(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0171941
(43) 공개일자 2023년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/12 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/1271 (2013.01)
A61K 39/085 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7035872
(22) 출원일자(국제) 2022년03월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년10월19일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/012823
(87) 국제공개번호 WO 2022/196816
국제공개일자 2022년09월22일
(30) 우선권주장
JP-P-2021-046301 2021년03월19일 일본(JP)
JP-P-2021-173381 2021년10월22일 일본(JP)

(71) 출원인
고쿠리츠다이가쿠호진 미에다이가쿠
일본 미에켄 츠시 구리마마치야쵸 1577
더 보오드 오브 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 일리노이즈
미국 61801 일리노이 어바나 사우쓰 라이트 스트리트 506 헨리 어드미니스트레이션 빌딩 352
(72) 발명자
가바자 에스테반
일본 미에켄 츠시 구리마마치야-쵸 1577 씨/오 미에 유니버시티
가바자 코리나
일본 미에켄 츠시 구리마마치야-쵸 1577 씨/오 미에 유니버시티
캔 아이작
미국 일리노이 61801 씨/오 유니버시티 오브 일리노이 앳 어바나-샴페인
(74) 대리인
리앤목특허법인

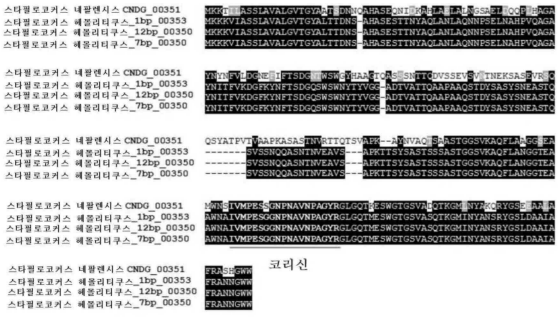
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **급성 폐손상 및 폐섬유증의 급성 악화를 개선하기 위한 의약 조성물**

(57) 요 약

급성 폐손상 및 폐섬유증의 급성 악화를 개선하기 위한, 코리신에 대한 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체, 및 이를 함유하는 의약 조성물을 제공한다. 본 발명의 의약 조성물은, 스타필로코커스 네팔렌시스 등의 다양한 포도상구균에 보존되어 있는 펩타이드인 코리신에 대한 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체를 함유한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 13/12 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
G01N 33/6884 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
G01N 2800/12 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

코리신(corisin)에 특이적으로 결합하는, 단리된 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서, 코리신이 IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)인, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, PESSGNP(서열번호 68) 또는 NPAGY(서열번호 69)가 에피토프인, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

(IA)

(i) 서열번호 37의 H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 38의 H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 39의 H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역; 및

(ii) 서열번호 41의 L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 42의 L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 43의 L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역;

(IIA)

(i) 서열번호 70의 H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 49의 H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 50의 H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역; 및

(ii) 서열번호 52의 L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 53의 L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 54의 L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역;

또는

(IVA)

(i) 서열번호 72의 H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 73의 H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 74의 H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역; 및

(ii) 서열번호 76의 L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 77의 L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 78의 L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역

을 포함하는, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

(IB) 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 또는 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역;

(IIB) 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 또는 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄

가변영역; 또는

(IVB) 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 또는 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역

을 포함하는, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

(IC) 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역;

(IIC) 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역;

(IIIC) 서열번호 44의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 44의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역; 또는

(IVC) 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역

을 포함하는, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제5항에 따른 H쇄 가변영역, 및 제6항에 따른 L쇄 가변영역을 포함하는, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 8

제7항에 있어서,

제5항에 따른 (IB)의 H쇄 가변영역 및 제6항에 따른 (IC)의 L쇄 가변영역;

제5항에 따른 (IIB)의 H쇄 가변영역 및 제6항에 따른 (IIC)의 L쇄 가변영역; 또는 제5항에 따른 (IVB)의 H쇄 가변영역 및 제6항에 따른 (IVC)의 L쇄 가변영역

을 포함하는, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 9

제8항에 있어서, 제5항에 따른 (IB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열이고, 그리고 제6항에 따른 (IC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열이거나; 또는 제5항에 따른 (IIB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열이고, 그리고 제6항에 따른 (IIC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열이거나; 또는 제5항에 따른 (IVB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열이고, 그리고 제6항에 따른 (IVC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열인, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 10

제8항에 있어서,

제5항에 따른 (IB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 제6항에 따른 (IC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역이거나; 또는

제5항에 따른 (IIB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 제6항에 따른 (IIC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역이거나; 또는

제5항에 따른 (IVB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 제6항에 따른 (IVC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 75의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역인, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 11

제8항에 있어서,

제5항에 따른 (IB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 제6항에 따른 (IC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 L쇄 가변영역이거나; 또는

제5항에 따른 (IIB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 제6항에 따른 (IIC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 L쇄 가변영역이거나; 또는

제5항에 따른 (IVB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 제6항에 따른 (IVC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 L쇄 가변영역인, 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 항체 분자의 유도체로서, Fab, $F(ab')_2$, Fv 또는 단쇄 Fv 단편(scFv)인, 항체 분자의 유도체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 분자 또는 이의 유도체는 코리신-유발 아폽토시스(corisin-induced apoptosis)를 중화 및/또는 저해하는, 항체 분자 또는 이의 유도체.

청구항 14

급성 폐손상 또는 섬유증을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물로서, 유효 용량의 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체를 함유하는, 의약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 급성 폐손상이, 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)을 야기해서 폐기능을 저하시키고 호흡 관리

를 필요로 하는 치명적 폐렴 폐렴인, 의약 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 섬유증이 특발성 폐섬유증(IPF), 간경변, 신장섬유증, 낭포성 섬유증, 골수섬유증 및 유선섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 의약 조성물.

청구항 17

급성 폐손상 또는 섬유증을 예방하기 위한 백신 조성물로서, 아미노산 서열: IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)을 갖는 코리신의 서열 내의 1개 또는 여러 개의 돌연변이 갖는 코리신 돌연변이체를 유효성분으로서 포함하되, 상기 돌연변이체는 아폽토시스 활성을 나타내지 않는, 백신 조성물.

청구항 18

급성 폐손상 또는 섬유증의 진행도를 판정하기 위한 바이오 마커로서의, 코리신의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 특허 출원은, 일본국 특허 출원 2021-046301호(2021년 3월 19일 출원) 및 일본국 특허 출원 2021-173381호(2021년 10월 22일 출원)에 의거한 파리조약상의 우선권 및 이익을 주장하는 것이며, 상기 출원의 전체 내용은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0002] 본 발명은, 폐섬유증의 급성 악화를 개선하기 위한 의약 조성물 및 이를 위한 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 폐 미생물군집 유래 펩타이드의 저해 물질을 함유하는, 폐섬유증의 급성 악화를 개선하기 위한 의약 조성물 및 이의 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 특발성 폐섬유증(IPF)은 만성의 병인 불명의 불치병이다. IPF에서는, 허파꽈리 상피세포의 아폽토시스(apoptosis) 증가와, 이에 이어지는 이상 폐조직 수복이 그 진행의 중심이다. IPF의 치료에 현재 사용되고 있는, 피르페리돈(pirfenidone)과 닌테다닙(nintedanib)의 2종류의 항섬유화 약의 경우, 환자는 진단 후 약 2 내지 3년의 기대 수명을 지닌다(비특허문헌 1). 이들 항섬유화 약은, 폐기능의 손실을 약간 감소시키는 것에 지나치지 않고, 환자의 생존이나 생활의 질을 개선하는 것은 아니다(비특허문헌 2 내지 4). 최근의 역학연구에서는, IPF 환자가 세계적으로 500만명을 넘고 있고, 그 수는 세계적으로 증가하고 있는 것을 시사하고 있다(비특허문헌 5). 전환 성장 인자-β1(Transforming Growth Factor-β1) 등의 폐섬유화 인자의 분비 증가, 및 폐에 있어서의 근섬유아세포의 과잉 동원 및 세포외 매트릭스의 침착(deposition)에 기인하는 허파꽈리 상피세포의 손상과 비정상 조직 수복이, IPF의 질환 병인에서 중심적인 역할을 하고 있다(비특허문헌 1). 이 진행은, 최종적으로는, 폐조직의 반흔화, 폐의 구조적 파괴 및 호흡 부전에 이른다(비특허문헌 5). IPF의 자연 경과는 예측 불능이며, 가변적이고(비특허문헌 6), 따라서, 질환이 서서히, 빠르게 진행할 경우, 또는 급성 악화(AE)로 불리는 급격한 임상적 악화가 보일 경우가 있다(비특허문헌 7, 8). IPF에 있어서의 가장 빈도가 높은 사인은, IPF의 대략 46%의 사례에서 일어나는 AE이다(비특허문헌 9, 10). AE에서는, 발증 동안 높은 사망률(최대 50%)과 급성 발증 후의 단기 생존율이 예측되어, AE라 진단된 후, 환자는 불과 3 내지 4개월밖에 생존할 수 없다(비특허문헌 8, 9). 인공 호흡기를 필요로 하는 사례에서, 사망률은 최대 90% 증가한다(비특허문헌 9). 감염증 및 진단 또는 외과수술이 AE를 유발할 가능성이 있지만, 그 정확한 기전은 불분명하다(비특허문헌 8). 현재 시점에서, AE에 대한 유효한 치료법은 존재하지 않는다(비특허문헌 3).

[0004] 특발성 폐섬유증(IPF)의 원인으로서, 폐내 미생물군집(폐 마이크로바이옴)이 그 역할을 하고 있는 것을 나타내는 증거가 증가하고 있다. IPF 환자에서는, 장내 세균불균형, 또는 다량의 폐내 미생물군집이, 숙주 방어에 관여하는 유전자의 지속적인 발현 변화, 면역 응답의 저하, 폐 상피세포 장해, 이상한 섬유아세포 반응성, 폐기능 이상의 중증도, 흉부 방사선 사진 소견의 악화, 질환 진행 및 생존성의 저하와 관계되고 있다(비특허문헌 11 내지 16). 폐내 미생물군집의 변화 및 세균부하는, 급성 악화를 수반하는 IPF에서는 더욱 악화된다(비특허문헌 17, 18). 그러나, 폐내 섬유증을 수반하는 폐 미생물군집에 관련되는 기전은, 여전히 불분명하다. 본 발명자들은 최근 폐내 미생물군집에 있어서 코리신(corisin)이라 일컬어지는 프로-아폽토시스 펩타이드를 동정했지만,

이것은 폐섬유증에 있어서의 병인적 역할을 설명할 수도 있다(비특허문헌 19). 코리신은, 다양한 포도상구균 및 상이한 병원성 세균 균주에 보존되어 있는 펩타이드이다(비특허문헌 19).

[0005] 코리신의 아미노산 서열은 세균의 트랜스글리코실라제 단편에 대응하고 있다(비특허문헌 19). 폐섬유증이 확립된 마우스에 코리신 또는 코리신 보유 세균을 폐내 투여하면, 허파꽈리 상피세포에 아폽토시스가 일어나고, 급성 악화(AE)가 일어난다(비특허문헌 19). 또한, 질환이 서서히 진행되는 IPF 환자는, 건강한 집단과 비교해서 코리신의 폐 수준이 증가되고, AE를 가진 환자는, 안정한 환자와 비교해서 폐 코리신의 수준이 현저하게 높았다(비특허문헌 19).

[0006] 따라서, 본 발명자들은 이미 코리신에 대한 항체를 사용한 치료는, 코리신의 아폽토시스 활성을 차단함으로써 폐섬유증의 AE(AE-IPF)를 직접적으로 저해할 수 있다고 가정하였다. 이들은 다양한 실험을 수행하여, 코리신에 대한 항체를 개발하고, 그 폐 조직 중 코리신의 웨스턴 블로팅에 이용될 수 있는 것을 증명하였다(특허문헌 1).

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] WO 2021/126957 A

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) [비특허문헌 1] 1 King, T. E., Jr., Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet 378, 1949-1961, doi: 10.1016/S0140-6736 (11)60052-4 (2011).

(비특허문헌 0002) [비특허문헌 2] 2 Richeldi, L. et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med370, 2071-2082, doi: 10.1056/NEJMoa1402584 (2014).

(비특허문헌 0003) [비특허문헌 3] King, T. E., Jr., Noble, P. W. & Bradford, W. Z. Treatments for idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med 371, 783-784, doi: 10.1056/NEJMc1407776 (2014).

(비특허문헌 0004) [비특허문헌 4] King, T. E., Jr. et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med 370, 2083-2092, doi: 10.1056/NEJMoa1402582 (2014).

(비특허문헌 0005) [비특허문헌 5] 5 Lederer, D. J. & Martinez, F. J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. N Engl J Med 378, 1811-1823, doi: 10.1056/NEJMra1705751 (2018).

(비특허문헌 0006) [비특허문헌 6] 6 Sgalla, G., Biffi, A. & Richeldi, L. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis, epidemiology and natural history. Respirology 21, 427-437, doi: 10.1111/resp.12683 (2016).

(비특허문헌 0007) [비특허문헌 7] Kreuter, M. et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: international survey and call for harmonisation. Eur Respir J 55, doi: 10.1183/13993003.01760-2019(2020).

(비특허문헌 0008) [비특허문헌 8] Collard, H. R. et al. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report. Am J Respir Crit Care Med 194, 265-275, doi: 10.1164/rccm.201604-0801CI (2016).

(비특허문헌 0009) [비특허문헌 9] Natsuizaka, M. et al. Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences. Am J Respir Crit Care Med 190, 773-779, doi: 10.1164/rccm.201403-05660C (2014).

(비특허문헌 0010) [비특허문헌 10] Ley, B., Collard, H. R. & King, T. E., Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 183, 431-440, doi: 10.1164/rccm.201006-0894CI (2011).

(비특허문헌 0011) [비특허문헌 11] Dickson, R. P. et al. Radiographic Honeycombing and Altered Lung Microbiota in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med200, 1544-1547,

doi: 10.1164/rccm.201903-0680LE (2019).

(비특허문헌 0012) [비특허문헌 12] Han, M. K. et al. Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study. Lancet Respir Med 2, 548-556, doi: 10.1016/S2213-2600(14)70069-4 (2014).

(비특허문헌 0013) [비특허문헌 13] Huang, Y. et al. Microbes Are Associated with Host Innate Immune Response in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 196, 208-219, doi: 10.1164/rccm.201607-15250C (2017).

(비특허문헌 0014) [비특허문헌 14] Molyneaux, P. L. et al. Host-Microbial Interactions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 195, 1640-1650, doi:10.1164/rccm.201607-14080C (2017).

(비특허문헌 0015) [비특허문헌 15] Takahashi, Y. et al. Impaired diversity of the lung microbiome predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Resl9, 34, doi:10.1186/s12931-018-0736-9 (2018).

(비특허문헌 0016) [비특허문헌 16] Wang, J. et al. Lung microbiome and host immune tone in subjects with idiopathic pulmonary fibrosis treated with inhaled interferon-gamma. ERJ Open Res 3, doi: 10.1183/23120541.00008-2017 (2017).

(비특허문헌 0017) [비특허문헌 17] Molyneaux, P. L. et al. Changes in the respiratory microbiome during acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res 18, 29, doi: 10.1186/s12931-017-0511-3 (2017).

(비특허문헌 0018) [비특허문헌 18] Weng, D. et al. The Role of Infection in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Mediators Inflamm 2019, 5160694, doi: 10.1155/2019/5160694 (2019).

(비특허문헌 0019) [비특허문헌 19] D'Alessandro-Gabazza, C. N. et al. A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis. Nat Commun 11, 1539, doi: 10.1038/s41467-020-15344-3 (2020).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 추가의 연구에서, 본 발명자들은 스타필로코커스 네팔렌시스(*Staphylococcus nepalensis*) 균주 CNDG 이외의 기지의 병원성 세균 유래의 코리신-유사 펩타이드의 존재와 아폽토시스 활성을 입증하였고, 따라서 이 독성 펩타이드가 보다 널리 분포되고 있는 것을 시사하였다. 또한, 여러 개의 단클론성 항체를 작성하고, 특성화하여, 코리신 및 관련 펩타이드의 독성활성을 중화시키는 능력을 지니는 단클론성 항체 A21을 동정하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은, 상기 지견을 이용하여, 2개의 다른 폐섬유증 모델에 있어서 중화 단클론성 항체의 유효성을 시험해보고, 이 항체가, 인간 전환 성장 인자-β1 트랜스제닉(transgenic) 마우스 모델에 있어서의 급성 악화 및 블레오마이신 모델에 있어서의 급성 폐손상을 유의하게 저해함으로써, 폐섬유증을 개선하는 것을 증명하여, 본 발명을 완성시켰다.

[0011] 즉, 본 발명은, 이하의 양상을 포함한다.

[0012] <단클론성 항체 분자>

[0013] [1]

[0014] 코리신에 특이적으로 결합하는, 단리된 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

[0015] [2]

[0016] 코리신이 IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)인, [1]에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

[0017] [3]

[0018] PESSGNP(서열번호 68) 또는 NPAGY(서열번호 69)가 에피토프인, [1] 또는 [2]에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

[0019] <단클론성 항체 분자를 CDR로 동정: A 시리즈>

[0020] [4]

[0021] 하기를 갖는, [1] 또는 [2]에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체:

[0022] (IA)

[0023] (i) 서열번호 37의 H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 38의 H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 39의 H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역; 및

[0024] (ii) 서열번호 41의 L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 42의 L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 43의 L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역;

[0025] (IIA)

[0026] (i) 서열번호 70의 H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 49의 H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 50의 H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역; 및

[0027] (ii) 서열번호 52의 L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 53의 L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 54의 L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역;

[0028] 또는

[0029] (IVA)

[0030] (i) 서열번호 72의 H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 73의 H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 74의 H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역; 및

[0031] (ii) 서열번호 76의 L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 77의 L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 78의 L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역.

[0032] <단클론성 항체 분자를 H쇄 가변영역 및 돌연변이형으로 동정: B 시리즈>

[0033] [5]

[0034] 하기를 갖는, [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체:

[0035] (IB) 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 또는 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역;

[0036] (IIB) 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 또는 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역; 또는

[0037] (IVB) 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 또는 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역.

[0038] <단클론성 항체 분자를 L쇄 가변영역 및 돌연변이형으로 동정: C 시리즈>

[0039] [6]

[0040] 하기를 갖는, [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체:

[0041] (IC) 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄

가변영역, 또는 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역;

[0042] (IIC) 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역;

[0043] (IIIC) 서열번호 44의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 44의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역; 또는

[0044] (IVC) 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역.

[0045] [7]

[0046] [5]에 따른 임의의 H쇄 가변영역 및 [6]에 따른 임의의 L쇄 가변영역을 갖는, [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

[0047] <단클론성 항체 분자의 H쇄 및 L쇄 가변영역의 조합의 동정>

[0048] [8]

[0049] 하기를 갖는, [7]에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체:

[0050] [5]에 따른 (IB)의 H쇄 가변영역 및 [6]에 따른 (IC)의 L쇄 가변영역;

[0051] [5]에 따른 (IIB)의 H쇄 가변영역 및 [6]에 따른 (IIC)의 L쇄 가변영역; 또는 [5]에 따른 (IVB)의 H쇄 가변영역 및 [6]에 따른 (IVC)의 L쇄 가변영역.

[0052] <단클론성 항체 분자를 H쇄 및 L쇄의 가변영역으로 동정>

[0053] [9]

[0054] 하기인, [8]에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체:

[0055] [5]에 따른 (IB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열이고, 그리고 [6]에 따른 (IC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열이거나; 또는

[0056] [5]에 따른 (IIB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열이고, 그리고 [6]에 따른 (IIC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열이거나; 또는

[0057] [5]에 따른 (IVB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열이고, 그리고 [6]에 따른 (IVC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열이다.

[0058] <단클론성 항체 분자의 돌연변이형 1>

[0059] [10]

[0060] [5]에 따른 (IB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 [6]에 따른 (IC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역이거나; 또는

[0061] [5]에 따른 (IIB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 [6]에 따른 (IIC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역이거나; 또는

[0062] [5]에 따른 (IVB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산

서열을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 [6]에 따른 (IVC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 75의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역인,

[0063] [8]에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

[0064] <단클론성 항체 분자의 돌연변이형 2>

[0065] [11]

[0066] [5]에 따른 (IB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 [6]에 따른 (IC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 L쇄 가변영역이거나; 또는

[0067] [5]에 따른 (IIB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 [6]에 따른 (IIC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 L쇄 가변영역이거나; 또는

[0068] [5]에 따른 (IVB)의 H쇄 가변영역이 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역이고, 그리고 [6]에 따른 (IVC)의 L쇄 가변영역이 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 L쇄 가변영역인,

[0069] [8]에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체.

[0070] [12]

[0071] Fab, $F(ab')_2$, Fv 또는 단쇄 Fv 단편(scFv)인, [1] 내지 [11] 중 어느 하나에 따른 항체 분자의 유도체.

[0072] [13]

[0073] 코리신-유발 아폽토시스를 중화 및/또는 저해하는, [1] 내지 [12] 중 어느 하나에 따른 항체 분자 또는 이의 유도체.

[0074] <의약 조성물>

[0075] [14]

[0076] 유효 용량의 [1] 내지 [13] 중 어느 하나에 따른 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체를 함유하는, 급성 폐손상 또는 섬유증을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물.

[0077] [15]

[0078] 급성 폐손상이, 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)을 야기해서 폐기능을 저하시키고 호흡 관리를 필요로 하는 치명적 폐렴인, [14]에 따른 의약 조성물.

[0079] [16]

[0080] 섬유증이, 특발성 폐섬유증(IPF), 간경변, 신장섬유증, 낭포성 섬유증, 골수섬유증 및 유선섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택되는, [14]에 따른 의약 조성물.

[0081] <백신>

[0082] [17]

[0083] 아미노산 서열: IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)을 갖는 코리신의 서열 내의 1개 또는 여러 개의 돌연변이 갖는 코리신 돌연변이체를 유효성분으로서 포함하되, 상기 돌연변이체는 아폽토시스 활성을 나타내지 않는, 급성 폐손상 또는 섬유증을 예방하기 위한 백신 조성물.

[0084] <바이오 마커>

[0085] [18]

[0086] 급성 폐손상 또는 섬유증의 진행도를 판정하기 위한 바이오 마커로서의, 코리신의, 용도.

발명의 효과

[0087] 본 발명자들은, 급성 폐손상의 일반 모델에 있어서의 항코리신 단클론성 항체의 영향을 더욱 조사하고, 이러한 질환에 대한 코리신의 잠재적 영향에 관한 결과를 얻었다. 본 발명은, 폐섬유증 및 아마도 다른 급성 폐손상 관련 폐질환의 병인 및 진행에 있어서의 코리신의 역할을 더욱 밝히는 동시에, 이 불치병을 치료하기 위한 새로운 접근접, 즉, 새로운 의약, 치료 방법 등을 제공하는 것으로 여겨진다.

도면의 간단한 설명

[0088] [도 1] 도 1은, 스타필로코커스 네팔렌시스(*Staphylococcus nepalensis*) 균주 CNDG(CNDG)로부터 유래된 코리신 펩타이드를 함유하는 추정 트랜스글리코실라제와, 마우스의 같은 폐섬유조직으로부터 단리된 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 3개의 균주의 상동성을 나타내는 얼라인먼트(alignment)이다. 코리신 펩타이드는 4열째에 바(bar)를 사용하여 나타내고 있다. 코리신 펩타이드 서열의 외측에서는, 보존된 아미노산은 흑색으로 음영 표시되고, 유사한 아미노산은 회색으로 음영 표시되어 있다. Staphylococcus haemolyticus는 스타필로코커스 헤몰리티쿠스이며, 1bp_00353, 12bp_00350 및 7bp_00350은 각각 에스. 헤몰리티쿠스 균주 1 단백질 번호 353, 에스. 헤몰리티쿠스 균주 12 단백질 번호 350 및 에스. 헤몰리티쿠스 균주 7 단백질 번호 350이다. 에스. 네팔렌시스 균주 CNDG의 단백질은, DnaA를 코딩하는 유전자(ORF00001)로부터 카운트하는 게놈의 오픈 리딩 프레임(open reading frame: ORF)의 351번 위치에 코딩되어 있다. 유사한 성질을 가진 아미노산은, LIMV, AG, YWF, DEQN, KRH 및 ST로 그룹화된다. 얼라인먼트는, Log-Expectation(MUSCLE (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/))에 의한 멀티플 시퀀스 비교를 사용해서 실행하였다.

[도 2] 도 2는 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 3개의 균주로부터의 배양 상청액은, 허파꽈리 상피세포의 아폽토시스를 유도하는 것을 나타내고 있다. 도 2a: A549 허파꽈리 상피세포를, 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 균주 1, 7 및 12로부터의 배양 상청액(1/10 희석)의 존재 하에서 48시간 배양했을 때의 플로우 사이토메트리(flow cytometry), 즉, 유세포 분석의 결과를 나타낸다. 플루오레세인-표지 아넥신 V와 요오드화프로피듐 염색을 지표로서 사용하고 있다. 스타필로코커스 네팔렌시스 균주 CNDG의 배양 상청액으로 처리한 A549 세포를 양성 대조군으로서 제공하고, 생리식염수로 처리한 세포를 음성 대조군으로 제공하였다. 도 2b: 플로우 사이토메트리에 의해 결정하고, 정량화한 아폽토시스 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 각 군에서 N=4. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 통계 분석은 스튜던트의 t검정을 사용해서 실행하였다. ***p<0.0001. 도 2c: A549 세포를 에스. 헤몰리티쿠스의 배양 상청액의 존재 하에서 48시간 배양하고, 투과형 전자현미경을 사용해서 평가한 결과를 나타낸다. 도 2d: 3개의 에스. 헤몰리티쿠스 균주 1, 7 및 12 및 에스. 네파렌시스의 배양 상청액의 존재 하에 배양한 A549 세포에 있어서의 카스파제-3 절단의 웨스턴 블로팅의 결과를 나타낸다. 도 2e: 3개의 에스. 헤몰리티쿠스 균주 1, 7 및 12 및 에스. 네파렌시스의 배양 상청액의 존재 하에 배양한 A549 세포에 있어서의 카스파제-3 절단의 결과를 나타내는 그래프이다. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 통계 분석은 대응이 없는 t검정을 사용해서 실행하였다. **p<0.001, ***p<0.0001.

[도 3] 도 3은, 여러 개의 병원체로부터의 트랜스글리코실라제의 합성 코리신-유사 펩타이드가 허파꽈리 상피세포의 아폽토시스를 유도하는 것을 나타내고 있다. 도 3a, b: A549 허파꽈리 상피세포를 10μM의 코리신-유사 펩타이드의 존재 하에 배양한 후, 아폽토시스를 평가한 결과를 나타내는 플로우 사이토메트리의 검토 결과이다. 합성 코리신 서열 또는 스크램블 펩타이드로 처리한 A549 세포를, 각각 양성 대조군 및 음성 대조군으로 제공하였다. 도 3b, c: 플로우 사이토메트리에 의해 결정하고, 정량화한 아폽토시스 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 각 군에서 N=4. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 통계 분석은 스튜던트의 t검정을 사용해서 실행되었다. *p<0.05; ***p<0.0001.

[도 4] 도 4는 다양한 세균성 병원체로부터의 코리신-함유 추정 트랜스글리코실라제의 얼라인먼트를 나타낸다. 유기물 명칭은, Wconf(웨이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), GenBank 단백질 수탁번호 WP_112464134.1), CNDG-00351(에스. 네파렌시스 균주 CNDG 단백질 00351), L. monocyt-2(리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), GenBank 단백질 수탁번호 HAB0417320.1), Myabs-2(마이코박테로이데스 압세수스(*Mycobacteroides abscessus*), GenBank 단백질 수탁번호 SKR69498.1), Myabs-1(마이코박테로이데스 압세수스,

GenBank 단백질 수탁번호 SKT99287.1), Shem_00350(스타필로코커스 헤몰리티쿠스 12b 단백질 00350) 및 Lmonocyt-1(엘. 모노사이토게네스-GenBank 단백질 수탁번호 ECO1693478.1)로 약칭된다. 코리신 펩타이드는 볼드체로 나타내고, 아미노산이 보존되어 있는 부분은 코리신으로 표기하고 있다(5단계째). 코리신 펩타이드 서열의 외측에서는, 보존된 아미노산은 흑색으로 음영 표시되고, 유사의 아미노산은 회색으로 음영 표시되어 있다. 같은 특성을 가진 아미노산은, LIMV, AG, YWF, DEQN, KRH 및 ST로서 그룹화된다. 에스, 스타필로코커스. 얼라인먼트는, Log-Expectation(MUSCLE (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/))에 의한 멀티플 얼라인먼트 비교를 사용해서 실행하였다.

[도 5] 도 5는 에스. 헤몰리티쿠스 배양 상청액에 의해 유도되는 아폽토시스 경로를 나타낸다. 도 5a: 아폽토시스는 외인성 및 내인성 경로에 의해 발생한다. 외인성 경로는, 리간드가 막결합형 사멸 수용체에 결합함으로써 개시되어, 그 결과, 세포내 신호 전달이 활성화되어, 프로카스파제-8이 카스파제-8로 절단된다. 내인성 경로는 미토콘드리아에 의해 조절된다. 자극의 존재 하에, 미토콘드리아막의 섭동은 그 투과성을 증가시켜, 아폽토시스 반복부-함유(BIRC) 단백질 및 아폽토시스 촉진 인자의 바큘로바이러스 저해제의 억제제의 방출을 일으키고, 이것은 프로카스파제-9를 카스파제-9로 절단하는 아폽토솜 형성에 기여한다. 카스파제-8과 카스파제-9는 둘 다 아폽토시스의 효과기인 카스파제-3을 활성화시킬 수 있다. 도 5b: A549 허파꽈리 상피세포를, 에스. 헤몰리티쿠스 균주 12의 배양 상청액(1/10 희석)의 존재 하에 24시간 배양하고, 절단된 카스파제-8, 절단된 카스파제-9 및 절단된 카스파제-3에 양성인 세포의 백분율을 플로우 사이토메트리로 분석한 결과를 나타낸다. 하단은 양성 세포의 대조군에 대한 백분율을 나타내는 그래프이다. 각 군에서 N=6. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 통계 분석은 스튜던트의 t검정을 사용해서 실행되었다. **p<0.01; ***p<0.0001.

[도 6] 도 6은 코리신이, 아폽토시스 촉진 인자와 항아폽토시스 인자의 mRNA 발현을 변화시키는 것을 나타내는 그래프이다. 각 군에서 N=6. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 통계 분석은 대응이 없는 t검정을 사용해서 실행하였다. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

[도 7] 도 7은 스타필로코커스 네팔렌시스 균주 CNDG의 배양 상청액에 의한 코리신-함유 트랜스글리코실라제의 분해와 펩티다제 분획의 조제를 나타낸다. 도 7a: 스타필로코커스 네팔렌시스 균주 CNDG의 트랜스글리코실라제 및 코리신 부분의 아미노산 서열을 나타낸다. 도 7b: 스타필로코커스 네팔렌시스 배양 상청액을 특정 분획에 농축시키기 위한 절차를 나타낸다. 도 7c: 높은 소화 활성을 갖는 분획을 얻기 위한 데이터와 절차를 나타낸다. 도 7d: OD(280nm)에서의 흡광도가 높은 분획에 대해서, 재조합 트랜스글리코실라제 351에 대한 높은 소화 활성을 갖는 분획을 얻을 때까지의 데이터와 절차를 나타낸다.

[도 8] 도 8은 세균 분비 산물이 트랜스글리코실라제를 분해시켜 폐상피세포의 아폽토시스를 유도하는 것을 나타내고 있다. 도 8a: 재조합 트랜스글리코실라제를 다양한 양의 스타필로코커스 네팔렌시스 배양 상청액으로부터 조제한 펩티다제 분획의 존재 하에, 2시간 인큐베이션한 후의, 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔을 실시한 결과를 나타내는 사진이다. 도 8b: 재조합 트랜스글리코실라제를 일정량의 펩티다제 분획의 존재 하, 다양한 시간 간격으로 인큐베이션한 후의, 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔을 실시한 결과를 나타내는 사진이다. 도 8c: 표시된 반응 혼합물로 처리한 후의 A549 허파꽈리 상피세포의 아폽토시스를 평가하는 플로우 사이토메트리 분석 결과를 나타낸다. c의 상단도의 제3상한을 제외한 부분의 점이 아폽토시스 세포이고, c의 하단도의 X축의 오른쪽의 돌출부가 아폽토시스 세포이다. 도 8d: 아폽토시스 세포의 대조군에 대한 백분율을 나타내는 그래프이다. 각 군에서 N=4. 데이터는, 투키 검정(Tukey's test)에 의한 일원 배치 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석이다. ***p<0.0001.

[도 9] 도 9는 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 배양 상청액이 재조합 트랜스글리코실라제를 분해시키는 것을 나타내는 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔의 사진이다. 스타필로코커스 네팔렌시스로부터의 상청액을 대조군으로 제공하였다.

[도 10] 도 10은 세균 유래의 추정 세린 프로테아제가 트랜스글리코실라제를 절단하는 것을 나타내고 있다. 도 10a, b: 트랜스글리코실라제 분해에 대한 세린 프로테아제 저해제인 Pefabloc SC(a, b)의 작용을 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 10c, d: 트랜스글리코실라제 분해에 대한 다이아이소프로필플루오린산(DFP)의 작용을 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 10e, f: 트랜스글리코실라제 분해에 대한 킬레이팅제인 에틸렌다이아민 사아세트산(EDTA)의 작용을 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 10g, h: 트랜스글리코실라제 분해에 대한 시스테인 프로테아제 저해제인 E-64의 작용을 나타내는 사진 및 그래프이다.

[도 11] 도 11은, 다른 클래스의 항코리신 단클론성 항체가 트랜스글리코실라제 351 위치의 코리신 펩타이드 및 코리신 서열에 결합하는 것을 나타내고 있다. 도 11a: 각 단클론성 항체의 아이소타입을 나타낸다. 도 11b: 트

랜스글리코실라제 351에 대한 각 단클론성 항체의 결합성을 나타내는 웨스턴 블로팅의 결과이다. 도 11c: 항코리신 단클론성 항체의 각 클론의 결합을 평가한 그래프이다. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 26kDa의 분자량 마커 아래의 작은 밴드는, 재조합 단백질의 정제 동안 분해시키는 것으로 알려져 있는 트랜스글리코실라제 351의 분해 산물이다.

[도 12] 도 12는, 래트 항코리신 단클론성 항체가 코리신의 컨센서스 모티프 PESSGNP 또는 NPAGY에 결합하는 것을 나타내고 있다. 도 12a, b: 전체적인 펩타이드 마이크로어레이의 완전성 및 검정의 질을 검증한 펩타이드 마이크로어레이 카피의 염색의 결과를 나타낸다. 도 12c, d: 래트 단클론성(mAtb) 항체 9A의 스캔 강도를 나타낸다. 도 12e, f: 래트 단클론성(mAtb) 항체 21A의 스캔 강도를 나타낸다. 도 12g, h: 래트 단클론성(mAtb) 항체 2A의 스캔 강도를 나타낸다. 도 12i, j: 래트 단클론성(mAtb) 항체 4A의 스캔 강도를 나타낸다.

[도 13] 도 13은 항코리신 단클론성 항체 클론의 가변 프레임워크 및 상보성 결정 영역의 서열을 나타낸다. 소문자는 프레임워크 영역(FR1, FR2, FR3, FR4)을 나타내고, 볼드체 대문자는 항체 가변영역의 CDR 영역(CDR1, CDR2, CDR3)을 나타낸다.

[도 14] 도 14는, 항코리신 단클론성 항체 클론 21A가 인간 허파꽈리 상피세포의 코리신-유발 아폽토시스에 대하여 강력한 중화 활성을 갖는 것을 나타내는 다양한 그래프이다. 도 14a: 항코리신 단클론성 항체의 배양 허파꽈리 상피세포 상의 코리신의 아폽토시스 촉진 활성의 저해 작용을 나타내는 플로우 사이토메트리 분석의 결과이다. a의 상단의 제3상한을 제외한 부분의 점은 아폽토시스 세포이다. a의 하단의 X축의 오른쪽의 돌출부가 아폽토시스 세포를 나타낸다. 도 14b: 플로우 사이토메트리에 의해 결정하고, 정량화한 아폽토시스 세포의 대조군에 대한 백분율을 나타내는 그래프이다. 각 군에서 N=3. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 통계 분석은 스튜던트의 t검정을 사용해서 실행하였다. ***p<0.0001.

[도 15] 도 15는, 항코리신 단클론성 항체 클론 21A가 인간 허파꽈리 상피세포에 대한 스타필로코커스 헤몰리티쿠스로부터의 배양 상청액의 아폽토시스 활성을 중화시키는 것을 나타낸다. 도 15a: 항코리신 단클론성 항체 클론 21A의 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 코리신 아폽토시스 촉진 활성의 저해 작용을 나타내는 플로우 사이토메트리 분석의 결과이다. a의 상단의 제3상한을 제외한 부분의 점은 아폽토시스 세포이다. a의 하단의 X축의 오른쪽의 돌출부가 아폽토시스 세포를 나타낸다. 도 15b: 플로우 사이토메트리에 의해 결정하고, 정량화한 아폽토시스 세포의 대조에 대한 백분율을 나타내는 그래프이다. 각 군에서 N=4. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 통계 분석은 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석을 사용해서 실행하였다. ***p<0.0001.

[도 16] 도 16은, 항코리신 중화 단클론성 항체가 트랜스글리코실라제 분해 산물에 의해 유도되는 폐세포의 아폽토시스를 저해하는 것을 나타내고 있다. 도 16a: 항코리신 중화 단클론성 항체에 있어서의 트랜스글리코실라제 분해 산물에 의해 유도되는 폐세포의 아폽토시스의 저해 작용을 나타내는 플로우 사이토메트리 분석의 결과이다. a의 상단의 제3상한을 제외한 부분의 점은 아폽토시스 세포이다. a의 하단의 X축의 오른쪽의 돌출부가 아폽토시스 세포를 나타낸다. 도 16b: 플로우 사이토메트리에 의해 결정한 아폽토시스 세포의 대조군에 대한 백분율을 나타내는 그래프이다. 각 군에서 N=4. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 통계 분석은 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석을 사용해서 실행하였다. ***p<0.0001. 도 16c: 반응 혼합물을 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동으로 영동하고, 은염색으로 염색한 결과를 나타낸다.

[도 17] 도 17은 혈장 중의 항코리신 중화 항체의 평균 반감기를 나타내는 그래프이다.

[도 18] 도 18은, 코리신의 기관내 주입 전에 항코리신 항체를 투여한 TGFβ1 TG 마우스와 아이소타입 항체를 투여한 TGFβ1 TG 마우스 사이의 폐섬유증의 일치한 스코어를 나타낸다. 도 18a: 항코리신 단클론성 항체(mAtb) 또는 아이소타입 항체(Atb)에 의한 치료, 즉, 처치를 시작하기 전에 실시한 컴퓨터 단층촬영(CT)의 결과이다. TGFβ1-TG/섬유증(+)/항코리신 항체/코리신 및 TGFβ1-TG/섬유증(+)/아이소타입 항체/코리신군에서는 N=6, TGFβ1-T/섬유증(-)/코리신군에서는 n=5. 도 18b: 전문가 8명이 CT에 있어서의 폐섬유증의 등급을 기록한 스코어의 평균치를 나타내는 그래프이다. 데이터는 평균±SD로 표현된다. 통계 분석은, 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석을 사용해서 실행하였다. TGFβ1: 전환 성장 인자 β1, TG: 트랜스제닉.

[도 19] 도 19는, 단클론성 항코리신 항체가 TGFβ1 TG 마우스의 폐의 CT소견의 악화를 방지하는 것을 나타내고 있다. 도 19a: 폐섬유증을 지닌 TGFβ1 TG 마우스에 있어서의 CT소견을 얻기 위한 스케줄을 나타낸다. 폐섬유증의 CT소견의 등급은 전문가에 의해 맹검화해서 스코어화하였다. 도 19b, c: TGFβ1-TG/섬유증(-)/코리신군에 있어서의 코리신의 기관내 주입 전후의 CT소견 및 이의 스코어를 나타내는 그래프이다. 통계 분석은, 대응이 있는 스튜던트의 t검정에 의해 실행하였다. ns, 유의차 없음. 도 19d, e: TGFβ1-TG/섬유증(+)/코리신/아이소타입군

에 있어서의 코리신의 기관내 주입 전후의 CT소견 및 이의 스코어를 나타내는 그래프이다. 바는 스코어의 평균치를 나타낸다. 대응이 있는 t검정에 의해 통계 분석을 하였다. *p<0.05. TGFβ1: 전환 성장 인자 β1, TG: 트랜스제닉. 도 19f, g: TGFβ1-TG/섬유증(+)/코리신/항코리신군에 있어서의 코리신의 기관내 주입 전후의 CT소견 및 이의 스코어를 나타내는 그래프이다. 바는 스코어의 평균치를 나타낸다. 대응이 있는 t검정에 의해 통계 분석을 하였다. **p<0.01.

[도 20] 도 20은 단클론성 항코리신 항체가 TGFβ1 TG 마우스의 폐섬유증의 급성 악화(AE)를 억제하는 것을 나타내고 있다. 도 20a: 세포분획수의 김자 염색(Giemsa staining)의 결과를 나타낸다. 스케일 바는 50μm를 나타낸다. 도 20b: BALF의 세포와 호중구의 총수를 나타내는 그래프이다. 데이터는 평균±SD이다. 통계 분석은, Neuman-Keuls 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의해 실행하였다. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.0001. 도 20c: 계면활성 단백질 D(SP-D), MUC5B 단백질, 매트릭스 메탈로프로테나제-1(MMP-1), 디코린(decorin) 및 MUC-1의 수준을, 시판의 효소면역 검정 키트에 의해 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 하이드록시프롤린의 수준은, 제조사의 지시에 따라서, 시판의 비색분석 키트를 사용해서 측정하였다. 데이터는 평균±SD이다. 통계 분석은, Neuman-Keuls 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의해 실행하였다. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.0001. 도 20d, e: 마슨 염색(Masson's staining)에 의한 각 군의 폐조직에의 콜라겐 침착을 나타내는 사진과 그래프이다. 스케일 바는 200μm를 나타낸다. 데이터는 평균±SD이다. 통계 분석은, Neuman-Keuls 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의해 실행하였다. *p<0.05; ***p<0.0001. 도 20f: 섬유증 영역과 도 20b에 기재되어 있는 염증세포의 총수와의 상관 관계를 나타내는 그래프이다. 스피어만의 상관계수에 의한 통계 분석.

[도 21] 도 21은 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 급성 악화의 유발의 실험 스케줄 및 폐섬유증의 CT 기준 크리테리아(criteria)를 나타낸다. 도 21a: 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 급성 악화의 유발의 실험 스케줄을 나타낸다. 도 21b: 폐섬유증의 CT 기준 크리테리아를 나타낸다. 이하의 CT 스코어 시스템을 사용하고, 폐섬유증의 등급을 결정하였다. 스코어 1: 정상 소견. 스코어 2: 폐밀도가 약간 증가하였다. 스코어 3: 반점이 있는 불투명 유리의 불투명도와 중격의 비후. 스코어 4: 중간정도의 불투명 글래스의 불투명도와 중격의 비후. 스코어 5: 흉막하 두께, 미만성 불투명 유리 형태 혼탁, 및 망상 중격 비후. 스코어 6: 흉막하 두께, 미만성 불투명 유리 형태 혼탁, 망상 중격 비후, 및 견인성 기관지확장증. 스코어 7: 흉막하 두께, 중도의 불투명 유리 형태 혼탁, 망상 중격 비후, 및 미만성 견인성 기관지확장증.

[도 22] 도 22는 코리신의 기관내 주입 후의 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 폐CT 소견의 악화를 나타낸다. 도 22a, b, c: 코리신의 기관내 주입 후의 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 폐CT 소견과 그 스코어를 나타내는 그래프이다. WT/BLM/스크램블 펩타이드에 있어서의 마우스의 수: n=5, WT/BLM/코리신군: n=6. 스튜던트의 대응이 있는 t검정에 의한 통계 분석. *p<0.05; ns, 유의차 없음. 도 22d, e, f: 코리신의 기관내 주입 후의 생리식염수투여 폐섬유증의 마우스에 있어서의 폐CT 소견과 그 스코어를 나타내는 그래프이다. 마우스의 수: WT/SAL/스크램블 펩타이드 및 WT/SAL/코리신군에서 n=3. 대응이 있는 t검정에 의한 통계 분석. ns, 유의차 없음.

