



(51) 국제특허분류:

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/002302

(22) 국제출원일:

2019년 2월 26일 (26.02.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0033849 2018년 3월 23일 (23.03.2018) KR

(71) 출원인: 한림대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) [KR/KR]; 24252 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교, Gangwon-do (KR).

(72) 발명자: 권형주 (KWON, Hyung Joo); 28774 충청북도 청주시 상당구 중흥로 70, 현대3차아파트 306동 1204호, Chungcheongbuk-do (KR). 김태하 (KIM, Te Ha); 24371 강원도 춘천시 남춘로51번길 29, 402호, Gangwon-do (KR). 김동범 (KIM, Dong Bum); 24278 강원도 춘천시 후석로 325, 춘천더샵아파트 107동 1003호, Gangwon-do (KR).

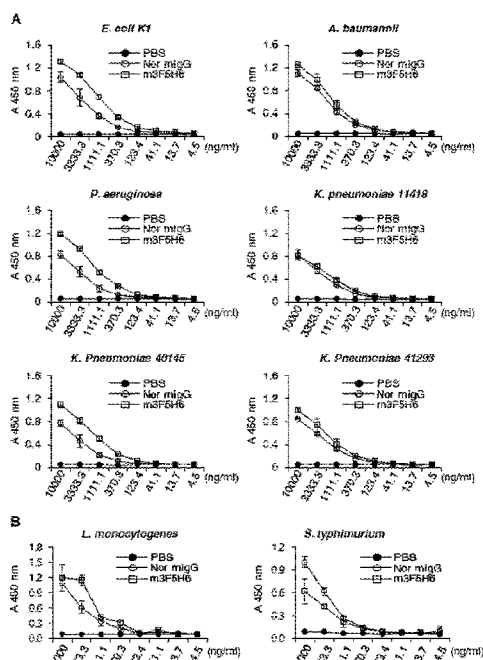
(74) 대리인: 구현서 (KOO, Hyun Seo); 06253 서울시 강남구 강남대로66길 8, 9층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: ANTIBACTERIAL ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 항균용 항체 및 그 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a monoclonal antibody produced by CpG-DNA or a functional fragment thereof, wherein the monoclonal antibody or the functional fragment thereof comprises any one polypeptide sequence selected from the following polypeptide sequences, and to a monoclonal antibody consisting of a heavy chain comprising the CDR1 region represented by SEQ ID NO: 1, the CDR2 region represented by SEQ ID NO: 2, and the CDR3 region represented by SEQ ID NO: 3, and a light chain comprising the CDR1 region represented by SEQ ID NO: 4, the CDR2 region represented by SEQ ID NO: 5, and the CDR3 region represented by SEQ ID NO: 6, and a use thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 CpG-DNA에 의하여 생산된 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편에 있어서, 상기 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편은 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편: 서열번호 1로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 단클론 항체 및 그 용도에 관한 것이다.

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 항균용 항체 및 그 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 항균용 항체 및 그 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 선천성 면역 시스템은 호스트에 잠재적으로 해로운 물질 및 침입하는 병원체에 대한 1차 저지선이다. 병원체의 인식은 선천성 면역 세포에서 PRRs(pattern recognition receptors)를 통한 PAMPs(pathogen-associated molecular patterns)라고 알려진 보존된 구조들에 의존한다. TLRs(Toll-like receptors)은 주요한 잘 연구된 PRRs이고, TLRs의 활성화는 싸이토카인, 케모카인 및 여러 면역 세포를 생산하여 면역을 유도하고 이것은 세균, 바이러스 및 기생충과 같은 병원체에 대한 방어를 수행한다.
- [3] TLR9(Toll-like receptor 9)은 호스트에서 면역조절 효과를 유도하는 박테리아 DNA를 검출하는 공지된 수용체이다. 박테리아 DNA 및 CpG dinucleotide를 포함하는 합성 올리고뉴클레오타이드(CpG-DNA)는 여러 세포를 활성화하여 증식시키고, Th1-매개된 싸이토카인을 TLR9의 자극을 통하여 생산한다.
- [4] 그러나 CpG-DNA 자극에 의하여 생산된 항체 및 그 작용에 대해서는 알려지지 않았다.
- [5] 메치실린-내성 황색 포도상 구균(MRSA)은 직접 환자를 상대하는 임상 의사의 주된 관심 이유이고, 이는 메치실린-감수성 포도상 구균에 의해 야기되는 감염들보다도 높은 치사율 및 발병률을 나타낸다. 게다가, 이러한 감염은 보다 장기간의 입원 시간과 항균 물질로 보다 높은 비용을 초래하고, 그 결과 이러한 병원체에 의해 감염된 환자의 치료에는 상당히 높은 비용이 발생하게 된다.
- [6] 반코마이신은 MRSA에 의해 야기되는 감염의 치료를 위해 선택할 수 있는 첫번째 항균제였다. 2004년의 반코마이신에 대한 MRSA 균주의 내성에 대한 내용은 의학-과학 공동체에서 엄청난 우려를 야기시켜 왔다. 현재 MRSA는 지금 사용할 수 있는 모든 약품에 내성이 있는 병원체, 즉 공포스러운 "슈퍼버그 또는 슈퍼박테리아"의 가장 강력한 후보를 나타낸다.
- [7] 통상적으로, 병원 감염에 있어서 MRSA 유병률(모든 감염중에서 MRSA에 의해 야기되는 황색 포도상 구균의 비율)은 지난 몇 십년에 걸쳐 점진적으로 증가하고 있다. 미국의 337개 병원에서의 1268 ICU(집중 치료 유닛)를 포함하여 Jarvis et al.에 의해 수행된 연구에서, ICU내에서 MRSA에 의해 야기된 감염수는 660으로부터 2184 건으로 변경되었고, 유병률 또한 35%에서 64.4%로 증대되었다. 일본에서, MRSA에 의해 야기되는 병원 감염(HIs)의 유병률은 우려할만한 수치, 즉 60%에서 90%를 나타낸다. 미국에서 수행된 연구에서, 백분위수는 1974년에 2%로부터 1997년에 50%로 변하였다.

- [8] MRSA 균주는 PBP2a와 같은 베타-락탐 클래스에서 항균제에 대한 매우 낮은 친화력을 가진 페니실린-결합 단백질을 제공한다. 유전자 *mecA*로 코드화되는 이러한 효소의 존재하에서, 세균은 심지어 베타-락탐의 존재하에서도 펩티도글리칸을 성공적으로 합성한다. 베타-락탐에 대한 내성 이외에도 병원 MRSA 균주는 치료를 위 첫번째로 선택되는, 글리코펩티드(반코마이신 및 테이코플라닌)의 사용과 함께, 다른 이용가능한 항균성 클래스에 대하여도 내성을 나타낸다.
- [9] PBP2a에 대항하여 DNA 백신을 사용하는 두가지의 연구는 이러한 단백질이 면역원성이 있고, 그 획득된 면역반응은 생쥐 모델에서 수행된 연구에서 MRSA에 대항하는 방어를 부여할 수 있었다는 것을 보여주었다. 그러나, 병원 감염에 있어서, 대부분의 환자는 면역 억제된 것으로 알려져 있다. 이러한 경우에는, 백신은 세균감염을 제어하기 위하여 적절한 시간내에 방어적 항체를 생성할 수 없을 것이다.
- [10] [선행 특허 문헌]
- [11] 대한민국 특허공개번호 10-2010-0108428
- [12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 CpG-DNA 자극에 의하여 생산된 항체를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은 CpG-DNA 자극에 의하여 생산된 항체의 용도를 제공하는 것이다.
- [15]

과제 해결 수단

- [16] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 CpG-DNA에 의하여 생산된 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편에 있어서, 상기 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편은 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편: 서열번호 1로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 단클론 항체를 제공한다.
- [17] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 기능적 단편은 단일 측쇄 항체(scFv); 항원결합 분절(Fab); 본 발명 항체의 CDR부위를 포함하는 경쇄 또는 중쇄; 및 본 발명 항체의 CDR부위를 포함하는 가변 도메인(Variable domain) 중 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [18] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 단클론 항체는 서열번호 7 또는

