



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0122726
(43) 공개일자 2017년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/12 (2006.01) A61K 39/40 (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/1228 (2013.01)
A61K 39/40 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7021389
(22) 출원일자(국제) 2015년11월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년07월28일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/075583
(87) 국제공개번호 WO 2016/131503
국제공개일자 2016년08월25일
(30) 우선권주장
15155448.2 2015년02월17일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
알사니스 바이오사이언시스 게엠베하
오스트리아, 에이-1030 비엔나, 헬무트-크발팅거-가쎄 2
(72) 발명자
스지자토, 발레리아
오스트리아, 에이-1160 빈, 오타크링거 스트라쎄 173/5
나지, 가보르
헝가리, 에이치-9400 소프론, 에르드뷰르거 듀에로에 8
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 클렙시엘라 슈모니에의 갈락탄-계 O-항원을 표적하는 항체

(57) 요약

본 발명은 클렙시엘라 슈모니에 (*Klebsiella pneumoniae*)의 리포폴리사카라이드(LPS) O-항원 구조의 갈락탄-III 에피토프를 특이적으로 인식하며, 상기 에피토프는 갈락탄-III 반복 단위에 포함되고, 갈락탄-III 반복 단위는 하기 화학식 I의 분지된 갈락토오스 동중중합체인 것인, 단리된 항체를 제공한다:

(뒷면에 계속)

대표도

표 1: 카바의 명명법을 이용한 CDR 서열							
중쇄 가변 영역 (VH)							
서열번호	mAb 이름	서열번호 CDR1	VH CDR1	서열번호 CDR2	VH CDR2	서열번호 CDR3	VH CDR3
21	8E3-E5	1	PTPSNYWIN	2	BIRKSNMYATYYVES/KG	3	TKYGGFAN
23	9H9-H7	4	LAPSNYWMN	5	BIRKSNYSYTHYAES/KG	6	TPFPGGFFY
25	5A4-A7	7	PTPSOYWMN	8	BIRKSNMYATYYAES/KG	9	LPEPGGFFY
27	2D8-A10	10	PTPSNYWMN	11	BIRKSNMYATHYAES/KG	12	TPFPGGFFY
경쇄 가변 영역 (VL)							
서열번호	mAb 이름	서열번호 VL CDR4	VL CDR4	서열번호 VL CDR5	VL CDR5	서열번호 VL CDR6	VL CDR6
22	8E3-E5	13	KSSQSLLYSSNQKNCIA	14	WASTRES	15	HQYLSSYT
24	9H9-H7	16	RSSQSLVHSDGQNTYLE	17	KVSNRFS	18	SQSTHVPWT
26	5A4-A7	19	RSSQSLVHSDGQNTYLE	20	LVSNRFS	18	SQSTHVPWT
28	2D8-A10	19	RSSQSLVHSDGQNTYLE	17	KVSNRFS	18	SQSTHVPWT

[화학식 1]

[→3)-β-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→]



본 발명은 상기 항체를 포함하는 약학 또는 진단 제제, 및 상기 항체의 제조 방법을 추가로 제공한다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/56916 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/20 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2333/26 (2013.01)

(72) 발명자

구아찰라, 루이스

오스트리아, 에이-1210 빈, 도나우펠더스트라췌
73/5/9

비스람, 제라

오스트리아, 에이-1090 비엔나, 투르크스트라췌
21/2

나기, 에스터

오스트리아, 에이-1070 비엔나, 웨스트반스트라췌
32-34/아이/12

루카시에비치, 올란타 카타르지나

폴란드, 53-201 브로츠와프, 할레라 115/14

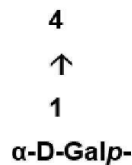
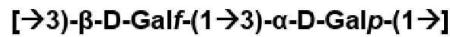
명세서

청구범위

청구항 1

클렙시엘라 슈모니에 (*Klebsiella pneumoniae*)의 리포폴리사카라이드(LPS) O-항원 구조의 갈락탄-III 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체로서, 상기 에피토프는 갈락탄-III 반복 단위에 포함되고, 상기 갈락탄-III 반복 단위는 하기 화학식 I의 분지된 갈락토오스 동종중합체인 것인, 단리된 항체:

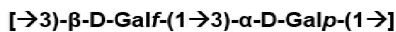
[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 갈락탄-I 에피토프에 비하여 갈락탄-III 에피토프에 우선적으로 결합하거나, 또는 갈락탄-I 에피토프와 교차 반응하지 않고, 상기 갈락탄-I 에피토프는 클렙시엘라 슈모니에의 LPS O2a-항원 구조의 갈락탄-I 반복 단위에 포함되고, 상기 갈락탄-I 반복 단위는 하기 화학식 II의 선형 갈락토오스 동종중합체인, 항체:

[화학식 2]



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 갈락탄-III 에피토프는 다중-약물 내성 (MDR) 클렙시엘라 슈모니에, 특히 MDR 클론 ST258의 것인, 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 갈락탄-III 에피토프를 발현하는 클렙시엘라 슈모니에 균주의 내독소를 중화시키며, 갈락탄-III 에피토프에 10^{-7} M 미만, 바람직하게는 10^{-8} M 미만, 더욱 바람직하게는 10^{-9} M 미만의 Kd 값으로 결합하는 친화성을 가지는, 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 전장 단클론 항체, 항원 결합 부위를 포함하는 적어도 하나의 항체 도메인을 포함하는 그의 항체 단편, 또는 항원 결합 부위를 포함하는 적어도 하나의 항체 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 특히 상기 항체는 무작위의 또는 인공적인 아미노산 서열을 포함하는 비-천연 유래 항체인, 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 카바트의 넘버링 시스템에 따라 표시되는, 표 1에 나열된 CDR1 내지 CDR3 서열 중 임의의 것, 또는 그의 기능 활성 CDR 변이체로 특징지어지는, 적어도 하나의 항체 중쇄 가변 영역 (VH)를 포함하는, 항체.

청구항 7

제6항에 있어서,

A) 하기의 그룹 구성원 i) 내지 iv)로 이루어지는 그룹에서 선택되거나:

i) a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

b) 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

c) 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3

을 포함하는 항체;

ii) a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

b) 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

c) 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3

을 포함하는 항체;

iii) a) 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

b) 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

c) 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3

을 포함하는 항체;

iv) a) 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

b) 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

c) 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3

을 포함하는 항체; 또는

B) 모 항체의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 중 임의의 것의 적어도 하나의 기능 활성 CDR 변이체를 포함하는, A)의 그룹 구성원들 중 임의의 것인 모 항체의 기능 활성 변이체인 항체인, 항체.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 도 2에 도시된 VH 서열 중 임의의 것으로부터 선택되는 VH 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 카바트의 넘버링 시스템에 따라 표시되는, 표 1에 나열된 CDR4 내지 CDR6 서열 중 임의의 것, 또는 그의 기능 활성 CDR 변이체를 포함하는, 항체 경쇄 가변 영역 (VL)을 추가로 포함하는, 항체.

청구항 10

제9항에 있어서,

A) 하기의 그룹 구성원 i) 내지 iv)로 이루어지는 그룹 중에서 선택되거나:

i) a) 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및

b) 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및

c) 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6

을 포함하는 항체;

ii) a) 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및

b) 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및

c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6

을 포함하는 항체;

iii) a) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및

b) 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및

c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6

을 포함하는 항체;

iv) a) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및

b) 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및

c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6

을 포함하는 항체; 또는

B) 모 항체의 CDR4, CDR5 또는 CDR6 중 임의의 것의 적어도 하나의 기능 활성 CDR 변이체를 포함하는, A)의 그룹 구성원들 중 임의의 것인 모 항체의 기능 활성 변이체인 항체인, 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 도 2에 도시된 VL 서열 중 임의의 것으로부터 선택되는 VL 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

청구항 12

제6항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 표 1에 나열된 임의의 항체의 CDR1 내지 CDR6 서열; 또는

b) 도 2에 도시된 임의의 항체의 VH 서열 및 VL 서열

을 포함하거나; 또는

c) 상기 a) 내지 c) 서열로 특징지어지는 모 항체의 기능 활성 변이체이고,

바람직하게는,

i. 상기 기능 활성 변이체가 모 항체의 CDR1 내지 CDR6 중 임의의 것의 적어도 하나의 기능 활성 CDR 변이체를 포함하고/하거나;

ii. 상기 기능 활성 변이체가 VH 서열 및 VL 서열 중 임의의 것의 프레임워크 영역 중에 적어도 하나의 점 돌연변이를 포함하고,

추가로,

iii. 상기 기능 활성 변이체가 모 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 특이성을 갖고/갖거나;

iv. 상기 기능 활성 변이체가 모 항체의 인간, 인간화된, 키메라 또는 쥐(murine) 및/또는 친화성 성숙된 변이체인, 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 표 1에 나열된 CDR 서열 중 임의의 것의 기능 활성 CDR 변이체를 포함하며, 상기 기능 활성 CDR 변이체는

a) 상기 모 CDR 서열 중에 1, 2 또는 3개의 점 돌연변이; 및/또는

b) 상기 모 CDR 서열의 4개의 C-말단 또는 4개의 N-말단, 또는 4개의 중심 아미노산 위치 중 임의의 위치에 1개 또는 2개의 점 돌연변이; 및/또는

c) 상기 모 CDR 서열과 적어도 60%의 서열 동일성;

중 적어도 하나를 포함하고;

바람직하게는 상기 기능적 활성 CDR 변이체가 4 또는 5개 미만의 아미노산으로 이루어지는 임의의 CDR 서열 중

에 1 또는 2개의 점 돌연변이를 포함하는, 항체.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 하기의 a) 내지 f)로 이루어지는 군에서 선택되는, 항체:

- a) a. 서열번호 1의 CDR1 서열; 및
- b. 서열번호 2의 CDR2 서열; 및
- c. 서열번호 3의 CDR3 서열; 및
- d. 서열번호 13의 CDR4 서열; 및
- e. 서열번호 14의 CDR5 서열; 및
- f. 서열번호 15의 CDR6 서열

을 포함하는 항체;

- b) a. 서열번호 4의 CDR1 서열; 및
- b. 서열번호 5의 CDR2 서열; 및
- c. 서열번호 6의 CDR3 서열; 및
- d. 서열번호 16의 CDR4 서열; 및
- e. 서열번호 17의 CDR5 서열; 및
- f. 서열번호 18의 CDR6 서열

을 포함하는 항체;

- c) a. 서열번호 7의 CDR1 서열; 및
- b. 서열번호 8의 CDR2 서열; 및
- c. 서열번호 9의 CDR3 서열; 및
- d. 서열번호 19의 CDR4 서열; 및
- e. 서열번호 20의 CDR5 서열; 및
- f. 서열번호 18의 CDR6 서열

을 포함하는 항체;

- d) a. 서열번호 10의 CDR1 서열; 및
- b. 서열번호 11의 CDR2 서열; 및
- c. 서열번호 12의 CDR3 서열; 및
- d. 서열번호 19의 CDR4 서열; 및
- e. 서열번호 17의 CDR5 서열; 및
- f. 서열번호 18의 CDR6 서열

을 포함하는 항체;

- e) a. 서열번호 4의 CDR1 서열; 및
- b. 서열번호 5의 CDR2 서열; 및
- c. 서열번호 6의 CDR3 서열; 및
- d. 서열번호 19의 CDR4 서열; 및

- e. 서열번호 20의 CDR5 서열; 및
 - f. 서열번호 18의 CDR6 서열
- 을 포함하는 항체; 및
- f) a. 서열번호 10의 CDR1 서열; 및
 - b. 서열번호 11의 CDR2 서열; 및
 - c. 서열번호 12의 CDR3 서열; 및
 - d. 서열번호 19의 CDR4 서열; 및
 - e. 서열번호 20의 CDR5 서열; 및
 - f. 서열번호 18의 CDR6 서열
- 을 포함하는 항체; 또는

10^{-8} M 미만의 Kd 값으로 갈락탄-III 항원에 결합하는 친화성을 가지는, 상기 임의의 것의 기능 활성 CDR 변이체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 균체 형성의 위험이 있거나 또는 이를 앓고 있는 개체에, 상기 감염을 제한하거나 또는 상기 감염으로부터 초래되는 질병 병태를 개선시키기에 유효한 양의 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체의 치료에 사용하기 위한, 바람직하게는 1차 및 2차 세균혈증, 폐렴, 요로 감염, 간 농양, 복막염, 또는 뇌수막염의 치료 또는 예방을 위한, 항체.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, 바람직하게는 비경구 또는 점막 제형을 포함하고, 선택적으로 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약학 제제.

청구항 17

개체에서 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 균체 형성, 또는 1차 및 2차 세균혈증, 폐렴, 요로 감염, 간 농양, 복막염, 또는 뇌수막염과 같은 관련 질병을 진단하기 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 개체는 면역저하 또는 면역억제된 환자, 또는 그의 접촉자인, 용도.

청구항 19

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 진단 제제로서, 조성물 또는 부품 키트 중에 상기 항체 및 추가적인 진단 시약을 포함하며,

- a) 상기 항체; 및
- b) 상기 추가적인 진단 시약; 및
- c) 선택적으로 상기 항체 및 진단 시약 중 적어도 하나를 고정시키는 고체상의 성분들을 포함하는, 진단 제제.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 추가적인 진단 시약은, 항원에 결합한 항체 및/또는 항체의 반응 산물에 특이적으로 반응하는 진단 표지 또는 시약인, 진단 제제.

청구항 21

- a) 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체를 제공하는 단계, 및
- b) 상기 항체가 검사하려는 개체의 생물학적 샘플 중의 갈락탄-III 에피토프와 특이적으로 면역반응 하는지를 검출함으로써, 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 균체 형성을 진단하는 단계를 포함하는,
- 개체에서 클렙시엘라 슈모니에 균주에 의해 유발되는 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 균체 형성에 대한 진단 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 체액 또는 조직 샘플, 바람직하게는 혈액 샘플, 대변 샘플, 피부 샘플, 뇨 샘플, 뇌척수액 샘플, 및 기관내 흡인물, 흉수액, 폐천자물, 코 먼봉 채취물 또는 객담과 같은 기도 시료로 이루어지는 군에서 선택되는 샘플, 또는 상기 임의의 것으로부터 유래되는 클렙시엘라 슈모니에 단리물인, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체를 암호화하는, 단리된 핵산.

청구항 24

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체의 VH 및/또는 VL을 포함하는 단백질을 발현하는 암호화 서열을 포함하는, 발현 카세트 또는 플라스미드.

청구항 25

제24항의 발현 카세트 또는 플라스미드를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 26

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법으로, 제25항의 숙주 세포를 상기 항체를 제조하는 조건에서 배양하거나 유지시키는, 방법.

청구항 27

- a) 항체 또는 항체-생산 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및
- b) 상기 샘플 중의 또는 샘플에 의해 제조된 항체의, 제1항에서 정의된 갈락탄-III 에피토프와의 결합을 평가하여, 상기 항체와 상기 에피토프 간에 양성 반응이 있는 경우 상기 항체를 후보 항체로 확인하는 단계를 포함하는,
- 후보 항체의 확인 방법.

청구항 28

- a) 항체 또는 항체-생산 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및
- b) 상기 샘플 중의 또는 샘플에 의해 제조된 항체의, 제1항에서 정의된 갈락탄-III 에피토프와의 결합을 평가하여, 갈락탄-I 에피토프 대비 갈락탄-III 에피토프와 상기 항체 간에 특이적 양성 반응이 있는 경우 상기 항체를 후보 항체로 확인하는 단계를 포함하는,
- 후보 항체의 확인 방법.

청구항 29

- a) 제27항 또는 제28항에서 확인되는 후보 항체를 제공하는 단계, 및
- b) 후보 항체와 동일한 에피토프 결합 특이성을 가지는, 상기 후보 항체의 단클론 항체, 또는 인간화된 또는 인간 형태, 또는 그의 유도체를 제조하는 단계를 포함하는,
- 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대부분의 유행성 다중-약물 내성 클렙시엘라 슈모니에 (*Klebsiella pneumoniae*) ST258 과 관련된, 독특한 갈락탄-계 O-항원 구조를 특이적으로 인식하는 단클론 항체에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 클렙시엘라 슈모니에는 요로 감염, 폐렴, 및 패혈증에 원인이 되며 주요 질병과 사망을 유발하는 중요 장내 병원균이다. 다중-약물 내성 (MDR) 균주들은 최근 부상하여 전세계적으로 확산되고 있으며, 이에 대한 치료 옵션이 제한적이다.

[0003] 리포폴리사카라이드 (LPS)는 클렙시엘라 슈모니에와 같은 그람-음성균 외막의 외층의 주요 구성요소이다. LPS는 구조적 및 기능적으로 다양한 3개의 주요 부분, 즉 i) 내독소로도 알려진 지질 A, ii) 코어-올리고사카라이드, 및 iii) 올리고사카라이드 블록의 반복 단위로 되어 있는 O-항원을 갖는다.

[0004] 클렙시엘라 슈모니에의 O-항원은 서로 다른 O-형을 정의하는 다양한 구조의 표면 항원이다. 최근 인식된 7개의 O-형 중 가장 보편적인 혈청형은 O1과 O2로 보이며, 이들은 모든 단리물의 대부분 (즉, 50% 초과)에서 함께 발견되는 것으로 보고되었다(비특허문헌 1, 2). O1과 O2 항원은 모두 갈락토오스 중합체, 즉 갈락탄으로 이루어져 있다. O2 항원 (하기의 O2ac와 구별하기 위하여 O2a 또는 O2ab로도 알려짐)은 소위 갈락탄-I 디사카라이드의 반복으로 구성된다 (도 3). 반면, O1 항원 및 O2ac 항원은 갈락탄-I 외에도 하기와 같이 추가적인 별개의 구조를 포함한다: LPS 코어-중심부쪽 부분은 갈락탄-I의 반복으로 구성되고, 갈락탄-II (O1의 경우 갈락토오스의 다른 동중합체) 또는 비-갈락탄 반복 단위 (O2ac의 경우) 에 의해 캡핑된다.

[0005] 갈락탄-I O-서브유닛을 공유하는 혈청형들은 이 구조의 합성과 배출을 암호화하는 매우 유사한 *rfb* 좌위를 갖는다. 갈락탄-I을 암호화하는 오페론의 뉴클레오티드 서열은 부분적으로 결정되어 있다 (비특허문헌 3). 상기 좌위는 6개의 유전자를 포함하는 7.3 kb 길이로 개시되어 있다. 복제된 *rfb* 좌위에 의한 클렙시엘라 슈모니에 O1, 대장균 (*E. coli*) K-12, 또는 살모넬라 엔테리카 세로바르 티피무리움 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)의 고르지 않은 변종의 상보성은, 갈락탄-I O-항원의 반복으로 이루어지는 스무스 LPS의 생산을 회복시켰다. 이는 상기 6개의 유전자가 갈락탄-I O-항원 측쇄의 생산에 필수적이고 충분함을 시사한다 (비특허문헌 3). 다른 O2 클렙시엘라 균주 내 D-갈락탄-I의 구조적 변형은 Kelly et al. (비특허문헌 5)에 개시되어 있다. 그럼에도 불구하고, 이러한 변형의 유전적 배경은 아직 밝혀지지 않았다. 갈락탄-II 반복 단위 (즉, 여기서 기재되는 갈락탄-I 또는 갈락탄-III을 캡핑하는 것들)를 암호화하는 유전적 결정요인이 최근 개시되었다 (비특허문헌 4). 중요한 것은, 이러한 유전자들이 갈락탄-I 유닛을 갈락탄-III으로 전환시키는 역할을 하는 유전적 결정요인과는 관련이 없다는 것이다. 따라서, O1 혈청형 균주는 혈청형 결정 표면에 위치한 갈락탄-II 반복 단위를 발현하는 것 외에, 지질 A-코어 및 갈락탄-II 반복을 연결하는 갈락탄-I과 갈락탄-III 반복 단위를 발현할 수 있다.

[0006] 최근 등장한 클렙시엘라 슈모니에의 다중-약물 내성 (MDR) 균주는 클렙시엘라 슈모니에 감염의 상당한 부분을 차지하고 있다. MDR 균주가 임상적으로 관련된 항생제 대부분의 부류에 내성을 가지도록 진화함에 따라, MDR 균주에 대한 치료 옵션은 점점 매우 제한되고 있다. 따라서, 대안적인 치료법, 즉 단클론 항체 (mAb)를 이용한 수동 면역이 미래에 큰 가능성을 가지고 있다.

[0007] 클렙시엘라 슈모니에의 새로운 표적에 대한 수요가 있다. 특히, 이러한 표적은 면역관련된 것으로 확인될 필요가 있고, 치료 및 진단법을 개발하는데 사용할 수 있다.

발명의 내용

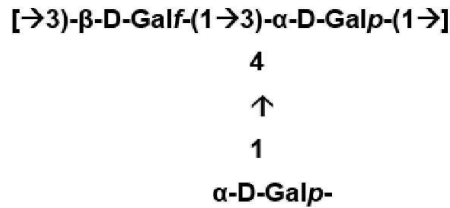
[0008] 본 발명의 목적은 클렙시엘라 슈모니에, 특히 MDR 균주에 대한 항체로서, 병원균에 대한 표적성이 향상된, 클렙시엘라 슈모니에 감염의 예방 또는 치료에 사용되는 항체를 제공하는 것이다. 또한 본 발명의 목적은 신속하고 신뢰성 있는 방식으로, MDR 균주와 같은 클렙시엘라 슈모니에 세균을 진단할 수 있는 수단 및 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 상기 목적은 본 발명의 주제에 의해 해결된다.

[0010] 본 발명에 따라, 클렙시엘라 슈모니에의 리포폴리사카라이드(LPS) O-항원 구조의 갈락탄-III (gal-III) 에피토

프를 특이적으로 인식하며, 상기 에피토프는 갈락탄-III 반복 단위에 포함되고, 갈락탄-III 반복 단위는 하기 화학식 I의 분지된 갈락토오스 동중중합체인 것인, 단리된 항체가 제공된다:

[0011] [화학식 1]

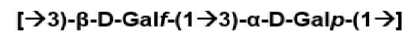


[0012] .

[0013] 구체적으로, 상기 갈락탄-III 에피토프는 갈락탄-III 반복 단위를 적어도 2개, 또는 적어도 3, 4, 또는 5개 포함하는 0-항원 구조에 포함된다.

[0014] 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 갈락탄-I 에피토프에 비하여 상대적으로 갈락탄-III 에피토프에 우선적으로 결합하거나, 또는 갈락탄-I 에피토프와 교차 반응하지 않는 항체로, 상기 갈락탄-I (gal-I) 에피토프는 클렙시엘라 슈모니애의 LPS O2a-항원 구조의 갈락탄-I 반복 단위에 포함되고, 상기 갈락탄-I 반복 단위는 하기 화학식 II의 선형 갈락토오스 동중중합체이다:

[0015] [화학식 2]



[0016] .

[0017] 예를 들어, 본 발명의 항체는 갈락탄-III 항원을 포함하는 0-항원 구조를 특이적으로 인식하거나 결합하는, 갈락탄-III 특이적 항체이다. 예시적인 항체로는 도 1 및 도 2에 나열된 것, 또는 그 항체의 변이체가 있다. 변이체를 제공하기 위하여, 상기 항체를 여기서 모 항체로 지칭하며, CDR 또는 프레임워크 서열을 여기서 모 CDR 또는 모 프레임워크 서열로 지칭한다.

[0018] 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 예를 들어 다른 기원의 제조함 CDR 및 프레임워크 서열을 포함하며, CDR 및 프레임워크 서열 중 적어도 하나는 인간, 인간화된, 키메라, 쥐 (murine) 또는 친화성 성숙된 서열을 포함하고, 바람직하게 상기 프레임워크 서열은 임의의 면역글로블린 아형의 것이고, 특히 IgG 항체의 것이다.

[0019] 구체적으로, 본 발명의 항체는 gal-III 및 gal-I 에피토프에 결합에 대해 교차-특이성을 가지는데, 클렙시엘라 슈모니애의 O2 항원의 gal-I 항원 구조에 비하여 gal-III 항원 구조에 우선적으로 결합하며, 예를 들어 gal-I 항원에 비하여 gal-III에 높은 친화성으로 결합한다. 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 gal-I 항원 대비 gal-III 항원에 결합하는 친화성이 적어도 2배 크며, 구체적으로 적어도 2배 차이, 또는 적어도 3배 차이, 적어도 4배, 적어도 5배, 또는 심지어 적어도 10배 차이를, 예를 들어 친화성 및/또는 강해진 친화성의 차이를 보인다. 예를 들어 gal-I 항원 대비 gal-III 항원에 우선적으로 결합함에 따라 나타나는 Kd 값 차이는 면역분석, 바람직하게는 면역블롯팅, ELISA 또는 다른 면역학적 방법들에 의해 확인되는 것과 같이, 적어도 0.5 또는 1 로그, 또는 심지어 적어도 2 로그, 또는 적어도 3 로그 차이를 갖는다.

[0020] 본 발명의 항체는 구체적으로 다른 임의의 클렙시엘라 슈모니애 항원에 교차-반응하지 않고/않거나, 항체가 다른 임의의 클렙시엘라 슈모니애 항원에 낮은 친화성으로 결합하는 것을 추가적인 특징으로 하는데, 예를 들어 다른 클렙시엘라 슈모니애 항원 (gal-III 또는 gal-I 항원 제외) 대비 gal-III 항원에 우선적으로 결합함에 따라 나타나는 Kd 값 차이는 적어도 2 로그, 바람직하게는 적어도 3 로그 이다.

[0021] 구체적으로, 상기 기능 활성 변이체는 모 CDR 서열 중에 적어도 하나의 점 돌연변이를 포함하고, 상기 모 CDR 서열과 적어도 60%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 상기 서열로 이루어진다.

[0022] 구체적인 변이체는 예를 들어 모 항체의 인간화된 변이체로, 여기서 모 CDR 서열은 인간 또는 인간화된 프레임워크 서열에 포함되며, 선택적으로는 모 항체 또는 인간화된 항체의 안정성, 특이성, 친화성을 향상시키기 위하여 각 모 CDR 서열의 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산 잔기가 점 돌연변이의 도입에 따라 추가적으로 변이될 수 있다.

[0023] 구체적으로, 각 변이체의 중쇄 가변 영역 (VH) 또는 중쇄 (HC) 서열은 다른 변이체의 VH 및 HC 서열로 각각 치

환될 수 있는데, 특히 다른 변이체는 동일한 모 항체의 다른 임의의 변이체이다.

- [0024] 구체적으로, 경쇄 가변 영역 (VL) 또는 경쇄 (LC) 서열은 다른 변이체의 VL 및 LC 서열로 각각 치환될 수 있는데, 특히 다른 변이체는 동일한 모 항체의 다른 임의의 변이체이다.
- [0025] 구체적으로, 상기 갈락탄-III 에피토프는 다중-약물 내성 (MDR) 클렙시엘라 슈모니에, 더욱 구체적으로 MDR 클론 ST258에 의하여 발현된다. 구체적으로, 상기 갈락탄-III 에피토프는 다중-약물 내성 (MDR) 클렙시엘라 슈모니에의 것이다.
- [0026] 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 갈락탄-III 에피토프에 10^{-7} M 미만, 바람직하게는 10^{-8} M 미만, 더욱 바람직하게는 10^{-9} M 미만의 Kd 값으로 결합하는 친화성을 가진다.
- [0027] 여기서 친화성-성숙 변이체로 지칭되는, 친화성 성숙에 의하여 제조된 모 항체의 변이체는 모 항체 대비 Kd 값 차이가 적어도 1 로그, 또는 2 로그, 또는 3 로그인, 향상된 결합 친화성을 가질 수 있다. 친화성 성숙된 변이체는 일반적으로 gal-III 항원에 10^{-8} M 미만, 또는 10^{-9} M 미만의 Kd 값으로 결합하는 친화성을 가진다. 모 항체가 10^{-8} M 미만 또는 10^{-9} M 미만의 Kd 값을 가지고 있고 상기 모 항체가 친화성 성숙을 진행하고 있는 경우, 친화성 성숙된 변이체는 각각 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만의 Kd 값으로, 보다 높은 친화성을 가질 수 있다.
- [0028] 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 중화시키는 항체이다. 구체적으로 상기 항체는 인비트로 또는 인비보 방법으로 확인되는 것과 같이, 갈락탄-III 에피토프를 발현하는 클렙시엘라 슈모니에 균주의 내독소 (예: LPS)를 중화시킨다. 구체적으로, 상기 항체는 인비트로에서 특정 LPS 분자의 내독성 효과를 중화시킨다.
- [0029] 구체적으로, 상기 항체는 갈락탄-III 에피토프를 발현하는 클렙시엘라 슈모니에 균주의 내독소를 중화시키며, 상기 중화능은 적어도 레퍼런스 항체 (예: 레퍼런스 항체 2D8-A10)의 중화능이고, 카밧의 명명법에 따라
- [0030] a) 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및
- [0031] b) 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및
- [0032] c) 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3; 및
- [0033] d) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및
- [0034] e) 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및
- [0035] f) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6
- [0036] 을 포함하는, 항체이다. 이러한 CDR 서열은 카밧의 넘버링 시스템에 따라 표기될 수 있다.
- [0037] 하기에 달리 나타내지 않는 한, 카밧에 따라 넘버링된, 즉 카밧 명명법 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. (1991))에 따라 결정된 것과 같은 CDR 서열, 및 특히 표 1에 나열된 것과 같은 CDR 서열들을 참조한다. 본 발명 및 특허청구범위는 동일한 항체 및 CDR 또한 포함하지만, 넘버링 및 표기된 CDR 영역과 상이한 것 또한 포함하는 것은 충분히 이해될 것이며, 이때 CDR 영역들은 IMGT 시스템(The international ImMunoGeneTics, Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212)에 따라 정의된다.
- [0038] 구체적으로, 본 발명의 항체에 의하여 표적되는 상기 클렙시엘라 슈모니에 균주는 추가적인 글리코실트랜스퍼라아제 (*gtr*) 유전자를 포함하는 *rfb_{gal-I}* 좌위를 특징으로 한다.
- [0039] 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 MDR 클렙시엘라 슈모니에 클론 ST258, 특히, 갈락탄-III 에피토프를 발현하는 균주를 인식한다.
- [0040] 구체적인 실시태양은 전장 단백론 항체, 항원 결합 부위를 포함하는 적어도 하나의 항체 도메인을 포함하는 그의 항체 단편, 또는 항원 결합 부위를 포함하는 적어도 하나의 항체 도메인을 포함하는 융합 단백질인 항체에 대한 것이며, 여기서 구체적으로 상기 항체는 무작위의 또는 인공적인 아미노산 서열을 포함하는 비-천연 유래 항체이다.
- [0041] 구체적으로, 상기 항체는 쥐, 라마, 토끼, 염소, 소, 키메라, 인간화된 또는 인간 항체, 중쇄 항체, Fab, Fd, scFv 및 VH, VHH 또는 VL와 같은 단일-도메인 항체, 바람직하게는 인간 IgG 항체 또는 쥐 IgG 항체로 이루어지

는 군에서 선택되는 항체이다.

