토프를 포함하는 웨타이드나 그것의 기능성 유도체들을 예방 또는 치료 백신으로서 다음과 같은 수많은 방식으로 활용할 수도 있다: 1) 동일 서열의 단량체 또는 다량체로서, 2) 응집을 촉진하고, 상기 에피토프의 제시 또는 가공을 촉진할 수도 있는 부가 서열(예, 클래스

I/II 표적화 서열) 및/또는 부가 항체, T 헬퍼(helper) 또는 11E10 에피토프의 면역원성 증대를 위한 CTL 에피토프와 인접하거나 인접하지 않게 조합된 방식, 3) 화학적으로 변형되거나 백신의 면역원성이나 전달을 촉진할 작용제에 접합된 방식 (예, 지방산 또는 아실 사슬, KLH, 파상풍 변성독소, 또는 콜레라 독소), 4) 상기한 것들의 조합, 5) 수산화알루미늄 등의 무기 젤, 및 불완전 프로인트 항원보강제 등의 유중수형 에멀젼, 알루미늄염, 사포닌 또는 트리테르펜, MPL, 콜레라 독소, ISCOM'S®, PROVAX®, DETOX®, SAF, 프로인트 항원보강제, Alum®, Saponin®, 기타 등등, 및 특히 미국특허번호 5,709,860; 5,695,770; 및 5,585,103에 설명된 것들을 포함하지만 이들에만 한정되지 않는 항원보강제와 조합; 및/또는 리포좀, VPL 또는 바이러스 유사 입자, 마이크로에멀젼, 약독화되었거나 죽은 박테리아 및 바이러스 벡터, 및 분해성 마이크로스피어를 포함하지만 이들에만 한정되지 않는 전달 비히클과 조합된 상기한 것들 중 어느 것 (예, 문헌 [커스텐(Kersten)과 힐쉬베르그(Hirschberg) (2004) *Expert Rev of Vaccines*. 3: 453 - 462]; [쉐이키(Sheikh) 등 (2000) *Curr Opin Mol Ther.* 2: 37-54] 참조), 및 6) 임의의 경로에 의하거나 수단으로 투여되어 생체외 방식으로 항원을 갖는 세포를 탐색하는 방식.

[0079] 시가 독소 관련 질병에 대한 예방적 치료나 치료로 개인에게 투여되는, 11E10 에피토프를 포함하는 폴리펩타이드(여기서 상기 폴리펩타이드는 전장 Stx2이 아님)의 투여량은, 당업자에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 투여량에는 약 10 µg 내지 1,000 mg, 바람직하게는 약 10 mg 내지 500 mg, 더욱 바람직하게는 약 30 mg 내지 120 mg, 더욱 바람직하게는 약 40 mg 내지 70 mg, 가장 바람직하게는 약 60 mg의 11E10 에피토프 포함 폴리펩타이드가 함유될 것이다.

[0080] 상기 11E10 에피토프 포함 폴리펩타이드의 적어도 1회의 투약, 바람직하게는 최소한 2회 투약, 더욱 바람직하게는 4회 투약으로서, 총 6회 이상까지의 투약이 대상체에게 투여될 것이다. 상기 11E10 에피토프를 포함하는 폴리펩타이드의 부스터 투약은 마지막 면역화 후에 1 또는 2주 간격을 두고 실시하는 것이 바람직할 수도 있는데, 일반적으로 한번의 부스터 투약은 초기 투여량보다 적거나 같은 양의 11E10 에피토프를 함유한다. 하나의 예에서, 상기 면역화 요법은 1주일 간격으로 4회 투약으로 실시될 것이다. 폴리펩타이드나 핵산이 위에서 분해될 수도 있기 때문에, 상기 면역화는 바람직하게는 비경구적 (예, 피하, 근육내, 정맥, 또는 피내 주사)으로 투여된다. 면역화된 대상체의 경과에는 일반 의료 평가, 혈청테스트에 의한 감염 여부 스크리닝 및/또는 위경 검사가 이어질 수도 있다.

#### IV. 실시예

##### 실시예 1

단일클론 항체 11E10은 Stx2의 A<sub>1</sub> 서브유닛을 인식한다. Stx2에 대한 11E10의 결합은 Stx2의 세포독성 및 치사활성을 중화시키지만, 단일클론 항체는 성숙한 A 서브유닛들의 아미노산에서 55% 동일성 및 68% 유사성에도 불구하고 Stx1에 결합하거나 또는 이를 중화시키지 않는다. 이 연구에서, 본 발명자들은 11E10 에피토프를 구성하는 Stx2에 대한 세그먼트(들)를 확인하고 어떻게 11E10에 의한 그 영역의 인식이 독소의 비활성화를 초래하는지를 결정하고자 했다. 이들 목적을 위해, 본 발명자들은 키메라 Stx1/Stx2 분자 세트를 만든 후, 웨스턴블로트 분석에 의해 이들 하이브리드 독소들을 인식하고 베로 세포 세포독성 검정에서 이들을 중화시킨 11E10의 능력을 평가하였다. 또한 본 발명자들은, 11E10에 대한 Stx2 상의 결합 에피토프를 예측할 수 있는 비유사 영역에 대해 Stx1 및 Stx2의 아미노산 서열들 및 결정 구조들을 비교하였다. 이들 평가를 통해, 본 발명자들은 11E10 에피토프가 Stx2 활성 부위를 둘러싸는 3개의 비연속적 영역들로 이루어져 있는 것으로 결론지었다. 11E10이 Stx2를 중화시키는 방법을 알기 위해, 본 발명자들은 표적 리보솜들에 대한 11E10/Stx2 복합체의 능력을 조사하였다. 본 발명자들은, Stx2에 대한 11E10의 결합은 독소가 시험관 내 검정에서 단백질 합성을 억제하는 것을 방지하지만 또한 베로 세포에서의 Stx2의 전반적인 세포 분포를 변경시켰음을 발견하였다. 본 발명자들은 Stx2에 대한 11E10 단일클론 항체의 결합이 독소의 효과 전부는 아니더라도 적어도 일부를 중화시키며, 독소가 리보솜들에 도달하거나 또는 이들을 비활성화시키는 것을 방지함으로써 중화시킬 수 있다고 제안한다.

[0084] 본 발명자들은 STEC 감염들과 연관된 Stx들을 중화시키는 수동 면역 전략(passive immunization strategy)들을 연구하였다 (문헌 [다울링(Dowling) 등 (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1808-1812]; [에드워즈(Edwards) 등 (1998) In J. B. Kaper and A. D. O'Brien (ed.), *Escherichia coli* 0157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, DC.]; [기무라(Kimura) 등 (2002) *Hybrid. Hybridomics*. 21:161-168]; [마(Ma) 등 (2008) *Immunolet.* 121:110-115]; [무크헤르지(Mukherjee) 등 (2002) *Infect. Immun.* 70:612-619]; [무크헤르지 등 (2002) *Infect. Immun.* 70:5896-5899]). 본 발명자들의 수동 면역 전략은, Stx/Stx1 또는 Stx2에 특이적으로 결합하고 이를 중화시키는 실험실에서 개발된 젖과 단일클

론 항체들에 기초한 것이다(문헌 [스트록빈(Strockbine) 등 (1985) *Infect. Immun.* 50:695-700]; [페레라(Perera) 등 (1988) *J Clin. Microbiol.* 26:2127-2131]). 단일클론 항체 11E10은 포름알데하이드로 처리함으로써 변성독소화된(toxoid) Stx2를 사용하는 BALB/c 마우스의 접종에 의해 생성되었다(페레라 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음). 웨스턴 블로트 분석에 의하면, 11E10 단일클론 항체가 Stx2의 A<sub>1</sub> 단편을 특이적으로 인식하고 베로 세포들 및 마우스의 Stx2를 중화시키지만, Stx/Stx1에 결합하거나 이를 중화시키지 않는다(에드워즈 등의 문헌 및 페레라 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음). 젖과 11E10 단일클론 항체는, 인간 불변 영역을 함유하도록 개질되어서, 항체 수용자를 위한 포텐셜을 감소시켜서 항-마우스 항체 반응을 생성시키도록 하였다. c<sub>a</sub> Stx2로 지칭되는 이 인간/마우스 키메라 항체는 제 I 단계 임상 시험을 성공적으로 거쳤다(다울링 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음). 이 보고서에서, 본 발명자들은, Stx2의 A 서브유닛 상의 젖과 11E10 단일클론 항체에 의해 (따라서, 또한 c<sub>a</sub> Stx2에 의해) 인식된 Stx2의 A 서브유닛 상의 에피토프를 정의하고, 단일클론 항체가 시험관 내에서 독소의 효소적 작용을 차단하고 또한 베로 세포들에서 독소 트래피킹(trafficking)을 변경하는 증거를 제시한다.

[0085]

#### 재료 및 방법

[0086]

박테리아 균주, 플라스미드, 정제된 Stx1 및 Stx2, 및 단일클론 항체들인 11E10 및 13C4.

[0087]

재조합 플라스미드의 선택에 있어 필요에 따라 100  $\mu$ g/ml의 암피실린이 보충된 루리아-버타니(Luria-Bertani)(LB) 브로쓰 내 또는 LB 한천(벡톤 디킨슨 앤드 캄파니(Becton Dickinson and Company), 미국 메릴랜드주 스파크스 소재) 상에서 박테리아를 성장시켰다. 이 연구에서 사용된 박테리아 균주 및 플라스미드를 하기 표 1에 열거하였다. 종래 기재된 바와 같이 친화성 크로마토그래피에 의해 Stx1 및 Stx2를 정제시키고(문헌 [멜톤-셀사(Melton-Celsa) 및 오브라이언(O'Brien) (2000) 385-406 페이지. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 145 권. Springer-Verlag, Berlin]), 단일클론 항체들인 11E10, 11F11 (Stx2에 특이적임, 페레라 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음), 및 13C4 (Stx1에 특이적임, 문헌 [스트록빈(Strockbine) 등 (1985) *Infect. Immun.* 50:695-700] 참조)를 이 실험실에서 생산하여 BEI 리소스즈 (BEI Resources, 미국 버지니아주 마나사스 소재)에 기탁하였다.

[0088]

&lt;표 1&gt;

본 연구에 사용한 박테리아 균주 및 플라스미드.

균주 또는 플라스미드	관련 특성	공급처 또는 참조문헌
대장균 균주		
Dh5 $\alpha$	F $^+$ _80 d $lacZ$ _M15 _( $lacZYA$ - $argF$ )U169 endA1 recA1hsdR17(rK- mK +) deoR thi-1 phoA supE44 _gyrA96 relA1	지브코 비알 엘(Gibco BRL)
XL10 Gold	Tetr $\Delta$ ( $mcrA$ )183 $\Delta$ ( $mcrCB$ - $hsdSMR$ - $mrr$ )173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB $lacIqZ$ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	스트라타진(S tratagene)
B121 (DE3)	F $^+$ ompT hsdS $B$ ( $r_B$ - $m_B$ -) gal dcm (DE3)	노바젠(Novag en)
EH250	대장균 Ount:H12 단리체; Stx2d 생산자	피에라드(Pie rard) 등 (1998) J Clin Microbiol 36: 3317-3322
클로닝 벡터		
pBluescript II KS (-)	대장균 클로닝 벡터 (Amp $R$ )	스트라타진
pTRCHIS2c	대장균 발현 벡터 (Amp $R$ )	인비트로젠(I nvitrogen)
재조합 플라스미드		
pCKS120	stx <sub>2c</sub> 의 pBR328 독소 클론	린드그렌(Lin dgren) 등 (1994) Infect. Immun. 62: 623-631
pJES101	stx <sub>2c</sub> 의 pKS (-)독소 클론	사무엘(Samue l) 등 (1990) Infect. Immun. 58: 611-618
pSQ543	stx <sub>2dact</sub> 의 pSK (-)독소 클론	린드그렌(Lin dgren) 등 (1994) Infect. Immun. 62: 623-631

[0089]

pMJS1	<i>stx1</i> 의 pBluescript II KS (-)독소 클론	스미스(Smith) 등 (2006) Vaccine 24: 4122-4129
pMJS2	<i>stx2</i> 의 pBluescript II KS (-)독소 클론	스미스(Smith) 등 (2006) Vaccine 24: 4122-4129
pMJS9	pBluescript II KS (-)독소 클론, 키메라 <i>stxA1-s</i> <i>txA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 29-297 + StxB2)	본 연구
pMJS10	pBluescript II KS (-)독소 클론, 키메라 <i>stxA1-s</i> <i>txA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 1-158)	본 연구
pMJS11	pTrcHis2 C 독소 클론, 키메라 <i>stxA1-stxA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 1-158)	본 연구
pMJS13	pBluescript II KS (-)독소 클론, 키메라 <i>stxA1-s</i> <i>txA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 29-128)	본 연구
pMJS15	pBluescript II KS (-)독소 클론, 키메라 <i>stxA1-stxA2</i> 유전자 (StxA2 = aa 29-76)	본 연구
pMJS16	pBluescript II KS (-)독소 클론, 키메라 <i>stxA1-s</i> <i>txA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 42-76)	본 연구
pMJS28	pBluescript II KS (-)독소 클론, 키메라 <i>stxA1-s</i> <i>txA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 42-49)	본 연구
pMJS49	<i>stx1</i> 의 pTrcHis2 C 독소 클론	본 연구
pMJS49A	pTrcHis2 C 독소 클론, 키메라 <i>stxA1-stxA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 42-49)	본 연구
pMJS49AB	pTrcHis2 C 독소 클론, 키메라 <i>stxA1-stxA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 42-49, 96-100)	본 연구
pMJS49AC	pTrcHis2 C 독소 클론, 키메라 <i>stxA1-stxA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 42-49, 244-259)	본 연구
pMJS49BC	pTrcHis2 C 독소 클론, 키메라 <i>stxA1-stxA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 96-100, 244-259)	본 연구
pMJS49ABC	pTrcHis2 C 독소 클론, 키메라 <i>stxA1-stxA2</i> 유전자 (StxA2 = 아미노산 42-49, 96-100, 244-259)	본 연구
pMJS50	<i>stx2</i> 의 pTrcHis2 C 독소 클론	로빈슨(Robin son) 등 (2006) PNAS 103: 9667-9672
PMJS52	<i>stx2c</i> 의 pTrcHis2 C 독소 클론	본 연구
PMJS59	<i>stx2d</i> 의 pTrcHis2 C 독소 클론	본 연구
pMJS49ABC*	Y77S 돌연변이 보유 pMJS49ABC	본 연구

[0090]

## 키메라 독소 플라스미드의 제작.

[0091]

*stxA1* 및 *stxA2* 모두의 일부분이 함유된 6개의 키메라 독소 유전자를, 오버랩 익스텐션에 의한 스플라이싱 (splicing by overlap extension; SOE) 프로토콜을 사용해 PCR로 생성하고 (문헌 [히구치(Higuchi) (1989) p. 61-70. H. A. Erlich (ed.), PCR technology. Stockton Press, New York]), PCR 생성물을 pBluescript II KS (-) (스트라타진, 미국 캘리포니아주 라 졸라 소재)에 결찰시켰다. 키메라 독소 유전자들은 본래의 프로모터 및 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열들을 함유하였고, 상기 클론들 중 5 개로부터 독소 발현의 수준은 이를 조건 하에서 충분하였다. 하나의 클론(pMJS11)으로부터 A 서브유닛의 발현의 수준을 증가시키기 위해, 독소 오폐론을 PCR에 의해 재차 증폭시키고 최적화된 샤인-달가르노 서열 [TAAGGAGGACAGCTATG (최적화된 샤인-달가르노 서열은 밑줄 친 부분이며 StxA2에 대한 번역 시작 부위는 볼드체로 되어 있다) 서열번호: 20]을 *stxA2*의 상부 (upstream)에 추가하였다. 이 후자의 PCR 생성물을 이소프로필- $\beta$ -D-티오갈락토파라노시드(IPTG)-유도성 프로모터를 갖는 pTrcHis2 C 발현 벡터 (인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스베드 소재)에 결찰하였다. 이 연구에 사용된 모든 프라이머들을 하기 표 2에 열거하였다. 이 연구를 위해 생성된 각 구축물의 DNA 서열은 사용 전에 확인하였다.