[도 23] 도 23은 코리신의 기관내 주입 후의 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 폐섬유증의 급성 악화를 나타낸다. 도 23a: 코리신을 투여한 BLM-유발 폐섬유증 마우스에 있어서의 각 처치군의 BALF 세포 염색의 대표적인 현미경 사진을 나타내고 있다. 도 23b: 코리신을 투여한 BLM-유발 폐섬유증 마우스에 있어서의 각 처치군의 염색 BALF 세포수를 나타내는 그래프이다. 스케일 바는 20μm를 나타낸다. 데이터는, t검정에 의한 평균±SD 통계 분석이다. *p<0.05; *p<0.01. WT/SAL/스크램블 펩타이드 및 WT/SAL/코리신군에 있어서의 마우스의 수: n=3, WT/BLM/스크램블 펩타이드 및 WT/BLM/코리신군: n=5. 도 23c: 코리신을 투여한 BLM-유발 폐섬유증 마우스에 있어서의 혈청 아밀로이드 P 성분(SAP), MUC-1, 단구 주화성 단백질-1(MCP-1), 페리오스틴(periostin), 콜라겐 I 및 오스테오폰틴(osteopontin)의 수준을 나타내는 그래프이다. 데이터는, 대응이 없는 t검정에 의한 평균±SD 통계 분석이다. *p<0.05; *p<0.01; ***p<0.001. 도 23d: 코리신을 투여한 BLM-유발 폐섬유증 마우스에 있어서의 카스파제-3의 절단을 웨스턴 블로팅에서 평가하고, 정량 한 결과를 나타낸다. 도 23e: 코리신을 투여한 BLM-유발 폐섬유증 마우스에 있어서의 절단된 카스파제-3과 β-액틴의 비의 그래프를 나타낸다. 바는, 대응이 없는 t검정에 의한 평균±SD 통계 분석을 나타낸다. *p<0.05. 도 23f: 콜라겐 침착을 정량화한 결과를 나타내고 있다. 도 23g: 콜라겐 침착을 정량화한 결과의 그래프를 나타낸다. 데이터는 대응이 없는 t검정에 의한 평균±SD 통계 분석이다. *p<0.05. 도 23h: 하이드록시프롤린의 폐조직 함유량의 측정 결과의 그래프를 나타낸다. 바는, 대응이 없는 t검정에 의한 평균±SD 통계 분석을 나타낸다. *p<0.05, **p<0.001.

[도 24] 도 24는 항코리신 단클론성 항체로 처치 혹은 처리한 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 폐CT 소견의 개선 및 폐 염증 세포침윤의 감소를 나타내고 있다. 도 24a: 항코리신 단클론성 항체의 폐섬유증

억제 작용을 조사하는 스케줄을 나타낸다. 도 24b, c: b는 항코리신 단클론성 항체로 처치한 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 폐CT 소견을 나타낸다. c는 b의 결과를 반영하는 CT 스코어의 그래프이다. WT/SAL/아이소타입 및 WT/SAL/항코리신군에 있어서의 마우스의 수: n=4, WT/BLM/항코리신 및 WT/BLM/아이소타입군: n=9. 데이터는, 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석이다. ***p<0.001. 도 24d, e: d는 항코리신 단클론성 항체로 처치한 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스의 BALF 중의 세포의 사진을 나타낸다. e는 항코리신 단클론성 항체로 처치한 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 BALF의 총세포수 및 세포분획의 수를 나타낸다. WT/SAL/아이소타입 및 WT/SAL/항코리신군에 있어서의 마우스의 수: n=4, WT/BLM/항코리신 및 WT/BLM/아이소타입군: n=9. 스케일 바는 50㎛를 나타낸다. 데이터는 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석이다. **p<0.01, ***p<0.0001.

[도 25] 도 25는 항코리신 단클론성 항체로 처치한 폐섬유증 마우스의 폐에 있어서의 급성조직 손상, 실질세포의 아폽토시스 및 조직 섬유증의 개선을 나타내고 있다. 도 25a: 항코리신 단클론성 항체로 처치한 폐섬유증 마우스의 폐에 있어서의 오스테오폰틴, MUC-1 및 MUC5B의 수준을 나타내는 그래프이다. WT/SAL/아이소타입 및 WT/SAL/항코리신군에서는 N=4, WT/BLM/아이소타입 및 WT/BLM/항코리신군에서는 n=9. 바는 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석을 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001. 도 25b: 항코리신 단클론성 항체로 처치한 폐섬유증 마우스의 폐에 있어서의 DNA 단편화를 나타내는 사진이다. 화살표는 아폽토시스 세포를 나타낸다. 도 25c: 항코리신 단클론성 항체로 처치한 폐섬유증 마우스의 폐에 있어서의 아폽토시스 세포를 정량화한 그래프이다. 스케일 바는 20㎛를 나타낸다. WT/SAL/아이소타입 및 WT/SAL/항코리신군에서는 N=4, WT/BLM/아이소타입 및 WT/BLM/항코리신군에서는 n=9. 바는 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석을 나타낸다. ***p<0.0001. 도 25d, e: 항코리신 단클론성 항체로 처치한 폐섬유증 마우스의 폐에 있어서의 폐섬유증의 등급을, 7명의 전문가가 맹검 표적으로 애쉬크로프트(Ashcroft score)의 스코어를 사용해서 스코어화한 결과를 나타낸다. 스케일 바는 200㎛를 나타낸다. WT/SAL/아이소타입 및 WT/SAL/항코리신군에서는 N=4, WT/BLM/아이소타입 및 WT/BLM/항코리신군에서는 n=9. 바는 투키 검정에 의한 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석을 나타낸다. *p<0.05, ***p<0.0001. 도 25f, g: f는 폐의 콜라겐 침착에 대해서 마슨의 트라이크롬 염색한 사진이며, g는 이것을 WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용해서 정량화한 그래프이다. WT/SAL/아이소타입 및 WT/SAL/항코리신군에서는 N=4, WT/BLM/아이소타입 및 WT/BLM/항코리신군에서는 n=9. 바는 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석을 나타낸다. *p<0.05, ***p<0.0001. 도 25h: 비색분석에 의해 측정한 하이드록시프롤린의 폐조직 함유량을 나타내는 그래프이다. WT/SAL/아이소타입 및 WT/SAL/항코리신군에서는 N=4, WT/BLM/아이소타입 및 WT/BLM/항코리신군에서는 n=9. 바는 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석을 나타낸다. ***p<0.0001.

[도 26] 도 26은 질환의 급성기에 항코리신 단클론성 항체로 처치한 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 9일차의 폐CT 이상 및 폐 염증 세포의 감소를 나타내고 있다. 도 26a: 급성기에 처치하는 항코리신 단클론성 항체에 있어서의 BLM-유발 폐손상 폐섬유증의 개선 작용을 조사하는 스케줄을 나타낸다. 도 26b, c: b는 급성기에 처치하는 항코리신 단클론성 항체에 있어서의 BLM-유발 폐손상 폐섬유증에 있어서의 CT 폐불투명도를 나타내는 사진이며, c는 b의 결과를 반영하는 CT 스코어의 그래프이다. 항코리신 단클론성 항체(WT/BLM/항코리신) 또는 아이소타입 항체(WT/BLM/아이소타입)로 처치한 마우스에서는 N=7. 데이터는 평균±SD이다. 통계 분석은 대응이 없는 t검정에 의해 실행하였다. *p<0.05. 도 26d, e: d는 급성기에 처치하는 항코리신 단클론성 항체에 있어서의 BLM-유발 폐손상 폐섬유증에 있어서의 혈액중 세포를 나타내는 사진이며, e는 그 총세포수 및 세포분획수를 나타내는 그래프이다. 항코리신 단클론성 항체(WT/BLM/항코리신) 또는 아이소타입 항체(WT/BLM/아이소타입)로 처치한 마우스에서는 N=7. 스케일 바는 20㎛를 나타낸다. 데이터는 대응이 없는 t검정에 의한 평균±SD 통계 분석이다. **p<0.01.

[도 27] 도 27은 질환의 급성기에 항코리신 단클론성 항체로 처치한 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 22일차의 폐CT 이상 및 폐의 염증세포의 감소를 나타낸다. 도 27a, b: a는 질환의 급성기에 항코리신 단클론성 항체로 처치한 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 BLM 펌프 주입 후 21일차(만성기)의 CT 화상을 나타내는 사진이며, b는 22일차에 있어서의 CT 섬유증 스코어의 그래프이다. 두 처치군에서 N=7. 데이터는 평균±SD이다. 통계 분석은 대응이 없는 t검정에 의해 실행하였다. **p<0.01. 도 27c, d: c는 질환의 급성기에 항코리신 단클론성 항체로 처치한 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에서 BLM 펌프의 22일 후의 기관지 허파꽈리 세정액(BALF)에 있어서의 김자 염색 후의 세포분획을 나타내는 사진이며, d는 그 총세포수를 나타내는 그래프이다. 두 처치군에서 N=7. 스케일 바는 20㎛를 나타낸다. 데이터는 대응이 없는 t검정에 의한 평균±SD 통계 분석이다. ***p<0.0001.

[도 28] 도 28은 질환의 급성기에 항코리신 단클론성 항체로 처치한 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 22일차의 폐손상, 폐실질 아폽토시스 및 콜라겐 침착의 개선을 나타낸다. 도 28a: BLM 펌프 주입의 22일 후에 채취한 BALF 및 혈장에 있어서의 MUC-1, 계면활성제 단백질 C(SP-C), SP-D, 콜라겐 I, 페리오스틴, 오스테오폰틴 및 총TGFβ1의 수준을 나타내는 그래프이다. 데이터는 평균±SD이다. 통계 분석은 대응이 없는 t검정에 의해 실행하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. 도 28b, c: b는 절단된 카스파제-3 및 β-액틴의 웨스턴 블로팅의 결과를 나타내고, c는 b의 결과인 절단된 카스파제-3과 β-액틴의 비의 그래프를 나타낸다. WT/BLM/아이소타입군에서는 N=7, WT/BLM/항코리신군에서는 n=6. 데이터는 평균±SD이다. 통계 분석은 대응이 없는 t검정에 의해 실행하였다. *p<0.05. 도 28d, e: 7명의 전문가가 맹검 표적으로, 애쉬크로프트의 스코어를 사용해서 폐섬유증의 등급을 스코어화하였다. 스케일 바는 200μm를 나타낸다. WT/BLM/아이소타입군과 WT/BLML/항코리신군의 둘 다에서 N=7. 바는, 평균±SD 통계 분석이 대응이 없는 t검정에 의해 실행한 것을 나타낸다. *p<0.05. 도 28f, g: f는 폐의 콜라겐 침착에 대해서 마슨의 트라이크롬 염색한 사진이며, g는 이것을, WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용해서 정량화한 그래프이다. 도 28h: 폐의 하이드록시프롤린 함유량을 나타내는 그래프이다. WT/BLM/아이소타입군과 WT/BLML/항코리신군의 둘 다에서 N=7. 바는 평균±SD 통계 분석이 대응이 없는 t검정에 의해 실행한 것을 나타낸다. *p<0.05; ***p<0.0001.

[도 29] 도 29는 항코리신 단클론성 항체가 폐섬유증의 급성 악화를 수반하는 마우스의 생존율을 연장하는 것을 나타내고 있다. 도 29a, b: a는 폐섬유증의 급성 악화를 수반하는 마우스에 있어서의 컴퓨터 단층촬영(CT)의 결과를 나타내고, b는 b의 결과를 반영하는 CT 스코어의 그래프이다. WT/BLM/아이소타입과 WT/BLM/항코리신군의 둘 다에서 N=22, WT/SAL/아이소타입과 WT/SAL/항코리신군의 둘 다에서 n=5. 바는, 평균±SD 통계 분석이 투키 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의해 실행한 것을 나타낸다. *p<0.05. 도 29c: 생존율을 모니터한 결과를 나타내는 그래프이다. 통계 분석은 로그 랭크 검정에 의해 실행하였다. p=0.001.

[도 30] 도 30은 항코리신 단클론성 항체가 중도의 리포다당류-유발 급성 폐손상을 경감시키는 것을 나타내고 있다. 도 30a: 항코리신 단클론성 항체가, 중도의 리포다당류-유발 급성 폐손상을 경감시키는 것을 조사하는 스케줄을 나타낸다. 도 30b: 각 처치군의 BALF 세포 염색의 대표적인 현미경 사진을 나타내고 있다. 도 30c: 각 처치군의 BALF에 있어서의 세포수를 나타내는 그래프이다. 스케일 바는 20μm를 나타낸다. SAL/아이소타입 및 SAL/항코리신군에서 N=4, LPS/아이소타입군에서 n=5, LPS/항코리신군에서 n=8. 데이터는, Neuman-Keuls 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석이다. #p =0.1, ***p<0.0001. 도 30d: 중도의 리포다당류-유발 급성 폐손상을 지니는 마우스에 있어서의 락트산 데하이드로게나제 A(LDHA), 계면활성제 단백질 D(SP-D), 매트릭스 메탈로프로테나제-1(MMP-1), MUC-1 및 종양괴사인자 α(TNFα)의 수준을 나타내는 그래프이다. SAL/아이소타입 및 SAL/항코리신군에서 N=4, LPS/아이소타입군에서 n=5, LPS/항코리신군에서 n=8. 데이터는 Newman-Keuls법에 의한 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석이다. #p =0.1, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

[도 31] 도 31은, 항코리신 단클론성 항체에 의한 처치가, 중도의 리포다당류-유발 급성 폐손상이 있는 마우스의 CT소견을 개선하는 것을 나타내고 있다. 도 31a: 리포다당류(lipopolysaccharide: LPS)의 기관내 주입의 1일 후에 실행한 컴퓨터 단층촬영(CT)의 결과를 나타낸다. WT/SAL/아이소타입 및 WT/SAL/항코리신군에서 N=4, WT/LPS/아이소타입군에서 n=5, WT/LPS/항코리신군에서 n=8. 도 31b: WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용해서 정량화한 폐의 정점에서부터 기저영역까지의 CT 불투명도를 나타내는 그래프이다. 데이터는 평균±SD인 Neuman-Keuls 검정에 의한 일원 배치 분산 분석에 의한 통계 분석. *p<0.05, ***p<0.001.

[도 32] 도 32는 항코리신 단클론성이, 중간 정도의 리포다당류-유발 급성 폐손상을 경감하는 것을 나타내고 있다. 도 32a: 항코리신 단클론성이 중간 정도의 리포다당류-유발 급성 폐손상을 경감시키는지의 여부를 조사하는 스케줄을 나타낸다. 도 32b: 각 처치군의 BALF 세포 염색의 대표적인 현미경 사진을 나타내고 있다. 도 32c: 각 처치군의 염색 BALF 세포수를 나타내는 그래프이다. 스케일 바는 20μm를 나타낸다. LPS/아이소타입에서 N=4, LPS/항코리신군에서 n=5. 데이터는, 쌍을 이루고 있지 않은 테스트에 의한 평균±SD 통계 분석이다. ***p<0.001. 도 32d: 항코리신 단클론성을 투여한 중간 정도의 리포다당류-유발 급성 폐손상 마우스에 있어서의 계면활성제 단백질 D(SP-D), 단구 주화성 단백질-1(MCP-1), TNFα, 락트산 데하이드로게나제 A(LDHA), MUC-5B 및 매트릭스 메탈로프로테나제-1(MMP-1)의 BALF 및 혈장 중 수준 혈장을 나타내는 그래프이다. LPS/아이소타입군에서는 N=4, LPS/아이소타입군에서는 n=5. 데이터는 Newman-Keuls법에 의한 분산 분석에 의한 평균±SD 통계 분석이다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

[도 33] 도 33은 코리신의 순환 수준의 상승이 폐섬유증의 마커와 상관하고 있는 것을 나타내고 있다. 도 33a: TGFβ1 트랜스제닉 마우스(TG) 및 야생형(WT) 마우스에 있어서의 코리신의 혈장 수준을 측정하고, 섬유증 마커와의 상관을 평가하기 위한 스케줄을 나타낸다. WT 마우스군에서는 N=16, TGFβ1 TG 마우스군에서는 n=20. 도

33b: TGFβ1 TG 마우스 및 WT 마우스에 있어서의 폐섬유증의 애쉬크로프트 스코어 및 혈장 코리신과 폐 하이드록시프롤린의 측정 결과를 나타내는 그래프이다. 군간의 통계적 차이는, 대응이 없는 t검정에 의해 분석하고, 관계의 강도는 피어슨-적율 상관에 의해 분석하였다. *p<0.05, **p<0.01***p<0.001.

[도 34] 도 34는 TGFβ1 TG 마우스에 있어서의 폐섬유증의 CT 스코어의 증가를 나타내고 있다. 도 34a: TGFβ1 TG 마우스에 있어서의 폐섬유증의 CT 스코어의 결과를 나타낸다. 도 34b: WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용해서 정량화한 폐의 정점에서부터 기저영역까지의 CT 불투명도를 나타내는 그래프이다. WT 마우스군에서는 N=16, TGFB1TG 마우스군에서는 n=20. WT: 야생형, TGFβ1 TG: 전환 성장 인자 β1, CT: 컴퓨터 단층촬영. 데이터는 평균±SD이다. 통계 분석은 대응이 없는 스튜던트의 t검정에 의해 실행하였다. ***p<0.001.

[도 35] 도 35는 특정한 아미노산 변이를 갖는 코리신 펩타이드에 있어서의 아폽토시스 활성을 나타내는 그래프이다.

[도 36] 도 36은 여러 종의 포도상구균 및 연쇄구균에 있어서의 트랜스글리코실라제의 프로아폽토시스 세그먼트가 보존된 서열의 다중 서열 얼라인먼트를 나타낸다.

[도 37] 도 37은 여러 종의 포도상구균 및 연쇄구균에 있어서의 트랜스글리코실라제의 프로아폽토시스 세그먼트가 보존된 서열의 다중 서열 얼라인먼트를 나타낸다.

[도 38] 도 38은 여러 종의 포도상구균 및 연쇄구균에 있어서의 트랜스글리코실라제의 프로아폽토시스 세그먼트가 보존된 서열의 다중 서열 얼라인먼트를 나타낸다. 도 36, 37 및 38C에 나타낸 코리신으로서는, 예를 들어, IVMPESGGNPNAVNPAGYR(서열번호 58), IIMPESGGNPNIVNPYGYS(서열번호 59), IVMPESGGNPNAVNPYGYR(서열번호 60), IVLPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 61), IVLPESSGNPNAVNELGYR(서열번호 62), IVMPESGGNPNAVNELGYR(서열번호 63), IVMPESSGNPNAVNELGYR(서열번호 64), IVMPESSGNPDAVNELGYR(서열번호 65), IAQRESGGDLKAVNPSSGA(서열번호 66) 또는 IAERESGGDLKAVNPSSGA(서열번호 67)의 아미노산 서열을 들 수 있고, 이들은, 본 발명의 하나 또는 복수의 양상에 있어서 사용될 수 있다.

[도 39] 도 39는 결장 점막 상피세포, 소장 점막 상피세포, 피부의 각질형성세포, 망막 상피세포, 신장의 포도사이트(podocyte) 및 요관상피세포를, 코리신, 코리신-유사 펩타이드 또는 스크램블 펩타이드와 함께 배양하고, 절단된 카스파제-3 양성 세포를 나타내는 사진, 및 그 카스파제-3 양성 세포와 대조의 β-액틴 양성 세포와의 비율을 그래프화한 것이다.

[도 40] 도 40은 건강한 대상체, 안정한 돌발성 폐섬유증(IPF) 환자, 급성 악화를 수반하고 있는 돌발성 폐섬유증(IPF) 환자에 있어서의 혈청 중의 코리신 농도를 비교하고 있는 그래프이다. 코리신은, 토끼 다클론성 항트랜스글리코실라제와 항체 래트 단클론성 항코리신 항체를 이용해서 효소면역검정법으로 측정하였다. 건강한 대상체, n=8; IPF 환자, n=22; 급성 악화를 수반하는 IPF 환자, n=22. 바는, 평균±SD를 나타낸다. 통계 분석은 t검정으로 행하였다. *p<0.05, **p<0.001

[도 41] 도 41a 및 b: A549 허파꽈리 상피세포를, 스타필로코커스 네팔렌시스의 배양 상청액(1:10 희석)과 항코리신 항체의 존재 하에 배양하고, 아폽토시스를 평가한 결과를 나타내는 플로우 사이토메트리의 검토 결과이다. 바는 평균±SD를 나타낸다. 통계 분석은 ANOVA법과 Newman-Keuls 검정을 이용해서 행하였다. ****p<0.0001. 도 41c: 스타필로코커스 네팔렌시스 및 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 미희석 배양 상청액 중의 천연의 코리신의 농도를 측정한 그래프이다. 바는 평균±SD를 나타낸다. 도 41d: A549 허파꽈리 상피세포는, 건강한 대상체(도면 중, HC; n=5) 및 특발성 폐섬유증의 급성 악화를 수반하는 환자(도면 중, IPF; n=14)의 기관지 허파꽈리 세정액(BALF)(1:2 희석), 항코리신 중화 항체(클론 21A)(도면 중, Anticorisin) 또는 대조군 IgG(도면 중, Control IgG)의 존재 하에 배양해서 아폽토시스를 평가한 결과를 나타내는 플로우 사이토메트리의 검토 결과이다. 바는 평균±SD를 나타낸다. 도 41e: 도 41d에 있어서의 모든 건강한 대상체(n=5)와 IPF 환자(n=14)의 BALF에 의해 유도된 아폽토시스 세포의 비율을 항코리신 항체군과 대조군 IgG군 사이에서 비교한 결과이다. 바는 평균±SD를 나타낸다. 통계 분석은 Wilcoxon 검정을 이용해서 행하였다. ***p<0.001. ns, 유의차 없음. 도 41f: 건강한 대상체(n=5)와 IPF 환자(n=14)의 미희석의 BALF의 천연 코리신의 농도를 나타내는 그래프이다. 바는 평균±SD를 나타낸다. **p<0.01. 도 41g: A549 허파꽈리 상피세포를 배양하고, 합성 코리신을 최종농도 10μg/mL로 세포 배양배지에 첨가하고, 0, 1, 3, 6, 12, 24시간 후에 배양배지를 채취하고, 코리신 농도를 측정한 그래프이다. 결과 코리신의 시험관내 반감기를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] <단클론성 항체 분자>

[0090] 본 발명은, 일 실시형태는, 코리신에 특이적으로 결합하는, 단리된 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것이다.

[0091] 본 발명에 있어서, 코리신이란, 일반적으로, 폐섬유증의 급성 악화를 유발하는 것이 발견되어 있는 포도상구균 프로-아폽토시스 펩타이드를 의미한다. 코리신은, 예를 들어, IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1), IVMPESGGNPNAVNPAGYR(서열번호 58), IIMPESGGNPNIVNPYGYS(서열번호 59), IVMPESGGNPNAVNPYGYR(서열번호 60), IVLPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 61), IVLPESSGNPNAVNELGYR(서열번호 62), IVMPESGGNPNAVNELGYR(서열번호 63), IVMPESSGNPNAVNELGYR(서열번호 64), IVMPESSGNPDAVNELGYR(서열번호 65), IAQRESGGDLKAVNPSSGA(서열번호 66) 또는 IAERESGGDLKAVNPSSGA(서열번호 67)의 아미노산 서열의 하나를 가질 수 있다. 바람직하게는, 코리신은 IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드이다.

[0092] 서열번호 1의 서열은 스타필로코커스 네팔렌시스가 기원일 수 있다. 도 36, 37 및 38을 참조하면서, 다른 서열번호의 서열의 기원을 기록한다:

[0093] - 서열번호 58: wp022791177(최상단 236): 1개

[0094] - 서열번호 59: wp049409534 wp103371985(최상단 248): 2개

[0095] - 서열번호 60: wp103328722 wp126565453(최상단 239, 244): 2개

[0096] - 서열번호 61: wp069827045 wp099091381(최상단 246): 2개

[0097] - 서열번호 62: wp061853755(최상단 244): 1개

[0098] - 서열번호 63: suk04795 wp105995336(최상단 116): 2개

[0099] - 서열번호 64: wp112369066(최상단 252): 1개

[0100] - 서열번호 65: wp099090334(최상단 120): 1개

[0101] - 서열번호 66: wp107644182 내지 wp119486153(최상단 222 내지 223): 92개

[0102] - 서열번호 66: wp096808177 내지 CNDG00159(최상단 229): 2개

[0103] 코리신의 보존은 계통해석에 의해 밝혔다. 다른 세균에 의해 발현되는 트랜스글리코실라제의 진화적 관계를 밝히기 위해서, 스타필로코커스 네팔렌시스 균주 CNDG의 게놈에서 동정된 6개의 트랜스글리코실라제의 아미노산 서열과 이들의 상동체에 의거해서, 공개되어 있는 데이터베이스(www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)에 따라서 계통수를 구축하였다. 계통수의 토폴로지는, 선조 서열에 가까운 트랜스글리코실라제의 유도체가 2개의 IsaA 클러스터에 갈라져(IsaA-1과 IsaA-2), IsaA-1 관련 서열로부터 SceD 구성원이라 불리는 단백질이 진화되었을 가능성을 나타내고 있다(SceD-1, SceD-2, SceD-3, SceD-4). IsaA 및 SceD 아미노산 서열의 멀티플 얼라인먼트는, 일반적으로, 프로아폽토시스 코리신을 나타내는 아미노산 잔기의 보존을 밝히고, 그의 기능적 의의를 강조하였다(도 36, 도 37 및 도 38). 스타필로코커스 자일로수스(*Staphylococcus xylosus*), 스타필로코커스 코니이(*Staphylococcus cohnii*) 및 스타필로코커스 네팔렌시스 유래의 코리신 상동 트랜스글리코실라제의 아미노산 서열 동일성은 100%였다. 또한, 이들의 포도상구균은, IsaA-1 및 IsaA-2 클러스터의 다른 구성원로부터의 트랜스글리코실라제가 대응하는 코리신 영역과 98% 이상의 동일성 및 SceD 클러스터의 구성원의 대응하는 영역과 60%의 동일성을 공유하였다(도 36, 도 37 및 도 38). 트랜스글리코실라제(신테니(synteny)) 주위의 유전자 클러스터링의 게놈 구축물은, 스타필로코커스 코니이 및 스타필로코커스 네팔렌시스에 있어서 보존되는 경향이 있었다.

[0104] 본 발명의 일 실시형태는, 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것으로, 여기서 PESSGNP(서열번호 68) 또는 NPAGY(서열번호 69)의 아미노산 서열을 갖는 아미노산이 에피토프이다. 본 발명에 있어서, 코리신 분자에 대한 결합 특성을 지니는 다양한 항코리신 단클론성 항체를 작성하고, 그 결합 부위를 동정하기 위한 에피토프 매핑을 수행함으로써, PESSGNP(서열번호 68) 또는 NPAGY(서열번호 69)의 아미노산 서열을 갖는 에피토프를 발견해냈다(도 12). 이 에피토프를 표적으로 하는 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체는, 해당 코리신에 대한 유사한 결합 특성 및 유사한 기능, 예를 들면, 아폽토시스 저해 및/또는 중화 활성을 갖는 것으로 여겨진다. 따라서, 바람직한 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체는, 코리신 대한 중화 활성을 갖는다. 이것은 중화 항체를 포함한다.

[0105] 본 발명의 하나의 구체적인 실시형태로는, 하기를 포함하는, 본 발명의 단클론성 항체를 CDR로 동정하는 A시리즈 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것이다:

[0106] (IA)

[0107] (i) 서열번호 37의 H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 38의 H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 39의 H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 및

[0108] (ii) 서열번호 41의 L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 42의 L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 43의 L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역;

[0109] (IIA)

[0110] (i) 서열번호 70의 H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 49의 H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 50의 H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 및

[0111] (ii) 서열번호 52의 L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 53의 L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 54의 L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역;

[0112] 또는

[0113] (IVA)

[0114] (i) 서열번호 72의 H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 73의 H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 74의 H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 및

[0115] (ii) 서열번호 76의 L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열, 서열번호 77의 L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열 및 서열번호 78의 L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역.

[0116] 본 발명에 있어서, "단클론성 항체 분자"는, 2개의 동일한 H쇄(중쇄)와 2개의 동일한 L쇄(경쇄)가 다이설파이드 결합에 의해 서로 결합된 테트라 펩타이드 사슬 구조의 면역 글로불린 분자를 의미한다. 항체 H쇄 및 L쇄의 N-말단에 측접하는 대략 110개의 아미노산 서열은, 고도로 가변성이고, 가변영역(Fv영역)으로서 알려져 있다. C 말단에 가까운 나머지의 부분의 아미노산 서열은 상대적으로 안정적이며, 불변영역으로서 알려져 있다. 가변영역은 3개의 초가변영역(HVR)과 상대적으로 보존된 4개의 프레임워크 영역(FR)을 갖는다. 3개의 초가변영역은, 항체의 특이성을 결정하고, 상보성 결정 영역(CDR)으로도 알려져 있다. 각 L쇄 가변영역(LCVR) 및 각 H쇄 가변영역(HCVR)은, 아미노 말단에서부터 카복실 말단으로, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4의 연속적인 순서로, 3개의 CDR 영역 및 4개의 FR영역으로 이루어진다. 3개의 L쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 지칭하고, 또 3개의 H쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 지칭한다. 항체 분자는, 비인간 항체 분자, 인간화 항체 분자 및 인간 항체 분자를 포함한다.

[0117] 본 발명에 있어서, "단리된"은, 그 본래의 천연 환경으로부터 단리된 시료를 의미한다. 예를 들어, 살아 있는 동물에게 존재하는 천연 유래 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리되어 있지 않지만, 천연의 계에 있어서 공존하는 시료의 일부 또는 전부로부터 인위적으로 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리된다.

[0118] 본 발명에 있어서, "단클론성 항체 분자의 유도체"는, 다이아바디 및 단쇄분자뿐만 아니라, "항원결합 단편"을 의미한다. "항원결합 단편"은, 항원결합 활성을 갖는 Fab 단편, Fab' 단편, $F(ab')_2$ 단편, 및 코리신과 결합하는 Fv 단편, scFv 단편을 지칭하고, 본 발명에서 규정되어 있는 항체에 있어서의 1개 이상의 CDR 영역을 포함할 수 있다. Fv 단편은, H쇄 가변영역, L쇄 가변영역, 및 불변영역을 가지지 않는 모든 항원결합 부위를 포함하는 최소의 항체 단편이다. 일반적으로, Fv 항체는, H쇄 가변영역과 L쇄 가변영역 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 더 포함하여, 항원 결합에 필요한 구조를 형성할 수 있다. 또한, 다른 링커가, 2개의 항체의 가변영역을 연결하는 데 이용되어, 단쇄항체 또는 단쇄 Fv(scFv)라고 명명되는 폴리펩타이드를 형성한다. 본 명세서에서는, 본 발명의 "항원결합 부위"는, 본 발명의 항체 또는 항원결합 단편에 의해 인식되는, 항원 상의 불연속인 3차원 부위를 지칭한다. 본 명세서에서는, "코리신을 특이적으로 인식하는"은, 코리신에 결합하는 능력을 지니는 것을 의미하고, 이것은 "코리신에 결합하는 항체" 또는 "코리신에 대한 항체"와 동의어이다.

[0119] 본 발명의 추가의 하나의 구체적인 실시형태는, 하기를 포함하는, 본 발명의 단클론성 항체를 H쇄 가변영역 및 돌연변이형으로 동정하는 B 시리즈 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것이다

[0120] (IB) 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 또는 서열번호 36의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역;

[0121] (IIB) 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 또는 서열번호 48의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역; 또는

[0122] (IVB) 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 또는 서열번호 71의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역.

[0123] 본 발명에 있어서, 돌연변이된 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체는, 돌연변이 없는 원래의 단클론성 항체 분자의 결합 특성 및 기능과 동등한 결합 특성 및 기능을 갖는다.

[0124] 본 발명의 추가의 하나의 구체적인 실시형태는, 하기를 포함하는, 본 발명의 단클론성 항체를 L쇄 가변영역 및 돌연변이형으로 동정하는 C 시리즈 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것이다:

[0125] (IC) 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 40의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역;

[0126] (IIC) 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 51의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역;

[0127] (IIIC) 서열번호 44의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 44의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역; 또는

[0128] (IVC) 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역, 또는 서열번호 75의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크 영역을 포함하는 L쇄 가변영역.

[0129] 본 발명에 있어서, 돌연변이된 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체는, 돌연변이 없는 원래의 단클론성 항체 분자의 결합 특성 및 기능과 동등한 결합 특성 및 기능을 갖는다.

[0130] 본 발명의 추가의 하나의 구체적인 실시형태는, 본 발명의 임의의 H쇄 가변영역 및 본 발명의 임의의 L쇄 가변영역을 갖는, 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것이다. 바람직한 H쇄 가변영역과 L쇄 가변영역의 조합은, 각각 단리된 단클론성 항체 클론 4A, 9A, 2A 및 21A의 조합이다. 구체적으로, 조합은 다음과 같다.

[0131] 항코리신 단클론성 항체 클론 4A: 단클론성 항체 (IA), (IB), (IC) 관련:

[0132] H쇄(4A-HC.7331): 서열번호 36

[0133] evqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTD AFYFSHSYwgqgvlvtvss 및

[0134] L쇄(4A-LC.7395): 서열번호 40

[0135] divmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrspkllivWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPL

Tfgsgtkleik

[0136] 항코리신 단클론성 항체 클론 9A: 단클론성 항체 (IIIC) 관련:

[0137] L쇄(9A-LC.7402): 서열번호 44

[0138] divmtqspssqavsagekvtmsckssQNLLYSEDKKNYlawyqqkpgqspkl liyWAStresgvpdrfigsgsgtdftltvtsvqaedlavyycQQYYNFPR Tfgggtklelk

[0139] 항코리신 단클론성 항체 클론 2A: 단클론성 항체 (IIA), (IIB), (IIC) 관련:

[0140] H쇄(2A-HC.7352): 서열번호 48

[0141] evklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtamyycAAEGFG TPFPYwgqgtlvtvss 및

[0142] L쇄(2A-LC.7413): 서열번호 51

[0143] divmtqtpssravsagekvtmsckssQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqspkl liyWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPR Tfgggtrlelk

[0144] 항코리신 단클론성 항체 클론 21A: 단클론성 항체 (IVA), (IVB), (IVC) 관련:

[0145] H쇄(KK1410-2_VH_pep): 서열번호 71

[0146] evklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIYYDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFG TPFPYwgqgtlvtvss 및

[0147] L쇄(KK1410-2_VL_pep): 서열번호 75

[0148] divmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspkl liyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPR Tfgggtrlelk.

[0149] 위에서 언급된 바와 같이, 본 발명의 단클론성 항체 분자는, 임의의 H쇄 가변영역 및/또는 임의의 L쇄 가변영역을 가질 수 있다. (IB), (IIB), (IVB), (IC), (IIC), (IIIC) 및 (IVC)에 있어서, 80%는, 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%이다. H쇄 가변영역 및 L쇄 가변영역은, "프레임워크 영역"(FR 또는 FW)이라 명명되는 더욱 보존된 영역이 "상보성 결정 영역"(CDR)이라 명명되는 고빈도 가변성의 영역으로 더욱 분할될 수 있는 돌연변이체이다.

[0150] 소정의 실시형태에서, 코리신에 대한 단클론성 항체 분자의 L쇄 또는 H쇄 가변 프레임워크는, 인간 컨센서스 서열에 유래하는 L쇄 혹은 H쇄 가변 프레임워크 잔기의 적어도 80%, 85%, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99%를 포함하는 L쇄 또는 H쇄 가변 프레임워크를 포함할 수 있다.

[0151] 본 발명의 추가의 하나의 구체적인 실시형태는, 본 발명의 임의의 돌연변이형 H쇄 가변영역, 및 본 발명의 임의의 돌연변이형 L쇄 가변영역을 갖는, 본 발명의 돌연변이형 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것이다. 돌연변이형 H쇄와 돌연변이형 L쇄 가변영역의 바람직한 조합은, 단리된 단클론성 항체 클론 4A, 9A, 2A 및 21A 각각의 조합이다. 구체적으로, 조합은 다음과 같다.

[0152] 항코리신 단클론성 항체 클론 4A: 단클론성 항체 (IA), (IB), (IC) 관련:

[0153] H쇄: 서열번호 36

[0154] evqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTD AFYFSHSYwgqgvlvtvss의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 및

[0155] L쇄: 서열번호 40

[0156] divmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrspkl liyWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPL Tfgsgtkleik의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역

[0157] 항코리신 단클론성 항체 클론 2A: 단클론성 항체 (IIA), (IIB), (IIC) 관련:

[0158] H쇄: 서열번호 48

[0159] evklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtamyycAAEGFG TPFPYwgqgtlvtvss의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 및

[0160] L쇄: 서열번호 51

[0161] divmtqtpssravsagekvtmsckssQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqspkllivWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPR Tfgggtrlelk의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 L쇄 가변영역

[0162] 항코리신 단클론성 항체 클론 21A: 단클론성 항체 (IVA), (IVB), (IVC) 관련:

[0163] H쇄: 서열번호 71

[0164] evklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIYYDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFG TPFPYwgqgtlvtvss의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역, 및

[0165] L쇄: 서열번호 75

[0166] divmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspkllivWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPR Tfgggtrlelk의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 H쇄 가변영역.

[0167] 본 발명의 추가의 하나의 구체적인 실시형태는, 본 발명의 임의의 돌연변이형 H쇄 가변영역 및 본 발명의 임의의 돌연변이형 L쇄 가변영역을 갖는, 본 발명의 돌연변이형 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것이다. 돌연변이형 H쇄와 돌연변이형 L쇄 가변영역의 바람직한 조합은, 단리된 단클론성 항체 클론 4A, 9A, 2A 및 21A의 조합이다. 구체적으로, 조합은 다음과 같다.

[0168] 항코리신 단클론성 항체 클론 4A: 단클론성 항체 (IA), (IB), (IC) 관련:

[0169] H쇄: 서열번호 36

[0170] evqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTD AFYFSHSYwgqgvlvtvss의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역, 및

[0171] L쇄: 서열번호 40

[0172] divmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrspkllivWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPL Tfgsgtkleik의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 L쇄 가변영역

[0173] 항코리신 단클론성 항체 클론 2A: 단클론성 항체 (IIA), (IIB), (IIC) 관련:

[0174] H쇄: 서열번호 48

[0175] evklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtamyycAAEGFG TPFPYwgqgtlvtvss의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역, 및

[0176] L쇄: 서열번호 51

[0177] divmtqtpssravsagekvtmscksSQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqspkllivWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPR Tfgggtrlelk의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 L쇄 가변영역

[0178] 항코리신 단클론성 항체 클론 21A: 단클론성 항체 (IVA), (IVB), (IVC) 관련:

[0179] H쇄: 서열번호 71

[0180] evklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIYYDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFG TPFPYwgqgtlvtvss의 H쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실,

삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 H쇄 가변영역, 및

[0181] L쇄: 서열번호 75

[0182] divmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspkllіyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPR Tfgggtrlelk의 L쇄 가변영역 아미노산 서열과 비교해서 1개 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 혹은 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 적어도 1개의 프레임워크(FW) 영역을 포함하는 L쇄 가변영역.

[0183] 본 발명의 단클론성 항체 분자는, 하이브리도마에 의해 생산된 항체, 또는 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 세포에 의해 생산된 유전자조작 항체일 수 있다. 본 발명의 단클론성 항체 분자, 본 발명의 임의의 H쇄 가변영역 및 본 발명의 임의의 L쇄 가변영역을 갖는 본 발명의 단클론성 항체 분자, 및 돌연변이형 단클론성 항체 분자는, 당해 기술분야에 있어서 기지의 방법에 의해 조제할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체 분자를 코딩하는 핵산분자를, 숙주세포 내에 도입할 수 있는 벡터에 혼입시킨다. 본 발명의 항체 분자는, 적어도 2개의 폴리펩타이드 사슬을 반드시 함유하므로, 이들의 사슬을 코딩하는 핵산은, 단일 벡터 또는 2개 이상의 벡터 중 어느 것인가에 존재시킬 수 있다. 2개 이상의 벡터가 사용될 경우, 이들 벡터는, 숙주세포 내에 함께 도입될 수 있다. 그러한 항체 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주세포는, 단백질이 발현되는 조건하에, 배양될 수 있다. 다음에, 발현된 항체 분자는, 세포가 배양된 배지로부터, 또는 세포 자체로부터 얻어질 수 있고, 당해 기술분야에 있어서 기지의 많은 적절한 수단 중 임의의 것에 의해 정제될 수 있다.

[0184] 본 발명에 있어서, 코리신-유발 아폽토시스는, 외인성 또는 내인성 경로의 활성화를 통해 일어난다(참고 문헌 25). 외인성 경로는, 막에 결합하는 사멸 수용체에 의해 매개되고 있고, 그 수용체는, 리간드가 결합해서 프로카스파제-8이 카스파제-8로 절단된 후, 세포내 사멸 도메인을 개재해서 세포내 사망 신호을 전달한다(도 5a)(참고 문헌 25). 내인성 경로는 미토콘드리아에 의해 조절된다. 아폽토시스 촉진 자극은, 미토콘드리아 막 투과성을 증가시키는 미토콘드리아 섭동을 일으키고, 아폽토시스 반복부 함유(BIRC) 단백질의 바큘로바이러스 저해제의 억제제 및 아폽토시스 촉진 인자를 방출시키고, 이들은 아폽토시스 형성에 기여하고, 프로카스파제-9를 카스파제-9로 절단시킨다(참고 문헌 26, 27). 카스파제-8과 카스파제-9의 절단형은, 아폽토시스의 실행 인자인 카스파제-3을 활성화시킨다(도 5a). 이들 일련의 아폽토시스 경로를 이용해서, 다양한 주지의 방법에 의해, 아폽토시스 활성을 조사할 수 있다. 본 발명의 항체 분자 또는 이의 유도체는, 바람직하게는, 코리신 중화 항체 분자 또는 이의 유도체이며, 보다 바람직하게는, 코리신-유발 아폽토시스를 중화 및/또는 저해하는 항체 분자 또는 이의 유도체이다.

[0185] <의약 조성물>

[0186] 본 발명의 일 실시형태는, 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체의 유효량을 함유하는, 급성 폐손상 또는 섬유증을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물에 관한 것이다.

[0187] 본 발명에 있어서, 급성 폐손상은, 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)을 야기해서 폐기능을 저하시키고, 호흡 관리를 필요로 하는 치명적 폐렴이다. COVID-19와 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)을 포함하는 중요한 인간 폐손상은, 폐섬유증의 후유증을 수반하는 급성 폐손상을 특징으로 한다.

[0188] 본 발명에 있어서, 섬유증은, 특발성 폐섬유증(IPF), 간경변, 신장섬유증, 낭포성 섬유증, 골수섬유증 및/또는 유선섬유증 등을 포함한다. 특히, 특발성 폐섬유증은 병인불명의 불치병이다. 허파꽈리 상피세포의 아폽토시스 증가와 이에 이어지는 이상 폐조직 수복이 그 진행의 중심이다. 본 발명자들은, 허파꽈리 상피세포의 아폽토시스를 유도하고, 폐섬유증의 급성 악화를 유발하는 펩타이드, 코리신을 동정함으로써, 본 발명을 발견하였다. 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체는, 중화 항체, 예를 들면 섬유증을 앓는 환자의 폐 또는 다른 조직에 있어서의 코리신의 부작용을 차단 또는 저해하는 항체일 수 있다.

[0189] 본 발명에 있어서, "치료"(혹은 처치라고도 칭함)는 (1) 질환 또는 병태의 발증을 지연 또는 예방하는 것; (2) 질환 또는 병태의 증상의 진행, 악화(exacerbation) 또는 악화(worsening)를 감속 또는 정지시키는 것; (3) 질환 또는 병태의 증상의 관해를 초래하는 것; 혹은 (4) 질환 또는 병태를 치유시키는 것을 목적으로 하는 방법 또는 과정을 의미한다. 치료는, 예방적 조치로서 질환 또는 병태의 발증 전에 시행될 수 있거나, 또는 대안적으로 치료는, 질환의 개시 후에 시행될 수 있다.