[0042] 구체적으로, 상기 항체는 단클론 항체이다.

[0043] 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 적어도 하나의 항체 중쇄 가변 영역 (VH) 또는 도메인을 포함하며, 카바트의 넘버링 시스템에 따라 표기된 표 1에 나열된 것과 같은 CDR1 내지 CDR3 서열 중 어느 것, 또는 그의 기능 활성 CDR 변이체를 특징으로 한다.

[0044] 구체적인 태양에 따르면, 본 발명은 도 2의 VH 및 VL 아미노산 서열 또는 표 1의 각 CDR 서열에 의해 형성되는 특정 항원 결합 부위를 특징으로 하는 모 항체로서, 여기서 제공되는 도면에 도시된 것과 같은 예시적인 (모) 항체와, 이러한 모 항체의 추가적인 항체 변이체, 특히 필수적으로 동일한 에피토프에 결합하는 변이체를 포함하는 변이체를 제공한다. 이러한 항체는 예를 들어 모 항체의 각 CDR 또는 항체 서열을 변형하여 얻은 기능 활성 변이체일 수 있다. 여기서 기술되는 임의의 항체 서열이 변이, 예를 들어 점 돌연변이의 대상이 되는 "모" 서열로 간주됨은 충분히 이해된다.

[0045] 예시로 기술되는 항체들은 쥐 기원 또는 그의 인간화된 형태이다. 인간화와 선택적으로는 친화성 성숙에 의해 얻어진 변이체는 잘 알려진 기술을 이용하여 조작될 수 있다. 상기 변이체 항체는 표적 항원에 결합하므로, 기능적으로 활성화된 것으로 간주된다. 변이체 VH 또는 VL 도메인, 예를 들어 FR 또는 CDR 서열이 각각 변형된 도메인이 사용되는 것 또한 가능한데, 이들은 기능적으로 활성화되어, 예를 들어 동일한 에피토프에 결합하거나 동일한 항원 결합 부위를 포함하거나 모 항체와 같은 결합 특성을 갖는다. 또한 여기서 기술된 상기 항체의 일부 FR 또는 CDR 서열이 다른 항체의 서열, 예를 들어 표 1에 나열된 항체의 서열 교환되는 것도 가능하다.

[0046] 구체적으로, 본 발명의 항체는 도 1 (표 1)에 도시된 항체 중쇄 가변 영역의 임의의 CDR 서열 또는 그의 기능 활성 CDR 변이체 및/또는 도 2에 도시된 임의의 VH 서열로부터 선택되는 VH 아미노산 서열 또는 그의 기능 활성 변이체, 예를 들어 CDR1, 2, 및 3을 포함하는 항체 중쇄 (HC) 또는 VH 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 임의의 CDR1 서열은 서열번호 1, 4, 7, 또는 10; 및/또는 임의의 CDR2 서열은 서열번호 2, 5, 8, 또는 11; 및/또는 임의의 CDR3 서열은 서열번호 3, 6, 9, 또는 12이거나; 또는 서열번호 19, 21, 23, 또는 25의 임의의 VH를 포함한다.

[0047] 구체적으로, 상기 항체는

[0048] A) 하기의 그룹 구성원 i) 내지 iv)로 이루어지는 그룹에서 선택되거나:

[0049] i) a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

[0050] b) 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

[0051] c) 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3

[0052] 을 포함하는 항체;

[0053] ii) a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

[0054] b) 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

[0055] c) 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3

[0056] 을 포함하는 항체;

[0057] iii) a) 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

[0058] b) 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

[0059] c) 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3

[0060] 을 포함하는 항체;

[0061] iv) a) 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

[0062] b) 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

[0063] c) 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3

[0064] 을 포함하는 항체; 또는

- [0065] B) A)의 그룹 구성원들 중 임의의 것인 모 항체의 기능 활성 변이체로, 모 항체의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 중 어느 기능 활성 CDR 변이체를 적어도 하나 포함한다.
- [0066] 구체적으로, 상기 기능 활성 변이체는 모 CDR 서열에 적어도 하나의 점 돌연변이를 포함하는 기능 활성 CDR 변이체이며, 상기 모 CDR 서열과 적어도 60%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 상기 서열로 이루어진다.
- [0067] 구체적으로, 상기 항체는 도 2에 도시된 임의의 VH 서열로부터 선택되는 VH 아미노산을 포함한다.
- [0068] 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 카바트의 넘버링 시스템에 따라 표기된 표 1에 나열된 CDR4 내지 CDR6 서열 중 어느 것, 또는 그의 기능 활성 CDR 변이체를 포함하는 항체 경쇄 가변 영역 또는 도메인 (VL)을 추가로 포함한다.
- [0069] 구체적으로, 본 발명의 항체는 도 1 (표 1)에 도시된 항체 경쇄 가변 영역의 임의의 CDR 서열 또는 그의 기능 활성 CDR 변이체 및/또는 도 2에 도시된 임의의 VL 서열로부터 선택되는 VL 아미노산 서열 또는 그의 기능 활성 변이체, 예를 들어 CDR4, 5, 및 6을 포함하는 항체 경쇄 (LC) 또는 VL 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 임의의 CDR4 서열은 서열번호 13, 16, 또는 19; 및/또는 임의의 CDR5 서열은 서열번호 14, 17, 또는 20; 및/또는 임의의 CDR6 서열은 서열번호 3, 6, 9, 또는 12이거나; 또는 서열번호 15 또는 18의 임의의 VH를 포함하거나 또는 서열번호 20, 22, 24, 또는 26의 임의의 VL을 포함한다.
- [0070] 구체적으로, 상기 항체는
- [0071] A) 하기의 그룹 구성원 i) 내지 iv)로 이루어지는 그룹 중에서 선택되거나:
- [0072] i) a) 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및
- [0073] b) 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및
- [0074] c) 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6
- [0075] 을 포함하는 항체;
- [0076] ii) a) 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및
- [0077] b) 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및
- [0078] c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6
- [0079] 을 포함하는 항체;
- [0080] iii) a) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및
- [0081] b) 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및
- [0082] c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6
- [0083] 을 포함하는 항체;
- [0084] iv) a) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및
- [0085] b) 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및
- [0086] c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6
- [0087] 을 포함하는 항체; 또는
- [0088] B) A)의 그룹 구성원들 중 임의의 것인 모 항체의 기능 활성 변이체로, 모 항체의 CDR4, CDR5 또는 CDR6 중 어느 기능 활성 CDR 변이체를 적어도 하나 포함한다.
- [0089] 구체적으로, 상기 기능 활성 변이체는 모 CDR 서열 중에 적어도 하나의 점 돌연변이를 포함하고, 상기 모 CDR 서열과 적어도 60%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 상기 서열로 이루어진다.
- [0090] 구체적으로, 상기 항체는,

- [0091] a) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4 또는 상기 CDR4의 기능 활성 CDR 변이체; 및
- [0092] b) 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5 또는 상기 CDR5의 기능 활성 CDR 변이체; 및
- [0093] c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6 또는 상기 CDR6의 기능 활성 CDR 변이체;
- [0094] 바람직하게는 여기서 기술된 임의의 VH 서열과의 조합을 특징으로 하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0095] 구체적으로, 상기 항체는 도 2에 도시된 임의의 VL 서열로부터 선택되는 VL 아미노산 서열을 포함한다.
- [0096] 구체적으로, 상기 항체는 VH 및 VL 아미노산 서열을 모두 포함하고, 선택적으로는 전장 항체 또는 항체 단편, 특히 전장 항체 또는 Fab 단편의 프레임워크 서열을 추가적으로 포함한다.
- [0097] 구체적으로, 상기 항체는,
- [0098] a) 표 1에 나열된 임의의 항체의 CDR1 내지 CDR6 서열; 또는
- [0099] b) 도 2에 도시된 임의의 항체의 VH 서열 및 VL 서열
- [0100] 을 포함하거나; 또는
- [0101] c) 상기 a) 내지 c) 서열로 특징되는 모 항체의 기능 활성 변이체로서,
- [0102] 바람직하게는,
- [0103] i. 상기 기능 활성 변이체가 상기 모 항체의 CDR1 내지 CDR6 중 어느 기능 활성 CDR 변이체를 적어도 하나 포함 하고/하거나;
- [0104] ii. 상기 기능 활성 변이체가 상기 VH 서열 및 VL 서열 중 어느 프레임워크 영역 중에 적어도 하나의 점 돌연변 이를 포함하고,
- [0105] 추가로,
- [0106] iii. 상기 기능 활성 변이체가 상기 모 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 특이성을 갖고/갖거나;
- [0107] iv. 상기 기능 활성 변이체가 상기 모 항체의 인간, 인간화된, 키메라 또는 쥐 및/또는 친화성 성숙된 변이체이 다.
- [0108] 구체적으로, 상기 항체는 하기의 a) 내지 f)로 이루어지는 군에서 선택된다:
- [0109] a) a. 서열번호 1의 CDR1 서열; 및
- [0110] b. 서열번호 2의 CDR2 서열; 및
- [0111] c. 서열번호 3의 CDR3 서열; 및
- [0112] d. 서열번호 13의 CDR4 서열; 및
- [0113] e. 서열번호 14의 CDR5 서열; 및
- [0114] f. 서열번호 15의 CDR6 서열
- [0115] 을 포함하는 항체;
- [0116] b) a. 서열번호 4의 CDR1 서열; 및
- [0117] b. 서열번호 5의 CDR2 서열; 및
- [0118] c. 서열번호 6의 CDR3 서열; 및
- [0119] d. 서열번호 16의 CDR4 서열; 및
- [0120] e. 서열번호 17의 CDR5 서열; 및
- [0121] f. 서열번호 18의 CDR6 서열
- [0122] 을 포함하는 항체;
- [0123] c) a. 서열번호 7의 CDR1 서열; 및

- [0124] b. 서열번호 8의 CDR2 서열; 및
- [0125] c. 서열번호 9의 CDR3 서열; 및
- [0126] d. 서열번호 19의 CDR4 서열; 및
- [0127] e. 서열번호 20의 CDR5 서열; 및
- [0128] f. 서열번호 18의 CDR6 서열
- [0129] 을 포함하는 항체;
- [0130] d) a. 서열번호 10의 CDR1 서열; 및
- [0131] b. 서열번호 11의 CDR2 서열; 및
- [0132] c. 서열번호 12의 CDR3 서열; 및
- [0133] d. 서열번호 19의 CDR4 서열; 및
- [0134] e. 서열번호 17의 CDR5 서열; 및
- [0135] f. 서열번호 18의 CDR6 서열
- [0136] 을 포함하는 항체;
- [0137] e) a. 서열번호 4의 CDR1 서열; 및
- [0138] b. 서열번호 5의 CDR2 서열; 및
- [0139] c. 서열번호 6의 CDR3 서열; 및
- [0140] d. 서열번호 19의 CDR4 서열; 및
- [0141] e. 서열번호 20의 CDR5 서열; 및
- [0142] f. 서열번호 18의 CDR6 서열
- [0143] 을 포함하는 항체; 및
- [0144] f) a. 서열번호 10의 CDR1 서열; 및
- [0145] b. 서열번호 11의 CDR2 서열; 및
- [0146] c. 서열번호 12의 CDR3 서열; 및
- [0147] d. 서열번호 19의 CDR4 서열; 및
- [0148] e. 서열번호 20의 CDR5 서열; 및
- [0149] f. 서열번호 18의 CDR6 서열
- [0150] 을 포함하는 항체; 또는
- [0151] 10^{-8} M 미만, 바람직하게는 10^{-9} M 미만, 바람직하게는 10^{-10} M 미만, 바람직하게는 10^{-11} M 미만의 Kd 값, 예를 들어 피코몰 범위의 친화성으로 gal-III 항원에 결합하는 친화성을 가지는, 상기 임의의 것의 기능 활성 CDR 변이체이다.
- [0152] 구체적으로, 상기 항체는 표 1에 나열된 CDR 서열 중 어느 것의 기능 활성 CDR 변이체를 포함하며, 상기 기능 활성 CDR 변이체는
- [0153] a) 모 CDR 서열 중에 1, 2 또는 3개의 점 돌연변이; 및/또는
- [0154] b) 상기 모 CDR 서열의 4개의 C-말단 또는 4개의 N-말단, 또는 4개의 중심 아미노산 위치 중 임의의 위치에 1개 또는 2개의 점 돌연변이; 및/또는
- [0155] c) 상기 모 CDR 서열과 적어도 60%의 서열 동일성;

- [0156] 중 적어도 하나를 포함하고;
- [0157] 바람직하게는 상기 기능적 활성 CDR 변이체가 4 또는 5개 미만의 아미노산으로 이루어지는 임의의 CDR 서열 중에 1 또는 2개의 점 돌연변이를 포함한다.
- [0158] 구체적으로, 상기 기능 활성 변이체 항체는 본 발명의 기능 활성 CDR 변이체를 적어도 하나 포함한다. 구체적으로, 1 이상의 기능 활성 CDR 변이체를 포함하는 상기 기능 활성 변이체 항체는 모 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 특이성을 가진다.
- [0159] 구체적으로, 상기 기능 활성 변이체는 CDR 변이체로, 예를 들어 CDR, 더욱 구체적으로 CDR 루프 서열을 60%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%의 서열 동일성으로 포함한다.
- [0160] 구체적인 태양에 따르면, 적어도 하나의 점 돌연변이는 1 이상의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입 중 어느 것이든 상관없다.
- [0161] 구체적으로, 상기 기능 활성 변이체는 모 항체와 아미노산 서열, 바람직하게는 CDR 중 적어도 하나의 점 돌연변이에서 다르고, 상기 각 CDR 아미노산 서열에서의 점 돌연변이의 수는 0, 1, 2 또는 3이다.
- [0162] 구체적으로, 상기 항체는 상기와 같은 항체로부터 유래하며, 각각의 CDR 서열, 또는 하나의 CDR 루프 내에, 예를 들어 5 내지 18 아미노산 길이의 CDR 내에, 예를 들어 5 내지 15 아미노산 또는 5 내지 10 아미노산의 CDR 영역 내에, 예를 들어 1, 2 또는 3개의 점 돌연변이를 갖는 기능 활성 CDR 변이체를 포함하는 CDR 변이체를 사용한다. 또는, 하나의 CDR 루프 내에, 예를 들어 5 아미노산 미만의 CDR 길이 내에 1 내지 2개의 점 돌연변이가 존재하여, 기능 활성 CDR 변이체를 포함하는 항체를 제공할 수 있다. 특정한 CDR 서열들은 짧을 수도 있고, 예를 들어 CDR2 또는 CDR5 서열일 수도 있다. 구체적인 태양에 따르면, 상기 기능 활성 CDR 변이체는 4 또는 5 아미노산 미만으로 이루어지는 임의의 CDR 서열 중에 1 또는 2개의 점 돌연변이를 포함한다.
- [0163] 구체적인 태양에 따르면, 본 발명의 항체는 CDR 및 프레임워크 서열을 포함하며, 여기서 상기 CDR 및 프레임워크 서열 중 적어도 하나는 인간, 인간화된, 키메라, 쥐 또는 친화성 성숙된 서열을 포함하며, 바람직하게는 상기 프레임워크 서열은 IgG 항체, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 아형, 또는 IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체의 서열이다.
- [0164] 예를 들어 모 항체의 제조가능성 또는 내인성을 개선시키기 위한, 예를 들어 낮은 면역원성 잠재성을 갖는 개선된 (변이된) 항체, 예를 들어 모 항체에 비해 CDR 서열 및/또는 프레임워크 서열 중 임의의 것에 변이를 갖는 인간화된 항체를 제공하기 위한 프레임워크 변이된 항체가 구체적인 항체로 제공된다.
- [0165] 예를 들어 항체의 친화성을 개선시키고/시키거나 모 항체에 의해 표적화된 에피토프와 동일한 에피토프 또는 그 부근의 에피토프를 표적화하기 위한 (에피토프 이동) CDR 변이된 항체가 추가적인 구체적인 항체로 제공된다.
- [0166] 따라서, 표 1 또는 도 2에 나열된 것과 같은 항체들 어느 것이든, 개선된 버전을 조작하기 위한 모 항체로서 사용할 수 있다
- [0167] 구체적인 태양에 따르면, 본 발명의 항체는 도 1 (표 1)에 나열된 것과 같은 CDR 조합을 포함하나, 단, 항체는 여전히 기능적으로 활성화된 것이다.
- [0168] 구체적으로, 본 발명의 항체는 표 1에 나열된 것과 같은 항체들 중 임의의 것의 CDR1-6를 포함한다. 그러나, 또 다른 실시태양에 따르면 상기 항체는 상이한 CDR 조합들을 포함할 수도 있는데, 예를 들어 표 1에 나열된 것과 같은 항체는, 하나의 항체의 적어도 하나의 CDR 서열, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR 서열 및 표 1에 나열된 것과 같은 항체들 중 임의의 것 중 상이한 항체의 적어도 하나의 추가적인 CDR 서열을 포함한다. 구체적인 예에 따르면, 상기 항체는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR 서열을 포함하며, 여기서 상기 CDR 서열은 1개 초과 항체, 예를 들어 2, 3, 4, 5 또는 6개의 상이한 항체들의 CDR 조합이다. 예를 들어, 상기 CDR 서열들은 함께, 바람직하게는 표 1에 나열된 것과 같은 항체들 중 임의의 것의 CDR1 내지 3 중 1, 2 또는 3개 전부, 및 표 1에 나열된 동일하거나 또는 임의의 다른 항체의 CDR4 내지 6 중 1, 2 또는 3개 전부를 포함할 수 있다.
- [0169] 예를 들어, CDR 서열은 적어도 표 1에 나열된 것과 같은 항체의 CDR1 내지 3, 예를 들어 8E3-E5, 9H9-H7, 5A4-A7, 또는 2D8-A10로 표기된 항체, 및/또는 적어도 표 1에 나열된 것과 같은 임의의 (다른) 항체의 CDR4 내지 6, 예를 들어 5A4-A7로 표기된 항체의 것, 또는 적어도 그 CDR4 및 CDR6 서열과 그 CDR5의 기능 활성 CDR 변이체의 조합을 포함하도록 조합될 수 있다. 구체적인 태양에 따르면, 본 발명의 항체는 표 1에 나열된 것과 같은 항체, 예를 들어 8E3-E5, 9H9-H7, 5A4-A7, 또는 2D8-A10로 표기된 항체의 CDR1 내지 6을 포함한다. 그러나 다른 구체

적인 태양에 따르면, 상기 항체는 상이한 CDR 조합을 포함할 수 있는데, 예를 들어 표 1에 나열된 것과 같은 항체, 예를 들어 8E3-E5, 9H9-H7, 5A4-A7, 또는 2D8-A10로 표기된 항체는 어느 것이든 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR 서열과 같이 다른 항체의 적어도 하나의 CDR 서열, 예를 들어 표 1에 나열된 것과 같은 항체 중 임의의 다른 항체의 CDR 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR 서열을 포함하는데, 여기서 상기 CDR 서열은 1개 초과와 항체, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 다른 항체의 CDR 조합이다. 다른 항체의 CDR 서열을 포함하는 예시적인 항체가 도 2에 기재되어 있다.

[0170] 구체적으로,

[0171] i. 항체 G3-77는 항체 9H9-H7의 VH-CDR 서열 (CDR1, 2, 및 3); 및 항체 5A4-A7의 VL-CDR 서열 (CDR4, 5, 및 6)을 포함한다;

[0172] ii. 항체 G3-78은 항체 9H9-H7의 VH-CDR 서열 (CDR1, 2, 및 3); 및 항체 5A4-A7의 VL-CDR 서열 (CDR4, 5, 및 6)을 포함한다;

[0173] iii. 항체 G3-79는 항체 2D8-A10의 VH-CDR 서열 (CDR1, 2, 및 3); 및 항체 5A4-A7의 VL-CDR 서열 (CDR4, 5, 및 6)을 포함한다;

[0174] 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 항원 결합 모이어티로서 VH 도메인만을 포함하므로, 각 VL 도메인 없이 CDR1 내지 3을 포함한다.

[0175] CDR1, 2, 3으로 넘버링되는 CDR들은 VH 도메인의 결합 영역을 나타내고, CDR4, 5, 6은 VL 도메인의 결합 영역을 나타낸다는 것은 여기서 구체적으로 이해될 수 있다.

[0176] 구체적인 태양에 따르면, 본 발명의 항체는 도 2에 도시된 것과 같은 VH 및 VL 아미노산 서열의 조합 중 임의의 것, 또는 이러한 VH 및 VL 아미노산 서열의 조합으로 형성된 항원 결합 부위를 포함한다. 또는, 2개의 상이한 항체의 면역글로불린 도메인의 조합이 사용될 수 있는데, 단, 상기 항체는 여전히 기능적으로 활성화된 것이다. 예를 들어 하나의 항체의 VH 서열은 다른 항체의 VL 서열과 조합될 수 있다. 다른 구체적인 태양에 따르면, 도 2에서 제공되는 것과 같은 프레임워크 영역 중 임의의 것은 여기서 기술되는 임의의 CDR 서열 및/또는 VH/VL 조합에 대해 프레임워크로 사용될 수 있다.

[0177] 구체적인 태양에 따르면, 본 발명의 항체는 도 2에 도시된 것과 같은 VH 및 VL 아미노산 서열의 조합 중 임의의 것, 또는 이러한 VH 및 VL 아미노산 서열의 조합으로 형성된 항원 결합 부위를 포함한다.

[0178] 본 발명의 항체는 적합한 신호 또는 리더 서열과 함께 또는 상기 서열 없이, 상기와 같은 도 2의 아미노산 서열을 선택적으로 포함하는 것으로 이해된다.

[0179] 구체적인 태양에 따르면, 도 2의 각 서열을 말단 연장시키거나 또는 불변 영역 중에서 결실시킬 수 있으며, 예를 들어 C-말단 아미노산 중 하나 이상을 결실시킬 수도 있다.

[0180] 도 2는 8E3-E5, 9H9-H7, 5A4-A7, 2D8-A10, G3-43, G3-46, G3-77, G3-78, 및 G3-97로 지칭되는 모 항체의 상이한 VH 서열 및 상이한 VL 서열을 나타내며, 어느 VH/VL 조합이든 지지하므로, 예를 들어 도 9에 도시된 것과 같은 각 모 항체에 대한 일련의 상이한 VH/VL 조합을 지지할 수 있다. 따라서, 모 항체의 특정한 변이체는 하나의 모 항체의 VH 서열 및 다른 모 항체의 VL 서열, 또는 그 VH 및 VL 서열의 기능 활성 변이체, 예를 들어 동일한 모 항체로부터 유래된 기능 활성 변이체들의 조합을 포함할 수 있다.

[0181] 특히, 도 2는 8E3-E5, 9H9-H7, 5A4-A7, 2D8-A10, G3-43, G3-46, G3-77, G3-78, 및 G3-97로 지칭되는 모 항체의 상이한 VH 서열 및 상이한 VL 서열을 나타낸다. 예를 들어, 하나의 모 항체의 VH 서열 및 다른 모 항체의 VL 서열을 조합한 81개의 상이한 VH/VL 조합이 가능하며, VH 또는 VL 서열 중 어느 것이 예를 들어 CDR 변이 및/또는 프레임워크 변이를 포함하는 변이체와 같이 모 서열의 기능 활성 변이체인 경우 더 많은 변이체가 가능하다.

[0182] 도 2의 VH 및 VL 서열에 포함된 상기 CDR 서열은 도 1에 나열된 것과 같은 각 CDR 서열과 동일하다.

[0183] 본 발명은, 예를 들어 표 1에 나열된 것과 같은 항체, 또는 도 2에 도시된 것과 같은 VH 또는 VL 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함하는 항체, 또는 그 VH 및 VL 아미노산 서열의 조합에 의해 형성되는 항원 결합 부위를 포함하는 항체와 같은 임의의 본 발명의 항체를 모 항체로 하는 모 항체의 기능 활성 항체 변이체를 제조하는 방법을 추가로 제공한다. 상기 방법은 변이체 항체를 얻기 위하여 프레임워크 영역 (FR) 또는 불변 도메인 중 임의의 것 또는 상보성 결정 영역 (CDR1 내지 CDR6)에 적어도 하나의 점 돌연변이를 조작하는 단계, 및 구체적으로 갈락탄-III 에피토프에 결합하는 친화성이 10^{-6} M 미만, 바람직하게는 10^{-7} M 미만, 또는 10^{-8} M 미만, 또는

10^{-9} M 미만, 심지어 10^{-10} M 미만, 또는 10^{-11} M 미만의 Kd 값, 예를 들어 피코몰 범위의 친화성인지에 따라 변이체 항체의 기능 활성을 결정하는 단계를 포함한다. 기능 활성 결정에 따라, 상기 기능 활성 변이체는 추가적인 용도를 위해 선택되며, 선택적으로는 재조합 제조 방법에 의한 제조를 위해 선택된다.

- [0184] 구체적인 태양에 따르면, 상기 변이체 항체는 모 항체와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0185] 다른 구체적인 태양에 따르면, 상기 변이체 항체는 모 항체와 동일한 항원 결합 부위를 갖는다.
- [0186] 기능 활성 변이체 항체는 VH 또는 VL 서열 중 어느 것이든지 달리하거나 공통되는 VH 및 VL 서열을 공유할 수 있으며, 각 FR에서의 변형을 포함할 수 있다. 돌연변이유발에 의해 모 항체로부터 유래된 상기 변이체 항체는 당해 분야에 널리 공지된 방법으로 제조될 수 있다.
- [0187] 예시적인 모 항체는 하기 실시예 섹션 및 도 1 (표 1) 및 도 2에 개시되어 있다. 구체적으로, 상기 항체는 표 1 또는 도 2에 나열된 것과 같은 서열을 특징으로 하는 모 항체의 기능 활성 유도체이다. 하나 이상의 변형된 CDR 서열, 및/또는 FR1, FR2, FR3 또는 FR4 서열과 같은 하나 이상의 변형된 FR 서열, 또는 변형된 불변 도메인 서열을 갖는 변이체가 조작될 수 있다.
- [0188] 예를 들어, 기능 활성 변이체 항체는 돌연변이유발, 구체적으로 친화성 성숙 및/또는 인간화에 의해 얻어질 수 있다. 변이체 항체가 모 항체의 공통적인 CDR 서열 CDR1 내지 6 또는 공통적인 VH 및 VL 서열을 여전히 공유하더라도, 예를 들어 각 FR 또는 CDR 서열이 변형된, 기능적으로 활성화된 변이체 항체 또는 항체 도메인의 제조가 또한 가능하다.
- [0189] 모 항체의 예시적인 변이체 항체는 CDR1 내지 CDR6 중 임의의 것에 적어도 하나의 점 돌연변이, 및/또는 FR 서열 중 임의의 것에 적어도 하나의 점 돌연변이를 포함하며, 바람직하게 상기 항체는 모 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 특이성을 갖는다.
- [0190] 특정한 태양에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 이와 같은 기능 활성 변이체 항체, 바람직하게는 단클론 항체, 더욱 바람직하게는 인간화된 또는 인간 항체를 제공하며, 여기서 경쇄 또는 경쇄 가변 영역 (VL) 중 임의의 것, 또는 각 CDR은 적어도 하나의 FR 또는 CDR 서열의 변형에 의해, 8D5-1G10 또는 4D5-D4로 표기된 항체 또는 표 1 또는 도 2에 나열된 것과 같은 그 외의 항체인 모 항체로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0191] 본 발명은 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 균체 형성의 위험이 있거나 또는 상기 감염을 앓고 있는 개체에, 상기 감염을 제한하거나 또는 상기 감염으로부터 초래되는 질병 병태를 개선시키기에 유효한 양의 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체의 치료에 사용하기 위한, 바람직하게는 1차 및 2차 세균혈증, 패혈, 요로 감염, 간 농양, 복막염, 또는 뇌수막염의 치료 또는 예방을 위한 본 발명의 항체의 용도를 추가로 제공한다.
- [0192] 따라서, 본 발명은 추가적으로, 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 균체 형성의 위험이 있거나 또는 상기 감염을 앓고 있는 개체에, 상기 감염을 제한하거나 또는 상기 감염으로부터 초래되는 질병 병태를 개선시키기에 유효한 양의 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체의 치료 방법에 대한 것으로, 바람직하게는 1차 및 2차 세균혈증, 패혈, 요로 감염, 간 농양, 복막염, 또는 뇌수막염의 치료 또는 예방을 위한 방법에 관한 것이다.
- [0193] 특히 상기 항체는 치명적인 내독소혈증을 중화시킬 수 있다. 이러한 기능 활성은 인비보 모델 (정제된 LPS에 의해 유발됨)에서 적절하게 확인될 수 있다.
- [0194] 특히, 상기 항체는 gal-III 0-형의 클렙시엘라 슈모니에, 특히 MDR 클렙시엘라 슈모니에, 바람직하게는 MDR 클렙시엘라 슈모니에 ST258에 대한 살균 활성을 제공할 수 있다.
- [0195] 구체적인 태양에 따르면, 본 발명의 항체를 사용하는 면역요법은 예를 들어 다양한 동물 모델에서 확인되는 것과 같이, 살아있는 세균 공격을 효과적으로 방어할 수 있다.
- [0196] 상기 항체는 예를 들어 인비트로 혈청 살균 분석 (serum bactericidal assay, SBA)에 의해 확인되는 것과 같이, 보체-매개된 살해에 의해 gal-III 0-형의 클렙시엘라 슈모니에에 대해 특히 효과적이며, 예를 들어 대조군 샘플 (항체가 없거나 또는 관련 없는 대조군 mAb가 첨가된)보다 세균을 적어도 20% 더 살해한다.
- [0197] 상기 항체는 예를 들어 인비트로 옵소닌식작용 분석 (opsonophagocytotic killing assay, OPK)에 의해 확인되는 것과 같이, 항체 매개된 식작용에 의해 gal-III 0-형의 클렙시엘라 슈모니에에 특히 효과적이며, 예를 들어 대조군 샘플 (항체가 없거나 또는 관련 없는 대조군 mAb가 첨가된)보다 투입 세균을 적어도 20% 더 흡수하거나 20% 더 낮은 최종 CFU수를 갖는다.