[0093]

&lt;표 2&gt;

본 연구에 사용한 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머

프라이머	서열 (5'-3') <sup>a, b</sup>	목적/상동성 영역
MJS1	GATCGGATCCCCCTGTAACGAAGTTGCGTAACA GC (서열번호 21)	pMJS9, pMJS13, pMJS15, pMJS16 및 pMJS28을 생성시키는데 사용된 <i>stx1</i> 상부 프라이머
MJS2	GATCGAATTCTCGCTTACGATCATCAAAGAGATC ATACC (서열번호 22)	pMJS10, pMJS11, pMJS13, pMJS15, pMJS16 및 pMJS28을 생성시키는데 사용된 <i>stx1</i> 하부 프라이머
MJS5	GATCGGATCCAGCAAGGCCACCATATCACATAC CGCC(서열번호 23)	pMJS10을 생성시키는데 사용된 <i>stx2</i> 상부 프라이머
MJS6	CAGGGGAATTCACCATGCGAAATTTCACAA ATGC (서열번호 24)	pMJS9를 생성시키는데 사용된 <i>stx2</i> 하부 프라이머
2A29F	GAACATATATCTCAGGGGACAC (서열번호 25)	pMJS9, pMJS13 및 pMJS15를 생성시키기 위해 1A28R과 함께 사용
1A28R	GTGGTCCCCGTGAGATATATGTTCTAATGGAGTAC CTATTGCGAGCG (서열번호 26)	pMJS9, pMJS13 및 pMJS15를 생성시키기 위해 2A29F와 함께 사용
1A159F	TTACGGTTTGTACTGTGACAGCTGAAGC (서열번호 27)	pMJS10 및 pMJS11을 생성시키기 위해 2A158R과 함께 사용
2A158R	GCTTCAGCTGTCACAGTAACAAACCGTAAACTG CTCTGGATGCATCTGGT(서열번호 28)	pMJS10 및 pMJS11을 생성시키기 위해 1A159F와 함께 사용
1A129F	CAGATAAATGCCATTCTGTTGA (서열번호 29)	pMJS13을 생성시키기 위해 2A128R과 함께 사용
2A128R	TCAACGAATGGCGATTATCTGCATTCCGGAACG TTCCAG CGC (서열번호 30)	pMJS13을 생성시키기 위해 1A129F와 함께 사용
2A42F	GGTACGTCTTACTGATGATTAACCAACACCCCCAC CGGGCAGTTATTTCGC (서열번호 31)	pMJS16을 생성시키기 위해 1A41R과 함께 사용
1A41R	GCAAATAACTGCCGGTGGGTGTGGTTAACATCA TCAGTAAAGACGTACC(서열번호 32)	pMJS16을 생성시키기 위해 2A42F와 함께 사용
1A77F	TATGTGACAGGATTGTTAACAGGAC (서열번호 33)	pMJS15를 생성시키기 위해 2A76R과 함께 사용
2A76R	GTCCTGTTAACAAATCCTGTCACATATAAATTAT TTTGCT CAATAATCAGACGAAGATGG (서열번호 34)	pMJS15를 생성시키기 위해 1A77F와 함께 사용
1A51	AGGAGGACAGCTATGAAAATAATTATTTTAGAG TGCTA (서열번호 35)	pMJS49를 생성시키기 위해 사용된, 최적화된 색

[0094]

		인-달가르노 서열 포함 <i>s</i> <i>txA1</i> 상부 프라이머 #1
1A52	GATCGGATCTAAGGAGGACAGCTATGAAAATAA TT (서열번호 36)	pMJS49를 생성시키기 위해 사용된 최적화된 사인-달가르노 서열 포함 <i>stx</i> <i>A1</i> 상부 프라이머 #2
1BC1	GGTGGTGGTGACGAAAAATAACTCGCTGAATCC (서열번호 37)	pMJS49를 생성시키는데 사용된 <i>stxB1</i> His-태그된 하부 프라이머 #1
1BC2	CAGTGGTGGTGGTGGTGACGAAAAATAAC (서열번호 38)	pMJS49를 생성시키는데 사용된 <i>stxB1</i> His-태그된 하부 프라이머 #2
BC3	GATCGAATTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG (서열번호 39)	pMJS49 및 pMJS52를 생성시키는데 사용된 <i>stxB1</i> His-태그된 하부 프라이머 #3
MSAF	AACCACACCCACCGGGCAGTTATTTGCAGTTG ATGTCAGAGGG (서열번호 40)	pMJS28, pMJS49A, pMJS49AB, pMJS49AC 및 pMJS49ABC를 생성시키기 위해 MSAR과 함께 사용
MSAR	ATAACTGCCGGTGGGTGTGGTTAACATCAGT AAAGACGTACC (서열번호 41)	pMJS28, pMJS49A, pMJS49AB, pMJS49AC 및 pMJS49ABC를 생성시키기 위해 MSAF와 함께 사용
96100F	ACACATATATCAGTGCCAGGTACAACAGCGGTTA CATTGTCTGG (서열번호 42)	pMJS49AB, pMJS49BC 및 pMJS49ABC를 생성시키기 위해 96100R과 함께 사용
96100R	ACCTGGCACTGATATATGTGTAAAATCAGCAAAG CGATAAAAACA (서열번호 43)	pMJS49AB, pMJS49BC 및 pMJS49ABC를 생성시키기 위해 96100F와 함께 사용
JCT1F	GTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAAATGTCCGGCAG ATGGAAGAGTCAG (서열번호 44)	pMJS49AC, pMJS49BC 및 pMJS49ABC를 생성시키기 위해 JCT1R과 함께 사용된 C 영역 프라이머 #1
JCT1R	TTCTGGTTGACTCTCTTCATTCAC (서열번호 45)	pMJS49AC, pMJS49BC 및 pMJS49ABC를 생성시키기 위해 JCT1F와 함께 사용된 C 영역 프라이머 #1
JCT2F	GGCATTAATACTGAATTGTCATCATCAGGGGGCG CGTTCTGTTCGC (서열번호 46)	pMJS49AC, pMJS49BC 및 pMJS49ABC를 생성시키기 위해 JCT2R과 함께 사용된 C 영역 프라이머 #2
JCT2R	ATGATGACAATTCAAGTATTAATGCC (서열번호 47)	pMJS49AC, pMJS49BC 및 pMJS49ABC를 생성시키기

[0095]

		위해 JCT2F와 함께 사용 된 C 영역 프라이머 #2
2A51	AGGAGGACAGCTATGAAGTGTATATTATTTAAAT GGGT (서열번호 48)	pMJS11 및 pMJS52를 생성 시키기 위해 사용된, 최 적화된 샤인-달가르노 서 열 포함 <i>stx4<sub>2</sub></i> 상부 프라 이머 #1
2A52	GATCGGATCCTAAGGAGGACAGCTATGAAGTGTAA (서열번호 49)	pMJS11 및 pMJS52를 생성 시키기 위해 사용된, 최 적화된 샤인-달가르노 서 열 포함 <i>stx4<sub>2</sub></i> 상부 프라 이머 #2
C12B	GGTGGTGGTGGTCATTATTAAACTGCACCTTC (서열번호 50)	pMJS52를 생성시키는데 사용된 <i>stxB<sub>2</sub></i> His-태그된 하부 프라이머 #1
C22B	CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCATTATTAAA (서열번호 51)	pMJS52를 생성시키는데 사용된 <i>stxB<sub>2</sub></i> His-태그된 하부 프라이머 #2
2dF	GATCGGATCCCTGGTATCGTATTACTTCAGCC (서열번호 52)	pMJS59를 생성시키는데 2 dR과 함께 사용
2dR	GATCGAATTCCCTGCACACTACGAAACCAGC (서열번호 53)	pMJS59를 생성시키는데 2 dF와 함께 사용
1Y77SF	TCAGTGACAGGATTGTAAACAGGAC (서열번호 54)	pMJS49ABC*를 생성시키는 데 1Y77SF와 함께 사용
1Y77SR	GTCTCTGTTAACAAATCTGTCACTGATAAAATTAA TTTCGTTCAACAAATAAGCCG (서열번호 55)	pMJS49ABC*를 생성시키는 데 1Y77SF와 함께 사용

<sup>a</sup> 제한효소 부위가 밑줄쳐져 있음.

<sup>b</sup> 돌연변이 코돈 부위가 볼드체로 표시됨.

[0096]

[0097]

B 유전자의 바로 하부 (downstream)에 위치한 6개의 히스티딘 코돈을 함유하는 *stx1* 클론으로부터 5개의 His-태그된 키메라 독소를 추가로 생성시켰다 (도 2a). 이들 키메라에 의해 생산된 독소들은, Stx1 내 필적하는 서열 대신에 추정 11E10 단일클론 항체 에피토프를 포함하는 Stx2 A 서브유닛으로부터의 1, 2 또는 3개의 영역들 (이후 본원에서 영역 A, B 및 C로서 지칭함)을 함유한다. A, B 및 C 영역들은 각각 Stx2 A 서브유닛의 아미노산 42-49(서열번호 1), 96-100(서열번호 2), 및 244-259(서열번호 3)를 지칭한다. 제조된 5개의 키메라 독소를 다음과 같이 명명하였다: Stx1 +A(서열번호 4에 나타난 키메라 Stx2 A 서열 함유), Stx1 +AB(서열번호 5에 나타난 키메라 Stx2 A 서열 함유), Stx1 +AC(서열번호 6에 나타난 키메라 Stx2 A 서열 함유), Stx1 +BC(서열번호 7에 나타난 키메라 Stx2 A 서열 함유), 또는 Stx1 +ABC(서열번호 8에 나타난 키메라 Stx2 A 서열 함유).

[0098]

### 일부 변성독소화된 $Stx1 +ABC$ 의 생성 및 정제.

[0099]

A 서브유닛의 77 위치에 티로신 잔기를 SOE 프로토콜에 의해 세린 잔기로 변경시킴으로써 Stx1 +ABC 독소를 부분적으로 변성독소화시켰다. Y77S 돌연변이는 베로 세포들에 대한 50% 세포독성 투여량( $CD_{50}$ )을 유도된 배양액  $m1$ 당  $10^6$   $CD_{50}$ 으로부터  $10^2$   $CD_{50}$ 까지 감소시켰다. Y77S 돌연변이가 도입된 후 이러한 세포독성의 4-log 감소는 Stx1에서의 Y77S 돌연변이에 대해 이전에 보고된 것과 유사하다 (문현 [데레시위츠(Deresiewicz) 등 (1992) *Biochemistry* 31:3272-3280]).

[0100]

Stx1 +ABC 변성독소를 종래 기재된 바와 같이 니켈 친화성 칼럼을 사용하여 정제하였다 (문현 [스미스(Smith) 등 (2006) *Infect. Immun.* 74:6992-6998]). 변성독소의 농도를 비신크로닌산 검정 (bicinchoninic acid assay; 피어스(Pierce), 미국 일리노이즈주 록포드 소재)에 의해 결정하였다. 소듐 도데실 살레이트-폴리아크릴아미드 겔의 은-염색으로, 키메라 변성독소의 A 및 B 서브유닛들이 2개의 주요 밴드에 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 다른 비주요 밴드도 관찰되었다 (데이터는 제시되지 않음).

[01011]

### Stx2c 및 Stx2d 변이 클론의 제작

[0102]

His-태그된 Stx2c가 발현된 클론을 Stx2에 대해 종래 기재된 바와 같이 PCR에 의해 생성하였다 (문현 [로빈슨 (Robinson) 등 (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:9667-9672]). *stx2d* 클론을 대장균 EH250으로부터 프라이머 2DF 및 2DR을 사용하여 PCR에 의해 생성하였다 (문현 [피어라드 (Pierard) 등 (1998) *J. Clin.*

*Microbiol.* 36:3317-3322]). PCR 생성물을 발현 벡터 pTrcHis2 C에 결합하였다. 서열 분석에 의해 이 *stx<sub>2c</sub>* 및 *stx<sub>2d</sub>*가 올바르게 증폭된 것을 확인하였다.

#### [0103] 웨스턴 블롯 분석

정제된 Stx1, Stx2, 또는 키메라 Stx1/Stx2 독소를 발현하는 박테리아의 음파 용해물 (sonic lysate)을 소듐 도데실 살피아트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)한 다음, 종래 기재된 바 (스미스 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음)와 같이 웨스턴 블롯으로 조사하였다. Stx1, Stx2, 또는 키메라 독소를 함유하는 음파 용해물 내의 A 서브유닛의 농도를 다음과 같이 추정하였다. 우선, Stx1 또는 Stx2 각각으로부터의 정제된 A 서브유닛을 검출하는 토키의 항-Stx1 및 항-Stx2 토키 다클론 항체들의 비교적 등가 수준으로의 특정 희석액을 NIH 이미지 J 소프트웨어 (NIH Image J software, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>)의 사용을 통해 측정하였다. 둘째, 키메라-함유 음파 용해물들을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 상기 분리된 겔을 니트로셀룰로스로 옮긴 다음, 이를 블롯 (blot)을 상기 결정된 바와 같이 희석된 토키의 항-Stx1 및 항-Stx2 토키 다클론 항체들의 혼합물을 탐침하였다. 셋째, 각 레인에서 키메라 A 서브유닛에 상응하는 밴드들을 NIH 이미지 J 프로그램을 사용하여 정량화하여서 각 용해물 샘플에서 독소 농도를 결정하였다. 넷째, 2개의 추가 폴리아크릴아미드 겔에 정제된 Stx1, Stx2, 또는 등가 농도를 함유하도록 정규화된 키메라-함유 용해물 (단계 3으로부터 결정된 바와 같음)의 시료를 로딩하였다. 그 다음, 독소 제조물을 SDS-PAGE한 후, 토키 항-Stx1 및 토키 항-Stx2 다클론 항체들 (도 1b의 상부 패널; 블롯 1) 또는 11E10 단일클론 항체 (도 1b 하부 패널; 블롯 2)의 혼합물을 가지고 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다. 이들 웨스턴에 사용된 2차 항체들은 블롯 1의 경우 1:15,000의 희석으로의 홀스래디쉬 퍼옥시다제 [Horseradish peroxidase (HRP), 바이오-래드 (Bio-Rad), 미국 캘리포니아주 허큘리스 소재]에 접합된 염소 항-토끼 면역글로불린 G (IgG, 도 1b의 상부 패널)이었고, 블롯 2의 경우 1:3,000의 희석으로의 HRP (바이오-래드, 미국 캘리포니아주 허큘리스 소재)에 접합된 염소 항-마우스 IgG (도 1b 하부 패널)이었다. 결합된 2차 항체들을 ECL-플러스 웨스턴 블로팅 검출 키트 (ECL-Plus Western blotting detection kit)를 사용하는 화학발광 (chemiluminescence)에 의해 검출하였다 (엠머샴 바이오사이언스 (Amersham Bioscience), 영국 버킹แฮ머 리틀 찰톤트 소재).