[0190] 본 발명에 있어서, "예방"은 염증성 및/또는 섬유증성 병태의 개시를 예방하는 것을 의미한다.

[0191] 본 발명에 있어서 "의약 조성물"은, 일반적으로, 질환 또는 병태의 처리, 치료 혹은 예방, 또는 검사 및 진단을

위한 약제를 의미한다.

[0192] 본 명세서에서 이용되는 "대상체" 또는 "환자"는, 동물을 의미하고, 그것은 치료, 관찰 또는 시험의 대상이 된다. 단순한 예시로서, 대상체는, 인간을 포함하는 포유 동물일 수 있다. 코리신에 대한 항체는, 바람직하게는 인간이므로, 단독으로 또는 의약 조성물로서 제공될 수 있다. 이 목적을 달성하기 위하여, 화합물은, 예방적 또는 치료적 목적에 따라서 다양한 의약적 제형으로 제조될 수 있다. 의약적 투여 형태의 예는, 경구 제형, 주사, 좌제, 연고, 고약 등이다. 이러한 투여 형태는, 당업자에게 주지이며, 통상의 방법에 의해 제형화될 수 있다.

[0193] 본 발명에 있어서, "의약 조성물"은, 안정제, 희석제, 분산제, 현탁제, 증점제 및/또는 부형제 등의 하나 이상의 다른 화학성분을 포함하는, 하나 이상의 코리신에 대한 항체를 함유한다. 의약 조성물은, 코리신에 대한 항체의 생물체에의 투여를 쉽게 한다. 코리신에 대한 항체를 투여하는 여러 기술, 예를 들어, 경구투여, 또는 국소투여, 정맥투여, 에어로졸 투여, 점안 투여 등의 비경구 투여가 알려져 있다.

[0194] 용어 "희석제"는, 수송 전에 소망의 약제(예를 들면 코리신에 대한 항체)를 희석시키는 데 이용되는 화합물을 지칭한다. 희석제는, 보다 안정한 환경을 제공할 수 있으음로 안정제에도 이용될 수 있다. pH를 제어 또는 유지할 수 있는 완충액에 용해된 염은, 희석제로서 유익하고, 이것는 인산완충 생리식염수를 포함한다.

[0195] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은, 치료되는 질환, 장애 또는 병태의 증상의 하나 이상의 정도를 완화시키기 위하여 투여되는 본 발명의 코리신에 대한 항체의 충분한 양을 의미한다. 그 결과, 질환의 징후, 증상 또는 원인을 경감 및/또는 완화시킬 수 있다. 예를 들면, 치료 용도에 있어서의 "유효량"은, 과도한 부작용이 없이, 소망의 약리효과, 치료적 개선 또는 질환 증상의 임상적으로 현저한 저감을 제공하는 데 필요한 코리신에 대한 항체의 양이다. "유효량"은, 코리신에 대한 항체의 대사, 유전학, 조합, 또는 대상체에 있어서의 연령, 체중, 전신 상태, 치료되는 조건, 치료되는 조건의 중증도, 및 처방 의사의 판단의 차이에 의해 대상체마다 달라질 수 있다.

[0196] "유효량"은 "예방적 유효량"을 포함하고, 이것은, 치료되는 질환, 병태 또는 장애의 증상의 하나 이상의 정도를 완화시키기 위하여 환자에 적용되는 본 발명의 코리신에 대한 항체의 양을 의미한다. 그러한 예방적 적용에 있어서, 그러한 양은, 대상의 건강 상태, 체중 등에 따라서 달라질 수 있다.

[0197] 단위제형의 각각에 혼입되는 코리신에 대한 항체의 양은, 대상체의 건강 상태 또는 제형제의 형태에 의해 달라질 수 있다. 바람직한 단위제형당의 양은, 경구투여에서는 대략 1 내지 1,000mg, 주사에서는 대략 0.1 내지 500mg이다. 1일당 용량은, 환자의 증상, 체중, 연령, 성별 및 다른 요인에 따라 달라지고, 통상의 범위는 1일당 성인에 대해 대략 0.1 내지 5,000mg, 바람직하게는 대략 1 내지 1,000mg이다. 제형은, 바람직하게는 단회 용량 또는 2 내지 4회의 분할 용량으로 투여된다.

[0198] 경구투여용의 고형 제형의 제형화를 위하여, 부형제, 및 필요에 따라, 결합제, 붕괴제, 윤활제, 착색제, 교정제, 향료 등이 항PD-1 제형에 첨가되고, 제형은 통상의 방법에 의해 정제, 코팅정제, 과립제, 분말제 또는 캡슐제 등으로 제형화된다. 이러한 첨가제는, 당업계에 있어서 주지이며, 유용한 예는, 락토스, 수크로스, 염화나트륨, 전분, 탄산칼슘, 카올린, 결정 셀룰로스 및 규산 등의 부형제, 물, 에탄올 프로판올, 단순한 시럽, 글루코스 용액, 전분 용액, 젤라틴 용액, 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필셀룰로스, 하이드록시프로필 전분, 메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 셀락, 인산칼슘 및 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제, 건조 전분, 아르긴산나트륨, 한천 분말, 탄산수소나트륨, 탄산칼슘, 라우릴황산나트륨, 스테아르산 모노글리세라이드 및 락토스 등의 붕괴제, 정제 탤크, 스테아르산염, 붕사 및 폴리에틸렌글리콜 등의 윤활제, 수크로스, 오렌지 껍질, 시트르산 및 타르타르산 등의 교정제이다.

[0199] 경구투여용 액체 제형의 제형화를 위하여, 교정제, 완충제, 안정제, 향료 등이 화합물에 첨가되고, 그 혼합물은, 통상의 방법에 의해 경구액제형, 시럽제 또는 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 유용한 교정제의 예는 상기와 같다. 완충제의 예는 시트르산나트륨 등이다. 안정제의 예는 트래거캔스, 아라비아검, 젤라틴 등이다. 비한정적 실시형태로서, 시럽제는, 이하에 나타낸 비율의 성분을 이용해서 통상의 방법에 의해 조제될 수 있다.

[0200] 주사제는, 코리신에 대한 항체에, pH조정제, 완충제, 안정제, 등장제, 국소마취제 등을 첨가함으로써, 통상의 방법으로, 피하, 근육내 또는 정맥 주사제로서 조제된다. pH 조정제 및 완충제의 예는, 시트르산나트륨, 아세트산나트륨, 인산나트륨 등을 포함한다. 안정제의 예는, 피로아황산나트륨, EDTA, 티오글리콜산 등을 포함한다. 국소마취제의 예는, 프로칼린 염산염, 리도카인 염산염 등을 포함한다. 등장제의 예는, 염화나트륨, 글루코스 등을 포함한다. 비한정적 실시형태로서, 주사제는, 이하에 나타낸 비율의 성분을 이용해서 통상의 방법으로 조

제될 수 있다.

[0201] 본 발명의 본 실시형태의 다른 양상은 급성 폐손상 또는 섬유증을 치료 또는 예방하기 위한 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체를, 그러한 치료 등을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 바람직하게는, 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체의 유효량을 그러한 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 방법에서, 급성 폐손상은 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)을 야기해서 폐기능을 저하시키고 호흡 관리를 필요로 하는 치명적 폐렴이거나, 또는 섬유증은 특발성 폐섬유증(IPF), 간경변, 신장섬유증, 낭포성 섬유증, 골수섬유증 및 유선섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0202] 또한, 본 발명의 다른 양상은, 급성 폐손상 또는 섬유증을 치료 또는 예방하기 위한 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에서, 급성 폐손상은 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)을 야기해서 폐기능을 저하시키고 호흡 관리를 필요로 하는 치명적 폐렴 폐렴이거나, 또는 섬유증은 특발성 폐섬유증(IPF), 간경변, 신장섬유증, 낭포성 섬유증, 골수섬유증 및 유선섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0203] 본 발명은 추가의 다른 양상은, 급성 폐손상 또는 섬유증을 치료 또는 예방하기 위한 의약을 제조하기 위한, 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체에서, 급성 폐손상은 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)을 야기해서 폐기능을 저하시키고 호흡 관리를 필요로 하는 치명적 폐렴 폐렴이거나, 또는 섬유증은, 특발성 폐섬유증(IPF), 간경변, 신장섬유증, 낭포성 섬유증, 골수섬유증 및 유선섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0204] <백신>

[0205] 본 발명의 다른 실시형태는, 아미노산 서열: IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)을 갖는 코리신의 서열 내의 1개 또는 여러 개의 돌연변이를 갖는 코리신 돌연변이체를 유효성분으로서 갖는, 급성 폐손상 또는 섬유증을 예방하기 위한 백신 조성물에 관한 것으로, 여기서 돌연변이체는 아폽토시스 활성을 나타내지 않는다. 바람직한 코리신 돌연변이체는 코리신 N14S: IVMPESSGNPNAVSPAGYR(서열번호 55) 및 코리신 P15A: IVMPESSGNPNAVNAAGYR(서열번호 56)이다.

[0206] 본 발명에 있어서, "백신 조성물"은, 특이적 면역반응(특이적 항체의 생산생)을 유도하는 항원을 포함하는 생물학적 제제를 의미한다. 본 발명에 있어서, 백신은, 변형될 수 있는 펩타이드를 포함할 수 있다. 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 코리신 돌연변이체는, 특정한 돌연변이 또는 아미노산위치의 변화에 의해 코리신의 아폽토시스 촉진 활성을 약화시키고, 그리고 항원성을 갖는다. 즉, 펩타이드는 코리신 펩타이드의 다른 위치에 있는 아미노산을 변화시키고, 아폽토시스를 유도하지 않지만, 프로-아폽토시스 코리신 펩타이드를 중화하는 항체를 유도하는데도 충분히 코리신과 유사하고 있는 펩타이드이다.

[0207] 본 발명에 있어서, 돌연변이는, "아미노산 잔기의 치환", "아미노산 잔기의 결실", "아미노산 잔기의 삽입" 또는 "아미노산 잔기의 부가"를 포함한다. "아미노산 잔기의 치환"의 예는 비보존적 아미노산 치환을 포함한다. "비보존적 아미노산 치환"은, 특정 아미노산을, 그 아미노산의 측쇄와 다른 성질의 측쇄를 갖는 아미노산으로 치환하는 것을 지칭한다. 구체적으로, 비보존적 아미노산 치환에서는, 특정 아미노산은, 그 특정 아미노산과는 상이한 그룹에 속하는 다른 아미노산으로 치환된다. 다른 성질의 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은, 당해 분야에 잘 알려져 있다. 이러한 예로서, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파라긴산, 글루탐산), 중성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 토레오닌, 티로신, 시스테인, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판)과 하는 같은 성질을 가진 아미노산 그룹과는 다른 그룹의 아미노산을 선택한다.

[0208] 또한, 중성 측쇄를 갖는 아미노산은, 또한, 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인) 및 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판)으로 분류할 수 있고, 이 경우에도, 다른 성질을 가진 그룹의 아미노산을 선택한다. 또한, 다른 그룹으로서, 예를 들어, 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 페닐알라닌, 트립토판, 티로신), 수산기(알코올성 수산기, 페놀성 수산기)를 포함하는 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 세린, 트레오닌, 티로신) 등도 이용할 수 있다.

[0209] "아미노산 잔기의 결실"은, 예를 들어, 코리신 펩타이드의 부분 서열 중에서 선택된 임의의 아미노산 잔기의 결

실을 포함한다. "아미노산 잔기의 삽입" 또는 "아미노산 잔기의 부가"는, 예를 들어, 코리신 펩타이드의 부분 서열의 내부에 아미노산 잔기를 삽입하거나, 또는 해당 부분 서열의 N-말단 측 또는 C-말단 측에, 아미노산 잔기를 부가시키는 것을 포함한다.

[0210] 본 발명의 이 실시형태의 다른 양상은, 급성 폐손상 또는 섬유증을 예방하기 위한 백신 요법에 관한 것으로, 여기서 해당 요법은 아미노산 서열: IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)을 갖는 코리신의 서열 내의 1개 또는 여러 개의 돌연변이 갖는 코리신 돌연변이체로서, 아폽토시스 활성을 나타내지 않는 해당 돌연변이체를, 그러한 치료 등을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 바람직하게는, 본 발명의 단클론성 항체 분자 또는 이의 유도체의 유효량을 그러한 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 코리신 돌연변이체는, 코리신 N14S: IVMPESSGNPNAVSPAGYR(서열번호 55) 및 코리신 P15A: IVMPESSGNPNAVNAAGYR(서열번호 56)이다.

[0211] 또한, 본 발명의 다른 양상은, 급성 폐손상 또는 섬유증을 예방하기 위한 백신 요법에 사용하는, 아미노산 서열: IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)을 갖는 코리신의 서열 내의 1개 또는 여러 개의 돌연변이 갖는 코리신 돌연변이체에 관한 것으로, 여기서 돌연변이체는 아폽토시스 활성을 나타내지 않는다. 본 발명의 추가의 양상은 급성 폐손상 또는 섬유증을 예방하기 위한 백신 요법에 사용하는 의약을 제조하기 위한, 아미노산 서열: IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)을 갖는 코리신의 서열 내의 1개 또는 여러 개의 돌연변이 갖는 코리신 돌연변이체의 용도에 관한 것으로, 여기서, 돌연변이체는 아폽토시스 활성을 나타내지 않는다.

[0212] <바이오 마커>

[0213] 본 발명은 다른 양상은, 코리신의, 급성 폐손상 또는 섬유증의 진행도를 판정하기 위한 바이오 마커로서의 용도에 관한 것이다. 코리신의 바이오 마커로서의 용도는, 섬유증을 소유하거나, 또는 발증하고 있다고 의심되는 대상체를 평가 또는 진단하는 것도 포함한다. 대상체로부터 생물학적 시료를 채취하고, 그 생물학적 시료 중에 존재하는 코리신의 양을 검출한다. 생물학적 시료 중의 코리신의 검출된 양은 1 이상의 미리 결정된 역치와 비교될 수 있다. 미리 결정된 역치는, 예를 들면 건강한 대상체에게 전형적인, 통상, 존재하는 코리신의 수준에 의거해서 설정될 수 있다.

[0214] 생물학적 시료는, 예를 들어, 담, 기관지 분비물, 흉수, 기관지 허파꽈리 세정액(BALF) 및 기관지 또는 폐로부터 채취된 조직일 수 있다. 생물학적 시료는 혈액일 수 있다. 여기에, 코리신은, 예를 들어, IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1), IVMPESGGNPNAVNPAGYR(서열번호 58), IIMPESGGNPNIVNPYGYS(서열번호 59), IVMPESGGNPNAVNPYGYR(서열번호 60), IVLPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 61), IVLPESSGNPNAVNELGYR(서열번호 62), IVMPESGGNPNAVNELGYR(서열번호 63), IVMPESSGNPNAVNELGYR(서열번호 64), IVMPESSGNPDAVNELGYR(서열번호 65), IAQRESGGDLKAVNPSSGA(서열번호 66) 또는 IAERESGGDLKAVNPSSGA(서열번호 67) 중 하나의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 바람직하게는, 코리신은, IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드이다.

[0215] 코리신은, 질량분석, 웨스턴 블로팅 또는 효소결합 면역흡착 검정법(예를 들어, ELISA)으로, 예를 들어, IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1), IVMPESGGNPNAVNPAGYR(서열번호 58), IIMPESGGNPNIVNPYGYS(서열번호 59), IVMPESGGNPNAVNPYGYR(서열번호 60), IVLPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 61), IVLPESSGNPNAVNELGYR(서열번호 62), IVMPESGGNPNAVNELGYR(서열번호 63), IVMPESSGNPNAVNELGYR(서열번호 64), IVMPESSGNPDAVNELGYR(서열번호 65), IAQRESGGDLKAVNPSSGA(서열번호 66) 또는 IAERESGGDLKAVNPSSGA(서열번호 67)의 아미노산 서열 중 어느 것인가의 아미노산 서열을 인식하는 항체에 결합한 코리신을 검출함으로써, 예를 들어, 표지된 항체를, 예를 들어, 기질에 결합하는 항체에 결합함으로써 검출할 수 있다. 이러한 방법을 실시하기 위한 키트는, 이러한 항체 및 생물학적 시료 중의 코리신의 검출을 수행하기 위한 하나 이상의 시약을 포함할 수 있다.

[0216] 이러한 양상에서, 본 발명은, 섬유화의 진행도를 판정하는 방법을 제공하되, 해당 방법은,

[0217] (a10) 대상체의 코리신의 양(테스트 바이오 마커량)을 측정하는 단계,

[0218] (b10) 테스트 바이오 마커량과 기준 코리신 양(대조 바이오 마커량)을 비교하는 단계 및

[0219] (c10) 테스트 바이오 마커량이 대조 바이오 마커량보다도 많을 경우에, 대상체를, 급성 폐손상 또는 섬유증의 진행도가 높다고 판정하는 단계를 포함한다. 기준 코리신 양은, (a10) 단계보다 전에 측정된 동일 대상체의 코리신의 양일 수 있거나, 건강한 대상체의 근섬유아세포의 코리신의 양일 수도 있다.

[0220] 본 발명자들은, 코리신이 섬유증-특이적 마커 분자이며, 이것이 섬유화 질환, 특히 중증의 섬유화 질환에 관련되어 있음을 발견하였다. 본 발명의 방법, 바이오 마커 및 코리신의 사용에 의해, 급성 폐손상 또는 섬유증의 진행도를 예측하는 것이 가능해지고, 급성 폐손상 또는 섬유증의 예방 또는 치료에 있어서 유익하다.

[0221] 본 명세서에서 이용되는 아미노산의 3문자 표기와 1문자 표기 간의 대응은 다음과 같다.

[0222] 알라닌: Ala: A

[0223] 아르기닌: Arg: R

[0224] 아스파라긴: Asn: N

[0225] 아스파라긴산: Asp: D

[0226] 시스테인: Cys: C

[0227] 글루타민: Gln: Q

[0228] 글루탐산: Glu: E

[0229] 글리신: Gly: G

[0230] 히스티딘: His: H

[0231] 아이소류신: Ile: I

[0232] 류신: Leu: L

[0233] 라이신: Lys: K

[0234] 메티오닌: Met: M

[0235] 페닐알라닌: Phe: F

[0236] 프롤린: Pro: P

[0237] 세린: Ser: S

[0238] 트레오닌: Thr: T

[0239] 트립토판: Trp: W

[0240] 티로신: Tyr: Y

[0241] 발린: Val: V

[0242] 이하, 본 발명을 참고예 및 실시예에 의해, 상세히 설명할 것이다. 이들은, 단순한 예시이며, 본 발명은, 특허청구범위에 기재된 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능하고, 이들도 본 발명의 범위 내에 포함되는 것에 유의해야 한다.

[0243] [실시예]

[0244] 참고 결과 1

[0245] 아폽토시스 촉진성 코리신-유사 펩타이드를 갖는 광범위한 병원체군

[0246] 본 발명자들은 이전에 스타필로코커스 네팔렌시스 CNDG 균주, 및 폐섬유증의 종말기 마우스 유래의 폐섬유증 표본을 접종한 배지에서 증식한 포도상구균종 (*Staphylococcus spp.*)의 혼합물로부터의 배양 상청액이, 허파꽈리 상피세포의 아폽토시스를 유도하는 것을 입증하였다(비특허문헌 19). 또한, 스타필로코커스 네팔렌시스로부터 방출되는 코리신이라 지칭되는 트랜스글리코실라제 단편이, 확립된 트랜스제닉 마우스에 있어서의 폐상피세포 아폽토시스의 원인이며, 만성폐섬유증의 급성 악화를 일으키는 것을 보고하였다(비특허문헌 19). 코리신 또는 이의 유도체의 서열은 포도상구균족의 많은 구성원 간에 고도로 보존되어 있으므로(비특허문헌 19), 스타필로코커스 네팔렌시스에 부가해서, 다른 포도상구균의 종도 트랜스글리코시다제로부터 코리신-유사 펩타이드를 방출하여, 폐상피세포에 있어서 아폽토시스를 유도하는 것이라고 예상하였다.

[0247] 이 예상을 검증하기 위하여, 폐섬유증 표본을 접종한 배지에 있어서 증식시킨 포도상구균종의 혼합물을 선조접종하고, 각각의 세균 콜로니를 단리하였다. 얻어진 12개의 콜로니를 스크리닝하였다. 균주 1, 7 및 12의 3개의 콜로니가 아폽토시스 인자를 분비하고, 나머지의 단리체에서는 아폽토시스 활성이 검출되지 않았다. 이들 결과는, 이미 발견된 균주 6의 배양물(비특허문헌 19)은 아폽토시스 촉진성 세균과 비아폽토시스 세균의 혼합물이었던 것을 나타내고 있다. 전체 게놈 서열을 결정하면, 이들 3개의 아폽토시스 세균 단리체가 스타필로코커스 혜

몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*)의 별개의 균주인 것을 나타내었다. 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 균주 1, 7 및 12의 전체 게놈 서열은 Genbank 데이터베이스에서, 수탁번호가 할당되어 기탁되어 있었다. 이들 게놈 분석은, 균주 1(트랜스글리코실라제_1bp_353), 균주 7(트랜스글리코실라제_7bp_350) 및 균주 12(트랜스글리코실라제_12bp_350)에 있어서 보존되어 있는 코리신-유사 단편의 존재를 나타냈다(도 1). 각 균주의 대응하는 트랜스글리코실라제(비특허문헌 19)에 있어서, 코리신-유사 단편의 서열은 동일하였다(도 1).

[0248] 다음에, 각 세균주의 세균 배양 상청액의 존재 하에 A549 허파꽈리 상피세포를 배양하여, 아폽토시스를 평가하였다. 각 균주의 배양 상청액은, 허파꽈리 상피세포의 아폽토시스를 유도하였다(도 2a, b). 투과형 전자현미경에 의해, 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 균주 12의 배양 상청액으로 처리한 후의 아폽토시스 세포가 증가하고 있는 것이 확인되었다(도 2c). 각 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 균주 유래의 배양 상청액의 존재 하에 배양한 A549 허파꽈리 상피세포도, 카스파제-3의 절단의 유의한 증가를 보였다(도 2d, e). 제조사(ThermoFisher Scientific)에 의해 조제된 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 코리신-유사 서열의 합성 펩타이드는, 공개된 서열(비특허문헌 19)과 비교해서 단일 위치에서만 상이했지만, 이것은, A549 폐상피세포에 대한 각 균주(균주 1, 7 및 12)의 상청액의 아폽토시스 촉진 효과를 재현하였다(도 3a, b, c). 스타필로코커스 헤몰리티쿠스는 공생 세균이지만, 이것은 잘 알려진 기회감염 및 다제 내성 병원체이다(참고 문헌 20). 이 세균은, 산소 및 염(10% NaCl)의 조건하에 더욱 최적으로 성장한다(참고 문헌 21). 스타필로코커스 헤몰리티쿠스를 원인으로 하는 인간 감염증은 패혈증, 복막염, 심장내막염, 수막염 및 창상, 뼈 및 요로 감염증을 포함한다. 흥미롭게도, 본 명세서에서 단리된 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 균주 유래의 트랜스글리코실라제 동족체의 코리신-유사 서열은, 마이코박테로이데스 압세수스 아종 압세수스(*Mycobacteroides abscessus subsp. abscessus*)(Genbank 단백질 수탁 번호 SKR 69498.1) 및 리스테리아 모노사이토게네스(Genbank 단백질 수탁 번호 ECO 1693478.1) 균주 유래의 트랜스글리코실라제에서 관찰된 서열과 동일하다(도 4). 리스테리아 모노사이토게네스는, 가장 독성이 강한 식품매개 병원체이며(참고 문헌 22), 마이코박테로이데스 압세수스 아종 압세수스(참고 문헌 23)는, 일반적으로 만성 폐감염증을 야기하는 다제 내성의 비결핵성 마이코박테륨이다. 리스테리아 모노사이토게네스 및 마이코박테로이데스 압세수스 아종 압세수스의 다른 균주 유래의 상동 트랜스글리코실라제 및 기회감염 병원체인 웨이셀라 콘푸사(참고 문헌 24) 유래의 가상성 단백질은 또한 아폽토시스 촉진 활성을 갖는 코리신-유사 서열을 포함한다(도 3 a, b, c). 이들 관찰 사항은, 광범위한 병원체가 이 독성 펩타이드의 유도체를 담지하고 있는 것을 나타낸다.

[0249] 참고 결과 2

[0250] 세균 배양 상청액 및 코리신에 의한 세포내 아폽토시스 경로의 활성화

[0251] 도 5a는 아폽토시스의 외인성 또는 내인성 경로를 나타낸다. A549 허파꽈리 상피세포를, 에스. 헤몰리티쿠스 균주 12의 (1/10 희석) 배양 상청액의 존재 하에 24시간 배양하였다. 절단된 카스파제-8, 절단된 카스파제-9 및 절단된 카스파제-3에 대한 양성의 세포의 백분율을 플로우 사이토메트리에 의해 결정하고, 정량화하였다. 에스. 헤몰리티쿠스의 배양 상청액은, 대조 자극과 비교해서, 활성화 카스파제-8 및 활성화 카스파제-3을 갖는 허파꽈리 상피세포의 수를 유의하게 증가시키는 것을 발견하였다(도 5b).

[0252] 다음에, Bax 등의 아폽토시스 촉진 인자 및 항아폽토시스 인자 BIRC1, BIRC5, BIRC7, Bc12, BclXL, 사이클린 D1, 증식 세포핵항원, 증식 Ki-67에 대한 마커의 mRNA 발현에 대한 코리신의 작용을 조사하였다. A549 허파꽈리 상피세포를 50μM 코리신의 존재 하에 24시간 배양하고, 전체 mRNA를 추출하고, cDNA를 조제하고 나서 RT-PCR에 의해 증폭하였다. 그 결과, 코리신은, 항아폽토시스 인자의 mRNA 발현을 유의하게 저하시키고, 그리고 스크램블 펩타이드와 비교해서, Bax 등의 아폽토시스 촉진 인자 및 아폽토시스 프로테아제 활성화 인자-1(APAF-1)의 mRNA 발현을 유의하게 증가시키는 것도 발견하였다(도 6, 표 1). 이들 결과는, 세균 유래 펩타이드가 아폽토시스의 내인성 경로를 선택적으로 활성화시키는 것을 나타내고 있다.

[0253] [표 1-1]

표 1: RT-PCR에서 사용된 프라이머

유전자		서열 (5' -> 3')	길이	Tm	기준	위치	크기
BIRC 1	센스 가닥	TACGAAGAACTACGGCT GGAC (서열번호 2)	21	61.2	NM_0045 36	829-8 49	180 bp
	안티센스 가닥	GGTGTGATCGTCTAATG GGTCA (서열번호 3)	22	61.5		1006-9 87	
BIRC 2	센스 가닥	GTTCAGTGGTTCTTACT CCAGC (서열번호 4)	22	60.6	NM_0011 66	444-4 65	91 bp
	안티센스 가닥	ACTGTAGGGGTTAGTC CTCGAT (서열번호 5)	22	61.4		534-5 13	
BIRC 3	센스 가닥	TTTCCGTGGCTCTTATT CAAACT (서열번호 6)	23	60.2	NM_0011 65	399-4 21	96 bp
	안티센스 가닥	GCACAGTGGTAGGAAC TTCTCAT (서열번호 7)	23	61.9		494-4 72	
BIRC 4	센스 가닥	TATCAGACACCATATAC CCGAGG (서열번호 8)	23	60.2	NM_0011 67	446-4 68	98 bp
	안티센스 가닥	TGGGGTTAGGTGAGCA TAGTC (서열번호 9)	21	60.7		543-5 23	
BIRC 5	센스 가닥	AGGACCACCGCATCTC TACAT (서열번호 10)	21	62.5	NM_0010 12270	44-64	118 bp
	안티센스 가닥	AAGTCTGGCTCGTTCTC AGTG (서열번호 11)	21	61.7		161-1 41	
BIRC 6	센스 가닥	TGCACAGTTTCCTTGTA CGGA (서열번호 12)	21	61.6	NM_0162 52	1128-11 48	207 bp
	안티센스 가닥	GAGCTTGGGTCTCCTG ATAGAA (서열번호 13)	22	60.6		1334-13 13	

[0254]

[0255] [표 1-2]

BIRC7	센스 가닥	GCTCTGAGGAGTTGCGTCTG (서열번호 14)	20	62.5	NM_139317	254-273	245 bp
	안티센스 가닥	CACACTGTGGACAAAGTCTCTT (서열번호 15)	22	60.1		498-477	
BIRC8	센스 가닥	GCGCTCAGAAAGACACTACAG (서열번호 16)	21	60.7	NM_033341	464-484	93 bp
	안티센스 가닥	CCTCTTGCAGACGCCTTAGC (서열번호 17)	20	62.9		556-537	
GAPDH	센스 가닥	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT (서열번호 18)	21	61.6	NM_001256799	108-128	197 bp
	안티센스 가닥	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG (서열번호 19)	23	60.9		304-282	
BCL2	센스 가닥	GCCTTCTTTGAGTTCGGTGG (서열번호 20)	20	60.9	NM_000657	445-464	53 bp
	안티센스 가닥	ATCTCCCGGTTGACGCTCT (서열번호 21)	19	62.7		497-479	
BAX	센스 가닥	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG (서열번호 22)	21	62.1	NM_138763	116-136	155 bp
	안티센스 가닥	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT (서열번호 23)	21	61.9		270-250	
BCL-XL	센스 가닥	GACTGAATCGGAGATGGAGACC (서열번호 24)	22	61.6	NM_001191	120-141	179 bp
	안티센스 가닥	GCAGTTCAAACTCGTCGCCT (서열번호 25)	20	63.0		298-279	
APAF1	센스 가닥	GTCACCATACATGGAATGGCA (서열번호 26)	21	60.1	NM_181868	448-468	177 bp

[0256]

[0257] [표 1-3]

	안티센스 가닥	CTGATCCAACCGTGTGCAAA (서열번호 27)	20	60.9		624-605	
CCND1	센스 가닥	CAATGACCCCGCACGATTTC (서열번호 28)	20	61.7	NM_053056	461-480	146 bp
	안티센스 가닥	CATGGAGGGCGGATTGGAA (서열번호 29)	19	61.8		606-588	
PCNA	센스 가닥	ACACTAAGGGCCGAAGATAACG (서열번호 30)	22	61.8	NM_002592	265-286	209 bp
	안티센스 가닥	ACAGCATCTCCAATATGGCTGA (서열번호 31)	22	61.2		473-452	
MKI67	센스 가닥	AGAAGAAGTGGTGCTTCGGAA (서열번호 32)	21	61.3	NM_002417	1936-1956	202 bp
	안티센스 가닥	AGTTTGCGTGGCCTGTACTAA (서열번호 33)	21	61.7		2137-2117	
CASP3	센스 가닥	CATGGAAGCGAATCAATGGACT (서열번호 34)	22	60.7	NM_004346	64-85	139 bp
	안티센스 가닥	CTGTACCAGACCGAGATGTCA (서열번호 35)	21	60.6		202-182	

[0258]

[0259] [표 중,

[0260] BIRC, 아폽토시스 반복부 함유(BIRC) 단백질의 바큘로바이러스 저해제;

[0261] GAPDH, 글리세르알데하이드 3-인산 데하이드로게나제;

[0262] Bcl-2, B세포 림프종2;

[0263] Bax, Bcl-2 관련 X단백질;

[0264] BclXL: B세포 림프종-과잉 라지(B-cell lymphoma-extra large);

[0265] APAF-1: 아폽토시스 프로테아제 활성화 인자1;

[0266] CCND1, 사이클린 D1;

[0267] PCNA, 증식 세포 핵항원;

[0268] MPKi-67, 증식 마커 Ki-67]

[0269] 참고 결과 3

[0270] 세균 분비 인자에 있어서의 코리신-함유 트랜스글리코실라제 분해능 및 폐상피세포의 아폽토시스 유도 능력

[0271] 본 발명자들은, 아폽토시스 펩타이드인 코리신이, 에스. 네팔렌시스 트랜스글리코실라제로부터 절단되어, 폐섬유증의 AE를 유도할 가능성이 있는 것을 이전에 보고하고 있다(비특허문헌 19). 이 절단에 관련되는 인자는 미지이다. 여기에서는, 코리신배출 세균이 각각의 트랜스글리코실라제로부터 아폽토시스 펩타이드를 절단하는 프로테아제를 분비된다고 예상하였다(도 7a). 이 예상을 검증하기 위하여, 우선 에스. 네파렌시스 CNDG 균주의 배양 상청액으로부터 펩타이드 분획을 부분 정제하였다. 에스. 네팔렌시스의 배양 상청액을 50kDa 초과 필터를 이용해서 연속적으로 농축시키고, 이어서 통과(<50 kDa) 분획을 10kDa 초과 필터를 이용해서 농축시켰다(도 7b). 농축된 분획을 Sephacryl S-300 칼럼에 부하하고, 겔 전기영동에 의해 산물을 분리한 후, 코리신-함유 재조합 트랜스글리코실라제에 대한 채취 분획의 소화 활성을 측정하였다(도 7c). 높은 소화 활성을 갖는 분획을 풀링하고(pool), 농축시켰다. Sephacryl S-300 칼럼에 2회째 부하를 행하고, 소화 활성이 높은 분획을 분리시켰다(도 7d).

[0272] 다음에, 소화 완충액, 재조합 트랜스글리코실라제, 및 스타필로코커스 네팔렌시스 배양 상청액으로부터 조제한

다양한 양의 펩티다제 분획(>10kDa)을 포함하는 반응 혼합물을 37℃에서 2시간 인큐베이션하였다. 이어서 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 행하고 나서, 은염색으로 염색하였다. 또한, 소화 완충액, 재조합 트랜스글리코실라제, 및 스타필로코커스 네팔렌시스 배양 상청액으로부터 조제한 펩티다제 분획(>10kDa)의 용량을 포함하는 반응 혼합물을, 다양한 시간 간격으로 37℃에서 인큐베이션하였다. 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔을 행하고 나서, 은염색으로 염색하였다. 그 결과, 겔의 은염색은, 재조합 트랜스글리코실라제의 용량- 및 시간-의존적 분해를 나타내었다(도 8a, b). 다른 실험으로서, 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 배양 상청액의 트랜스글리코실라제의 분해 작용을 조사하였다. 소화 완충액, 재조합 트랜스글리코실라제, 및 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 균주 12의 배양 상청액을 포함하는 반응 혼합물을 37℃에서 14시간 인큐베이션한 후, 이어서 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 행하고 나서, 은염색으로 염색하였다. 그 결과, 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 배양 상청액도, 재조합 트랜스글리코실라제를 절단하는 것을 나타내었다(도 9). 다음에, A549 허파꽈리 상피세포를 서브컨플루언트까지 배양하여다. 그 배양 세포를, 스타필로코커스 네팔렌시스의 세균 상청액 중의 재조합 트랜스글리코실라제를 2시간 인큐베이션해서 조제한 분해 산물로 처리하였다. 그 결과, 세포배양 48시간 후에 실시한 플로우 사이토메트리 분석에 의해, 대조군과 비교해서, 분해 산물의 존재하에 배양한 상피세포의 아폽토시스가 유의하게 증가하고 있는 것으로 밝혀졌다(도 8c, d). 이들 결과는, 프로테아제와 같은 세균 분비 인자가 트랜스글리코실라제를 절단하고, 그에 의해서 폐상피세포의 아폽토시스를 유도하는 코리신 펩타이드를 제공하는 것을 나타내고 있다.

[0273] 참고 결과 4

[0274] 트랜스글리코실라제를 절단하는 세균 분비 인자: 추정 세린 프로테아제

[0275] 트랜스글리코실라제 절단 인자가 프로테아제인지의 여부를 결정하기 위하여, 재조합 트랜스글리코실라제(2mg/mL), 스타필로코커스 네팔렌시스의 배양 상청액으로부터 조제한 펩티다제 분획(>10kDa)을 포함하는 반응 혼합물에, 세린 프로테아제 저해제로서의 Pefabloc SC 또는 다이아이소프로필플루오린산(DFP); 시스테인 프로테아제 저해제로서의 E-64; 또는 킬레이팅제로서의 에틸렌다이아민 사아세트산(EDTA)을 다양한 농도(0.1, 0.3, 1mM)로 첨가하고, 0.5, 1 및 2시간, 37℃에서 인큐베이션하였다. 그 결과, 은염색에 의한 단백질 겔 상에서 산물을 분리한 후, 세린 프로테아제 저해제 Pefabloc SC 및 DFP가 트랜스글리코실라제 분해를 억제하는 것을 발견하였다(도 10a, b, c 및 d). 그러나, E-64도 EDTA도, 트랜스글리코실라제 분해를 억제하지 않았다(도 10e, f, g 및 h). 이들 결과는, 스타필로코커스 네팔렌시스가 분비되는 추정 세린 프로테아제가 코리신-함유 트랜스글리코실라제를 분해시켜, 코리신을 포함하는 보다 작은 펩타이드를 형성하는 것을 나타내고 있다.

[0276] 재료 및 방법

[0277] 본 명세서의 실시예에서 사용하는 참고 결과, 시약 등은, 다음과 같이 해서 입수거나 또는 조제하였다.

[0278] 시약:

[0279] 인간 폐상피세포주 A549 및 과염 배지(ATCC media 1097, 2168)를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection((미국) 버지니아주 머내서스)로부터, 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)를 Sigma-Aldrich((미국) 미주리주 세인트루이스 소재)로부터, 소 태아혈청(FBS)을 Bio Whittaker((미국) 메릴랜드주 워커스빌 소재)로부터 구입하였다.

[0280] L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신은 Invitrogen(캘리포니아주 칼즈배드 소재)으로부터 구입하였다.

[0281] 합성 코리신 및 대응하는 합성 스크램블 펩타이드: NRVYNGPAASPVSEGMPIN(서열번호 1)은, Peptide Institute Incorporation(오사카시 소재) 및 ThermoFisher Scientific(매사추세츠주 월섬 소재)에 의해 조제하여 제공하였다.

[0282] 블레오마이신(BLM)은, Nippon Kayaku(일본 도쿄 소재)로부터, ALZET 삼투압 미니펌프(모델 2001)는, Alza Corporation(캘리포니아주 팰로앨토 소재)으로부터 구입하였다. 여기서, 스크램블 펩타이드는, 아미노산 서열을 해체시켜 기능을 없앤 펩타이드이다. 구체적으로, 코리신의 아미노산 서열의 해체로 인해 기능을 잃게 된 펩타이드이다.

[0283] 동물:

[0284] 실험 동물로서, 일본 SLC(일본 하마마츠시 소재)로부터 암컷 WT C57BL/6J 마우스를 구입하고, 폐손상, 폐섬유증 및 급성 악화를 유발시켰다(참고 문헌 29). 체중 20 내지 22g 및 8 내지 9주령의 WT 마우스를 BLM-유발 폐섬유증 실험에 이용하였다. 또한, 자연히 진행하여 치사적인 폐섬유증을 발증하는 C57BL/6J 배경의 암컷 및 수컷의

트랜스포밍 β1(TGFβ1) TG 마우스와 이의 WT 한배 새끼를 이용하였다(비특허문헌 19, 참고 문헌 31 및 61). TG 마우스와 WT 한배 새끼의 체중은 20 내지 24g이고, 8 내지 10주령이었다. 마우스는, 미에대학(Mie University)의 실험 동물시설에서, 21℃, 12시간 명암 사이클의 특정 병원체 무함유 환경에서 사육하였다. 마우스의 케이지에는 목재-양모 보금자리 재료를 공급하고, 마우스는 자유롭게 물과 음식물에 접근할 수 있었다. TG 마우스는, 마우스의 꼬리로부터 단리시킨 DNA 및 특이적 프리머쌍을 이용해서, 표준 PCR분석에 의해 유전자형을 결정하였다(비특허문헌 19).

[0285] 윤리적 성명:

[0286] 재조합 DNA 실험 안전위원회(인가번호: I-614(henko 1); 날짜: 2013/15/12; 인가번호: I-708, 날짜: 13/02/2019) 및 미에대학동물실험 위원회는, 실험 계획서(인가번호: 25-20-hen 1-sai 1, 날짜: 23/07/2015; 인가 번호 29-23, 날짜 15/01/2019)를 승인하였다. 모든 실험 순서는, 국립위생연구소(https://olaw.nih.gov/)에 의해 공표된 국제적으로 승인된 실험 동물 케어 원칙에 따라서 실시하였다. 연구는, 동물연구를 위한 ARRIVE 가이드 라인을 따르고 있고, 변수는 처치군의 맹검하에 측정하였다.

[0287] 펩티다제 분획의 조제:

[0288] 연속적으로 농축시킨, 100mL의 스타필로코커스 네팔렌시스 배양 상청액을 50kDa 초과의 필터를 이용해서 조제하고, 얻어진 통과 분획을 10kDa 초과의 필터를 이용해서 도 7b에 예시된 바와 같이 농축시켰다. 다음에, 10kDa 초과로 농축시킨 시료를 Sephacryl S-300 칼럼에 부하하고, 몇개의 분획(각 1mL)을 분리하였다. 코리신-함유 재조합 트랜스글리코실라제 상의 각 분획의 단백질분해 활성의 산물을, 도데실황산나트륨 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동과 은염색에 의해 분리하였다(도 7c). 은염색은 Daiichi 2-D 은염색 키트(Daiichi(도쿄 소재))를 이용해서 행하였다. 반응 혼합물은, 1×소화 완충액(20mM TrisCl, 140mM NaCl, pH7.5) 0.5μL, 2 mg/mL 재조합 트랜스글리코실라제 및 각 분획 6μL를 함유하고 있었다. 다음에, 높은 소화 활성을 갖는 분획(도 7 c의 분획 10 내지 13)의 풀(pool)을 조제하고, 0.5 mL로 농축시켰다. 다음에, 농축 시료를 Sephacryl S-300 칼럼에 부하하고, 몇개의 분획으로 분리하고, 280nm에서 흡광도를 측정하였다(도 7d). 다음에, 재조합 트랜스글리코실라제 351 상의 각 분획의 소화 활성을, 위에서 기재된 바와 같이 평가하였따(도 7d). 실험에서는, 단백질분해 활성이 높은 분획을 이용하였다.

[0289] 재조합 트랜스글리코실라제 분해 검정:

[0290] 반응 혼합물 50μL에 재조합 트랜스글리코실라제(12.5μL; 2μg/mL), 10×소화 완충액(TrisCl, 1.4 NaCl, pH 7.5) 5μL, 스타필로코커스 네팔렌시스 배양 상청액 25μl 및 증류수 7.5μL를 첨가하였다. 반응 혼합물을 37℃에서 하룻밤 인큐베이션하고, 이어서, 반응 혼합물 10μL를 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 적용시켜, 산물을 은염색으로 가시화하였다. 별도의 실험에서, 스타필로코커스 네팔렌시스 배양 상청액, 항코리신 단클론성 항체 또는 아이소타입 항체의 여러 양을 반응 혼합물에 첨가하고, 그 후의 은염색을 위하여 SDS-PAGE 상에서 가동시켰다.

[0291] 트랜스글리코실라제 분해 저해 검정:

[0292] 재조합 트랜스글리코실라제(2μg/mL)를 포함하는 소화 완충액, 스타필로코커스 네팔렌시스 배양 상청액, 다양한 농도(0.1, 0.3, 1mM)의 세린 프로테아제 저해제(Pefabloc SC 또는 다이아이소프로필플루오린산[DFP]), 시스테인 프로테아제 저해제(E-64) 또는 킬레이팅제(에틸렌다이아민 사아세트산[EDTA])의 반응 혼합물을 조제하였다. 다음에, SDS-PAGE와 은염색을 행하기 전에, 혼합물을, 0.5, 1 및 2시간 인큐베이션하였다.

[0293] 세포배양:

[0294] 인간 A549 허파꽈리 상피세포의 배양을, 10% 소태아혈청, 0.03%(w/v) L-글루타민, 100 IU/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 보충한 DMEM 중에서, 5% CO2 가습분위기 중, 37℃에서 행하였다.