서열번호 15로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8 또는 서열번호 16으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [19] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 CpG-DNA는 서열번호 9로 기재되는 염기 서열로 이루어진 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [20] 또 본 발명은 상기 본 발명의 단클론 항체 또는 그 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.
- [21] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 그람 양성균, 그람 음성균, 세포내 기생세균 (intracellular bacteria) 또는 약제 내성균에 대해 항균활성을 가지는 것이 바람직하고, 상기 조성물은 메치실린-내성 황색 포도상구균(MRSA), 포도상구균, 대장균, 살모넬라 또는 리스테리아에 대한 항균활성을 가지는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [22] 또한 본 발명은 CpG-DNA에 의하여 생산된 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편을 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.
- [23] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편은 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편:서열번호 1로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 단클론 항체인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [24] 또 본 발명은 CpG-DNA를 동물에 투여하여 메치실린-내성 황색 포도상구균(MRSA), 포도상구균, 대장균, 살모넬라 또는 리스테리아에 대한 항균활성을 가지는 항체를 생산하는 방법을 제공한다.
- [25] 이하 본 발명을 설명한다.
- [26] 본 발명에서, 본 발명자들은 박테리아-반응성 항체의 생산에서 CpG-DNA의 신규한 기능을 제안한다.
- [27] CpG-DNA로 마우스의 전처리는 Methicillin-resistant *S. aureus* MW2 감염으로부터 마우스의 생존을 증가시켰고, 마우스 조직에서 박테리아를 제거하였다. CpG-DNA 단독 투여는 획득 면역(adaptive immunity)을 증가시키는 방향으로 복강내에서 특히 면역 세포군을 조절하였다. *S. aureus* MW2의 감염은 복강내, 골수 및 지라에서 전체 세포수의 큰 감소를 유도한 반면에, CpG-DNA로 마우스의 전처리는 통상적으로 면역 세포군을 보호하였다. CpG-DNA로 마우스 감염은 박테리아-반응성 항체의 증가를 유도하였고, 이것은 복강 및 혈청에서 TLR9-의존 경로를 통하여 다양한 종의 박테리아와 결합할 수 있었다. CpG-DNA로 복강내 세포의 자극은 인 비트로에서 박테리아-반응성 항체를 유도하였다. 박테리아-반응성 항체들은 CpG-DNA에 반응하여 복강내 B1 및 B2 세포 모두에서 생산하였고, 그 항체들은 마우스의 복강내에서

식균작용(phagocytosis)을 촉진하였다. 박테리아-반응성 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 CpG-DNA 자극된-복합 B 세포로부터 선택하였다. 본 발명자들은 박테리아에 반응성을 가지는 단클론 항체를 확립하고, 그 항체 서열을 CDR grafting을 통하여 안정한 인간 골격으로 인간화하였다. 그 정제된 단클론 항체는 여러 박테리아에 반응성을 가졌고, 대식세포주 및 1차 복강 세포에서 *S. aureus* MW2의 식균작용을 촉진하였다.

- [28] 박테리아-반응성 단클론 항체로 주사는 *S. aureus* MW2의 감염 후 생존률 증가 및 박테리아 제거의 치료 효과를 가졌다. 그 정제된 박테리아-반응성 인간화된 단클론 항체는 (h3F5H6 IgG) 다양한 박테리아 (G(+) 및 G(-) 박테리아)에 반응하였고 인간화된 박테리아-반응성 항체의 주사는 *S. aureus* MW2 및 *E. coli* K1의 감염 후 생존률 증가 및 박테리아 제거의 치료 효과를 가졌다. 따라서, 본 발명자들은 CpG-DNA가 복강내에서 박테리아-반응성 항체의 생산을 유도하고 면역 세포군을 보호하여 면역 시스템의 항균 활성을 촉진한다는 것을 시사한다.
- [29] 또한 본 발명자들은 박테리아 감염에 의하여 야기되는 긴급한 임상 상황의 치료에서 그 분리된 단클론 항체 및 인간화 단클론 항체가 유용하다는 것을 제안한다.
- [30] 또한 본 발명은 상기의 본 발명의 항체 또는 단일 측쇄 항체(scFv) 절편을 유효성분으로서 함유하는 약학 조성물을 제공한다.
- [31] 또 본 발명은 상기의 본 발명의 항체 또는 그 단일 측쇄 항체(scFv) 절편을 유효성분으로서 함유하는 감염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [32] 또한 본 발명은 상기의 본 발명의 항체 또는 그 단일 측쇄 항체(scFv) 절편을 유효성분으로서 함유하는 항감염 조성물을 제공한다.
- [33] 본 발명의 약학은 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 희석제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명에서 사용가능한 담체로는 단백질, 폴리펩티드, 리포솜, 다당, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성아미노산, 아미노산 공중합체 및 불활성 바이러스 입자와 같이 천천히 대사되는 거대분자를 들 수 있다. 예를 들면, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트 및 설페이트와 같이 무기산의 염; 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트와 같은 유기산의 염과 같은 약제학적으로 허용가능한 염; 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체, 및 수화제, 유화제 또는 pH 완충 물질과 같은 보조적 물질을 사용할 수 있다.
- [35] 약제학적으로 허용가능한 담체에 관해서는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 1991]에 기재되어 있다.
- [36] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제, 바람직하게는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 경구, 또는 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 수막강내, 심실내, 폐, 경피,

- 피하, 복강내, 비강내, 소화관내, 국소, 설하, 질내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [37] 이러한 목적에 적합한 제형으로는 정제, 환제, 당제 (dragee), 산제, 캡슐제, 시럽제, 용액제, 겔제, 현탁제, 에멀전, 마이크로에멀전 등의 다양한 경구투여용 제제; 및 주사용 앰플과 같은 주사제, 주입제 및 하이포스프레이 (hypospray)와 같은 분무제 등과 같은 비경구투여용 제제가 바람직하다. 주사 또는 주입용 제제의 경우에는 현탁액, 용액 또는 에멀전 등의 형태를 취할 수 있고, 현탁화제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제화제를 포함할 수 있다. 또한, 상기 항체 분자는 사용 전에 적절한 무균 액체를 재조정하여 사용할 수 있는 건조된 형태로 제제화될 수도 있다.
- [38] 본 발명의 조성물은 유효성분으로서 위장관 내에서 분해되기 쉬운 항체 분자를 포함하므로, 상기 조성물이 위장관을 이용하는 경로에 의하여 투여되어야 하는 경우에는 분해로부터 항체를 보호하고, 항체를 방출한 후에는 위장관으로 흡수되는 약제를 포함하는 것이 바람직하다.
- [39] 본 발명에서는 또한 본 발명의 항체를 상기에 기재된 바와 같은 다양한 방법으로 동물, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 사람에게 투여되는 단계를 포함하는 감염증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [40] 본 발명의 조성물 또는 약학적 제제의 유효성분으로서 상기 항체는 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.001 내지 50 mg/kg 체중, 바람직하게는 0.1 내지 20 mg/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 예방 또는 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별, 약제조합, 반응 민감성 및 치료에 대한 내성/반응 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [41] 본 발명의 기능적 항체 단편으로는 경쇄, 중쇄, 가변 영역, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Diabody, Tribody, dsFv, CDR을 함유하는 펩타이드 등을 들 수 있다.
- [42] Fab는 IgG를 단백질 분해효소 파파인으로 처리하여 수득되는 단편중(중쇄의 224번째의 아미노산 잔기로 절단된다), 중쇄의 N 말단측 약 절반과 경쇄 전체가 디설파이드 결합(S-S 결합)으로 결합된 분자량 약 5만의 항원결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [43] 본 발명의 Fab는 본 발명의 항체를 단백질 분해효소 파파인으로 처리하여 수득할 수 있다. 또는 당해 항체의 Fab를 암호화하는 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하고, 당해 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 발현시켜 Fab를 제조할 수 있다.
- [44] F(ab')₂는 IgG를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 수득되는 단편중(중쇄의 234번째의 아미노산 잔기로 절단된다), Fab가 힌지영역의 S-S 결합을 개재하여 결합된 것보다 약간 큰 분자량 약 10만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