- [0198] 상기 항체는 예를 들어 인비트로 LAL 분석 또는 Toll-유사 수용체 4 (TLR4) 리포터 분석에 의해 확인되는 것과 같이, 내독소 기능의 중화에 의해 gal-III O-형의 클렙시엘라 슈모니에에 특히 효과적이며, 예를 들어 대조군 샘플 (항체가 없거나 또는 관련없는 대조군 mAb가 첨가된)에 비해 내독소 활성이 적어도 20% 감소된다.
- [0199] 다른 구체적인 태양에 따르면, 상기 항체는 인간 및 비-인간 동물 모두를 포함하는 동물에서 표적 병원균을 중화시키며, 인비보, 바람직하게는 1차 및 2차 세균혈증, 폐렴, 요로 감염, 간 농양, 복막염, 또는 뇌수막염 모델에서의 발병을 억제한다.
- [0200] 중화능을 확인하기 위한 기준 (양성 대조군)으로, 실시예 섹션에 개시된 어느 항체든지 사용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체의 중화능은 여기서 2D8-A10로 지칭된 항체의 CDR1 내지 6 서열을 특징으로 하는 항체, 특히 실시예에 개시된 키메릭 IgG1 항체의 중화능과 동일하거나 그보다 크다.
- [0201] 본 발명은, 본 발명의 항체를 포함하는, 바람직하게는 비경구 또는 점막 제형을 포함하고, 선택적으로는 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약학 제제를 추가로 제공한다.
- [0202] 상기와 같은 약학 조성물은 유일한 활성 물질로서 또는 다른 활성 물질과 함께 상기 항체를 포함하거나, 또는 활성 물질들의 콕테일, 예를 들어 적어도 2개 또는 3개의 상이한 항체들의 조합 또는 콕테일을 포함할 수 있다.
- [0203] 본 발명에 따르면, 본 발명의 항체는 특히 의학, 진단, 또는 분석 용도로 제공된다.
- [0204] 본 발명은 본 발명의 항체의 용도로 진단 용도, 특히 개체에서 클렙시엘라 슈모니에 (특히 ST258) 감염 또는 균체 형성, 또는 1차 및 2차 세균혈증, 폐렴, 요로 감염, 간 농양, 복막염, 또는 뇌수막염과 같은 관련 질병을 진단하기 위한 용도를 추가로 제공한다.
- [0205] 구체적으로, 개체는 인간, 특히 개체는 면역저하 또는 면역억제된 환자, 또는 그의 접촉자이다.
- [0206] 구체적으로, 상기 항체는 본 발명에 따른 용도를 위해 제공되는데, 개체에서 gal-III O-형의 클렙시엘라 슈모니에에 의한 전신 감염 또는 균체 형성은 상기 개체의 생물학적 샘플과 항체의 접촉에 의해 체외에서 확인되며, 항체의 특정한 면역 반응으로 감염 또는 균체 형성을 확인한다.
- [0207] 구체적으로, 생물학적 샘플은 체액 또는 조직 샘플, 바람직하게는 혈액 샘플, 대변 샘플, 피부 샘플, 뇨 샘플, 뇌척수액 샘플, 및 기관내 흡입물, 흉수액, 폐천자물, 코 먼봉 채취물 또는 객담과 같은 기도 시료로 이루어지는 군에서 선택되는 샘플, 또는 상기에서 유래되는 클렙시엘라 슈모니에 단리물이다. 구체적으로, 체액 샘플은 특정 면역 반응을 위해 검사되며, 상기 샘플은 뇨, 혈액, 혈액 단리물 또는 혈액 배양물, 흡입물, 객담, 삼관 개체의 세척 유체, 및 대변으로 이루어지는 군에서 선택된다.
- [0208] 구체적으로, 생물학적 샘플은 생물학적 샘플로부터 유래된 클렙시엘라 슈모니에 균주를 얻기 위하여 처리되며, 상기 균주는 추가적으로 그의 gal-III 유전형 또는 표현형, 및/또는 gal-III 항원 발현 수치를 특징으로 할 수 있다. 세균을 얻기 위한 바람직한 샘플 제조 방법은 세균 농축 및 배양 단계를 이용하는 것이다.
- [0209] 구체적으로, 생물학적 샘플은 샘플에서 직접 gal-III 수치를 확인하기 위하여 처리되며, 이후 생체시료효과 (matrix effect)를 감소시키고 검사의 특이성 및 민감도를 증가시키기 위한 준비 단계인 농축 또는 정제 단계를 선택적으로 거친다. 준비 단계는, 유일한 것은 아니나 예를 들어 통상적인 미생물 실험실에서 수행되는 것과 같이 샘플을 고체 아가에 배양시키는 것 (표현형 분석 포함 - 예: 항균제 감수성 검사)뿐만 아니라 표준 성장 배지에 혈액 배양시키는 것과 같은, 표준 배양 방법에 따라 생물학적 샘플을 배양하는 단계를 포함한다. 세균은 상이한 성장 배지 (표준 배지 및/또는 화학적으로 정제된 배지; 고 영양, 저 영양, 제한 성장 배지 조성물)에서의 CFU 증가를 위하여 서브-배양되어 독성 인자의 발현을 증가시킬 수 있다. 세균 현탁액은 제조된 후 생체시료효과를 감소시키기 위하여 표준 버퍼 용액에서 세척될 수 있다.
- [0210] 구체적으로, 상기 gal-III 항원은 적어도 하나의 면역분석, 바람직하게는 ELISA, CIA, RIA, IRMA, 응집 검사, 면역크로마토그래피, 딥스틱 분석 및 웨스턴-블롯 중 임의의 것, 또는 질량-분석, 핵 자기 공명 (NMR), 또는 gal-III 발현을 나타내는 해당 DNA 또는 RNA, 특히 *gtr* 유전자에 특이적인 핵산 서열을, 바람직하게는 핵산 혼성화 분석 또는 핵산 증폭 분석을 이용하여 확인하는 방법에 의해 확인된다.
- [0211] 구체적으로, 본 발명에 따른 진단 용도는, 상기 세균이 gal-III O-형의 것인지 아닌지를 결정하기 위하여, 임상 샘플로부터 회수한 순수한 클렙시엘라 슈모니에 배양물로부터 인비트로에서 클렙시엘라 슈모니에의 혈청형을 확인하는 것을 지칭한다.

- [0212] 본 발명은, 조성물 또는 부품 키트 중에 상기 항체 및 추가적인 진단 시약을 포함하며,
- [0213] a) 상기 항체; 및
- [0214] b) 상기 추가적인 진단 시약;
- [0215] 그리고 선택적으로
- [0216] c) 상기 항체 및 진단 시약 중 적어도 하나를 고정시키는 고체상
- [0217] 의 성분들을 포함하는, 본 발명의 항체의 진단 제제를 추가로 제공한다.
- [0218] 상기 진단 제제는 선택적으로 본 발명의 항체 및 상기 추가적인 진단 시약을 조성물 또는 부품 키트 중에 포함한다.
- [0219] 상기 진단 키트는 바람직하게는 생물학적 샘플에서 gal-III 발현을 확인하기 위한 모든 필수적인 성분을 포함하며, 선택적으로는 공통의 또는 불특정의 물질 또는 성분, 예를 들어 물, 버퍼, 또는 부형제를 포함하지 않는다. 저장 안정 키트는 바람직하게는 적어도 6개월 동안, 더욱 바람직하게는 적어도 1년 또는 2년 동안 보관될 수 있다. 이는 건조 (예: 동결건조) 성분으로 이루어지고/이루어지거나, 보존제를 포함할 수 있다.
- [0220] 바람직한 진단 키트는 패키지 또는 프리패키지된 단위로 제공될 수 있고, 예를 들어 상기 성분은 하나의 패키지에 포함되며, 통상적인 실험에 이용될 수 있다. 이러한 패키지는 예를 들어 일련의 생물학적 샘플에 대한 검사를 수행하기에 적합한 1 이상의 검사에 필요한 시약을 포함할 수 있다. 상기 키트는 추가로 적절하게 gal-III 항원 제제를 표준 또는 기준 대조군으로서 포함할 수 있다.
- [0221] 상기 진단 조성물은 생물학적 샘플과 함께 반응 혼합물 내에 사용할 수 있도록 준비된 시약이거나, 예를 들어 동결건조; 동결보존 (예: 액화 질소 내), 초저온 보관 (-70°C 및 -80°C), 냉장 보관 (-20°C 및 5°C) 및 통제된 상온 (15°C 내지 27°C); 예를 들어 글리세롤-스톡, 조직 파라핀-블록, (구강) 면봉 및 다른 표준 생물학적 샘플 보관 방법과 같은 표준 샘플 보관 등의 보관-적합한 형태와 같은 시약의 보존된 형태일 수 있고, 시약의 보존된 형태는 사용할 수 있도록 준비된 시약을 얻기 위하여 재구성되거나 준비될 수 있다. 이러한 사용할 수 있도록 준비된 시약은 일반적으로 수용액 형태, 특히 (생리학적) 버퍼 상태 (예: EDTA 버퍼, 포스페이트 버퍼, HBSS, 시트레이트 버퍼 등)이다.
- [0222] 구체적으로, 상기 추가적인 진단 시약은 항체 및/또는 그의 항원에 결합하는 항체의 반응 산물과 특이적으로 반응하는 시약이다. 적절한 진단 시약은 개체에서 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 군체 형성을 진단 또는 모니터링하기 위한 면역분석을 수행하기에 적합하게 사용된다. 적절한 진단 시약은 용매, 버퍼, 염료, 항응고제, 본 발명의 항체에 특이적으로 결합하는 리간드 및/또는 항체-항원 면역 복합체일 수 있다.
- [0223] 구체적으로, 본 발명은, 표지된 항체, 및/또는 항체 또는 각 표적 항원과 항체의 면역 복합체를 특이적으로 인식하는 시약과 같이 표지된 추가적인 진단 시약, 및/또는 항체와 진단 시약 중 적어도 하나를 고정시키는 고체상을 선택적으로 포함하는, 본 발명의 항체의 진단 제제를 제공한다.
- [0224] 상기 항체 또는 진단 시약은 직접적 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 간접적인 표지는 gal-III 항원에 대한 상기 항체 또는 진단 시약과 복합체를 형성하는 표지된 결합제를 포함할 수 있다.
- [0225] 상기 표지는 일반적으로 분석법에서 검출될 수 있는 분자 또는 분자의 일부이다. 예시적인 표지로는 발색단, 형광색소, 또는 방사성 분자가 있다. 일부 실시태양에서, 상기 항체 또는 진단 시약은 검출될 수 있는 반응 산물의 생성 (예: 호스래디시 퍼옥시다아제, 알칼리 포스파타아제와 같은 효소 등) 또는 스스로 검출될 수 있는 특이적 결합 분자 (예: 비오틴, 디곡시제닌, 말토오스, 올리고히스티딘, 2,4-딘트로벤젠, 페닐아르세네이트, ssDNA, dsDNA 등)에 의해 간접적으로 검출될 수 있는 분자뿐만 아니라 스스로 검출될 수 있는 분자 (예: 형광 모이어티, 전기화학적 표지, 금속 킬레이트 등)를 포함할 수 있는, 검출될 수 있는 표지에 결합한다.
- [0226] 바람직한 진단 제제 또는 분석법은, 예를 들어 검사하려는 샘플로부터 얻어진 gal-III 형 세균의 항체에 의한 응집반응을 검사하기 위하여, 예를 들어 라텍스 비즈, 금 입자 등과 같은 고체상에 고정화된 본 발명의 항체를 포함한다.
- [0227] 본 발명은,
- [0228] a) 본 발명에 따른 항체를 제공하는 단계, 및

- [0229] b) 상기 항체가 검사하려는 개체의 생물학적 샘플 중의 갈락탄-III 에피토프와 특이적으로 면역반응 하는지를 검출함으로써, 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 군체 형성을 진단하는 단계를 포함하는,
- [0230] 개체에서 클렙시엘라 슈모니에 균주에 의해 유발되는 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 군체 형성에 대한 진단 방법을 추가로 제공한다.
- [0231] 상기와 같은 진단은 구체적으로, MDR 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 군체 형성의 경우, 특히 gal-III 형의 MDR 클렙시엘라 슈모니에를 다루는 경우를 지칭한다. 선택적으로, 진단 분석법은 상이한 특이성 및/또는 친화성으로 gal-III 및/또는 gal-I에 결합하는 2개의 상이한 항체를 수반할 수 있으며, 이에 따라 gal-III 및 gal-I 항원을 구별할 수 있다.
- [0232] 구체적인 태양에 따르면, 본 발명은 본 발명의 진단법 또는 본 발명의 진단 방법에 의해 클렙시엘라 슈모니에, 특히 MDR 클렙시엘라 슈모니에에 의한 개체의 감염을 확인하여, 상기와 같은 감염에 대한 치료법, 예를 들어 본 발명의 항체에 의한 치료와 같은 면역요법을 사용하는 치료법에 의한 치료의 토대를 제공하기 위한 동반 진단법을 제공한다.
- [0233] 구체적인 태양에 따르면, 본 발명은 예를 들어 살아있는 세균량이 제한된 임상 샘플로부터 유리 LPS를 확인함으로써 클렙시엘라 슈모니에, 특히 MDR 클렙시엘라 슈모니에에 의한 개체의 감염을 진단하기 위한, 민감한 베드사이드 진단법을 제공한다. 상기와 같은 분석의 감도는 구체적으로 LPS 100 ng 미만, 바람직하게는 LPS 10 ng 미만이다.
- [0234] 본 발명은 본 발명의 항체를 암호화하는 단리된 핵산을 추가로 제공한다.
- [0235] 본 발명은 본 발명의 항체의 VH 및/또는 VL을 포함하는 단백질을 발현하는 암호화 서열을 포함하는 발현 카세트 또는 플라스미드를 추가로 제공한다.
- [0236] 본 발명은 본 발명의 발현 카세트 또는 플라스미드를 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다.
- [0237] 본 발명은 본 발명의 항체의 제조 방법을 추가로 제공하며, 여기서 본 발명의 숙주 세포를 상기 항체를 제조하는 조건에서 배양하거나 유지시킨다.
- [0238] 특히, 숙주 세포 및 상기 숙주 세포를 이용하는 제조 방법이 바람직하며, 상기 숙주 세포는
- [0239] - 항체 경쇄를 발현하는 암호화 서열을 포함하는 본 발명의 플라스미드 또는 발현 카세트; 및
- [0240] - 항체 중쇄를 발현하는 암호화 서열을 포함하는 본 발명의 플라스미드 또는 발현 카세트를 포함한다.
- [0241] 다른 태양에 따르면, 본 발명은
- [0242] a) 비-인간 동물을 클렙시엘라 슈모니에의 gal-III 항원으로 면역시키고 항체를 생산하는 B-세포를 단리하는 단계;
- [0243] b) 상기 단리된 B-세포로부터 불멸화된 세포주를 형성시키는 단계;
- [0244] c) 상기 gal-III 항원 및 선택적으로는 gal-I 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 세포주를 확인하기 위해서 상기 세포주를 선별하고, 여기서 예를 들어 gal-I에 비해 gal-III에 우선적으로 결합함을 확인하는 단계; 및
- [0245] d) 상기 단클론 항체, 또는 상기 항체의 인간화된 또는 인간 형태, 또는 상기 단클론 항체와 동일한 에피토프 결합 특이성을 갖는 그의 유도체를 생성시키는 단계
- [0246] 를 포함하는 본 발명의 항체의 제조 방법을 제공한다.
- [0247] 본 발명은
- [0248] a) 항체 또는 항체-생산 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및
- [0249] b) 상기 샘플 내에서 또는 샘플에 의해 제조된 항체와, 갈락탄-III 에피토프와의 결합을 평가하여, 상기 항체와 상기 에피토프 간의 양성 반응이 있는 경우 상기 항체를 후보 항체로 확인하는 (identify) 단계
- [0250] 를 포함하는 후보 항체의 확인 방법을 추가로 제공한다.
- [0251] 본 발명은

- [0252] a) 항체 또는 항체-생산 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및
- [0253] b) 상기 샘플 내에서 또는 샘플에 의해 제조된 항체와, 갈락탄-III 에피토프와의 결합을 평가하여, 갈락탄-I 에피토프 대비 갈락탄-III 에피토프와 상기 항체 간의 특이한 양성 반응이 있는 경우 상기 항체를 후보 항체로 확인하는 단계
- [0254] 를 포함하는 후보 항체의 확인 방법을 추가로 제공한다.
- [0255] 본 발명은
- [0256] a) 본 발명에 따라 정의된 후보 항체를 제공하는 단계; 및
- [0257] b) 단클론 항체, 또는 상기 후보 항체의 인간화된 또는 인간 형태, 또는 상기 후보 항체와 동일한 에피토프 결합 특이성을 갖는 그의 유도체를 생성시키는 단계
- [0258] 를 포함하는 본 발명의 항체의 제조 방법을 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0259] **도 1.** 표 1: 8E3-E5, 9H9-H7, 5A4-A7, 및 2D8-A10로 지정된 항체의 CDR 서열 (카밧 명명법).

도 1에 사용된 것과 같은 상기 명명법은 하기의 의미를 가질 것이다:

VH CDR1 = CDR1

VH CDR2 = CDR2

VH CDR3 = CDR3

VL CDR4 = CDR4 = VL CDR1

VL CDR5 = CDR5 = VL CDR2

VL CDR6 = CDR6 = VL CDR3

도 2. 하기의 VH 및 VL 서열

- 표 1의 CDR 서열 및 프레임워크 서열을 포함하는 키메릭 항체 (마우스 가변 도메인) 8E3-E5, 9H9-H7, 5A4-A7, 및 2D8-A10

- 인간화된 항체 G3-43, G3-46, G3-77, G3-78, G3-97

G3-43 VH: (VH 5A4-A7의 CDR 서열을 포함)

G3-43 VL: (VL 5A4-A7의 CDR 서열을 포함)

G3-46 VH: (VH 5A4-A7의 CDR 서열을 포함)

G3-46 VL: (VL 5A4-A7의 CDR 서열을 포함)

G3-77 VH: (VH 9H9-H7의 CDR 서열을 포함)

G3-77 VL: (VL 5A4-A7의 CDR 서열을 포함)

G3-78 VH: (VH 9H9-H7의 CDR 서열을 포함)

G3-78 VL: (VL 5A4-A7의 CDR 서열을 포함)

G3-97 VH: (VH 2D8-A10의 CDR 서열을 포함)

G3-97 VL: (VL 5A4-A7의 CDR 서열을 포함)

VH의 FR 서열: FR1 (N-말단과 CDR1 사이에 위치함), FR2 (CDR1과 CDR2 사이에 위치함), FR3 (CDR2와 CDR3 사이에 위치함) 및 FR4 (C-말단과 CDR3 사이에 위치함).

VL의 FR 서열: FR1 (N-말단과 CDR4 사이에 위치함), FR2 (CDR4와 CDR5 사이에 위치함), FR3 (CDR5와 CDR6 사이에 위치함) 및 FR4 (C-말단과 CDR6 사이에 위치함).

도 3. 클렙시엘라 슈모니에 01, 02ab 및 02ac 0-항원 측쇄의 도식 구조 및 당 조성. 본 발명에 기초하여, 갈락탄-I 서브유닛은 모든 예시에서 갈락탄-III 서브유닛으로 대체될 수 있다.

도 4. 서열분석된 클렙시엘라 슈모니에 균주 내 *rfb* (*wb*) 오페론 (A) 및 갈락탄-I을 암호화하는 상이한 *rfb* (*wb*) 좌위의 유전적 구성의 도식 비교 (B). 검정색으로 도식된 유전자는 Clarke et al. (비특허문헌 3)에서 기술된 것을 지칭한다. 빈 화살표는 *gtr*-유사 유전자를 나타내며, 2개의 *rfb* (*wb*) 변이체 사이의 회색 화살표는 비-보존된 가상의 글리코실트랜스퍼라아제 유전자를 나타낸다.

도 5. 변형된 갈락탄-I (여기서 갈락탄-III으로 명명) 반복 단위 (비특허문헌 5)의 구조.

도 6. 01, 02 및 02ac의 *rfb* (*wb*) 오페론 내 *gtr*-유사 유전자를 검출한 PCR 반응 결과. 약 2kb 크기의 앰플리콘은 *gtr*-유사 유전자의 부재를 확인시키는 반면, 약 5kb의 앰플리콘은 *wbbO* 및 *hisI* 사이에 *gtr*-유사 유전자의 존재를 시사한다.

도 7. D-갈락탄 III 분자를 인식하는 mAb 9H9-H7를 이용한 면역블롯팅 결과

도 8. 균주의 동종 패널로부터 정제된 LPS를 이용한 면역블롯팅 결과는 *gtr* 유전자 존재하에서 mAb가 반응함을 보여준다.

도 9. 검사된 인간화된 mAb의 VH 및 VL 조성. 인간화된 mAb의 CDR 영역은 표시된 키메라 모체로부터 유래되었다. 표시된 CDR 영역은 인간 프레임워크 서열로 이식되었다. 인간화된 mAb의 결합 특성이 유지되는 것은, 유세포 분석에 의해 친화성된 gal-III 발현 클렙시엘라 슈모니에의 표면 염색 결과로 확인하였다 (마지막 열).

도 10. GalN 민감화된 균혈증 마우스 모델에서 키메라 (패널 A) 또는 인간화된 (패널 B) 갈락탄-III 특이적 mAb (각각 1 또는 2 µg/마우스 용량)에 의한 살아있는 클렙시엘라 슈모니에에 의한 차후의 치사 공격에 대한 보호. 그래프는 2개의 개별적인 마우스 그룹 (각 5마리)에서의 실험 결과를 함께 보여준다.

도 11. 1 µg/ml 농도에서의 인간화된 gal-III 특이적 mAb의 내독소 중화능. 구체적인 사항은 실시예 참조.

도 12. 선택된 인간화된 및 모 키메라 gal-III 특이적 mAb에 의해 나타난 내독소 중화능의 용량 적정. 폴리믹신 B에 의한 중화를 기준으로 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0260] 여기서 사용되는 것과 같은 "항체"라는 용어는 링커 서열의 존재 또는 부재하의 면역글로불린의 중쇄 및/또는 경쇄의 불변 및/또는 가변 도메인으로서 이해되는 항체 도메인들로 이루어지거나 또는 상기 도메인들을 포함하는 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭할 것이다. 폴리펩티드는, 루프 서열에 의해 연결된 항체 도메인 구조의 적어도 2개의 베타-가닥으로 이루어지는 베타-원통 구조를 포함하는 경우의 항체 도메인으로서 이해된다. 항체 도메인은 천연 구조이거나, 예를 들어 항원 결합 특성 또는 임의의 다른 특성, 예를 들어 안정성 또는 기능적 특성, 예를 들어 Fc 수용체 FcRn 및/또는 Fc감마 수용체에의 결합을 변형하기 위한, 돌연변이유발 또는 유도체화에 의해 변형될 수 있다.

[0261] 여기서 사용되는 것과 같은 항체는 하나 이상의 항원 또는 항원의 하나 이상의 에피토프에 결합하는 특이적인 항원 결합 부위를 가지며, 구체적으로 단일 가변 항체 도메인, 예를 들어 VH, VL 또는 VHH의 CDR 결합 부위, 또는 가변 항체 도메인의 쌍, 예를 들어 VL/VH 쌍의 항원 결합 부위, VL/VH 도메인 쌍 및 불변 항체 도메인을 포함하는 항체, 예를 들어 Fab, F(ab'), (Fab)2, scFv, Fv 또는 전장 항체를 포함한다.

[0262] 여기서 사용되는 것과 같은 "항체"라는 용어는 예를 들어 VL/VH 쌍과 같은 가변 항체 도메인을 포함하며, VH, VL 또는 VHH와 같은 단일 가변 항체 도메인, 또는 연결 서열 또는 힌지 영역을 갖거나 갖지 않는 가변 및/또는 불변 항체 도메인의 조합을 포함하거나 또는 이들로 이루어지는 항체 포맷, VL/VH 도메인 쌍 및 불변 항체 도메인을 포함하거나 또는 이들로 이루어지는 항체, 예를 들어 중쇄 항체, Fab, F(ab'), (Fab)2, scFv, Fd, Fv 또는 전장 항체, 예를 들어 IgG 유형 (예: IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아형)의 항체, IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체를 특히 지칭할 것이다. "전장 항체"라는 용어는 Fc 도메인 및 천연 유래 항체 단량체에서 통상적으로 발견되는 다른 도메인의 적어도 대부분을 포함하는 임의의 항체 분자를 지칭하는데 사용될 수 있다. 상기 어구는 여기서 특정 항체 분자가 항체 단편이 아님을 강조하기 위하여 사용된다.

[0263] "항체"라는 용어는 구체적으로 단리된 형태의 항체를 포함하며, 상기 항체는 상이한 표적 항원에 대한 또는 항

체 도메인의 상이한 구조 배열을 포함하는 다른 항체가 실질적으로 배제된 것이다. 더욱이, 단리된 항체는 상기 단리된 항체와, 예를 들어 적어도 하나의 다른 항체, 예를 들어 상이한 특이성을 갖는 단클론 항체 또는 항체 단편과의 조합을 포함하는 복합 제제 중에 포함될 수도 있다.

- [0264] "항체"라는 용어를 인간 종을 포함한 동물 기원, 예를 들어 인간, 쥐, 토끼, 염소, 라마, 소 및 말을 포함한 포유동물, 또는 닭과 같은 조류의 항체에 적용할 것이며, 상기 용어는 특히 동물 기원의 서열, 예를 들어 인간 서열에 기초한 재조합 항체를 포함할 것이다.
- [0265] "항체"라는 용어를 또한 상이한 종들의 기원의 서열, 예를 들어 쥐 및 인간 기원의 서열을 갖는 키메라 항체에 적용한다.
- [0266] 항체에 관하여 사용되는 것과 같은 "키메라"이라는 용어는 중쇄 및 경쇄 각각의 아미노산 서열 중 한 부분은 특정 종으로부터 유래되거나 또는 특정 강에 속하는 항체의 상응하는 서열과 상동하는 반면, 상기 쇠의 나머지 분절은 또 다른 종 또는 강의 상응하는 서열과 상동하는 항체들을 지칭한다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄 모두의 가변 영역은 하나의 포유동물 종으로부터 유래된 항체의 가변 영역을 모방하는 반면, 불변 영역은 또 다른 종으로부터 유래된 항체의 서열과 상동한다. 예를 들어, 상기 가변 영역은 예를 들어 인간 세포 제제로부터 유래된 불변 영역과 함께, 비-인간 숙주 유기체로부터 쉽게 입수할 수 있는 B-세포 또는 하이브리도마를 사용하여 현재 알려져 있는 소스로부터 유래될 수 있다.
- [0267] "항체"라는 용어는 인간화된 항체에도 적용할 수 있다.
- [0268] 항체에 관하여 사용되는 것과 같은 "인간화된"이라는 용어는 비-인간 종으로부터의 면역글로불린으로부터 실질적으로 유래된 항원 결합 부위를 갖는 분자를 지칭하며, 여기서 상기 분자의 나머지 면역글로불린 구조는 인간 면역글로불린의 구조 및/또는 서열을 기반으로 한다. 상기 항원 결합 부위는 불변 도메인상에 융합된 완전한 가변 도메인을 포함하거나, 또는 가변 도메인 중의 적합한 프레임워크 영역상에 이식된 상보성 결정 영역 (CDR)만을 포함할 수 있다. 항원-결합 부위는 야생형이거나, 또는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있고, 바람직하게는 인간 면역글로불린에 보다 가깝게 닮도록 변형될 수 있다. 인간화된 항체의 일부 형태는 모든 CDR 서열을 보존한다 (예를 들어 마우스 항체로부터의 6개 CDR을 모두 포함하는 인간화된 마우스 항체). 다른 형태들은 기본 항체에 대해 변형된 하나 이상의 CDR을 갖는다.
- [0269] "항체"라는 용어는 인간 항체에도 적용한다.
- [0270] 항체에 관하여 사용되는 것과 같은 "인간"이라는 용어는 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 이해된다. 본 발명의 인간 항체는 예를 들어 CDR 중에 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기(예: 인비트로에서 무작위 또는 부위-특이적 변이에 의해 또는 인비보에서 체세포 변이에 의해 도입되는 변이)를 포함할 수 있다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린이 유전자 이식된 동물로부터 단리된 항체를 포함한다.
- [0271] "항체"라는 용어를 구체적으로 임의의 부류 또는 하위부류의 항체에 적용한다. 항체 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체는 항체의 주요 부류들 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 지정할 수 있으며, 이들 중 몇몇을 하위부류(아형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가 세분화할 수 있다.
- [0272] 상기 용어를 또한 단클론 또는 다클론 항체, 구체적으로 재조합 항체에 적용하며, 상기 용어는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 단리되는 모든 항체 및 항체 구조물, 예를 들어 상이한 기원의 유전자 또는 서열을 포함하는 동물, 예를 들어 인간을 포함한 포유동물로부터 기원하는 항체, 예를 들어 쥐, 키메라, 인간화된 항체, 또는 하이브리도마 유래 항체를 포함한다. 추가적인 예로는 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포로부터 단리된 항체, 또는 항체 또는 항체 도메인의 재조합된, 조합 라이브러리로부터 단리된 항체, 또는 항체 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 단리된 항체를 들 수 있다.
- [0273] "항체"라는 용어는 또한 항체의 유도체, 특히 기능 활성 유도체를 지칭하는 것으로 이해된다. 항체 유도체는 하나 이상의 항체 도메인 또는 항체 및/또는 융합 단백질의 임의의 조합, 예를 들어 CDR 루프를 포함하는 결합 구조물, 수용체 폴리펩티드뿐만 아니라 리간드, 스캐폴드 단백질, 효소, 독소 등으로서 이해되며, 여기서 상기 항체의 임의의 도메인은 하나 이상의 다른 단백질, 예를 들어 다른 항체의 임의의 위치에 융합될 수 있다. 상기 항체의 유도체는, 다양한 화학 기법들, 예를 들어 공유 커플링, 정전기적 상호작용, 디-설파이드 결합 등에 의한 다른 물질과의 연관 또는 결합에 의해 수득할 수 있다. 상기 항체에 결합된 다른 물질은 지질, 탄수화물, 핵

산, 유기 및 무기 분자 또는 이들의 임의의 조합 (예: PEG, 전구약물 또는 약물)일 수 있다. 구체적인 실시태양에서, 상기 항체는 생물학적으로 허용 가능한 화합물과의 특이적인 상호작용을 가능하게 하는 추가적인 태그를 포함하는 유도체이다. 상기 태그가 상기 항체가 그의 표적에 결합하는데 부정적인 영향을 미치지 않거나 허용 가능한 정도의 영향을 미치는 한, 본 발명에 사용가능한 태그에 대한 특별한 제한은 없다. 적합한 태그의 예는 His-태그, Myc-태그, FLAG-태그, 스트랩-태그, 칼모듈린-태그, GST-태그, MBP-태그 및 S-태그를 포함한다. 다른 구체적인 실시태양에서, 상기 항체는 표지를 포함하는 유도체이다. 본 발명에 사용되는 것과 같은 "표지"라는 용어는 "표지된" 항체를 생성시키기 위해 상기 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 결합되는 검출 가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 상기 표지는 단독으로 검출 가능하거나 (예를 들어 방사성동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에 검출 가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.