[0295] 아폽토시스 검정:

[0296] A549 세포(4×105개 세포/웰)을 12웰 플레이트에서 서브컨플루언트까지 배양하고, 24시간의 혈청기아시켰다. 다음에, 48시간 후의 아폽토시스를 평가하기 위하여 코리신 또는 코리신-유사 펩타이드, 혹은 코리신 서열에 의거한 스크램블 펩타이드로 처치하였다. 아폽토시스는, 플로우 사이토메트리(영국 옥스퍼드 소재, BD Biosciences, FACScan)에 의해, 플루오레세인-표지 아넥신 V와 요오드화프로피듐(FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI, Bioelgend, 캘리포니아주 샌디에고 소재) 염색 후에 평가하였다. 절단된 카스파제-8, 절단된 카스파제-9 및 절단형 카스파제-3에 관해서 양성 세포의 비율을, Cell signaling Technology((미국) 매사추세츠주 비벌

리 소재) 유래의 항체를 이용한 플로우 사이토메트리에 의해 평가하였다.

[0297] 아폽토시스 세포의 투과형 전자현미경 관찰

[0298] A549 세포(10×104개 세포/mL)를 콜라겐 피복 8-웰 챔버 슬라이드(BD Bioscience, 캘리포니아주 산호세 소재) 상에 평판배양하고, 세미컨플루언트할 때까지 배양하였다. 세포를 6시간 혈청기아시키고, 아폽토시스 촉진 펩타이드(5μM)로 16시간 자극하였다. 세포를, 0.1M 카코딜산나트륨 완충액(pH 7.4) 중, 2% 신선한 포름알데하이드 및 2.5% 글루타르알데하이드에서 실온에서 2시간 고정하였다. 0.1M 카코딜산 완충액(pH 7.4)으로 세정 후, 1% OsO4를 동일 완충액 중 4℃에서 2시간 후 고정하고, 증류수에서 헹구고, 1% 아세트산우라닐 수용액에서 실온에서 2시간 또는 하룻밤 염색하고, 에탄올과 프로필렌 옥사이드로 탈수하고, Epon(Epon 812 수지, Nacalai) 중에 포매하였다. 유리로 세포를 제거한 후, 초박절편(94nm)을 절단하고, 아세트산우라닐 및 Reynolds의 시트르산납으로 염색하고, 투과형 전자현미경(일본 도쿄 소재, JEOL, JEM-1010)하에 관찰하였다.

[0299] 트랜스글리코실라제 분해 산물의 활성의 평가

[0300] A549 허파꽈리 상피세포(2×105개 세포/웰)를 12웰 플레이트에서 컨플루언트까지 배양하였다. 하룻밤 혈청기아 후, 5μM 재조합 트랜스글리코실라제 351, 1/10용량의 스타필로코커스 네팔렌시스 상청액 및 5μM 항코리신 단클론성 항체 또는 아이소타입 항체를 포함하는 반응 혼합물을, 세포 배양물에 첨가하고, 48시간 인큐베이션하였다. 전술한 바와 같이, 아폽토시스를 평가하였다.

[0301] 게놈 DNA 서열결정 및 게놈 아노테이션(Genome Annotation)

[0302] 게놈 서열결정은, 이전의 보고(비특허문헌 19)와 마찬가지로, Oxford Nanopore 서열결정과 Illumina Miseq Nanopore 서열결정의 조합을 사용해서 행하였다. 간단히 말하면, 각 세균주(400ng) 유래의 게놈 DNA를, Rapid Barcoding library kit SQK-RAD 004를 이용해서 나노포어 라이브러리로 변환하고, 얻어진 라이브러리에 대해서, GridION 시퀀서(sequencer)를 이용해서, SpotON R 9.4.1 FLOMIN-MIN 106 플로우 셀상에서 48시간 서열결정하였다. 판독물의 대부분은 6kb 내지 30kb의 길이이었지만, 94kb의 길이의 판독물도 얻어졌다. Illumina Miseq 서열결정은, Kapa Biosystems(Roche)로부터의 Hyper Library 구축 키트를 이용해서 샷건 게놈 라이브러리(shotgun genomic library)를 조제함으로써 행하였다. 라이브러리를 qPCR에 의해 정량화하고, 하나의 MiSeq Nano 플로우 셀 상에서 251사이클에 걸쳐서 서열결정하였다. Fastq 파일은, bcl2 fastq v 2.20 변환 소프트웨어(Illumina)로 생성 및 분리하였다.

[0303] Canu(참고 문헌 62)를 이용해서, Oxford Nanopore 데이터의 최초의 어셈블리를 행하였다. 이어서, Nanopolish(참고 문헌 63)와 Pilon(Illumina MiSeq 판독물의 이용)(참고 문헌 64)을 이용해서 정교화(refining)를 행하고, 최후에 Circlator(참고 문헌 65)를 이용해서 게놈을 재배향시켰다. SPAdes(참고 문헌 66)를 이용해서 다른 하이브리드 게놈 어셈블리를 수행하고, 이어서 Circlator를 이용해서 게놈을 재배향시켰다. 또한, Unicycler(참고 문헌 67)를 이용해서 하이브리드 게놈 어셈블리를 수행하였다. Canu 어셈블리를 어셈블리 골격으로 하는 Unicycler를 이용해서, 최종적인 하이브리드 게놈 어셈블리를 제작하였다.

[0304] 모든 어셈블리를 BUSCO(참고 문헌 68)와 QUAST(참고 문헌 69)를 사용해서 품질평가하고, MUMmer(참고 문헌 70)를 이용해서 관련되는 참조 게놈과 비교하였다. 게놈 어셈블리는, 툴(tool) Prokka(참고 문헌 71)를 이용해서 아노테이션(주석 기입)하고, 평가 후, 최선의 전체적 BUSCO 스코어를 전체적 어셈블리 측정 기준과 조합시키는 것에 의해, 최선의 전체적 어셈블리를 결정하였다.

[0305] 실시예 1

[0306] 항코리신 중화 단클론성 항체에 있어서의 트랜스글리코실라제 분해 산물에 의해 유도되는 폐세포 아폽토시스의 저해

[0307] 1-1: 아폽토시스 촉진 펩타이드 IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)에 대한 단클론성 항체의 조제

[0308] 상기 참고 결과의 소견에 의거해서, 항코리신 중화 항체가, 추정 세균 세린 프로테아제의 단백질분해 활성에 유래하는 트랜스글리코실라제 분해 산물의 아폽토시스 촉진 활성을 저해한다고 예상하였다. 이 예상을 검증하기 위해서, 우선, 항코리신 중화 단클론성 항체로서, 아폽토시스 촉진 펩타이드 IVMPESSGNPNAVNPAGYR에 대한 단클론성 항체를 조제하고, 특징화하였다. 아폽토시스 촉진 펩타이드 IVMPESSGNPNAVNPAGYR는, 도 3 및 도 4에 나타낸 스타필로코커스 네팔렌시스의 코리신-유사 서열이며, 이것은, 제조업자(ThermoFisher Scientific)에 의해 조제되었다.

[0309] Eurofins Genomics Inc.(일본 도쿄 소재)에서, 단클론성 항체를 조제하였다. 간단히 말하면, 면역에 사용하는 펩타이드(NH2-C+IVMPESSGNPNAVNPAGYR-COOH)를 합성하고, 고속 액체 크로마토그래피에 의해 정제하고, 이어서 말레이미드법에 의해, 일반적으로 사용되는 담체 단백질인 키홀 림펫 헤모시아닌에 결합시켰다(참고 문헌 72, 73). 실험 동물을 면역화시키기 위하여, 2마리의 Wistar 래트에 0, 2, 4, 6주차에 면역원을 피하 주사 1회 행하고, 그 다음에 최초의 면역 후 8주차에 동일한 펩타이드를 정맥내 주사 1회 행하였다. 첫 회합 면역 후 5주차에 채혈하고, 면역측정법에 의해 항체값을 측정하였다. 한마리의 래트의 비장세포를 골수종세포(P3U1과 Sp2)의 세포 융합에 이용하였다. 세포 융합은, 하이포잔틴-아미노프테린-티미딘 배지를 이용해서 폴리에틸렌글리콜법에 의해 행하였다(참고 문헌 74). 단클론성 항체-생산 하이브리도마의 클로닝을 한계희석법에 의해 행하였다(참고 문헌 74). 얻어진 하이브리도마는, 이후의 사용을 위하여 액체 질소 중에 저장하였다. 아이소타이핑은, Antagen Pharmaceuticals, Inc.((미국) 매사추세츠주 보스턴 소재)로부터 구입한 Rapid RAT Monoclonal Antibody Isotyping XpressCard를 이용해서 실시하였다.

[0310] 다양한 양의 재조합 트랜스글리코실라제 351을 폴리아크릴아마이드 겔을 사용하여 전기영동하고, 항코리신 단클론성 항체의 각 클론을 생산하는 하이브리도마의 상처액의 1:1000 희석을 사용해서 웨스턴 블로팅을 행하였다. 특히, 조직 또는 시료를 빙랭 인산완충식염수로 2회 세정하고, 이어서 프로테아제/포스파타제 저해제(1mM 오쏘바나데이트, 50mM β-글리세로포스페이트, 10mM 피로인산나트륨, 5μg/mL 류펩틴, 2μg/mL 아프로티닌, 5mM 플루오린화나트륨)를 보충한 방사면역침강검정(radioimmunoprecipitation assay: RIPA) 완충액(10mM Tris-Cl(pH 8.0), 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% 데옥시콜산나트륨, 0.1% SDS, 140mM NaCl, 1mM 플루오린화페닐메틸설포닐) 중에서 세포용해시켰다. 17,000×g에서 10분간, 4℃에서 원심분리한 후, Pierce BCA 단백질 검정 키트(Thermo Fisher Scientific사, 매사추세츠주 월섬 소재)를 이용해서 단백질 농도를 측정하였다. 등량의 단백질을 포함하는 시료를 Laemmli 시료 완충액과 혼합하고, 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분리하였다. 다음에, 니트로셀룰로스막과 항개열 카스파제-3 또는 항β-액틴 항체(Cell Signaling, (미국) 매사추세츠주 댄버스 소재)(참고 문헌 61)를 이용해서 웨스턴 블로팅법을 실시하고, 퍼블릭 도메인 NIH ImageJ 프로그램(wayne@codon.nih.gov; Wayne Rasband, NIH, 연구 서비스 부문)을 이용해서 블롯 상의 밴드 강도를 정량하였다.

[0311] 또한, 여기에 사용하는 재조합 트랜스글리코실라제 351은, 다음과 같이 발현되었다. 재조합 트랜스글리코실라제 351을 조제하기 위하여, 그 단백질을 코딩하는 유전자를 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)-최적화 코돈을 이용해서 합성하고, 말단 A를 부가해서 증폭하고, TA 클로닝 벡터 pGEM-T Easy(Promega, (미국) 위스콘신주 매디슨 소재)에 클로닝하였다. 다음에, 유전자를 절제해서, 변형 pET28a 벡터에 클로닝하고, 에스케리키아 콜라이 BL21 DE3 세포에 형질전환하고, 6-히스티딘 태그(His-tag)화 단백질로서 발현시키고, 정제하였다(비특허문헌 19).

[0312] 위에서 기재된 바와 같이 하고, 면역 글로불린(Ig)IgG2bκ, IgMκ, IgG2aκ, IgG2aκ, IgG2aκ 및 IgG2bκ를 각각 생산하는 하이브리도마 클론 2A, 3Aa, 4A, 9A 및 21A를 수립하였다(도 11a). 각 단클론성 항체의 아이소타입의 결정은, Rapid Monoclonal Antibody Isotyping Kit를 사용해서 실행하였다.

[0313] 재조합 트랜스글리코실라제의 증가량을 이용해서 실시한 웨스턴 블로팅법은, 모든 단클론성 항체 클론이 에스. 네파렌시스 유래의 코리신-함유 트랜스글리코실라제를 인식하고, 결합하는 것으로 밝혀졌다(도 11b). 다음에, 코리신 펩타이드를 마이크로플레이트에 코팅하고, 하이브리도마 상청액의 다양한 희석액을 사용하여, 항코리신 단클론성 항체의 각 클론의 결합을 평가하였다. 각 하이브리도마 클론이 생산하는 단클론성 항체는, 다양한 희석 수준으로 표면-피복 코리신에 차등적으로 결합하였다. 특히, 클론 9A와 21A는 강한 결합 활성을 나타내었다(도 11c).

[0314] 1-2: 아폽토시스 촉진 펩타이드 IVMPESSGNPNAVNPAGYR(서열번호 1)에 대한 단클론성 항체의 에피토프 매핑

[0315] 코리신 분자에 있어서의 항코리신 단클론성 항체의 결합 부위를 동정하기 위하여, 에피토프 매핑을 행하였다. 이 목적을 위하여, 코리신 서열의 길이가 다른 소형 펩타이드의 마이크로어레이에 대한 각 단클론성 항체의 결합을 평가하였다. 대조군으로서 헤마글루티닌 펩타이드와 항헤마글루티닌 항체를 이용해서, 펩타이드 마이크로어레이에 있어서의 완전성과 검정의 질을 검증하였다. PEPPerPRINT Incorporation(하이델베르크 소재)에서 매핑을 수행하였다.

[0316] 구체적으로, 펩타이드 IVMPESSGNPNAVNPAGYR는, 최초에, C-말단 및 N-말단에 중성 GSGSG 링커를 이용해서 신장시키고, 절두 펩타이드를 형성되는 것을 회피하였다. 신장된 펩타이드 서열은, 4, 9 및 14개의 아미노산의 펩타이드-펩타이드 중복을 수반한 5, 10 및 15 아미노산 펩타이드로 번역되었다. 얻어진 펩타이드 마이크로어레이는,

72개의 다른 직쇄 펩타이드를 이중으로(144 스폿) 그리고 부가적인 헤마글루티닌(YPYDVPDYAG, 17 스폿) 대조군 펩타이드를 함유하고 있었다. 인큐베이션 완충액(세정 완충액[인산완충 생리식염수, pH 7.4, 0.05% Tween 20, 10% Rockland블록킹 완충액 MB-070) 중, 펩타이드 마이크로어레이 카피의 사전 염색을, 2차(염소 항래트 IgG [H+L] DyLight 680) 항체 및 대조군(마우스 단클론성 항HA [12CA5] DyLight 800) 항체를 이용해서 행하고, 마이크로어레이의 72개의 다른 펩타이드와의 백그라운드 상호작용을 결정하였다. 그 후, 인큐베이션 완충액 중 1 μg/mL의 농도에서, 다른 펩타이드 마이크로어레이 카피를 래트 단클론성 항체 9A, 21A, 2A 및 4A와 인큐베이션하고, 이어서, 2차 항체 및 대조군 항체로 염색하고, LI-COR Odyssey 영상화 시스템을 이용해서 7/7(중간 스폿/주변 스폿(상측 및 좌측의 가장자리 스폿))의 주사 강도로 판독하였다. 펩타이드 마이크로어레이를 구성하는 부가적인 헤마글루티닌 펩타이드를 내부 품질 대조군으로서 동시에 염색하고, 검정의 품질과 펩타이드 마이크로어레이의 완전성을 확인하였다(도 12a, b).

[0317] 스폿 강도와 펩타이드 아노테이션의 정량화는, 16-비트 컬러 tiff 파일보다 높은 다이내믹 레인지를 나타내는 7/7의 주사 강도에서의 24-비트 그레이스케일 tiff 파일에 의거하였다. 마이크로어레이 화상 분석은, PepSlide(등록상표) 아날라이저를 이용해서 수행하였다. 결과는 보충 마이크로어레이 데이터에 기재되어 있다. 소프트웨어 알고리즘은 각 스폿의 형광강도를 원시(raw), 전경 및 배경신호로 분해시키고, 평균 전경 강도 중간치 및 스폿 중복의 스폿간 편차를 계산한다. 평균 전경 강도의 중간치에 의거해서 강도 맵을 생성하고, 강도 컬러 코드는 고스폿 강도에 대하여 중간 스폿 및 저스폿 강도에 대하여 백색의 펩타이드 맵에 있어서의 상호작용을 강조하였다. 스폿으로부터 스폿으로의 최대 편차는 40%였다. 그렇지 않으면, 대응하는 강도값은 제로(zero)로 설정되었다. 또한, 펩타이드 IVMPESSGNPNAVNPAGYR의 N-말단에서 C-말단까지의 항원 서열에 대한 래트 항체를 이용한 검정의 평균 스폿 강도를 플롯하여, 총 스폿 강도 및 신호 대 잡음비를 가시화하였다. 래트 항체 9A, 21A, 2A 및 4A의 에피토프를 동정하기 위하여, 강도 플롯을 펩타이드 및 강도 맵뿐만 아니라 마이크로어레이의 육안 검사와 상관시켰다. 이경우에, 특정 아미노산이 항체 결합성에 기여하고 있는지의 여부는 불명이지만, 대응하는 아미노산 문자를 회색으로 그리고 있다.

[0318] 상기 에피토프 매핑의 결과, 대조 항체에 의한 헤마글루티닌 펩타이드의 염색만이, 어느 주사 강도 수준에서도 백그라운드 상호작용이 없는 확립된 스폿 패턴을 나타내었다(도 12a, b). 인큐베이션 중의 1μg/ml의 농도에서의 래트 단클론성 항체 9A(c, d), 21A(e, f), 2A(g, h) 및 4A(i, j)와 다른 펩타이드 마이크로어레이 카피의 후속 인큐베이션 완충액에 이어서, 2차 항체와 대조군 항체를 사용하여 염색하고 나서, LI-COR Odyssey Imaging System을 사용하여 7/7(중앙 스폿/주변 스폿)의 스캔 강도로 판독하였다. 이어서, 9A, 21A 및 2A 단클론성 항체 클론에 대한 컨센서스 모티프 PESSGNP(서열번호 68)를 포함하는 중앙-스폿의 에피토프-유사 스폿 패턴에 대하여 중등도의 명백한 항체 응답을 나타내고(도 12c, d, e, f, g, h), 4A 단클론성 항체 클론에 대한 컨센서스 모티프 NPAGY(서열번호 69)를 포함하고(도 12i, j), 높은 신호 대 잡음비(보충 마이크로어레이 데이터)를 가지고 있었다.

[0319] 1-3: 항코리신 단클론성 항체 클론의 가변 프레임워크 및 상보성 결정 영역의 서열결정

[0320] 항코리신 단클론성 항체 클론 4A, 9A 및 2A의 가변영역의 서열을, syb labs Incorporation((미국) 매사추세츠주 홉킨턴 소재)에서 결정하였다. 각 하이브리도마 유래의 전체 RNA를 이용해서 합성한 cDNA를 이용해서, cDNA 말단의 5' 신속 증폭 반응을 수행하였다. PCR 분석에 의해 얻어진 양성 밴드를 클로닝하고, 서열결정하였다. 각 클론의 상보성 결정 영역(CDR)을 서열결정하였다. CDR 영역은, IMGT/V-QUEST(http://www.imgt.org)를 이용해서 정의하였다. 또한, 항코리신 단클론성 항체 클론 21A의 가변영역의 서열을 마찬가지 방식으로 결정하였다. CDR 동정은, Kabat 시스템에 의거해서 수행하였다.

[0321] 도 13은 단클론성 항체의 가변 프레임워크 및 상보성 결정 영역을 나타낸다.

[0322] 상세는 다음과 같다:

[0323] 항코리신 단클론성 항체 클론 4A

[0324] H쇄(4A-HC.7331): 가변영역

[0325] evqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTD AFYFSHSYwgqgvlvtvss(서열번호 36)

[0326] H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열: GFTFSTAW(서열번호 37)

[0327] H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열: IKAKSNSYAT(서열번호 38)

[0328] H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열: ASTDAFYFSHSY(서열번호 39)

[0329] H쇄(4A-HC.7331): 전장

[0330] MELCMMWIFLVAFLKGVQCevqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTDAFYFSHSYwgqgvlvtvssAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSST WSSQAVTCNVAH(서열번호 79)

[0331] (단, 서열: MELCMMWIFLVAFLKGVQC(서열번호 80)는 신호 펩타이드이며,

[0332] 서열: AETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWSSQAVTCNVAH(서열번호 81)는 불변영역이다)

[0333] L쇄(4A-LC.7395): 가변영역

[0334] divmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrspklliyWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPLTfgsgtkleik(서열번호 40)

[0335] L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열: QSLLYSENKKNY(서열번호 41)

[0336] L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열: WAST(서열번호 42)

[0337] L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열: QQYYNFPLT(서열번호 43)

[0338] L쇄(4A-LC.7395): 전장

[0339] MESQTQVLMSLLLWVSGTCGdivmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrspklliyWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPLTfgsgtkleikRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS(서열번호 82)

[0340] (단, 서열: MESQTQVLMSLLLWVSGTCG(서열번호 83)는 신호 펩타이드이며,

[0341] 서열: RADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS(서열번호 84)는 불변영역이다)

[0342] 항코리신 단클론성 항체 클론 9A

[0343] L쇄(9A-LC.7402): 가변영역

[0344] divmtqspssqavsagekvtmscksQNLLYSEDKKNYlawyqqkpgqspklliyWAStresgvpdrfigsgsgtdftltvtsvqaedlavyycQQYYNFPRTfgggtklelk(서열번호 44)

[0345] L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열: QNLLYSEDKKNY(서열번호 45)

[0346] L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열: WAS(서열번호 46)

[0347] L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열: QQYYNFPRT(서열번호 47)

[0348] L쇄(9A-LC.7402): 전장

[0349] MESQTQVLMSLLLWVSGTCGdivmtqspssqavsagekvtmscksQNLLYSEDKKNYlawyqqkpgqspklliyWAStresgvpdrfigsgsgtdftltvtsvqaedlavyycQQYYNFPRTfgggtklelkRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS(서열번호 85)

[0350] (단, 서열: MESQTQVLMSLLLWVSGTCG(서열번호 86)는 신호 펩타이드이며,

[0351] 서열: RADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS(서열번호 87)는 불변영역이다)

[0352] 항코리신 단클론성 항체 클론 2A

[0353] H쇄(2A-HC.7352): 가변영역

[0354] evklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnsknt lylemnslrsedtamyycAAEGFGTPFPYwgqgtlvtvss(서열번호 48)

[0355] H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열: GFTFTNYG(서열번호 70)

[0356] H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열: IYYDSSKM(서열번호 49)

[0357] H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열: AAEGFGTPFPY(서열번호 50)

[0358] H쇄(2A-HC.7352): 전장

[0359] MDFRLNLVFLVFILKGVWCevklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtamyycAAEGFGTPFPYwgqgtlvtvssAQTTAPSVYPLAPGCGDTTSSTVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTSSTWPSQTVTCNVAH(서열번호 88)

[0360] (단, 서열: MDFRLNLVFLVFILKGVWC(서열번호 89)는 신호 펩타이드이며,

[0361] 서열: AQTTAPSVYPLAPGCGDTTSSTVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTSSTWPSQTVTCNVAH(서열번호 90)는 불변영역이다)

[0362] L쇄(2A-LC.7413): 가변영역

[0363] divmtqtpssravsagekvtmscksSQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqspklliyWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk(서열번호 51)

[0364] L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열: QSLLYSENEKNY(서열번호 52)

[0365] L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열: WAS(서열번호 53)

[0366] L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열: QQYYHFPRT(서열번호 54)

[0367] L쇄(2A-LC.7413): 전장

[0368] MESQTQVLMSLLLWVSGSCGdivmtqtpssravsagekvtmscksSQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqspklliyWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelkRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS(서열번호 91)

[0369] (단, 서열: MESQTQVLMSLLLWVSGSCG(서열번호 92)는 신호 펩타이드이며,

[0370] 서열: RADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS(서열번호 93)는 불변영역이다)

[0371] 항코리신 단클론성 항체 클론 21A:

[0372] H쇄(KK1410-2_VH_pep): 가변영역

[0373] evklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIYYDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFGTPFPYwgqgtlvtvss(서열번호 71)

[0374] H쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열: NYGMH(서열번호 72)

[0375] H쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열: MIYYDSSKMSYADTVKG(서열번호 73)

[0376] H쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열: EGFGTPFPY(서열번호 74)

[0377] H쇄(KK1410-2_VH_pep): 전장

[0378] MDFRLNLVFLVFILKGVWCevklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIYYDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFGTPFPYwgqgtlvtvss(서열번호 94)

[0379] (단, 서열: MDFRLNLVFLVFILKGVW(서열번호 95)는 신호 펩타이드이다)

[0380] L쇄(KK1410-2_VL_pep): 가변영역

[0381] divmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspklliyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk(서열번호 75)

[0382] L쇄 가변영역 CDR1 아미노산 서열: KSSQSLLYREDTKNYLA(서열번호 76)

[0383] L쇄 가변영역 CDR2 아미노산 서열: WASTRES(서열번호 77)

[0384] L쇄 가변영역 CDR3 아미노산 서열: QQYYHFPRT(서열번호 78)

[0385] L쇄(KK1410-2_VL_pep): 전장

[0386] MESQTQVLMSLLLWVSGTYGdivmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspkl liyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltis svqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk(서열번호 96)

[0387] (단, 서열: MESQTQVLMSLLLWVSGTYG(서열번호 97)는 신호 펩타이드이다)

[0388] 1-4: 항코리신 단클론성 항체 클론에 있어서의 코리신 아폽토시스 촉진 활성의 저해

[0389] 코리신에 대한 높은 결합 능력을 지니는 단클론성 항체(2A, 9A 및 21A)가, 배양 허파꽈리 상피세포 상의 코리신의 아폽토시스 촉진 활성을 저해할 수 있는지의 여부를 평가하였다.

[0390] 아폽토시스 저해 검정은, A549 허파꽈리 상피세포를 서브컨플루언트까지 배양하고, 하룻밤, 혈청 기아시키고, 이어서 항코리신 단클론성 항체 클론 2A, 9A 또는 21A로 전처리하고, 추가로 48시간 배양을 계속해서 행하였다. 아폽토시스 세포의 수는, 위에서 기재된 바와 같이 플로우 사이토메트리에 의해 평가하였다.

[0391] A549 허파꽈리 상피세포는, 항코리신 단클론성 항체의 각 클론(1:100 희석의 하이브리도마 상청액)으로 전처리한 후, 코리신 또는 스크램블 펩타이드의 존재 하에 배양하였다. 래트 항코리신 혈청으로 전처리한 A549 세포를 양성 대조군으로서 사용하고, 전처리를 행하지 않은 세포를 음성 대조군으로서 사용하였다. 플로우 사이토메트리 분석은, 클론 21A 단클론성 항체만이 시험관내에서 허파꽈리 상피세포의 코리신-유발 아폽토시스를 유의하게 중화시키는 것으로 드러났다(도 14a, b).

[0392] 또한, 클론 21A 중화 단클론성 항체가 스타필로코커스 네팔렌시스 및 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 양쪽의 아폽토시스 활성을 저해하는지의 여부에 대해서 조사를 수행하였다. A549 허파꽈리 상피세포를, 항코리신 단클론성 항체 클론 A21의 하이브리도마 상청액(1:100 희석)으로 전처리한 후, 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 균주 12의 배양 상청액의 존재 하에 배양하였다. 단클론성 항체 A21 또는 아이소타입 IgG만으로 전처리한 A549 세포는 음성 대조군으로서, 스타필로코커스 네팔렌시스 상처액으로 전처리한 세포는 양성 대조군으로서 사용하였다. 그 결과, 클론 21A 중화 단클론성 항체는 A549 허파꽈리 상피세포 상의 스타필로코커스 네팔렌시스 및 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 둘 다의 세균 상청액의 아폽토시스 활성도 유의하게 저해하였다(도 15a, b).

[0393] 따라서, 이후의 실험에서는, 클론 21A 단클론성 항체를 이용해서, 항코리신 단클론성 항체가 스타필로코커스 네파렌시스 코리신-함유 트랜스글리코실라제의 분해 산물의 아폽토시스 촉진 활성을 저해할 수 있는지의 여부를 평가하였다. 재조합 트랜스글리코실라제(2mg/mL), 스타필로코커스 네팔렌시스 배양 상청액 유래의 펩티다제 분획(>10kDa), 및 20μg/mL의 항코리신 단클론성 항체 클론 A21 또는 아이소타입 항체를 포함하는 반응 혼합물을 2시간 인큐베이션하고, 이것을 A549 세포배양 물에 첨가하였다. 배양의 48시간 후, 플로우 사이토메트리 분석에 의해 아폽토시스를 평가하였다. 코리신 및 항코리신 항체 또는 아이소타입 항체로 처리한 세포를 양성 대조군으로서, 항코리신 항체 또는 아이소타입 항체만으로 처리한 세포를 음성 대조군으로서 사용하였다. 그 결과, 플로우 사이토메트리 분석은, 항코리신 단클론성 항체 클론 A21이, 아이소타입 항체 대조군과 비교해서, 허파꽈리 상피세포상의 트랜스글리코실라제 분해 산물의 아폽토시스 활성을 유의하게 저해하는 것을 나타낸다(도 16a, b). 그러나, 주목해야 할 점은, 겔 전기영동과 은염색에 의해, 항코리신 중화 단클론성 항체 클론 21A가 재조합 트랜스글리코실라제의 단백질분해를 저해할 수 없는 것이 밝혀진 점이다(도 16c). 전체로서, 이들 관찰은, 추정 세린 프로테아제의 세균 분비가 트랜스글리코실라제 단백질 분해를 일으키고, 트랜스글리코실라제 단백질 분해가 코리신을 방출하여 폐상피세포의 아폽토시스를 유발하고, 그리고 트랜스글리코실라제에의 항코리신 중화 단클론성 항체의 결합이 트랜스글리코실라제 분해를 방해하지 않는 것을 나타내고 있다.

[0394] 실시예 2

[0395] 항코리신 중화 항체에 있어서의 폐섬유증의 코리신-유발 AE의 저해 작용

[0396] 코리신이 TGFβ1 TG 마우스에 있어서 폐섬유증의 AE를 유발하는 것을 이전에 나타냈다. 이 소견에 의거해서, 항코리신 중화 항체가 섬유증 질환의 AE를 억제할지의 여부를 검토하였다. 최초에, 복강내 투여 후의 항코리신 단클론성 항체 클론 21A의 순환 수준의 변화를 평가하고, 그 반감기를 계산하였다. 5 마리의 전장 인간 TGFβ1을 코딩하는 유전자를 폐특이적으로 과잉발현시켜서 야기한 폐섬유증을 지닌 TGFβ1 트랜스제닉 마우스(TGFβ1 TG 마우스)에 20mg/kg 항코리신 항체 클론 A21의 복강내 주사를 행하고, 3, 6, 24, 48, 168, 336 및 504시간 후에 혈액을 채취하였다. 원심분리 후에, 혈장을 분리하고, 재료 및 방법란에 기재된 바와 같이 효소면역검정을 사용하여 항코리신 항체의 수준을 측정하였다. 그 결과, 항코리신 중화 단클론성 항체의 혈장 중의 평균 반감기는

3.8±2.5일이었다(도 17).

[0397] 다음에, 폐섬유증을 지닌 TGFβ1 TG 마우스를, 대응하는 컴퓨터 단층촬영(CT) 스코어를 갖는 2개의 군에 할당하였다(도 18a, b). CT 검사는 다음과 같이 수행하였다.

[0398] 폐 CT는, Hitachi Aloka Medical(일본 도쿄 소재)로부터 구입한 Latheta LCT-200 마이크로 CT로 실시하였다. 마우스에 아이소플루란을 흡입시켜서 마취시킨 후, 복와위로 배치시켜 데이터를 수집하였다(비특허문헌 19, 참고 문헌 61). 처치군에 맹검화한 폐방사선학의 전문가 7 내지 9명이, 폐섬유증을 지닌 TGFβ1 TG 마우스에 있어서의 CT소견을, 이전에 보고되어 검증된 기준에 의거해서 다음과 같이 스코어화하였다: 스코어 1, 정상 폐소견; 스코어 2, 중간 소견; 스코어 3, 경도 폐섬유증; 스코어 4, 중간 소견; 스코어 5, 중등도 폐섬유증; 스코어 6, 중간소견; 및 스코어 7, 진행성 폐섬유증(비특허문헌 19). BLM-유발 폐섬유증 마우스 모델에서, 같은 기준을 이용해서 폐의 염증과 섬유증을 스코어화하였다(도 21b).

[0399] 기관내 코리신을 투여한 섬유증이 없는 TGFβ1 TG 마우스군을, 대조군으로서 이용하였다(도 18a, b). 폐섬유증을 가진 하나의 군에는, 항코리신 단클론성 항체 클론 21A를 투여하고, 폐섬유증의 다른 군에는, AE를 유발시키기 위하여 코리신을 기관내 주입하기 전 2주간 사이에, 매3일에 1회, 무관한 아이소타입 항체를 복강내 주사하였다(도 19a). 즉, 폐섬유증을 가진 TGFβ1-TG 마우스(n=6)군에는, 항코리신 단클론성 항체(mAtb)을 복강내 주사하고, 폐섬유증의 다른 군(n=6)에는, 아이소타입 항체(Atb)를 2일 전에 5회 투여하였다. 코리신의 기관내 주입. 섬유증이 없는 TGFβ1-TG 마우스군(n=5)에는 기관내 코리신만을 투여하였다. 비교를 위하여, 코리신 또는 생리식염수의 기관내 주입 전후에 CT를 수행하였다.

[0400] 그 결과, 생리식염수, 아이소타입 항체 또는 항코리신 항체로 처치한 섬유증이 없는 대조군 TGFβ1 TG 마우스는, 변화를 나타내지 않았다(도 18b). 코리신을 투여하고, 아이소타입 항체로 처치한 TGFβ1 TG 마우스는, 유의한 악화의 CT소견을 나타내었고(도 19c), 다른 한편, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 마우스는, 폐섬유증의 CT 스코어의 유의한 개선을 나타내었다(도 19d).

[0401] 다음에, 단클론성 항코리신 항체가, TGFβ1 TG 마우스의 폐섬유증의 급성 악화(AE)을 억제하는지의 여부를 평가하였다.

[0402] TGF β 1TG 마우스를, 폐섬유증의 등급이 일치하는 2개의 군과, 폐섬유증이 없는 1개의 군에 무작위로 할당하였다. 폐섬유증을 가진 TGFβ1-TG 마우스(n=6)군에는, 항코리신 단클론성 항체를 복강내 주사하고, 폐섬유증을 가진 다른 군(n=6)에는, 아이소타입 항체를 2일 전에 5회 투여하였다. 코리신은 기관내 주입하였다. 섬유증이 없는 TGFβ1-TG 마우스군(n=5)에는, 기관내 코리신만을 투여하였다. 마취제의 과잉섭취에 의한 안락사 후, 각 군의 마우스로부터 기관지 허파꽈리 세정액(BALF)을 채취하고, BALF액을 원심분리하고, 펠릿을 사용해서 총세포수와 세포분획을 처치군 간에 평가하였다.

[0403] 그 결과, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 TGFβ1 TG 마우스에서는, 대조 및 아이소타입 항체로 처치한 마우스와 비교해서, BALF 중의 전세포수 및 림프구수는 유의하게 감소하고 있었다(도 20a, b). 계면활성 단백질-D(SP-D), MUC5B, 매트릭스 메탈로프로테나제-1(MMP-1), 디코린 등의 폐손상의 마커, 및 SP-D, MUC5B, MUC-1의 기관지 허파꽈리 세정액(BALF) 수준은, 대조군 및 아이소타입 항체로 처치한 마우스와 비교해서, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 마우스에서 유의하게 저하되었다(도 20c). 폐에 있어서의 하이드록시프롤린 함량 및 콜라겐 침착은, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 마우스에 있어서, 아이소타입 항체로 처치한 마우스보다도 유의하게 낮았다(도 20c, d, e). 폐섬유증의 등급은, 폐 염증 세포수와 유의하게 상관되었다(도 20f). 이들 관찰은, 코리신이 폐섬유증에 있어서의 AE의 잠재적 치료 표적인 것을 나타낸다.

[0404] 실시예 3

[0405] 블레오마이신-유발 폐섬유증에서의 코리신의 AE 유발 작용

[0406] 마우스 또는 래트에 있어서의 블레오마이신(BLM)-유발 폐섬유증은, IPF 연구를 위한 가장 특징화되고 일반적으로 사용되는 전임상 모델이다(참고 문헌 28). 코리신이 BLM-유발 폐섬유증의 질환을 악화시키는지의 여부는 불분명하다. 이 문제를 해결하기 위하여, 삼투압 미니펌프를 개재해서 BLM을 주입하고, 기관내 주입에 의해 코리신을 투여함으로써, 야생형(WT) 마우스에 있어서 실험 모델을 개발하였다(도 21a). 도 21a에 나타낸 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 급성 악화를 유발시키기 위한 실험 스케줄에 따르면, 블레오마이신(BLM) 또는 생리식염수(SAL)를, 마우스의 등에 피하 이식한 삼투압 미니펌프로부터 주입하였다. 컴퓨터 단층촬영(CT)은, 마우스 안락사 전에 코리신 또는 스크램블 펩타이드의 기관내 투여의 전후에 실행하였다. 삼투압 미니펌프 및 기관내 코리신 또는 스크램블 펩타이드를 개재해서 SAL을 투여한 마우스를 대조군으로서 사용하였다. BLM 또

는 SAL 펌프 이식 후 22일차에 마우스를 안락사시켰다.

[0407] 이와 같이 흉부 CT에 의한 폐섬유증 발증을 확인한 후, 자가 CT 스코어 기준(도 21b)을 이용해서, 일치한 CT 스코어를 갖는 두 개의 군에 마우스를 할당하였다.

[0408] 야생형(WT) 마우스에 대하여, 0일차에 삼투압 미니펌프에 의해 블레오마이신(BLM)을 투여하고, 펌프 이식 후 20일차에 코리신 또는 스크램블 펩타이드(300㎍/마우스)를 기관내 주입(75㎕)하였다. CT 은, 실시예 2에 기재된 바와 같이 실행하였다. 그 결과, 폐섬유증 마우스의 CT 스코어는, 기관내 코리신 투여 후에 유의하게 악화되었다(도 22a, b, c). 다음에, 야생형(WT) 마우스에 대하여, 0일차에 삼투압 미니펌프에 의해 생리식염수(SAL)를 투여하고, 펌프 이식 후 20일차에 코리신 또는 스크램블 펩타이드(300㎍/마우스)를 기관내 주입(75㎕)하였다. 그 결과, CT 스코어는, 스크램블 펩타이드를 기관내 주입한 폐섬유증 마우스, 또는 기관내 코리신 혹은 스크램블 펩타이드 중 어느 것인가를 받은 폐섬유증이 없는 마우스에서는, 변화되지 않았다(도 22d, e, f).

[0409] 다음에, 기관내 코리신을 투여한 BLM-유발 폐섬유증 마우스에 있어서의 염증세포 등을 검사하였다. 야생형(WT) 마우스에 대하여, 0일차에 삼투압 미니펌프에 의해 블레오마이신(BLM) 또는 생리식염수(SAL)를 투여하고, 펌프 이식 후 20일차에 코리신 또는 스크램블 펩타이드(300㎍/마우스)를 기관내 주입(75㎕)하였다. BALF의 총세포수는 NucleoCounter를 사용해서 결정하고, 세포분획수는, WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용한 김자 염색 후에 실행하였다. 혈청 아밀로이드 P 성분(SAP), MUC-1, 단구 주화성 단백질-1(MCP-1), 페리오스틴, 콜라겐 I 및 오스테오폰틴의 수준은, 제조사의 지시에 따라서 효소면역검정에 의해 측정하였다. 결과, 기관내 코리신을 투여한 BLM-유발 폐섬유증 마우스는, 기관내 스크램블 펩타이드를 투여한 대조군 마우스와 비교해서, BALF 중의 림프구 총수가 유의하게 증가하고, 혈청 아밀로이드 P 성분의 순환 수준이 증가하고, 또 MUC-1, 단구 주화성 단백질-1(MCP-1), 페리오스틴, 콜라겐 I 및 오스테오폰틴의 수준이 증가하였다(도 23a, b, c).

[0410] 다음에, 카스파제-3의 절단을 웨스턴 블로팅에서 평가하고, 정량하였다. 카스파제-3의 절단은, 스크램블 펩타이드를 투여한 마우스의 대응물과 비교하고, 기관내 코리신을 투여한 마우스로 유의하게 증가하였다(도 23d, e). 콜라겐 침착은, 마슨의 트라이크롬 염색에 의해 평가하고, WindRoof 영상화 소프트웨어를 사용해서 정량화하였다. 하이드록시프롤린의 폐조직 함유량은, 제조사의 지시에 따라서 시판의 키트를 사용한 비색분석에 의해 측정하였다. 그 결과, 폐에 있어서의 콜라겐 침착과 하이드록시프롤린 함량도, 스크램블 펩타이드(도 23f, g, h)로 처리한 마우스와 비교해서, 코리신을 투여한 마우스로 증가하였다. 삼투압 미니펌프를 개재해서 생리식염수를 투여하고, 코리신 또는 스크램블 처리한 마우스는 유의한 변화를 나타내지 않았다. 이들의 소견은, 코리신이 BLM-유발 폐섬유증에 있어서도 질환을 악화시키는 것을 나타냈다.

[0411] 실시예 4

[0412] 항코리신 단클론성 항체에 있어서의 BLM-유발 폐섬유증의 억제 작용

[0413] 코리신은 BLM-유발 폐섬유증을 악화시키므로, 이 치사성 펩타이드는 이 실험 모델에 있어서 역할을 한다고 예상하였다. 이 예상을 검증하기 위하여, 삼투압 미니펌프를 개재해서 마우스에 BLM을 주입하고, 항코리신 중화 단클론성 항체 또는 아이소타입 항체를 3주간의 사이, 주 3회 복강내 경로로 처치하였다(도 24a). 야생형(WT) 마우스에 삼투압 미니펌프로 블레오마이신(BLM)을 투여하고, 복강내 경로에서 항코리신 단클론성 항체(WT/BLM/항코리신) 또는 아이소타입 항체(WT/BLM/아이소타입)로 주3회, 3주간 처치하였다. 삼투압 미니펌프로 생리식염수(SAL)를 투여하고, 복강내 경로에서 항코리신 단클론성 항체(WT/SAL/항코리신) 또는 아이소타입 항체(WT/SAL/아이소타입)로 주3회, 3주간 처치한 WT 마우스를 대조군 마우스로서 사용하였다. 컴퓨터 단층촬영(CT)은, 마우스 안락사 1일 전에 실시하고, 치료군을 알고 있지 않은 9명의 전문가가 CT소견을 기록하였다. BLM 또는 생리식염수(SAL) 펌프 이식 후 21일차에 마우스를 안락사시켰다. 삼투압 미니펌프를 개재해서 생리식염수(SAL)를 투여한 마우스는, 항체의 2차적 영향을 제외하기 위하여 준비한 대조군 마우스였다.

[0414] 그 결과, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 BLM-유발 폐섬유증 마우스는, 아이소타입 항체로 처치한 대응 마우스와 비교해서, CT 섬유증 스코어가 유의하게 감소되었다(도 24b, c). 생리식염수 주입 후에 항코리신 단클론성 항체 또는 아이소타입 항체로 처치한 마우스에서는, CT변화는 없었다.

[0415] 다음에, BALF의 총세포수를, NucleoCounter를 사용해서 결정하고, 세포분획수는 WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용한 김자 염색 후에 실행하였다. BALF 중의 염증세포를 평가하면, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 BLM-유발 폐섬유증 마우스가, 아이소타입 항체로 처치한 마우스와 비교해서, 모든 유형의 세포의 총수, 림프구의 총수 및 호중구를 유의하게 감소시킨 것을 나타내었다(도 24d, e).

[0416] 또한, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 폐섬유증 마우스의 폐에 있어서의 급성조직 손상, 실질세포의 아폽토시

스 및 조직 섬유증을 조사하였다. 야생형(WT) 마우스에 삼투압 미니펌프로 블레오마이신(BLM)을 투여하고, 복강내 경로에서 항코리신 단클론성 항체(WT/BLM/항코리신) 또는 아이소타입 항체(WT/BLM/아이소타입)로 주3회, 3주간 처치하였다. 삼투압 미니펌프로 생리식염수(SAL)를 투여하고, 복강내 경로에서 항코리신 단클론성 항체(WT/SAL/항코리신) 또는 아이소타입 항체(WT/SAL/아이소타입)로 주3회, 3주간 처치한 WT 마우스를 대조군 마우스로서 사용하였다. 오스테오폰틴, MUC-1 및 MUC5B의 수준은, 시판의 키트를 사용한 효소면역검정에 의해 측정하였다. DNA 단편화는, 말단 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 dUTP 닉-엔드 라벨링(terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick-end labeling: TUNEL)에 의한 염색에 의해 평가하였다. 폐섬유증의 등급은, 7명의 전문가가 맹검 표적으로, 애쉬크로프트의 스코어를 사용해서 스코어화하였다. 폐의 콜라겐 침착은, 마슨의 트라이크롬 염색에 의해 평가하고, WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용해서 정량화하였다. 하이드록시프롤린의 폐조직 함유량은, 제조사의 지시에 따라서 시판의 키트를 사용한 비색분석에 의해 측정하였다.