[0105] 또한, Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2d<sub>act</sub> 또는 Stx2e를 발현하는 클론들의 음파 용해물에 대해 웨스턴 블롯을 실시하였다. 먼저, 프로브로서 토키 항-Stx2 다클론 항체만을 사용한 것을 제외하고는 앞서 기재된 바와 같이 이들 독소 시료들로부터의 A 서브유닛의 농도를 결정하였다. 그 다음, 2개의 추가 폴리아크릴아미드 겔에 등가량의 정규화된 시료를 로딩하고, 1차 항체로서 토키 항-Stx2 다클론 항체 또는 11E10 단일클론 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 실시하였다. 2차 항체 및 검출 방법은 앞서 기재된 바와 동일하였다.

#### [0106] 베로 세포에 대한 시험관 내 중화 검정.

[0107] Stx1, Stx2, 키메라 Stx1/Stx2 독소, Stx2c, Stx2d, Stx2d<sub>act</sub>, 또는 Stx2e가 함유된 박테리아로부터의 음파 용해물의 시험관 내 중화 검정을, 종래 기재된 바와 같이 (문헌 [마르크스 (Marques) 등 (1986) *J Infect. Dis.* 154:338-341]; 스미스 등의 문헌, 상기한 바와 같음) 베로 세포들 (ATCC, 미국 버지니아주 마나사스 소재) 상의 11E10을 사용하여 실시하였다. 요약하면, 이글 최소 필수 배지 (Eagle's Minimal Essential Medium; EMEM) 중의 독소 (1 내지 3 CD<sub>50</sub>) 및 EMEM 중의 정제된 11E10 단일클론 항체 (0.5 mg/ml)를 함유한 동일한 부피의 시료들을 함께 혼합하고, 37°C에서 2시간 동안 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하였다. 그 다음, 독소-항체 혼합물을 96-웰 플레이트 내의 서브-합류성 (subconfluent) 베로 세포들 상으로 중첩시킨 다음 48시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 베로 세포들을 고정시키고, 염색하고, 600 nm에서의 광학 밀도 (OD<sub>600</sub>)를 측정하였다. 이들 중화 실험들을 적어도 이중으로 2회 실시하였다. 독소 단독 또는 독소 및 항체가 첨가된 웰 내에서 세포 생존성을 비교함으로써 음파 용해물 중의 독소의 세포독성 효과를 중화시키는 11E10 단일클론 항체의 능력을 측정하였다. 항체에 의한 독소의 중화 백분율은 하기 식에 의해 계산하였다. 중화 백분율: [(독소+ 항체 웰의 평균 OD<sub>600</sub> - 독소 단독 웰의 평균 OD<sub>600</sub>)/(세포 단독 웰의 평균 OD<sub>600</sub> - 독소 단독 웰의 평균 OD<sub>600</sub>)] x 100. 11E10 단일클론 항체는 Stx2를 야생형 활성의 약 65%까지 중화시켰다. 11E10 단일클론 항체에 의한 독소 유도체들의 중화 백분율을 더욱 쉽게 비교하기 위해, 11E10에 의한 Stx2의 중화량을 100%로 설정하고 다른 독소들의 중화 수준들이 Stx2의 것과 비교하여 계산되도록 데이터를 정규화하였다.

#### [0108] 마우스의 접종 및 챌린지 (challenge)

[0109] 체중이 14 내지 16 g인 CD-1 수컷 마우스로부터 면역이전 혈청을 수거하였다 (찰스 리버 래버토리즈(Charles River Laboratories), 미국 메사추세츠주 보스턴 소재). 이를 혈청 시료를 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)에 사용하여서 마우스가 Stx1 또는 Stx2에 대해 선제 역가(pre-existing titer)를 갖는지 측정하였다. 연구 시작 시 독소에 대해 면역 반응을 나타내는 마우스는 없었다. 그 다음, 마우스를 2개의 군으로 나누었다: 샘(sham)-접종된 군 (이후 본원에서 음성-대조군으로 지칭) 및 키메라 변성독소로 접종된 군. 음성 대조군 내의 마우스에 PBS와 타이터맥스 (TiterMax)의 혼합물, 유중수형 항원보강제 (타이터맥스 유에스에이 인코포레이티드 (TiterMax, USA Inc.), 미국 조지아주 노크로스 소재)를 복강 내에 접종하였다. 제 2 군의 마우스에 타이터맥스와 혼합된 변성독소 1  $\mu$ g를 복강 내 접종하였다. 총 4번의 부스트를 위해 3주 간격으로 마우스를 부스팅하였다. 최종 부스팅 2주 후, 5마리 음성-대조군 마우스 및 5마리 변성독소-접종된 마우스에 50% 치사 투여량 ( $LD_{50}$ )의 Stx1(1,250 ng)를 복강 내로 10회 투여하고, 29마리 음성 대조군 마우스 및 34마리 변성독소-접종된 마우스에 5  $LD_{50}$ 의 Stx2(5 ng)를 투여하였다.

#### [0110] 시험관 내 단백질 합성 억제 검정.

[0111] 토끼 망상적혈구 용해물, 개똥벌레 루시퍼라제 mRNA, 및 루시페린 기질을 프로메가 코포레이션 (Promega Corporation, 미국 위스콘신주 메디슨 소재)으로부터 구입하였다. Stx2(4 ng/  $\mu$ l)를 동일한 부피의 항체(4 또는 40 ng/  $\mu$ l)와 조합하고, 1  $\mu$ l의 독소/항체 혼합물을 9  $\mu$ l 망상적혈구 용해물과 조합하였다. 혼합물을 30 °C에서 인큐베이션하여 독소가 용해물 중의 리보솜을 비활성화하도록 하였다. 1시간 후, 2분 동안 70°C까지 가열된 분취량의 루시퍼라제 mRNA 및 아미노산을 첨가하고, 용액을 90분 더 인큐베이션하여 시험관 내 단백질 합성이 진행되도록 하였다. 모든 검정은 3회 반복 실시하였다. 루시퍼라제 활성은, 1  $\mu$ l의 용해물 혼합물을 깨끗한 96 웰 플레이트(피셔 사이언티픽(Fisher Scientific), 미국 웜실베니아주 피츠버그 소재) 내의 20  $\mu$ l의 루시페린 기질에 첨가함으로써 측정하였다. 생물발광 (Bioluminescent light emission)은 코닥 이미지 스테이션 (Kodak Image Station) 440CF를 사용하여 10분 노출 후 검출하였다. 발광 신호는 단일 웰에 상응하는 원형 영역 내의 총 신호 세기의 합으로 분석하였다.

#### [0112] 비독성화된 세포 중의 11E10의 국소화

[0113] 베로 세포들을 8-웰 조직 배양 슬라이드 (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 미국 뉴욕주 로체스터 소재) 내에  $1 \times 10^5$  세포/ml의 농도로 씨딩(seed)하고, 24시간 동안 37°C에서 5%  $CO_2$ 의 분위기 하에서 부착시켰다. Stx2 (0.2 ml의 10 ng/ml)를 10 ng의 정제된 11E10 단일클론 항체 또는 음성 대조군으로서의 PBS와 혼합하였다. 항체/독소 또는 PBS/독소 용액을 6시간 동안 베로 세포들과 함께 인큐베이션한 후, 세포들을 완충된 포르말린 (포름알데-프레쉬(Formalde-Fresh), 피셔 사이언티픽, 미국 웜실베니아주 피츠버그 소재)으로 고정하고, PBS 중의 0.001% 트리톤(Triton)-X100 (피어스, 미국 일리노이즈주 록포드 소재)을 이용해 투과시켰다. 모든 면역염색 절차들을 3% 소 혈청 알부민(BSA, 시그마(Sigma), 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)을 사용해 PBS 내에서 실시하였다. 세포들 내 단일클론 항체 11E10의 존재는 알렉사-플루오르(Alexa-Fluor) 488 표지된 당나귀 항-마우스 IgG (인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)로 검출하였다. 비독성화된 세포들 내의 총 Stx2를 토끼 항-Stx2 다클론 항체로 표지하고, 알렉사-플루오르 488-접합된 당나귀 항-토끼 IgG를 2차 항체 (인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)로 사용하였다. Stx2 및 엔도솜 이중 표지화는 항-Stx2 단일클론 항체 11F11 (페레라 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음) (BEI 리소스즈, 미국 베지니아주 마나사스 소재) 및 항-EEA1 (C-15) 염소 다클론 항체 (산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 미국 캘리포니아주 산타 크루즈 소재) 각각 및 알렉사-플루오르 표지된 2차 항체를 사용하여 수행하였다. 적절한 1차 및 2차 항체를 사용하여 인큐베이션한 후, 세포들을 20분 동안 37°C에서 포르말린으로 고정하고, 상기 슬라이드를 슬로우페이드 배지 (SlowFade medium, 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)에 고정(mount)시켰다. 반사광 형광 부착물을 갖는 올림푸스 (Olympus) 현미경, 및 스폿(Spot) CCD 디지털 카메라 (다이어그노스틱 인스트루먼트 프로덕츠(Diagnostic Instrument Products), 미국 미시건주 스텔링 하이츠 소재)를 통해, 결합된 형광단-표지된 2차 항체들의 40배 확대 이미지들을 수득하였다. 형광 이미지들을 어도비 포토샵 (어도비 시스템즈(Adobe Systems), 미국 캘리포니아주 샌 조스 소재)을 사용해 가공하여 중첩시켰다.

#### [0114] 결과

#### [0115] 초기 키메라 독소와 단일클론 항체 11E10의 상호작용.

[0116] 11E10 단일클론 항체와 상호작용하는 Stx2의 부분을 결정하기 위해, 본 발명자들은 *stx41*의 상응 영역 대신에

삽입된 *stxA<sub>2</sub>* 유전자의 다른 영역을 함유한 6개의 키메라 독소 오페론의 초기 세트를 제작하였다 (도 1a). 정제된 Stx1, Stx2, 또는 6개의 상이한 키메라 Stx1/Stx2 독소 중 하나를 발현하는 대장균 DH5  $\alpha$ 로부터의 용해물의 웨스턴 블로트를 11E10 단일클론 항체로 탐침하였다. 상기 항체는 Stx2 A 서브유닛의 29-297, 1-158, 및 29-128의 영역들로부터의 아미노산을 함유하는 키메라 독소 및 Stx2와 강하게 반응하였다 (도 1b). 11E10에 의해 약하기는 하나 여전히 인식되는 최소 부분의 Stx2를 갖는 키메라 독소는 StxA<sub>2</sub>, 영역 42-49로부터의 8개의 아미노산만을 함유하였다.

[0117] 다음으로, Stx1, Stx2, 또는 베로 세포들에 대한 6개의 초기 키메라 독소들 중 하나를 함유하는 박테리아 용해물의 독성을 중화시키는 11E10 단일클론 항체의 능력을 조사하였다. 예상되는 바와 같이, 11E10 단일클론 항체는 Stx2를 중화시켰지만 Stx1은 중화시키지 않았다 (도 1c). 그러나, StxA<sub>2</sub>로부터의 영역 1-158 또는 29-297을 갖는 하이브리드 독소는 Stx2와 비교하면 11E10에 의해 약 85% 중화되었으며, 그 결과는 11E10 에피토프의 중요한 성분들이 Stx2의 잔기 29-158 사이에 존재함을 시사하였다. 반면, Stx2로부터의 아미노산 29-128을 갖는 키메라 독소는 면역블로트(immunoblot)에서 강하게 인식되었지만, Stx2 수준의 약 32%까지만 중화되었다. 이를 결론을 종합하면, 11E10 중화 에피토프는 웨스턴 블로트에서 Stx1(2A<sub>29-128</sub>)에 대한 11E10의 결합에 요구되는 것보다 많은 수의 아미노산을 포함하므로, 상기 중화 에피토프의 일부가 이 하이브리드로부터 누락됨을 제시한다. 웨스턴 블로트 분석에서 11E10 단일클론 항체에 의해 약하게 검출된 다른 3개의 키메라 독소는 Stx2 중화의 정규화된 수준과 비교하여 11E10에 의해 현저하게 중화되지는 않았다 (15% 미만). 종합하면, 이들 결과는 Stx2 상의 11E10 중화 에피토프의 하나 이상의 주요 성분들이 아미노산 29-76의 외부에 존재함을 나타낸다.

#### [0118] Stx1 및 Stx2 A 서브유닛 아미노산 서열들 및 결정 구조들간 차이의 분석.

[0119] 키메라 독소의 제 1 세트의 웨스턴 블로트 및 중화 분석에서는 11E10 에피토프가 독소 검출을 위해 적어도 Stx2 A 서브유닛의 아미노산 42-49 (서열번호 1)를 요구하는 것으로 나타나지만, 또한 완전한 인식 및 독소 중화를 위해 추가 아미노산이 요구되는 것으로 드러났다. 따라서, 11E10에 의한 Stx2의 인식 및 중화에 관여하는 것일 수 있는 아미노산의 추가적인 독특한 영역을 확인하기 위해 Stx1 및 Stx2로부터의 성숙한 A 서브유닛의 아미노산 서열들을 정렬하였다. 다음, Stx (프레서(Fraser) 등의 문헌 (1994) 참조, 상기한 바와 같음) 및 Stx2 (프레서 등의 문헌 (2004) 참조, 상기한 바와 같음)의 결정 구조 (각각 단백질 데이터 벤크(Protein Data Bank) 수탁 번호 1RQ4 및 1R4P)를 딥 뷰/스위스-PDB 뷰어(Deep View/Swiss-PDB viewer)를 사용하여 상호 비교하여, 이러한 영역들의 3차원적 구조 및 상호간의 근접성에서 독소들간의 서열 차이가 있는 영역 위치를 평가하였다. 이전에 구축되어 있는 바와 같이, Stx2 A 서브유닛 내 잔기 42-49에 포함된 8개의 아미노산은 11E10 결합 부위의 일부를 형성하며, 이후 영역 A 또는 서열번호 1로서 지칭된다 (도 2a; 영역 A는 아미노산이 밑줄로 표시되어 있음). 영역 A로부터의 8개의 아미노산을 Stx2 결정 구조의 맥락에서 볼 경우, 이들은 독소 구조에서 주요 벤드(bend)를 형성하는 것으로 보이며 (도 2b에서 녹색으로 및 흑색 화살표로 나타낸 것 및 또한 도 2c에서 나타낸 바와 같음), 또한 아미노산 167 주위의 활성 부위 틈 근처, Stx2의 외부 표면 상에서 발견되었다.