[0274] 본 발명에 개시되는 것과 같은 바람직한 유도체는 항원 결합에 관하여 기능적으로 활성화된 것이며, 바람직하게는 예를 들어 SBA, OPK 또는 LAL 분석에서 확인되는 것과 같이, 클렙시엘라 슈모니애에 대항하거나, 또는 세균 공격에 대해 방어하거나 또는 내독소혈증을 중화시키는 효능을 갖는다.

[0275] 구체적으로, 본 발명의 항체로부터 유래된 항체는 상기 gal-III 항원에 대해 차등적으로 결합하도록 기능적으로 활성화된, 예를 들어 상기 gal-III 항원에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는 CDR 영역 중 적어도 하나 이상 또는 그의 CDR 변이체를 포함할 수 있다.

[0276] 모 항체 또는 항체 서열, 예를 들어 모 CDR 또는 FR 서열로부터 유도된 항체는 여기서 특히, 예를 들어 인실리코 또는 재조합 조작에 의해 또는 그 밖의 화학적 유도체화 또는 합성에 의해 수득되는 돌연변이체 또는 변이체로서 이해된다.

[0277] "항체"라는 용어는 또한 모 CDR 서열의 기능 활성 CDR 변이체를 갖는 항체 및 모 항체의 기능 활성 변이체 항체를 포함하는 항체의 변이체를 지칭하는 것으로 이해된다.

[0278] 구체적으로, 본 발명의 항체로부터 유래된 항체는 기능적으로 활성인, 예를 들어 gal-III 항원에 특이적으로 결합하는 CDR 영역 중 적어도 하나 이상 또는 그의 CDR 변이체, 예를 들어 중쇄 가변 영역 중 적어도 3개의 CDR 및/또는 경쇄 가변 영역 중 적어도 3개의 CDR을 포함할 수 있고, 이 때 상기 CDR 또는 FR 영역 중 적어도 하나 또는 상기 HC 또는 LC의 불변 영역에 적어도 하나의 점 돌연변이를 가진다.

[0279] "변이체"라는 용어는 특히, 예를 들어 특정 항체 아미노산 서열 또는 영역을 결실시키거나, 교환하거나, 삽입물을 도입시키거나, 또는 예를 들어 불변 도메인에서 항체 안정성, 효과기 기능 또는 반감기를 조작하기 위해 또는 가변 도메인에서 항원-결합 특성을 개선시키기 위해 아미노산 서열을 화학적으로 유도체화하는 돌연변이유발 방법, 예를 들어 당해 분야에서 이용 가능한 친화성 성숙 기법에 의해 획득되는 항체, 예를 들어 돌연변이 항체 또는 항체의 단편을 지칭할 것이다. 상기 공지된 돌연변이유발 방법들 중 임의의 방법, 예를 들어 무작위화 기법에 의해 획득되는, 목적하는 위치에서의 점 돌연변이를 사용할 수 있다. 일부의 경우에, 위치는 예를 들어 가능한 아미노산들 중 임의의 것 또는 항체 서열을 무작위로 추출하기에 바람직한 아미노산 모음 중에서 무작위로 선택된다. "돌연변이유발"이라는 용어는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 변형과 관련하여 당해 분야에서 알려진 임의의 기법을 지칭한다. 돌연변이유발의 바람직한 유형은 실수 유발 PCR 돌연변이유발, 포화 돌연변이유발, 또는 그 외의 부위 지정 돌연변이유발을 포함한다.

[0280] "변이체"라는 용어는 구체적으로 기능 활성 변이체를 포함할 것이다.

[0281] 여기서 사용되는 것과 같은 CDR 서열의 "기능 활성 변이체"라는 용어는 "기능 활성 CDR 변이체"로서 이해되며, 여기서 사용되는 것과 같은 항체의 "기능 활성 변이체"는 "기능 활성 항체 변이체"로서 이해된다. 상기 기능 활성 변이체는 하나 이상의 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환에 의해, 또는 상기 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산 잔기, 또는 상기 뉴클레오티드 서열 내 뉴클레오티드, 또는 상기 서열의 원위 말단 중 하나 또는 둘다, 예를 들어 CDR 서열에서 N-말단 및/또는 C-말단의 1, 2, 3 또는 4개 아미노산, 및/또는 중심의 1, 2, 3 또는 4개 아미노산(즉, 상기 CDR 서열의 한 가운데)의 화학적 유도체화에 의해, 상기 서열 (모 항체 또는 모 서열)이 변형되어 생긴 서열을 의미하며, 상기 변형은 상기 서열의 활성에 영향, 특히 손상을 미치지 않는다. 선택된 표적 항원에 대해 특이성을 갖는 결합 부위의 경우, 항체의 기능 활성 변이체는, 예를 들어 특정 에피토프에 대한 미세한 특이성, 친화성, 강해진 친화성, Kon 또는 Koff율 등이 변하도록 변화될 수는 있지만, 여전히 소정의 결합 특이성을 가질 것이다. 예를 들어, 친화성 성숙 항체는 구체적으로 기능 활성 변형 항체로서 이해된다. 따라서, 친화성 성숙 항체에서 변형된 CDR 서열은 기능 활성 CDR 변이체로서 이해된다.

[0282] 구체적으로, 본 발명의 항체의 기능 활성 변이체는 gal-III 항원에 결합하는 효능 및 클렙시엘라 슈모니애의 다

른 항원들에 비해 gal-III 항원에 우선적으로 결합하는, 예를 들어 gal-III에는 결합하지만 클렙시엘라 슈모니아의 gal-I 항원에는 결합하지 않거나, gal-I 항원에 특이적으로 결합하지 않고/않거나, 클렙시엘라 슈모니아의 다른 항원들에는 결합하지 않는 특이성 또는 선택성을 갖는다.

[0283] 기능 활성 변이체는, 예를 들어 모 항체, 예를 들어 표 1 및 도 2에 나열된 것과 같은 항체 중 임의의 것과 동일한 항원 결합 부위를 포함하지만 상기 항원 결합 부위 외의 항체 영역 내에 변형을 갖는 항체의 서열을 변화 시킴으로써 획득되거나, 또는 항원 결합을 손상시키지 않는 상기 항원 결합 부위내의 변형에 의해 모 항체로부터 유래되지만 바람직하게는 모 항체와 실질적으로 동일한 생물 활성 또는 심지어 개선된 활성, 예를 들어 gal-III에는 결합하지만 클렙시엘라 슈모니아의 gal-I 항원에는 결합하지 않거나 gal-I 항원에 특이적으로 결합하지 않고/않거나 클렙시엘라 슈모니아의 다른 항원들에는 결합하지 않는, gal-III 항 특이성 또는 선택성을 가질 것이다. 선택적으로, (MDR) 클렙시엘라 슈모니아를 표적하는 특이적 결합 분석 또는 기능 검사에 의해 확인되는 것과 같이, 상기 기능 활성 변이체는 예를 들어 실질적으로 동일한 생물 활성과 함께 중화능 및/또는 SBA 분석에서의 보체 매개 살해능을 추가로 포함할 수 있고/있거나, 선택적으로 OPK 분석에서의 항체 매개 식작용의 효능을 추가로 포함하고/하거나, 선택적으로 LAL 분석에서의 내독소 중화 기능을 추가로 포함할 수 있다.

[0284] 여기서 사용되는 것과 같은 "실질적으로 동일한 생물 활성"이라는 용어는 실질적으로 동일한 활성이, 비금가는 또는 모 항체에 대해 확인된 것과 같이, 활성의 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 예를 들어 적어도 100%, 또는 적어도 125%, 또는 적어도 150%, 또는 적어도 175%, 또는 예를 들어 200% 이하, 또는 이보다 높은 활성임에 의해 지시되는 것과 같은 활성을 지칭한다.

[0285] 여기서 개시된 것과 같은 바람직한 변이체 또는 유도체는 항원 결합에 관하여 기능적으로 활성을 갖는 것이며, 바람직하게는 gal-III 항원에 특이적으로 결합하고 클렙시엘라 슈모니아의 다른 항원들에는 결합하지 않는 효능, 예를 들어 gal-III에 결합하고 클렙시엘라 슈모니아의 gal-I 항원에는 결합하지 않거나, 또는 gal-I 항원에는 유의하게 결합하지 않거나, 또는 gal-I에 비해 gal-III 항원에 우선적으로 결합하거나, 또는 gal-I 균주로부터 모아져 현재 다클론으로 분류된 혈청에 비해 더 높은 친화성으로 gal-III에 결합하는 효능을 갖는다. 바람직한 변이체는 적어도 2 로그, 바람직하게는 적어도 3 로그의 Kd 값 차이를 가져 클렙시엘라 슈모니아의 다른 항원들에 결합하지 않으며, 예를 들어 클렙시엘라 슈모니아를 표적하기 위한 특이성 결합 분석 또는 기능 검사에 의해 확인되는 것과 같은 실질적으로 동일한 생물 활성과 함께, 선택적으로는 예를 들어 상기 항체를 함유하지 않는 대조군 샘플에 비해 세균수를 현저히 감소시키는 것과 같은 SBA 분석에서의 보체 매개 살해 효능을 추가로 포함하고/하거나, 선택적으로는 예를 들어 상기 항체를 함유하지 않는 대조군 샘플에 비해 세균수를 현저히 감소시키는 것과 같은 OPK 분석에서의 항체 매개 식작용 효능을 추가로 포함하고/하거나, 선택적으로는 예를 들어 상기 항체를 함유하지 않는 대조군 샘플에 비해 유리 LPS를 현저히 감소시키는 것과 같은 LAL 또는 TLR4 신호전달 분석에서의 내독소 중화 기능을 추가로 포함한다. 상기 다양한 분석들에서 활성의 유의한 감소는, 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 98%의 감소 내지 약 100%(+/-1%)의 완전한 감소를 일반적으로 의미한다.

[0286] 바람직한 실시태양에서 모 항체의 기능 활성 변이체는

[0287] a) 상기 항체의 생물학적으로 활성을 갖는 단편이고, 상기 단편은 상기 분자의 서열의 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 및 가장 바람직하게는 적어도 97%, 98% 또는 99%를 포함하며;

[0288] b) 적어도 하나의 아미노산 치환, 부가 및/또는 결실에 의해 상기 항체로부터 유도되고, 여기서 상기 기능 활성 변이체는 상기 분자 또는 그의 부분과 서열 동일성을 가지며, 예를 들어 항체에 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 보다 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 90%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 95% 및 가장 바람직하게는 적어도 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가지고/가지거나;

[0289] c) 상기 항체 또는 그의 기능 활성 변이체 및 추가로 상기 폴리펩티드 또는 뉴클레오티드 서열에 이중인 적어도 하나의 아미노산 또는 뉴클레오티드로 이루어진다.

[0290] 본 발명의 하나의 바람직한 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체의 기능 활성 변이체는 상술한 변이체에 필수적으로 동일하지만, 상이한 종의 상동성있는 서열로부터 유래된다는 점에서 각각 그의 폴리펩티드 또는 뉴클레오티드 서열과 상이하다. 이들을 천연 유래 변이체 또는 유사체라 칭한다.

[0291] "기능 활성 변이체"라는 용어는 또한 천연 유래 대립유전자 변이체뿐만 아니라 돌연변이체 또는 임의의 다른 비

-천연 변이체를 포함한다. 당해 분야에 공지된 것과 같이, 대립유전자 변이체는 폴리펩티드의 생물학적 기능을 필수적으로 변경시키지는 않는 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 것을 특징으로 하는 (폴리)펩티드의 또 다른 형태이다.

- [0292] 기능 활성 변이체를, 예를 들어 하나 이상의 점 돌연변이에 의한 상기 폴리펩티드 또는 뉴클레오티드 서열 중의 서열 변형에 의해 획득할 수 있으며, 여기서 상기 서열 변형은 본 발명과 함께 사용될 때, 변형되지 않은 폴리펩티드 또는 뉴클레오티드 서열의 기능을 유지하거나 개선시킨다. 상기와 같은 서열 변형은 이에 제한되는 것은 아니나, (보존적인) 치환, 부가, 결실, 돌연변이 및 삽입을 포함할 수 있다.
- [0293] 구체적인 기능 활성 변이체는 CDR 변이체이다. CDR 변이체는 CDR 영역 중에 적어도 하나의 아미노산에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 변형은 상기 아미노산 서열의 화학적 또는 부분적 변형일 수 있고, 상기 변형은 상기 변이체가 변형되지 않은 서열의 생물학적 특성을 유지할 수 있게 한다. 상기 CDR 아미노산 서열의 부분적 변형은 하나 내지 여러 개의 아미노산, 예를 들어 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 결실 또는 치환에 의하거나, 또는 하나 내지 여러 개의 아미노산, 예를 들어 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 부가 또는 삽입에 의하거나, 또는 하나 내지 여러 개의 아미노산, 예를 들어 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 화학적 유도체화에 의하거나, 또는 이들의 조합에 의할 수 있다. 아미노산 잔기에서 치환은 보존적인 치환일 수 있으며, 예를 들어 하나의 소수성 아미노산이 또 다른 소수성 아미노산으로 치환되는 것일 수 있다.
- [0294] 보존적인 치환은 측쇄 및 화학적 특성에 관련된 아미노산 패밀리 내에서 발생하는 치환들이다. 이러한 패밀리의 예로는 염기성 측쇄, 산성 측쇄, 비-극성 지방족 측쇄, 비-극성 방향족 측쇄, 하전되지 않은 극성 측쇄, 작은 측쇄, 큰 측쇄 등을 갖는 아미노산들이 있다.
- [0295] 점 돌연변이는 특히, 상이한 아미노산에 대한 하나 이상의 단일 (비-보존적인) 또는 이중 아미노산의 치환 또는 교환, 결실 또는 삽입에 있어 조작되지 않은 아미노산과 상이한 아미노산 서열의 발현을 유발하는 폴리뉴클레오티드의 조작으로 이해된다.
- [0296] 바람직한 점 돌연변이는 동일한 극성 및/또는 전하의 아미노산이 교환되는 것을 지칭한다. 이와 관련하여, 상기 아미노산은 64개 삼중자 코돈에 의해 암호화되는 20개의 천연 유래 아미노산을 지칭한다. 이들 20개 아미노산은 중성 전하, 양전하 및 음전하를 갖는 것들로 분류할 수 있다:
- [0297] 상기 "중성" 아미노산은 각각의 3-문자 및 단일-문자 암호 및 극성과 함께 하기에 나타낸다:
- [0298] 알라닌: (Ala, A) 비극성, 중성;
- [0299] 아스파라긴: (Asn, N) 극성, 중성;
- [0300] 시스테인: (Cys, C) 비극성, 중성;
- [0301] 글루타민: (Gln, Q) 극성, 중성;
- [0302] 글리신: (Gly, G) 비극성, 중성;
- [0303] 이소류신: (Ile, I) 비극성, 중성;
- [0304] 류신: (Leu, L) 비극성, 중성;
- [0305] 메티오닌: (Met, M) 비극성, 중성;
- [0306] 페닐알라닌: (Phe, F) 비극성, 중성;
- [0307] 프롤린: (Pro, P) 비극성, 중성;
- [0308] 세린: (Ser, S) 극성, 중성;
- [0309] 쓰레오닌: (Thr, T) 극성, 중성;
- [0310] 트립토판: (Trp, W) 비극성, 중성;
- [0311] 티로신: (Tyr, Y) 극성, 중성;
- [0312] 발린: (Val, V) 비극성, 중성; 및
- [0313] 히스티딘: (His, H) 극성, 양성(10%) 중성(90%) 이다.

- [0314] 상기 "앞으로" 하전된 아미노산은:
- [0315] 아르기닌: (Arg, R) 극성, 양성; 및
- [0316] 리신: (Lys, K) 극성, 양성이다.
- [0317] 상기 "음으로" 하전된 아미노산은:
- [0318] 아스파르트산: (Asp, D) 극성, 음성; 및
- [0319] 글루탐산: (Glu, E) 극성, 음성이다.
- [0320] 여기서 개시된 항체 서열 및 상동체와 관련된 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는, 최대의 서열 동일성 퍼센트를 얻을 수 있도록 필요한 경우 서열을 정렬하고 간격을 유도한 후, 상기 서열 동일성의 부분으로서 어떠한 보존적인 치환도 고려하지 않은, 특정한 폴리펩티드 서열 중의 아미노산 잔기와 일치하는 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 당업자들이라면 비교되는 서열들의 전체 길이에 걸쳐 최대의 정렬을 이루어내는데 필요한 임의의 연산을 포함하여, 정렬을 계산하기에 적합한 매개변수들을 결정할 수 있다.
- [0321] 항체 변이체는 구체적으로, 예를 들어 당공학에 의해 생성된 특정한 당화 패턴을 갖는 상동체, 유사체, 단편, 변형 또는 변이체를 포함하는 것으로 이해되며, 이들은 기능적이고 기능성 등가물, 예를 들어 특정한 표적에 결합하고 기능적 특성을 갖는 기능성 등가물로서 제공될 수 있다.
- [0322] 본 발명의 항체는 Fc 효과기 기능을 나타내거나, 나타내지 않을 수 있다. 작용 기작은 주로 Fc 효과기 기능이 없는 중화된 항체에 의해 매개되지만, Fc는 보체를 이끌어 면역 복합체의 형성을 통해 순환되는 표적 항원, 예를 들어 독소를 제거할 수 있도록 한다.
- [0323] 구체적인 항체는 활성 Fc 부분이 없을 수 있으며, 따라서 항체의 Fc 부분을 함유하지 않거나 Fc 감마 수용체 결합 부위를 함유하지 않는 항체 도메인으로 구성되거나, 또는 예를 들어 Fc 효과기 기능을 감소시키는, 특히 ADCC 및/또는 CDC 활성을 없애거나 감소시키는 변형에 의해 Fc 효과기 기능이 결여된 항체 도메인을 포함할 수 있다. 다른 항체로서, Fc 효과기 기능을 증가시키는, 특히 ADCC 및/또는 CDC 활성을 증대시키는 변형을 포함하도록 조작할 수도 있다.
- [0324] 상기와 같은 변형은 돌연변이유발, 예를 들어 Fc 감마 수용체 결합 부위의 돌연변이에 의해 또는 항체 포맷의 ADCC 및/또는 CDC 활성을 방해하는 유도체 또는 작용체에 의해 나타날 수 있으며, Fc 효과기 기능을 감소 또는 증가시킬 수 있다.
- [0325] Fc 효과기 기능의 유의한 감소는 일반적으로 ADCC 및/또는 CDC 활성에 의해 측정 시 변형되지 않은 (야생형) 포맷의 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만의 Fc 효과기 기능을 지칭하는 것으로 이해된다. Fc 효과기 기능의 유의한 증가는 일반적으로 ADCC 및/또는 CDC 활성에 의해 측정시 변형되지 않은 (야생형) 포맷의 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 30%, 40% 또는 50%의 Fc 효과기 기능의 증가를 지칭하는 것으로 이해된다.
- [0326] 항체 서열과 관련하여 "당공학" 변이체라는 용어는 당공학의 결과로서 변형된 면역원성 또는 면역조절성 (예: 항염) 특성, ADCC 및/또는 CDC를 갖는 당화 변이체를 지칭할 것이다. 모든 항체는 중쇄 불변 영역 중의 보존된 위치에 탄수화물 구조를 함유하며, 이때 각각의 아이소타입은 단백질 조립, 분비 또는 기능 활성에 가변적으로 영향을 미치는 N-연결된 탄수화물 구조의 독특한 배열을 갖는다. IgG1 유형 항체는 각각의 CH2 도메인 내 Asn297에 보존된 N-연결된 당화 부위를 갖는 당단백질이다. Asn297에 부착된 2개의 이중 안테나구조 복합체 올리고사카라이드는 상기 CH2 도메인 사이에 묻혀, 상기 폴리펩티드 골격과의 광범위한 접촉을 형성하며, 이들의 존재는 상기 항체가 항체 의존성 세포독성(ADCC)과 같은 효과기 기능을 매개하는데 필수적이다. N297에서 예를 들어 N297의 예를 들어 A로의 돌연변이를 통한 N-글리칸의 제거, 또는 T299에서 N-글리칸의 제거는, 감소된 ADCC와 함께 일반적으로 비당화된 항체 포맷을 생성시킨다. 구체적으로, 본 발명의 항체는 당화되거나 또는 당공학에 의해 조작되거나, 또는 비당화된 항체일 수 있다.
- [0327] 항체 당화에 있어서는 큰 차이가 세포주들 사이에서 발생하며, 심지어 특정한 세포주 사이에서도 상이한 배양 조건 하에서 작은 차이가 발견된다. 일반적으로 세균 세포에서의 발현은 비당화된 항체를 제공한다. 이등분 GlcNAc의 형성을 촉매하는 글리코실트랜스퍼라아제인 $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 III (GnTIII)의 테트라사이클린-조절된 발현을 갖는 CHO 세포는 개선된 ADCC 활성을 갖는 것으로 보고되었다 (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180). 숙주 세포의 선택 외에, 항체의 재조합 생성 과정에서 당화에 영향을 미치는 인자에는 성장 방식, 배지 제형, 배양 밀도, 산소 처리, pH, 정제 설계 등이 포함된다.

- [0328] "항원 결합 부위" 또는 "결합 부위"라는 용어는 항원 결합에 관여하는 항체의 부분을 지칭한다. 상기 항원 결합 부위는 중("H") 및/또는 경("L")쇄의 N-말단 가변("V") 영역, 또는 그의 가변 도메인의 아미노산 잔기에 의해 형성된다. "고가변 영역"으로 지칭되는, 상기 중쇄 및 경쇄의 V 영역 내 3개의 매우 이질적인 신장부가, 프레임 워크 영역으로 알려진 보다 보존된 측면 인접 신장부들 사이에 삽입된다. 상기 항원 결합 부위는 결합된 에피토프 또는 항원의 3차원 표면에 상보적인 표면을 제공하며, 상기 고가변 영역은 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR"로 지칭된다. 상기 CDR에 포함된 결합 부위는 여기서도 "CDR 결합 부위"라고 칭한다.
- [0329] "표적" 또는 "표적 항원"이라는 용어들과 여기서 호환되어 사용되는 것과 같은 "항원"이라는 용어는 항체 결합 부위에 의해 인식되는 전체 표적 분자 또는 상기와 같은 분자의 단편을 지칭할 것이다. 구체적으로, 면역학적으로 관련된 "에피토프", 예를 들어 B-세포 에피토프 또는 T-세포 에피토프라고 일반적으로 지칭되는 항원의 하위 구조, 예를 들어 폴리펩티드 또는 탄수화물 구조는 상기와 같은 결합 부위에 의해 인식될 수 있다. gal-III 또는 gal-I 항원과 같은 특정한 항원들을 탄수화물 구조로 단리된 항원으로 제공될 수 있으며, 상기 단리된 항원은 선택적으로는 인공 담체 상에, 또는 그 외 클랩시엘라 슈모니에 세포 또는 그 세포 분획의 형태로 제공된다.
- [0330] 여기서 사용되는 것과 같은 "에피토프"라는 용어는 특히 항체의 결합 부위에 대한 특정한 결합 파트너를 완전하게 구성하거나 또는 특정한 결합 파트너의 일부가 될 수 있는 분자 구조를 지칭할 것이다. 에피토프는 탄수화물, 펩티드 구조, 지방산, 유기, 생화학적 또는 무기 물질 또는 그의 유도체 및 이들의 임의의 조합으로 구성될 수 있다. 에피토프가 펩티드 구조, 예를 들어 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 중에 포함되는 경우, 이는 대개 적어도 3개 아미노산, 바람직하게는 5 내지 40개 아미노산, 보다 바람직하게는 약 10 내지 20개 아미노산을 포함할 것이다. 에피토프는 선형 또는 입체 에피토프일 수 있다. 선형 에피토프는 폴리펩티드 또는 탄수화물쇄의 1차 서열의 단일 분절로 구성된다. 선형 에피토프는 연속적이거나 또는 겹칠 수 있다.
- [0331] 입체 에피토프는, 폴리펩티드를 폴딩시킴으로써 함께 3차 구조를 형성하는 아미노산 또는 탄수화물로 구성되며, 상기 아미노산은 선형 서열에서 서로 반드시 인접할 필요는 없다. 구체적으로 그리고 폴리펩티드 항원과 관련하여, 입체 또는 불연속 에피토프는 1차 서열에서 분리되었지만 상기 폴리펩티드가 고유 단백질/항원으로 폴딩되는 경우 상기 분자의 표면상에서 일치하는 구조로 조립되는, 2개 이상의 별도의 아미노산 잔기의 존재를 특징으로 한다.
- [0332] 여기서 "에피토프"라는 용어는 특히, 항체 또는 적어도 2개의 상이한 항원을 공유하는 교차-반응성 에피토프에 의해 인식되고, 선택적으로는 교차-반응성 항체에 의해서 인식되는 단일 에피토프를 지칭할 것이다.
- [0333] "발현"이라는 용어는 하기의 방식으로 이해된다. 예를 들어 여기서 개시된 것과 같은 항체와 같은 발현 산물의 목적하는 암호화 서열, 및 예를 들어 작동가능한 결합 내의 프로모터와 같은 조절 서열을 포함하는 핵산 분자를 발현 용도로 사용할 수 있다. 이들 서열에 의해 형질전환되거나 또는 형질감염된 숙주는 상기 암호화된 단백질을 생산할 수 있다. 형질전환을 수행하기 위해서, 상기 발현 시스템을 벡터에 포함시킬 수 있으나; 관련 DNA를 또한 상기 숙주 염색체에 삽입할 수도 있다. 구체적으로 상기 용어는, 예를 들어 상기 벡터에 의해 운반되고 숙주 세포에 도입되는 외래 DNA에 의해 암호화된 단백질의 발현에 적합한 조건하의 숙주 세포 및 알맞는 벡터를 지칭한다.
- [0334] 암호화 DNA는 예를 들어 항체와 같은 특정한 폴리펩티드 또는 단백질에 대한 특정 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열이다. 프로모터 DNA는 상기 암호화 DNA의 발현을 개시하거나, 조절하거나, 또는 다른 방법으로 매개하거나 제어하는 DNA 서열이다. 프로모터 DNA 및 암호화 DNA는 동일한 유전자 또는 상이한 유전자로부터 유래할 수 있으며, 동일하거나 상이한 유기체로부터 유래할 수 있다. 재조합 클로닝 벡터는 보통 암호화 또는 발현을 위한 하나 이상의 복제 시스템, 예를 들어 항생제 내성 마커와 같은 숙주 내의 하나 이상의 선택용 마커, 및 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 것이다.
- [0335] 여기서 사용되는 "벡터"는 클로닝된 재조합 뉴클레오타이드 서열, 즉 재조합 유전자의 전사, 및 적합한 숙주 유기체에서 그의 mRNA의 번역에 필요한 DNA 서열로서 정의된다.
- [0336] "발현 카세트"는 정의된 제한 부위에서 벡터내에 삽입될 수 있는 발현 산물을 암호화하는 DNA 암호화 서열 또는 DNA의 분절을 지칭한다. 상기 카세트 제한 부위는 적합한 해독 프레임 내에 상기 카세트가 반드시 삽입될 수 있도록 설계된다. 일반적으로, 외래 DNA는 상기 벡터 DNA의 하나 이상의 제한 부위에 삽입되고, 이어서 상기 벡터에 의해 전달 벡터 DNA와 함께 숙주 세포 내로 운반된다. 발현 벡터와 같이, 삽입되거나 부가된 DNA를 갖는 DNA의 분절 또는 서열을, "DNA 구조물"로도 칭할 수 있다.
- [0337] 발현 벡터는 발현 카세트를 포함하며, 숙주 세포 내의 자율 복제 기원 또는 계놈 삽입 부위, 하나 이상의 선택

성 마커 (예: 아미노산 합성 유전자, 또는 제오신, 카나마이신, G418 또는 히그로마이신과 같은 항생제에 대한 내성을 부여하는 유전자), 다수의 제한 효소 절단 부위, 적합한 프로모터 서열 및 전사 종결자를 보통 추가적으로 포함하고, 이들 성분은 함께 작동가능하도록 연결된다. 여기서 사용되는 것과 같은 "벡터"라는 용어는 게놈 삽입 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 자율적으로 복제되는 뉴클레오티드 서열도 포함한다. 벡터의 통상적인 유형은 "플라스미드"이며, 이는 일반적으로 추가적인 (외래) DNA를 쉽게 수용할 수 있는 이중 가닥 DNA의 독립된 분자로, 적절한 숙주 세포 내에 쉽게 도입될 수 있다. 플라스미드 벡터는 보통 암호화 DNA 및 프로모터 DNA를 포함하며, 외래 DNA의 삽입에 적합한 하나 이상의 제한 부위를 갖는다. 구체적으로, "벡터" 또는 "플라스미드"라는 용어는 DNA 또는 RNA 서열 (예: 외래 유전자)을 숙주 세포에 도입시켜, 상기 숙주를 형질전환시키고 도입된 서열의 발현 (예: 전사 및 번역)을 촉진할 수 있는 운반 수단을 지칭한다.