[0417] 그 결과, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 BLM-유발 폐섬유증의 마우스는, 아이소타입 항체를 투여한 마우스와 비교해서, 오스테오폰틴, MUC-1 및 MUC5B의 낮은 혈장 및 BALF 수준, 아폽토시스 폐상피세포수의 감소 및 폐에 있어서의 애쉬크로프트 스코어 및 콜라겐 침착과 하이드록시프롤린의 감소를 나타냈다(도 25a, b, c, d, e, f, g, h). 전체로서, 이들의 지견은, 코리신이 BLM-유발 폐섬유증의 발증에 있어서도 역할을 하는 것을 나타내고 있다.

[0418] 실시예 5

[0419] 급성기에 투여된 경우 항코리신 단클론성 항체의 BLM-유발 폐손상 폐섬유증에 대한 개선 작용

[0420] 삼투압 미니펌프를 개재해서 피하투여된 BLM에 의해 유발된 폐손상은, 11일차에 피크가 되는 급성기의 폐 염증, 계속해서 만성기의 폐섬유증에 의해 특징화된다(참고 문헌 29). 항코리신 단클론성 항체가, BLM-유발 초기 급성기의 폐손상을 저해함으로써 폐섬유증을 개선할 것인가지의 여부를 조사하였다.

[0421] 블레오마이신(BLM)을, 마우스의 등에 피하에 이식한 삼투압 미니펌프를 개재해서 주입하였다. 주입 후 2, 4, 6, 9 및 11일차에, 마우스를, 아이소타입 항체(WT/BLM/아이소타입) 또는 항코리신 단클론성 항체(WT/BLM/항코리신)로 20mg/kg의 용량으로 복강내 경로에 의해 처치하였다. 마우스는, 12일차로부터 22일차의 안락사까지의 만성기에는 처치를 행하지 않았다. 채혈은 9일차에 행하고, 컴퓨터 단층촬영(CT)은 9일차와 마우스 안락사 전에 행하였다. BLM 펌프 이식 후 22일차에, 마우스를 안락사시켰다. CT 폐불투명도는, WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용해서 각 군에서 측정하였다. BLM 펌프의 보충 후 9일차에 채혈하고, 혈액 중의 총세포수를, NucleoCounter를 사용해서 결정하고, 김자 염색 후에 세포분획수를 계수하였다. WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용하였다.

[0422] 그 결과, 폐손상의 CT소견 및 혈액 중의 호중구수는, IgG2인 아이소타입 항체로 처치한 대조와 비교해서, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 마우스로 9일차에 유의하게 개선되었다(도 26b, c, d, e).

[0423] 다음에, 야생형(WT) 마우스에 삼투압 미니펌프에 의해 블레오마이신(BLM)을 투여하고, 블레오마이신 펌프 주입 후 2, 4, 6, 9 및 11일차에 복강내 경로에 의해 항코리신 단클론성 항체(WT/BLM/항코리신) 또는 아이소타입 항체(WT/BLM/아이소타입)로 처리하였다. CT는, BLM 펌프 이식 후 21일차(만성기)에 실시하였다. 또한, BLM 펌프의 22일 후에 기관지 허파꽈리 세정액(BALF)을 수집하고, BALF의 총세포수를 NucleoCounter를 사용해서 결정하고, 미분세포수는 WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용한 김자 염색 후에 실행하였다.

[0424] 그 결과, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 마우스는, 대조 항체를 받은 마우스와 비교해서, 질환의 만성기(BLM 주입 시작 후 22일차) 동안, CT 섬유증 스코어와 BALF 중의 림프구수의 유의한 개선을 나타냈다(도 27a, b, c, d).

[0425] 질환의 급성기에 항코리신 단클론성 항체로 처치된 블레오마이신-유발 폐섬유증의 마우스에 있어서의 22일차의 폐손상, 폐실질 아폽토시스 및 콜라겐 침착을 조사하였다. 야생형(WT) 마우스에 삼투압 미니펌프로 블레오마이신(BLM)을 투여하고, BLM 펌프 주입 후의 2, 4, 6, 9 및 11일차에 복강내 경로에서 항코리신 단클론성 항체(WT/BLM/항코리신) 또는 아이소타입 항체(WT/BLM/아이소타입)로 처치하였다. 기관지 허파꽈리 세정액(BALF)과 혈장은, BLM 펌프의 22일 후에 채취하였다. MUC-1, 계면 단백질C(SP-C), SP-D, 콜라겐 I, 페리오스틴, 오스테오폰틴 및 총TGFβ1의 수준은, 제조사의 지시에 따라서, 시판의 효소면역검정 키트로 측정하였다(도 28a). 또한, 절단된 카스파제-3 및 β-액틴의 웨스턴 블로팅을 행하였다(도 28b, c). 폐의 콜라겐 침착에 대해서 마슨의 트라이크롬 염색한 사진 및 WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용해서 정량화하였다(도 28f, g). 폐의 하이드록시프롤린 함유량은 제조사의 지시에 따라서 시판의 비색분석에 의해 측정하였다(도 28h).

[0426] 그 결과, 22일차에 있어서의 MUC-1, SP-C, SP-D, 콜라겐 I, 페리오스틴, 오스테오폰틴의 혈장 수준 및 MUC-1의 BALF 수준과 총 TGFβ1은, 아이소타입 항체로 처치한 마우스보다 항코리신 단클론성 항체로 처치한 마우스에서 유의하게 낮았다(도 28a). 항코리신 단클론성 항체로 처치한 마우스는, 아이소타입 항체로 처치한 마우스와 비교해서, 애쉬크로프트 스코어, 콜라겐 침착, 하이드록시프롤린 함량이 유의하게 저하되었고, 폐에 있어서 카스파제-3 절단이 저하되었다(도 28b, c, d, e, f, g). 이들 관찰은, 급성기의 코리신 관련 급성 폐손상이 질환의 만성기에 있어서의 폐섬유증의 중요한 결정 인자인 것을 나타내고 있다.

[0427] 실시예 6

[0428] 항코리신 단클론성 항체에 있어서의 폐섬유증 AE 마우스의 생존율에 대한 연장 작용

[0429] 컴퓨터 단층촬영(CT)은, 인간 전환 성장 인자 β1(TGFβ1) 트랜스제닉(TG) 마우스로 실시하였다. 7명의 전문가가 맹검 표적으로 폐섬유증의 등급을 기록하고, 각각의 마우스에 있어서의 7명의 전문가의 스코어의 평균치를, 마우스의 CT 스코어로 간주하였다. 폐섬유증의 TGFβ1 TG 마우스는, CT 섬유증 스코어가 일치하는 2개의 군으로 나누고, 삼투압 미니펌프를 개재해서 블레오마이신(BLM)을 투여하였다. 이들 2개의 군 중 1개에는 항코리신 단클론성 항체(TGFβ1-TG/BLM/항코리신)를 복강내 주사하고, 이미 1개의 군에는 아이소타입 항체(TGFβ1-TG/BLM/아이소타입)를 복강내 주사하였다. 항코리신 단클론성 항체 또는 아이소타입 항체로 주3회, 3주간 처치하였다. 삼투압 미니펌프를 개재해서 생리식염수를 주입하고, 항코리신 단클론성 항체(TGFβ1-TG/SAL/항코리신) 또는 아이소타입 항체(TGFβ1-TG/SAL/아이소타입)로 처치한 폐섬유증이 없는 TGFβ1 TG 마우스를 마우스 대조군으로 사용하였다(도 29a, b). 이와 같이 해서 처치한 마우스에 있어서의 생존율을 도 29c에 나타낸다.

[0430] 그 결과, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 폐섬유증과 BLM-유발 AE를 갖는 TGFβ1 TG 마우스는, 아이소타입 항체로 처치한 마우스보다도, 유의하게 긴 생존율을 나타내었다(도 29c). 예상대로, 삼투압 미니펌프를 개재해서 생리식염수를 투여한 대조군에서는, 생존율에 변화는 보이지 않았다.

[0431] 실시예 7

[0432] 항코리신 단클론성 항체에 의한 리포다당류-유발 급성 폐손상의 억제.

[0433] 이상의 결과에 기초하여, 리포다당류(LPS)와 같은 다른 물질에 기인하는 급성 폐손상의 발증에도, 코리신이 영향을 미치는지의 여부에 대해서 조사를 행하였다.

[0434] 야생형(WT) 마우스에 대하여, 아이소타입 항체 또는 항코리신 단클론성 항체를 20mg/kg의 용량으로 1일 걸러 1일 1회, 복강내 경로에서 3회 처치하였다. 마우스는, 항체에 의한 최후의 처치의 2일 후에 고용량(150μg)의 리포다당류(LPS) 또는 생리식염수(SAL)를 기관내(IT) 점적하고, LPS 주입의 2일 후에 안락사시켰다. 기관내 생리식염수(SAL)를 투여하고, 아이소타입 항체(WT/SAL/아이소타입) 또는 항코리신 항체(WT/Sal/항코리신)로 처치한 마우스를 대조군 마우스로 하였다(도 30a). 기관내 LPS 주입 후 2일차에 안락사시킨 마우스로부터, 기관지 허파꽈리 세정액(BALF)을 채취하고, 얻어진 BALF 세포를, NucleoCounter를 사용해서 카운트하고, 세포분획을 김자염색하고, 카운트하였다(도 30b, c). 또한, 락트산 데하이드로게나제 A(LDHA), 계면활성제 단백질 D(SP-D), 매트릭스 메탈로프로테나제-1(MMP-1), MUC-1 및 종양괴사인자α(TNFα)의 수준을, 제조사의 지시에 따라서, 시판의 면역검정 키트를 사용해서 측정하였다(도 30d).

[0435] 또한, 항코리신 단클론성 항체에 의한 처치가, 중도의 리포다당류-유발 급성 폐손상이 있는 마우스의 CT소견을 개선하는지의 여부에 대해서 조사를 행하였다. 야생형(WT) 마우스에 아이소타입 항체(WT/LPS/아이소타입) 또는 항코리신 항체(WT/LPS/항코리신)를 20mg/kg의 용량으로 복강내 경로에 의해, 1일 걸러 1일 1회, 1주간 처치하고, 이어서 안락사시켰다. 마우스에는, 고용량(150μg)의 리포다당류(LPS) 또는 생리식염수를 기관내(IT) 점적하였다. 기관내 생리식염수(SAL)를 투여하고, 아이소타입 항체(WT/SAL/아이소타입) 또는 항코리신 항체(WT/Sal/항코리신)로 처치한 마우스를 대조군 마우스로 사용하였다. 컴퓨터 단층촬영(CT)은, 리포다당류(LPS)의 기관내 주입 1일 후에 실행하였다(도 31a). 폐의 정점에서 기저영역까지의 CT 불투명도는, 재료 및 방법란에 기재된 바와 같이 WindRoof 이미지 소프트웨어를 사용해서 정량화하였다(도 31b).

[0436] 그 결과, 항코리신 단클론성 항체로 처치한 마우스는, 아이소타입 대조군으로 전처치한 마우스와 비교해서, 폐 CT 불투명도가 유의하게 감소되었고(도 31a, b), 폐침윤 호중구수는 저하되었고, 그리고 락트산 데하이드로게나제 A(LDHA), SP-D 및 MMP-1의 혈장과 BALF 수준, 및 MUC-1과 종양괴사인자-α(TNFα)의 BALF 수준은 유의하게 감소되었다. 이것은, 코리신이 LPS에 대한 급성 염증반응에 관여하고 있는 것을 나타낸다(도 30c, d).

[0437] 다음에, 항코리신 단클론성이, 중간 정도의 리포다당류-유발 급성 폐손상을 경감하는지의 여부에 대해서 조사를

행하였다. WT 마우스를, 20mg/kg의 용량의 아이소타입 항체 또는 항코리신 단클론성 항체로, 1일 걸러 1일 1회, 복강내 경로에서 3회 처치하였다. 마우스는, 항체에 의한 최후의 처치 2일 후에, 저용량(75μg)의 LPS를 IT 주입하고, LPS 주입 2일 후에 안락사시켰다. 그 후, BALF를 채취하였다. BALF 세포를, NucleoCounter를 사용해서 카운트하고, 재료 및 방법란에 기재된 바와 같이, 세포분획의 카운트를 위하여 김자로 염색하였다(도 32b, c). 계면활성제 단백질 D(SP-D), 단구 주화성 프로틴-1(MCP-1), TNFα, 락트산 데하이드로게나제 A(LDHA), MUC-5B 및 매트릭스 메탈로프로테나제-1(MMP-1)의 BALF 및 혈장 중 수준을, 제조사의 지시에 따라서, 시판의 면역검정 키트를 사용해서 측정하였다(도 32d).

[0438] 그 결과, 이와 같이 해서 보다 적은 양의 기관내 LPS를 이용해서, 보다 경도의 급성 폐손상을 유도하는 다른 실험을 행한 바, 항코리신 단클론성 항체로 전처치한 마우스는, 아이소타입으로 전처치한 대조군 마우스와 비교해서, 폐침윤 호중구의 수를 유의하게 감소시키고, SP-D, 단구 주화성 단백질-1(MCP-1) 및 TNFα의 혈장 및 BALF 수준을 유의하게 감소시키고, LDHA의 BALF 수준 및 MUC5B와 MMP-1의 혈장 수준을 유의하게 감소시켰다(도 32a, b, c, d). 전체로서, 이들 관찰은 또한 급성 폐손상의 발증에 있어서, 코리신이 관여하고 있는 것을 더욱 뒷받침한다.

[0439] 실시예 8

[0440] 폐섬유증의 잠재적 바이오 마커로서의 코리신의 혈장 수준

[0441] IPF 환자에 있어서의 AE의 발생과 빈도는, 폐섬유증의 가속과 바람직하지 못한 임상적 귀결을 예측시킨다(비특허문헌 1). 순환 코리신이 폐섬유증의 바이오 마커를 구성할 수 있는 것으로 예상하였다. 이 예상을 검증하기 위하여, 항코리신 단클론성 항체를 이용한 효소면역검정을 설계하였다.

[0442] 8-1: 코리신의 측정

[0443] 항코리신 단클론성 항체 클론 9A를 포착 항체로서 그리고 바이오틴화(biotinylated) 항코리신 단클론성 항체를 검출 항체로서 사용하는 효소면역측정법을 개발하였다. 간단히 말하면, 포착 항체를, 96웰 플레이트 위에, 최종 농도 2μg/mL의 인산완충 생리식염수에서 4℃에서 하룻밤 코팅하였다. 인산완충식염수 중, 1% 소혈청 알부민으로 블록킹하고, 인산염으로 적절하게 세정한 후, Tween 중 완충 식염수, 다양한 표준 농도의 코리신 및 혈장 시료를 웰에 첨가하고, 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 다음에, 웰을 세정한 후, 인산완충 생리식염수에 서양고추냉이 퍼옥시다제 결합 스트렙타비딘(R&D Systems)을 첨가하였다. 적절한 세정 및 인큐베이션 후, 발색을 위하여 기질 용액을 첨가하고, 450nm에서 흡광도를 판독하였다. 값은 몇 가지 농도의 코리신을 이용해서 그려진 표준 곡선으로부터 외삽하였다.

[0444] 8-2: 폐섬유증의 잠재적 바이오 마커로서의 코리신의 평가

[0445] 전장 인간 TGFβ1을 코딩하는 유전자를 폐-특이적 과잉발현시켜서 야기한 폐섬유증을 지닌 TGFβ1 트랜스제닉 마우스(TG) 및 야생형(WT) 마우스에 있어서의 코리신의 혈장 수준을 측정하고, 섬유증 마커와의 상관을 평가하였다(도 33a). 구체적으로는, 전환 성장 인자 β1(TGFβ1) 트랜스제닉(TG) 마우스의 유전자형을 특정하고, 컴퓨터 단층촬영(CT)을 수행하고, 폐섬유증의 정도에 대해서 소견을 기록하였다. 혈액 및 폐조직 샘플링을 위하여 마우스를 안락사시켰다. 폐섬유증의 애쉬크로프트 스코어, 및 혈장 코리신과 폐 하이드록시프롤린의 측정은, 재료 및 방법란에 기재된 바와 같이 실행하였다.

[0446] 그 결과, 예상대로, TGFβ1 TG 마우스에 있어서의 폐섬유증의 컴퓨터 단층촬영(CT) 스코어, 섬유증의 애쉬크로프트 스코어 및 폐 하이드록시프롤린 함량은, WT 마우스와 비교해서 유의하게 증가되었다(도 32b; 도 34a, b). TGF β1 TG 마우스는, WT 마우스와 비교해서, 코리신의 혈장 농도가 유의하게 상승하고, 코리신의 혈장 농도는 CT 섬유증 스코어, 애쉬크로프트 스코어 및 폐 하이드록시프롤린 함량과 유의한 상관 관계가 있었다. 이것은, 폐섬유증에 있어서의 질환 진행의 바이오 마커로서의 순환 코리신의 잠재적 응용을 뒷받침한다(도 31b).

[0447] 실시예 9

[0448] 백신의 조제

[0449] 스타필로코커스 네팔렌시스의 코리신-함유 트랜스글리코실라제(즉, 에스. 네팔렌시스 균주 CNDG 단백질 00351)와 같은 패밀리의 몇 가지 트랜스글리코실라제에 대해서, 도 4의 얼라인먼트에 나타낸 바와 같이, 코리신 위치의 아미노산 서열을 조사하였다. 어떤 종류의 세균이 특정 위치에 아미노산의 변화를 갖는 것은 매우 명확하다. 웨이셀라 콘푸사(콘푸사) 코리신 펩타이드는 Asp14Ser(또는 N14S)과 Ala16Asp(또는 A16N)의 2개의 아미노산 변화를 나타냈다. 자발적 돌연변이/변화의 모든 명명은 에스. 네팔렌시스 코리신 번호에 의거하고 있다. 즉, 위치

1은 아이소류신(I)이고, 위치 19는 아르기닌(R)이다. 도 3에 나타낸 바와 같이, (3) 더블유. 콘푸사(*W. confusa*) 펩타이드(Shem_00350 또는 1b 또는 7b 또는 12b)가 합성되었고(수탁번호 WP_112464134.1), 이의 아폽토시스 활성은, W. conf 펩타이드에 나타낸 2개의 변화를 제외하고 같은 서열을 갖는 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 코리신 펩타이드와 비교하였다(즉, N14S 및 A16N-펩타이드 수탁 번호WP_112464134.1). 도 3(3)에 나타낸 바와 같이, 이들 돌연변이는 더블유. 콘푸사 펩타이드(Shem_00350 또는 1b 또는 7b 또는 12b의 활성의 25%)의 아폽토시스 활성을 극히 저하시킨 것은 매우 명확하다. 코리신 펩타이드의 아폽토시스 유도 능력을 저하시키는 돌연변이의 다른 예는, 마이코박테륨 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) 코리신 펩타이드1(Myco 얼라인먼트 중의 Absc-1 또는 Genbank 수탁번호 SKT 99287.1)이다. Myco abc-1 펩타이드는, 에스. 헤몰리티쿠스 코리신 펩타이드와 비교해서, 도 4의 얼라인먼트(4)에 나타낸 바와 같이, 3개의 아미노산 변화와 1개의 아미노 산소 결실을 갖는다. 도 3(3)에 나타낸 아폽토시스 유도 능력에 관한 데이터는, 아미노산의 변화 및 결실이 Myabs-1 펩타이드의 훨씬 낮은 유도 능력(용혈성 연쇄구균 펩타이드-Shem 00350 또는 1b 또는 7b 또는 12b의 활성의 약 30%)을 초래한 것을 나타내고 있다. 원래의 코리신, 즉, 스타필로코커스 네팔렌시스 균주의 CNDG펩타이드(또는 얼라인먼트 중의 CNDG-00351)와 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 펩타이드(Shem_00350 또는 1b 또는 7b 또는 12b)에서는, 반대의 효과가 관찰되었다. 여기에서는, 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 펩타이드(즉, 에스. 네팔렌시스 펩타이드 중의 Gly 7 Ser 또는 G7S)와 비교해서, 스타필로코커스 네팔렌시스 펩타이드에 단일 아미노산 변화가 있었다. 이전의 예와는 달리, 아폽토시스 유도 활성은, 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 펩타이드와 비교해서, 항상 약간 더 높았다.

[0450] 상기 분석에 의거해서, 코리신에 있어서 아미노산 돌연변이를 행하여, 이하의 3개의 펩타이드를 합성하였다.

[0451] 코리신 N14S: IVMPESSGNPNAVSPAGYR(서열번호 55)

[0452] 코리신 P15A: IVMPESSGNPNAVNAAGYR(서열번호 56)

[0453] 코리신 A16N: IVMPESSGNPNAVNPNGYR(서열번호 57)

[0454] 합성 후, 이들의 활성이 이들의 친(펩타이드) 서열(IVMPESSGNPNAVNPAGYR)과 비교해서 활성이 저하되어 있는지의 여부를 결정하였다. 1개의 아미노산이 변화되면 코리신 펩타이드는 불활성이 될 것으로 예상하였다. 얻어진 결과를, 도 35에 나타낸다. 예상대로, 코리신 N14S 및 P15A가, 기능을 갖지 않는 스크램블 펩타이드와 동등하게, 아폽토시스 활성이 없는 것으로 판명되었다.

[0455] 다음에, 아미노산의 변경을 (항체 결합은 N-말단 측의 절반에 있는 것으로 여겨지므로, C-말단 측의 절반에 초점을 맞추어) 행한다. 현재, 1개의 아미노산의 변화를 조사하고 있지만, 이 결과에 기초하여, 2 내지 3개의 아미노산을 조합시킴으로써, 코리신 펩타이드의 아폽토시스 유도성을 완전히 제거해야 한다. 이 죽은(또는 감쇠) 펩타이드는, 코리신-방출 세균으로부터 또는 코리신 펩타이드의 투여로부터 마우스 환자를 보호하는 능력을 결정하기 위하여, 근육내 주사 또는 비강내(흡입) 투여 중 어느 것인가를 통해 마우스 모델에 있어서 시험될 수 있다.

[0456] 실시예 10

[0457] 코리신의 추가적 활성

[0458] 근위 세뇨관 상피 유래의 Caki-2 세포주, 성인 피부 유래의 각질형성세포의 HaCaT 세포주, 망막색소상피의 ARPE-19의 세포주, 결장암 유래 Caco-2의 세포주, 및 정상인 인간 소장 상피세포 유래 HIEC-6의 세포주는, 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection; 버지니아주 머내서스 소재)으로부터 입수하였다. RPMI 1640 배지는 Sigma-Aldrich(미주리주 세인트루이스 소재)로부터 구입하고, 소 태아 청(FBS)은 바이오 비타커(Bio Whittaker; 메릴랜드주 워커스빌 소재)로부터 구입하였다. L- 글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신은 Invitrogen(캘리포니아주 칼즈배드 소재)으로부터 입수하였다. Caki-2 세포, Caco-2 세포 및 ihPOD세포는 RPMI 1640 배지, HaCaT 세포는 DMEM 배지, ARPE-19 세포는 DMEM/F12 배지, HIEC-6 세포는 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0459] 웨스턴 블로팅에 의한 카스파제-3의 절단을 검토하기 위하여, 각 세포주를 서브컨플루언트가 될 때까지 배양하였다. 다음에, 세포를 세정하고, FCS를 포함하지 않는 배지에서 하룻밤 배양하였다. 세포를 10㎍/mL의 스크램블 펩타이드, 코리신 또는 코리신-유사 펩타이드로 자극하고, 24시간 배양하고 나서, 웨스턴 블로팅을 행하였다.

[0460] 얻어진 결과를 도 39에 나타낸다. 카스파제-3 활성의 검토는, 스크램블 펩타이드로 처리된 세포와 비교해서, 코

리신 및 코리신-유사 펩타이드로 처리된 모든 세포에서 카스파제-3의 절단이 유의하게 증가된 것을 나타내고, 아폽토시스 경로의 활성화를 나타내고 있다. 즉, 도 39는 코리신이 대장 점막 상피세포, 소장 점막 상피세포, 피부의 각질형성세포, 망막 상피세포, 신장의 포도사이트 및 요관상피세포에 있어서 아폽토시스를 유발하는 것을 나타내고 있다. 이들 결과에 의거하여, 본 발명의 항코리신 단클론성 항체는, 폐섬유증 이외에, 이들 세포에 기인하는 질환, 예를 들어, 궤양성 대장염, 클론병, 망막증, 신장염·신장섬유증, 만성피부염, 강피증, 간경변 등에 대한 치료 효과를 기대할 수 있다.

[0461] 실시예 11

[0462] 혈청 중 코리신 농도의 비교

[0463] 토끼 다클론성 항트랜스글리코실라제 다클론성 항체와 바이오틴화된 항코리신 9A 단클론성 항체를 이용해서 효소면역측정법을 개발하였다. 건강한 대상체, 병태가 안정적인 특발성 폐섬유증(IPF) 환자 및 급성 악화가 있는 IPF 환자 사이에서 혈청 중의 코리신 수준을 비교하였다.

[0464] 얻어진 결과를 도 40에 나타낸다. 도 40은, 혈청 중의 코리신 농도가, 건강한 대상체와 비교해서 안정적인 IPF 환자에서는 유의하게 더 높았고, 또한 안정적인 IPF 환자와 비교해서 급성 악화의 IPF 환자에서는 유의하게 더 높았던 것을 나타낸다. 이상의 결과에 기초하여, 코리신의 측정의 IPF 환자의 바이오 마커로서의 유용성이 명백해졌다.

[0465] 실시예 12

[0466] 천연 코리신이 합성 코리신보다도 더 강렬한 아폽토시스 활성을 나타낸다

[0467] 지금까지의 실험은, 합성 코리신이 10μg/mL의 농도로 아폽토시스 활성을 갖는 것을 나타내었다. 합성 코리신과 비교해서 세균이 분비되고 있는 천연 코리신이 어느 정도의 활성을 가질지를 검토하였다. 우선, 세균 배양 상청액의 아폽토시스 활성을 조사하였다. 10배(1/10) 희석된 스타필로코커스 네팔렌시스의 배양 상청액을 항코리신 단클론성 항체(클론 A21)(20μg/mL)의 존재하 또는 부재하에, A59 허파꽈리 상피세포의 배지에 첨가하였다. 48시간 배양 후, A549 세포의 아폽토시스를 플로우 사이토메트리에 의해 검토하였다.

[0468] 얻어진 결과를 도 41a, b 및 c에 나타낸다. 도 41a는, 10배 희석된 세균 상청액에 의한 A549 세포의 아폽토시스가, 항코리신 단클론성 항체에 의해 유의하게 그리고 거의 완전히 억제되는 것을 나타낸다.

[0469] 다음에, 희석되지 않는 세균 상청액 중의 천연 코리신의 농도를 효소면역측정법을 사용하여 측정하였다.

[0470] 얻어진 결과를 도 41b 및 c에 나타낸다. 도 41b 및 c는 스타필로코커스 네팔렌시스의 미희석 배양 상청액 중의 천연 코리신의 평균 농도가 1042±174.6 pg/mL인 것과, 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 미희석 배양 상청액 중의 천연 코리신의 평균 농도가 802.4±57.7 pg/mL인 것을 나타낸다.

[0471] 이상의 결과에 기초하여, A549 세포의 아폽토시스를 유도하는 실험에서는 세균 상청액을 1:10 희석에서 사용했기 때문에, 천연 코리신은 약 100 pg/mL의 농도로 강력한 생물 활성을 가지는 것이 명확하게 되었다. 합성 코리신은 10μg/mL의 농도로 아폽토시스 활성을 나타내지만, 도 41a, b 및 c에 예시된 바와 같이, 천연 코리신은 약 100 pg/mL의 농도로 아폽토시스 활성을 나타낸다. 따라서, 천연 코리신은 합성 코리신(10μg/100pg=100,000)보다도 100,000배의 아폽토시스 활성을 가지는 것으로 판명되었다.

[0472] 실시예 13

[0473] 항코리신 단클론성 항체(클론 A21)는 인간 체액(기관지 허파꽈리 세정액) 중의 천연 코리신의 아폽토시스 활성도 억제한다

[0474] IPF 환자의 기관지 허파꽈리 세정액(BALF)에 존재하는 천연 코리신의 아폽토시스 촉진 활성을 검토하기 위해서 상기와 같은 실험을 실시하였다. 급성 악화가 있는 IPF 환자(n=14) 및 건강한 대상체(n=5)로부터 수집한 BALF를, 항코리신 단클론성 항체(클론 A21) 또는 대조군 IgG(20μg/mL)의 존재 하, A59 허파꽈리 상피세포의 배지에 첨가하고, 48시간 후, 아폽토시스를 플로우 사이토메트리에 의해 검토하였다.

[0475] 도 41d는 각 IPF 환자 또는 각 건강 대상체에 의해 얻어진 결과를 나타낸다. 도 41e는 모든 IPF 환자 또는 모든 건강 대상체에 대해서 얻어진 결과를 나타낸다. 도 41e는 본 발명의 항코리신 단클론성 항체가, IPF 환자의 BALF의 아폽토시스 활성을 유의하게 억제하는 것을 나타낸다. 한편, 도 41f는 IPF 환자(n=14)의 BALF 중의 천연 코리신의 농도(650.9±218.3 pg/mL) 및 건강한 대상체(n=5)의 BALF 중의 천연 코리신의 농도(458.4±60.7

pg/mL)를 나타낸다. A549 세포의 아폽토시스를 유도하는 실험에서는 BALF의 1:2 희석을 사용하였다. 따라서, 인간 체액 중의 천연 코리신도 강력한 생물 활성을 갖는 것으로 판명되었다.

[0476] 또한, 도 41g는 시험관내 그리고 세포배양 상청액 중의 코리신의 반감기를 나타낸다. 어느 정도의 속도로 세포 배양 시스템에 있어서 코리신이 대사될지를 알기 위해서, 코리신의 반감기를 조사하였다. A549 허파꽈리 상피세포를, 10% 소태아혈청을 첨가한 DMEM에서 컨플루언트가 될 때까지 배양하였다. 다음에, 코리신을 최종농도 10 마이크로그램/mL로 세포배양배지에 접종하고, 0, 1, 3, 6, 12 및 24시간 후에 세포 상청액을 채취하였다. 코리신의 농도를 효소면역측정법으로 측정하고, 코리신의 반감기를 검토하였다. 그 결과, 도 41g에 나타낸 바와 같이, 용액 중의 (합성) 코리신의 반감기는, 인간 허파꽈리 세포 배양 시스템에서는 1시간 미만인 것이 밝혀졌다. 이들 결과로부터, IPF 환자의 급성 악화가 발증할 때에 환자의 혈청 중(천연)코리신의 농도는 높아지지만, 반감기가 짧기 때문에, 그 농도가 재빠르게 저하한다고 하는 것을 알 수 있다. 따라서, 급성 악화의 발증 직후에 혈청 코리신의 측정을 수행해야 한다.

[0477] 다음은 본 명세서에 인용하고 있는 참고 문헌이다.

[0478] 참고 문헌

20. Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K. & Prevost, G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. Int JMol Sci20, doi:10.3390/ijms20051215 (2019).

21. Czekaj, T., Ciszewski, M. & Szewczyk, E. M. Staphylococcus haemolyticus - an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. Microbiology (Reading) 161, 2061-2068, doi: 10.1099/mic.0.000178 (2015).

22. Yin, Y. et al. A hybrid sub-lineage of Listeria monocytogenes comprising hypervirulent isolates. Nat Commun 10, 4283, doi: 10.1038/s41467-019-12072-l (2019).

23. Johansen, M. D., Herrmann, J. L. & Kremer, L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus. Nat Rev Microbiol 18, 392-407, doi: 10.1038/s41579-020-0331-1 (2020).

24. Fusco, V. et al. The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential. Front Microbiol 6, 155, doi:10.3389/fmicb.2015.00155 (2015).

25. Bedoui, S., Herold, M. J. & Strasser, A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. Nat Rev Mol Cell Biol 21, 678-695, doi: 10.1038/s41580-020-0270-8 (2020).

26. Batandier, C., Leverve, X. & Fontaine, E. Opening of the mitochon

[0479]

drial permeability transition pore induces reactive oxygen species pr oduction at the level of the respiratory chain complex I. J Biol Chem 279, 17197-17204, doi: 10.1074/jbc.M310329200 (2004).

27. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by e liminating IAP inhibition. Cell 102, 33-42, doi: 10.1016/s0092-8674(0 0)00008-8 (2000).

28. Jenkins, R. G. et al. An Official American Thoracic Society Works hop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Po tential Therapies for Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol56 , 667-679, doi: 10.1165/rcmb.2017-0096ST (2017).

29. Urawa, M. et al. Protein S is protective in pulmonary fibrosis. / Thromb Haemost 14, 1588-1599, doi: 10.1111/jth.l3362 (2016).

30. Drakopanagiotakis, F., Xifteri, A., Polychronopoulos, V. & Bouros , D. Apoptosis in lung injury and fibrosis. Eur Respir J32, 1631-1638 , doi:10.1183/09031936.00176807 (2008).

31. D'Alessandro-Gabazza, C. N. et al. Development and preclinical ef ficacy of novel transforming growth factor-betal short interfering RN As for pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol46, 397-406, doi : 10.1165/rcmb.2011-01580C (2012).

32. Upagupta, C., Shimbori, C., Alsilmi, R. & Kolb, M. Matrix abnorma lities in pulmonary fibrosis. Eur Respir Rev 27, doi:10.1183/16000617 .0033-2018 (2018).

33. Ryerson, C. J., Cottin, V., Brown, K. K. & Collard, H. R. Acute e xacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: shifting the paradigm. Eur Respir J 46, 512-520, doi: 10.1183/13993003.00419-2015 (2015).

34. Jeon, K. et al. Prognostic factors and causes of death in Korean patients with idiopathic pulmonary fibrosis. RespirMedlOO, 451-457, d

oi:10.1016/j.rmed.2005.06.013 (2006).

35. Kondoh, Y. et al. Risk factors of acute exacerbation of idiopathi c pulmonary fibrosis. Sarcoidosis Vase Diffuse Lung Dis 27, 103-110 (2010).

36. Raghu, G. et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An O fficial ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Cri t Care Med 198, e44-e68, doi:10.1164/rccm.201807-1255ST (2018).

37. Kreuter, M. & Maher, T. M. Treatment of Acute Exacerbation of Idi opathic Pulmonary Fibrosis. A Call to Arms. Am J Respir Crit Care Med 201, 1030-1032, doi: 10.1164/rccm.202001 -0057ED (2020).

38. Collard, H. R. et al. Suspected acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis as an outcome measure in clinical trials. Respir R es 14, 73, doi:10.1186/1465-9921-14-73 (2013).

39. Barbas-Filho, J. V. et al. Evidence of type II pneumocyte apoptos is in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual i nterstitial pneumonia (UIP). J Clin Pathol54, 132-138, doi: 10.1136/j cp.54.2.132 (2001).

40. Sauler, M., Bazan, I. S. & Lee, P. J. Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. Annu Rev Physiol 81, 375-402, doi:10.114 6/annurev-physiol-020518-114320 (2019).

41. Uhal, B. D. etal. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. Am J Physiol 269, L819-828, doi: 10.1152/ajplung.l995.269.6.L819 (1995).

42. Bellani, G. et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Ca re Units in 50 Countries. JAMA 315, 788-800, doi: 10.1001/jama.2016.0 291 (2016).

43. Force, A. D. T. et al. Acute respiratory distress syndrome: the B

erlin Definition. JAMA 307, 2526-2533, doi:10.1001/jama.2012.5669 (2012).

44. Marchioni, A. et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: lessons learned from acute respiratory distress syndrome? Crit Care 22, 80, doi:10.1186/s13054-018-2002-4 (2018).

45. Matthay, M. A. et al. Acute respiratory distress syndrome. Nat Rev Dis Primers 5, 18, doi: 10.1038/s41572-019-0069-0 (2019).

46. Ware, L. B. & Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. NEnglJ Med342, 1334-1349, doi:10.1056/NEJM200005043421806 (2000).

47. Domscheit, H., Hegeman, M. A., Carvalho, N. & Spieth, P. M. Molecular Dynamics of Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury in Rodents. Front Physiol 11, 36, doi: 10.3389/fphys.2020.00036 (2020).

48. Menezes, S. L. et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. J Appl Physiol (1985) 98, 1777-1783, doi: 10.1152/japplphysiol.01182.2004 (2005).

49. Chiba, H., Otsuka, M. & Takahashi, H. Significance of molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: A mini review. Respir Investig 56, 384-391, doi: 10.1016/j.resinv.2018.06.001 (2018).

50. Collard, H. R. et al. Plasma biomarker profiles in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 299, L3-7, doi: 10.1152/ajplung.90637.2008 (2010).

51. Moodley, Y. P. et al. Analysis by proteomics reveals unique circulatory proteins in idiopathic pulmonary fibrosis. Respirology 24, 1111-1114, doi:10.1111/resp.13668 (2019).

52. O'Dwyer, D. N. et al. The peripheral blood proteome signature of idiopathic pulmonary fibrosis is distinct from normal and is associated with novel immunological processes. Sci Repl, 46560, doi:10.1038/s

rep46560 (2017).

53. Rosas, I. O. etal. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS Med5, e93, doi:10.1371/journal.pmed.0050093 (2008).

54. Todd, J. L. et al. Peripheral blood proteomic profiling of idiopathic pulmonary fibrosis biomarkers in the multicentre IPF-PRO Registry. Respir Res 20, 227, doi: 10.1186/s12931-019-1190-z (2019).

55. White, E. S. et al. Plasma Surfactant Protein-D, Matrix Metalloproteinase-7, and Osteopontin Index Distinguishes Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Other Idiopathic Interstitial Pneumonias. Am J Respir Crit Care Med 194, 1242-1251, doi: 10.1164/rccm.201505-08620C (2016).

56. Yang, I. V. et al. The peripheral blood transcriptome identifies the presence and extent of disease in idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One 7, e37708, doi: 10.1371/journal.pone.0037708 (2012).

57. Maranville, J. C. & Di Rienzo, A. Combining genetic and nongenetic biomarkers to realize the promise of pharmacogenomics for inflammatory diseases. Pharmacogenomics 15, 1931-1940, doi: 10.2217/pgs.14.129 (2014).

58. Wang, J. et al. [Research advances in the mechanism of pulmonary fibrosis induced by coronavirus disease 2019 and the corresponding therapeutic measures]. Zhonghua Shao ShangZaZhi36, 691-697, doi:10.3760/cma.j.cn501120-20200307-00132 (2020).

59. Das, K. M. et al. Follow-up chest radiographic findings in patients with MERS-CoV after recovery. Indian J Radiol Imaging 27, 342-349, doi:10.4103/ijri.IJRI_469_16 (2017).

60. George, P. M., Wells, A. U. & Jenkins, R. G. Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy. LancetRespirMed8, 807-815, doi:10.1016/S2213-2600(20)30225-3 (2020).

61. Fujiwara, K. et al. Inhibition of Cell Apoptosis and Amelioration of Pulmonary Fibrosis by Thrombomodulin. Am JPathoim, 2312-2322, doi :10.1016/j.ajpath.2017.06.013 (2017).

62. Koren, S. et al. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. Genome Res 21, 722-736, doi:10.1101/gr.215087.116 (2017).

63. Loman, N. J., Quick, J. & Simpson, J. T. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. Nat Methods 12, 733-735, doi: 10.1038/nmeth.3444 (2015).

64. Walker, B.J. et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. PLoS One 9, el 12963, doi: 10.1371/journal.pone.0112963 (2014).

65. Hunt, M. et al. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. Genome Biol 16, 294, doi:10.1186/sl3059-015-0849-0 (2015).

66. Bankevich, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. JComputBiol 19, 455-477, doi: 10.1089/cmb.2012.0021 (2012).

67. Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol 13, el005595, doi: 10.1371/journal.pcbi. 1005595 (2017).

68. Waterhouse, R. M. etal. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. MolBiolEvol35, 543-548, doi: 10.1093/molbev/msx319 (2017).

69. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29, 1072-1075, doi:10.1093/bioinformatics/btt086 (2013).

70. Delcher, A. L., Salzberg, S. L. & Phillippy, A. M. Using MUMmer to identify similar regions in large sequence sets. Curr Protoc Bioinformatics Chapter 10, Unit 10 13, doi: 10.1002/0471250953.bil003s00 (2003).

71. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30, 2068-2069, doi:10.1093/bioinformatics/btul53 (2014).

72. Francis, M. B. & Carrico, I. S. New frontiers in protein bioconjugation. Curr Opin Chem BiolU, 771-773, doi:10.1016/j.cbpa.2010.11.006 (2010).

73. Koniev, O. & Wagner, A. Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. Chem Soc Rev44, 5495-5551, doi: 10.1039/c5cs00048c (2015).

74. Macardle, P. J. & Bailey, S. in Cell Biology: A Laboratory Handboksol. 1 (ed J.E. Celis) Ch. 57, 475-490 (Elsevier, 2006).

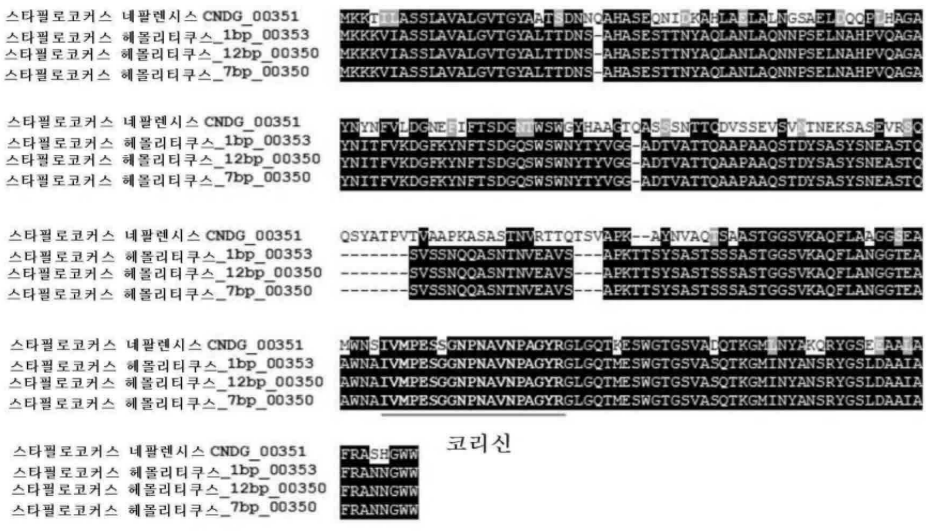
75. Tomaru, A. et al. Oligonucleotide-targeting periostin ameliorates pulmonary fibrosis. Gene TherlA, 706-716, doi:10.1038/gt.2017.80 (2017).

76. Yasui, H. et al. Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. Am J Respir Crit Care Med 163, 1660-1668, doi: 10.1164/ajrccm. 163.7.9911068 (2001).