[0120] Stx1 및 Stx2의 A 서브유닛들 사이의 제 2 비유사 영역은 이들 2개의 독소들의 아미노산 서열 및 결정 구조를 비교하여 확인되었으며, 이 세그먼트를 본 발명자들은 영역 B 또는 서열번호 2로 일컫는다 (도 2a 참고; 영역 B는 아미노산이 밑줄로 표시되어 있음). 영역 B는 Stx2의 A 서브유닛 내 5개의 잔기들을 포함하며 (<sub>96</sub>THISV<sub>100</sub>) (서열번호 2), 이 영역에서 5개의 아미노산 중 4개는 Stx1과 Stx2 사이에서 차이가 있다 (도 2a). 영역 B가 영역 A로부터 약 50개의 아미노산만큼 떨어져 있으나, 이 부분의 아미노산은 Stx2 결정 구조 내의 영역 A를 향해 신장된다 (영역 B는 도 2b에서 청색으로 및 회색 화살표로 표시되어 있음). 3차원 구조에서 영역 B에 대한 영역 A의 근접성은 공간-충전 모델(space-filling model)에서 더욱 분명해진다 (도 2c).

[0121] 본 발명자들이 영역 C 또는 서열번호 3이라고 일컫는 Stx1 및 Stx2의 A 서브유닛들 사이의 제 3 비유사 영역은 Stx2의 잔기 246 주변의 퓨린 분할 부위와 중첩된다 (도 2a 참고; 영역 C는 아미노산이 밑줄로 표시되어 있음). 영역 C는, 그 위치에서 Stx1과 Stx2 사이의 아미노산 서열 차이뿐 아니라 Stx와 Stx2의 결정 구조의 비교에서 영역 C(도 2c에서 시안색으로 및 백색 화살표로 표시되어 있음)가 영역 A 및 B에 공간적으로 근접해 있는 것을 나타내기 때문에 확인되었다. Stx 및 Stx2 결정 구조에 대한 본 발명자들의 분석으로부터, 본 발명자들은 Stx2의 동일한 표면 상의 영역 A, B 및 C 클러스터가 촉매 활성 부위에 비교적 근접해 있다고 결론지었다 (도 2c에서 가장 잘 나타남).

#### [0122] 제2 세대 키메라 독소와 단일클론 항체 11E10의 상호작용.

[0123] 영역 B 및 C가 11E10 에피토프의 일부인지를 결정하기 위해, 본 발명자들은, Stx1 상의 상응하는 영역들 대신에

Stx2로부터의 영역 A, B 또는 C의 다양한 조합이 함유된 키메라 독소의 제 2 세트를 생산하였다 (도 3a). 다음으로, Stx1, Stx2 또는 키메라 독소의 웨스턴 블로트를 11E10으로 탐침하였다 (도 3b, 하부 패널). 11E10 단일클론 항체는 영역 A를 함유하는 모든 독소를 검출하였다 (Stx2, Stx1 +A, Stx1 +AB, Stx1 +AC, 및 Stx1 +ABC) (도 3b, 하부 패널). 독소가 없는 영역 A는 11E10 단일클론 항체에 의해 검출되지 않았으며 (Stx1 및 Stx1 +BC), 이러한 발견은 영역 A가 11E10 에피토프의 본질적인 성분임을 확인해 준다. 그러나, 영역 A 및 B를 포함하는 2개의 키메라 독소 (Stx1 +AB 또는 Stx1 +ABC)는 영역 A 단독 또는 영역 C와 조합된 영역 A를 포함하는 키메라 독소보다 11E10 단일클론 항체에 의해 더 강하게 검출되는 것으로 보였다 (도 3b, 하부 패널). 종합해보면, 이들 결과는 영역 A 및 B 모두가 독소의 완전한 11E10 인식에 중요한 것임을 나타낸다.

[0124] 그 다음, 본 발명자들은 11E10 단일클론 항체에 의한 시험관 내 중화에 대해 5개의 제2 세대 키메라 독소(도 3a) 각각의 음과 용해물을 검정하였다. 항체는 영역 A, B 및 C를 함유하는 키메라 독소(Stx1 +ABC)를 Stx2 중화 수준의 약 65%로 중화하였다. 반면, 영역 A 및 B(Stx1 +AB) 또는 A 및 C(Stx1 +AC)만을 함유하는 키메라 독소를 Stx1 +ABC 키메라의 중화 수준의 거의 절반으로 중화하였다 (도 3c). Stx1 +A 또는 Stx1 +BC 키메라 독소에 대해서는 11E10에 의한 주목할 만한 중화가 관찰되지 않았다 (각각 약 6.9 및 4.3%). 키메라 독소의 더욱 집중적인 (> 50%) 중화를 위해서는 Stx2로부터의 영역 A, B 및 C가 요구되었기 때문에, 본 발명자들은 모든 3개의 영역(A, B 및 C)이 11E10에 의한 50% 초과의 중화에 필요한 것으로 결론지었다.

#### Stx2 및 Stx2 변이체 및 11E10 단일클론 항체를 사용한 웨스턴 블로트 및 시험관 내 중화 검정 결과.

[0125] 어떠한 Stx2 변이체가 11E10에 의해 인식되고/되거나 중화될 수 있는지를 결정하기 위해, Stx1, Stx2 또는 Stx2 변이체 (Stx2c, Stx2d, Stx2d<sub>act</sub> 및 Stx2e)를 웨스턴 블로트에 의해 분석하였다. Stx2e는 훨씬 적은 양으로 검출되었으나, Stx2 및 모든 Stx2 변이체는 11E10에 의해 인식되었다 (도 4A, 하부 패널). 웨스턴 블로트 형식에서 11E10에 의한 Stx2e의 이러한 약한 검출은, 11E10이 콜로니 블로트에 의해 Stx2e-생성 균주를 검출할 수 없다는 본 발명자들의 종래 보고와 일치된다 (페레라 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음). Stx2e는 Stx2와 비교할 때 영역 B에서의 2개의 보존적 아미노산 차이를 갖는다 (THISV(서열번호 2)가 아닌 AHISL(서열번호 19)). 또한, 영역 A에 바로 인접한 몇몇 아미노산 서열 차이들도 존재한다 (미기재). 본 발명자들은 이를 차이가 웨스턴 블로트에서 11E10에 의한 Stx2e의 감소된 인식때문일 수 있는 것으로 추측한다.

[0127] Stx2 변이체 독소에 대한 단일클론 항체 11E10의 중화 능력을 평가했을 때, 본 발명자들은 11E10이 모든 Stx2 변이체 독소를 Stx2의 중화 수준의 60% 이상으로 중화시키는 것을 밝혀냈다 (도 4B). 본 발명자들은 웨스턴 블로트 형식에서 11E10에 의한 Stx2e의 제한된 인식으로 인해 Stx2e의 11E10에 의해 관찰되는 중화 수준에 놀랐다 (도 4A, 하부 패널). 그러나, 이 연구에서 11E10에 의한 Stx2e의 중화는 11E10이 Stx2e를 부분적으로 중화시킨다는 것을 보여주는 본 발명자들의 종래 결과와 일치한다 (페레라 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음).

#### 마우스 내의 Stx1 +ABC 변성독소의 면역 및 보호 반응.

[0128] 그 다음, 본 발명자들은 Stx1 +ABC 하이브리드 분자의 변성독소화된 유도체가 마우스에서 Stx2에 대한 혈청-중화 또는 보호 반응을 이끌어내는지를 확인하고자 하였다. 마우스의 군들에 키메라 변성독소 또는 대조군으로서의 PBS를 접종하였다. 이후, 5마리 변성독소-접종된 마우스 및 5마리 PBS-접종된 마우스로부터의 혈청에 대해 항-Stx1 중화 반응을 평가하였다. PBS-접종된 마우스로부터의 어떠한 혈청도 Stx1-중화 활성을 함유하지 않았다. 종래 연구들로부터 예측된 바와 같이, 모든 5마리 변성독소-접종된 마우스는 Stx1에 대항하는 중화 항체를 가졌다 (문헌 [스미스 등 (2006) *Vaccine* 24:4122-4129], 상기한 웬(Wen) 등의 문헌 참조). 이들 5마리 마우스로부터의 혈청에 대한 평균 항-Stx1 중화 역가는 배경보다  $4.0 \pm 0.9 \log$  위였다. 나머지 34마리 변성독소-접종된 마우스로부터의 혈청 중 11개는 Stx2에 대해 일부 중화 반응을 가졌지만, 29마리 PBS-접종된 마우스로부터의 혈청에서는 어떠한 항-Stx2 반응도 나타나지 않았다 (데이터 미기재).

[0130] 최종 부스팅 2주 후, 5마리 음성-대조군 마우스 및 5마리 변성독소-접종된 마우스에 10 LD<sub>50</sub>의 Stx1을 복강 내 접종하였다. 종래 연구의 결과들로부터 예측된 바와 같이 (스미스 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음, 웬 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음), 모든 음성-대조군 마우스는 죽었지만, 모든 변성독소-접종된 마우스는 치사 접종에서 생존하였다 (표 3). 또한, Stx1로 접종된 변성독소-접종된 마우스의 생존은 이들 마우스로부터의 시험관 내 중화 역가와 직접 연관되어 있었다.

[0131]

&lt;표 3&gt;

Stx1 또는 Stx2로의 치사적 투여에 대한 접종된 마우스의 보호.

군	하기 것으로 접종된 마우스	10 LD <sub>50</sub> <sup>a,b</sup> 의 하기 것으로 투여된 마우스	마우스의 생존 마리수/마우스의 총 마리수 (생존 백분율)
A	PBS	Stx1	0/5
B	Stx1 +ABC 변성독소	Stx1	5/5
C	PBS	Stx2	6/29 (20.7 %)
D	Stx1 +ABC 변성독소	Stx2	12/34 (35.3 %) <sup>c</sup>

a. LD<sub>50</sub>이 종래에서는 Stx1 및 Stx2에 대해 각각 125 및 1 ng/마우스인 것으로 측정되었다.

b. 투여시 마우스의 평균 체중은 47.1 g이었다.

c. 피셔(Fisher)의 정확검정을 사용하여 C군 및 D군에서 생존율을 비교하였으며, p값은 0.2667이었다.

[0132]

[0133]

낮은 Stx2 중화 항체 역자가 변성독소-접종된 군에서 관찰되었기 때문에, 본 발명자들은 나머지 마우스를 5 LD<sub>50</sub>의 Stx2만으로 접종하기로 결정하였다. 29마리 음성-대조군 마우스 중 6마리 (20.7 %)가 Stx2의 접종에서 생존한 반면, 34마리 변성독소-접종된 마우스 중 12마리 (35.3 %)가 생존하였으며 (표 3), 이러한 발견은 통계적으로 유의적이지는 않지만 키메라 변성독소가 Stx2로부터 일부 보호를 제공했을 수 있음을 제시한다.

[0134]

시험관 내 단백질 합성 억제 검정.

[0135]

11E10 에피토프가 Stx2 활성 부위 틈 주변에 있는 표면 루프들로 이루어진 것으로 보인다는 본 발명자들의 발견은, 본 발명자들로 하여금 11E10이 단백질 합성을 억제하는 독소의 능력을 차단함으로써 Stx2를 중화시킬 것이라는 가설을 세우게 하였다. 따라서, 본 발명자들은 루시퍼라제 mRNA가 추가된 토끼 망상적혈구 단백질 합성 검정에서의 Stx2의 리보솜-비활성 효과를 11E10 단일클론 항체가 중화시킬 수 있는지 평가하였다. 독소의 농도는, 독소가 전혀 첨가되지 않은 경우에 측정된 신호와 비교하여, 루시퍼라제 리포터(reporter) 단백질로부터의 신호가 약 60%까지 감소되도록 선택하였다 (도 5). 검정에 11E10을 첨가함으로 인해, 비록 Stx2가 존재하는 경우에도 토끼 망상적혈구 용해물에서 단백질 합성이 허용되지만, 동종형-매칭된 비관련 항체는 그렇지 않았다(도 5).

[0136] 단일클론 항체 11E10은 베로 세포에서 Stx2의 전체 분포를 변경시킨다

[0137]

본 발명자들이 단일클론 항체 11E10이 시험관 내 단백질 합성 검정에서 Stx2에 의한 단백질 합성의 억제를 방지한다는 것을 발견하였지만, 본 발명자들은 11E10이 비독성화된 베로 세포의 원형질에서 Stx2가 리보솜에 도달되지 않게 할 수 있다는 가설도 세웠다. 따라서, 본 발명자들은 단일클론 항체 11E10이 표적 세포에서 Stx2 국소화를 변경시키는지를 결정하고자 하였다. (본 발명자들은 이전에 11E10-결합된 Stx2가 베로 세포들에 결합하고 11E10이 베로 세포들에 결합된 Stx2에 부착될 수 있다는 것을 발견하였다(데이터 미제시)). Stx2를 11E10 또는 PBS와 혼합하고, 항체/독소 또는 PBS/독소 혼합물을 베로 세포와 함께 인큐베이션하였다. 그 다음, 표적 세포들에서 Stx2의 분포를 토끼 다클론 항체 항-Stx2 및 형광단-표지된 항-토끼 IgG 2차 항체로 가시화하였다 (도 6). Stx2는 11E10의 부재 하에서 원형질 전반에 걸쳐 분포되어 있는 것으로 보였지만 (도 6A), 11E10의 존재 하에서는 주로 핵주변 몸체들에 놓축된 채로 존재하는 것으로 보였다 (도 6B). 독소/11E10 혼합물로 인큐베이션된 세포들을 항-마우스 IgG로 염색한 경우, 11E10은 Stx2와 동일한 핵주변 점모양 구조에서 관찰되었다 (도 6C). 11E10 단일클론 항체는 독소의 부재시 세포들 내로 진입할 수 없었다 (도 6D). 핵 주변의 점모양 몸체들 내의 11E10-결합된 Stx2의 국소화는 항체-독소 복합체가 세포 내로 진입하지만 원형질 내로의 교류가 이뤄지지 않았음을 암시하였다. 따라서, 본 발명자들은 비독성화된 세포를 초기 엔도솜 마커 단일클론 항체 EEA-1로 면역염색시킴으로써 Stx2 또는 11E10-결합된 Stx2가 초기 엔도솜 내에서 국소화되는지 의문을 품게 되었다. 본 발명자들은, 염색 패턴들을 중첩한 경우 황색-주황색에 의해 제시되는 바와 같이, 11E10-결합된 Stx2로 비독성화된 세포들 내의 다수의 Stx2가 초기 엔도솜 마커로 동시 국소화된다는 것을 발견하였다 (도 6E 내지 6G). 반면, 베로 세포들이 Stx2 단독으로 인큐베이션되는 경우, 독소는 원형질 전반에 걸쳐 발견되었으며, 소량만이 초기 엔도솜 마커로 동시 국소화되었다 (도 6H 내지 6J).