- [45] 본 발명의 F(ab')₂는 본 발명의 항체를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 수득할 수 있다. 또는 하기의 Fab'를 티오에테르 결합 또는 S-S 결합시켜 제작할 수 있다. Fab'는 상기 F(ab')₂의 힌지영역의 S-S 결합을 절단한 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [46] scFv는 1개의 VH와 1개의 VL을 12잔기 이상의 적당한 펩타이드 링커(P)를 사용하여 연결한 VH-P-VL 내지는 VL-P-VH 폴리펩타이드로, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [47] 본 발명의 scFv는 본 발명의 항체의 VH 및 VL을 암호화하는 cDNA를 수득하고, scFv를 암호화하는 DNA를 작제하며 당해 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하여 당해 발현 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.
- [48] Diabody는 항원 결합 특이성이 동일하거나 상이한 scFv가 이량체를 형성한 항체 단편이고, 동일한 항원에 대한 2가의 항원 결합 활성 또는 상이한 항원에 대한 2특이적인 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [49] 본 발명의 Diabody는 예를 들면, 본 발명의 항체의 VH 및 VL을 암호화하는 cDNA를 수득하고, 3 내지 15 잔기의 폴리펩타이드 링커를 갖는 scFv를 암호화하는 DNA를 작제하며 당해 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하여 당해 발현벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 Diabody를 발현시켜 제조할 수 있다.
- [50] 또한, linker P 길이가 3-10 일 때는 tribody가 형성되어, tribody로 포함할 수 있다.
- [51] dsFv는 VH 및 VL 중 각각 하나의 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 폴리펩타이드를 당해 시스테인 잔기 간의 S-S 결합을 개재하여 결합시킨 것을 말한다. 시스테인 잔기로 치환되는 아미노산 잔기는 Reiter 등에 의해 기재된 방법[참조: Protein Engineering, 7, 697(1994)]에 따라서 항체의 입체구조 예측에 근거하여 선택할 수 있다.

[52]

발명의 효과

- [53] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 항체는 면역 세포군을 보호하여 면역 시스템의 항균 활성을 촉진한다.

[54]

도면의 간단한 설명

- [55] 도 1은 CpG-DNA가 *S. aureus* MW2 감염으로부터 마우스를 보호한다는 것을 나타낸 그림. (A) 실험 과정의 도식도. BALB/c 마우스에 i.p.로 CpG-DNA 1826를 투여하였다. 7 일 후, 마우스에 i.v.로 *S. aureus* MW2 (1 x 10⁷ CFU)를 주사하였다. (B) 마우스의 생존을 *S. aureus* MW2 감염 7일 후 기록하였다. 각 처리군에서 생존 마우스의 퍼센트를 나타내었다(n=10/group). (C) *S. aureus* MW2 감염 2일 후, 그 마우스를 희생하고, 지시된 조직을 제거하고, PBS 용액에서 균질화하였다. 그

용액을 희석하고 아가 플레이트에 플레이팅하여서 *S. aureus* MW2 (n=5/group)의 CFU(colony forming unit)를 측정하였다. (D) 감염 2일 후 지시된 조직의 조직병리. 스케일 바, 10 μ m. 1826, CpG-DNA 1826; MW2, *S. aureus* MW2. 이 결과는 3회 독립적인 실험의 대표값으로 나타내었다.

[56] 도 2는 *S. aureus* MW2 감염 후 마우스 복강, 지라 및 골수에서 세포군의 변화를 나타낸 그림. BALB/c 마우스에 i.p.로 CpG-DNA 1826를 투여하고 7일 후 그 마우스에 i.v.로 *S. aureus* MW2 (1×10^7 CFU)를 주사하고 2일 후 마우스를 희생하고 복강, 지라세포 및 골수 세포를 모아서 형광-부착 항체로 염색하고 유세포분석법을 통하여 세포군을 분석하였다. (A)복강 세포, (B) 골수 세포. (C) 지라세포. n=3/group. 1826, CpG-DNA 1826. MW2, *S. aureus* MW2. 이 결과는 3회 독립적인 실험의 대표값으로 나타내었다.

[57] 도 3은 CpG-DNA 1826 투여에 의한 마우스 복강내 항체 생산을 나타낸 그림. 마우스에 i.p.로 CpG-DNA 1826 또는 non-CpG-DNA 2041를 기재된 시간 동안 투여하고, 투여 1, 3 및 7일에 복강 (A) 및 혈청 (B)의 상등액을 모아서 전체 IgG의 레벨을 ELISA로 측정하였다(n=3/group). 이 결과는 3회 독립적인 실험의 대표값으로 나타내었다.

[58] 도 4는 마우스 복강 및 혈청에서 CpG-DNA 1826의 투여에 의한 박테리아-반응성 항체의 생성을 나타낸 그림. (A, B) BALB/c 마우스에 i.p.로 CpG-DNA 1826를 투여하고 7일 후 그 마우스에 i.v.로 *S. aureus* MW2 (1×10^7 CFU)를 주사하고 2일 후 마우스를 희생하고 복강 및 혈청의 상등액을 마우스로부터 모았다. 복강(A) 및 혈청(B)의 박테리아-반응성 항체를 *S. aureus* MW2 코팅된 플레이트를 사용하여 캡처하고(n=3/group) 총 IgG 및 각 IgG isotype의 양을 ELISA로 측정하였다. 1826, CpG-DNA 1826. MW2, *S. aureus* MW2. (C-F) BALB/c (C, D) 및 TLR9 -/- (E, F) 마우스에 i.p.로 CpG-DNA 1826를 투여하고 7일 후 복강 (C, E) 및 혈청(D, F)의 상등액을 모았다. Gram-양성 박테리아에 반응하는 항체의 양을 측정하기 위하여, 기재된 박테리아를 poly-L-lysine 코팅된 플레이트에 코팅하였다. 총 IgG의 양을 ELISA로 결정하였다(n=3/group). 이 결과는 3회 독립적인 실험의 대표값으로 나타내었다.

[59] 도 5는 마우스 복강 세포에서 CpG-DNA 1826의 처리로 인 비트로에서 박테리아-반응성 항체의 생성을 나타낸 그림, BALB/c 마우스에 i.p.로 PBS, CpG-DNA 1826 또는 non-CpG-DNA를 7일간 투여하였다. (A) 복강이 세포를 모아서 PBS, CpG-DNA 1826 또는 non-CpG-DNA 2041로 자극하고 48시간 후, 세포 배양 상등액을 모아서 총 IgG의 양을 ELISA로 측정하였다(n=3/group). (B) PBS-주사된 마우스 유래 복강 세포에 PBS, CpG-DNA 1826 또는 non-CpG-DNA 2041로 자극하였다. Gram-양성 박테리아에 반응하는 항체의 양을 측정하기 위하여, 기재된 박테리아를 poly-L-lysine 코팅된 플레이트에 코팅하고, 세포 배양 상등액을 적용하였다. 결합된 IgG의 양을 ELISA로 결정하였다(n=3/group). (C) BALB/c에 i.p.로 PBS 또는 CpG-DNA 1826를 투여 후, 복강의 B1 및 B2 세포를

FACSAria™ II로 형광 표지된 anti-mouse CD19 및 anti-mouse CD23 항체로 분리하였다. (D 및 E) 복강 유래 분리된 B1 세포 및 B2 세포를 PBS 또는 CpG-DNA 1826으로 자극하고, 48시간 후 세포 배양 상등액을 모았다. 총 IgG (D) 및 Gram-양성 박테리아에 반응하는 항체(E)의 양을 ELISA로 결정하였다(n=3/group). 1826, CpG-DNA 1826; 2041, non-CpG-DNA 2041. 이 결과는 3회 독립적인 실험의 대표값으로 나타내었다.

- [60] 도 6은 마우스 대식 세포주에서 CpG-DNA 1826-유도된 다클론 항체에 의한 식균작용의 증가를 나타낸 그림. (A 및 B) BALB/c 마우스에 i.p.로 PBS (A) 또는 CpG-DNA 1826 (B)를 투여하고, 7일 후, 복강의 상등액을 모아서 다클론 항체를 Protein A 친화 비드로 정제하였다. 그 정제된 항체를 reducing (R) 또는 non-reducing (NR) 샘플 버퍼로 처리하고, SDS-PAGE 후 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하였다. (C) 항체(10 µg/ml)의 *S. aureus* MW2에 대한 결합능력을 ELISA로 측정하였다. PC Ab, PBS-투여된 복강 유래 정제된 항체. 1826 PC Ab, CpG-DNA 1826-투여된 복강 유래 정제된 항체. 흡광도를 450 nm에서 읽었다. (D) FITC-표지 *S. aureus* MW2 (3×10^8 CFU /ml)를 PBS, PC Ab 또는 1826 PC Ab (10 µg/ml)로 1시간 동안 배양하고, RAW 264.7 세포에 처리하고, 1시간 후, RAW 264.7 세포를 PBS로 세척하고, 고정화한 후, Hoechst No. 33258로 염색하여 핵(blue)을 관찰하였다. 공초점 이미지는 *S. aureus* MW2의 식균작용을 나타낸다. 스케일 바, 10 µm. (E) 식균작용 지수를 분석하였다. (n=3/group). 식균작용 지수는 대식세포에 의하여 섭취된 FITC-표지 *S. aureus* MW2의 수를 의미한다 이 결과는 3회 독립적인 실험의 대표값으로 나타내었다.