[0338] 여기서 사용되는 것과 같은 "숙주 세포"라는 용어는 특정한 재조합 단백질, 예를 들어 여기서 개시된 것과 같은 항체, 및 그의 임의의 자손을 생산하도록 형질전환된 1차 대상 세포를 지칭한다. 모든 자손이 모 세포와 정확하게 동일할 필요는 없으나 (의도적인 또는 우연한 돌연변이 또는 환경적인 차이로 인해), 상기와 같은 변형된 자손은 상기 자손이 최초로 형질전환된 세포와 동일한 기능성을 유지하는 한 상기 용어에 포함되는 것으로 이해되어야 한다. "숙주 세포주"라는 용어는 재조합 항체와 같은 재조합 폴리펩티드를 생산하도록 재조합 유전자를 발현시키는데 사용되는 것과 같은 숙주 세포의 세포주를 지칭한다. 여기서 사용되는 것과 같은 "세포주"라는 용어는 오랜 기간에 걸쳐 증식하는 능력을 획득한 특정 세포 유형의 확립된 클론을 지칭한다. 상기와 같은 숙주 세포 또는 숙주 세포주를 세포 배양물 중에 유지시키고/시키거나 재조합 폴리펩티드를 생산하도록 배양할 수 있다.

[0339] 핵산, 항체 또는 다른 화합물에 관하여 여기서 사용된 것과 같은 "단리된" 또는 "단리"라는 용어는 "실질적으로 순수한" 형태로 존재하도록, 자연적으로는 결합되었을 수도 있는 환경으로부터 충분히 분리된 상기와 같은 화합물을 지칭할 것이다. "단리된"은 다른 화합물 또는 물질과의 인공적인 또는 합성적인 혼합물의 배제, 또는 핵심적인 활성을 방해하지 않으며 예를 들어 불완전한 정제로 인해 존재할 수도 있는 불순물의 존재를 반드시 의미하는 것은 아니다. 특히, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 천연 유래가 아닌 것들, 예를 들어 코돈-최적화된 핵산 또는 cDNA, 또는 화학적으로 합성된 것들 또한 포함되는 것으로 여겨진다.

[0340] 마찬가지로, 본 발명의 단리된 항체는 구체적으로, 예를 들어 또 다른 항체 또는 활성제의 조합 제제 (상기 조합은 자연에서 존재하지 않는다) 중에서 제공된 것과 같이 비-천연 유래이거나, 또는 천연 유래 항체의 최적화된 또는 친화성-성숙된 변이체, 또는 항체의 제조가능성을 개선시키기 위해 조작된 프레임워크-영역을 갖는 항체이다. 이와 같은 항체의 최적화 또는 조작은 하나 이상의 합성 서열 또는 특성을 포함하는데, 이들은 천연의 항체 환경에서는 발견되지 않는다.

[0341] 본 발명의 핵산과 관련하여, "단리된 핵산"이라는 용어가 때때로 사용된다. 상기 용어는 DNA에 적용될 때, 상기 DNA 분자가 유래되는 유기체의 천연 유래 게놈 중에 바로 인접한 서열들로부터 분리된 DNA 분자를 지칭한다. 예를 들어, "단리된 핵산"은 벡터, 예를 들어 플라스미드 또는 바이러스 벡터에 삽입되거나, 또는 원핵생물 또는 진핵생물 세포 또는 숙주 유기체의 게놈 DNA에 삽입된 DNA 분자를 포함할 수 있다. RNA에 적용될 때, 상기 "단리된 핵산"이라는 용어는 상기 정의된 것과 같은 단리된 DNA 분자에 의해 암호화된 RNA 분자를 주로 지칭한다. 또는, 상기 용어는 천연 상태 (즉, 세포 또는 조직 내)로 결합될 수도 있는 다른 핵산으로부터 충분히 분리된 RNA 분자를 지칭할 수 있다. "단리된 핵산"(DNA 또는 RNA)은 또한 생물학적 또는 합성 수단에 의해 직접적으로 생성되고, 그의 생성 과정에서 존재하는 다른 성분들로부터 분리된 분자를 나타낼 수 있다.

[0342] 폴리펩티드 또는 단백질, 예를 들어 본 발명의 단리된 항체 또는 에피토프와 관련하여, "단리된"이라는 용어는 구체적으로 천연 환경, 또는 인비트로 또는 인비보에서 수행되는 재조합 DNA 기술에 의해 제조 시 준비되는 환경 (예: 세포 배양)에서 발견되는 다른 화합물과 같이, 자연적으로 결합된 물질이 없거나 실질적으로 없는 화합물을 지칭할 것이다. 단리된 화합물을 희석제 또는 항원보강제와 함께 제형화할 수 있으며, 더욱이 실용적인 목적 상 단리될 수 있다 - 예를 들어 상기 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 진단 또는 치료법에 사용할 때, 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 혼합할 수 있다. 특히 본 발명의 단리된 항체는 클렙시엘라 슈모니에 균주에서 모아진 다클론 혈청 제제와 상이한데, 그 이유는 상기 항체가 단리되고 정제된 형태로 제공되기 때문이며, 바람직하게는 상기 단리된 항체를 유일한 활성 물질로서 포함하는 제제로 제공되기 때문이다. 그러나, 이는 상기 단리된 항체가 제한된 수의 더 명확한(단리된) 항체를 포함하는 복합 제품으로 제공되는 것을 제외하는 것은 아니다. 단리된 항체를 또한 고체, 반-액체 또는 액체 담체, 예를 들어 비드 상에 제공할 수도 있다.

[0343] "중화하는" 또는 "중화"라는 용어는 여기서 가장 넓은 의미로 사용되며 중화가 이루어지는 이전에 관계없이 병

원체, 예를 들어 클렙시엘라 슈모니아에 개체가 감염되는 것을 억제하거나, 또는 상기 병원체가 내독소를 생산함으로써 감염을 촉진하는 것을 억제하거나, 또는 상기 내독소가 생물학적 활성을 발휘하는 것을 억제하는 임의의 분자를 지칭한다. 중화는 예를 들어 숙주 내에서 점막 표면의 클렙시엘라 슈모니아에 의한 군체 형성, 인체의 무균 부위에 대한 공격, 부정적인 생물학적 신호의 도출 (최악의 경우 패혈 쇼크를 유도)을 억제하는 항체에 의해 이루어질 수 있다.

[0344] 엄밀한 의미에서 중화는, 특정 LPS와 그의 동족 수용체 (예: Toll-유사 수용체-4 복합체)의 결합을 억제하여 생물학적 활성을 도출하는 것을 의미한다. 상기 중화 효능은 일반적으로는 표준 분석, 예를 들어 인비트로 또는 인비보 중화 분석, 예를 들어 LAL 분석 또는 TLR-4 기반 분석에서 확인하며, 이때 내독소의 생물 활성의 억제를, 예를 들어 비색측정에 의해 측정한다.

[0345] 클렙시엘라 슈모니아에 대항하거나 이를 중화시키는 항체는 병원체 및 병원성 반응을 방해하며, 따라서 감염을 제한하거나 예방하고/하거나 상기와 같은 감염으로부터 초래되는 질병 병태를 개선시키거나, 또는 클렙시엘라 슈모니아에 의한 발병, 특히 숙주의 무균 신체 구획/부위 내로의 또는 상기 내의 전염 및 복제를 억제할 수 있다. 이와 관련하여, 중화 항체는 "보호 항체"로도 이해될 수 있는데, 이는 능동 또는 수동 면역에서 관찰되는 감염인자에 대한 면역을 맡고 있는 항체를 의미한다. 특히, 여기서 개시된 것과 같은 중화 또는 보호 항체는, 치료 목적으로, 예를 들어 병원체에 의해 유발된 질병 증상, 부작용 또는 질병의 진행을 예방하거나, 개선시키거나, 치료하거나 또는 적어도 부분적으로 저지시키기 위한 예방 또는 치료를 위해 사용될 수 있다. 구체적으로, 보호 항체는 예를 들어 혈청 살균 또는 옵소닌식작용 활성을 유도함으로써 살아있는 클렙시엘라 슈모니아 세포를 살해하거나 또는 상기 세포의 복제를 방해하거나, 또는 치료 상의 적용(즉, 확립된 감염에 대해 제공된) 후에 무균 신체 부위로부터 전체 세균 세포 또는 그의 LPS 분자를 제거할 수 있다. 또는, 예방적으로 적용된 보호 항체는 상기 언급된 또는 그 외의 기전들 중 하나에 의한 감염의 확립(즉, 비-무균 부위로부터 무균 신체 구획으로의 클렙시엘라 슈모니아의 확산)을 억제한다.

[0346] 여기서 사용되는 것과 같은 "생물학적 샘플"이라는 용어는 클렙시엘라 슈모니아를 포함할 수도 있는 생물학적 물질을 포함하거나 포함할 가능성이 있는, 인간과 같은 개체로부터 얻어지는 임의의 물질을 지칭한다. 생물학적 샘플은 조직, 체액 또는 세포 배양 샘플일 수 있다. 본 발명에 따라 샘플이 사용될 수 있는 예로는, 환자의 샘플에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 조직 또는 체액, 구체적으로 기관내 흡인물, 흉수액, 폐천자물, 코 면봉 채취물 또는 객담과 같은 기도 시료, 혈액 샘플, 대변 샘플, 피부 및 뇨 샘플 또는 뇌척수액 샘플이 포함된다.

[0347] 생물학적 샘플은 예를 들어 단백질 성분이 풍부한 점막 삼출물 등 다양한 유형의 생물학적 작은 유기 분자를 포함하고 있는 복잡한 점성 생물학적 유체와 같은 복잡한 생물학적 매트릭스를 일반적으로 포함한다. 샘플 내 매트릭스와 관련된 비-특이적 결합의 감소를 위하여, 및/또는 가용화하여/하거나 샘플 매트릭스 내의 점성이 있거나 고체인 성분을 분해함으로써 매트릭스 점성을 감소시키기 위하여, 적합한 첨가제 또는 추출 과정이 사용될 수 있다. 샘플 준비 방법은 마커를 유기체로부터 제거하고/하거나, 생물학적 매트릭스를 분해하고/하거나 액화시키는 방법을 이용할 수 있다. 분석될 수 있는 생물학적 매트릭스에는 점막-포함 샘플들, 예를 들어 코 분비물, 객담, 가래, 인두 삼출물, 요도 또는 질 분비물, 상기 막 표면의 세척물이 포함된다.

[0348] 적합한 샘플 준비 방법은 분석 시 생물학적 매트릭스의 효과를 감소시키는 단계를 포함한다. 이러한 단계는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 포획, 크로마토그래피, 회전-원심분리, 및 투석이 포함된다.

[0349] 개체로부터 얻어질 수 있는 물질은 세균 단리물의 형태, 예를 들어 단리된 클렙시엘라 슈모니아를 배양한 세포 배양물 또는 세포 배양 제품의 형태일 수 있다. 세포 배지는 클렙시엘라 슈모니아의 개체 수만을 증가시키기 위한 선택 배지, 또는 비-선택적 배지일 수 있다.

[0350] 세균 단리물의 제조는 일반적으로 클렙시엘라 슈모니아의 증식을 증가시키는 조건 하에서 샘플을 유지하는 인큐베이팅 단계를 포함하며, 이에 따라 샘플 내 클렙시엘라 슈모니아의 개체 수를 증가시킬 수 있다.

[0351] 단리물이 얻어지면, 세균은 추가적으로 생화학적 및/또는 혈청학적 검사에 따라, 예를 들어 O형, gal-III 발현 수치를 확인하기 위하여 조사된다. 클렙시엘라 슈모니아를 연구하기 위하여 여러 분류 방법을 이용할 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 혈청 분석법, 다좌위 서열 형별분석 (multi-locus sequence typing, MLST)을 포함한 유전적 관계/계통발생에 대한 표준 분류법, 또는 펄스필드 젤 전기영동법 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)을 포함한다.

[0352] 여기서 사용되는 것과 같은 "gal-III"로도 지칭되는 "갈락탄-III"은 갈락토오스 폴리머 및 화학식 (I)의 반복단위를 적어도 하나 포함하는 구조를 포함하는 클렙시엘라 슈모니아의 LPS O-항원의 탄수화물 구조를 지칭할 것이

다. 이러한 반복 단위는 분지된 갈락토오스 폴리머를 포함한다 (도 5 참조). 상기 구조는 gal-I 항원의 구조와 유사하나, 구분된다. gal-III는 여기서 새로운 혈청형 결정인자로 이해되며, gal-I 항원의 존재 및 gal-III 구조의 부재를 특징으로 하는 O2a 혈청형과 유사하나 구분된다.

- [0353] gal-III 구조를 포함하는 각 O-항원은 여기서, 본 발명의 gal-III 특이적 항체에 의해 인식되는 "gal-III 에피토프"를 포함하는 "gal-III 항원"으로 지칭된다. gal-III 항원은 gal-III O-형의 클렙시엘라 슈모니애의 LPS의 외부분으로 이해되며, 하나 이상의 특정 gal-III 에피토프를 포함하는 표면에 접근가능한 항원 탄수화물 구조가 이에 포함된다.
- [0354] gal-III O-형 클렙시엘라 슈모니애의 유전자형은 특히 *gtr* 유전자가 보충된 *rfb*_{gal-I} 좌위 (도 4B), 즉, 추가적인 *gtr* 유전자에 의해 연장된 *rfb* 좌위를 특징으로 하며, 이는 gal-I 형 중 하나의 선형과 상이한 분지된 3개의 갈락토오스 반복 단위를 발현시키는 역할을 한다.
- [0355] 적어도 하나의 gal-III 구조를 포함하는 LPS O-항원을 특징으로 하는 임의의 클렙시엘라 슈모니애를 여기서 gal-III O-형 클렙시엘라 슈모니애로 지칭한다. gal-III O-형 클렙시엘라 슈모니애의 LPS는 gal-III 구조만을 단독으로 포함하거나, gal-III 및 gal-I 구조를 모두 포함할 수 있다.
- [0356] 여기서 사용되는 것과 같은 "gal-I"로도 지칭되는 "갈락탄-I"은 갈락토오스 폴리머 및 화학식 (I)의 반복단위가 아닌 화학식 (II)의 반복단위를 적어도 하나 포함하는 구조를 포함하는 클렙시엘라 슈모니애의 LPS O-항원의 탄수화물 구조를 지칭한다. 이러한 반복 단위는 선형 갈락토오스 폴리머를 포함한다. gal-I은 gal-III 항원을 포함하지 않는 O2a 혈청형을 특징으로 한다.
- [0357] gal-I 구조를 포함하는 각 O-항원은 여기서, 본 발명의 gal-I 특이적 항체에 의해 인식되는 "gal-I 에피토프"를 포함하는 "gal-I 항원"으로 지칭된다. gal-I O-형 클렙시엘라 슈모니애의 유전자형은 특히 *gtr* 유전자가 보충되지 않은 *rfb*_{gal-I} 좌위를 특징으로 하며, 이는 gal-III 형의 분지된 것과 상이한 선형의 3개의 갈락토오스 반복 단위를 발현시키는 역할을 한다.
- [0358] gal-I 항원은 gal-I O-형의 클렙시엘라 슈모니애의 LPS의 외부분으로 이해되며, 하나 이상의 특정 gal-I 에피토프를 포함하는 표면에 접근가능한 항원 탄수화물 구조가 이에 포함되며, gal-III 구조를 포함하지 않는다.
- [0359] 여기서 사용되는 것과 같은 "특이적" 결합, 인식 또는 표적은, 결합체, 예를 들어 항체 또는 그의 항원-결합 부위가 표적 항원 또는 분자의 이중 집단에서의 각 에피토프에 주목할 만한 친화성을 보이는 것을 의미한다. 따라서, 주어진 조건 (예: 면역분석 조건)하에서, 결합체는 표적 gal-III 항원에 특이적으로 결합하며, 샘플 중에 존재하는 다른 분자에는 유의한 양으로 결합하지 않는다. 상기 특이적 결합은 결합이, 선택되는 표적의 정제, 높은, 중간 또는 낮은 결합 친화성 또는 강력한 친화성에 대해서 선택적임을 의미한다. 선택적 결합은 대개 결합 상수 또는 결합 역학이 다른 항원과 비교 시, 적어도 10배 (적어도 1 로그 차이로 이해됨), 바람직하게는 적어도 100배 (적어도 2 로그 차이로 이해됨), 보다 바람직하게 적어도 1000배 (적어도 3 로그 차이로 이해됨) 상이한 경우에 나타난다.
- [0360] "특이성"이라는 용어는 예를 들어 교차-특이적 결합체와 같은 하나 이상의 분자에 결합하는 결합체에 적용되는 것으로 이해된다. 적어도 2개의 상이한 표적 또는 에피토프 또는 그 표적의 뉴클레오타이드 서열을 표적하거나, 적어도 2개의 상이한 표적 상의 교차-반응성 에피토프 또는 뉴클레오타이드 서열을 표적하는 바람직한 교차-특이적 (또는 다특이성 또는 교차-반응성) 결합체는, 특히 100배 미만, 또는 10배 미만 차이의 실질적으로 유사한 결합 친화성, 또는 적어도 10배 또는 적어도 100배 차이의 실질적으로 상이한 결합 친화성을 나타내며 표적과 결합한다. 1차 (예: gal-III) 및 2차 (예: gal-I) 표적을 모두 인식하나, 2차 표적보다 1차 표적에 우선적으로 결합하는 교차-반응성 결합체는 일반적으로 2차 표적 대비 1차 표적에 동일 또는 더 높은 친화성을 보이는 것을 특징으로 하며, 구체적으로 2차 항원에 비해 1차 항원에 우선적으로 결합하는 차별적인 결합 친화성은 구체적으로 적어도 동등하거나 또는 그보다는 예를 들어 적어도 1.5배, 또는 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 4배, 또는 적어도 5배, 또는 적어도 6배, 또는 적어도 7배, 또는 적어도 8배, 또는 적어도 9배, 또는 적어도 10배 더 크다. 이러한 차별적인 결합은 면역분석, 바람직하게는 면역블롯팅, ELISA, 또는 기타 면역학적 방법에 의하여 확인될 수 있다.
- [0361] 본 발명의 바람직한 항체는 gal-III 항원에 높은 친화성으로, 특히 높은 on-율 및/또는 낮은 off-율, 또는 높은 결합 활성으로 결합한다 (오직 gal-III, 또는 gal-I 대비 gal-III에 우선적으로 결합). 항체의 결합 친화성은 일반적으로, 해리 상수 (K_d 또는 K_D)로 알려진, 항원 결합 부위의 절반이 점유되는 항체의 농도를 특징으로 한

다. 대개 결합제로는, $K_d < 10^{-7}$ M의 높은 친화성 결합제, 어떤 경우 예를 들어 치료 목적을 위해서 더 높은 친화성, 예를 들어 $K_d < 10^{-8}$ M, 바람직하게는 $K_d < 10^{-9}$ M, 훨씬 더 바람직하게는 $K_d < 10^{-10}$ M의 친화성 결합제가 고려된다.

[0362] 그러나, 특히 바람직한 실시태양에서 상기 개별적인 항원 결합 친화성은 예를 들어 적어도 2개의 항원에 결합하는 경우 중간 친화성, 예를 들어 10^{-6} 미만 및 10^{-8} M 이하의 K_d 를 갖는다.

[0363] 중간 친화성 결합제를 필요한 경우 본 발명에 따라, 바람직하게는 친화성 성숙 과정과 함께 제공할 수 있다.

[0364] 친화성 성숙은 표적 항원에 대해 증가된 친화성을 갖는 항체가 생산되는 과정이다. 여기서 개시된 다양한 실시태양들에 따른 친화성 성숙된 항체를 생성시키기 위해서, 당해 분야에서 입수할 수 있는 친화성 성숙 라이브러리를 제조 및/또는 사용하는 임의의 하나 이상의 방법을 사용할 수 있다. 예시적인 상기와 같은 친화성 성숙 방법 및 용도, 예를 들어 무작위 돌연변이유발, 세균 돌연변이 균주 계대배양, 부위-특이적 돌연변이유발, 돌연변이 다발점 표적화, 절약 돌연변이유발, 항체 서플링, 경쇄 서플링, 중쇄 서플링, CDR1 및/또는 CDR1 돌연변이유발, 및 여기서 개시된 본 발명의 다양한 실시태양들에 따른 실행 방법 및 용도로 이용할 수 있는 친화성 성숙 라이브러리를 생성시키고 사용하는 방법은 예를 들어 하기에 개시된 것들을 포함한다: Prassler et al. (2009); Immunotherapy, Vol. 1(4), pp. 571-583; Sheedy et al. (2007), Biotechnol. Adv., Vol. 25(4), pp. 333-352; WO2012/009568; WO2009/036379; WO2010/105256; US2002/0177170; WO2003/074679.

[0365] 아미노산 돌연변이유발을 포함한 항체의 구조적 변화와 함께, 또는 면역글로불린 유전자 분절 중의 체세포 돌연변이의 결과로서, 더 큰 친화성을 위해 항원에 대한 결합 부위의 변이체가 생성되고 선택된다. 친화성 성숙된 항체는 모 항체보다 수 로그배 더 큰 친화성을 나타낼 수 있다. 단일 모 항체는 친화성 성숙의 대상이 될 수 있다. 한편, 표적 항원에 대해 유사한 결합 친화성을 갖는 항체들의 풀은, 친화성 성숙된 단일 항체 또는 상기와 같은 항체의 친화성 성숙된 풀을 획득하기 위해 변화시킨 모 구조로 간주될 수 있다.

[0366] 본 발명에 따른 항체의 바람직한 친화성 성숙된 변이체는 적어도 2배, 바람직하게는 적어도 5배, 바람직하게는 적어도 10배, 바람직하게는 적어도 50배, 또는 바람직하게는 적어도 100배의 결합 친화성 증가를 나타낸다. 상기 친화성 성숙을 모 분자의 각 라이브러리를 사용하는 선택 캠페인의 과정에 사용할 수 있으며, 이 때 함께 사용되는 본 발명의 항체를 수득하기 위해 중간 결합 친화성을 갖는 항체는, 결합 친화성이 10^{-8} M 미만의 K_d 값인 특이적인 표적 결합 특성을 갖는다. 한편으로, 상기 친화성은 10^{-9} M 미만, 바람직하게는 10^{-10} M 미만 또는 심지어 10^{-11} M 미만, 가장 바람직하게는 피코몰 범위의 K_d 에 상응하는 높은 값을 획득하도록, 본 발명에 따른 항체의 친화성 성숙에 의해 훨씬 더 증가될 수 있다.

[0367] 일부 실시태양에서 결합 친화성은 친화성 ELISA 분석에 의해 확인된다. 일부 실시태양에서 결합 친화성은 비아코어(BIAcore), 포르테바이오 또는 MSD 분석에 의해 확인된다. 일부 실시태양에서 결합 친화성은 동역학적 방법에 의해 확인된다. 일부 실시태양에서 결합 친화성은 평형/용해 방법에 의해 확인된다.

[0368] "동일한 특이성을 갖는", "동일한 결합 부위를 갖는" 또는 "동일한 에피토프에 결합하는"이라는 용어의 사용은 등가의 단클론 항체들이 동일하거나 또는 필수적으로 동일한, 즉 유사한 면역반응(결합) 특성을 나타내며 사전-선택된 표적 결합 서열에 결합하기 위해 경쟁하는 것을 가리킨다. 특정 표적에 대한 항체 분자의 상대적인 특이성은, 예를 들어 문헌 [Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988]에 개시된 것과 같은 경쟁 분석에 의해 상대적으로 확인할 수 있다.

[0369] 항체에 대하여 여기서 사용되는 것과 같은 "경쟁한다"라는 용어는 1차 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 2차 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 결합과 충분히 유사한 방법으로 에피토프에 결합하는 것을 의미하며, 그에 따라 상기 1차 항체와 그의 동족 에피토프와의 결합 결과가 2차 항체의 부재 하에서의 1차 항체의 결합에 비해 상기 2차 항체의 존재 하에서 검출 가능할 정도로 감소할 수 있다. 한편, 1차 항체의 존재 하에서 2차 항체가 그의 에피토프에 결합하는 것이 검출 가능할 정도로 감소하는 경우가 존재할 수 있으나, 반드시 그럴 필요는 없다. 즉, 1차 항체가 그의 에피토프에 결합하는 것을 억제하는 2차 항체가 없더라도, 1차 항체는 2차 항체가 그의 에피토프에 결합하는 것을 억제할 수 있다. 그러나, 각각의 항체가 다른 항체와 그의 동족 에피토프와의 결합을 검출 가능할 정도로 억제하는 경우, 그것이 동일한 정도이든, 더 큰 정도이든 또는 더 적은 정도이든 간에, 항체는 그의 각 에피토프(들)의 결합에 대해서 서로 "경쟁한다"고 한다. gal-III 항원에 결합하는 예시된 항체 중 어느 것과 경쟁하는 항체이든 모두 본 발명에 특히 포함된다.

- [0370] 여기서 경쟁은 경쟁 ELISA 분석에 의해서 또는 포르테바이오 분석에 의해서 확인되는 것과 같이 약 30%를 초과하는 상대적인 억제를 의미한다. 특정 상황에서, 예를 들어 상기 항원의 결합의 의도된 기능을 갖도록 설계된 새로운 항체를 선택하거나 선별하는데 경쟁 분석을 사용하는 경우, 경쟁의 적합한 수준에 대한 기준으로 더 큰 상대적인 억제 한계를 설정하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 예를 들어 상기 경쟁 결합에 대한 기준을 설정할 수 있으며, 여기에서 적어도 40%, 또는 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 심지어 적어도 100%의 상대적인 억제가 검출되어야 그 항체가 충분히 경쟁적인 것으로 간주된다.
- [0371] 여기서 사용되는 "진단 키트"라는 용어는 키트 또는 부품 세트를 지칭하며, 이는 조합되어 또는 혼합물로서, 질병 또는 질병 병태를 확인하거나 질병 또는 질병의 진행을 예측하기 위하여 하나 이상의 분석물 또는 마커를 측정/검출하는 데에 사용될 수 있다. 특히, 상기 키트는 적어도 검출 분자 및/또는 결합제를 포함하며, 여기서 검출 분자 및/또는 결합제는 분석물 또는 마커, 또는 상기 분석물 또는 마커의 반응 산물을 특이적으로 인식한다. 나아가, 다양한 시약 또는 도구가 상기 키트에 포함될 수 있다. 상기 진단 키트는 대상 방법을 수행하기 위한 임의의 유용한 시약, 예를 들어 마이크로비드 또는 평면 어레이 또는 웰과 같은 기질, 바이오마커 분리를 위한 시약, 특정 표적에 대한 검출 분자, 핵산 서열분석 및 증폭을 위한 프라이머와 같은 시약, 핵산 혼성화 어레이, 검출 가능한 표지, 용매 또는 버퍼 등, 다양한 링커, 다양한 분석 성분, 차단제 등을 포함할 수 있다.
- [0372] 상기 키트는 또한 진단 방법에 사용되기 위한 지시사항을 포함할 수 있다. 상기 지시사항은, 예를 들어 키트에 포함된 장치, 예를 들어 마커를 확인하기 전 세포 및/또는 단백질 포함 층의 분리와 같이 진단 목적을 위한 생물학적 샘플을 준비를 위한 도구 또는 장치 상에 제공될 수 있다. 상기 키트는 보관에 안정적인 형태, 예를 들어 적어도 6개월의 저장 수명을 가지는 상업적인 키트로 편리하게 제공될 수 있다.
- [0373] 특정한 진단 키트는 또한, 검출 분자를 포함하거나 목적하는 마커에 대한 검출 분자의 고정된 패턴 어레이를 가지는, 바람직하게는 제1 마커에 대한 제1 결합 시약을 포함하는 제1 영역 및 제2 마커에 대한 제2 결합 시약을 포함하는 제2 영역을 포함하는 고체 지지체를 포함한다.
- [0374] 특히, 샌드위치 형태가 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 결합제는 생물학적 샘플과 접촉하기 전에 기질에 결합되어 있다. 상기 하나 이상의 결합제는 검출 분자로서 제공되는 검출 표지에 결합될 수 있다. 다른 실시양태에서, 상기 하나 이상의 결합제는 검출 표지에 결합할 수 있다. 이러한 배치에서, 상기 하나 이상의 결합제는 포획제로 제공되기 위하여 생물학적 샘플에 접촉하기 전에 기질에 결합할 수 있다. 나아가, 상기 하나 이상의 결합제는 생물학적 샘플에 접촉하기 전에 기질에 결합될 수 있고/있거나, 상기 하나 이상의 결합제는 검출 가능한 표지에 결합될 수 있다. 이러한 경우, 상기 하나 이상의 결합제는 포획제 또는 검출제 중 어느 하나 또는 모두의 역할을 수행할 수 있다.
- [0375] 상기 진단 키트는 특히 면역분석의 용도로 제공될 수 있는데, 여기서 검출 분자는 면역반응에 의해 분석물 또는 마커에 결합할 수 있는 특이적 결합제이다. 이러한 결합제는 표적 항원에 결합하는 항체 또는 항체 단편 또는 항체-유사 스캐폴드일 수 있다.
- [0376] 적합한 면역분석으로는 ELISA, CIA, RIA, IRMA, 응집 검사, 면역크로마토그래피, 덤스틱 분석 및 웨스턴-블롯 중 어느 것을 사용할 수 있다.
- [0377] "클렙시엘라 슈모니에 감염" 및 "클렙시엘라 슈모니에 균체 형성"라는 용어는 다음과 같이 이해될 수 있다: 클렙시엘라 슈모니에는 장내세균(*Enterobacteriaceae*) 과에 속하는 그람 음성균이다. 이는 아주 흔한 세균으로, 또한 인간 숙주에, 일반적으로는 장 또는 상기도에 대량 서식할 수 있다. 기회 감염성의 병원체로서, 면역 체계에 의해 적절히 제어되지 못하는 경우 상기 위치로부터 무균 신체 부위로 전파된다. 다른 무균 부위에서의 제어되지 않는 세균 복제는, 클렙시엘라 슈모니에로부터 분비된 내독소 (즉, LPS) 분자에 의해 주로 매개되는 감염을 유도한다. 균혈증의 경우, 내독소 분자는 패혈 쇼크를 유발할 수도 있다.
- [0378] 클렙시엘라 슈모니에 균체 형성은 개체가 검출될 수 있을 정도로 충분히 높은 농도의 클렙시엘라 슈모니에 세균을 부위에 갖고 있으나, 상기 세균이 어떠한 신호 또는 증상을 유발하지 않은 경우를 의미한다. 균체 형성은 장기간 동안 지속될 수 있으며, 유기체에 대한 면역 반응, 다른 유기체로부터의 부위에서의 경쟁, 및 때때로 항균제의 사용에 의해 그 해결책이 영향을 받는다.
- [0379] 일반적으로, 클렙시엘라 슈모니에에 의해 유발된 균혈증은 항생제, 스테로이드, 비-스테로이드성 염증 억제제와 같은 알려진 종래의 항균 치료법에 의해 성공적으로 치료될 수 있다. 본 발명은 클렙시엘라 슈모니에를 특이적으로 인식하는 항체를 이용하는, 새로운 면역 치료법을 제공하며, 이는 선택적으로 항-균 또는 항-염 치료법과 병행하여 사용될 수 있다. 클렙시엘라 슈모니에 감염 환자의 치료에 사용될 수 있는 예시적인 항생제로는 아미

노글리코시드, 세팔로스포린, 아미노페니실린, 카바페넴, 플루오로퀴놀론, 티게사이클린, 폴리스틴 등이 있다.