[0138]

논의

[0139]

본 발명자들의 결과는 11E10 단일클론 항체 에피토프가 입체형태이며 결정 구조에서 독소의 활성 부위에 근접한 것으로 보이는 Stx2 A 서브유닛 내 3개의 비선형 영역들을 포함함을 시사한다 (도 2c 참조). 11E10 에피토

프를 확인하기 위한 본 발명자들의 전략은 키메라 Stx1/Stx2 독소의 생성을 수반하며, Stx2 서열들을 Stx1 주체 상에 배치시키는 것이 항체 에피토프의 3차원적 삼차 구조를 유지하고 11E10 단일클론 항체에 의해 인식될 수 있게 한다는 가정에 기초하였다. 본 발명자들은 웨스턴 분석에서 11E10에 의한 인식이 허용되는 StxA2의 최소 영역이 단지 8개의 Stx2 아미노산으로 이루어진다는 것을 밝혀냈다 ( $_{42}\text{NHTPPGSY}_{49}$ , 서열번호 1). 그러나, Stx2로부터 8개의 아미노산 (영역 A)만을 갖는 키메라 Stx1/Stx2는 11E10 단일클론 항체에 의해 중화되지 않았다. 11E10이 Stx2를 중화시키기 때문에, 본 발명자들은 본인들이 확인한 8개의 아미노산이 11E10 에피토프의 중요 영역들로 이루어졌지만 완전한 중화 에피토프를 포함하지 않았다고 간주하였다. 본 발명자들은 또한 Stx1 및 Stx2의 아미노산 서열 및 결정 구조 모두에서의 차이점을 분석하여, 11E10 인식 및 중화에 관여하는 것일 수 있는 Stx2 상의 추가 영역들을 확인하기 위한 시도를 하였다. 이들 비교를 통하여, 본 발명자들은 11E10 에피토프에 잠재적으로 기여하는 Stx2의 2개 이상의 세그먼트를 확인하였다. 사실상, 본 발명자들은 모든 3개의 영역들을 Stx1 상의 상응하는 세그먼트를 교체하는데 사용하였을 때 이를 영역이 11E10에 의한 가장 완전한 인식 및 중화에 요구된 것을 발견하였다.

[0140]

완전한 11E10 중화 에피토프가 Stx2 상의 3개의 불연속 영역들을 포함한다는 본 발명자들의 결론은, 아마도 단일클론 항체가 웨스턴 블로트의 추정적인 변성 조건들 하에서 Stx2를 인식하기 때문에 놀라운 것이다. 이 후자의 발견에 대한 일부 설명들은 상상이 가능하다. 이들 가능성들로는, 본 발명자들이 다른 연구에서 단일클론 항체 13C4에 대해 관찰한 바와 같이, 웨스턴 반응성이 주로 11E10과 영역 A ( $_{42}\text{NHTPPGSY}_{49}$ )의 상호작용 때문인 경우이거나, 또는 웨스턴 블로트 과정 동안에 발생하는 A 서브유닛의 부분적 재폴딩 (refolding)의 경우가 포함된다 (문헌 [스미스 등 [(2006) *Infect. Immun.* 74:6992-6998]]).

[0141]

Stx2 상의 11E10 단일클론 항체 중화 에피토프를 형성하는 3개의 표면 루프들의 서열은 Stx2 변이체들 중에서 보존되어 있다. Stx2d 및 Stx2e에서의 이들 영역 내에서 상이한 일부 아미노산이 존재하며, 인간에게서 드물게 발견되는 2가지 독소가 단리되었다 (멜톤-셀사(Melton-Celsa) 등의 문헌 (2005) 참조, 상기한 바와 같음). 그러나, 11E10 단일클론 항체는 이 보고서에서 분석된 Stx2 및 모든 Stx2 변이체의 세포독성 활성을 검출하고 부분적으로 중화시켰다 (Stx2c, Stx2d, Stx2d<sub>act</sub> 및 Stx2e). Stx2e가 베로 세포들 상에서 11E10에 의해 중화되지 만 Stx2와 비교할 때 웨스턴 형식에서는 불량하게 인식된다는 발견은, Stx2와 Stx2e 간에 차이가 나는 영역 B 중의 서열이 중화에 있어서보다는 웨스턴 블로트 상에서의 인식에 있어서 더욱 중요하다는 것을 나타내는 것일 수 있다. 그러나, 11E10이 이들 모든 변이체 독소를 중화시키는 능력을 갖는다는 사실은, 이것이 인간 내의 Stx2 및 Stx2-관련된 독소들에 의해 중재된 질병을 치료하기 위한 우수한 후보물질일 수 있음을 암시한다. 사실상, 본 발명자들은 11E10이 독소혈증(toxemia)(Stx2) 질병 모델 (문헌 [서터(Sauter) 등 (2008) *Infect. Immun.* 76:4469-4478]) 및 Stx2d<sub>act</sub>를 생성시키는 균주를 갖는 질병을 가진 경구 식이 공급 마우스 모델 (에드워즈(Edwards) 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음)에서 보호적이라는 것을 밝혀냈다. 본 발명자들은 현재 11E10의 인간화 버전인 cαStx2에 대해 진행중인 실험실 평가에 관여하고 있는데, 여기서 제 I 단계 안전성 시험이 완료되었다 (다울링 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음).

[0142]

본 발명자들은, 11E10 에피토프를 포함하는 Stx2로부터 29개의 아미노산만을 함유하는 변성독소화된 키메라 Stx1 분자를 사용하는 접종에 의해 Stx2 접종으로부터 마우스를 보호하고자 시도하였다. 본 발명자들은, 비록 접종된 마우스가 Stx1에 대한 보호 반응을 일으켰지만, 단지 마우스 중 소수만이 Stx2-중화 항체를 생성시켰으며, 이들은 낮은 역가였음을 발견하였다. Stx2에 대한 반응은 키메라 변성독소의 추가 부스트로 개선될 수 있었을 수 있다.

[0143]

본 발명자들은, 11E10이 시험관 내의 Stx2의 효소적 활성을 차단한다는 것을 밝혀냈으며, 이러한 사실은 본 발명자들이 독소 활성 부위에 대한 11E10 에피토프의 근접성에 기초하여 예측한 것이었다. 또한 본 발명자들은, 크라우츠-피터슨(Krautz-Peterson) 등의 문헌 [(2008) *Infect. Immun.* 76:1931-1939 참조]에 보고된 바와 같이, 11E10이 세포 내 독소의 전체 분포를 변경시킨다는 것을 관찰했으며, 이러한 발견은 상이한 StxA2 단일클론 항체인 5C12에 의한 Stx2 중화에 대한 데이터와 유사하다. 이들 연구자들은, 단일클론 항체 5C12가 StxA2와 결합하는 경우, 이로 인해 독소의 세포내 트래피킹 패턴이 변경된다고 결론지었다 (크라우츠-피터슨 등의 문헌 참조, 상기한 바와 같음). 본 발명자들의 데이터에서는, 일단 11E10/Stx2 복합체가 숙주 세포와 결합하여 그 내부로 진입하면, 항체는 세포질 내의 표적 리보솜으로의 독소 트래피킹을 방지할 수 있다는 것을 나타낸다. 그러나, 본 발명자들은, 11E10이 시험관 내에서 독소의 효소적 기능을 방지하는 것을 입증하였기 때문에, 본 발명자들은 11E10와 복합체를 형성한 Stx2의 A 서브유닛이 세포질 내의 그의 효소적 표적에 도달하게 되면, 독소는 세포를 죽일 수 없을 것으로 예측한다.

[0144]

## 기타 실시양태들

[0145]

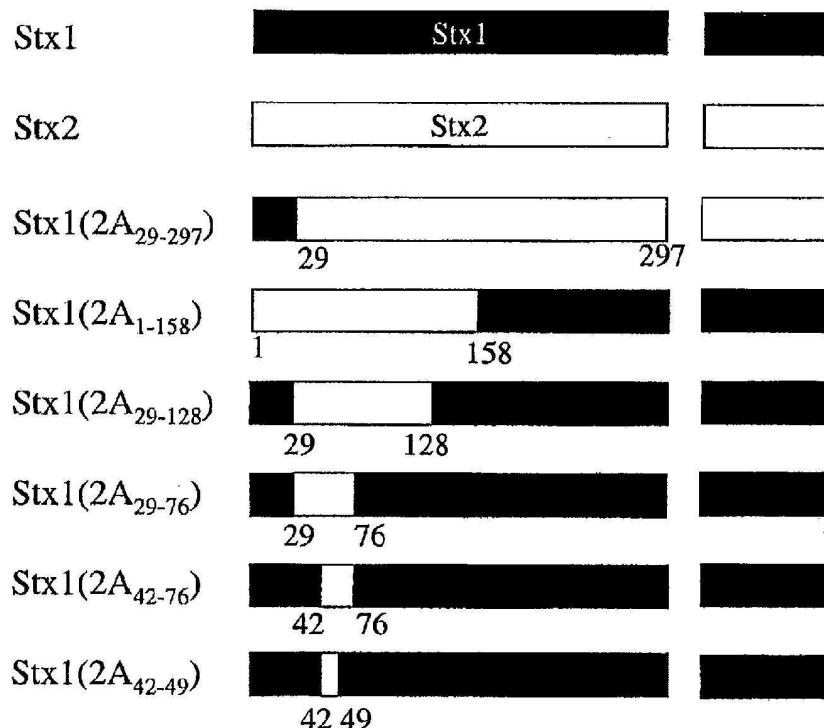
본 발명의 범위 및 사상으로부터 벗어나지 않는 본 발명에 대한 상술한 방법들 및 조성물들의 다양한 변형에 및 변화가 당업자들에게 명백할 것이다. 비록 본 발명은 특정한 바람직한 실시양태들과 연계해서 설명되었지만, 청구된 것과 같은 본 발명은 그런 특정한 실시양태들에 한정되지 않아야 함을 이해해야 한다.

[0146]

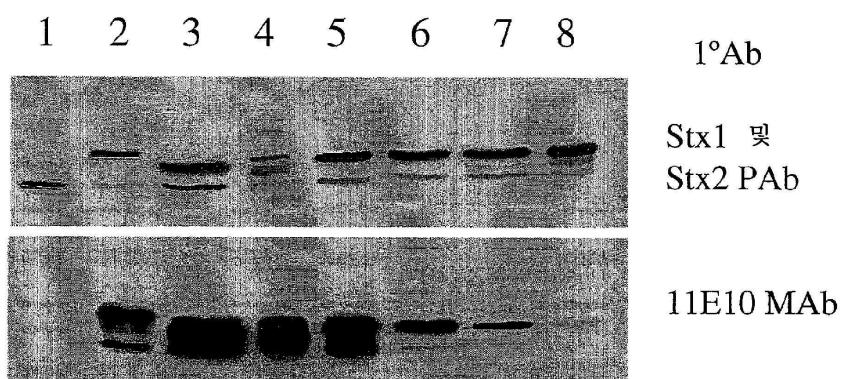
본 명세서에 언급된 모든 특허, 특히출원, 및 공개물은 마치 개개의 독립된 공개문헌이 구체적이고 개별적으로 참조 병합된 것과 동일한 정도로 본원에 참조 병합된다.

## 도면

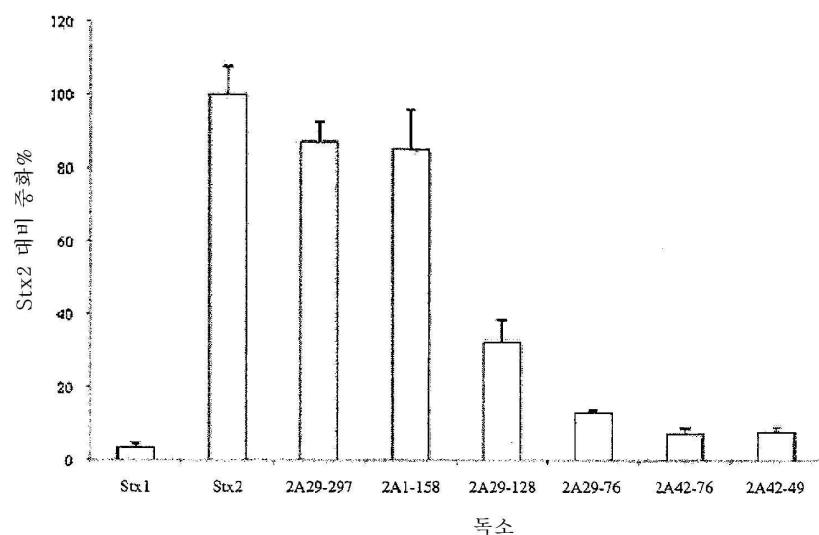
## 도면1a



## 도면1b



## 도면1c



## 도면2a

	40	50
Stx1	MIDSGSGDNLFA	
Stx2	V.NHTPPGSY..	

## A 영역

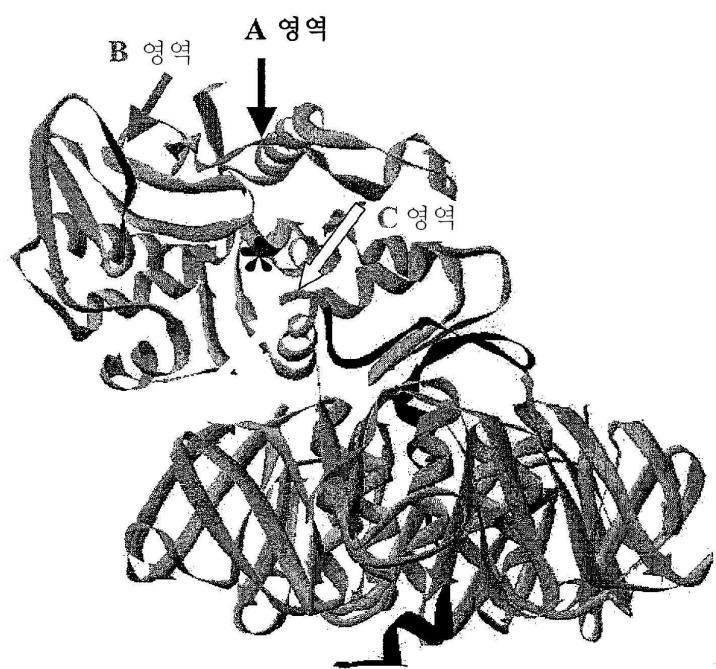
	90		100
Stx1	YRFADF <del>SHVT</del> FP <del>G</del>		
Stx2	...S...T.ISV...		

B 영역

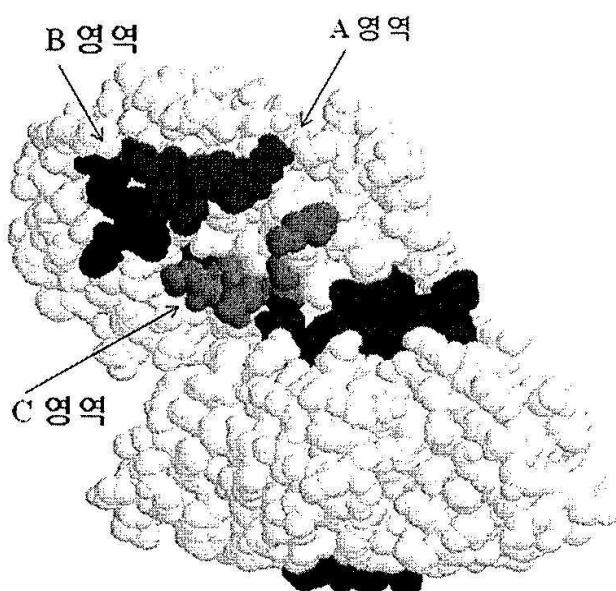
242 260  
Stx1 CHHHASRVARMASDEFPSMC  
Stx2 ...OGA.SV.AVNE.SOPE...