- [61] 도 7은 박테리아-반응성 단클론 항체를 생성하는 HAT 및 HT 배지에서 하이브리도마 클론의 스크리닝을 나타내는 그림. (A) HAT 배지에서 세포 융합 실험의 초기 스크리닝의 ELISA 결과. CpG-DNA 1826-투여된 마우스의 복막 세포를 모아서 마우스 SP2/0 myeloma 세포로 융합하였다. 박테리아-반응성 항체-생산 하이브리도마 클론을 *S. aureus* MW2 코팅된 플레이트를 사용하여 HAT 배지로 스크리닝하였다. (B) *S. aureus* MW2 코팅된 플레이트를 사용한 도 7A 유래 6클론의 ELISA 결과. (C) *S. aureus* MW2 코팅된 플레이트를 사용한 도 7B 유래 4클론의 ELISA 결과. (D) 도 7A 유래 3F5 하이브리도마 클론에서 박테리아-반응성 항체 생산하는 클론을 선택하기 위하여 HT 배지에서 리미팅 희석 방법으로 서브클로닝하였다. (E) 박테리아 결합에 대한 하이브리도마 클론 배양 상등액을 ELISA를 사용하여 분석하였다.

- [62] 도 8은 하이브리도마 세포 클론 3F5H6로부터 분리된 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인의 cDNA 서열. (A) 중쇄 가변 도메인의 서열. (B) 경쇄 가변 도메인의 서열. 예측 아미노산 서열을 cDNA 서열 밑에 기재함.

- [63] 도 9는 CpG-DNA 1826-자극된 마우스 복강 B 세포로부터 생산된 단클론 항체에 의한 식균작용의 증가를 나타낸 그림. (A) 박테리아-반응성 단클론 항체의 생산. 박테리아-반응성 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마

세포(3F5H6 클론)를 표준 하이브리도마 기술에 의하여 CpG-DNA 1826-투여된 마우스 복강의 B 세포로부터 얻었다. 3F5H6 클론에 의하여 유도된 마우스의 복수(ascite)를 분리하여 그 단클론 항체를 Protein A 친화 컬럼 크로마토그래피로 정제하고, SDS-PAGE 후, Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하였다. R, reducing; NR, non-reducing. (B) 단클론 항체의 isotype을 *S. aureus* MW2-코팅된 플레이트를 사용하여 ELISA로 결정하였다. (C) 항체의 박테리아-반응성을 ELISA로 기재된 Gram-positive 박테리아-코팅된 플레이트를 사용하여 평가하였다($n=3/\text{group}$). (D-G) FITC-표지된 *S. aureus* MW2 세포(3×10^8 CFU/mL)를 PBS, 정상 마우스 IgG 또는 m3F5H6 단클론 항체 ($10 \mu\text{g/mL}$)로 1시간 동안 배양하고, 인 비트로에서 RAW 264.7 세포 (D 및 E) 및 복강 세포(F 및 G)에 처리하고, 1시간 후, 그 세포들을 PBS로 세척하고, 고정화한 후, Hoechst No. 33258로 염색하여 핵(blue)을 관찰하였다. (D 및 F) 공초점 이미지는 *S. aureus* MW2의 식균작용을 나타낸다. 스케일 바, $10 \mu\text{m}$. RAW, RAW 264.7 세포; (E 및 G) 식균 지수를 분석하였다 ($n=3/\text{group}$). (H) 박테리아-반응성 단클론 항체에 의한 식균작용의 증가. FITC-표지 *S. aureus* MW2 세포 (3×10^8 CFU/mL)를 정상 마우스 IgG 또는 m3F5H6 단클론 항체 ($10 \mu\text{g/mL}$)로 1시간 배양하고 i.p.로 BALB/c 마우스에 주사하고 1시간 후, 복막 세포를 마우스로부터 모아서 대식세포, 수지상 세포 및 호중구에 대하여 특정 세포 특이적인 마커들로 염색하였다. 식균작용의 레벨을 유세포분석법으로 분석하였다($n=3/\text{group}$). 이 결과는 3회 독립적인 실험의 대표값으로 나타내었다.

- [64] 도 10은 CpG-DNA 1826-자극된 마우스 복강 B 세포로부터 생산된 단클론 항체(m3F5H6 단클론 항체)의 박테리아-반응성 특성을 나타낸 그림. (A) 박테리아-반응성 단클론 항체 (m3F5H6) 또는 정상 마우스 IgG (Nor mIgG)를 Gram(-) 박테리아로 (*E. coli* K1, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* 11418, *K. pneumoniae* 40145, *K. pneumoniae* 41293)) 코팅된 플레이트를 사용하여 캡처하고($n=3/\text{group}$) 적정 곡선을 ELISA로 측정하였다. (B) 박테리아-반응성 단클론 항체 (m3F5H6) 또는 정상 마우스 IgG (Nor mIgG)를 세포내기생 박테리아로 (*L. monocytogenes*, *S. typhimurium*) 코팅된 플레이트를 사용하여 캡처하고($n=3/\text{group}$) 적정 곡선을 ELISA로 측정하였다.

- [65] 도 11은 박테리아-반응성 단클론 항체의 *S. aureus* MW2-감염된 마우스의 생존률에 대한 효과를 나타낸 그림. (A) 실험 과정의 대략도. (B) 8주령 암컷 BALB/c 마우스에 i.v.로 *S. aureus* MW2 (1.5×10^7 CFU)를 주사한 후, i.v.로 PBS, 정상 마우스 IgG 또는 m3F5H6 IgG (25 mg/Kg mouse)를 주사한 후, 생존률을 7일간 모니터링하였다($n=10/\text{group}$). (C) *S. aureus* MW2 감염 2일 후, 기재된 조직에서 *S. aureus* MW2의 CFU를 결정하였다($n=5/\text{group}$). (D) 감염 후 2일에 기재된 조직의 조직병리(D2). (E) 감염 후 30일에 기재된 조직의 조직병리(D30). 스케일 바, $10 \mu\text{m}$. MW2, *S. aureus* MW2. 이 결과는 3회 독립적인 실험의 대표값으로 나타내었다.