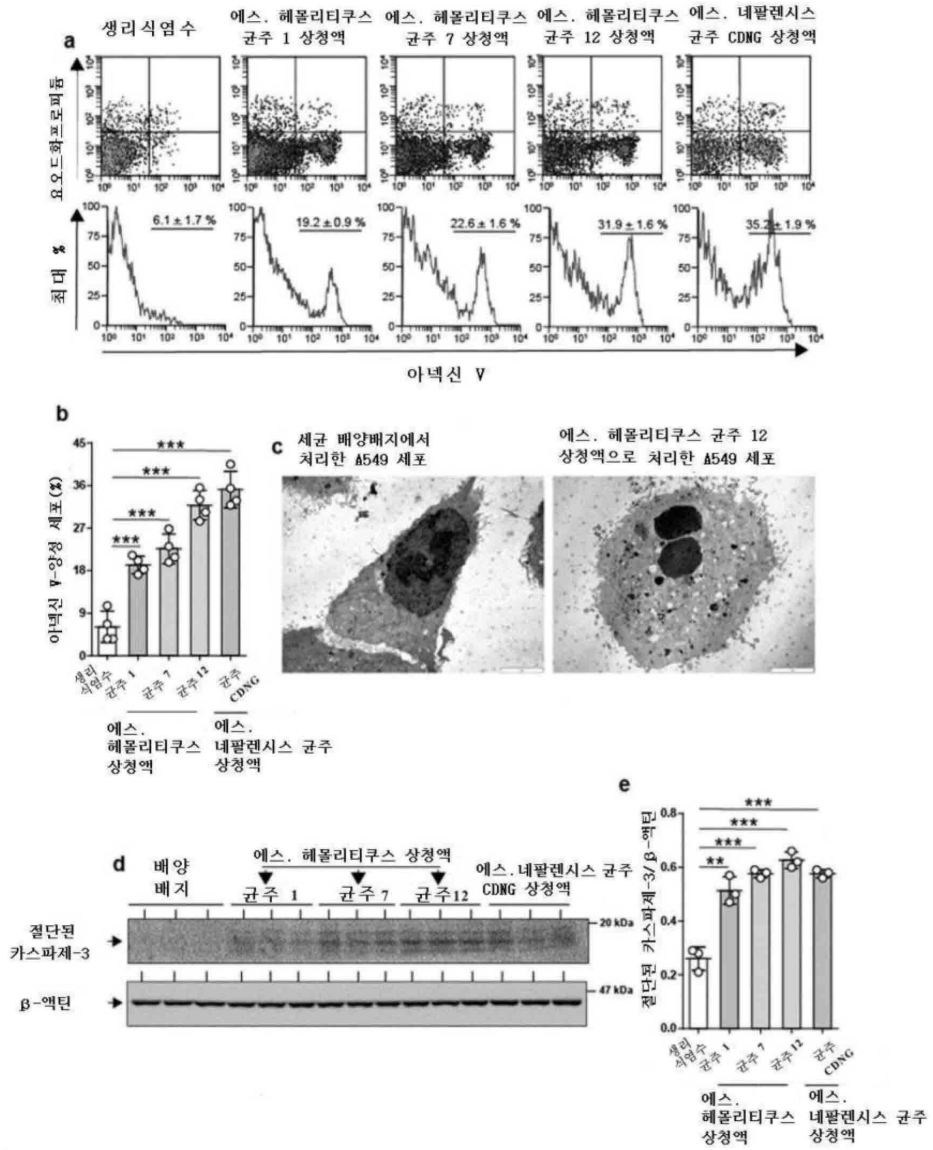
77. Ashcroft, T., Simpson, J. M. & Timbrell, V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. J Clin Pathol 41, 467-470, doi:10.1136/jcp.41.4.467 (1988).

도면

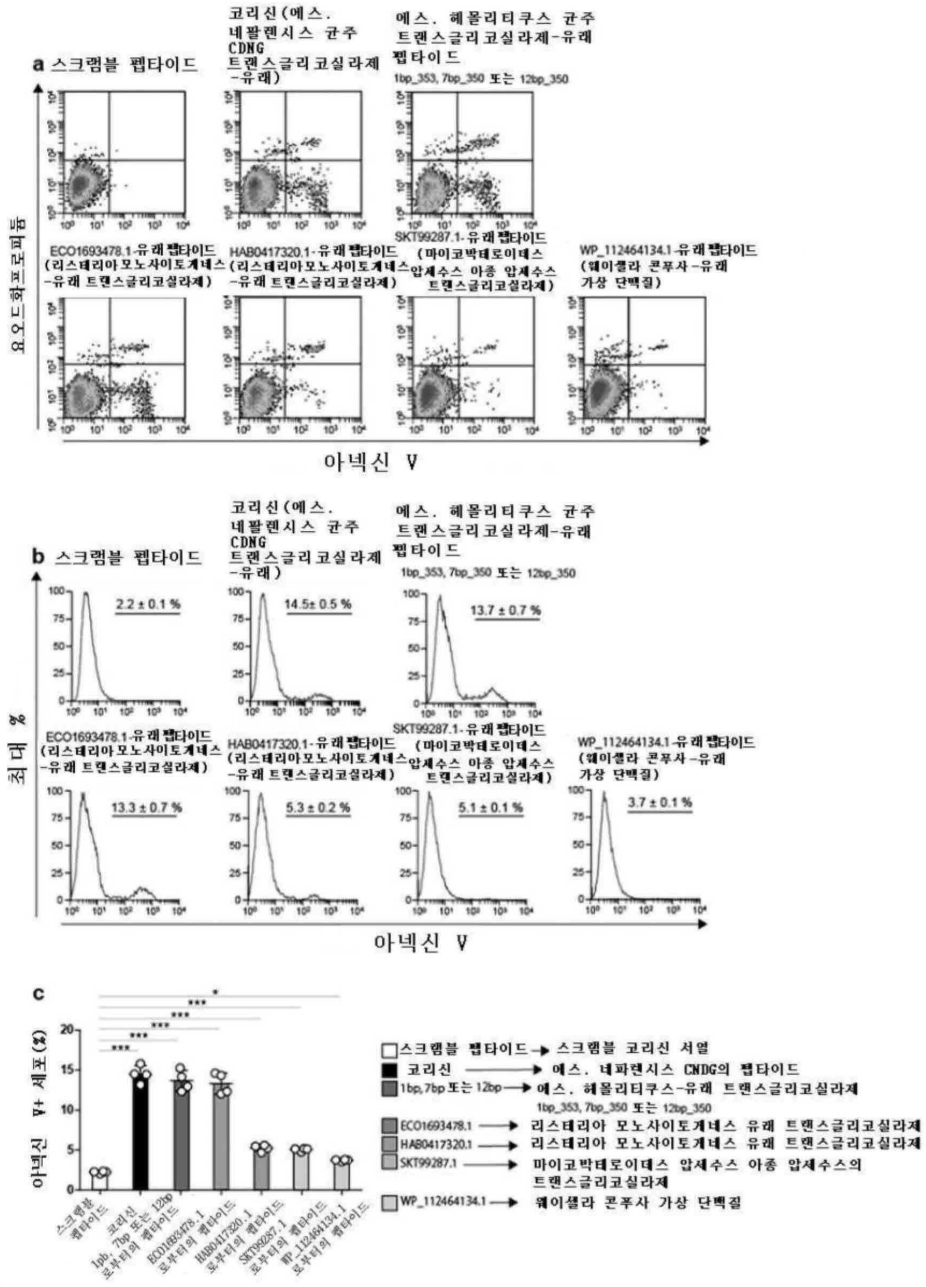
도면1



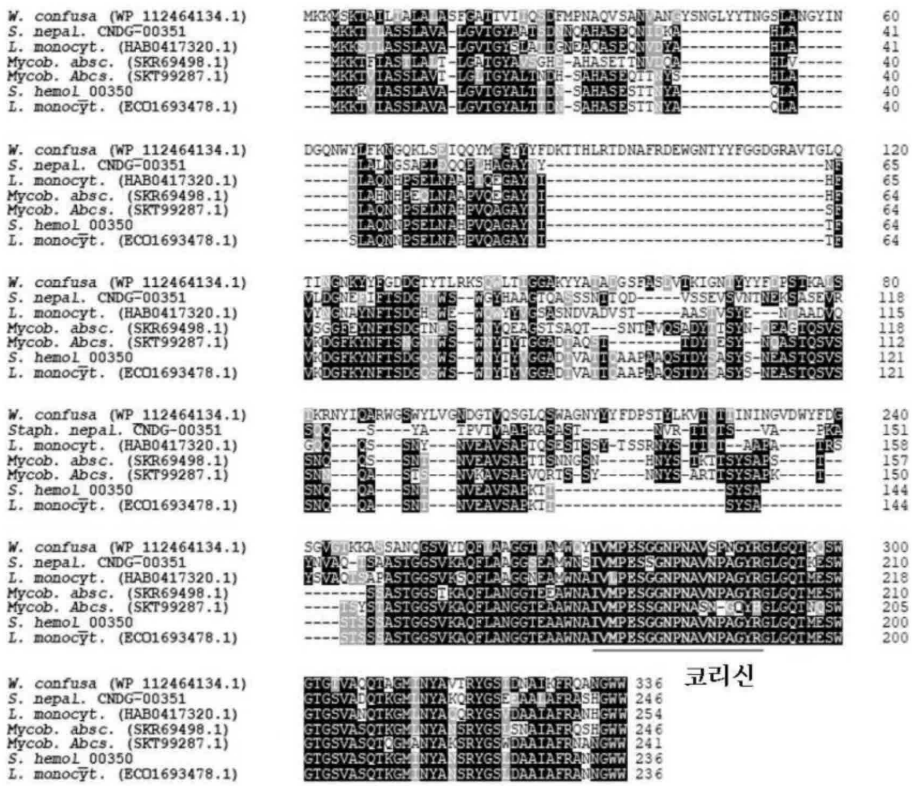
도면2


a
생리식염수
에스. 헤몰리티쿠스 균주 1 상청액
에스. 헤몰리티쿠스 균주 7 상청액
에스. 헤몰리티쿠스 균주 12 상청액
에스. 네팔렌시스 균주 CDNG 상청액
요오드화프로피듐
최대 %
6.1 ± 1.7 %
19.2 ± 0.9 %
22.6 ± 1.6 %
31.9 ± 1.6 %
35.2 ± 1.9 %
아넥신 V
b
아넥신 V-양성 세포(%)
생리식염수
균주 1
균주 7
균주 12
균주 CDNG
에스. 헤몰리티쿠스 상청액
에스. 네팔렌시스 균주 상청액
c
세균 배양배지에서 처리한 A549 세포
에스. 헤몰리티쿠스 균주 12 상청액으로 처리한 A549 세포
d
배양 배지
에스. 헤몰리티쿠스 상청액
균주 1
균주 7
균주12
에스. 네팔렌시스 균주 CDNG 상청액
절단된 카스파제-3
β-액틴
20 kDa
47 kDa
e
절단된 카스파제-3/β-액틴
생리식염수
균주 1
균주 7
균주 12
균주 CDNG
에스. 헤몰리티쿠스 상청액
에스. 네팔렌시스 균주 상청액

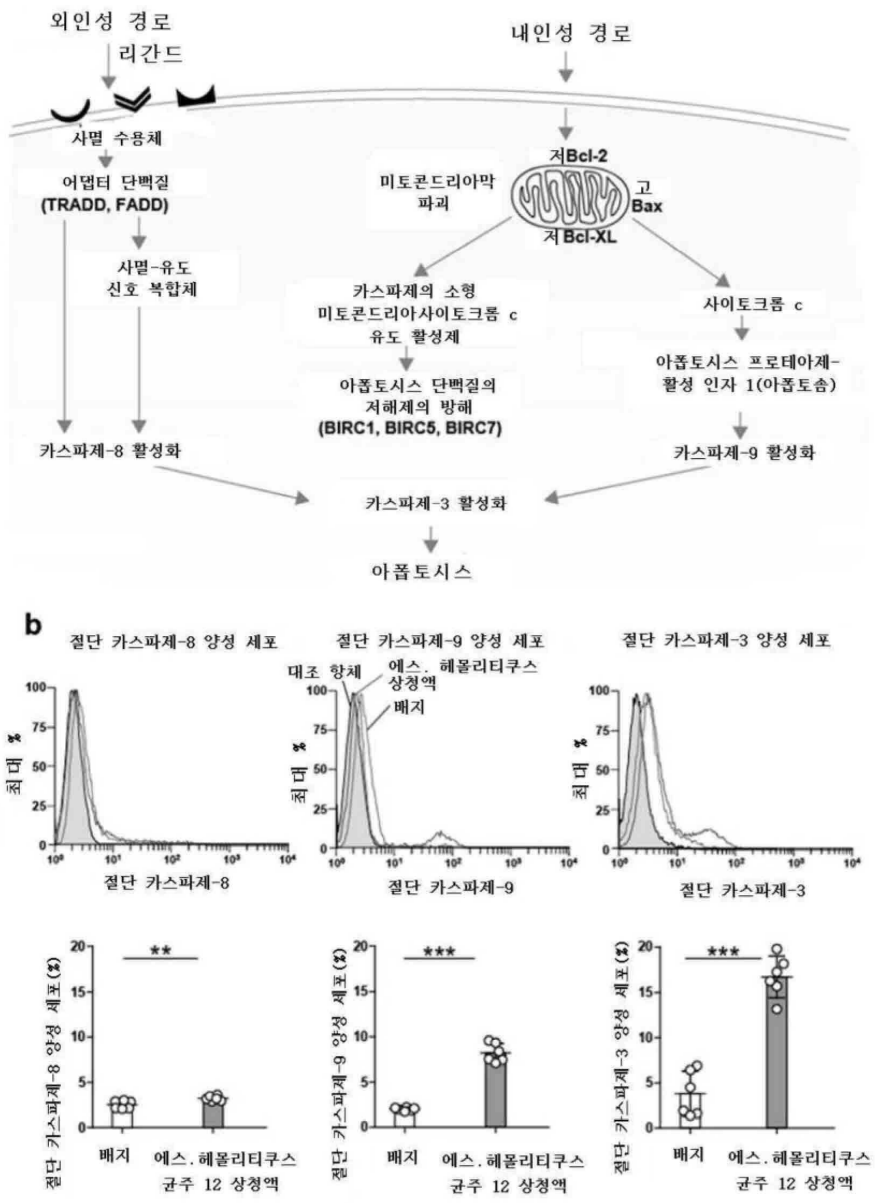
도면3


a 스크램블 펩타이드
코리신(에스. 네팔렌시스 균주 CDNG 트랜스글리코실라제-유래)
에스. 헤몰리티쿠스 균주 트랜스글리코실라제-유래 펩타이드
1bp_353, 7bp_350 또는 12bp_350
ECO1693478.1-유래 펩타이드 (리스테리아 모노사이토게네스 -유래 트랜스글리코실라제)
HAB0417320.1-유래 펩타이드 (리스테리아 모노사이토게네스 -유래 트랜스글리코실라제)
SKT99287.1-유래 펩타이드 (마이코박테로이데스 압세수스 아종 압세수스 트랜스글리코실라제)
WP_112464134.1-유래 펩타이드 (웨이셀라 콘푸사-유래 가상 단백질)
요오드화프로피듐
아넥신 V
b 스크램블 펩타이드
2.2 ± 0.1 %
14.5± 0.5 %
13.7 ± 0.7 %
13.3 ± 0.7 %
5.3 ± 0.2 %
5.1 ± 0.1 %
3.7 ± 0.1 %
최대 %
c
아넥신 V+ 세포(%)
스크램블 펩타이드
코리신
1bp, 7bp 또는 12bp 포유터의 펩타이드
ECO1693478.1 포유터의 펩타이드
HAB0417320.1 포유터의 펩타이드
SKT99287.1 포유터의 펩타이드
WP_112464134.1 포유터의 펩타이드
스크램블 펩타이드 → 스크램블 코리신 서열
코리신 → 에스. 네파렌시스 CNDG의 펩타이드
1bp,7bp 또는 12bp → 에스. 헤몰리티쿠스-유래 트랜스글리코실라제
1bp_353, 7bp_350 또는 12bp_350
ECO1693478.1 → 리스테리아 모노사이토게네스 유래 트랜스글리코실라제
HAB0417320.1 → 리스테리아 모노사이토게네스 유래 트랜스글리코실라제
SKT99287.1 → 마이코박테로이데스 압세수스 아종 압세수스의 트랜스글리코실라제
WP_112464134.1 → 웨이셀라 콘푸사 가상 단백질

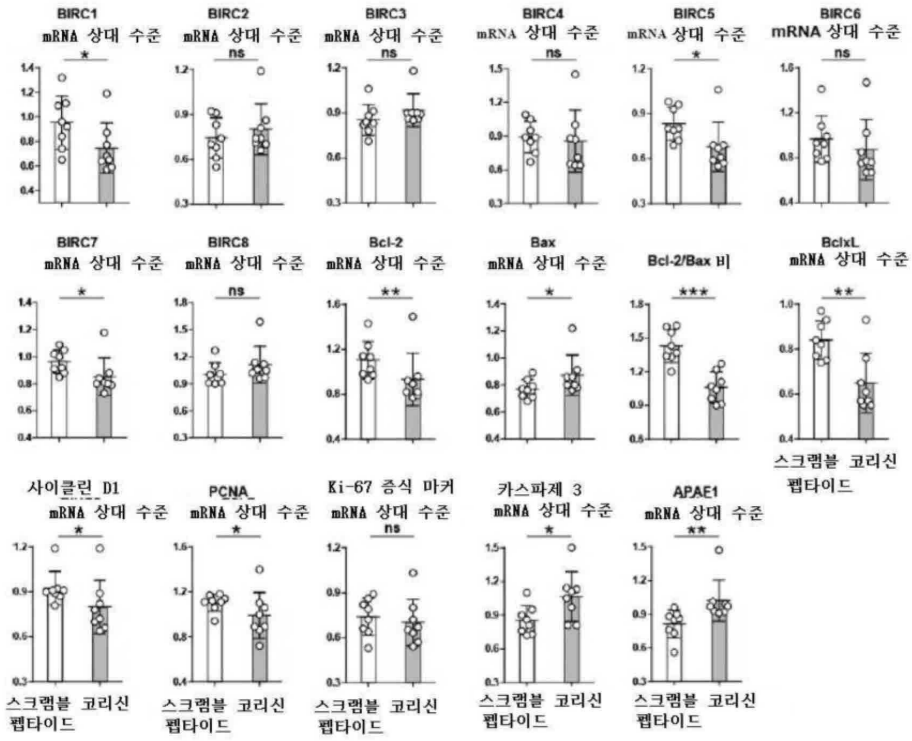
도면4


W. confusa (WP 112464134.1)
S. nepal. CNDG-00351
L. monocyt. (HAB0417320.1)
Mycob. absc. (SKR69498.1)
Mycob. Abcs. (SKT99287.1)
S. hemol 00350
L. monocyt. (ECO1693478.1)
코리신

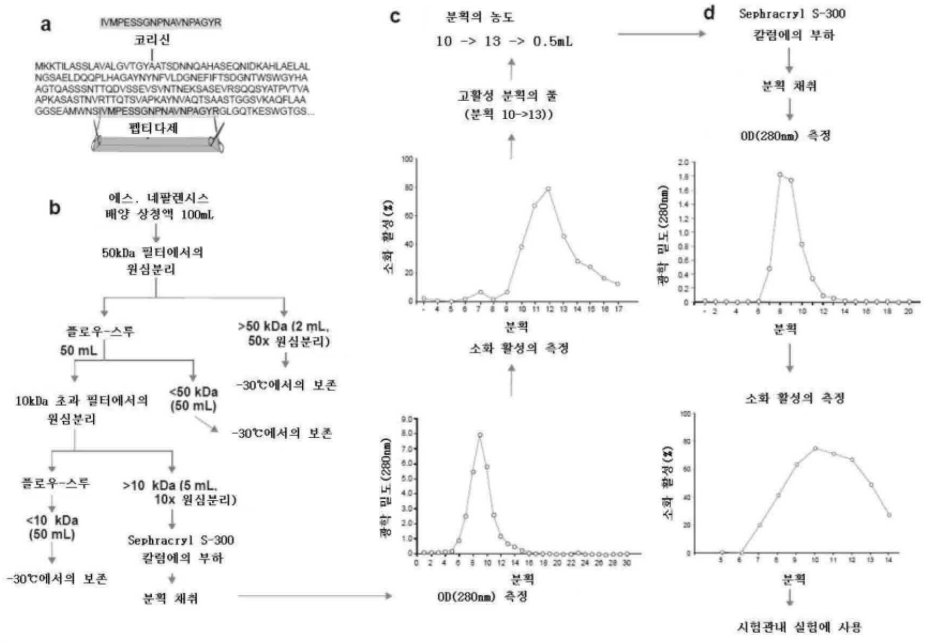
도면5


외인성 경로
리간드
사멸 수용체
어뎁터 단백질
(TRADD, FADD)
사멸-유도
신호 복합체
카스파제-8 활성화
내인성 경로
미토콘드리아막
파괴
저Bcl-2
고
Bax
저Bcl-XL
카스파제의 소형
미토콘드리아사이토크롬 c
유도 활성제
아폽토시스 단백질의
저해제의 방해
(BIRC1, BIRC5, BIRC7)
사이토크롬 c
아폽토시스 프로테아제-
활성 인자 1(아폽토솜)
카스파제-9 활성화
카스파제-3 활성화
아폽토시스
b
절단 카스파제-8 양성 세포
절단 카스파제-9 양성 세포
절단 카스파제-3 양성 세포
대조 항체
에스. 헤몰리티쿠스
상청액
배지
최대 %
절단 카스파제-8
절단 카스파제-9
절단 카스파제-3
절단 카스파제-8 양성 세포(%)
절단 카스파제-9 양성 세포(%)
절단 카스파제-3 양성 세포(%)
**
***
***
배지
에스. 헤몰리티쿠스
균주 12 상청액

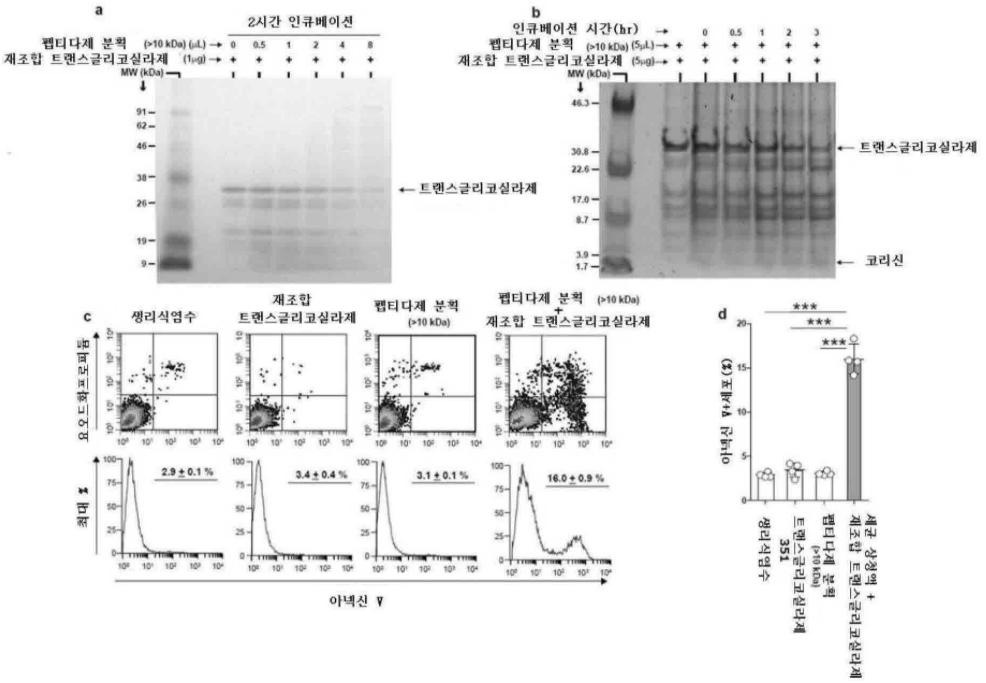
도면6


BIRC1
mRNA 상대 수준
BIRC2
mRNA 상대 수준
BIRC3
mRNA 상대 수준
BIRC4
mRNA 상대 수준
BIRC5
mRNA 상대 수준
BIRC6
mRNA 상대 수준
BIRC7
mRNA 상대 수준
BIRC8
mRNA 상대 수준
Bcl-2
mRNA 상대 수준
Bax
mRNA 상대 수준
Bcl-2/Bax 비
BclxL
mRNA 상대 수준
스크램블 코리신 펩타이드
사이클린 D1
mRNA 상대 수준
PCNA
mRNA 상대 수준
Ki-67 증식 마커
mRNA 상대 수준
카스파제 3
mRNA 상대 수준
APAE1
mRNA 상대 수준
스크램블 코리신 펩타이드
스크램블 코리신 펩타이드
스크램블 코리신 펩타이드
스크램블 코리신 펩타이드
스크램블 코리신 펩타이드

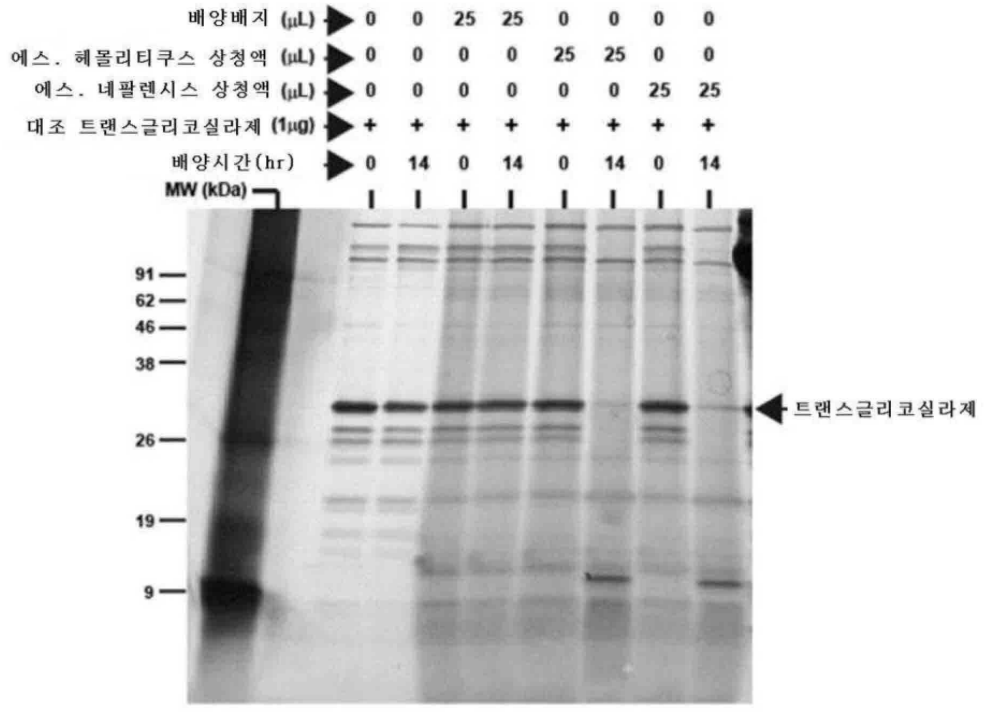
도면7


a
코리신
펩티다제
b
에스. 네팔렌시스 배양 상청액 100mL
50kDa 필터에서의 원심분리
플로우-스루
50 mL
>50 kDa (2 mL, 50x 원심분리)
-30℃에서의 보존
10kDa 초과 필터에서의 원심분리
<50 kDa (50 mL)
-30℃에서의 보존
플로우-스루
>10 kDa (5 mL, 10x 원심분리)
<10 kDa (50 mL)
Sephracryl S-300 칼럼에의 부하
-30℃에서의 보존
분획 채취
c
분획의 농도
10 -> 13 -> 0.5mL
고활성 분획의 풀 (분획 10->13))
소화 활성(%)
분획
소화 활성의 측정
광학 밀도(280nm)
분획
OD(280nm) 측정
d
Sephracryl S-300 칼럼에의 부하
분획 채취
OD(280nm) 측정
광학 밀도(280nm)
분획
소화 활성의 측정
소화 활성(%)
분획
시험관내 실험에 사용

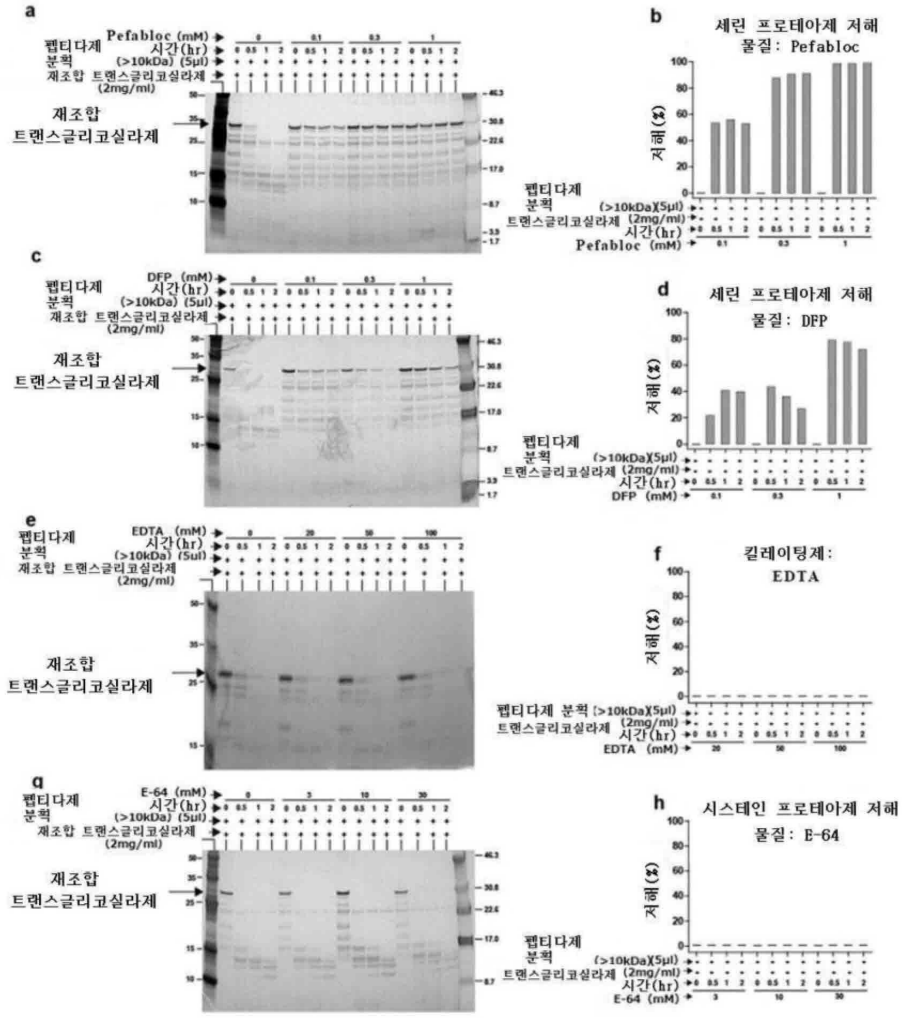
도면8


a
2시간 인큐베이션
펩티다제 분획
재조합 트랜스글리코실라제
MW (kDa)
트랜스글리코실라제
b
인큐베이션 시간(hr)
펩티다제 분획
재조합 트랜스글리코실라제
MW (kDa)
트랜스글리코실라제
코리신
c
생리식염수
재조합 트랜스글리코실라제
펩티다제 분획
재조합 트랜스글리코실라제
요오드화프로피듐
2.9 ± 0.1 %
3.4 ± 0.4 %
3.1 ± 0.1 %
16.0 ± 0.9 %
아넥신 V
d
아넥신 V+세포 (%)
생리식염수
트랜스글리코실라제
펩티다제 분획
재조합 트랜스글리코실라제

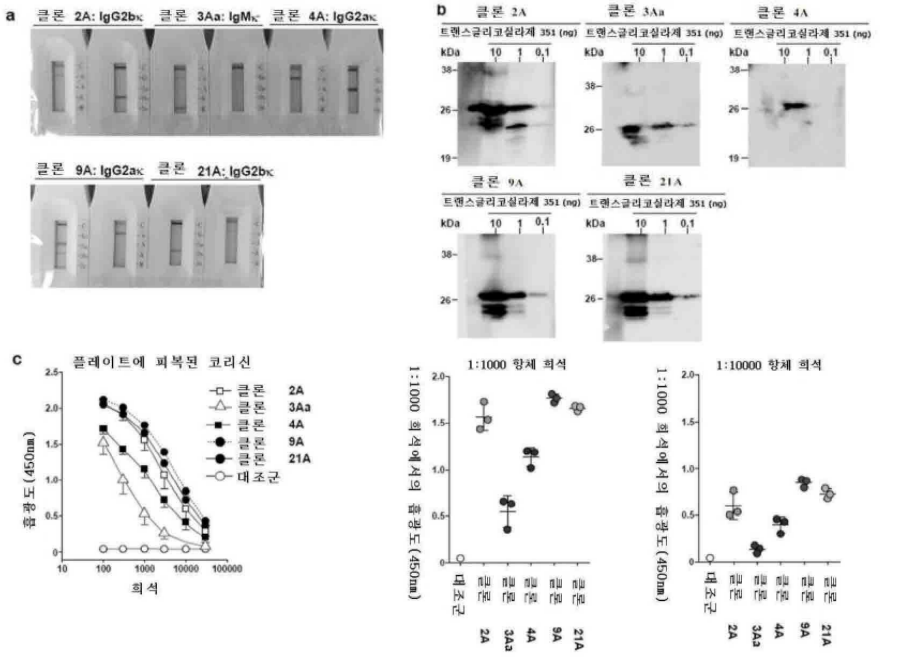
도면9


배양배지 (μL) 0 0 25 25 0 0 0 0
에스. 헤몰리티쿠스 상청액 (μL) 0 0 0 0 25 25 0 0
에스. 네팔렌시스 상청액 (μL) 0 0 0 0 0 0 25 25
대조 트랜스글리코실라제 (1μg) + + + + + + + +
배양시간(hr) 0 14 0 14 0 14 0 14
MW (kDa)
91
62
46
38
26
19
9
트랜스글리코실라제

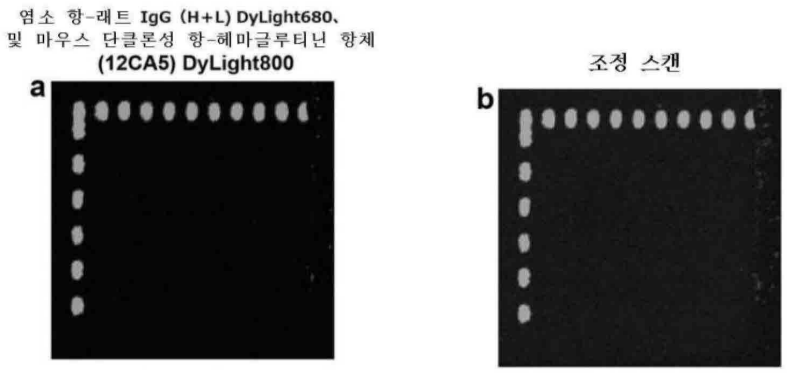
도면10


a
펩티다제 분획 재조합 트랜스글리코실라제 (2mg/ml)
Pefabloc (mM)
시간(hr)
(>10kDa) (5μl)
재조합 트랜스글리코실라제
b
세린 프로테아제 저해
물질: Pefabloc
저해(%)
c
DFP (mM)
d
세린 프로테아제 저해
물질: DFP
e
EDTA (mM)
f
킬레이팅제:
EDTA
g
E-64 (mM)
h
시스테인 프로테아제 저해
물질: E-64

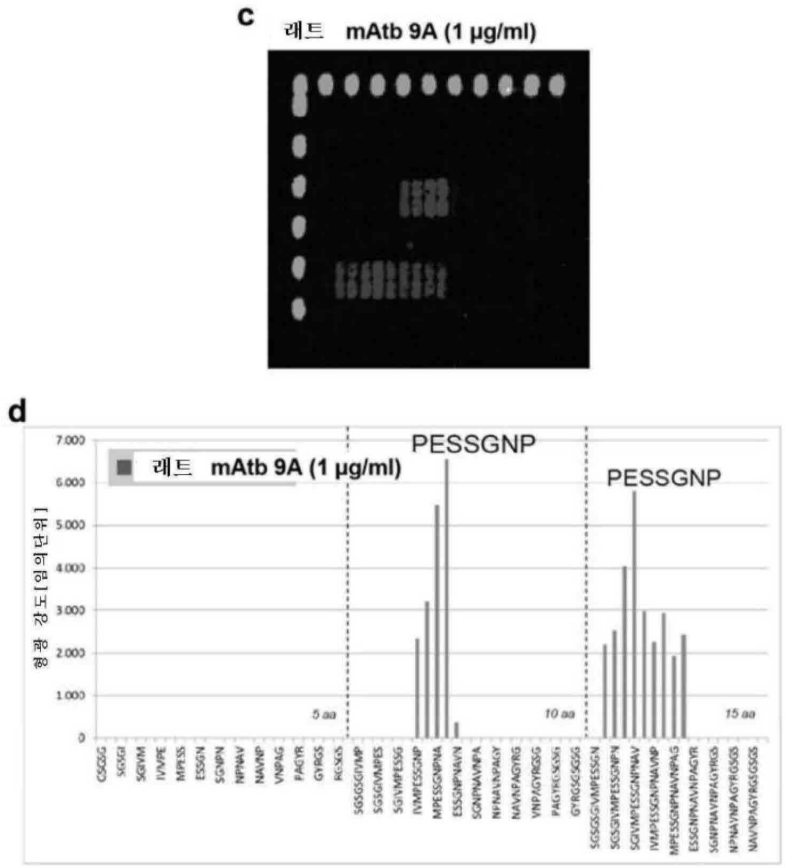
도면11


a
클론 2A: IgG2bκ
클론 3Aa: IgMκ
클론 4A: IgG2aκ
클론 9A: IgG2aκ
클론 21A: IgG2bκ
b
클론 2A
클론 3Aa
클론 4A
클론 9A
클론 21A
트랜스글리코실라제 351 (ng)
kDa
c
플레이트에 피복된 코리신
흡광도 (450nm)
희석
대조군
1:1000 항체 희석
1:1000 희석에서의 흡광도 (450nm)

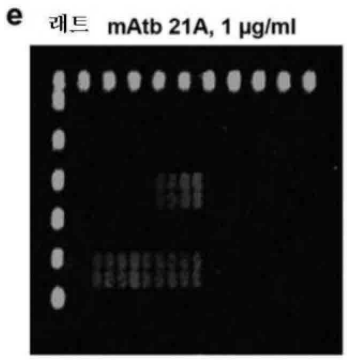
도면12ab

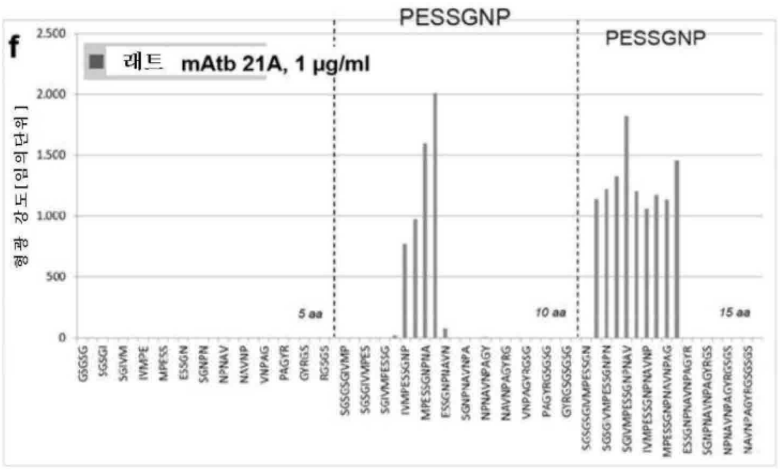


도면12cd

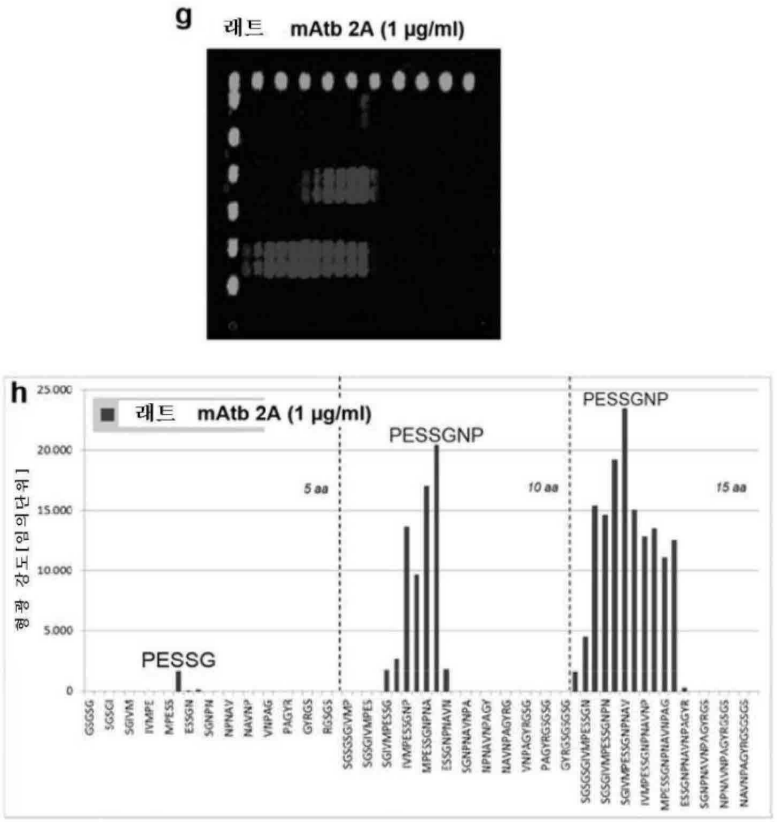


도면12ef

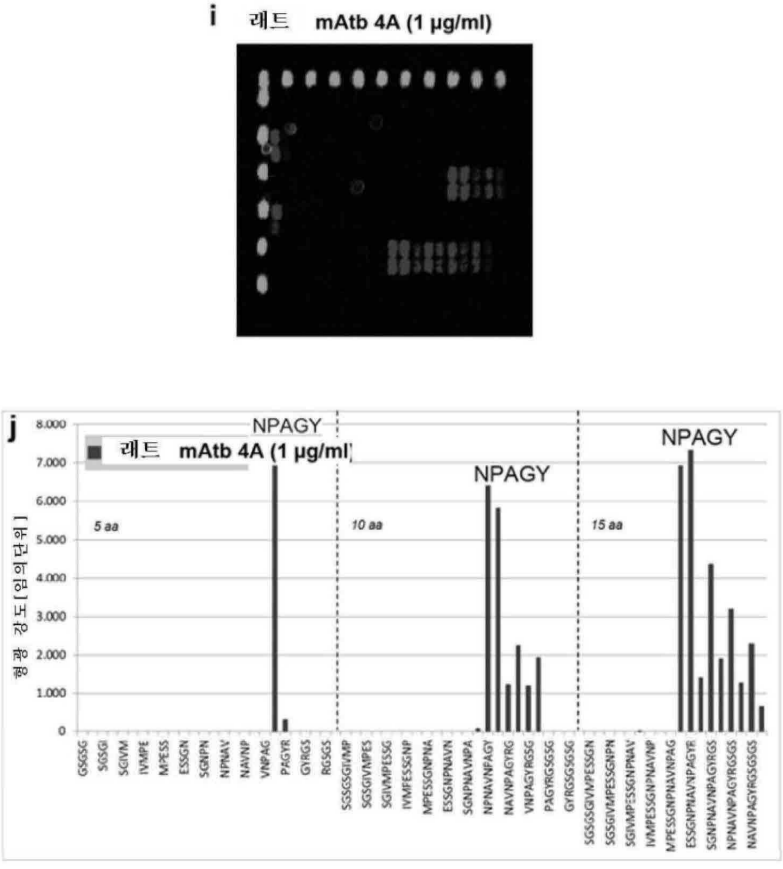

e
래트 mAtb 21A, 1 μg/ml


f
래트 mAtb 21A, 1 μg/ml
PESSGNP
PESSGNP
형광 강도 [임의단위]
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
5 aa
10 aa
15 aa

도면12gh



도면12ij



도면13

항코리신 단클론성 항체 클론 4A

H쇄 (4A-HC.7331) : 1문자 표기, 가변 및 불변영역 서열

MELCMMWIFLVAFLKGVQCevqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyr
qfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedta
iyycASTDAFYFSHSYwgqgvlvtvssAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCL
VKGYFPEPVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWSSQAVTCNVAH

L쇄 (4A-LC.7395) : 1문자 표기, 가변 및 불변영역 서열

MESQTQVLMSLLLWVSGTCGdivmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKK
NYlawyqqkpgrspkllyWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavy
ycQQYYNFPLTfgsgtkleikRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPR
DISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS

항코리신 단클론성 항체 클론 9A

L쇄 (9A-LC.7402): 1문자 표기, 가변 및 불변영역 서열

MESQTQVLMSLLLWVSGTCGdivmtqspssqavsagekvtmsckssQNLLYSEDKK
NYlawyqqkpgqspkllyWAStresgvpdrfigsgsgtdftltvtsvqaedlavyy
cQQYYNFPRTfgggtklelkRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRD
ISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS

항코리신 단클론성 항체 클론 2A

H쇄 (2A-HC.7352): 1문자 표기, 가변 및 불변영역 서열

MDFRLNLVFLVFILKGVWCevklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwir
qapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnsknt lylemnslrsedtamy

ycAAEGFGTPFPYwgqgtlvtvssAQTTAPSVYPLAPGCGDTTSSTVTLGCLVKG
YFPEPVTVTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTSSTWPSQTVTCNVAH

L쇄 (2A-LC.7413): 1문자 표기, 가변 및 불변영역 서열

MESQTQVLMSLLLWVSGSCGdivmtqtpssravsagekvtmsckssQSLLYSENEK
NYlawyqqrpgqspkllyWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyy
cQQYYHFPRTfgggtrlelkRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRD
ISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS

항코리신 단클론성 항체 클론 21A

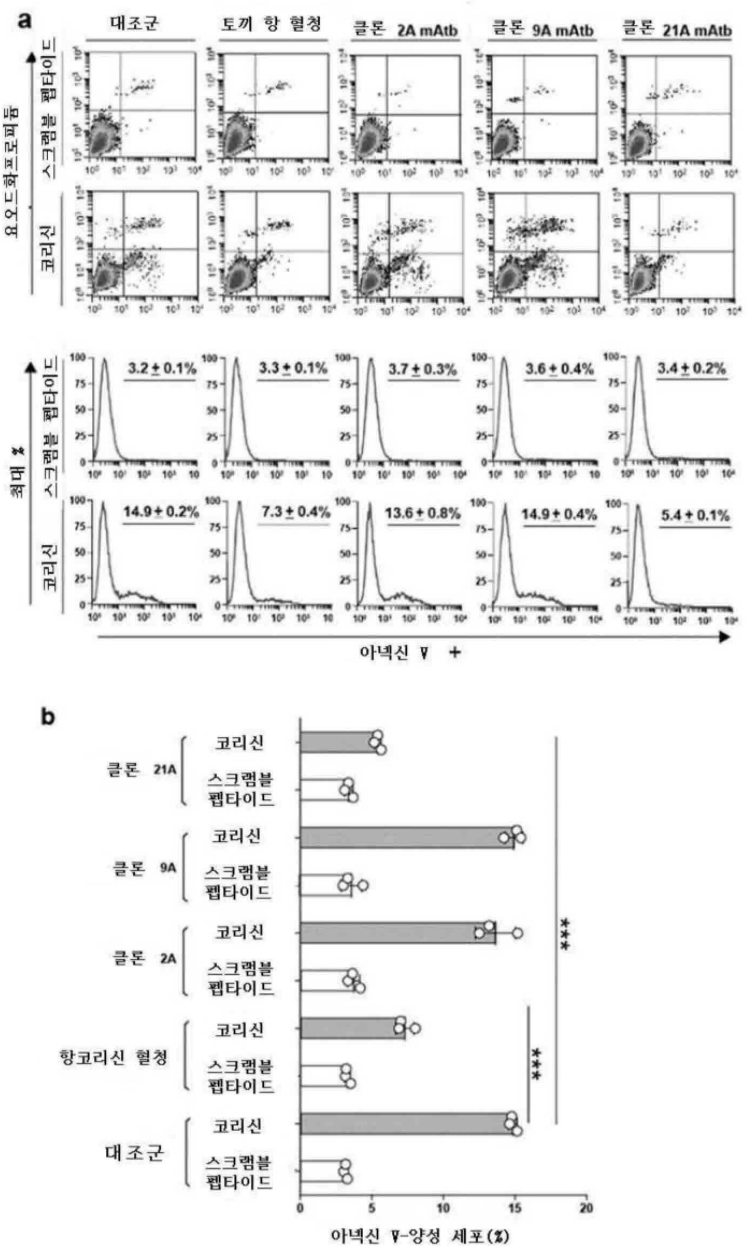
H쇄 (KK1410-2_VH_pep) : 1문자 표기, 가변영역 서열

MDFRLNLVFLVFILKGVWCevklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIY
YDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFGTPFPYwgqgtlvtvss

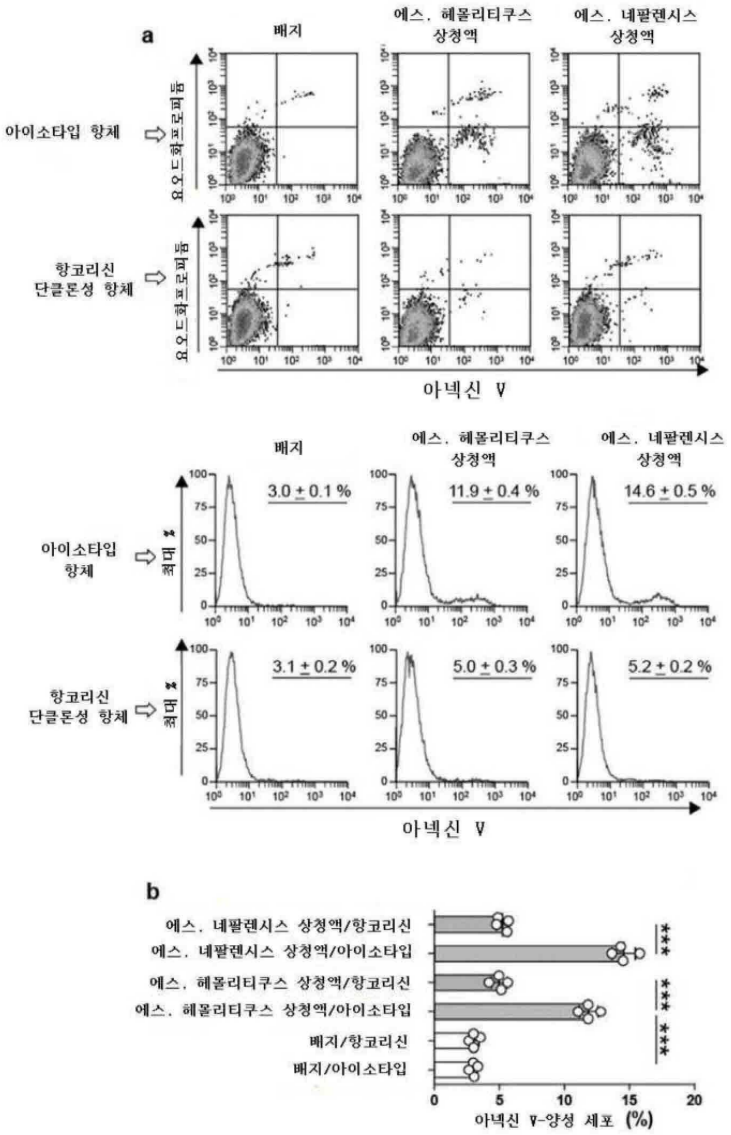
L쇄 (KK1410-2_VL_pep) : 1문자 표기, 가변영역 서열

MESQTQVLMSLLLWVSGTYGdivmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyq
qrpgqspkliyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk

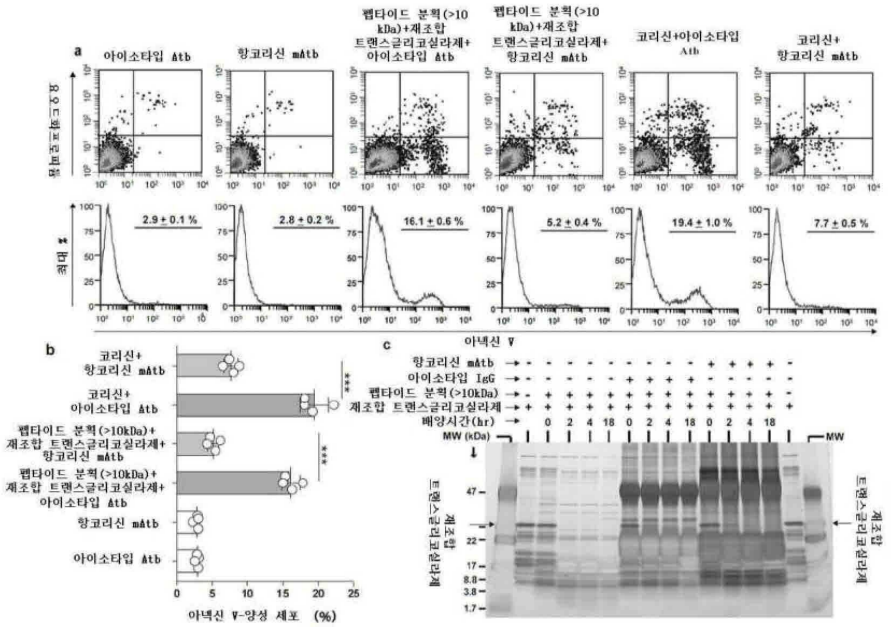
도면14


a
대조군
토끼 항 혈청
클론 2A mAtb
클론 9A mAtb
클론 21A mAtb
요오드화프로피듐
스크램블 펩타이드
코리신
최대 %
3.2 ± 0.1%
3.3 ± 0.1%
3.7 ± 0.3%
3.6 ± 0.4%
3.4 ± 0.2%
14.9 ± 0.2%
7.3 ± 0.4%
13.6 ± 0.8%
14.9 ± 0.4%
5.4 ± 0.1%
아넥신 V +
b
클론 21A
클론 9A
클론 2A
항코리신 혈청
대조군
코리신
스크램블 펩타이드
***
***
0
5
10
15
20
아넥신 V-양성 세포(%)

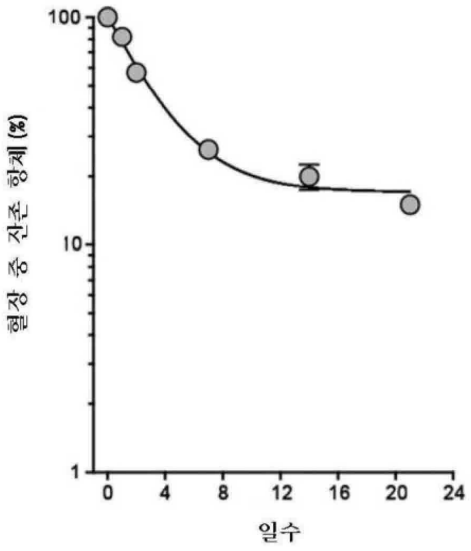
도면15


a
배지
에스. 헤몰리티쿠스 상청액
에스. 네팔렌시스 상청액
아이소타입 항체
항코리신 단클론성 항체
요오드화프로피듐
아넥신 V
3.0 ± 0.1 %
11.9 ± 0.4 %
14.6 ± 0.5 %
3.1 ± 0.2 %
5.0 ± 0.3 %
5.2 ± 0.2 %
최대 %
b
에스. 네팔렌시스 상청액/항코리신
에스. 네팔렌시스 상청액/아이소타입
에스. 헤몰리티쿠스 상청액/항코리신
에스. 헤몰리티쿠스 상청액/아이소타입
배지/항코리신
배지/아이소타입
***
아넥신 V-양성 세포 (%)

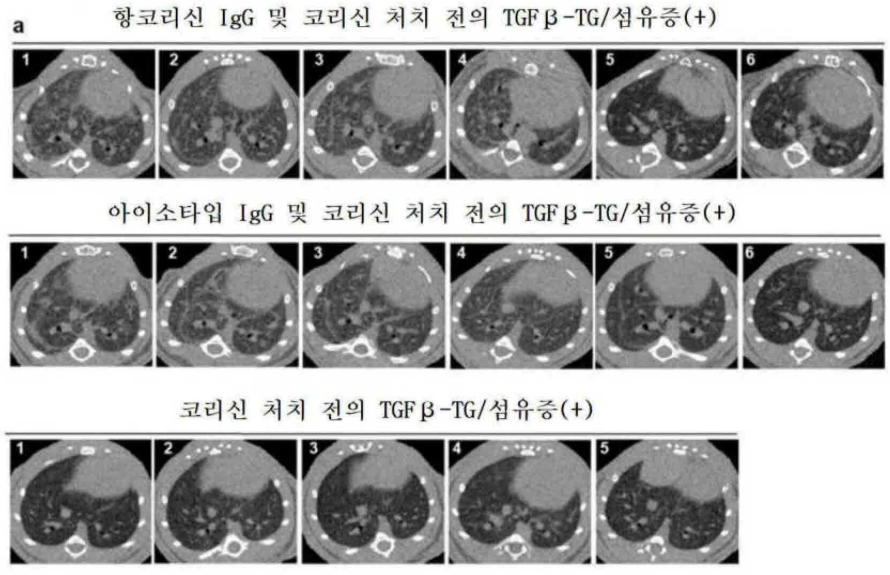
도면16


a
아이소타입 Atb
항코리신 mAtb
펩타이드 분획(>10 kDa)+재조합 트랜스글리코실라제+ 아이소타입 Atb
펩타이드 분획(>10 kDa)+재조합 트랜스글리코실라제+ 항코리신 mAtb
코리신+아이소타입 Atb
코리신+ 항코리신 mAtb
2.9 ± 0.1 %
2.8 ± 0.2 %
16.1 ± 0.6 %
5.2 ± 0.4 %
19.4 ± 1.0 %
7.7 ± 0.5 %
최대 %
아넥신 V
b
코리신+ 항코리신 mAtb
코리신+ 아이소타입 Atb
펩타이드 분획(>10kDa)+ 재조합 트랜스글리코실라제+ 항코리신 mAtb
펩타이드 분획(>10kDa)+ 재조합 트랜스글리코실라제+ 아이소타입 Atb
항코리신 mAtb
아이소타입 Atb
아넥신 V-양성 세포 (%)
c
항코리신 mAtb
아이소타입 IgG
펩타이드 분획(>10kDa)
재조합 트랜스글리코실라제
배양시간(hr)
MW (kDa)
MW
재조합 트랜스글리코실라제
트랜스글리코실라제

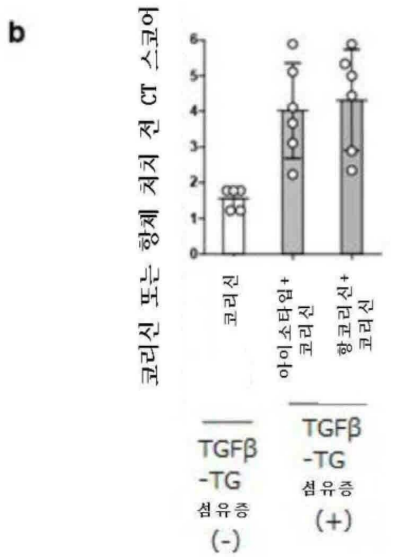
도면17


혈장 중 잔존 항체 (%)
일수

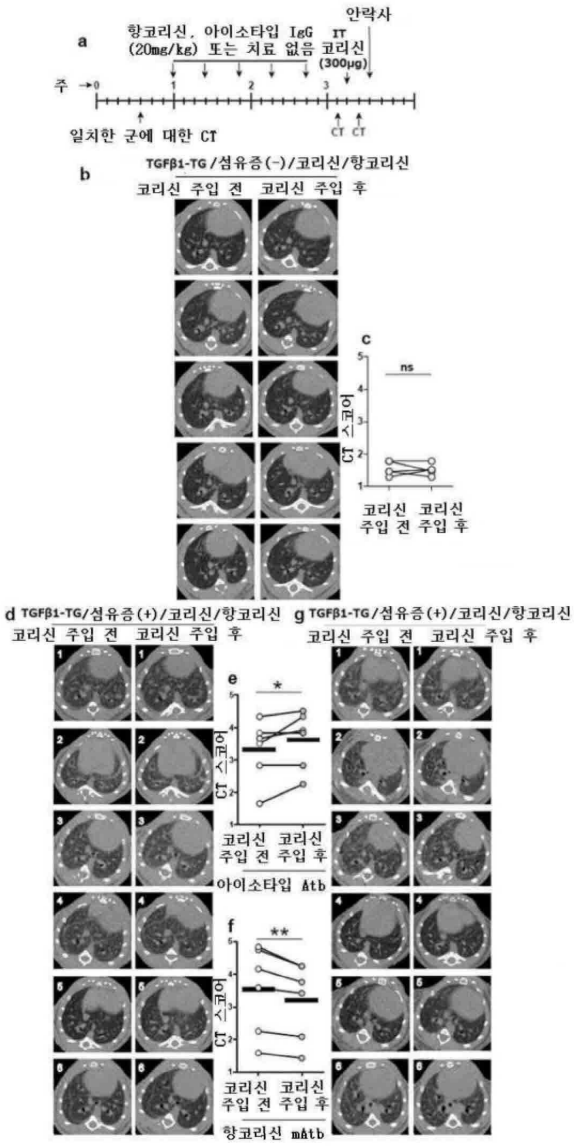
도면18a


a
항코리신 IgG 및 코리신 처치 전의 TGFβ-TG/섬유증(+)
아이소타입 IgG 및 코리신 처치 전의 TGFβ-TG/섬유증(+)
코리신 처치 전의 TGFβ-TG/섬유증(+)

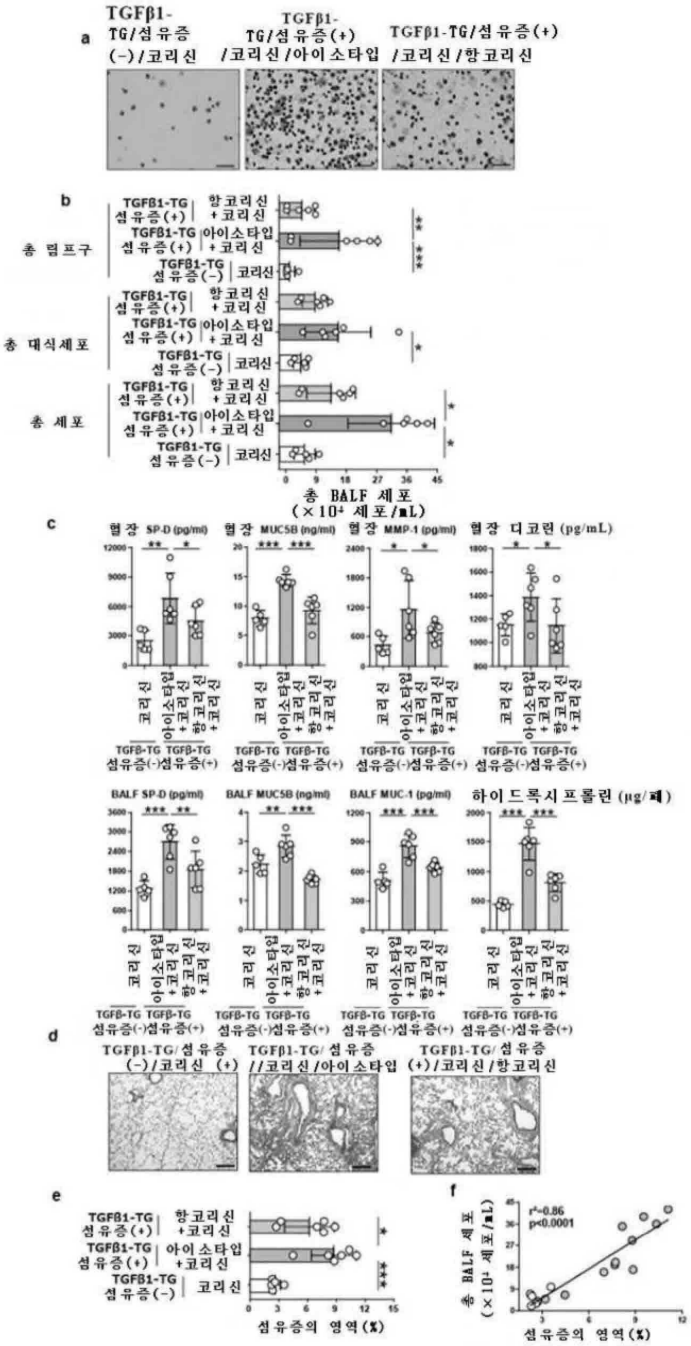
도면18b


b
코리신 또는 항체 처치 전 CT 스코어
코리신
아이소타입+코리신
항코리신+코리신
TGFβ-TG 섬유증 (-)
TGFβ-TG 섬유증 (+)

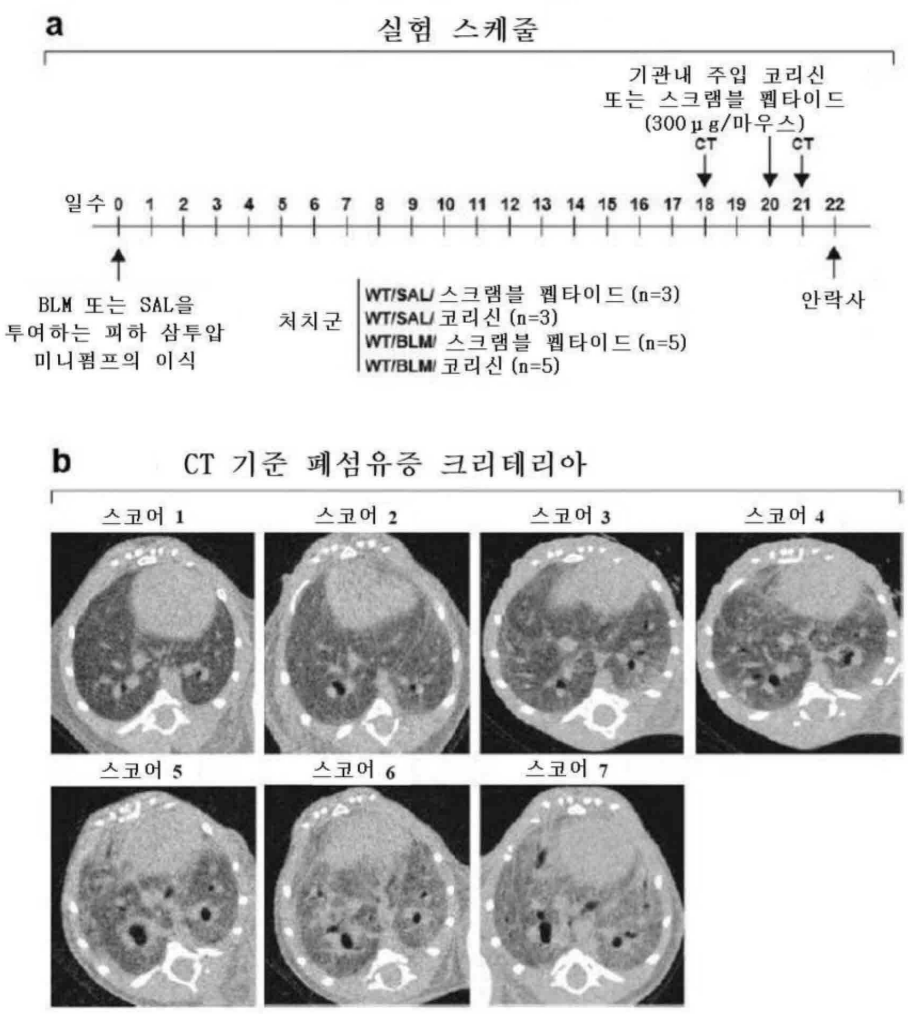
도면19


a
항코리신, 아이소타입 IgG (20mg/kg) 또는 치료 없음
IT 코리신 (300μg)
안락사
주
일치한 군에 대한 CT
CT CT
b
TGFβ1-TG/섬유증(-)/코리신/항코리신
코리신 주입 전
코리신 주입 후
c
ns
CT 스코어
코리신 주입 전
코리신 주입 후
d TGFβ1-TG/섬유증(+)/코리신/항코리신
코리신 주입 전
코리신 주입 후
e
*
CT 스코어
코리신 주입 전
코리신 주입 후
아이소타입 Atb
f
**
CT 스코어
코리신 주입 전
코리신 주입 후
항코리신 mAtb
g TGFβ1-TG/섬유증(+)/코리신/항코리신
코리신 주입 전
코리신 주입 후

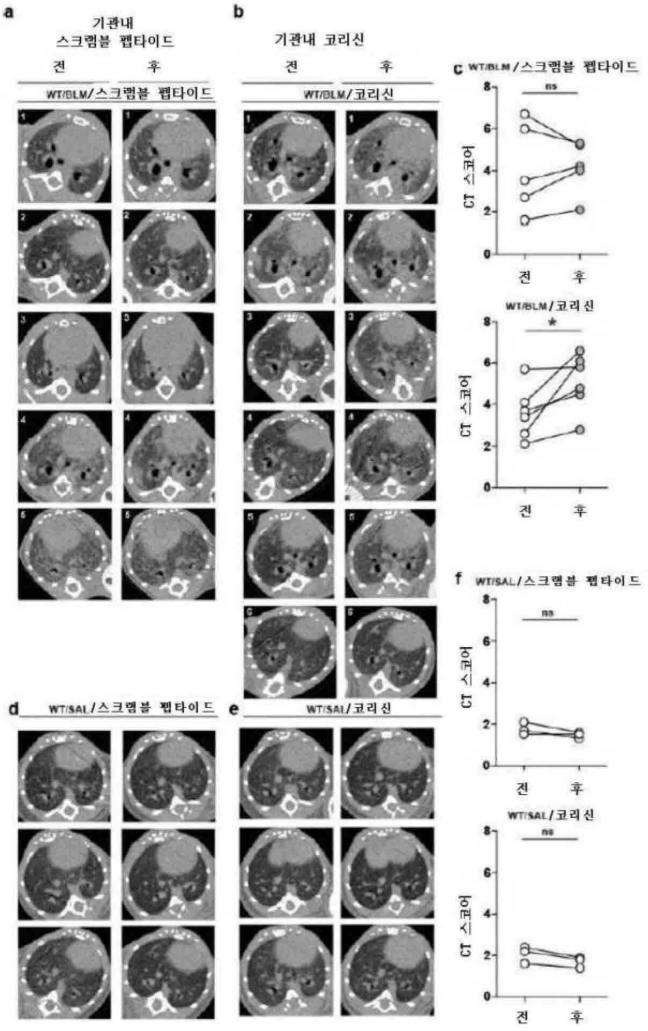
도면20


a
TGFβ1-TG/섬유증(-)/코리신
TGFβ1-TG/섬유증(+)/코리신/아이소타입
TGFβ1-TG/섬유증(+)/코리신/항코리신
b
총 림프구
총 대식세포
총 세포
TGFβ1-TG 섬유증(+) 항코리신+코리신
TGFβ1-TG 섬유증(+) 아이소타입+코리신
TGFβ1-TG 섬유증(-) 코리신
총 BALF 세포 (×10⁴ 세포/mL)
c
혈장 SP-D (pg/ml)
혈장 MUC5B (ng/ml)
혈장 MMP-1 (pg/mL)
혈장 디코린 (pg/mL)
BALF SP-D (pg/ml)
BALF MUC5B (ng/ml)
BALF MUC-1 (pg/ml)
하이드록시프롤린 (μg/폐)
코리신
아이소타입+코리신
항코리신+코리신
TGFβ-TG 섬유증(-)
TGFβ-TG 섬유증(+)
d
TGFβ1-TG/섬유증(-)/코리신 (+)
TGFβ1-TG/섬유증//코리신/아이소타입
TGFβ1-TG/섬유증(+)/코리신/항코리신
e
섬유증의 영역(%)
f
총 BALF 세포 (×10⁴ 세포/mL)
섬유증의 영역(%)
r²=0.86
p<0.0001

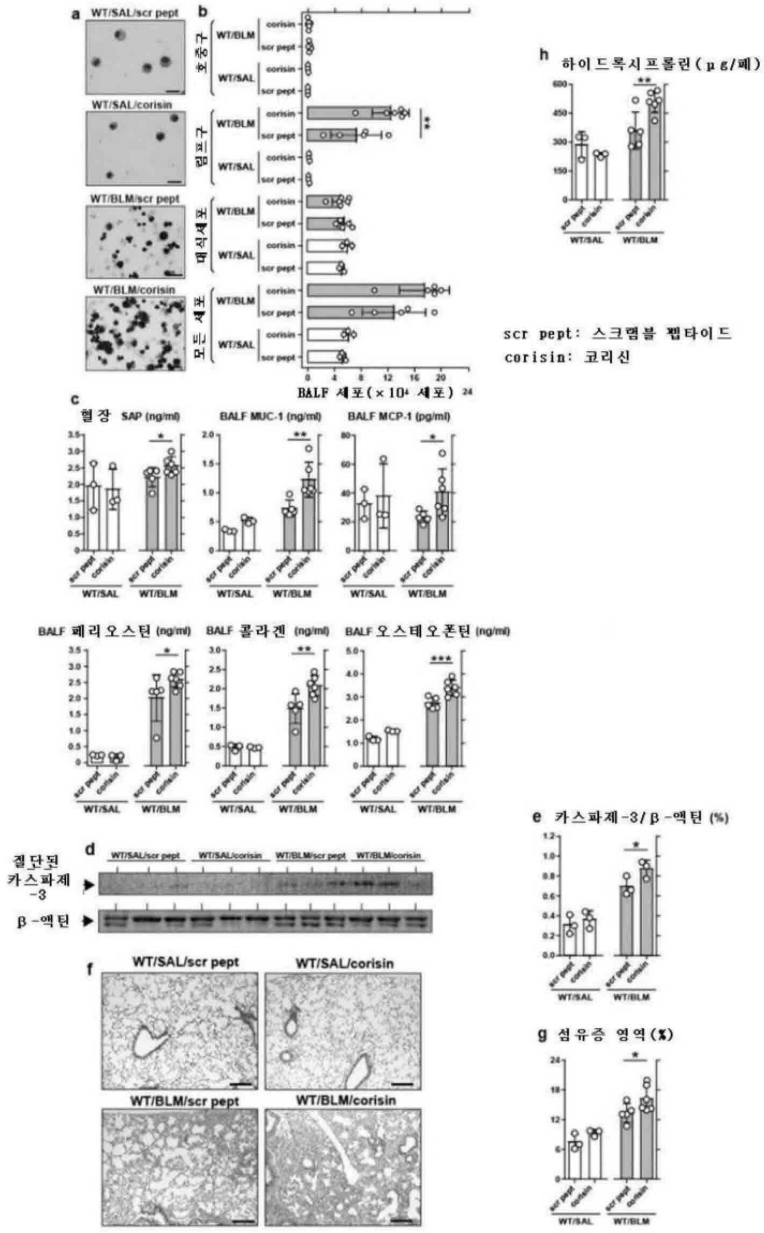
도면21


a
실험 스케줄
기관내 주입 코리신
또는 스크램블 펩타이드
(300μg/마우스)
CT
CT
일수 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
BLM 또는 SAL을
투여하는 피하 삼투압
미니펌프의 이식
처치군
WT/SAL/ 스크램블 펩타이드 (n=3)
WT/SAL/ 코리신 (n=3)
WT/BLM/ 스크램블 펩타이드 (n=5)
WT/BLM/ 코리신 (n=5)
안락사
b
CT 기준 폐섬유증 크리테리아
스코어 1
스코어 2
스코어 3
스코어 4
스코어 5
스코어 6
스코어 7

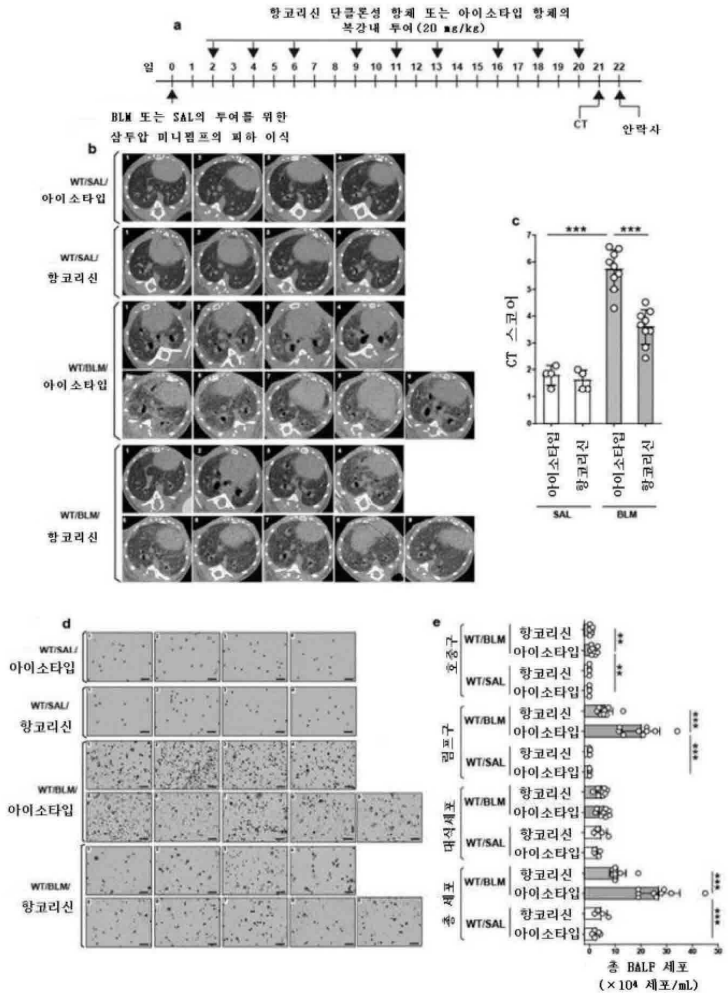
도면22


a
기관내
스크렘블 펩타이드
전
후
WT/BLM/스크렘블 펩타이드
b
기관내 코리신
전
후
WT/BLM/코리신
c
WT/BLM/스크렘블 펩타이드
ns
CT 스코어
전
후
WT/BLM/코리신
*
CT 스코어
전
후
d
WT/SAL/스크렘블 펩타이드
e
WT/SAL/코리신
f
WT/SAL/스크렘블 펩타이드
ns
CT 스코어
전
후
WT/SAL/코리신
ns
CT 스코어
전
후

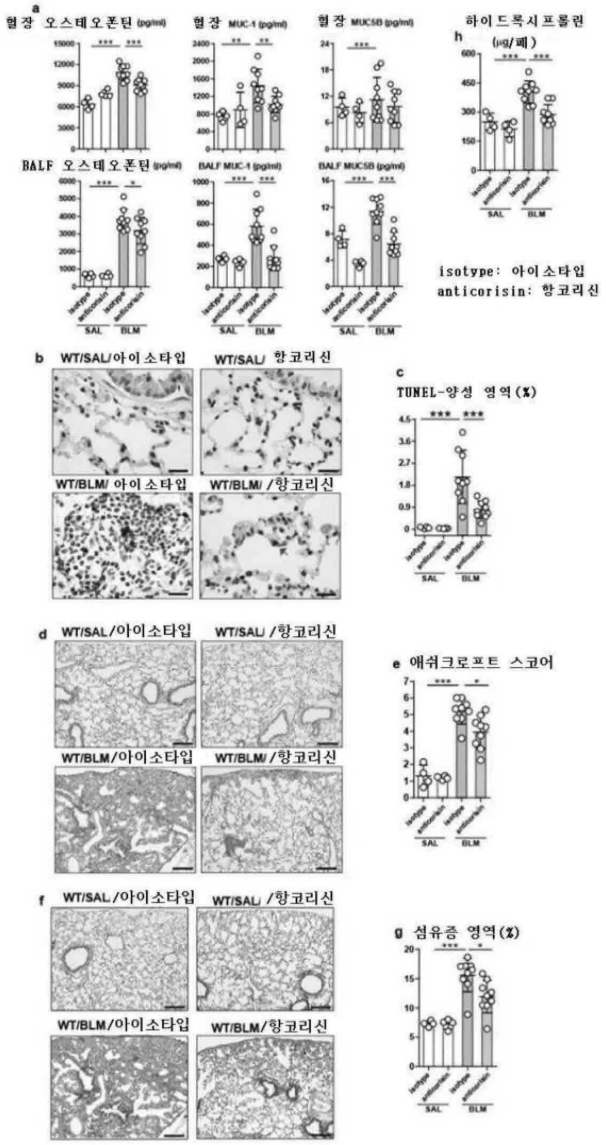
도면23


a
WT/SAL/scr pept
WT/SAL/corisin
WT/BLM/scr pept
WT/BLM/corisin
b
호중구
림프구
대식세포
모든 세포
WT/BLM
WT/SAL
corisin
scr pept
BALF 세포(×10⁴ 세포)
c
혈장 SAP (ng/ml)
BALF MUC-1 (ng/ml)
BALF MCP-1 (pg/ml)
BALF 페리오스틴 (ng/ml)
BALF 콜라겐 (ng/ml)
BALF 오스테오폰틴 (ng/ml)
d
절단된 카스파제-3
β-액틴
f
WT/SAL/scr pept
WT/SAL/corisin
WT/BLM/scr pept
WT/BLM/corisin
h
하이드록시프롤린(μg/폐)
scr pept: 스크램블 펩타이드
corisin: 코리신
e
카스파제-3/β-액틴 (%)
g
섬유증 영역(%)

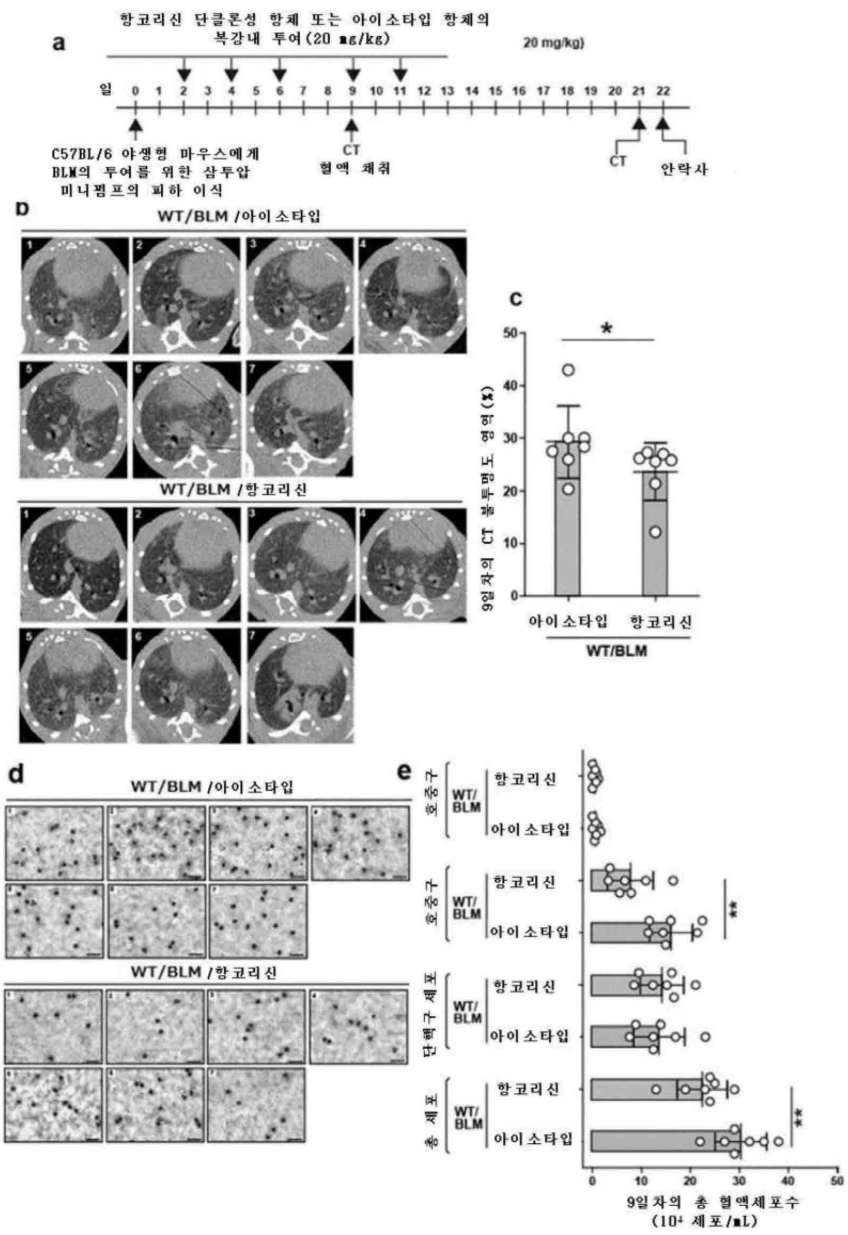
도면24


a
항코리신 단클론성 항체 또는 아이소타입 항체의
복강내 투여(20 mg/kg)
일 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
BLM 또는 SAL의 투여를 위한
삼투압 미니펌프의 피하 이식
CT
안락사
b
WT/SAL/
아이소타입
WT/SAL/
항코리신
WT/BLM/
아이소타입
WT/BLM/
항코리신
c
CT 스코어
아이소타입
항코리신
아이소타입
항코리신
SAL
BLM
d
WT/SAL/
아이소타입
WT/SAL/
항코리신
WT/BLM/
아이소타입
WT/BLM/
항코리신
e
호중구
림프구
대식세포
총 세포
WT/BLM
WT/SAL
항코리신
아이소타입
총 BALF 세포
(×10⁴ 세포/mL)

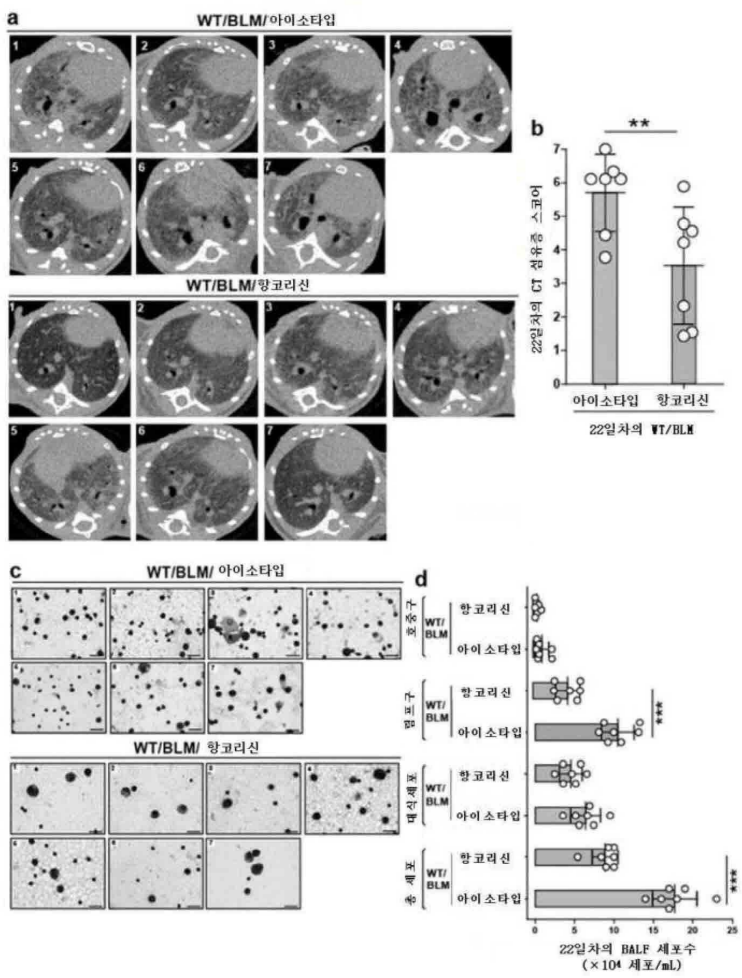
도면25


a
혈장 오스테오폰틴 (pg/ml)
혈장 MUC-1 (pg/ml)
혈장 MUC5B (pg/ml)
하이드록시프롤린 (μg/폐)
BALF 오스테오폰틴 (pg/ml)
BALF MUC-1 (pg/ml)
BALF MUC5B (pg/ml)
isotype: 아이소타입
anticorisin: 항코리신
SAL
BLM
b
WT/SAL/아이소타입
WT/SAL/ 항코리신
WT/BLM/ 아이소타입
WT/BLM/ /항코리신
c
TUNEL-양성 영역(%)
d
WT/SAL/아이소타입
WT/SAL/ /항코리신
WT/BLM/아이소타입
WT/BLM/ /항코리신
e 애쉬크로프트 스코어
f
WT/SAL/아이소타입
WT/SAL/ /항코리신
WT/BLM/아이소타입
WT/BLM/항코리신
g 섬유증 영역(%)