영역

도면2b

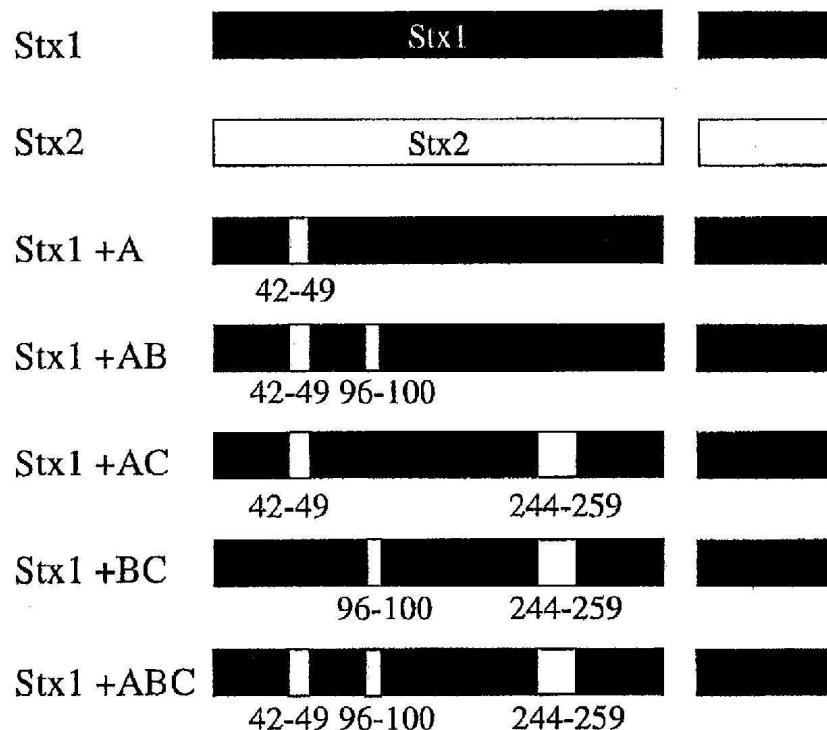


도면2c

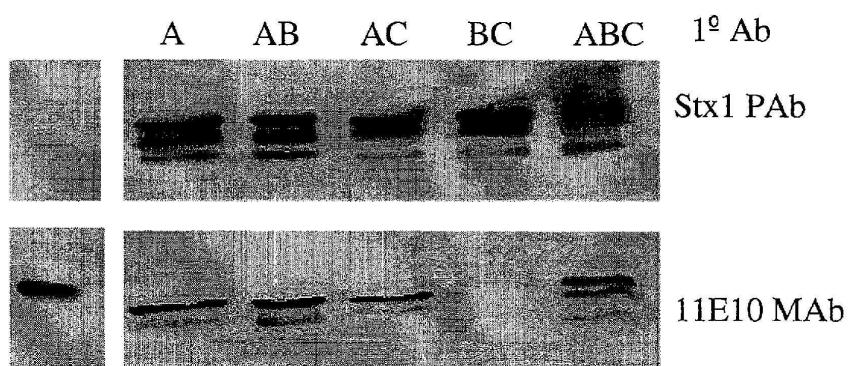


Stx2

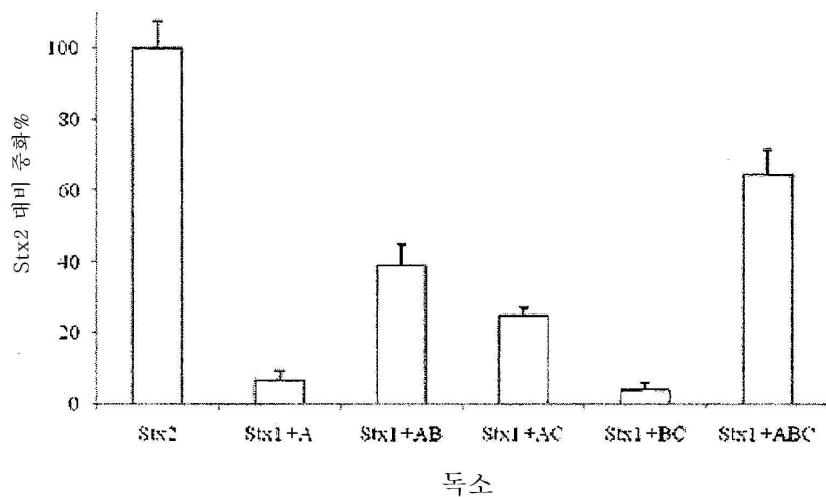
### 도면3a



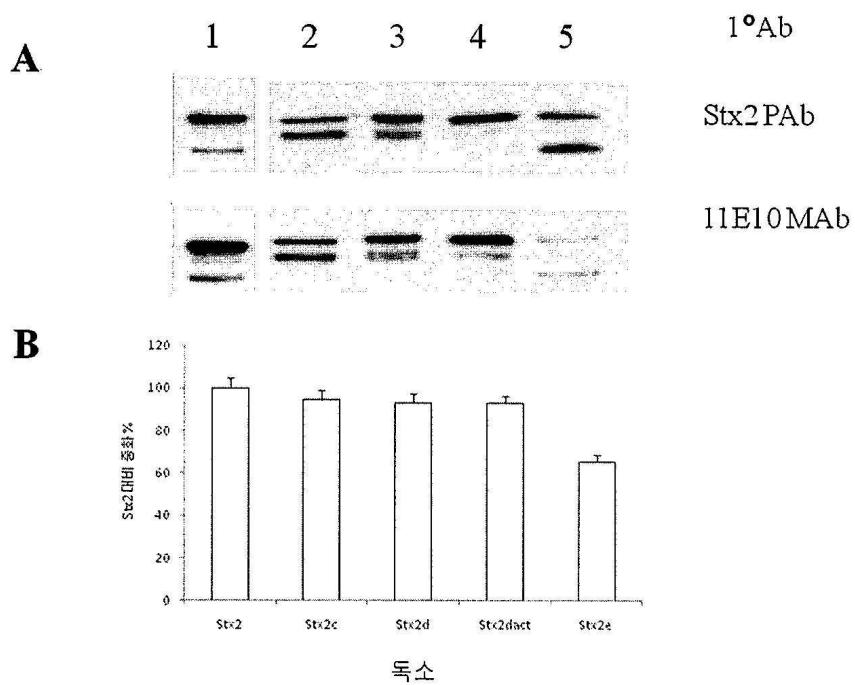
### 도면3b



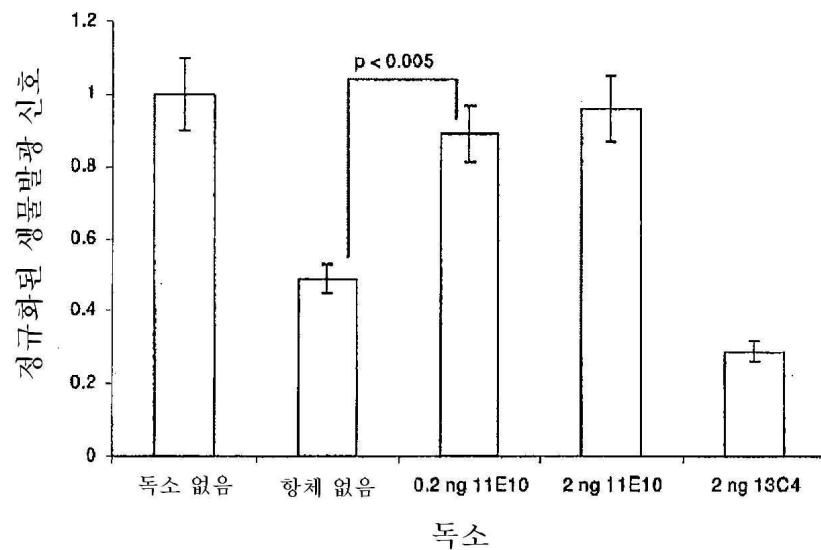
도면3c



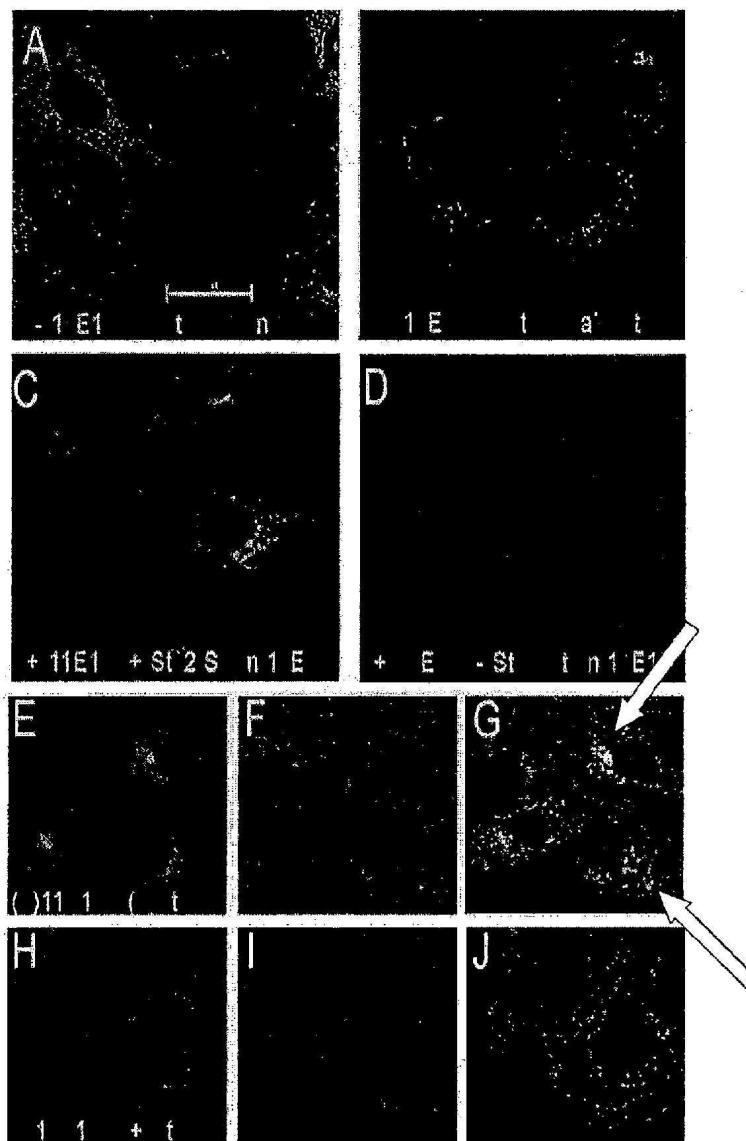
도면4



도면5



도면6



도면7

- A. 서열번호 1  
NHTPPGSY
- B. 서열번호 2  
THISV
- C. 서열번호 3  
QGARSVRRAVNEESQPE
- D. 서열번호 19  
AHISL

## 도면8

## A. 서열번호 4

MKIIIFRVLT FFFVIFSVNV VAKEFTLDFS TAKTYVDSL VIRSAIGTPL 50  
QTISGGTSL LMINHTPPGS YFAVDVRGID PEEGRFNNLR LIVERNNLYV 100  
TGFVNRTNNV FYRFADFSHV TFPGTTAVTL SGDSSYTTLQ RVAGISRTGM 150  
QINRHSLLTTS YLDLMSHSGT SLTQSVARAM LRFVTVTAA LRFRQIQRGF 200  
RTTLDDLSGR SYVMTAEDVD LTLNWGRLLS VLPDYHGQDS VRVGRISFGS 250  
INAILGSVAL ILNCHHHASR VARMASDEF SMCPADGRVR GITHNKILWD 300  
SSTLGAILMR RTISS 315

## B. 서열번호 5

MKIIIFRVLT FFFVIFSVNV VAKEFTLDFS TAKTYVDSL VIRSAIGTPL 50  
QTISGGTSL LMINHTPPGS YFAVDVRGID PEEGRFNNLR LIVERNNLYV 100  
TGFVNRTNNV FYRFADFSHV TFPGTTAVTL SGDSSYTTLQ RVAGISRTGM 150  
QINRHSLLTTS YLDLMSHSGT SLTQSVARAM LRFVTVTAA LRFRQIQRGF 200  
RTTLDDLSGR SYVMTAEDVD LTLNWGRLLS VLPDYHGQDS VRVGRISFGS 250  
INAILGSVAL ILNCHHHASR VARMASDEF SMCPADGRVR GITHNKILWD 300  
SSTLGAILMR RTISS 315

## C. 서열번호 6

MKIIIFRVLT FFFVIFSVNV VAKEFTLDFS TAKTYVDSL VIRSAIGTPL 50  
QTISGGTSL LMINHTPPGS YFAVDVRGID PEEGRFNNLR LIVERNNLYV 100  
TGFVNRTNNV FYRFADFSHV TFPGTTAVTL SGDSSYTTLQ RVAGISRTGM 150  
QINRHSLLTTS YLDLMSHSGT SLTQSVARAM LRFVTVTAA LRFRQIQRGF 200  
RTTLDDLSGR SYVMTAEDVD LTLNWGRLLS VLPDYHGQDS VRVGRISFGS 250  
INAILGSVAL ILNCHHQGAR SVRAVNEESQ PECPADGRVR GITHNKILWD 300  
SSTLGAILMR RTISS 315

## D. 서열번호 7

MKIIIFRVLT FFFVIFSVNV VAKEFTLDFS TAKTYVDSL VIRSAIGTPL 50  
QTISGGTSL LMDSGSGDM YFAVDVRGID PEEGRFNNLR LIVERNNLYV 100  
TGFVNRTNNV FYRFADFSHV TFPGTTAVTL SGDSSYTTLQ RVAGISRTGM 150  
QINRHSLLTTS YLDLMSHSGT SLTQSVARAM LRFVTVTAA LRFRQIQRGF 200  
RTTLDDLSGR SYVMTAEDVD LTLNWGRLLS VLPDYHGQDS VRVGRISFGS 250  
INAILGSVAL ILNCHHQGAR SVRAVNEESQ PECPADGRVR GITHNKILWD 300  
SSTLGAILMR RTISS

## E. 서열번호 8

MKIIIFRVLT FFFVIFSVNV VAKEFTLDFS TAKTYVDSL VIRSAIGTPL 50  
QTISGGTSL LMINHTPPGS YFAVDVRGID PEEGRFNNLR LIVERNNLYV 100  
TGFVNRTNNV FYRFADFSHV TFPGTTAVTL SGDSSYTTLQ RVAGISRTGM 150  
QINRHSLLTTS YLDLMSHSGT SLTQSVARAM LRFVTVTAA LRFRQIQRGF 200  
RTTLDDLSGR SYVMTAEDVD LTLNWGRLLS VLPDYHGQDS VRVGRISFGS 250  
INAILGSVAL ILNCHHQGAR SVRAVNEESQ PECPADGRVR GITHNKILWD 300  
SSTLGAILMR RTISS 315