- [66] 도 12는 인간화 항체의 구축을 위한 서열 분석 및 본 발명의 야생형 마우스 유래 항체인 m3F5H6, 인간화 항체 구축에 사용된 인간 VH1-Vk1 subtype 골격을 가지는 Samalizumab 항체, 인간화 항체인 h3F5H6의 아미노산 서열을 가변중쇄와 가변경쇄로 나누어 일직선으로 정렬한 도이다. 대괄호 ([])는 각각의 CDR 구역을 나타내고, 밑줄은 베르니에 구역에 해당하는 아미노산을 나타내며, 별표(*)는 친화도의 유지를 위하여 마우스 m3F5H6야생형 항체에서 유래한 아미노산으로 역치환한 부분을 나타낸다. 삼각표 (▲)는 베르니에 구역에 해당하는 앓는 아미노산을 친화도의 유지를 위하여 마우스 m3F5H6야생형 항체에서 유래한 아미노산으로 역치환한 부분을 나타낸다. 이 때 CDR 구역은 Kabat numbering을 따라 정의하였다.
- [67] 도 13은 인간화된 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6)의 정제를 나타낸 그림. 인간화된 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6 IgG) 항체를 Protein-A 아가로스 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하고, SDS-PAGE 및 Coomassie blue 염색으로 동정하였다.
- [68] 도 14는 박테리아를 인지하는 인간화 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6)의 특성을 나타낸 그림. (A) 인간화된 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6 IgG) 또는 정상 인간 IgG를 Gram(+) 박테리아 (*S. aureus*, *S. aureus* MW2, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*) 코팅된 플레이트를 사용하여 캡처하고(n=3/group) 적정 곡선을 ELISA로 측정하였다. (B) 인간화된 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6 IgG) 또는 정상 인간 IgG (정상 hIgG)를 Gram(-) 박테리아 (*A. baumannii*, *E. coli* K1, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* 11418, *K. pneumoniae* 40145, *K. pneumoniae* 41293) 코팅된 플레이트를 사용하여 캡처하고(n=3/group) 적정 곡선을 ELISA로 측정하였다.
- [69] 도 15는 박테리아를 인지하는 인간화 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6)의 특성을 나타낸 그림. 인간화된 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6 IgG) 또는 정상 인간 IgG를 세포내기생 박테리아로 (*L. monocytogenes*, *S. typhimurium*) 코팅된 플레이트를 사용하여 캡처하고(n=3/group) 적정 곡선을 ELISA로 측정하였다.
- [70] 도 16은 인간화된 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6)의 *S. aureus* MW2-감염된 마우스의 생존률에 대한 효과를 나타낸 그림. (A) 실험 과정의 대략도. (B) 8주령 암컷 BALB/c 마우스에 i.v.로 *S. aureus* MW2 (1.5×10^7 CFU)를 주사한 후, i.v.로 PBS, 정상 인간 IgG (정상 hIgG) 또는 h3F5H6 IgG (25 mg/Kg mouse)를 주사한 후, 생존률을 7일간 모니터링하였다(n=10/group). (C) 감염 후 2일에 기재된 조직의 조직병리(D2). 스케일 바, 10 μ m. MW2, *S. aureus* MW2.
- [71] 도 17은 cobra venom factor (CVF)를 마우스의 복강에 투여하여 보체 (complement)를 제거하고, 이 마우스에서 인간화된 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6)의 *S. aureus* MW2-감염에 대한 마우스의 생존률에 대한 효과를 나타낸 그림. (A) 실험 과정의 대략도. (B) 8주령 암컷 BALB/c 마우스에 i.p.로 CVF (30 μ g/mouse)를 투여하고 6시간 후에 i.v.로 *S. aureus* MW2 (1×10^7 CFU)를 주사한

후, i.v.로 PBS 또는 h3F5H6 IgG (25 mg/Kg mouse)를 주사한 후, 생존률을 7일간 모니터하였다(n=10/group).

- [72] 도 18은 CpG-DNA가 *E. coli* K1 감염으로부터 마우스를 보호한다는 것을 나타낸 그림. (A) 실험 과정의 도식도. BALB/c 마우스에 i.p.로 CpG-DNA 1826를 투여하였다. 7 일 후, 마우스에 i.p.로 *E. coli* K1 (1×10^6 CFU)를 주사하였다. (B) 마우스의 생존을 *E. coli* K1 감염 2일 동안 기록하였다. 각 처리군에서 생존 마우스의 퍼센트를 나타내었다(n=12/group). (C) *E. coli* K1 감염 1일 후, 그 마우스를 희생하고, 지시된 조직을 제거하고, PBS 용액에서 균질화하였다. 그 용액을 희석하고 아가 플레이트에 플레이팅하여서 *E. coli* K1 (n=5/group)의 CFU(colony forming unit)를 측정하였다. (D) 감염 1일 후 지시된 조직의 조직병리. 스케일 바, 10 μ m. 1826, CpG-DNA 1826.

- [73] 도 19는 CpG-DNA가 *E. coli* K1 감염으로부터 보체 (complement)가 제거된 마우스를 보호한다는 것을 나타낸 그림. (A) CVF가 보체를 제거하는 것을 확인하는 실험 과정의 도식도. (B) BALB/c 마우스에 i.p.로 CpG-DNA 1826를 투여하였다. 7 일 후, 마우스에 i.p.로 CVF (30 μ g/mouse)를 투여하고 혈청에서 보체(C₃)의 양을 ELISA를 통하여 측정하였다. (C) 보체가 제거된 마우스에서 CpG-DNA가 *E. coli* K1 감염으로부터 마우스를 보호한다는 실험 과정의 도식도. (D) BALB/c 마우스에 i.p.로 CpG-DNA 1826를 투여하였다. 7 일 후, 마우스에 i.p.로 CVF (30 μ g/mouse)를 투여하고, 6시간 후에 마우스에 i.p.로 *E. coli* K1 (3×10^5 CFU)를 주사하였다(n=12/group). 마우스의 생존을 *E. coli* K1 감염 2일 동안 기록하였다.

- [74] 도 20은 인간화된 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6)의 *E. coli* K1-감염된 마우스의 생존률에 대한 효과를 나타낸 그림. 8주령 암컷 BALB/c 마우스를 i.p.로 *E. coli* K1 (5×10^6 CFU)로 주사한 후, i.v.로 PBS, 정상 인간 IgG (정상 hIgG) 또는 h3F5H6 IgG (25 mg/Kg mouse)를 주사한 후, 생존률을 18시간 동안 모니터하였다(n=10/group).

[75]

발명의 실시를 위한 형태

- [76] 이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[77] 실시예 1: 실험 동물

- [78] 8주령 BALB/c 마우스를 Nara Biotech, Inc. (Seoul, Korea)으로부터 구입하고 BALB/c TLR9 녹아웃 마우스는 Oriental Bioservice, Inc. (Kyoto, Japan)로부터 구입하였다. 그 마우스들을 특정 무균(SPF) 조건에서 적당한 온도(20~25°C 및 습도(32~37%))에서 유지하였다. 그 마우스를 고통을 최소화하기 위하여 isoflurane (JW Pharmaceutical, Seoul, Korea) 마취 하에서 희생하였다. 모든 동물

연구의 프로토콜은 한림대 동물 실험 윤리 위원회의 승인을 받았다(Permit Number: Hallym 2014-66, 2015-54, 2016-22, 2016-36).

[79] 실시예 2:CpG-DNA

[80] CpG-DNA 1826 및 non-CpG-DNA 2041를 GenoTech (Daejeon, Korea)으로부터 구입하였다. 이 서열들의 골격을 phosphorothioate로 변형하였다. 하기 올리고데옥시뉴클레오타이드의 서열을 사용하였다: CpG-DNA 1826, 5'-TCCATGA CGTTCCTGA CGTT-3'(서열번호 9), non-CpG-DNA 2041, 5'-CTGGTCTTTCTGGTTTTTTTCTGG-3'(서열번호 10). non-CpG-DNA 2041를 음성 대조군으로 사용하였다. CpG-DNA 1826를 증류수로 희석시키고, 50μg의 CpG-DNA 1826를 기재된 시간 동안 마우스에 복강(i.p.) 주사하였다.

[81]

[82] 실시예 3:박테리아 배양 및 인 비보 감염 연구

[83] *S. aureus* (KCCM 12103), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*, KCCM 40416), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*, KCCM 11873), *A. baumannii* (KCCM 40203), *E. coli* K1 (KCCM 12119), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, KCCM 11803), *K. pneumoniae* 11418 (KCCM 11418), *K. pneumoniae* 40145 (KCCM 40145), *K. pneumoniae* 41293 (KCCM 41293)를 한국 미생물 보존 센터(KCCM, Seoul, Korea)로부터 구입하였다. *S. aureus*, 균주 MW2 (MRSA)는 이복률 교수(Pusan National University)로부터 얻었다. *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)는 이근욱 교수(Hallym University)로부터 얻었으며, *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*)은 박윤경 교수(Chosun University)로부터 얻었다.

[84] *S. aureus* MW2 및 *L. monocytogenes*를 제외한 모든 균주는 37°C에서 Lysogeny broth (LB)에서 배양하였다. *S. aureus* MW2를 37°C에서 2% NaCl 보충된 Columbia broth에서 배양하였다. *L. monocytogenes*는 Brain Heart Inclusion (BHI) 배지에서 배양하였다. 모든 박테리아를 밤새 배양하고, 1/50 희석된 신선 배지에서 OD₆₀₀ 0.5~0.6, 로그 상의 중간에 달할 때까지 재배양하고, 모았다. *S. aureus* MW2를 PBS로 세척하고, 원심분리한 후 PBS에 5 x 10⁷ CFU(colony forming units)/mL로 현탁하였다. 0.2 mL의 박테리아 현탁액을 마우스에 정맥내(i.v.) 또는 복강내(i.p.) 주사하였다. 주사된 마우스를 2일 또는 7일간 사망률 또는 회복을 관찰하였다. 본 발명자들은 감염된 마우스에서 생존률, 조직병리, 조직들에서 박테리아 로드(CFU), 조직들의 세포군을 조사하고, 복강 및 혈청에서 항체의 양을 측정하였다.