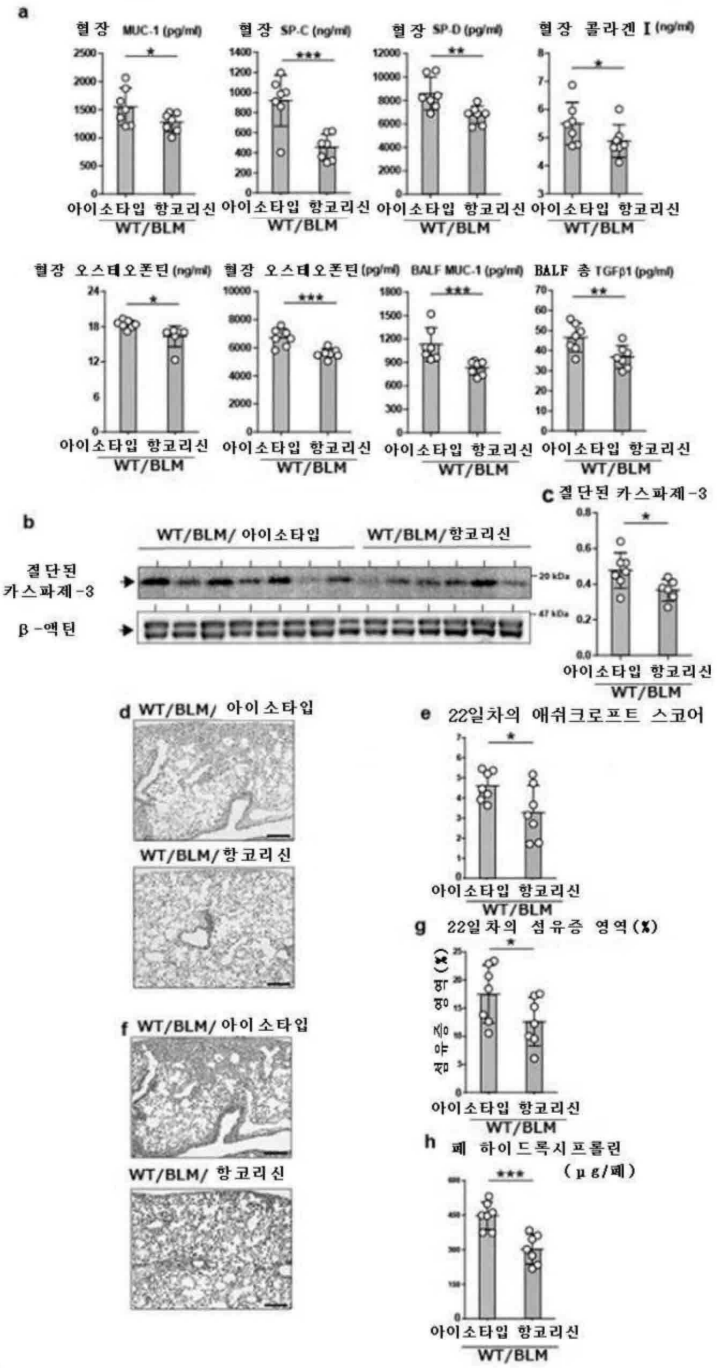
도면26


a
항코리신 단클론성 항체 또는 아이소타입 항체의
복강내 투여(20 ㎍/kg)
20 mg/kg)
일 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
C57BL/6 야생형 마우스에게
BLM의 투여를 위한 삼투압
미니펌프의 피하 이식
CT
혈액 채취
CT
안락사
D
WT/BLM /아이소타입
WT/BLM /항코리신
c
9일차의 CT 불투명도 영역(㎤)
아이소타입
항코리신
WT/BLM
d
WT/BLM /아이소타입
WT/BLM /항코리신
e
호중구
단핵구 세포
총 세포
WT/BLM
항코리신
아이소타입
9일차의 총 혈액세포수
(10⁴ 세포/㎖)

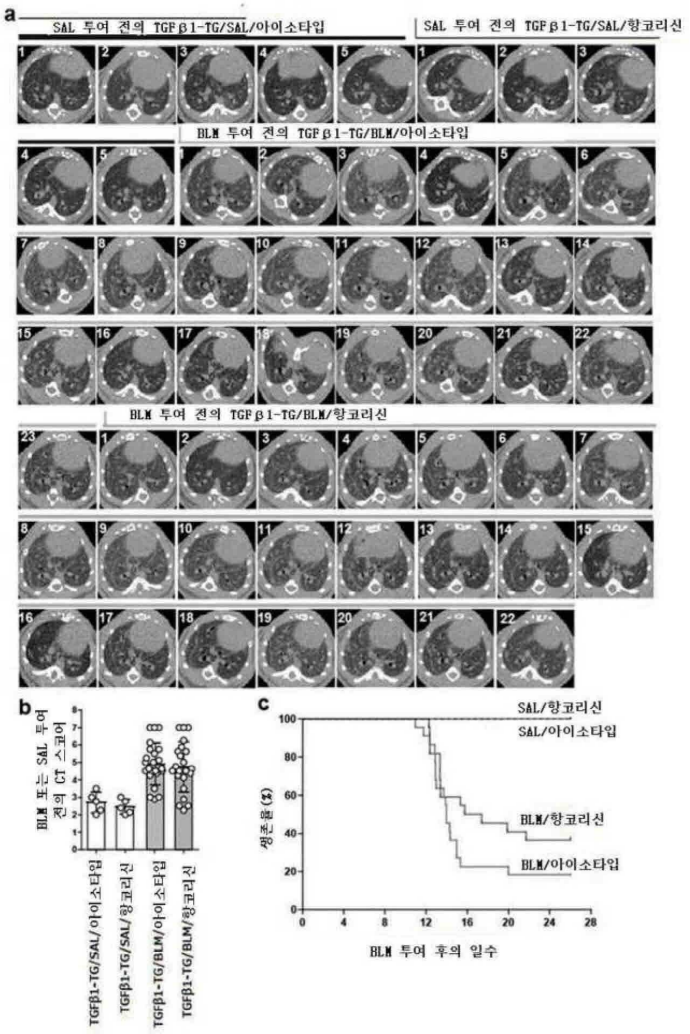
도면27


a
WT/BLM/아이소타입
WT/BLM/항코리신
b
**
22일차의 CT 섬유증 스코어
아이소타입
항코리신
22일차의 WT/BLM
c
WT/BLM/ 아이소타입
WT/BLM/ 항코리신
d
호중구
림프구
대식세포
총 세포
WT/BLM
항코리신
아이소타입
***
22일차의 BALF 세포수
(×10⁴ 세포/mL)

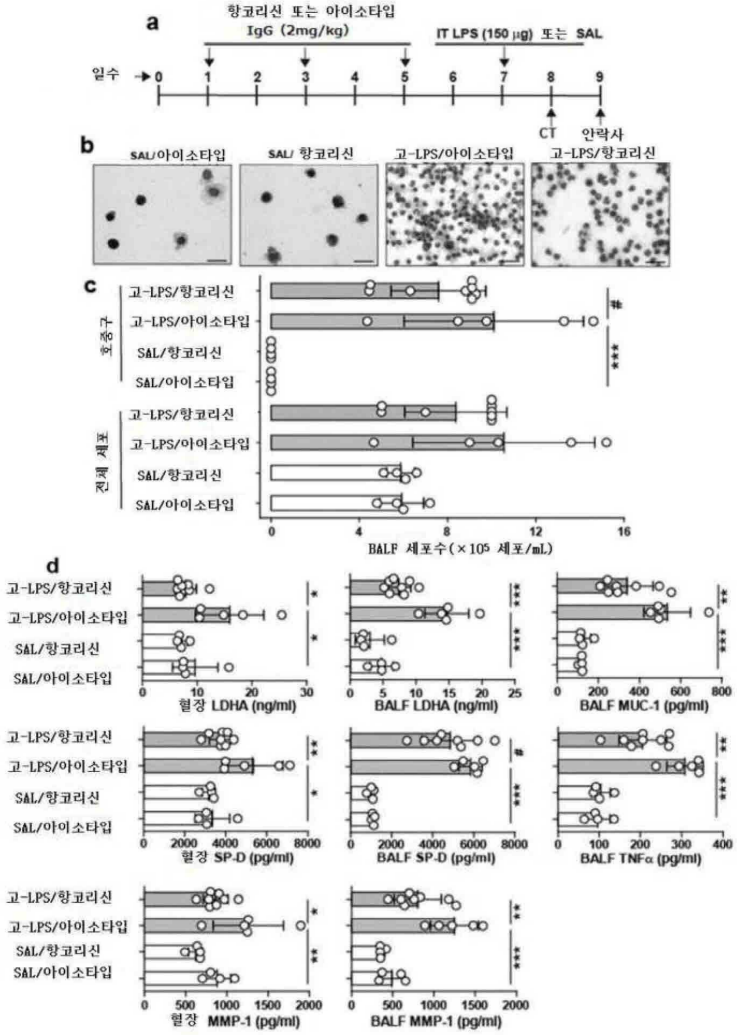
도면28


a
혈장 MUC-1 (pg/ml)
혈장 SP-C (ng/ml)
혈장 SP-D (pg/ml)
혈장 콜라겐 I (ng/ml)
혈장 오스테오폰틴 (ng/ml)
혈장 오스테오폰틴 (pg/ml)
BALF MUC-1 (pg/ml)
BALF 총 TGFβ1 (pg/ml)
아이소타입 항코리신
WT/BLM
b
WT/BLM/ 아이소타입
WT/BLM/항코리신
절단된 카스파제-3
β-액틴
20 kDa
47 kDa
c 절단된 카스파제-3
d WT/BLM/ 아이소타입
WT/BLM/항코리신
e 22일차의 애쉬크로프트 스코어
f WT/BLM/ 아이소타입
WT/BLM/ 항코리신
g 22일차의 섬유증 영역(%)
h 폐 하이드록시프롤린 (μg/폐)

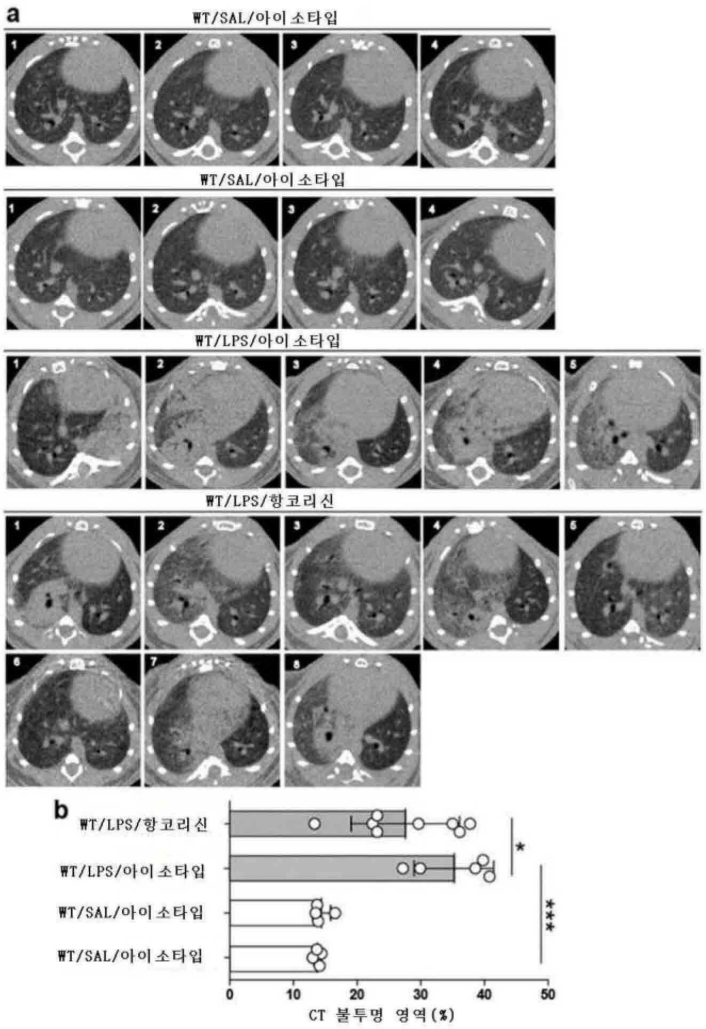
도면29


a
SAL 투여 전의 TGFβ1-TG/SAL/아이소타입
SAL 투여 전의 TGFβ1-TG/SAL/항코리신
BLM 투여 전의 TGFβ1-TG/BLM/아이소타입
BLM 투여 전의 TGFβ1-TG/BLM/항코리신
b
BLM 또는 SAL 투여 전의 CT 스코어
TGFβ1-TG/SAL/아이소타입
TGFβ1-TG/SAL/항코리신
TGFβ1-TG/BLM/아이소타입
TGFβ1-TG/BLM/항코리신
c
SAL/항코리신
SAL/아이소타입
BLM/항코리신
BLM/아이소타입
생존율 (%)
BLM 투여 후의 일수

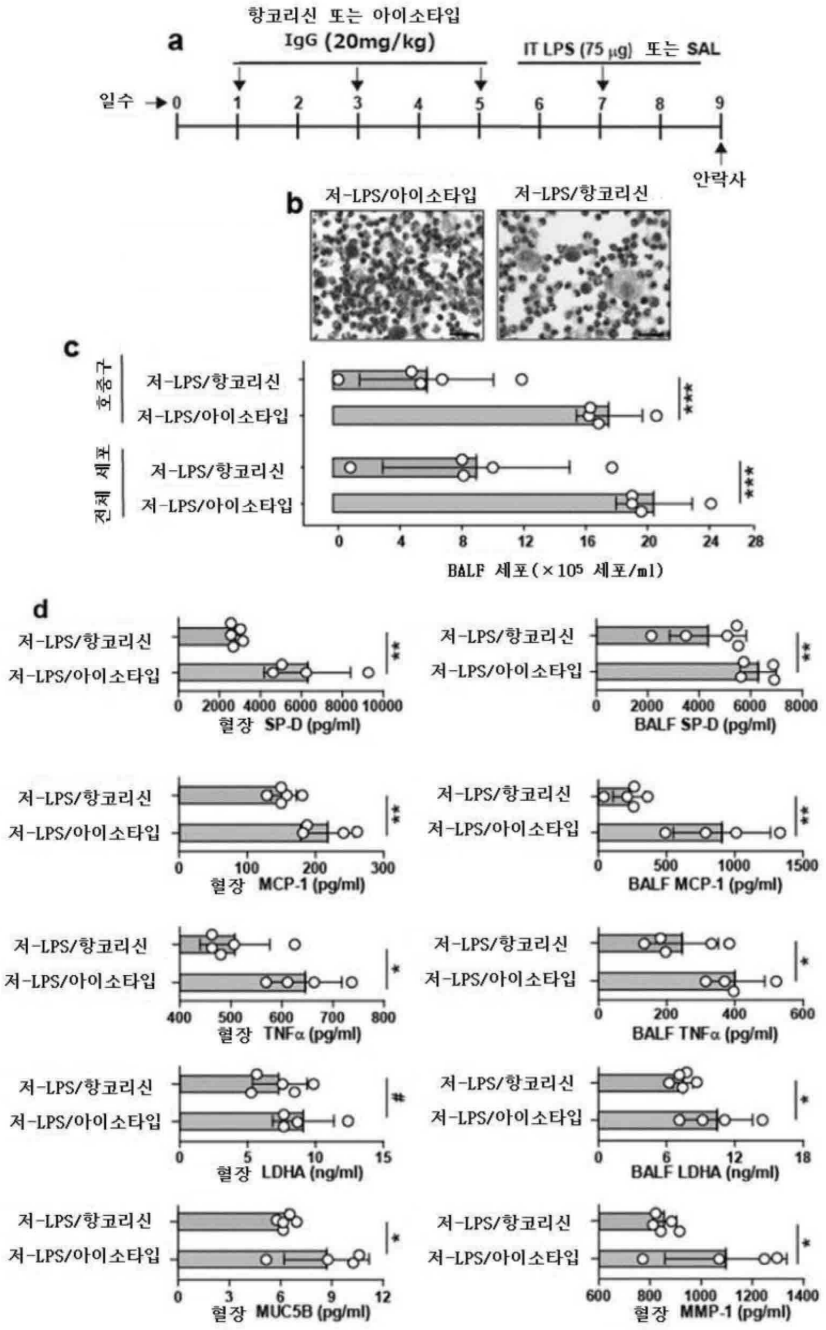
도면30


a
항코리신 또는 아이소타입
IgG (2mg/kg)
IT LPS (150 μg) 또는 SAL
일수
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
CT
안락사
b
SAL/아이소타입
SAL/ 항코리신
고-LPS/아이소타입
고-LPS/항코리신
c
호중구
전체 세포
고-LPS/항코리신
고-LPS/아이소타입
SAL/항코리신
SAL/아이소타입
BALF 세포수(×10⁵ 세포/mL)
d
혈장 LDHA (ng/ml)
BALF LDHA (ng/ml)
BALF MUC-1 (pg/ml)
혈장 SP-D (pg/ml)
BALF SP-D (pg/ml)
BALF TNFα (pg/ml)
혈장 MMP-1 (pg/ml)
BALF MMP-1 (pg/ml)

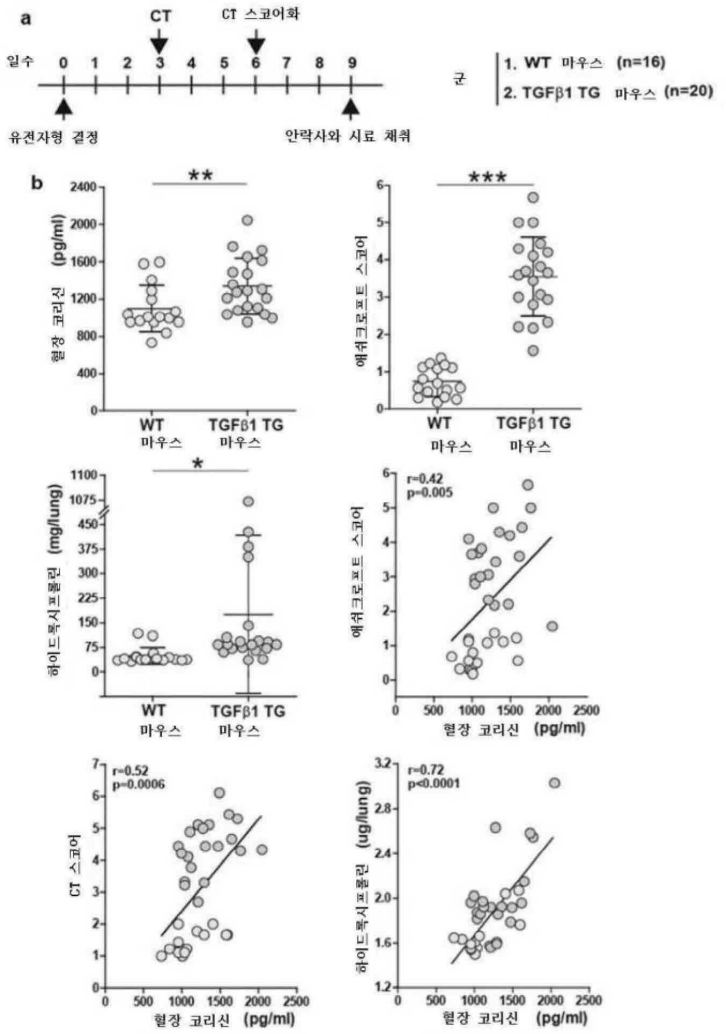
도면31


a
WT/SAL/아이 소타입
WT/SAL/아이 소타입
WT/LPS/아이 소타입
WT/LPS/항코리신
b
WT/LPS/항코리신
WT/LPS/아이 소타입
WT/SAL/아이 소타입
WT/SAL/아이 소타입
*
***
0
10
20
30
40
50
CT 불투명 영역(%)

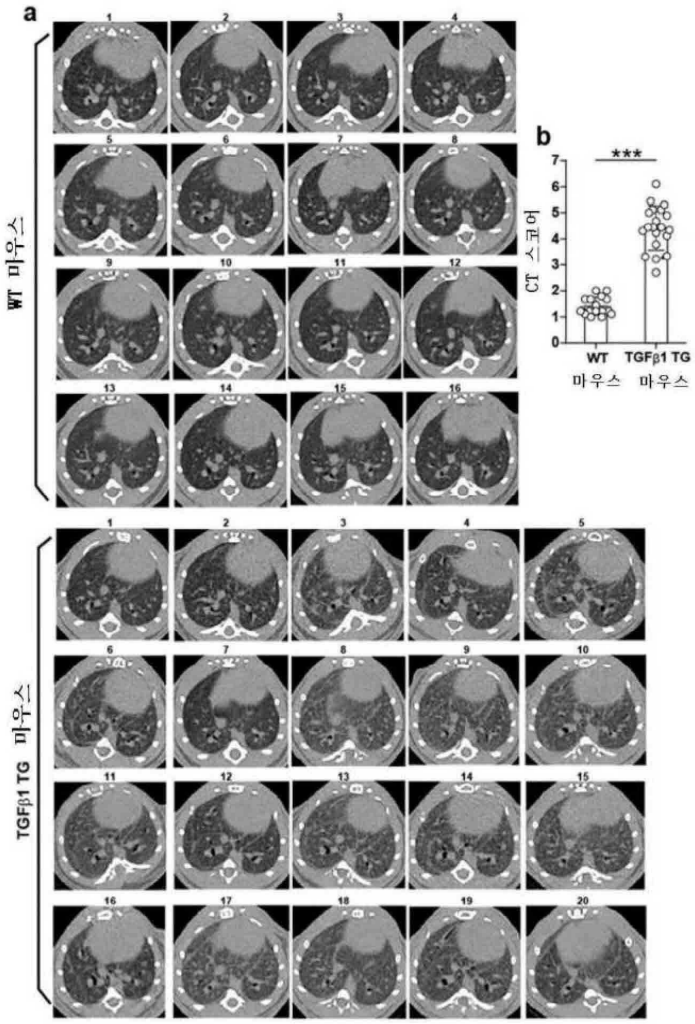
도면32


a
항코리신 또는 아이소타입
IgG (20mg/kg)
IT LPS (75 μg) 또는 SAL
일수
안락사
b
저-LPS/아이소타입
저-LPS/항코리신
c
호중구
전체 세포
저-LPS/항코리신
저-LPS/아이소타입
BALF 세포(×10⁵ 세포/ml)
d
혈장 SP-D (pg/ml)
BALF SP-D (pg/ml)
혈장 MCP-1 (pg/ml)
BALF MCP-1 (pg/ml)
혈장 TNFα (pg/ml)
BALF TNFα (pg/ml)
혈장 LDHA (ng/ml)
BALF LDHA (ng/ml)
혈장 MUC5B (pg/ml)
혈장 MMP-1 (pg/ml)

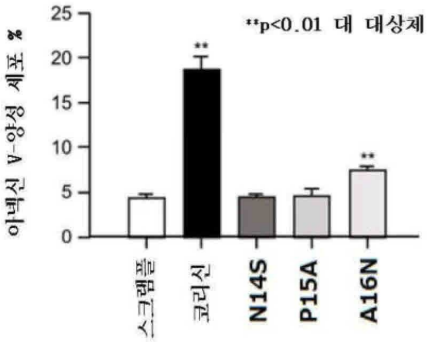
도면33


a
CT
CT 스코어화
일수 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
유전자형 결정
안락사와 시료 채취
군
1. WT 마우스 (n=16)
2. TGFβ1 TG 마우스 (n=20)
b
혈장 코리신 (pg/ml)
**
WT 마우스
TGFβ1 TG 마우스
에쉬크로프트 스코어
***
하이드록시프롤린 (mg/lung)
*
r=0.42
p=0.005
혈장 코리신 (pg/ml)
CT 스코어
r=0.52
p=0.0006
하이드록시프롤린 (ug/lung)
r=0.72
p<0.0001

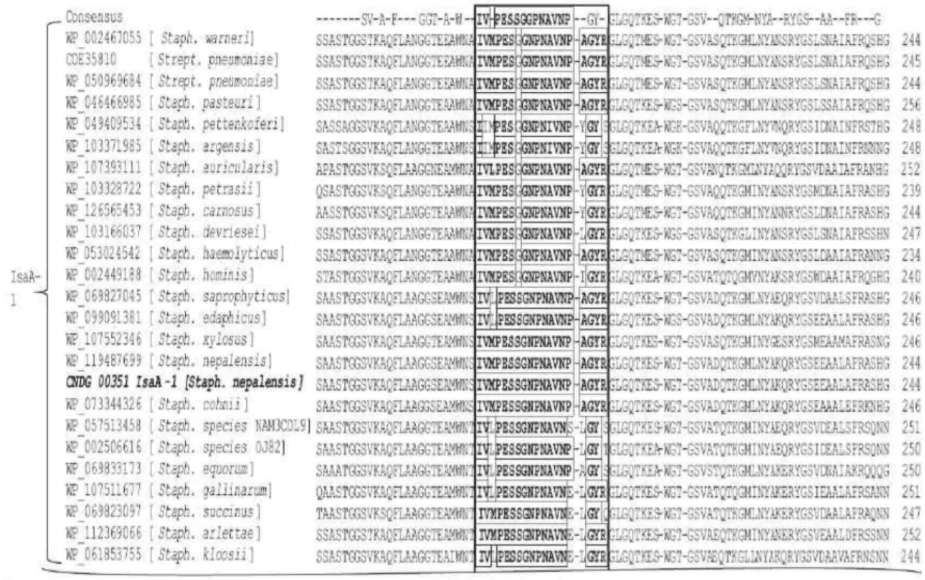
도면34


a
WT 마우스
TGFβ1 TG 마우스
b
***
CT 스코어
WT
마우스
TGFβ1 TG
마우스

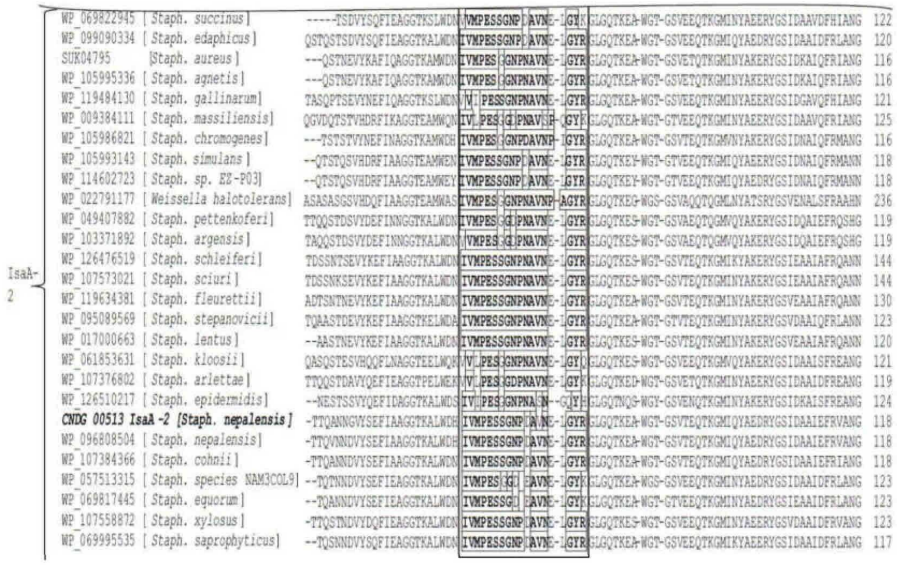
도면35


**p<0.01 대 대상체
아넥신 V-양성 세포 %
스크램블
코리신
N14S
P15A
A16N

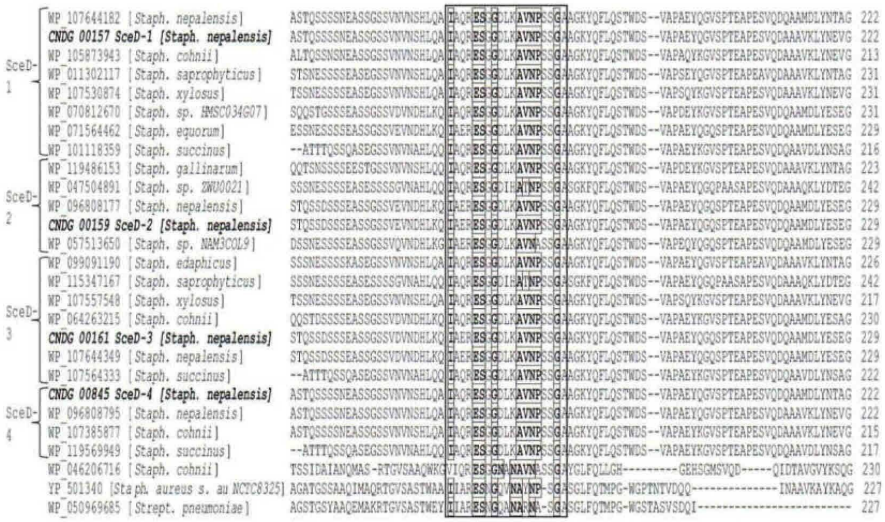
도면36



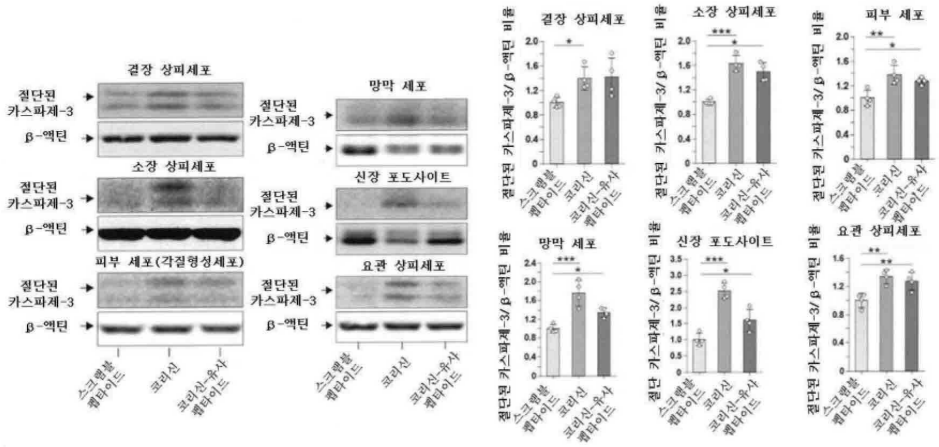
도면37



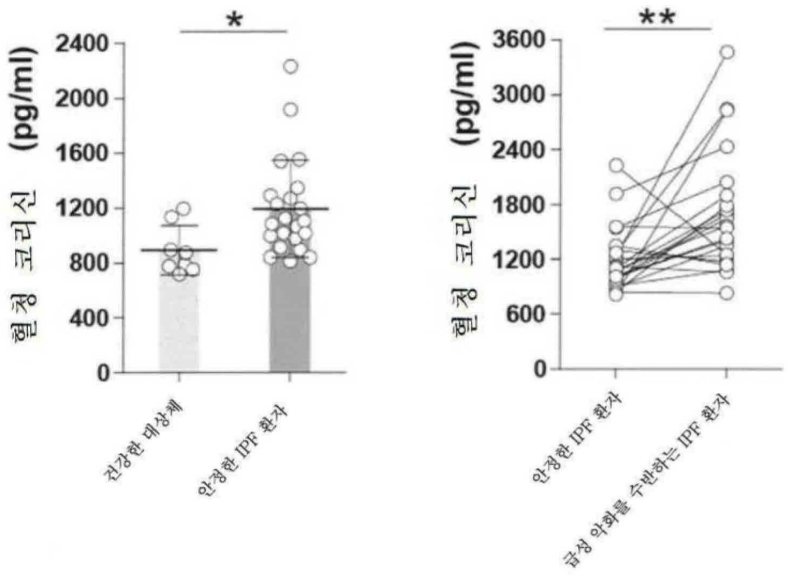
도면38



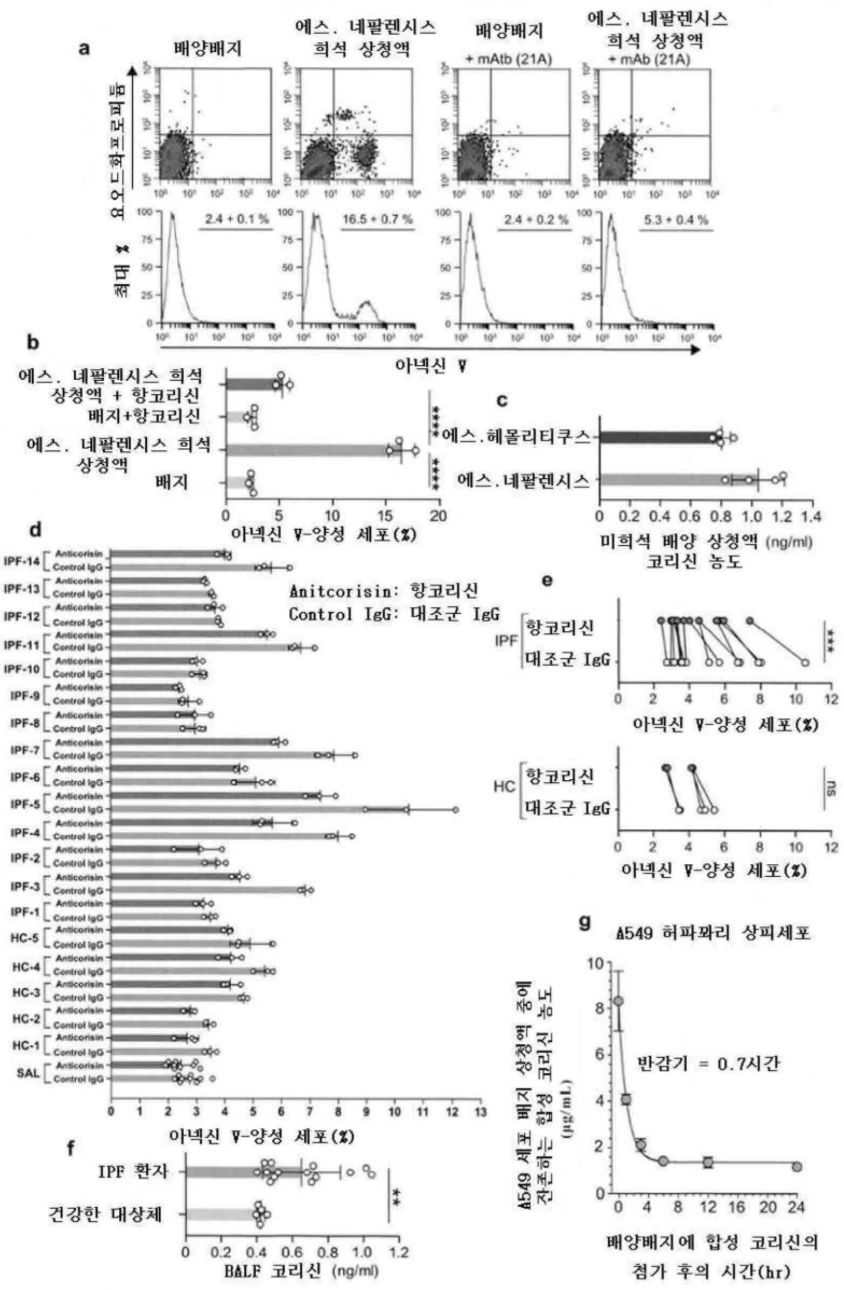
도면39



도면40



도면41



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MIE UNIVERSITY

The Board of Trustees of The University Of Illinois

<120> Pharmaceutical composition for improving acute lung injury and acute exacerbation of pulmonary fibrosis

<130> 676827

<160> 97

<150> JP 2021-046301

<151> 2021-03-19

<150> JP 2021-173381

<151> 2021-10-22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus nepalensis

<400> 1

Ile Val Met Pro Glu Ser Ser Gly Asn Pro Asn Ala Val Asn Pro Ala

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

tacgaagaac tacggctgga c 21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

ggtgtgatcg tctaatgggt ca 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Primer

<400> 4

gttcagtggt tcttactcca gc 22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

actgtagggg ttagtcctcg at 22

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

tttccgtggc tcttattcaa act 23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 7

gcacagtggt aggaacttct cat 23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8

tatcagacac catatacccg agg 23

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 9

tggggttagg tgagcatagt c 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

aggaccaccg catctctaca t 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

aagtctggct cgttctcagt g 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 12

tgcacagttt ccttgtacgg a 21

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Primer

<400> 13

gagcttgggt ctcctgatag aa 22

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 14

gctctgagga gttgcgtctg 20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

cacactgtgg acaaagtctc tt 22

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 16

gcgctcagaa agacactaca g 21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 17

cctcttgcag acgccttagc 20

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 18

ggagcgagat ccctccaaaa t 21

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Primer

<400> 19

ggctgttgtc atacttctca tgg 23

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 20

gccttctttg agttcggtgg 20

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

atctcccggt tgacgctct 19

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

cccgagaggt ctttttccga g 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 23

ccagcccatg atggttctga t 21

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 24

gactgaatcg gagatggaga cc 22

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 25

gcagttcaaa ctcgtcgcct 20

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 26

gtcaccatac atggaatggc a 21

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 27

ctgatccaac cgtgtgcaaa 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 28

caatgacccc gcacgatttc 20

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 29

catggagggc ggattggaa 19

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 30

acactaaggg ccgaagataa cg 22

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 31

acagcatctc caatatggct ga 22

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 32

agaagaagtg gtgcttcgga a 21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 33

agtttgcgtg gcctgtacta a 21

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 34

catggaagcg aatcaatgga ct 22

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 35

ctgtaccaga ccgagatgtc a 21

<210> 36

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

Ile Tyr Leu Arg Met Asn Asn Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Ser Thr Asp Ala Phe Tyr Phe Ser His Ser Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala Trp

1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Ile Lys Ala Lys Ser Asn Ser Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Ala Ser Thr Asp Ala Phe Tyr Phe Ser His Ser Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Glu Asn Lys Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Glu Asn Lys Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Trp Ala Ser Thr

1

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Gln Gln Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 44

<211

> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Glu Asp Lys Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Tyr Asn Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105 110

Lys

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213

> Mus musculus

<400> 45

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

1 5 10

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Trp Ala Ser

1

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Gln Gln Tyr Tyr Asn Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Ser Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ala Glu Gly Phe Gly Thr Pro Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met

1 5

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Ala Ala Glu Gly Phe Gly Thr Pro Phe Pro Tyr

1 5 10

<210> 51

<211> 227

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Glu Asn Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Arg Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe

130 135 140

Pro Pro Ser Met Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Thr Val Val Cys

145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile

165 170 175

Asp Gly Ser Glu Gln Arg Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln

180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr

195 200 205

Lys Val Glu Tyr Glu Arg His Asn Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His

210 215 220

Lys Thr Ser

225

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Glu Asn Glu Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 53

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Trp Ala Ser

1

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Gln Gln Tyr Tyr His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 55

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 55

Ile Val Met Pro Glu Ser Ser Gly Asn Pro Asn Ala Val Ser Pro Ala

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 56

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 56

Ile Val Met Pro Glu Ser Ser Gly Asn Pro Asn Ala Val Asn Ala Ala

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 57

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 57

Ile Val Met Pro Glu Ser Ser Gly Asn Pro Asn Ala Val Asn Pro Asn

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 58

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 58

Ile Val Met Pro Glu Ser Gly Gly Asn Pro Asn Ala Val Asn Pro Ala

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 59

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 59

Ile Ile Met Pro Glu Ser Gly Gly Asn Pro Asn Ile Val Asn Pro Tyr

1 5 10 15

Gly Tyr Ser

<210> 60

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 60

Ile Val Met Pro Glu Ser Gly Gly Asn Pro Asn Ala Val Asn Pro Tyr

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 61

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 61

Ile Val Leu Pro Glu Ser Ser Gly Asn Pro Asn Ala Val Asn Pro Ala

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 62

<211

> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 62

Ile Val Leu Pro Glu Ser Ser Gly Asn Pro Asn Ala Val Asn Glu Leu

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 63

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 63

Ile Val Met Pro Glu Ser Gly Gly Asn Pro Asn Ala Val Asn Glu Leu

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 64

Ile Val Met Pro Glu Ser Ser Gly Asn Pro Asn Ala Val Asn Glu Leu

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 65

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 65

Ile Val Met Pro Glu Ser Ser Gly Asn Pro Asp Ala Val Asn Glu Leu

1 5 10 15

Gly Tyr Arg

<210> 66

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 66

Ile Ala Gln Arg Glu Ser Gly Gly Asp Leu Lys Ala Val Asn Pro Ser

1 5 10 15

Ser Gly Ala

<210> 67

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus

<400> 67

Ile Ala Glu Arg Glu Ser Gly Gly Asp Leu Lys Ala Val Asn Pro Ser

1 5 10 15

Ser Gly Ala

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 68

Pro Glu Ser Ser Gly Asn Pro

1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 69

Asn Pro Ala Gly Tyr

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr Gly

1 5

<210> 71

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Ser Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ala Glu Gly Phe Gly Thr Pro Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Asn Tyr Gly Met His

1 5

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

Glu Gly Phe Gly Thr Pro Phe Pro Tyr

1 5

<210> 75

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg

20 25 30

Glu Asp Thr Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Leu

100 105 110

Lys

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Glu Asp Thr Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Gln Gln Tyr Tyr His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 79

<211> 226

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

Met Glu Leu Cys Met Met Trp Ile Phe Leu Val Ala Phe Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Asn Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Thr Ala Trp Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Lys Ala Lys Ser Asn Ser Tyr Ala Thr Asp
65 70 75 80

Tyr Thr Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Lys Gly Ser Ile Tyr Leu Arg Met Asn Asn Leu Lys Glu Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ser Thr Asp Ala Phe Tyr Phe Ser His Ser
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Thr Thr
130 135 140

Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn
145 150 155 160

Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Thr Ser Ser Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Ser Ser Gln Ala Val Thr Cys Asn Val
210 215 220

Ala His
225

<210> 80

<211> 19

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 80

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

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 81

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 81

Ala Glu Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala

1 5 10 15

Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu

50 55 60

Thr Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Ser Ser Gln Ala Val

65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His

85

<210> 82

<211> 227

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

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

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

115 120 125
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
130 135 140
Pro Pro Ser Met Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Thr Val Val Cys
145 150 155 160
Phe Val Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile
165 170 175
Asp Gly Ser Glu Gln Arg Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln

180 185 190
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr
195 200 205
Lys Val Glu Tyr Glu Arg His Asn Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His
210 215 220
Lys Thr Ser
225
<210> 83
<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 83

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly

20

<210> 84

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 84

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Met Glu

1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Thr Val Val Cys Phe Val Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Gln

35 40 45

Arg Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr Lys Val Glu Tyr Glu

65 70 75 80

Arg His Asn Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser

85 90

<210> 85

<211> 227

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400

> 85

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Glu Asp Lys Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe

130 135 140

Pro Pro Ser Met Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Thr Val Val Cys

145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile

165 170 175

Asp Gly Ser Glu Gln Arg Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln

180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr

195 200 205

Lys Val Glu Tyr Glu Arg His Asn Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His

210 215 220

Lys Thr Ser

225

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 86

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly

20

<210> 87

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 87

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Met Glu

1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Thr Val Val Cys Phe Val Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Gln

35 40 45

Arg Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr Lys Val Glu Tyr Glu

65 70 75 80

Arg His Asn Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser

85 90

<210> 88

<211> 221

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 88

Met Asp Phe Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Phe Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Trp Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Asn Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Ser Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ala Glu Gly Phe Gly Thr Pro Phe Pro Tyr Trp Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

165 170 175

Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser Asp Val His Thr Phe Pro Ala

180 185 190

Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Thr Ser Ser Val Thr Ser Ser

195 200 205

Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His

210 215 220

<210> 89

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 89

Met Asp Phe Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Phe Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Trp Cys
<210> 90
<211> 84
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial

<400> 90
Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly
1 5 10 15
Asp Thr Thr Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser
35 40 45
Asp Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Thr Ser Ser Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys
65 70 75 80
Asn Val Ala His
<210> 91
<211> 227
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 91
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Ser Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Arg Ala
20 25 30
Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45
Leu Leu Tyr Ser Glu Asn Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Arg Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe

130 135 140

Pro Pro Ser Met Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Thr Val Val Cys

145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile

165 170 175

Asp Gly Ser Glu Gln Arg Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln

180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr

195 200 205

Lys Val Glu Tyr Glu Arg His Asn Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His

210 215 220

Lys Thr Ser

225

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 92

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Gly Ser Cys Gly

20

<210> 93

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 93

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Met Glu
1 5 10 15
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Thr Val Val Cys Phe Val Asn Asn Phe

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

85 90

<210> 94

<211> 137

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 94

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

Thr Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Ser Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95
Ile Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ala Glu Gly Phe Gly Thr Pro Phe Pro Tyr Trp Gly
115 120 125
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 95
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial
<400> 95
Met Asp Phe Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Phe Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Trp

<210> 96
<211> 133
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 96
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Thr Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Gln Ala
20 25 30
Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Leu Tyr Arg Glu Asp Thr Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

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

Arg Leu Glu Leu Lys
130

<210> 97
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial
<400> 97

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Thr Tyr Gly
20