## 도면9

## A. 서열번호 9

1 ATGAAAATAA TTATTTTAG AGTGCTAATC TTTTCTTTG TTATCTTTC AGTTAATGTG  
 61 GTGGCGAAGG AATTACCTT AGACTTCTG ACTGCAAAGA CGTATGTAGA TTCGCTGAAT  
 121 GTCATTGCT CTGCAATAGG TACTCCATTA CAGACTATTT CATCAGGAGG TACGCTTTA  
 181 CTGATGATTG ATAGTGCTC AGGGGATAAT TTGTTTGAG TTGATGTCAG AGGGATAGAT  
 241 CCAGAGGAAG GGCGGTTAA TAATCTACGG CTTATTGTTG AACGAAATAA TTATATGTG  
 301 ACAGGATTG TTAACAGAC AAATAATGTT TTTATCGCT TTGCTGATT TTACATGTT  
 361 ACCTTCCAG GTACACAGC GGTTACATTG TCTGGTGACA GTAGCTATAC CACCTTACAG  
 421 CGTGTGCAAG GGATCAGTC TACGGGATG CAGATAAATC GCCATTGCTT GACTACTTCT  
 481 TATCTGGATT TAATGTGCA TAGTGGAACC TCACTGACGC AGTCTGTGGC AAGACCGATG  
 541 TTACGGTTG TTACTGTGAC AGCTGAAGCT TTACGTTTC GGCAAAATACA GAGGGGATT  
 601 CGTACACAC TGGATGATCT CAGTGGCGT TCTATGTA TGACTGCTGA AGATGTTGAT  
 661 CTTACATTGA ACTGGGAAAG GTTGAGTAGC GTCTGCTG ACTATCAATGG ACAAGACTCT  
 721 GTTCGTGTA GAAGAATTTC TTTTGGAAAG ATTAATGCAA TTCTGGGAAAG CGTGGCATT  
 781 ATACTGAATT GTCATCATCA TGCATCCCGA GTTGCAGAA TGGCATCTGA TGAGTTTCT  
 841 TCTATGTGTC CGGCAGATGG AAGAGTCCCGT GGGATTACCGC ACAATAAAAT ATTGTGGGAT  
 901 TCATCCACTC TGGGGCAAT TCTGATCGC AGAACTATTA GCAGTTGAGG GGGTAAAATG  
 961 AAAAAACAT TATTAATAGC TGCACTGCTT TCATTTTTT CAGCAAGTGC GCTGGCGACG  
 1021 CCTGATTGTTG TAACTGGAAAG GGTGAGCTT ACAAAATATA ATGATGACGA TACCTTTACA  
 1081 GTTAAAGTGG GTGATAAAGA ATTATTAC AACAGATGGA ATCTTCAGTC TCTTCTTCTC  
 1141 AGTGGCAAA TTACGGGAT CACTGTAAAC ATTAAAACTA ATGCCTGTCA TAATGGAGGG  
 1201 GGATTGAGCG AAGTATTTT TCGTTGA

## B. 서열번호 10

1 ATGAAAATAA TTATTTTAG AGTGCTAATC TTTTCTTTG TTATCTTTC AGTTAATGTG  
 61 GTGGCGAAGG AATTACCTT AGACTTCTG ACTGCAAAGA CGTATGTAGA TTCGCTGAAT  
 121 GTCATTGCT CTGCAATAGG TACTCCATTA CAGACTATTT CATCAGGAGG TACGCTTTA  
 181 CTGATGATTG ATAGTGCTC AGGGGATAAT TTGTTTGAG TTGATGTCAG AGGGATAGAT  
 241 CCAGAGGAAG GGCGGTTAA TAATCTACGG CTTATTGTTG AACGAAATAA TTATATGTG  
 301 ACAGGATTG TTAACAGAC AAATAATGTT TTTATCGCT TTGCTGATT TTACATGTT  
 361 ACCTTCCAG GTACACAGC GGTTACATTG TCTGGTGACA GTAGCTATAC CACCTTACAG  
 421 CGTGTGCAAG GGATCAGTC TACGGGATG CAGATAAATC GCCATTGCTT GACTACTTCT  
 481 TATCTGGATT TAATGTGCA TAGTGGAACC TCACTGACGC AGTCTGTGGC AAGACCGATG  
 541 TTACGGTTG TTACTGTGAC AGCTGAAGCT TTACGTTTC GGCAAAATACA GAGGGGATT  
 601 CGTACACAC TGGATGATCT CAGTGGCGT TCTATGTA TGACTGCTGA AGATGTTGAT  
 661 CTTACATTGA ACTGGGAAAG GTTGAGTAGC GTCTGCTG ACTATCAATGG ACAAGACTCT  
 721 GTTCGTGTA GAAGAATTTC TTTTGGAAAG ATTAATGCAA TTCTGGGAAAG CGTGGCATT  
 781 ATACTGAATT GTCATCATCA TGCATCCCGA GTTGCAGAA TGGCATCTGA TGAGTTTCT  
 841 TCTATGTGTC CGGCAGATGG AAGAGTCCCGT GGGATTACCGC ACAATAAAAT ATTGTGGGAT  
 901 TCATCCACTC TGGGGCAAT TCTGATCGC AGAACTATTA GCAGTTGAGG GGGTAAAATG

## C. 서열번호 11

1 ATGAAAAAAA CATTATTAAT AGTGCTACG CTTTCATTTC TTTCAGCAAG TGGCGCTGGCG  
 61 ACGCTGATT GTGTAACCTGG AAAGGTGGAG TATACAAAT ATAATGATGA CGATACCTT  
 121 ACAGTTAAAG TGGCTATAA AGAATTATTT ACCAACAGAT GGAATCTTC GTCTCTTCTT  
 181 CTCAGTGCCTC AAATTACGGG GATGACTGTA ACCATAAAAA CTAATGCCTG TCATAATGG  
 241 GGGGATTCA CGGAAGTTAT TTTTCGTGTA

## 도면10

## A. 서열번호 12

1 MKIIIFRVLT FFFVIFSVNV VAKEFTLDFS TAKTYVDSL VIRSAIGTPL QTISGGTSL  
 61 LMIDSGSGDN LFAVDVRGID PEEGRFNRLR LIVERNNLYV TGFWNRNTNNV FYRFADFSV  
 121 TFPGTTAVTL SGDSSYTLQ RVAGISRTGM QINRHSLLTSLTQMSHSGT SLTQSVARAM  
 181 LRFVTVAEALRFRQIQRGF RTTLDDLSGR SYVMTAEDVD LTINWGRLLS VLPDYHGQDS  
 241 VRVGRISPGS INAILGSVAL ILCNCHHHSR VARMASDEFP SMCPADGRVR GITHNKILWD  
 301 SSTLGAILMR RTISS

## B. 서열번호 13

1 MKKTLIASLSFFSASALA TPDCVTGKVE YTKYNDDDTF TVKVGDKELF TNRWNLQSL  
 61 LSAQITGMV TIKTNACHNG GGFSEVIFR

## 도면11

## A. 서열번호 14

1 ATGAAGTGTAA TATTATTTAA ATGGGTACTG TGCTCTTAC TGGGTTTTTC TTCGGTATCC  
 61 TATTCCCGGG AGTTTACGAT AGACTTTCTG ACCAACAAA GTTATGTCTC TTCGTTAAAT  
 121 AGTATACGGA CAGAGATATC GACCCCTCTT GAACATATAT CTCAGGGGAC CACATCGGTG  
 181 TCTGTTATTA ACCACACCCC ACCGGGCAGT TATTTGCTG TGGATATACG AGGGCTTGAT  
 241 GTCTATCAGG CGCGTTTGA CCATCTCTG CTGATTATTG AGCAAAATAA TTTATATGTG  
 301 GCGGGTTCG TTAATACGGC AAACAATACT TTCTACCGTT TTTCAGATT TACACATATA  
 361 TCAGTGCCCC GTGTGACAAC GGTTCCATG ACAACGGACA GCAGTTATAC CACTCTGC  
 421 CGTGTGCGAG CGCTGGAAACG TTCCCGAATG CAAATCAGTC GTCACTCACT GGTTTCATCA  
 481 TATCTGGCGT TAATGGAGTT CAGTGGTAAT ACAATGACCA GAGATGCATC CAGAGCAGTT  
 541 CTGCGTTTG TCACTGTAC AGCAGAAGCC TTACGTTCA GGCAGATACA GAGAGAATT  
 601 CGTCAGGCAC TGCTCTCTG TATAACGATGA CGCCCGGGAGA CGTGGACCTC  
 661 ACTCTGAACT GGGGGCGAAAT CAGCAATGTG CTTCGGAGT ATCGGGGAGA GGATGGTGT  
 721 AGAGTGGGGA GAATATCTT TAATAATATA TCAGCGATAC TGGGGACTGT GGCCGTTATA  
 781 CTGAATTGCC ATCATCAGGG GGCGCGTTCT GTTCGCCCCG TGAAATGAAGA GAGTCAACCA  
 841 GAATGTAGA TAACTGGCGA CAGGCGTGTG ATAAAAATAA ACAATACATT ATGGGAAAGT  
 901 AATACAGCTG CACCGTTCT GAAACAGAAAG TCACAGTTT TATATACAC GGGTAAATAA  
 961 AGGAGTTAAG CATGAAAGG ATGTTTATGG CGGTTTTTATT TGCATTAGCT TCTGTTAAATG  
 1021 CAATGGCGGC GGATTGTCTT AAAGCTAAA TTGAGTTTC CAAGTATAAT GAGGATGACA  
 1081 CATTTACAGT GAAGGTTGAC GGGAAAGAAT ACTGGACCAAG TCGCTGGAAT CTGCAACCGT  
 1141 TACTGCAAAG TGCTCAGTTG ACAGGAATGA CTGTCACAAT CAAATCCAGT ACCTGTGAAT  
 1201 CAGGCTCCGG ATTGCTGAA GTCCAGTTA ATAATCACTG A

## B. 서열번호 15

1 ATGAAGTGTAA TATTATTTAA ATGGGTACTG TGCTCTTAC TGGGTTTTTC TTCGGTATCC  
 61 TATTCCCGGG AGTTTACGAT AGACTTTCTG ACCAACAAA GTTATGTCTC TTCGTTAAAT  
 121 AGTATACGGA CAGAGATATC GACCCCTCTT GAACATATAT CTCAGGGGAC CACATCGGTG  
 181 TCTGTTATTA ACCACACCCC ACCGGGCAGT TATTTGCTG TGGATATACG AGGGCTTGAT  
 241 GTCTATCAGG CGCGTTTGA CCATCTCTG CTGATTATTG AGCAAAATAA TTTATATGTG  
 301 GCGGGTTCG TTAATACGGC AAACAATACT TTCTACCGTT TTTCAGATT TACACATATA  
 361 TCAGTGCCCC GTGTGACAAC GGTTCCATG ACAACGGACA GCAGTTATAC CACTCTGC  
 421 CGTGTGCGAG CGCTGGAAACG TTCCCGAATG CAAATCAGTC GTCACTCACT GGTTTCATCA  
 481 TATCTGGCGT TAATGGAGTT CAGTGGTAAT ACAATGACCA GAGATGCATC CAGAGCAGTT  
 541 CTGCGTTTG TCACTGTAC AGCAGAAGCC TTACGTTCA GGCAGATACA GAGAGAATT  
 601 CGTCAGGCAC TGCTGAAAC TGCTCTCTG TATAACGATGA CGCCCGGGAGA CGTGGACCTC  
 661 ACTCTGAACT GGGGGCGAAT CAGCAATGTG CTTCGGAGT ATCGGGGAGA GGATGGTGT  
 721 AGAGTGGGGA GAATATCTT TAATAATATA TCAGCGATAC TGGGGACTGT GGCCGTTATA  
 781 CTGAATTGCC ATCATCAGGG GGCGCGTTCT GTTCGCCCCG TGAAATGAAGA GAGTCAACCA  
 841 GAATGTAGA TAACTGGCGA CAGGCGTGTG ATAAAAATAA ACAATACATT ATGGGAAAGT  
 901 AATACAGCTG CACCGTTCT GAAACAGAAAG TCACAGTTT TATATACAC GGGTAAATAA

## C. 서열번호 16

1 ATGAAGAAGA TGTTTATGGC GGTTTATTT GCATTAGCTT CTGTTAATGC AATGGCGGCG  
 61 GATTGTGCTA AAGCTAAAT TGAGTTTCC AAGTATAATG AGGATGACAC ATTACAGTG  
 121 AAGGGTGACG GGAAAGAATA CTGACCACTG CGCTGGAAATC TGCAACCGT ACTGCAAAGT  
 181 GCTCAGTTGA CAGGAATGAC TGTCACAAATC AAATCCAGTA CCTGTGAATC AGGCTCCGG  
 241 TTGCTGAAAG TGCAGTTAA TAATGACTGA

## 도면12

## A. 서열번호 17

1 MKCILFKWVL CLLLGFSSVS YSREFTIDES TQOSYVSSLN SIRTEISTPL EHISQGTTSV  
 61 SVINHTEPGS YFAVDIRCLD VYQARFDHLR LIIEQNNLYV AGFVNTATNT FYRFSDFTHI  
 121 SVPGVTTVSM TTDSSYTTLQ RVAALERSGM QISRHSVLSS YLALMEFSGN TMTRDASRAV  
 181 LRFVTVTAEE LRFRQIQREF RQALSETAPV YTMTPGDVL TLNWGRISNV LPEYRGEDGV  
 241 RVGRISFNNI SAILGTVAVI LNCHHQGARS VRAVNEESQP ECQITGDRPV IKINNTLWES  
 301 NTAAAFLNRK SQFLYTTGK

## B. 서열번호 18

1 MKKMFMAVLF ALASVNAMAA DCAKGKIEFS KYNEDDTFTV KVDGKEYWTS RWNLQPLLQS  
 61 AQLTGMTVII KSSTCESGSG FAEVQFNND

## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

<110> The Henry M. Jackson Foundation For The Advancement of  
Military Medicine, Inc.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS BASED ON SHIGA TOXIN TYPE 2 PROTEIN

<130> 50111/117W03

<160> 55

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Asn His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Thr His Ile Ser Val

1 5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu

1 5 10 15

<210> 4

<211> 315

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 4

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe

1 5 10 15

Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala

20 25 30

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr

35 40 45

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asn

50 55 60

His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp

65 70 75 80

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn

85 90 95

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser

145 150 155 160

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val

165 170 175

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser

225	230	235	240
Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly			
245	250	255	
Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala			
260	265	270	
Arg Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg			
275	280	285	
Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu			
290	295	300	
Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser			
305	310	315	
<210> 5			
<211> 315			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic Construct			
<400> 5			
Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe			
1	5	10	15
Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala			
20	25	30	
Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr			
35	40	45	
Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asn			
50	55	60	
His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp			
65	70	75	80
Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn			
85	90	95	
Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr			
100	105	110	
Arg Phe Ala Asp Phe Thr His Ile Ser Val Pro Gly Thr Thr Ala Val			

115

120

125

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

130

135

140

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser

145 150 155 160

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val

165

170

175

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser

225 230 235 240

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

245

250

255

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala

260

265

270

Arg Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg

275

280

285

Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu

290

295

300

Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser

305 310 315

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 315

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 6

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

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

Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 130 135 140  
 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
 165 170 175  
 Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
 180 185 190

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

245 250 255

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val

260 265 270

Arg Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu Cys Pro Ala Asp Gly Arg

275 280 285

Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu

290 295 300

Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser

305 310 315

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 315

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 7

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe

1 5 10 15

Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala

20 25 30

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp

65 70 75 80

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn

85 90 95

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr

100 105 110

Arg Phe Ala Asp Phe Thr His Ile Ser Val Pro Gly Thr Thr Ala Val

115 120 125

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

130 135 140

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser

145 150 155 160

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val

165 170 175

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val

260 265 270

Arg Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu Cys Pro Ala Asp Gly Arg

275 280 285

Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu

290 295 300

Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser

305 310 315

<210> 8

<211> 315

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe

1 5 10 15

Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala  
 20 25 30  
 Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr  
 35 40 45  
 Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asn  
 50 55 60  
 His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn  
 85 90 95  
 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
 100 105 110  
 Arg Phe Ala Asp Phe Thr His Ile Ser Val Pro Gly Thr Thr Ala Val  
 115 120 125  
 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 130 135 140  
 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
 165 170 175  
 Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
 180 185 190  
 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser  
 195 200 205  
 Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn  
 210 215 220  
 Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser  
 225 230 235 240  
 Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly  
 245 250 255  
 Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val