[85] 실시예 4:H&E 염색

[86] 각 조직의 Paraffin 충전 및 절편을 통상의 방법(Kwon, S., D. Kim, B. K. Park, S. Cho, K. D. Kim, Y. E. Kim, C. S. Park, H. J. Ahn, J. N. Seo, K. C. Choi, D. S. Kim, Y. Lee, and H. J. Kwon. 2012. *PLoS One* 7: e33121; Weiss, A. T., N. M. Delcour, A. Meyer, and R. Klopfeisch. 2011. *Vet Pathol* 48: 834-838)으로 제조하였다.

[87] 마우스에 *S. aureus* MW2로 감염 후, 간, 폐, 신장 및 지라를 포함하는 조직을

준비하고 슬라이드에 마운팅하고 40°C에서 밤새 건조한 후, 그 조직 슬라이드를 60°C에서 30분간 배양하여 파라핀을 녹였다. 그 조직들을 xylene에서 배양하고, 일련의 100~70% 에탄올로 재수화하고 증류수로 세척하였다. 조직들을 Gill's Hematoxylin V (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)으로 염색하고, 물로 세척하고 Eosin Y 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 2차적으로 염색하였다. 염색된 조직들을 70~100% 에탄올로 탈수하고, xylene에서 배양하고, Malinol (Muto Pure Chemicals)으로 마운팅하였다. 염색된 조직들을 Eclipse E200 현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

[88] 실시예 5:CFU(colony forming units)의 분석

[89] 감염 후 2일에, 각 조직을 모아서, 무게를 재고 PBS로 2 mL 튜브(Eppendorf, Hamburg, Germany)에서 stainless steel 비드(Qiagen, Hilden, Germany)로 균질화하였다. 그 혼합 용액을 Columbia broth-Bacto 아가를 포함하는 6 웰 플레이트로 옮긴 후, 콜로니들을 37°C에서 밤새 배양한 후 카운트하였다.

[90] 실시예 6:혈청, 복막 세포, 지라세포, 및 골수 세포의 조제

[91] 마우스에서 *S. aureus* MW2로 감염 2일 후, 마우스를 isoflurane으로 마취하였다. 혈청을 심장-편칭 방법으로 마우스로부터 얻었다.

[92] Fortier, A. H., and L. A. Falk. 2001. *Curr Protoc Immunol* Chapter 14: Unit 14 11;Pineda-Torra, I., M. Gage, A. de Juan, and O. M. Pello. 2015. *Methods Mol Biol* 1339: 101-109;Ray, A., and B. N. Dittel. 2010. *J Vis Exp.*;Stagg, A. J., F. Burke, S. Hill, and S. C. Knight. 2001. *Methods Mol Med* 64: 9-22에 기재된 것과 같이, 복막 세포, 지라세포, 및 골수 세포를 마우스로부터 5% 우태아 혈청(FBS)을 포함하는 RPMI 1640 배지로 모았다.

[93] 세포를 모은 후, 적혈구를 적혈구 파쇄 버퍼(140 mM NH₄Cl, 20 mM Tris-HCl (pH7.2))로 제거하였다. 그 조제된 세포를 인 비트로에서 CpG-DNA로 자극하기 위하여 5% 우태아 혈청(FBS)을 포함하는 RPMI 1640 배지로 현탁하고, 96 웰 조직 배양 플레이트(BD Falcon, Falcon, Mexico)로 분주하였다.

[94] 실시예 7:유세포 분석법

[95] 마우스로부터 준비된 세포를 10분간 anti-mouse CD16/32 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 블럭킹하고 하기의 형광-표지 항체들: anti-mouse CD8, CD11c, CD3, CD4, CD11b, CD19 (BD Biosciences, USA), CD23, F4/80, Ly-6G 항체(eBioscience, San Diego, CA USA)로 염색하였다. 그 샘플들을 1% FBS를 포함하는 PBS로 세척하고, FACSCanto™ II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)으로 분석하였다.

[96] 실시예 8:ELISA

[97] 마우스에 CpG-DNA 1826 투여 및/또는 *S. aureus* MW2 감염에 의한 박테리아-특이적인 항체의 생성을 결정하기 위하여, 본 발명자들은 poly-L-lysine 코팅된 플레이트(Corning Inc, Corning city, NY, USA)를 사용하였다. 오버나잇 성장한 박테리아를 2회 PBS로 10,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 세척하고,

- 통상의 ELISA 코팅 버퍼로 재부유하였다.
- [98] 각 웰을 100 μ L의 재현탁된 박테리아로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 배양 후, 그 박테리아를 0.5% glutaraldehyde로 PBS에서 15 min 분간 상온에서 고정하였다. PBS로 2회 세척 후, 각 웰을 100 mM glycine 및 0.1% BSA를 포함하는 RPMI 1640 용액으로 배양하고 PBS로 2회 세척하였다. 그 박테리아-코팅된 웰들을 1% BSA를 포함하는 PBS로 상온에서 1시간 동안 블럭킹하였다.
- [99] 혈청, 복강의 상등액 및 복막 세포 배양 또는 정제된 항체들을 각 웰에 계대 희석하여 첨가하고 상온에서 1시간 배양하였다. 그 샘플을 PBS-T (0.2% Tween-20 in PBS)로 3회 세척하고, HRP(horse radish peroxidase)-표지 goat anti-mouse IgG (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), IgG1, IgG2a, IgG2b, 또는 IgG3 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)를 포함하는 항체들을 상온에서 1시간 동안 웰에 첨가하였다.
- [100] PBS-T로 4회 세척 후, TMB Microwell Peroxidase Substrate Kit (KPL, Gaithersburg, MD, USA)를 blue-color 표현에 사용하고, TMB Stop 용액(KPL)으로 yellow-color를 유지하기 위하여 고정화하고, 450 nm에서 Spectra Max 250 microplate 리더(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.
- [101] ELISA로 항체의 양을 결정하기 위하여, goat anti-mouse IgG (BD Biosciences)를 4°C에서 밤새 코팅하였다. 그 웰들을 1% BSA를 포함하는 PBS로 1시간 동안 상온에서 블럭킹하고, 총 IgG 및 IgG isotypes의 양들을 Kwon, S., D. Kim, B. K. Park, S. Cho, K. D. Kim, Y. E. Kim, C. S. Park, H. J. Ahn, J. N. Seo, K. C. Choi, D. S. Kim, Y. Lee, and H. J. Kwon. 2012. *PLoS One* 7: e33121에 기재된 것과 같이 ELISA로 측정하였다.
- [102] 실시예 9:인 비트로 CpG-DNA로 마우스 복막 세포의 자극
- [103] 복막 세포를 5% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지로 마우스로부터 모았다. 적혈구를 제거한 후, 그 세포를 5% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지로 세척하고, 100 U/mL의 penicillin 및 100 μ g/mL의 streptomycin를 포함하는 5% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 5 μ g/mL의 CpG-DNA 1826를 각 세포 배양 플레이트에 처리하였다. 48 시간 후, 세포 배양 상등액을 모아서 항체의 양을 정량화하기 위하여 ELISA로 분석하였다.
- [104] 실시예 10:마우스 복막 세포 유래 B 세포의 소팅(sorting)
- [105] Anti-mouse CD19 (BD Bioscience)를 B 세포의 지정을 위해 염색하였고, anti-mouse CD23 (eBioscience)를 B1 및 B2 세포의 분리된 소팅을 위해 염색하였다. Anti-mouse CD3 (BD Bioscience)을 림파구로부터 non-B 세포를 분리하기 위하여 T 세포의 염색에 사용하였다. 복막 세포를 항체로 염색하고, 세척하고, sorting buffer (1 mM EDTA, 25 mM HEPES pH7.0, 1% FBS diluted in PBS)로 현탁하였다. B1 세포 및 B2 세포를 FACSARIA™ II (Becton Dickinson)로 소팅하였다.