- [0380] 다중-약물 내성 (MDR) 클렙시엘라 슈모니에는 특히 하기의 작용제/그룹과 같은 항생제 중 3개 부류 이상에 내성을 나타내는 균주로 이해된다: 페니실린, 세팔로스포린, 카바페넴, 아미노글리코시드, 테트라사이클린, 플루오로퀴놀론, 니트로푸란토인, 트리메토프림 (및 그의 조합), 포스포마이신, 폴리믹신, 클로람페니콜, 아스트레오남, 또는 티게사이클린.
- [0381] 최근 등장한 항생제-내성 균주와 함께, 이러한 특성을 갖는 균혈증을 치료하는 것이 점점 현저히 어려워지고 있다. MDR 클렙시엘라 슈모니에 질병 환자는, 클렙시엘라 슈모니에 질병이 아닌 환자에 비해, 병원 및 중환자실에서 오래 치료를 받아야 하며, 사망율이 높고 의료비 부담이 크다. 환자의 치료는 개선될 수 있고, 환자가 MDR 클렙시엘라 슈모니에에 의한 심한 균체 형성을 나타내는 경우, 병원내 감염은 치료 보다는 클렙시엘라 슈모니에 질병 예방에 의해 감소될 수 있다.
- [0382] 클렙시엘라 슈모니에 질병은 특히 클렙시엘라 슈모니에 감염에 의해 유발되는 질병으로 이해된다. 이러한 질병은 국소 및 전신 질병을 포함한다. 이러한 질병의 심각한 예로는 1차 및 2차 세균혈증, 폐렴, 요로 감염, 간 농양, 복막염, 또는 뇌수막염이 있다.
- [0383] 여기서 사용되는 것과 같은 "재조합"이라는 용어는 "유전 공학에 의해 또는 그 결과로서 제조되는"을 의미한다. 재조합 숙주는 구체적으로 발현 벡터 또는 클로닝 벡터를 포함하거나, 또는 특히 상기 숙주에 대해 외래인 뉴클레오타이드 서열을 사용하는 재조합 핵산 서열을 함유하도록 유전자 조작된 것이다. 재조합 단백질은 숙주에서 각각의 재조합 핵산을 발현시킴으로써 제조된다. 여기서 사용되는 것과 같은 "재조합 항체"라는 용어는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 분리된 항체, 예를 들어 (a) 인간 면역글로불린 유전자 또는 그로부터 제조된 하이브리도마로 유전자 이식되거나 염색체 이식된 동물(예: 마우스)로부터 분리된 항체, (b) 상기 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어 형질주입종으로부터 분리된 항체, (c) 재조합, 조합성 인간 항체 라이브러리 또는 항체의 항원-결합 서열 라이브러리로부터 분리된 항체, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 분리된 항체를 포함한다. 상기와 같은 재조합 항체는 예를 들어 항체 성숙 중에 발생하는 재배열 및 돌연변이를 포함하도록 조작된 항체들을 포함한다. 본 발명에 부합되도록, 당해 업계에서 사용되는 종래 분자생물학, 미생물학, 및 재조합 DNA 기술이 사용될 수 있다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 기술되어 있다. 예를 들어 문헌 [Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1982)]을 참고할 수 있다.
- [0384] 선택적 결합은 당해 분야에 공지된 재조합 항체 최적화 방법에 의해 추가로 개선될 수 있다. 예를 들어, 여기서 개시된 면역글로불린쇄의 가변 영역 중 일부 영역에, 경쇄 서플링, 목적 돌연변이유발, CDR 융합, 및 선택된 CDR 및/또는 프레임워크 영역의 유도된 돌연변이유발을 포함하는 하나 이상의 최적화 전략을 가할 수 있다.
- [0385] 여기서 사용되는 것과 같은 "개체"라는 용어는 온혈 포유동물, 특히 인간 또는 비-인간 동물을 지칭할 것이다. 클렙시엘라 슈모니에는 최근 동물용 약품에도 관계가 깊은, 매우 중요한 인간 병원체이다. 이는 다양한 비-인간 동물 중에도 존재한다. 따라서, "개체"라는 용어는 특히 개, 고양이, 토끼, 말, 소, 돼지, 가금류를 포함하는 동물도 지칭할 수 있다. 특히, 본 발명의 치료 용도 또는 각 치료 방법은 클렙시엘라 슈모니에 감염과 관련된 질병 조건의 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체에 적용된다. 상기 개체는 클렙시엘라 슈모니에 감염의 위험이 있거나, 초기 또는 말기 질병을 포함하여 질병을 앓고 있는 환자일 수 있다. 상기 "환자"라는 용어는 예방적 또는 치료적 처리를 받는 인간 및 다른 포유동물 개체를 포함한다. 따라서 "치료"라는 용어는 예방적 및 치료적 처리를 모두 포함하는 것을 의미한다.
- [0386] 개체는, 예를 들어 클렙시엘라 슈모니에 질병 병태의 예방 또는 치료를 위해 처리된다. 특히, 감염 또는 상기와 같은 질병의 발생 또는 질병 재발의 위험이 있는 개체, 또는 상기와 같은 감염 및/또는 상기와 같은 감염과 관련된 질병을 앓고 있는 개체가 치료된다.
- [0387] 구체적으로, "예방"이라는 용어는 발병의 개시의 방지를 포함하고자 하는 예방적 수단 또는 발병의 위험을 감소시키기 위한 예방적 수단을 지칭한다.
- [0388] 구체적으로, 상기 치료는 상기 상태의 원인 인자로서 클렙시엘라 슈모니에의 병인을 방해함에 의한 것일 수 있다.
- [0389] 여기서 사용되는 것과 같은 "실질적으로 순수한" 또는 "정제된"이라는 용어는 화합물, 예를 들어 핵산 분자 또는 항체의 적어도 50%(w/w), 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%를 포함하는 제제를 지칭할 것이다.

다. 순도를 상기 화합물에 적합한 방법들 (예: 크로마토그래피 방법, 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, HPLC 분석 등)에 의해 측정한다.

- [0390] 화합물, 예를 들어 본 발명의 항체의 "유효량" 또는 "충분량"라는 용어 중 어느 것에도 호환될 수 있는 여기서 사용되는 "치료적으로 유효한 양"이라는 단어는 개체에 투여될 때, 임상결과를 포함하여 이로온 또는 목적하는 결과를 발생시키기에 충분한 양 또는 활성을 의미하며, 이와 같은 유효량 또는 그의 동의어는 적용되는 문맥에 따라 사용된다.
- [0391] 유효량은 상기 질병 또는 이상을 치료, 예방 또는 저해하기에 충분한 화합물의 양을 의미하는 것으로 의도된다. 질병과 관련하여, 여기서 기술되는 상기 항체의 치료적으로 유효한 양은 예를 들어 점막 표면에서의 부착 및 군체 형성, 무균 신체 부위에서의 제어되지 않은 복제, 및 세균 산물에 의한 숙주 세포의 독성과 같은 클렙시엘라 슈모니에 질병 발생을 저해하는 것이 유리한 질병 또는 상태를 치료하거나, 조절하거나, 약화시키거나, 역전시키거나, 또는 그에 영향을 미치는데 특히 사용된다.
- [0392] 상기와 같은 유효량에 상응하는 화합물의 양은 다양한 인자들, 예를 들어 정해진 약물 또는 화합물, 약학 제형, 투여 경로, 질병 또는 이상의 유형, 치료되는 개체 또는 숙주의 정제 등에 따라 변할 것이나, 그럼에도 불구하고 상기 양은 당업자에 의해 관례적으로 결정될 수 있다.
- [0393] 항체가 필요한 인간 환자에게 제공된 것과 같은, 여기서 기술되는 것과 같은 항체의 치료적으로 유효한 양은 구체적으로 0.5 내지 50 mg/kg, 바람직하게는 5 내지 40 mg/kg, 훨씬 더 바람직하게는 20 mg/kg 이하, 10 mg/kg 이하, 5 mg/kg 이하의 범위일 수 있으나, 예를 들어 급성 질병 병태의 치료를 위해서 더 높은 용량이 지시될 수도 있다. 상기 용량은 보다 높은 효능의 항체가 사용되는 경우 더 낮아질 수 있다. 이러한 경우, 유효량은 0.005 내지 5 mg/kg, 바람직하게는 0.05 내지 1 mg/kg 범위일 수 있다.
- [0394] 나아가, 치료적으로 유효한 양의 본 발명의 항체에 의한 개체의 치료 또는 예방 복용법은 단일 투여로 이루어지거나, 또는 일련의 적용을 포함할 수도 있다. 예를 들어, 상기 항체를 적어도 1년에 1회, 적어도 반년에 1회, 또는 적어도 1개월에 1회 투여할 수 있다. 그러나, 다른 실시태양에서, 상기 항체를 상기 개체에게, 제공된 치료를 위해 주당 약 1회 내지 대략 매일 투여할 수 있다. 상기 치료 기간의 길이는 다양한 인자들, 예를 들어 질병의 중증도, 급성 또는 만성 질병 여부, 환자의 연령, 항체 형태의 농도 및 활성에 의존하여 조절될 수 있다. 상기 치료 또는 예방에 사용되는 유효 투여량을 특정한 치료 또는 예방의 복용 과정 동안 증가시키거나 감소시킬 수도 있다는 것 또한 인식될 수 있을 것이다. 투여량의 변화가 나타날 수 있으며, 이는 당해 분야에 공지된 표준 진단 분석에 의해 명백해질 수 있다. 일부의 경우에, 만성 투여가 요구될 수도 있다.
- [0395] gal-III 에 고도로 특이적인 단클론 항체(mAb)는 특히 ST258 계통에 속하는 MDR 균주의 확인을 위한 진단 시약으로서 큰 잠재력을 갖는다. 더욱이, 특히 인간화되는 경우, 상기 mAb는 ST258-gal-III 균주에 의해 유발된 클렙시엘라 슈모니에 감염의 예방 (예를 들어 고 위험군의 경우) 및 치료에 사용하기에 적합하다.
- [0396] gal-III 및 gal-I 탄수화물 구조는 매우 유사하여 다른 항원이 아닌 것으로 생각되었다. MDR 클렙시엘라 슈모니에, ST258 균주에서 O-항원 합성의 유전적 배경은 충분히 밝혀지지 않았다. *rfb (wb)* 클러스터 (글리코실트랜스퍼라아제 (*gtr-s*)를 코딩하는)에 인접한 특정 유전자가 gal-III O-형 균주의 PCR 기반 확인의 토대를 형성한다는 것은 놀라운 것이다.
- [0397] O-항원 인자 갈락탄-I을 암호화하는 *rfb* 유전자 클러스터 내의 이종성에 대한 증거가 있다. 변이체 간에 발견되는 크기 차이는 *gtr* (글리코실트랜스퍼라아제)-유사 유전자를 포함하는 약 3-kb 단편의 존재 또는 부재로 인해 나타난 것이다. 변이체들을 서로 구별하기 위해 진행된 PCR 반응을 통해 모든 O1 및 O2 클렙시엘라 임상 단리물의 50% 이상, 및 모든 ST258 균주의 80% 이상이 *gtr*-유사 좌위를 가진다는 것이 밝혀졌다.
- [0398] 본 발명의 항체가 상기 gal-III 항원에 특이적으로 결합할 수 있음은 놀라웠다. *gtr+* O2 균주에 의한 마우스 면역이, *gtr* 좌위 (즉, 갈락탄-III 항원)에 의해 나타난 갈락탄-I 분자만을 인식하는 항-갈락탄 항체를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 상기 변형의 본질은, 앞서 혈청형 O2 (2a, 2f, 2g)의 반복 단위로 기술된 동일한 분지된 갈락탄 구조로 밝혀졌으나, 상기 구조는 항원적으로 상이한 것으로 밝혀졌다. 본 발명은 표준 하이브리도마 기술에 의해 생성된 갈락탄-III 특이적 mAb를 처음으로 제공한다. 상기 mAb가 살아있는 *gtr+* 클렙시엘라 단리물 (ST258 균주 포함)의 표면에 결합하는 능력이 관찰되었다. 갈락탄-III 특이적 mAb에 의한 보호 효능이 균혈증 및 내독소혈증 마우스 모델에서 나타난 것은 놀라웠다. 보호의 작용 기작으로 추정된 것은 내독소의 중화로, 이는 인비트로 기능 분석에서 확인되었다.
- [0399] MDR 클렙시엘라 균주에 의해 유발되는 감염의 예방 및 치료를 위한 치료적 단클론 항체를 개발하기 위하여, 특

정 mAb의 분자 표적으로 적합한 것은 LPS O-항원이며, 이는 클렙시엘라에서 제한된 이중성을 나타낸다. 이러한 O-측쇄는 별키한 캡슐 폴리사카라이드에 의해 완전히 가려지지 않기 때문에, 면역관련된 것으로 여겨진다.

- [0400] 일단 목적하는 결합 특성을 갖는 항체가 확인되면, 항체 단편을 포함한 상기와 같은 항체를 당해 분야에 주지된 방법들, 예를 들어 하이브리도마 기법 또는 재조합 DNA 기술에 의해 생성시킬 수 있다.
- [0401] 재조합 단클론 항체는, 예를 들어 필요한 항체쇄를 암호화하는 DNA를 단리하고, 주지된 재조합 발현 벡터, 예를 들어 상기 항체 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 본 발명의 플라스미드 또는 발현 카세트(들)를 사용하여 재조합 숙주 세포를 발현을 위한 암호화 서열로 형질감염시킴으로써 생성시킬 수 있다. 재조합 숙주 세포는 원핵생물 및 진핵생물 세포, 예를 들어 상술한 것들일 수 있다.
- [0402] 구체적인 태양에 따르면, 상기 뉴클레오타이드 서열을, 항체를 인간화시키거나 또는 상기 항체의 친화성 또는 항체의 다른 특성을 개선시키기 위한 유전자 조작에 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 항체가 인간의 임상 시험 및 치료에 사용되는 경우, 불변 영역을 인간 불변 영역에 보다 가깝게 닮도록 조작하여 면역 반응을 피할 수도 있다. 표적 gal-III에 대해 더 큰 친화성과 클렙시엘라 슈모나에, 특히 MDR 클론 ST258에 대해 보다 큰 효능을 획득하기 위해서, 상기 항체 서열을 유전자 조작하는 것이 바람직할 수도 있다. 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 변화가 상기 항체에 대해 이루어질 수 있고, 그렇다 하더라도 표적 gal-III에 대한 그의 결합 능력을 여전히 유지할 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.
- [0403] 다양한 수단에 의한 항체 분자의 생성은 일반적으로 충분히 이해되어 있다. 예를 들어 미국특허 제 6,331,415호 (Cabilly et al.)는 중쇄 및 경쇄가 단일 벡터 또는 단일 세포 중 2개의 별도의 벡터로부터 동시에 발현되는 항체의 재조합 생산 방법을 개시한다. Wibbenmeyer et al. (1999, Biochim Biophys Acta 1430(2):191-202) 및 Lee and Kwak (2003, J. Biotechnology 101:189-198)은 별도의 숙주 세포의 배양물에서 발현된 플라스미드를 사용하여, 별도로 생성된 중쇄 및 경쇄로부터 단클론 항체를 생산하는 방법을 개시한다. 항체의 생산에 관련된 다양한 다른 기법들이 예를 들어 문헌[Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)]에 제공된다.
- [0404] 원하는 경우, 본 발명의 항체, 예를 들어 도 1 또는 도 2의 항체 중 임의의 것을 서열분석할 수 있으며, 이후 발현 또는 증식을 위해 폴리뉴클레오타이드 서열을 벡터내에 클로닝할 수 있다. 상기 항체를 암호화하는 서열을 숙주 세포 내 벡터에 유지시킬 수 있으며, 이후 상기 숙주 세포를 확장시키고 추후의 용도를 위해 동결시킬 수 있다. 세포 배양물에서의 재조합 단클론 항체의 생산은 당해 분야에 공지된 수단에 의해 B 세포로부터의 항체 유전자를 클로닝하여 수행할 수 있다.
- [0405] 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명의 재조합 항체의 생성을 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한 다.
- [0406] 항체 암호화 핵산은 임의의 적합한 특성을 가질 수 있으며 임의의 적합한 특징들 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어 항체 암호화 핵산은 DNA, RNA 또는 그의 하이브리드 형태로 존재할 수 있으며, 비-천연 유래 염기, 변형된 주쇄, 예를 들어 상기 핵산의 안정성을 촉진하는 포스포로티오에이트 주쇄, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 상기 핵산을, 유리하게는 표적 숙주 세포(들)에서 목적하는 발현, 복제 및/또는 선택을 촉진하는 특징들을 포함하는 본 발명의 발현 카세트, 벡터 또는 플라스미드 내에 포함시킬 수 있다. 상기과 같은 특징의 예는 복제 성분의 기원, 선택 유전자 성분, 프로모터 성분, 인핸서 요소 성분, 폴리아데닐화 서열 성분, 종결 성분 등을 포함하며, 이에 대한 많은 적합한 예가 공지되어 있다.
- [0407] 본 명세서는 여기서 개시된 뉴클레오타이드 서열 중 하나 이상을 포함하는 재조합 DNA 구조물을 추가로 제공한다. 이들 재조합 구조물은 임의의 개시된 항체를 암호화하는 DNA 분자가 삽입되는 벡터, 예를 들어 플라스미드, 파지미드, 파지 또는 바이러스 벡터와 함께 사용된다.
- [0408] 단클론 항체는 배양물 내 세포주에 의해 항체 분자를 생성시키는 임의의 방법, 예를 들어 재조합 진핵생물 (포유류 또는 곤충) 또는 원핵생물 (세균) 숙주 세포를 배양하는 방법에 의해 생산된다. 단클론 항체의 제조에 적합한 방법들의 예로는 Kohler et al.의 하이브리도마 방법 (1975, Nature 256:495-497) 및 인간 B-세포 하이브리도마 방법 (Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001; 및 Brodeur et al., 1987, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 51-63)이 포함된다.
- [0409] 본 발명의 항체를 하이브리도마 방법을 사용하여 확인하거나 획득할 수 있다. 상기과 같은 방법에서, 마우스 또는 다른 적합한 숙주 동물, 예를 들어 햄스터를 면역시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 이끌어낸다. 또는, 림프구를 인비트로에서 면역시킬 수도 있다. 이후

림프구를 적합한 용합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시킨다.

- [0410] 하이브리도마 세포가 생육하는 배양 배지는, 항원에 대한 단클론 항체의 생산을 위하여 분석한다. 바람직하게, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 단클론 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해서 또는 인비트로 결합 분석, 예를 들어 방사성면역분석 (RIA) 또는 효소결합 면역흡수 분석(ELISA)에 의해서 확인한다.
- [0411] gal-III 항원의 특이적인 결합 및 가능하게는 gal-I 항원 대비 gal-III 항원에 우선적으로 결합하는 그의 차별적인 결합 친화성, 및 예를 들어 상이한 진단 또는 치료 목적을 위한 항체의 조작을 추가적으로 검사하기 위하여, 하이브리도마 상등액으로부터 mAb를 정제할 수 있다.
- [0412] 일부 예에서, gal-III 특이적 항체는 단일 gal-III 항원에 대한 선별을 통해 나타날 수 있다. 차별적으로 결합하는 클론을 단리할 가능성을 높이기 위하여, 상이한 항원들에 대한 향상된 선별에 의한 다중 선택압 (multiple selective pressure)을 적용할 것이다. 특별한 mAb 선정 전략으로, gal-III 및 gal-I 성분 또는 다른 클렙시엘라 슈모니에 항원을 교번 방식으로 사용한다.
- [0413] 목적하는 선택적인 결합 특성을 갖는 항체를 확인하기 위한 선별 방법은, 항체 서열 또는 그의 항원-결합 서열을 보여주는 라이브러리 (예: 파지, 세균, 효모 또는 포유동물 세포; 또는 핵산 정보를 각 (폴리)펩티드로 번역하는 인비트로 디스플레이 시스템을 사용함)를 이용한 디스플레이 기술에 의해 수행될 수 있다. 반응성은 ELISA, 웨스턴블롯, 또는 예를 들어 표준 분석을 사용하는 유세포 측정에 의한 표면 염색에 기초하여 평가할 수 있다.
- [0414] 단리된 항원(들)은 예를 들어 항체 라이브러리, 예를 들어 효모-디스플레이된 항체 라이브러리로부터 항체를 선택하는데 사용할 수 있다.
- [0415] 예를 들어, 본 발명은 구체적으로, 예를 들어 특수 발견 선택 계획에 의해 상기 gal-III 항원에 결합하는 특이성을 갖는 항체를 확인하는 과정에서 획득되는 gal-III 특이적 항체를 제공한다. 따라서, 상기 gal-III 표적에 반응성을 나타내는 항체를 포함하는 항체 라이브러리가 상기 표적에 대한 반응성을 위해 선택될 수 있다.
- [0416] 본 발명은 더욱이 여기서 개시된 것과 같은 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 이들 약학 조성물을 본 발명에 따라 일시 주사 또는 투입으로서 또는 연속 투입에 의해 투여할 수 있다. 상기와 같은 투여 수단을 가능하게 하는데 적합한 약학 담체는 당해 분야에 주지되어 있다.
- [0417] 약학적으로 허용 가능한 담체는 일반적으로 본 발명에 의해 제공되는 항체 또는 관련 조성물 또는 조합과 생리적으로 함께 사용될 수 있는 임의의 모든 적합한 용매, 분산 매질, 코팅제, 향균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적으로 허용 가능한 담체의 추가의 예로는 멸균수, 식염수, 포스페이트 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등뿐만 아니라 이들의 조합이 포함된다.
- [0418] 하나의 상기와 같은 태양에서, 항체는 목적하는 투여 경로에 적합한 하나 이상의 담체와 병용할 수 있으며, 항체를 예를 들어 락토오스, 슈크로스, 전분, 알칸산의 셀룰로스 에스테르, 스테아르산, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 마그네슘 옥사이드, 인산 및 황산의 나트륨 및 칼슘염, 황산, 아카시아, 젤라틴, 소듐 알기네이트, 폴리비닐피롤리딘, 폴리비닐 알콜 중 임의의 것과 혼합할 수 있고, 선택적으로는 통상적인 투여를 위해 추가로 정제 또는 캡슐로 제형화될 수 있다. 또는, 항체는 식염수, 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 카복시메틸 셀룰로스 콜로이드 용액, 에탄올, 옥수수유, 땅콩유, 면실유, 참깨유, 트라가칸트검, 및/또는 다양한 버퍼에 용해될 수 있다. 다른 담체, 항원보강제, 및 투여 방식들은 약학 분야에 주지되어 있다. 담체는 제어된 방출 물질 또는 시간 지연 물질, 예를 들어 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트를 단독으로, 또는 왁스 또는 당해 분야에 주지된 다른 물질들과 함께 포함할 수 있다.
- [0419] 추가의 약학적으로 허용 가능한 담체는 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES]에 개시되어 있다. 액체 제형은 용액, 유화액 또는 현탁액일 수 있으며, 부형제, 예를 들어 현탁제, 용해제, 계면활성제, 보존제 및 킬레이트제를 포함할 수 있다.
- [0420] 본 발명의 항체 및 하나 이상의 치료 활성제가 제형화된 약학 조성물이 고려된다. 목적하는 정도의 순도를 갖는 상기 면역글로불린을 임의의 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정제와 함께, 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 혼합함으로써, 본 발명의 항체의 안정한 제형을 보관용으로 제조한다. 인비보 투여용으로 사용되는 상기 제형은 구체적으로 무균성, 바람직하게는 무균성 수용액 형태이다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과 또는 다른 방법에 의해 용이하게 수행된다. 여기서 개시된 상기 항체 및 다른 치료 활성제를 또한 면역리포솜으로

서 제형화하고/하거나 미세캡슐 중에 포집할 수 있다.

[0421] 본 발명의 향체를 포함하는 약학 조성물의 투여를 다양한 방식으로, 예를 들어 경구, 피하, 정맥내, 비내, 귀내, 피내, 점막, 국소, 예를 들어 젤, 연고, 로션, 크림 등, 복강내, 근육내, 폐내, 예를 들어 흡입 기술 또는 폐 전달 시스템을 사용하여, 질내, 비경구, 직장내 또는 안대로 수행할 수 있다.

[0422] 비경구 투여용으로 사용할 수 있는 예시적인 제형은, 예를 들어 무균 용액, 유화액 또는 현탁액으로서 피하, 근육내 또는 정맥내 주사에 적합한 것들을 포함한다.

[0423] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 예를 들어 질병 변형 또는 예방 단독요법으로서 개체에 투여되는 유일한 치료 활성제이다.

[0424] 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 항체는 클렙시엘라 슈모니에, 특히 ST258 계통에 속하는 MDR 균주를 표적하기 위하여 추가의 항체와 혼합물 또는 부품 키트가 혼합된 캅테일로 병용하며, 이에 따라 캅테일은 예를 들어 질병 변경 또는 예방 복합 요법으로서 개체에 투여되는 하나 이상의 치료 활성제를 포함한다.

[0425] 더욱이, 본 발명의 항체는 하나 이상의 다른 치료제 또는 예방제, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니나 표준 치료, 예를 들어 항생제, 스테로이드 및 비-스테로이드성 염증 억제제, 및/또는 예를 들어 항균 또는 항염제를 사용하는 다른 항체 기반 요법과 함께 투여될 수 있다.

[0426] 복합 요법은 특히, 예를 들어 클렙시엘라 슈모니에, 특히 MDR 균주 ST258 감염의 치료에 사용되는 것과 같은 표준 복용법을 사용한다. 이는 항생제, 예를 들어 티게사이클린, 콜리스틴, 폴리믹신 B, 및 비-베타 락탐 저해제와 조합된 베타 락탐을 포함할 수 있다.

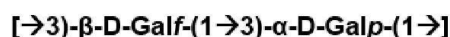
[0427] 복합 요법에서, 상기 항체를 혼합물로서, 또는 하나 이상의 다른 치료 복용법과 동반하여, 예를 들어 동반 요법 전에, 상기 요법과 동시에, 또는 상기 요법 후에 투여할 수 있다.

[0428] 본 발명의 항체 또는 각 약학 제제의 생물학적 특성들은 생체의 세포, 조직 및 완전 유기체 실험에서 특징지어질 수 있다. 당해 분야에 공지된 것과 같이, 질병 또는 질병 모델에 대한 약물의 치료 효능을 측정하거나 또는 약물의 약동학, 약역학, 독성 및 다른 특성들을 측정하기 위해서, 약물을 흔히, 동물, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니나 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 돼지 및 원숭이에서 인비보 검사한다. 상기 동물을 질병 모델로서 지칭할 수도 있다. 치료법을 흔히 마우스, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니나 누드 마우스, SCID 마우스, 이종이식 마우스 및 유전자이식된 마우스 (녹인 및 녹아웃 포함)에서 시험한다. 상기와 같은 실험은 적합한 반감기, 효과기 기능, (교차-) 중화 활성 및/또는 능동 또는 수동 면역요법에 대한 면역 반응을 갖는 치료제 또는 예방제로서 사용되는 상기 항체의 가능성을 확인하는데 의미있는 데이터를 제공할 수 있다. 임의의 유기체, 바람직하게는 포유동물을 검사에 사용할 수 있다. 예를 들어 인간과의 유전적 유사성으로 인해 영장류인 원숭이가 적합한 치료 모델일 수 있으며, 따라서 대상 물질 또는 조성물의 효능, 독성, 약동학, 약물역학, 반감기 또는 다른 특성을 시험하는데 사용될 수 있다. 약물로서의 승인을 위해서는 최종적으로 인간에서의 시험이 요구되며, 따라서 물론 상기 실험이 고려된다. 따라서, 본 발명의 항체 및 각 약학 조성물을 인간에서 시험하여 이들의 치료학적 또는 예방학적 효능, 독성, 면역원성, 약동학, 및/또는 다른 임상적 특성을 확인할 수 있다.

[0429] 하기 항들의 요지는 본 발명의 실시태양들로 간주된다:

[0430] 1. 클렙시엘라 슈모니애 (*Klebsiella pneumoniae*)의 리포폴리사카라이드(LPS) O-항원 구조의 갈락탄-III 에피토프를 특이적으로 인식하며, 상기 에피토프는 갈락탄-III 반복 단위에 포함되고, 갈락탄-III 반복 단위는 하기 화학식 I의 분지된 갈락토오스 동중중합체인 것인, 단리된 항체:

[0431] [화학식 1]



[0432]

[0433] 2. 1항의 항체로, 갈락탄-I 에피토프에 비하여 상대적으로 갈락탄-III 에피토프에 우선적으로 결합하거나, 또는 갈락탄-I 에피토프와 교차 반응하지 않는 항체로, 상기 갈락탄-I 에피토프는 클렙시엘라 슈모니애의 LPS 02a-항

원 구조의 갈락탄-I 반복 단위에 포함되고, 상기 갈락탄-I 반복 단위는 하기 화학식 II의 선형 갈락토오스 동중 중합체인, 항체:

[0434] [화학식 2]

[0435] **[→3)-β-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→]**

[0436] 3. 1항 또는 2항의 항체로, 상기 갈락탄-III 에피토프는 다중-약물 내성 (MDR) 클렙시엘라 슈모니에, 구체적으로 MDR 클론 ST258의 것인, 항체.