260	265	270
Arg Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu Cys Pro Ala Asp Gly Arg		
275	280	285
Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu		
290	295	300
Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser		
305	310	315

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1227

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 9

atgaaaataa ttattttag agtgctaact tttttcttg ttatctttc agttaatgtg	60
gtggcgaagg aatttacctt agacttctcg actgcaaaga cgtatgtaga ttcgctgaat	120
gtcattcgct ctgcaatagg tactccatta cagactattt catcaggagg tacgtctta	180
ctgatgattt atagtggctc agggataat ttgtttgcag ttgatgtcag agggatagat	240
ccagaggaag ggcggttaa taatctacgg cttattgtt aacgaaataa tttatatgt	300
acaggattt ttaacaggac aaataatgtt ttttacgct ttgctgattt ttcacatgtt	360

acctttccag gtacaacagc ggttacattt tctggtgaca gtagctatac cacgttacag	420
cgtgttgcg ggtacgtcg tacggggatg cagataatc gccattcggt gactacttct	480
tatctggatt taatgtcgca tagtggacc tcactgacgc agtctgtggc aagagcgatg	540
ttacggttt ttactgtgac agctgaagct ttacgtttc ggcaaataca gaggggattt	600
cgtacaacac tggatgatct cagtggcgat tcttatgtaa tgactgctga agatgttgat	660
cttacattga actggggaaag gttgagtagc gtcctgcctg actatcatgg acaagactct	720
gttcgtgttag gaagaatttcc ttttggaaagc attaatgcaa ttctggaaag cgtggcattt	780

atactgaatt gtcatcatca tgcattcgca gttggccagaa tggcatctga tgagtttct	840
tctatgtgtc cggcagatgg aagagtccgt gggattacgc acaataaaat attgtggat	900
tcatccactc tggggcaat tctgatgcgc agaactattt gcagttgagg gggtaaaatg	960
aaaaaaacat tattaatagc tgcattcgat tcattttt cagcaagtgc gctggcgacg	1020
cctgattgtg taactggaaa ggtggagttt acaaaatata atgatgacga taccttaca	1080
gttaaagtgg gtgataaaga attatattacc aacagatgga atcttcagtc tcttcttc	1140

agtgcgcaaa ttacggggat gactgtaacc attaaaacta atgcctgtca taatggaggg	1200
ggattcagcg aagtatttt tcgttga	1227
<210> 10	
<211> 948	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 10	
atgaaaataa ttattttag agtgctaact ttttcttg ttatcttc agttaatgtg	60
gtggcgaagg aatttacctt agacttctcg actgcaaaga cgtatgtaga ttcgcgtaa	120
gtcattcgct ctgcaatagg tactccatta cagactattt catcaggagg tacgtctta	180
ctgatgattt atagtggctc aggggataat ttgtttcgag ttgatgtcag agggatagat	240
ccagaggaag ggcggttaa taatctacgg cttattgtt aacgaaataa tttatatgt	300
acaggattt ttaacaggac aaataatgtt ttttacgtc ttgctgattt ttcacatgtt	360
acctttccag gtacaacagc ggttacattt tctggtgaca gtagctatac cacgttacag	420
cgtgttgcag ggatcagtcg tacggggatg cagataaatac gccattcggt gactacttct	480
tatctggatt taatgtcgca tagtggacc tcactgacgc agtctgtggc aagagcgatg	540
ttacggttt ttaactgtgac agctgaagct ttacgttttc ggcaaataca gaggggattt	600
cgtacaacac tggatgatct cagtggcgt tcttatgtaa tgactgctga agatgttcat	660
cttacattga actgggaag gttgagtagc gtccctgcctg actatcatgg acaagactct	720
gttcgtgtag gaagaatttc ttttggaaagc attaatgcaaa ttctggaaag cgtggcatta	780
atactgaattt gtcatcatca tgcattcgca gttgccagaa tggcatctga tgagtttctt	840
tctatgtgtc cggcagatgg aagagtccgt gggattacgc acaataaaat attgtggat	900
tcatccactc tggggcaat tctgtatgcgc agaactattt gcagttga	948
<210> 11	
<211> 270	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 11	
atgaaaaaaaaa cattattaaat agctgcattt ctttcatttt tttcagcaag tgcgtggcg	60
acgcctgttattt gtgttaactgg aaagggtggag tataaaaaat ataatgtga cgatacctt	120
acagttaaag tgggtgataa agaatttattt accaacagat ggaatcttca gtcttttt	180

ctcagtcgc aaattacggg gatgactgta accattaaaa ctaatgcctg tcataatgga 240  
 ggggattca gcgaagttat tttcggttga 270  
 <210> 12  
 <211> 315  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 12

Met Lys Ile Ile Ile Phe Arg Val Leu Thr Phe Phe Phe Val Ile Phe  
 1 5 10 15  
 Ser Val Asn Val Val Ala Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala  
 20 25 30

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

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
 100 105 110  
 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
 115 120 125  
 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 130 135 140  
 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 145 150 155 160

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
 165 170 175  
 Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
 180 185 190  
 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser

195

200

205

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

210

215

220

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser

225 230 235 240

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

245

250

255

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala

260

265

270

Arg Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg

275

280

285

Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu

290

295

300

Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser

305 310 315

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 13

Met Lys Lys Thr Leu Leu Ile Ala Ala Ser Leu Ser Phe Phe Ser Ala

1 5 10 15

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

20

25

30

Lys Tyr Asn Asp Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly Asp Lys Glu

35

40

45

Leu Phe Thr Asn Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Ser Ala Gln

50

55

60

Ile Thr Gly Met Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly

65 70 75 80

Gly Gly Phe Ser Glu Val Ile Phe Arg

85

<210> 14

<211> 1241

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 14

atgaagtgtatattatcaa atgggtactgtccctgttac tgggttttc ttccgttatcc 60

tattccggg agttacgt agactttcg acccaacaaa gttatgtctc ttcgtaat 120

agtatacgga cagagatatc gaccctctt gaacatatac ctcagggac cacatcggtg 180

tctgttatta accacacccc accgggcagt tatttgctg tggatatacg agggcttcat 240

gtctatcagg cgcggtttga ccatcttcgt ctgattattg agcaaaaataa tttatatgtg 300

gccgggttcg ttaatacggc aacaaatact ttctaccgtt tttcagattt tacacatata 360

tcagtgcccg gtgtgacaac ggttccatg acaacggaca gcagttatac cactctgcaa 420

cgtgtcgca cgctggaacg ttccggaatg caaatcagtc gtcaactact ggtttcatca 480

tatctggcgt taatggagtt cagtggtaat acaatgacca gagatgcac cagagcagt 540

ctgcgttttg tcactgtcac agcagaagcc ttacgcttca ggcagataca gagagaattt 600

cgtcaggcac tgtctgaaac tgctcctgtg tatacgatga cgccgggaga cgtggacctc 660

actctgaact gggggcgaat cagcaatgtg cttccggagt atcggggaga gcatggtgtc 720

agagtgggaa gaatatcctt taataatata tcagcgatac tggggactgt ggccgttata 780

ctgaattgcc atcatcaggg ggccgcgttct gttcgcccg tgaatgaaga gagtcaacca 840

gaatgtcaga taactggcga caggcctgtt ataaaaataa acaatacatt atggaaagt 900

aatacagctg cagcgtttct gaacagaaaag tcacagttt tatatacaac ggtaaataa 960

aggagtttaag catgaagaag atgttatgg cggtttatt tgcattagct tctgttaatg 1020

caatggccgc ggatttgtgct aaaggtaaaa ttgagtttc caagtataat gaggatgaca 1080

catttacagt gaagggttgc gggaaagaat actggaccag tcgctgaaat ctgcaaccgt 1140

tactgcaaag tgctcagttg acaggaatga ctgtcacaat caaatccagt acctgtaat 1200

caggctccgg atttgctgaa gtgcagttta ataatgactg a 1241

<210> 15

<211> 960

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 15

atgaagtgtatattatataatgggtactgtgcctgttac tgggttttcttcggatcc	60
tattccggaggatcacatcgatagacttttcgacccaaacaaatgtatgtctcttcgttaat	120
agtatacgacagagatatcgcaccctttaacatataatctcaggggacacatcggtgt	180
tctgttattaccacacccaccggcagtatitgcgttgtatatacgaggctgt	240
gtctatcaggcgcgtttgtatcttcgtctgattatttgcacaaataatgtatgt	300
gccgggttcgttataacatcgacacaaataacttttacccgttttacatata	360

tcagtgcgggtgtgacaacggttccatgacaacggacagcagttatacactctgaa	420
cgtgtcgacgcgtggaaacgttccggatgcaatcgtcgtcactcactgtttcatca	480
tatctggcgttaatggagttcgtggtaatacaatgaccaagatgcacacagcgtt	540
ctgcgtttgtactgtcacagcagaagccttacgttcaagcagatacaagagaattt	600
cgtcaggcacgtctgaaacgtctctgtgtatcgatgacggcgggagaatggac	660
actctgaactggggcgaatcagcaatgtgttccggagtatcgggagaatggatgggtc	720
agagtgggaaatataatccttaataatataatcgatatactgggactgtggcgatata	780

ctgaattgccatcatcaggggcgcgttctgtcgcccgtaatgaagaagtcacca	840
gaatgtcagaatactggcgaaggcctgttataaaataacaatacattatggaaagt	900
aatacagctgcagcgttctgtacagatgtttatataacaacggtaatata	960

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 270

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 16

atgaagaagaatgttatggcgttttatttgcattagcttctgttaatgcataggcggcg	60
gattgtgctaaggtaataatgtatggccaaatgtataatgaggatgacacatggaaatgt	120
aagggttacgttggaaatatactggaccgtcgctggaaatctcaaccgttactgcaatgt	180

gctcagttgcaggaatgactgtcacaatcataatccagtaatgtgaatcaggctccgga	240
tttgctgaagtgcagtttaataatgactgt	270

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 319

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 17

Met Lys Cys Ile Leu Phe Lys Trp Val Leu Cys Leu Leu Gly Phe

1	5	10	15
Ser Ser Val Ser Tyr Ser Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln			
20	25	30	
Gln Ser Tyr Val Ser Ser Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr			
35	40	45	
Pro Leu Glu His Ile Ser Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn			
50	55	60	
His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp			
65	70	75	80
Val Tyr Gln Ala Arg Phe Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln Asn			
85	90	95	
Asn Leu Tyr Val Ala Gly Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr			
100	105	110	
Arg Phe Ser Asp Phe Thr His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr Val			
115	120	125	
Ser Met Thr Thr Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Ala			
130	135	140	
Leu Glu Arg Ser Gly Met Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser			
145	150	155	160
Tyr Leu Ala Leu Met Glu Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala			
165	170	175	
Ser Arg Ala Val Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg			
180	185	190	
Phe Arg Gln Ile Gln Arg Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr Ala			
195	200	205	
Pro Val Tyr Thr Met Thr Pro Gly Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp			
210	215	220	
Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val			
225	230	235	240
Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr			
245	250	255	

Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg

260 265 270

Ala Val Asn Glu Glu Ser Gln Pro Glu Cys Gln Ile Thr Gly Asp Arg

275 280 285

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

290 295 300

Ala Phe Leu Asn Arg Lys Ser Gln Phe Leu Tyr Thr Thr Gly Lys

305 310 315

<210> 18

<211> 89

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 18

Met Lys Lys Met Phe Met Ala Val Leu Phe Ala Leu Ala Ser Val Asn

1 5 10 15

Ala Met Ala Ala Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ser Arg Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr

50 55 60

Gly Met Thr Val Thr Ile Lys Ser Ser Thr Cys Glu Ser Gly Ser Gly

65 70 75 80

Phe Ala Glu Val Gln Phe Asn Asn Asp

85

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

Ala His Ile Ser Leu

1	5	
<210>	20	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	20	
taaggaggac agctatg		17
<210>	21	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	21	
gatcgatcc ccctgtaacg aagttgcgt aacagc		36
<210>	22	
<211>		
>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	22	
gatcgaattc tcgcttacga tcatcaaaga gatcataacc		39
<210>	23	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	23	
gatcgatcc agcaagggcc accatatcac ataccgcc		38
<210>	24	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	

<400> 24	
cagggaaatt caccatgcga aatttttta acaaatgc	38
<210> 25	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 25	
gaacatatac ctcagggac cac	23
<210> 26	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 26	
gtggtccctt gagatatacg ttctaatgga gtacctattg cagagcg	47
<210> 27	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 27	
ttacggttg ttactgtgac agctgaagc	29
<210> 28	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 28	
gcttcagctg tcacagtaac aaaccgtaaa actgctctgg atgcatctct ggt	53
<210> 29	
<211> 22	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 29	
cagataaatc gccattcggtt ga	22
<210> 30	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 30	
tcaacgaatg gcgatttatac tgcattccgg aacgttccag cgc	43
<210> 31	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 31	
ggtacgtctt tactgatgat taaccacacc ccaccggca gttatttgc	50
<210> 32	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 32	
gcaaaataac tgcccggtgg ggtgtggta atcatcgta aagacgtacc	50
<210> 33	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 33	
tatgtacag gatttgtaa caggac	26
<210> 34	

<211> 60	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 34	
gtccgttaa caaatcgt cacaataaa ttatggct caataatcg acgaagatgg	60
<210> 35	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 35	
aggaggacag ctatgaaaat aattatttt agagtgcata	39
<210> 36	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 36	
gatcgatcc taaggaggac agctatgaaa ataatt	36
<210> 37	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 37	
ggtgtggtg acgaaaaata acttcgtga atcc	34
<210> 38	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 38	
cagttgggt ggtgggtggtg acgaaaaata ac	32

<210> 39	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 39	
gatcgaattc tcagtggtgg tggtggtggt g	31
<210> 40	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 40	
aaccacaccc caccggcag ttatggca gttgtatgtca gaggg	45
<210> 41	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 41	
ataactgccc ggtgggtgt ggttaatcat cagtaaagac gtacc	45
<210> 42	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 42	
acacatatat cagtgcagg tacaacagcg gttacattgt ctgg	44
<210> 43	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	

<400> 43	
acctggact gatatatgtg taaaatcagc aaagcgataa aaaaca	46
<210> 44	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 44	
gtgaatgaag agagtcaacc agaatgtccg gcagatggaa gagtccg	47
<210> 45	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 45	
ttctgggtga ctctttcat tcac	24
<210> 46	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 46	
ggcattaata ctgaattgtc atcatcaggg ggcgcgttct gttcg	46
<210> 47	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 47	
atgatgacaa ttcatgttata atgcc	25
<210> 48	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Construct

<400> 48

aggaggacag ctatgaagtg tatattat tt aaatgggt 38

<210> 49

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 49

gatcgatcc taaggaggac agctatgaag tgta 34

<210> 50

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 50

ggtgtggtg gtcattatta aactgcactt c 31

<210> 51

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 51

cagtgggt ggtgggtggtg gtcattatta aa 32

<210> 52

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 52

gatcgatcc ctggtatcgt attacttcag cc 32

<210> 53

<211> 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 53

gatcgaattc ctgcacacta cgaaaccagc 30

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 54

tcagtgacag gatttgtaa caggac 26

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 55

gtcctgttaa caaatcctgt cactgataaa ttatttcgtt caacaataag ccg 53