- [106] 실시예 11:마우스 복강으로부터 다클론 항체의 정제
- [107] 마우스에 i.p.로 PBS 또는 CpG-DNA 1826를 투여하고 7일 후에, 복강의 상등액을 원심분리에 의하여 얻어서 복막 세포를 제거하였다. 복강의 세포가 제거된 상등액의 다클론 항체를 Protein A affinity chromatography (Repligen, Waltham, MA, USA)로 정제하고 SDS-PAGE로 분석하였다. *S. aureus* MW2에 대한 이들 항체들의 결합력을 상기와 같이 ELISA로 측정하였다.
- [108] 실시예 12:박테리아-반응성 단클론 항체를 얻기 위한 복강의 B 세포로부터 하이브리도마 세포의 생산
- [109] 박테리아-반응성 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 얻기 위하여, BALB/c 마우스에 i.p.로 50 µg의 CpG-DNA 1826을 주사하였다. 마우스의 복막 세포를 7일 후 모아서, 마우스 SP2/0 myeloma 세포와 융합하고, 박테리아-반응성 항체-생성 하이브리도마 클론(m3F5H6)을 표준 하이브리도마 기술(Kim, D., S. Kwon, J. W. Rhee, K. D. Kim, Y. E. Kim, C. S. Park, M. J. Choi, J. G. Suh, D. S. Kim, Y. Lee, and H. J. Kwon. 2011. *BMC Immunol* 12: 29; Yokoyama, W. M., M. Christensen, G. D. Santos, and D. Miller. 2006. *Curr Protoc Immunol* Chapter 2: Unit 2 5)으로 스크리닝하였다.
- [110] 복수를 얻기 위하여, BALB/c 마우스에 i.p.로 프리스틴 주사 후에 하이브리도마 클론으로 주사하였다. 9~11 일 후, 복수를 마우스 복강으로부터 모았다. 그 단클론 항체를 복수로부터 Protein A affinity 크로마토그래피(Repligen)를 사용하여 정제하고 SDS-PAGE로 분석하였다. Isotype 및 단클론 항체의 박테리아-반응성을 상기와 같이 ELISA로 측정하였다.
- [111] 실시예 13:박테리아-반응성 단클론 항체의 가변 중쇄 및 경쇄(Fab)의 클로닝
- [112] 박테리아-반응성 단클론 항체(m3F5H6)를 생산하는 하이브리도마 세포를 배양하고, 전체 RNA를 하이브리도마 세포로부터 추출하고, cDNA를 역전사로 합성하였다. 박테리아-반응성 단클론 항체의 Fab 서열을 클로닝하기 위하여, 생성된 cDNA를 AccuPrime Taq DNA 폴리머라아제(Invitrogen) 및 다음의 프라이머를 사용하여 증폭하였다. : 중쇄 primers, IGG2b : GGAAGATCTAGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG(서열번호 11), 5'MH2 : CTTCCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG(서열번호 12); Kappa chain primers, 3'Kc : GGTGCATGCGGATACAGTTGGTGCAGCATC(서열번호 13), 5'Mk : GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA(서열번호 14).
- [113] 표준 PCR 반응을 25사이클 실시하였다. PCR 생산물을 pGEM-T 이지 벡터(Promega)로 직접 라이게이션 하였다. 클로닝 된 마우스 Ig 삽입물을 DNA 염기서열 분석법으로 분석하였다.
- [114] 실시예 14:가변 절편(Fv)의 서열 분석 및 분자 모델링
- [115] m3F5H6의 면역글로불린 가변 도메인 서열은 IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)로 분석하였다(Ye J, Ma N, Madden TL, Ostell JM. IgBLAST: Nucleic Acids Res. 2013; 41(Web Server issue):W34-4027). 여섯

CDRs(complementarity determining regions)을 Kabat 넘버링(Kabat EA, Wu TT. J Immunol. 1991; 147(5):1709-1719)에 의하여 결정하였고, m3F5H6 mAb의 일부 골격(FR) 잔기들을 인간 VH1-Vk1 서브패밀리로 접목시켰으며, 이 경우에는 Samalizumab 골격, 마우스 및 인간화된 3F5H6 Fv 아미노산 서열의 3차원 구조를 web 모델링 프로그램, ROSIE을 사용하여 시뮬레이션하였다(Lyskov S, Chou FC, Conchuir SO, Der BS, Drew K, Kuroda D, Xu J, Weitzner BD, Renfrew PD, Sripakdeevong P, Borgo B, Havranek JJ, Kuhlman B, et al. PLoS One. 2013; 8(5):e63906). 이 프로그램은 중쇄 및 경쇄의 FRs 및 CDRs에 대한 대부분의 호모로고스 템플레이트를 동정하고 이 템플레이트 구조를 최적화된 모델로 조합한다.

[116] 실시에 15: 3F5H6인간화 항체 구축

[117] 비인간(마우스) 유래 항체의 CDRs 결정

[118] 인간화를 하기 위해서는 가장 먼저 항체의 CDRs을 결정하는 것이 필요하다.

CDRs을 결정하는 방법에는 아미노산 서열의 다양성을 기준으로 하는 Kabat numbering, 루프 지역의 구조를 기준으로 하는 Chothia numbering (Dunbar J, Krawczyk K, Leem J, Baker T, Fuchs A, Georges G, Shi J, Deane CM. Nucleic Acids Res. 2014; 42:D1140-1146), 가변 부위 구조의 높은 보존정도를 기준으로 하는 IMGT numbering (Lefranc MP. Nucleic Acids Res. 2001; 29(1):207-209) 등이 있는데, 가장 널리 사용되는 것이 Kabat numbering이다. Kabat numbering에 따라 박테리아-반응성 마우스 유래 항체의 CDRs을 결정하였다(도 8 참조).

[119] 인간화 항체 구축에 적합한 인간 항체 골격의 선정 및 야생형 항체의 CDR 부위 이식

[120] 인간 항체의 가변 부위는 아미노산 서열에 따라서 크게 중쇄는 7가지 subtype (VH1,VH2,VH3,VH4,VH5,VH6,VH7), 경쇄는 17가지 subtype ($\kappa 1, \kappa \kappa \kappa \kappa \kappa \lambda \lambda \lambda \lambda \lambda \lambda \lambda \lambda \lambda \lambda \lambda$ 로 나뉜다. 각각의 subtype은 아미노산 서열이 서로 다르기 때문에 생물리학적 구조가 다르고 그에 따라 안정성도 서로 다르며 이에 따라 자연적인 인간 항체 repertoire에서 사용되는 빈도 수도 다르다(Tiller T, Schuster I, Deppe D, Siegers K, Strohn R, Herrmann T, Berenquer M, Poujol D, Stehle J, Stark Y, et al. MAbs, 2013; 5(3):445-470).

[121] 일반적으로 CDR 이식법을 이용하여 인간화 항체를 제작할 때에는 최대한 CDR의 구조를 유지시키기 위해 야생형 비인간 유래 항체와 서열 상동성이 매우 높은 인간 골격으로 옮기게 되는데, 이 경우에 옮겨지는 인간화 항체의 subtype이 자연적으로 안정성이나 빈도 수가 낮은 subtype일 경우, 인간화 후에 안정성이 낮은 항체가 얻어질 수 있는 가능성이 있다.

[122] 박테리아-반응성 마우스 유래의 항체의 인간화에 적합한 인간 골격을 결정하기 위해 Igblast([URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/))를 통하여 기존 야생형 항체와 가장 서열 상동성이 높은 인간 항체 가변 부위의 subtype을 검색하였고, 그 결과 인간 항체의 VH1, Vk1 subtype과 가장 상동성이 높은 것을

확인하였다. 따라서 본 발명에서는 항원에 대한 친화도 및 그 기능은 유지하면서 안정성이 높은 인간화 항체를 구축하기 위해 VH1-Vk1 subtype의 인간 항체 골격에 항원 결합 부위를 이식하였다. VH1-Vk1 subtype은 치료용 항체 (Samalizumab)의 골격을 사용하였다(Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappaqari N, Cofield R, Faas SJ, Bowdish KS. J Immunol 2008; 180:699-705). 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄의 불변영역은 상업화된 치료용 항체 (Herceptin)의 골격을 사용하였다. Herceptin의 열역학적 안정성 및 발현 수율은 기존 연구 결과들에 의해 충분히 증명되어왔으며, 특히 다양한 마우스 항체의 인간화에 성공적으로 사용되어 왔다(Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C Carver ME, Shepard HM. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89(10):4285-4289; Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. Cancer Res. 1997; 57(20):4593-4599).