[0437] 4. 1항 내지 3항 중 어느 한 항의 항체로, 갈락탄-III 에피토프에 10^{-7} M 미만, 바람직하게는 10^{-8} M 미만, 더욱 바람직하게는 10^{-9} M 미만의 Kd 값으로 결합하는 친화성을 가지는, 항체.

[0438] 5. 1항 내지 4항 중 어느 한 항의 항체로, 갈락탄-III 에피토프를 발현하는 클렙시엘라 슈모니에 균주의 내독소를 중화시키는, 항체.

[0439] 6. 1항 내지 5항 중 어느 한 항의 항체로, 갈락탄-III 에피토프를 발현하는 클렙시엘라 슈모니에 균주의 내독소를 중화시키며, 상기 중화능은 적어도 레퍼런스 항체의 중화능이고, 카밧의 명명법에 따라

[0440] a) 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

[0441] b) 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

[0442] c) 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3; 및

[0443] d) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및

[0444] e) 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및

[0445] f) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6

[0446] 을 포함하는, 항체.

[0447] 7. 5항 또는 6항의 항체로, 상기 균주는 *gtr* 유전자를 포함하는 *rfb*_{gal-I} 좌위를 특징으로 하는, 항체.

[0448] 8. 5항 내지 7항 중 어느 한 항의 항체로, MDR 클렙시엘라 슈모니에 클론 ST258을 인식하는, 항체.

[0449] 9. 1항 내지 8항 중 어느 한 항의 항체로, 전장 단클론 항체, 항원 결합 부위를 포함하는 적어도 하나의 항체 도메인을 포함하는 그의 항체 단편, 또는 항원 결합 부위를 포함하는 적어도 하나의 항체 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 구체적으로는 상기 항체는 무작위의 또는 인공적인 아미노산 서열을 포함하는 비-천연 유래 항체인, 항체.

[0450] 10. 1항 내지 9항 중 어느 한 항의 항체로, 인간, 인간화된, 키메라 또는 쥐 기원인, 항체.

[0451] 11. 1항 내지 10항 중 어느 한 항의 항체로, 단클론 항체인, 항체.

[0452] 12. 1항 내지 11항 중 어느 한 항의 항체로, 적어도 하나의 항체 중쇄 가변 영역 (VH)를 포함하며, 카밧의 넘버링 시스템에 따라 표기된 표 1에 나열된 CDR1 내지 CDR3 서열 중 어느 것, 또는 그의 기능 활성 CDR 변이체로 특징되는, 항체.

[0453] 13. 12항의 항체로,

[0454] A) 하기의 그룹 구성원 i) 내지 iv)로 이루어지는 그룹에서 선택되거나:

[0455] i) a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

[0456] b) 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

[0457] c) 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3

[0458] 을 포함하는 항체;

[0459] ii) a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및

[0460] b) 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및

- [0461] c) 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3
- [0462] 을 포함하는 항체;
- [0463] iii) a) 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및
- [0464] b) 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및
- [0465] c) 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3
- [0466] 을 포함하는 항체;
- [0467] iv) a) 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1; 및
- [0468] b) 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2; 및
- [0469] c) 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3
- [0470] 을 포함하는 항체; 또는
- [0471] B) A)의 그룹 구성원들 중 임의의 것인 모 항체의 기능 활성 변이체로, 모 항체의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 중 어느 기능 활성 CDR 변이체를 적어도 하나 포함하는 항체.
- [0472] 14. 12항 또는 13항의 항체로, 도 2에 도시된 VH 서열 중에서 선택되는 VH 아미노산 서열을 포함하는, 항체.
- [0473] 15. 12항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체로, 카바트의 넘버링 시스템에 따라 표시되는 표 1에 나열된 CDR4 내지 CDR6 서열 중 어느 것, 또는 그의 기능 활성 CDR 변이체로 특징되는, 항체 경쇄 가변 영역 (VL)을 추가로 포함하는, 항체.
- [0474] 16. 15항의 항체로,
- [0475] A) 하기의 그룹 구성원 i) 내지 iv)로 이루어지는 그룹 중에서 선택되거나:
- [0476] i) a) 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및
- [0477] b) 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및
- [0478] c) 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6
- [0479] 을 포함하는 항체;
- [0480] ii) a) 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및
- [0481] b) 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및
- [0482] c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6
- [0483] 을 포함하는 항체;
- [0484] iii) a) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및
- [0485] b) 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및
- [0486] c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6
- [0487] 을 포함하는 항체;
- [0488] iv) a) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR4; 및
- [0489] b) 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR5; 및
- [0490] c) 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR6
- [0491] 을 포함하는 항체; 또는
- [0492] B) A)의 그룹 구성원들 중 임의의 것인 모 항체의 기능 활성 변이체로, 모 항체의 CDR4, CDR5 또는 CDR6 중 어느 기능 활성 CDR 변이체를 적어도 하나 포함하는 항체.
- [0493] 17. 16항의 항체로, 도 2에 도시된 VL 서열 중에서 선택되는 VL 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

- [0494] 18. 12항 내지 17항 중 어느 한 항의 항체로,
- [0495] a) 표 1에 나열된 임의의 항체의 CDR1 내지 CDR6 서열; 또는
- [0496] b) 도 2에 도시된 임의의 항체의 VH 서열 및 VL 서열
- [0497] 을 포함하거나; 또는
- [0498] c) 상기 a) 내지 c) 서열로 특징되는 모 항체의 기능 활성 변이체로서,
- [0499] 바람직하게는,
- [0500] i. 상기 기능 활성 변이체가 상기 모 항체의 CDR1 내지 CDR6 중 어느 기능 활성 CDR 변이체를 적어도 하나 포함하고/하거나;
- [0501] ii. 상기 기능 활성 변이체가 상기 VH 서열 및 VL 서열 중 어느 프레임워크 영역 중에 적어도 하나의 점 돌연변이를 포함하고,
- [0502] 추가로,
- [0503] iii. 상기 기능 활성 변이체가 상기 모 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 특이성을 갖고/갖거나;
- [0504] iv. 상기 기능 활성 변이체가 상기 모 항체의 인간, 인간화된, 키메라 또는 쥐 및/또는 친화성 성숙된 변이체인, 항체.
- [0505] 19. 1항 내지 18항 중 어느 한 항의 항체로, 표 1에 나열된 CDR 서열 중 어느 것의 기능 활성 CDR 변이체를 포함하며, 상기 기능 활성 CDR 변이체는
- [0506] a) 모 CDR 서열 중에 1, 2 또는 3개의 점 돌연변이; 및/또는
- [0507] b) 상기 모 CDR 서열의 4개의 C-말단 또는 4개의 N-말단, 또는 4개의 중심 아미노산 위치 중 어느 곳에 1개 또는 2개의 점 돌연변이; 및/또는
- [0508] c) 상기 모 CDR 서열과 적어도 60%의 서열 동일성;
- [0509] 중 적어도 하나를 포함하고;
- [0510] 바람직하게는 상기 기능적 활성 CDR 변이체가 4 또는 5개 미만의 아미노산으로 이루어지는 임의의 CDR 서열 중에 1 또는 2개의 점 돌연변이를 포함하는, 항체.
- [0511] 20. 1항 내지 19항 중 어느 한 항의 항체로, 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 균체 형성의 위험이 있거나 또는 상기 감염을 앓고 있는 개체에, 상기 감염을 제한하거나 또는 상기 감염으로부터 초래되는 질병 병태를 개선시키기에 유효한 양의 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체의 치료에 사용하기 위한, 바람직하게는 1차 및 2차 세균혈증, 폐렴, 요로 감염, 간 농양, 복막염, 또는 뇌수막염의 치료 또는 예방을 위한, 항체.
- [0512] 21. 1항 내지 19항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, 바람직하게는 비경구 또는 점막 제형을 포함하고, 선택적으로 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약학 제제.
- [0513] 22. 개체에서 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 균체 형성, 또는 1차 및 2차 세균혈증, 폐렴, 요로 감염, 간 농양, 복막염, 또는 뇌수막염과 같은 관련 질병을 진단하기 위한, 1항 내지 19항 중 어느 한 항의 항체의 용도.
- [0514] 23. 22항의 용도로, 상기 개체는 면역저하 또는 면역억제된 환자, 또는 그의 접촉자인, 용도.
- [0515] 24. 조성물 또는 부품 키트 중에 1항 내지 19항 중 어느 한 항의 항체 및 추가적인 진단 시약을 포함하며,
- [0516] a) 상기 항체; 및
- [0517] b) 상기 추가적인 진단 시약;
- [0518] 그리고 선택적으로
- [0519] c) 상기 항체 및 진단 시약 중 적어도 하나를 고정시키는 고체상
- [0520] 의 성분들을 포함하는, 진단 제제;
- [0521] 25. 24항의 진단 제제로, 상기 추가적인 진단 시약은, 그의 항원에 결합한 상기 항체 및/또는 항체의 반응 산물

에 특이적으로 반응하는 진단 표지 또는 시약인, 진단 제제.

- [0522] 26. a) 1항 내지 19항 중 어느 한 항에 따른 항체를 제공하는 단계, 및
- [0523] b) 상기 항체가 검사하려는 개체의 생물학적 샘플 중의 갈락탄-III 에피토프와 특이적으로 면역반응 하는지를 검출함으로써, 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 군체 형성을 진단하는 단계를 포함하는,
- [0524] 개체에서 클렙시엘라 슈모니에 군주에 의해 유발되는 클렙시엘라 슈모니에 감염 또는 군체 형성에 대한 진단 방법.
- [0525] 27. 26항의 방법으로, 상기 생물학적 샘플은 체액 또는 조직 샘플, 바람직하게는 혈액 샘플, 대변 샘플, 피부 샘플, 뇨 샘플, 뇌척수액 샘플, 및 기관내 흡인물, 흉수액, 폐천자물, 코 면봉 채취물 또는 객담과 같은 기도 시료로 이루어지는 군에서 선택되는 샘플, 또는 상기에서 유래되는 클렙시엘라 슈모니에 단리물인, 방법.
- [0526] 28. 1항 내지 19항 중 어느 한 항의 항체를 암호화하는, 단리된 핵산.
- [0527] 29. 1항 내지 19항 중 어느 한 항의 항체의 VH 및/또는 VL을 포함하는 단백질 컨스트럭트 또는 단백질을 발현하는 암호화 서열을 포함하는, 발현 카세트 또는 플라스미드.
- [0528] 30. 29항의 발현 카세트 또는 플라스미드를 포함하는, 숙주 세포.
- [0529] 31. 1항 내지 19항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법으로, 30항의 숙주 세포를 상기 항체를 제조하는 조건에서 배양하거나 유지시키는 방법.
- [0530] 32. a) 항체 또는 항체-생산 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및
- [0531] b) 상기 샘플 내에서 또는 샘플에 의해 제조된 항체와, 1항에서 정의된 갈락탄-III 에피토프와의 결합을 평가하여, 상기 항체와 상기 에피토프 간의 양성 반응이 있는 경우 상기 항체를 후보 항체로 확인하는 단계를 포함하는,
- [0532] 후보 항체의 확인 방법.
- [0533] 33. a) 항체 또는 항체-생산 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및
- [0534] b) 상기 샘플 내에서 또는 샘플에 의해 제조된 항체와, 1항에서 정의된 갈락탄-III 에피토프와의 결합을 평가하여, 갈락탄-I 에피토프 대비 갈락탄-III 에피토프와 상기 항체와 특이적 양성 반응이 있는 경우 상기 항체를 후보 항체로 확인하는 단계를 포함하는,
- [0535] 후보 항체의 확인 방법.
- [0536] 34. a) 32항 또는 33항에서 확인되는 항체를 제공하는 단계, 및
- [0537] b) 후보 항체와 동일한 에피토프 결합 특이성을 가지는, 상기 후보 항체의 단클론 항체, 또는 인간화된 또는 인간 형태, 또는 그의 유도체를 제조하는 단계를 포함하는,
- [0538] 1항 내지 19항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법.
- [0539] 본 발명은 하기 실시예들에 의해 추가적으로 설명될 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0540] 실시예
- [0541] 실시예 1: 신규한 갈락탄 구조의 유전적 배경의 확인:
- [0542] 갈락탄-I 특이적 *rfb* (*wb* 로도 알려짐) 클러스터에 대한 최초의 개시 (비특허문헌 3) 이후, 여러 개의 전체 게놈 서열을 이용할 수 있게 되었다. *rfb* 클러스터가 항상 2개의 보존된 유전자 (*uge* 및 *hisI*) 사이에 포함되어 있기 때문에, *rfb* 좌위의 정확한 크기가 확인될 수 있었다. 인 실리코 분석을 통해 *rfb* 오페론의 2개의 다른 길이가 밝혀졌다 (도 4A). 상기 서열의 구체적인 분석 결과 (도 4B)는 *rfb* 클러스터 내에 Clarke et al. (비특허문헌 3)에서 확인되지 않은 추가적인 유전자가 있음을 보여준다.
- [0543] 보다 짧은 전장 *rfb* 오페론은 Clarke et al.에 의해 기술된 것에 비해 약 2 kb 길며, 글리코실트랜스퍼라아제 패밀리 단백질로 추정된다고 알려진 추가적인 유전자를 포함한다. 상기 유전자는 긴 *rfb* 오페론 및 짧은 *rfb* 오페론과 상동성이 떨어진다. 상기 유전자가 없는 복제 클러스터도 갈락탄-I을 합성하는 것을 고려할 때, 상기 유전자는 갈락탄-I 발현에 불필요한 것으로 보인다.

[0544] *rfb* 좌위의 보다 긴 형태에는, 맞은 편 DNA 가닥 상에 하나의 오페론으로 구성되는 3개의 유전자를 포함하는 추가적인 3 kb 영역이 있다. 상기 유전자들은 장내 세균 (*Enterobacteriaceae*)에 속하는 다양한 균들에서 이동성 있는 유전적 요소에 의해 흔히 수반되는 글리코실트랜스퍼라아제 패밀리와 높은 서열 유사성을 보인다. 이와 같은 종류의 수평적으로 얻어진 글리코실트랜스퍼라아제는 혈청형-전환에 역할을 하고 (비특허문헌 6), 중간 그리고 종내 표현형 다양성을 증가시키는 것으로 생각된다. 흥미롭게도, 클렙시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*)의 경우, 동일한 *gtr* 클러스터가 *rfb* 클러스터와 연결되지 않은 염색체 부위에서 발견되었다 (미공개 발견). 따라서, 특정 클렙시엘라 슈모니에 균주가 클렙시엘라 옥시토카로부터 수평적 유전자 전달에 의해 이러한 클러스터를 얻은 것이 가능하다.

[0545] 보다 긴 *rfb* 좌위 (즉, *gtr* 유전자를 포함하는 좌위)를 갖는 O2 균주로부터 정제된 O-항원 서브유닛의 구조는, 갈락탄-I 구조와는 다른, 분지한 3개의 갈락토오스 반복 단위 형태를 보인다 (도 5). 이러한 구조는 일찍이 Kelly et al. (비특허문헌 5)에 의해 O2 (2a, 2f, 2g)으로 명명되는 O2의 아혈청형으로 확인되었다. 공 벡터 또는 벡터 내에 복제된 *gtr* 유전자가 전달-보충된 그의 염색체 상에 짧은 오페론을 가지는 O2 균주에 대한 구조적 분석 결과는, 1-4 결합에 분지한 갈락토오스를 첨가하는 것이 *gtr* 유전자에 의해 암호화됨을 증명한다 (하기 실시예 3 참조).

[0546] 이전에 발표된 것 (비특허문헌 5)과는 달리, 생화학적 분석은, 압도적인 대부분의 단위가 갈락탄-III임에도 불구하고 이러한 갈락탄-I 반복 단위의 변형이 완전히 화학량적이지 않음을 보여준다. 그럼에도 불구하고, 변형의 화학량은 발현 조절의 영향 하에서와 마찬가지로 균주 의존적일 수 있으며, 이에 따라 추가적인 연구가 필요하다.

[0547] 실시예 2: 갈락탄-III의 역할

[0548] 클렙시엘라 슈모니에의 임상 단리물 내의 *gtr*-유사 유전자를 *rfb* 클러스터 내에서 검출하기 위하여, 보존된 *wbbO* 유전자와 *hisI* 유전자 (도 4B 참조)를 결합시키는 프라이머를 설계하였다.

표 2

[0549] *gtr*⁺ 및 *gtr*⁻ 균주의 탐지에 사용된 프라이머

프라이머 이름	프라이머 서열 (5'-3')	해리온도(℃)	<i>gtr</i> ⁻ 오페론의 단편 크기(bp)	<i>gtr</i> ⁺ 오페론의 단편 크기(bp)
<i>wbbO</i> rev	TGTTGTGGAGTAAAGGACTGGGCG (서열번호 39)	65.8	2183	5020
<i>hisI</i>	ACCGCTTCGAGCTGAAGAATGAG (서열번호 40)	64		

[0550] *gtr*-유사 유전자 존재 하에서 상기 프라이머를 이용하여 클렙시엘라 슈모니에 O1, O2 및 O2ac 프로토타입 균주를 검사하였다. Wizard® 게놈 DNA 정제 키트 (Promega)를 이용하여 제조사의 지시사항에 따라 게놈 DNA를 균주로부터 정제하였다. PCR 반응은 20pmol의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머, 0.2μl의 정제된 gDNA를 혼합한 20μl 혼합물 내 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo)를 이용하여 설계하였다. PCR은 하기 프로그램을 이용하여 TProfessional TRIO Thermocycler (Biometra)로 수행하였다:

초기 변성	98℃	1 min
변성	98℃	30 sec
어닐링	64℃	30 sec
신장	72℃	3 min
최종 신장	72℃	5 min
주기	30 주기	

[0551]

[0552] 반응 혼합물을 1% 아가로오스 겔에 로딩시키고, GelRed™ (Biotium)으로 시각화한 후 이미지를 ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare)으로 얻었다 (도 6).

[0553] PCR 결과, *gtr*⁺ 및 *gtr*⁻ 단리물이 O1 및 O2 균주 모두에서 확인되었다. 임상 단리물 중 *gtr*⁺ 및 *gtr*⁻ 단리물의 빈도를 보다 확실히 하기 위하여, 선별된 45개의 O1, 47개의 O2 임상 단리물을 서로 다른 지질학적 기원으로부

터 선별하였다. 01 단리물에서는, 27개 (60%)의 *gtr*⁻ 과 18개 (40%)의 *gtr*⁺ 단리물이 분리되었고, 02 단리물에서는, 15개 (32%)의 *gtr*⁻ 과 32개 (68%)의 *gtr*⁺ 균주가 확인되었다.

[0554] 흥미롭게도, 다중-약물 내성인 KPC (클렙시엘라 슈모니에 카바페넴분해효소)을 생산하는 특유의 클론 ST258에 속하는 대부분의 균주가 갈락탄-III을 암호화하는 오펜 (즉, *gtr* 유전자를 포함하는 긴 *rfb*_{gal-I} 좌위)을 가지고 있음이 밝혀졌다. 27개의 ST258 단리물을 PCR로 분석하고, 추가적으로 데이터베이스에서 입수가능한 224개의 게놈 서열을 인실리코 분석하였다. 이들 전체 중 210개 (83.6%)의 균주는 *gtr* 유전자를 포함하는 온전한 *rfb* 오펜을 가지고 있었다 (즉, 갈락탄-III 항원을 발현할 것으로 기대됨). 남은 균주 중 대부분의 게놈은 적어도 *gtr* 유전자의 일부를 포함하였으나, 결실 또는 트랜스포존 삽입으로 인하여 온전한 갈락탄-III을 발현할 것으로 기대되지는 않는다.

[0555] 갈락탄-II 합성의 유전적 배경이 최근 알려짐에 따라 (비특허문헌 4), 01 및 02 균주는 유전자 서열분석에 의해 온전히 구별될 수 있다. 그러나, ST258 단리물 중 어느 것도 01 특이적 결정인자를 보유하고 있지 않았다. 나아가, 입수가능한 ST258 중 어느 것도 갈락탄-II 특이적 mAb에 반응하지 않았으며, 이는 상기 단리물들이 02 혈청형의 것임을 보여준다.

[0556] 상기 결과들은 클론 계통 ST258이 갈락탄-III의 발현과 매우 관련이 깊으며, 특히 대부분의 ST258 균주에서 갈락탄-III이 유일한 0-측쇄 결정인자임 (즉, 갈락탄-III 항원이 갈락탄-II에 의해 캡핑되지 않음)을 시사한다. 이는 갈락탄-III을 면역 기반 진단 및/또는 치료에 있어 훌륭한 표적으로 보이게 한다.

[0557] 실시예 3: 갈락탄-III 특이적 단클론 항체의 생성

[0558] *gtr*⁺ 02 (즉, 갈락탄-III을 발현하는) 균주로 면역된 마우스를 사용한 표준 하이브리도마 기술을 이용하여 마우스 단클론 항체(mAb)를 생성하였다. 갈락탄-III에 특이성을 보이는 4개의 mAb를 선택하였다. mAb의 결합이 갈락탄-I 분자의 *gtr*-매개 장치에 의해 영향을 받는지 여부를 확인하기 위하여, *gtr*⁺ 및 *gtr*⁻ 01 및 02 균주로부터 정제한 LPS 분자 패널을 면역블롯으로 검사하였다. 항체는 1 µg/ml 농도로 희석하였고, 항-마우스 IgG 2차 항체는 1:20,000으로 희석하였다.

[0559] 모든 4개의 mAb가 동일한 결합 패턴을 나타내었다. 하나의 대표적인 mAb (9H9-H7)에 의해 얻어진 결과를 도 7에 도시하였다. 하나의 균주(Kp67, 8열)를 제외하고 *gtr*⁺ 균주에서 얻어진 모든 0-항원은 강하게 염색된 반면, *gtr*⁻ LPS 분자 중 어느 것도 상기 mAb에 의해 인식되지 않았다 (다른 3개 또한 동일). Kp67 균주가 *gtr*-좌위에 PCR 양성으로 나타났음에도 불구하고, 가정적인 *gtr*-매개 변형에서 표현형적으로는 음성으로 나타났다. 이러한 반대 결과가 나타난 것은, 은 염색된 겔에서 거친 LPS 표현형 (즉, 검출되는 0-항원의 부족으로 인한)에 의해 시사되는 것과 같이 (데이터 미도시), 아마도 *rfb* 오펜 내 돌연변이 때문으로 보인다.

[0560] 상기 mAb의 특이성을 추가적으로 확인하기 위하여, 동종 유도체의 패널에서 면역 반응성을 검사하였다 (도 8). 예상된 것과 같이, 02 *gtr*⁻ 균주에서 추출된 LPS로의 결합이 잘 나타나지 않았다 (도 8의 2열). *gtr* 유전자를 수반하는 플라스미드로 보충된 경우, 강한 결합이 관찰되었다 (도 8의 5열 및 6열).

[0561] 실시예 4: 바이오층 간섭 측정 (Biolayer Interferometry, BLI)

[0562] 항체 결합 특성을 바이오층 간섭 측정 (BLI)을 통해 관찰하였다. 비오틴화 D-갈락탄-III 폴리사카라이드 항원 (02 *gtr*⁺ 클렙시엘라 슈모니에 균주로부터 정제된 것)을 스트렙트아비딘 센서에 고정시키고, 키메릭 mAb (10 µg/mL)가 미리 로딩된 센서에 결합하는지를 10분간 1% 소 혈청 알부민 (BSA) 및 0.05% Tween-20을 포함하는 DPBS에서 모니터링한 후, 동일한 버퍼로 세척하여(1시간) 항체 결합을 측정하였다. *K_d*, *k_{on}* 및 *k_{off}* 값은 Data Analysis 7 소프트웨어 (ForteBio, Pall Life Sciences)를 이용하여 확인하였다. 0.05 nm 미만의 반응 값은 음성 값으로 간주하였다. 상기 *K_d*, *k_{on}* 및 *k_{off}* 값을 표 3에 나타내었다. 모든 mAb는 정제된 항원에 대해 강한 아비드 결합을 보였고 (*K_d* 값은 0.1nM 내지 10nM), 유사한 *k_{on}* 값을 나타내었다 (*k_{on}* 최저치 및 최고치 간에는 3배의 차이만이 나타남). 반면, mAbs 5A4 및 9H9의 *k_{off}* 값은 2D8 및 8E3의 값에 비해 약 2자리수 낮게 나타났다. 음성 대조군 항원에는 어떠한 mAb의 결합도 관찰되지 않았다.

표 3

[0563]

D-갈락탄 III 특이적 키메릭 mAb의 K_d , k_{on} 및 k_{off} 값

mAb	K_d	k_{on}	k_{off}
2D8	1.12E-08	6.85E+04	7.66E-04
5A4	1.06E-10	9.19E+04	9.75E-06
9H9	3.40E-10	3.54E+04	1.20E-05
8E3	1.32E-08	6.29E+04	8.30E-04

[0564]

실시예 5: 클렙시엘라 세포의 표면 염색

[0565]

상이한 O-형을 가지는 클렙시엘라 여러 임상 단리물에 대한 하나의 대표적인 mAb (9H9-H7)의 표면 결합을 유세포 분석을 통해 검사하였다 (표 4).

[0566]

밤새 배양한 세균을 희석하고 중앙-로그 기 ($OD_{600}=0.5$)까지 배양한 후, PBS로 세척하여 표면 염색에 사용하였다. 2×10^6 개의 세균을 0.5% BSA 및 0.01% 소듐 아지드를 포함하는 PBS에 재현탁하고, 얼음에서 30분 동안 $40 \mu\text{g/mL}$ 농도로 mAb 9H9-H7으로 염색하였다. 샘플을 BSA 및 소듐 아지드를 포함하는 PBS-버퍼로 2번 세척하고, $4 \mu\text{g/mL}$ AlexaFluor 488-결합된 염소 항-마우스 IgG 2차 항체를 포함하는 PBS에 재현탁한 후, 30분 동안 얼음에서 배양하였다. 세척 후, 샘플을 5nM SYTO-62 염료를 포함하는 PBS에 재현탁하고, i-Cyt Eclipse 유세포 분석 전 10분 동안 얼음에서 인큐베이팅하였다.

[0567]

분석 결과 (표 4), 임상 *gtr+* 및 *gtr-* 균주에서 나타난 결과를 볼 때, 관찰된 mAb는 갈락탄-III에 대하여 특이성을 보였다 (즉, *gtr* 양성 균주).

표 4

[0568]

다른 *gtr* 상태를 갖는 01 및 02 균주의 갈락탄-III 특이적 mAb의 표면 염색

	균주	Sec.Ctrl	2D8-A10	5A4-A7	9H9-H7	8E3-E5
02 <i>gtr</i> -	Kp20	4.2	4.2	4.2	4.4	4.1
	Kp26	4.2	4.2	4.3	4.3	4.3
02 <i>gtr</i> +	#79	4.3	281.1	230.1	157.8	288.9
	Kp19	4.3	80.4	82.5	60.4	71.2

[0569]

각 수치는 형광 강도(FL-1)/1000 를 나타낸다.

[0570]

나아가, ST258 균주들에 대한 결합을 상기와 같은 유세포 분석을 통해 확인하였다 (표 5). 관찰한 균주 중 8/11 이 4개의 mAb 모두에 의해 강하게 염색되었고, 하나의 균주는 매끄럽지 않게 나타났으며, 나머지 2개의 균주는 분류되지 않는 LPS 구조를 나타내었다 (데이터 미도시). 이들 중 어느 균주도 갈락탄-II 특이적 mAb에는 반응하지 않았다 (상기 결과 참조).

표 5

[0571]

ST258 단리물의 갈락탄-III 특이적 mAb의 표면 염색

균주	Sec. ctrl	2D8-A10	5A4-A7	9H9-H7	8E3-E5
Kp30	171	32066	40815	36796	41652
Kp31	172	8720	10647	10797	16701
Kp32	202	4040	4077	4739	5940
Kp150	207	1616	2945	2249	2989
Kp151	198	29495	26435	28560	37665
Kp157	192	8344	9659	8849	10334
Kp159	210	202	207	202	201
Kp160	222	210	219	216	214
Kp161	213	2517	7644	5352	4304
Kp162	214	4366	8962	5891	4681

- [0572] 각 수치는 형광 강도(FL-1)를 나타낸다.
- [0573] 실시예 6: 상이한 갈락탄-III 특이적 mAb의 기능적 효능 비교
- [0574] 마우스 가변 영역 (각각 중쇄 및 경쇄에 대한 VH 및 VL)이 유전적으로 인간 IgG1 및 카파 불변 영역에 융합되는 키메릭 mAb를 생성하였다. 상이한 인비트로 및 인비보 기능 분석에서의 검사 (하기 참조)에 이어, 가장 우수한 키메릭 mAb을 인간화 대상으로 하였다. 상기 인간화는, 중쇄 및 경쇄 모두의 CDR 서열을 마우스 프레임워크 영역에서 (인실리코 예측하기를) 이에 상응하는 인간 프레임워크로 이식하여 수행하였다. 결과적으로, 인간화된 mAb에서 마우스-유래 서열만이 CDR 영역이 되고, mAb의 나머지 부분은 인간 서열을 포함한다.
- [0575] 나아가, 인간화된 경쇄가 상이한 인간화된 중쇄와 짝을 이루었다 (경쇄 서플링, 도 9 참조). 흥미롭게도, 5A4 유래 인간화된 경쇄를 포함하는 mAb가 가장 현저히 높은 효능을 나타내었는데, 이는 이러한 특정 경쇄 CDR 영역이 일부 mAb의 우수한 효능에 기여할 수 있음을 암시한다. 인간화된 mAb의 결합은 유세포 분석으로 측정되는 것과 같이 특정 세균의 표면 염색에 의해 확인하였다 (도 9).
- [0576] 실시예 7: 갈락탄-III 특이적 mAb의 인비보 보호 효능
- [0577] 키메릭 (도 10A) 또는 인간화된 (도 10B) 갈락탄-III 특이적 mAb, 또는 대조군으로서 아형이 부합되는 관계없는 mAb로 5개의 마우스 그룹을 복강내 수동 면역하였다. 24시간 후 마우스를 20mg의 GalN 복강내 투여를 통해 내독소로 민감화시키고, 동시에 클렙시엘라 슈모니에 균주 #79의 치사량을 접종하였다. 마우스의 치사율은 매일 모니터링하였다.
- [0578] 검사된 모든 키메릭 mAb는 약 50 µg/kg의 용량에 상응하는 1 µg/마우스 (도 10A) 정도의 낮은 용량에서 유의한 보호능을 보였다. mAb 5A4는 뛰어난 보호 효능을 나타내었는데, 이는 그의 높은 친화성 (실시예) 및 인비트로 LPS 중화능 (하기 실시예 8)과 일관되는 결과이다.
- [0579] 내독소 중화능 (하기 실시예 8 참조)과 관련하여 가장 효과적으로 인간화된 mAb를 동일한 모델에서 검사하였다. 5A4-유래 경쇄 CDR를 포함하는 모든 인간화된 mAb부터, 키메릭 mAb 5A4에 대한 보호능을 기준으로 하였다. 도 10B에서 보듯이, 대부분의 인간화된 mAb의 우수한 보호능이 유지되었다. 상기 인간화된 mAb가 상이한 중쇄 CDR을 포함 (다만, 경쇄 CDR은 공유함)하는 것을 고려할 때, 경쇄 영역이 강한 보호능에 유의하게 기여하는 것으로 판단된다.
- [0580] 실시예 8: 인비트로 내독소 중화
- [0581] 클렙시엘라 슈모니에 02 균주의 높은 혈청 감수성을 고려할 때, 살균 활성이 아닌 내독소 중화가 상기한 (실시예 7) 주요 보호 기작으로 추측된다. 이를 실험적으로 입증하기 위하여, 상기 갈락탄-III 특이적 mAb의 내독소 중화능을 인비트로에서 관찰하였다.
- [0582] 제조업자의 지시사항에 따라, 정제된 LPS에 의해 유도된 Toll 유사 수용체 4 (TLR-4) 신호를 검출하기 위하여 상업적인 리포터 세포주 (HEK-Blue™ TLR4, Invivogen)를 사용하였다. 35 µl의 mAb (HEK Blue™ 배지로 희석됨)를, 바로 녹인 정제된 LPS 25 µl와 혼합하였다. 02 gtr+ LPS 는 PCM-27 균주 (02 gtr+:K27 Polish Collection of Microbes, Poland)에서 유래하였다. 스톱 용액을 HEK Blue™ 배지에 0.4 ng/ml 농도로 제조하였다. 혼합물을 깨끗한 96-웰의 반 부분의 플레이트에 이동시키고, 30분간 상온에서 배양하였다. 50 µl의 HEK-Blue™ 세포 현탁액을 첨가하였다 (약 50,000 세포/웰). 플레이트를 알루미늄 호일로 싸고 밤새 (16-18 시간) 37°C, 5% CO₂ 에서 배양하였다. 다음 날 광학 밀도를 630nm에서 측정하고, 모조 대비 리포터 단백질 (분비된 배아 알칼리 포스파타아제, SEAP)의 수치를 측정하였다. 항체가 없는 대조군 대비 SEAP 유도의 저해율을 계산하여, 상이한 mAb 농도별로 도표화 하였다. 50% 저해 농도 (IC50)를, log(저해제) vs. 반응 - 변수 경사 비선형 회귀 분석을 이용한 GraphPad Prism 5.0으로 계산하였다. 검사한 mAb와 유사한 폴리믹신 B (PMB-Sulfate, FLUKA Cat. #81334)를 양성 대조군으로 사용하였다. 음성 대조군으로는, 관계없는 mAb를 포함시켰다.
- [0583] 인간화된 mAb의 중화능을 그들의 모 (인간화된 경쇄는 서플로이딩기 때문에 중쇄에 관해서만) 키메릭 mAb와 1 µg/ml mAb 용량에서 비교하였다 (도 11). 상기 용량에서, 키메릭 mAb 5A4는 다른 키메릭 mAb에 비해 우수한 중화능을 나타내었으며, 이는 BLI (실시예 4)로 측정된 것과 같은 친화성과 일관되는 결과이다. 흥미롭게도, 인간화된 경쇄 유래 5A4와 짝 지을 경우, 각 중쇄 계통의 인간화된 유도체 몇몇은 키메릭 5A4 대비 비교적 우수한 중화능을 보였다. 이러한 발견은 역시 5A4 경쇄 CDR 서열이 개선된 중화능을 부여하며, 이에 따라 상기한 것(실시

예 7)과 같이 인비보 보호가 나타난다는 것을 시사하는 것이다.

- [0584] 이러한 발견을 추가적으로 뒷받침하기 위하여, 각 계통의 가장 인간화된 mAb과 그들의 모 키메라 mAb들을 동일하게 인비트로 중화 분석에서 적정하였다. 도 12에 도시된 것과 같이, 5A4 유래 경쇄 CDR을 포함하는 모든 mAb가 폴리믹신 B (내독소 결합 특성이 알려진 저분자 항생제)에 비해 우수한 중화능을 보인 반면, 다른 mAb들은 높은 용량에서만 중화능을 보였다.
- [0585] 참조 문헌
- [0586] Hansen DS, Mestre F, Alberti S, et al. Klebsiella pneumoniae lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. J Clin Microbiol 1999 Jan;37(1):56-62.
- [0587] Trautmann M, Ruhnke M, Rukavina T, et al. O-antigen seroepidemiology of Klebsiella clinical isolates and implications for immunoprophylaxis of Klebsiella infections. Clin Diagn Lab Immunol 1997 Sep;4(5):550-5.
- [0588] Clarke BR, Whitfield C. Molecular cloning of the rfb region of Klebsiella pneumoniae serotype O1:K20: the rfb gene cluster is responsible for synthesis of the D-galactan I O polysaccharide. J Bacteriol 1992 Jul;174(14):4614-21.
- [0589] Hsieh PF, Wu MC, Yang FL, et al. D-galactan II is an immunodominant antigen in O1 lipopolysaccharide and affects virulence in Klebsiella pneumoniae: implication in vaccine design. Front Microbiol 2014;5:608.
- [0590] R.F.Kelly, M.B.Perry, L.L.MacLean, C.Whitfield. Structures of the O-antigens of Klebsiella serotypes O2 (2a,2e), O2 (2a,2e,2h), and O2 (2a,2f,2g) members of a family of related D-galactan O-antigens in Klebsiella spp. Journal of Endotoxin Research 1995;2:131-40.
- [0591] Allison GE, Verma NK. Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in Shigella flexneri. Trends Microbiol 2000 Jan;8(1):17-23.

도면

도면1

표 1: 카바의 명명법을 이용한 CDR 서열									
중쇄 가변 영역 (VH)									
서열번호	mAb 이름	서열번호 CDR1	VH CDR1	서열번호 CDR2	VH CDR2	서열번호 CDR3	VH CDR3		
21	8E3-E5	1	PTFSNYIN	2	EIRLKSNNTATYYVESYKG	3	TKEYGGFAN		
23	9H9-H7	4	LAPSNYMN	5	EIRLKSNYSYTHYAESYKG	6	TPERGGFFY		
25	5A4-A7	7	PTFSNYMN	8	EIRLKSNNTATYYAESYKG	9	LPERGGFFY		
27	2D8-A10	10	PTFSNYMN	11	EIRLKSNNTATYYAESYKG	12	TPERGGFFY		
경쇄 가변 영역 (VL)									
서열번호	mAb 이름	서열번호 VL CDR4	VL CDR4	서열번호 VL CDR5	VL CDR5	서열번호 VL CDR6	VL CDR6		
22	8E3-E5	13	KSSQSILYSSNDKNCIA	14	WASTRES	15	HQYLSSYT		
24	9H9-H7	16	RSSQSLVHSDGNTYLH	17	KVSNRFS	18	SCSTHVEWT		
26	5A4-A7	19	RSSQSLVHSDGNTYLH	20	LVSNEFS	18	SCSTHVEWT		
28	2D8-A10	19	RSSQSLVHSDGNTYLH	17	KVSNRFS	18	SCSTHVEWT		

도면2a

8E3-E5

8E3-E5: VH: 서열번호 21

EVKLQESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFTFSNYWINWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYATYYVESVKGRFTISRDD
SKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTKEYGGFANWQGGTTTVTVSS

8E3-E5: VL: 서열번호 22

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNCLAWYQRKPGQSPKLLISWASTRESGVPDRFTGSGSGTD
FTLTISVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTRLEIK

9H9-H7

9H9-H7: VH: 서열번호 23

EVKLQESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGLAFSNIWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNSYSTHYAESVKGRFTISRDD
SKSGVYLQMNRLRAEDTGIYYCTPEFGGFPYWGQGGTTTVTVSS

9H9-H7: VL: 서열번호 24

DVVMQTPTPLSLPVLGDHASISCRSSQSLVHSDGSTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDF
TLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPWTFGGGTRLEIK

5A4-A7

5A4-A7: VH: 서열번호 25

EVNLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYATYYAESVKGRFTISRDD
SKRSVYLRVNNLRVEDTGIYYCLPEFGGFFYWGQGTTLTVSA

5A4-A7: VL: 서열번호 26

DVLMTQTPTPLSLPVLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLINLVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDF
TLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPWTFGGGTRLEIK

2D8-A10

2D8-A10: VH: 서열번호 27

EVKLQESGGGLVQPGGSMKLSCLVVGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDD
SKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTPEFGGFFYWGQGGTTTVTVSS

2D8-A10: VL: 서열번호 28

DVVMQTPTPLSLPVLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDF
TLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPWTFGGGTRLEIK

도면2b

G3-43

G3-43 VH: (VH 5A4-A7 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 29

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRLKSNNYATYYAESVKGRFTISRDN
SKNTVYVLQMNSLRAEDTAVYYCLPEFGGFFYWGQGITLVTVSS

G3-43 VL: (VL 5A4-A7 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 30

DVVMTQSPPLSLPVTPEGPASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLRKPGQSPQLLINLVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDF
TLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTRKVEIK

G3-46

G3-46 VH: (VH 5A4-A7 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 31

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRLKSNNYATYYAESVKGRFTISRDD
SKRTVYVLQMNSLRAEDTAVYYCLPEFGGFFYWGQGITLVTVSS

G3-46 VL: (VL 5A4-A7 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 32

DVVMTQSPPLSLPVTPEGPASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLRKPGQSPQLLINLVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDF
TLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTRKVEIK

G3-77

G3-77 VH: (VH 9H9-H7 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 33

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGLAFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRLKSNSYSTHYAESVKGRFTISRDD
SKSTVYVLQMNSLRAEDTAVYYCTPEFGGFFPYWGQGITLVTVSS

G3-77 VL: (VL 5A4-A7 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 34

DVVMTQSPPLSLPVTPEGPASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLRKPGQSPQLLINLVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDF
TLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTRKVEIK

G3-78

G3-78 VH: (VH 9H9-H7 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 35

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGLAFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRLKSNSYSTHYAESVKGRFTISRDD
SKSTVYVLQMNSLRAEDTAVYYCTPEFGGFFPYWGQGITLVTVSS

G3-78 VL: (VL 5A4-A7 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 36

DVQMTQSPSSLSASVGRVTITCRSSQSLVHSDGNTYLHWYQKPGKSPKLLINLVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPWTFGGGTRKVEIK

G3-97

G3-97 VH: (VH 2D8-A10 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 37

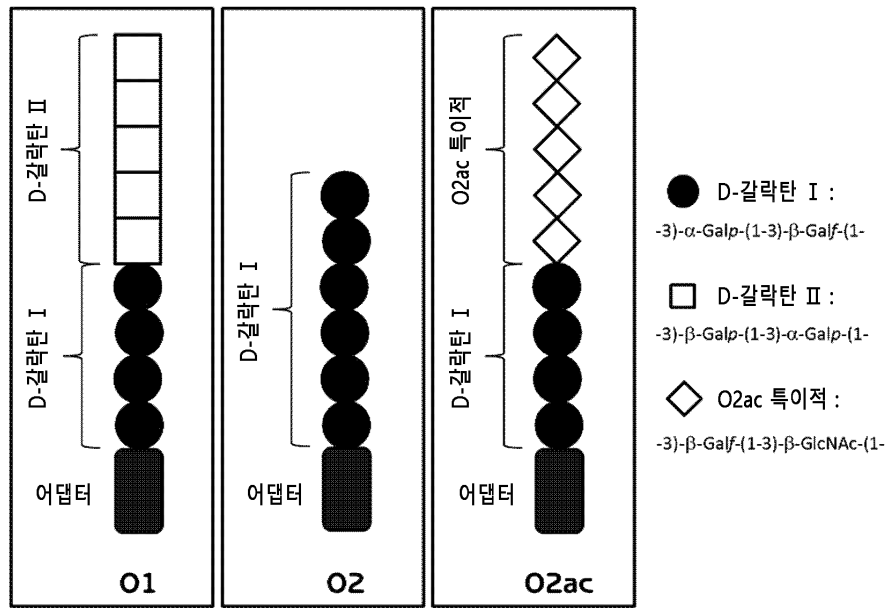
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDD
SKSTVYVLQMNSLRAEDTAVYYCTPEFGGFFYWGQGITLVTVSS

G3-97 VL: (VL 5A4-A7 의 CDR 서열을 포함) 서열번호 38

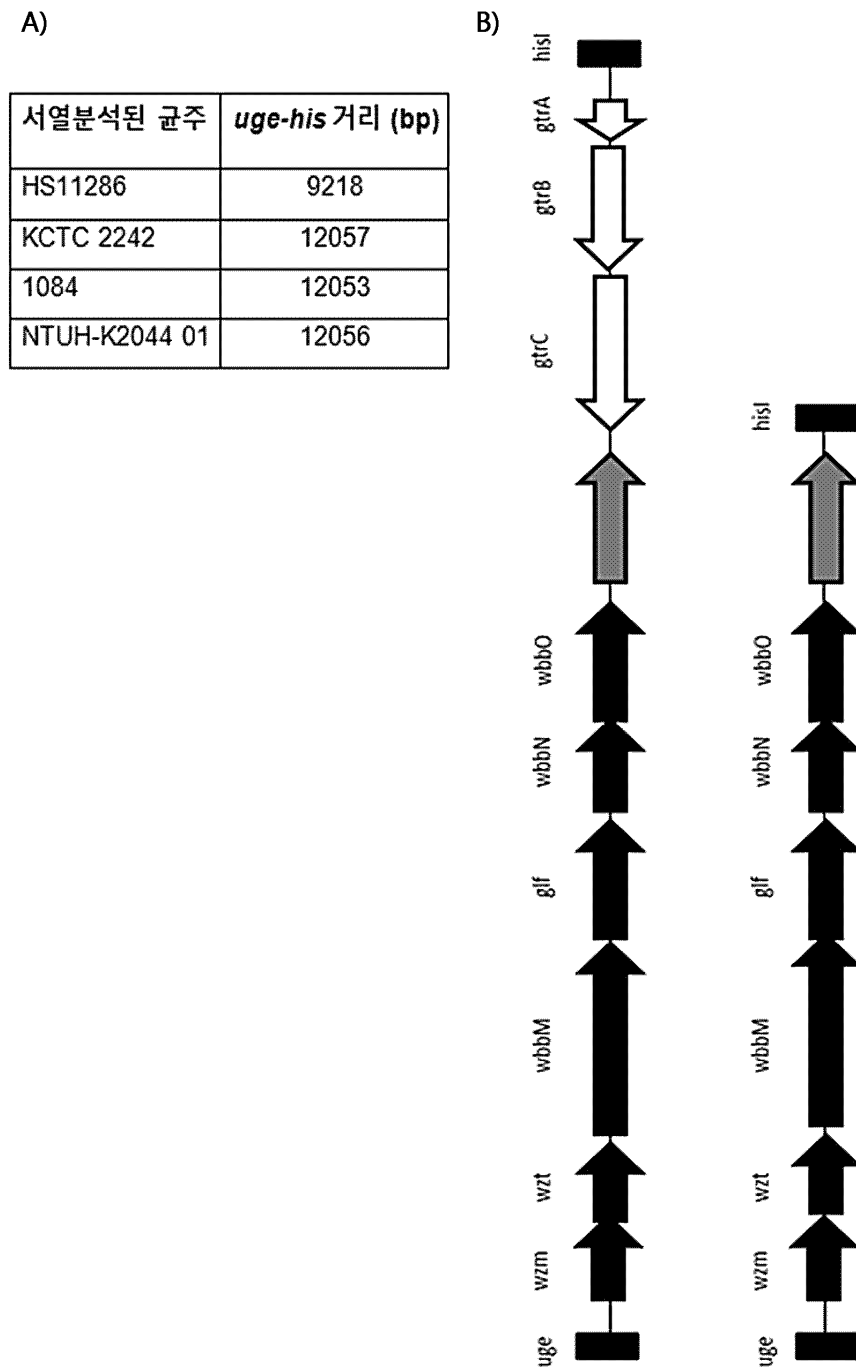
DVVMTQSPPLSLPVTPEGPASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLRKPGQSPQLLINLVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDF
TLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTRKVEIK

도 2 (계속)

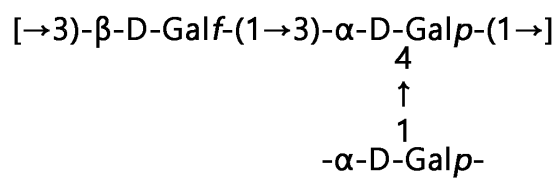
도면3



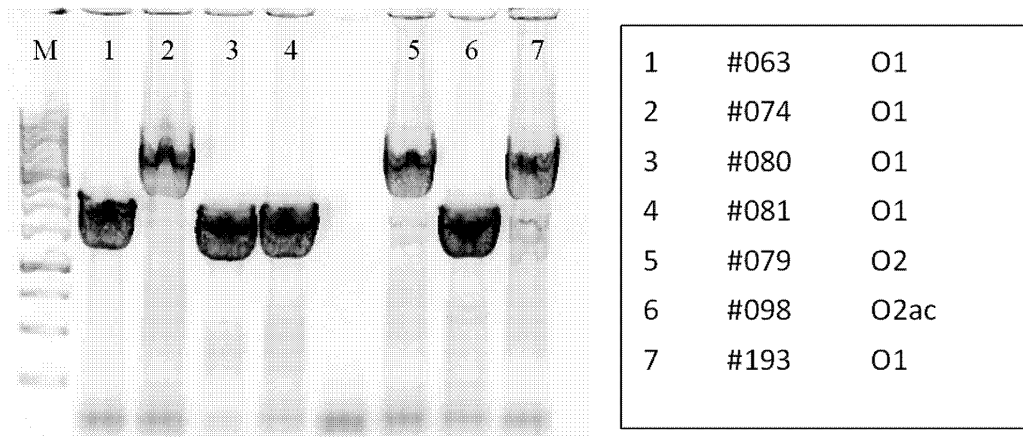
도면4



도면5

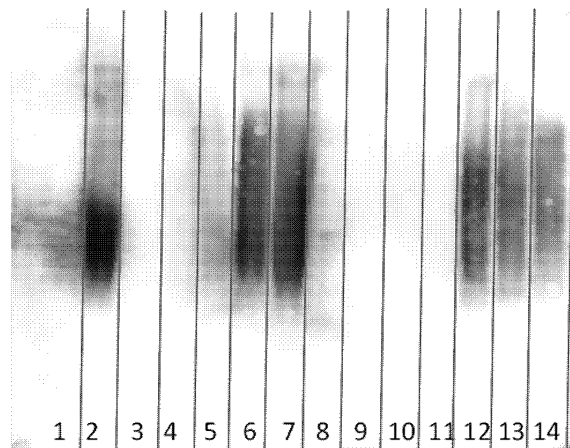


도면6

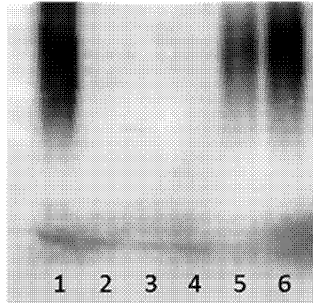


도면7

	균주	o-형	gtr
1	#63	O1	-
2	#79	O2	+
3	Kp5	O2	-
4	Kp55	O2	-
5	Kp117	O2	-
6	Kp19	O2	+
7	Kp30	O2	+
8	Kp67	O2	+
9	Kp3	O1	-
10	Kp69	O1	-
11	Kp111	O1	-
12	Kp24	O1	+
13	Kp36	O1	+
14	Kp97	O1	+



도면8



	LPS 샘플	gal-Ⅲ 특이적 혈청과의 반응성
1	O2 gtr+	+
2	O2 gtr-	-
3	O2 gtr- / 유도되지 않은 공백터	-
4	O2 gtr- / 유도된 공백터	-
5	O2 gtr- / 유도되지 않은 gtr 플라스미드	+
6	O2 gtr- / 유도된 gtr 플라스미드	+

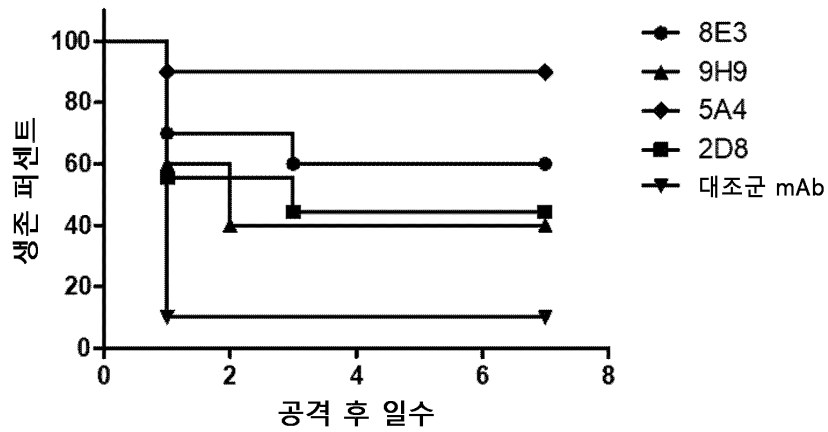
도면9

mAb	VH	VL	형광 강도 (FL-1)
9H9 키메릭	9H9-H7	9H9-H7	30067
G3-57	9H9-H7	9H9-H7	30397
G3-59	9H9-H7	9H9-H7	23804
G3-61	9H9-H7	9H9-H7	18207
G3-62	9H9-H7	9H9-H7	20349
G3-63	9H9-H7	9H9-H7	22465
G3-64	9H9-H7	9H9-H7	23186
G3-66	9H9-H7	9H9-H7	28715
G3-67	9H9-H7	9H9-H7	29945
G3-68	9H9-H7	9H9-H7	30977
G3-70	9H9-H7	2D8-A10	20252
G3-71	9H9-H7	2D8-A10	17153
G3-73	9H9-H7	2D8-A10	20246
G3-74	9H9-H7	2D8-A10	22200
G3-75	9H9-H7	2D8-A10	23805
G3-76	9H9-H7	5A4-A7	28495
G3-77	9H9-H7	5A4-A7	27983
G3-78	9H9-H7	5A4-A7	37587
G3-79	9H9-H7	2D8-A10	17647
G3-80	9H9-H7	2D8-A10	17238
G3-81	9H9-H7	2D8-A10	19754
음성 대조군 mAb #1	-	-	176
음성 대조군 mAb #2	-	-	277
2차 항체 mAb 단독	-	-	428

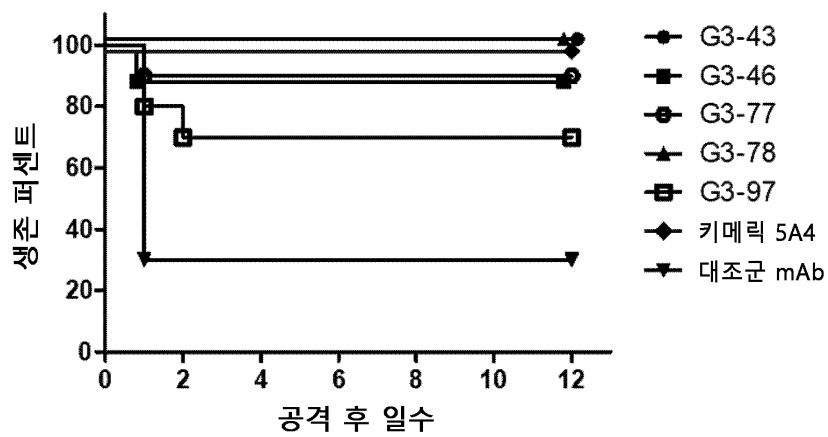
mAb	VH	VL	형광 강도 (FL-1)
5A4 키메릭	5A4-A7	5A4-A7	38918
G3-40	5A4-A7	5A4-A7	17108
G3-41	5A4-A7	5A4-A7	19965
G3-42	5A4-A7	5A4-A7	22187
G3-43	5A4-A7	5A4-A7	22801
G3-44	5A4-A7	5A4-A7	27903
G3-45	5A4-A7	5A4-A7	29942
G3-46	5A4-A7	5A4-A7	35252
G3-49	5A4-A7	2D8-A10	27470
G3-51	5A4-A7	9H9-H7	17701
G3-52	5A4-A7	9H9-H7	20058
G3-53	5A4-A7	2D8-A10	21597
G3-54	5A4-A7	2D8-A10	22973
G3-55	5A4-A7	2D8-A10	29562
2D8 키메릭	2D8-A10	2D8-A10	22436
G3-85	2D8-A10	2D8-A10	24789
G3-86	2D8-A10	2D8-A10	28199
G3-87	2D8-A10	2D8-A10	23433
G3-88	2D8-A10	2D8-A10	35420
G3-89	2D8-A10	2D8-A10	18449
G3-90	2D8-A10	2D8-A10	17514
G3-91	2D8-A10	2D8-A10	19934
G3-92	2D8-A10	2D8-A10	23634
G3-93	2D8-A10	2D8-A10	23929
G3-95	2D8-A10	5A4-A7	30144
G3-96	2D8-A10	9H9-H7	28988
G3-97	2D8-A10	5A4-A7	35792
G3-98	2D8-A10	9H9-H7	16983

도면10

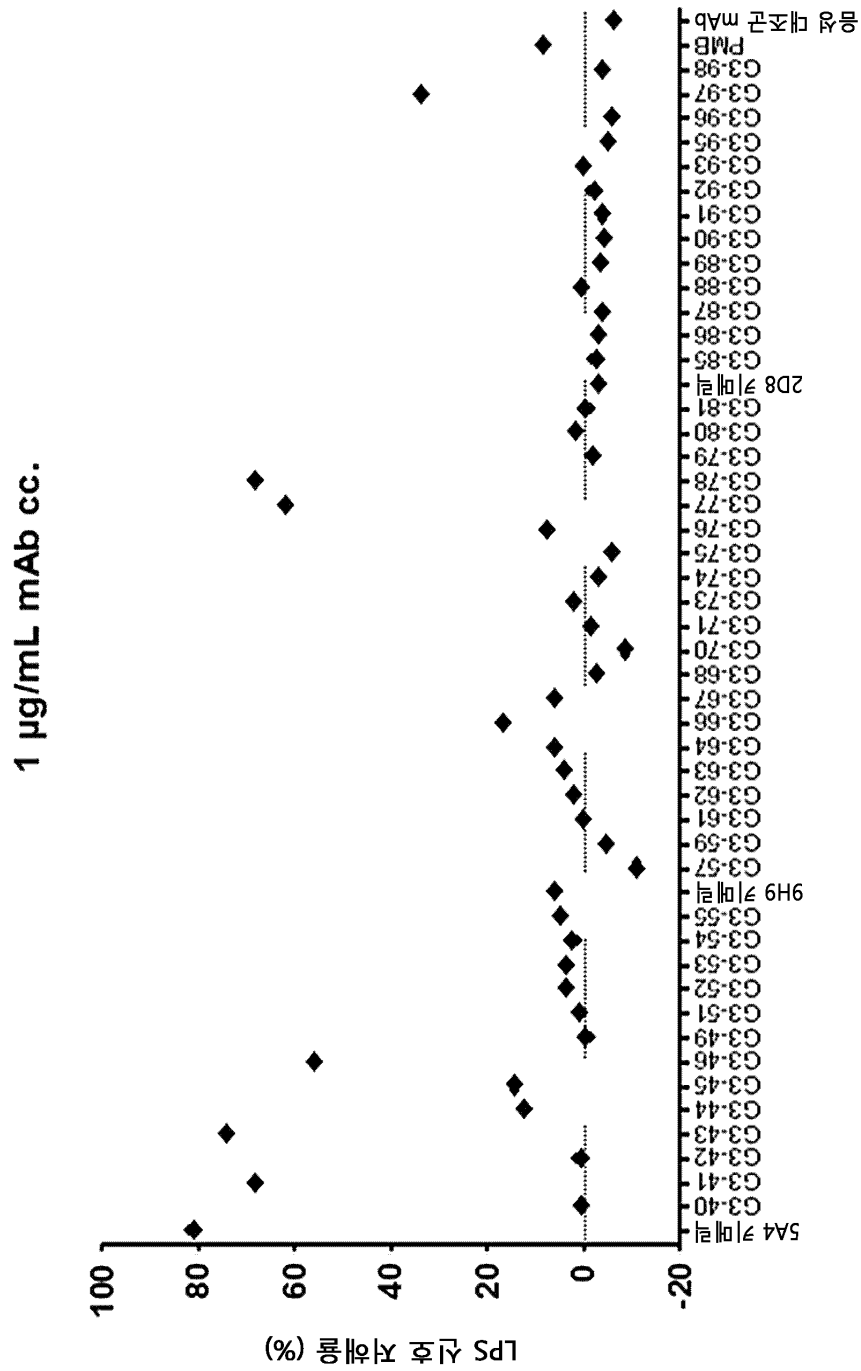
A)



B)



도면11



도면12