[123] 야생형 마우스 항체의 CDR 부위 이식 및 친화도의 유지를 위한 추가적인 보존 아미노산의 선정

[124] 앞서 언급하였듯이, 단순한 CDR 이식법에 의해 구축된 인간화 항체가 야생형 비인간 유래 항체와 비교하였을 때 그 기능이 감소하는 경우가 종종 발생하기 때문에, 기능의 상실을 우려하여 CDR 이식과 동시에 항체 골격에 위치하면서 CDR 루프 구조에 영향을 줄 수 있는 베르니에 구역에 위치하는 아미노산을 추가적으로 역치환한 클론(h3F5H6)으로 진행하였다. 베르니에 구역에 위치하는 아미노산은 가변 부위 내 총 30 개로 가변중쇄 부위에 16개, 가변경쇄 부위에 14개가 존재하며, 야생형 마우스 항체와 선정된 VH1-Vk1 인간 항체 골격 subtype간의 서열 분석을 통하여 전체 30개의 베르니에 구역의 아미노산 중 가변 중쇄 부위에 6개 (68,70,72,74,97,98), 가변 경쇄 부위에 4개 (36,49,69,71) 아미노산의 서열이 다름을 확인하였다 (도 11 참조). 특히, 가변 중쇄 부위 내 26-30번 4개 아미노산들은 문헌 상에서 CDR1과 CDR2 내 상호작용을 통한 canonical 구조의 유지에 중요한 역할을 한다(Foote J, Winter G. J Mol Biol. 1992; 224(2):487-499). 따라서 이식된 야생형 항체의 CDR의 구조를 안정화 시켜줄 것으로 예상되므로 기존 마우스 항체의 서열을 이용하는 것이 바람직하다. 중쇄 가변 부위 내 71번 아미노산 또한 마찬가지로 CDR1과 2의 배치를 결정하는 데 중요한 역할을 하는데, 이 위치에 부피가 큰 잔기를 가지는 아미노산 (리신 혹은 아르기닌) 혹은 작은 잔기를 가진 아미노산 (발린, 알라닌) 중 어떤 것이 오히려 CDR의 특성이 결정된다. 야생형 마우스 항체는 중쇄 내 74번에 리신을 가지고 있는데, 이는 인간 VH1 subtype 골격내 74번 글루타민과 반대의 특성을 가지고 있으므로 역치환 해주었고, 추가로 인간 VH1 subtype 중쇄 가변 부위 내 68, 70, 72번 아미노산을 야생형 마우스 항체의 아미노산 서열로 역치환 해주었다.

[125] 서열 분석을 위한 인간 VH1-Vk1 subtype의 염기 및 아미노산서열은 위 subtype의 골격을 가지고 있는 항체, Samalizumab의 것을 사용하였다.

- [126] 베르니에 구역 이외에도 안정성에 영향을 주는 VH/VL 인터페이스 아미노산은 그 잔기가 항체의 표면이 아닌 내부를 향하고 있어 가변 중쇄부위 및 경쇄 부위의 결합을 안정화시켜 항체 전체의 안정성에 영향을 주는 지역이고, 이러한 이유로 대부분의 항체가 동일한 아미노산 잔기로 이루어져 있다.
- [127] 먼저 아미노산 서열 분석을 통해 1차적으로 얻어진 후보 클론 및 야생형 마우스 항체의 가변 부위 서열을 모델링 온라인 서버 (URL : <http://rosie.rosettacommons.org/>; Lyskov S, Chou FC, Conchuir SO, Der BS, Drew K, Kuroda D, Xu J, Weitzner BD, Renfrew PD, Sripakdeevong P, Borgo B, Havranek JJ, Kuhlman B, et al. PLoS One. 2013; 8(5):e63906)내 항체 모델링 파트에 각각 입력하여 예측된 구조를 얻었다. 얻어진 각각의 구조는 CDR 루프의 구조적 변화를 관찰하기 위하여 단백질의 구조를 중첩시켰다. 중첩 구조 상에서 이식된 6개의 CDRs이 야생형 마우스 항체의 CDRs과 비교하였을 때 크게 벗어나지 않는 구조를 가짐을 확인하였고, 특히 항원 결합에 영향을 줄 수 있는 CDR 루프 내의 아미노산 잔기의 방향이 대부분 일치함을 확인하였다.
- [128] 실시예 16: 인간화된 박테리아-반응성 항체의 구축 및 발현
- [129] Intact IgG 포맷을 가지는 인간화된 IgG1 Ab를 얻기 위하여, VH 및 Vk 코딩 유전자를 5' 및 3' 말단 모두에 제한 효소 자리를 포함하게 합성하였다(Bioneer, Korea). 이 유전자들을 HEK 293F 세포에서 포유류 세포 발현을 위하여 인간 IgG1 고정 부위 (CH1-hinge-CH2-CH3) 또는 인간 카파 체인 고정 부위(CL)를 운반하는 변형된 pcDNA 3.4 발현 벡터(Invitrogen)에 삽입하였다. 인간화된 박테리아-반응성 항체를 HEK 293F 발현 시스템을 사용하여 생산하고 5-7일 배양 후 제조업자의 프로토콜에 따라 Protein A 친화 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 마우스 패런트 및 인간화된 항체를 SDS-PAGE 분석에 의하여 그것의 순도를 평가하였다.
- [130] 실시예 17: IgG 형태의 인간화 항체 유전자 제작
- [131] 설계된 인간화 항체의 염기 서열은 기본적으로 상업화된 고수율의 치료용 항체 Samalizumab의 염기서열을 따르되, 그와 다른 부분은 코돈의 사용빈도를 고려(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)하여 염기서열로 변환하고, 인간화 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 설계한다. 설계한 염기 서열은 5'과 3' 양쪽 말단에 동물세포 발현 벡터로의 클로닝을 위한 제한효소의 인식 서열을 도입하여 합성하였다(Bioneer, 한국).
- [132] 합성된 유전자는 Bioneer사에서 제공하는 기본벡터인 pBHA 벡터에 클로닝된 상태로 받을 수 있는데, 완전한 IgG 형태로의 발현을 위해 중쇄 불변영역, 경쇄 불변영역이 각각 들어가있는 동물발현벡터에 합성 시 도입하였던 제한효소 인식 서열을 이용하여 클로닝하였다. 이 때, 중쇄 및 경쇄의 불변영역의 아미노산 및 염기 서열은 상업화된 고수율의 치료용 항체 Herceptin의 염기서열을 따른다.

[133] 실시예 18: 항체의 발현 및 정제

- [134] 인간화된 박테리아-반응성 항체의 발현은 경쇄, 중쇄 발현 벡터와 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI) (Polyscience)의 혼합물을 HEK293-F(Invitrogen) 세포에 일시적 트랜스펙션(transient transfection)하여 무혈청 FreeStyle 293 발현 배지(Invitrogen)가 들어있는 진탕 플라스크에서 배양함으로써 이루어진다. 자세한 방법은 다음과 같다.
- [135] 진탕 플라스크(Corning)에 200 mL 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포를 2.0×10^6 세포/ml의 밀도로 배지 100 ml에 파종하여, 150 rpm, 8 % CO₂에서 배양하였다. 각각의 인간화 항체를 생산하기 위해 그에 따른 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 10 ml FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에 중쇄 125 μ g, 경쇄 125 μ g 총 250 μ g (2.5 μ g/ml)으로 희석하여, PEI 750 μ g (7.5 μ g/ml)을 희석한 10 ml의 배지와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다.
- [136] 그 후, 반응시킨 혼합배지를 앞서 100 ml로 파종한 세포에 넣어 4시간 동안 150 rpm, 8% CO₂에서 배양 후, 나머지 100 ml의 FreeStyle 293 발현 배지를 추가하여 짧게는 5일에서 길게는 7일 동안 배양하게 되면, 세포가 생산한 단백질 즉, IgG 형태의 인간화 항체는 세포에 의해 세포 바깥으로 분비되어 배지에 쌓이게 된다. 때문에 인간화 항체는 세포 배양 후 2500 rpm에서 20 분간 원심분리하여 채취한 세포 배양 상등액으로부터 단백질 A 세파로오스 컬럼 (protein A Sepharose column, GE healthcare)을 이용하여 정제하였다.
- [137] 이 때, 정제방법은 단백질 A 컬럼 회사에서 제공하는 표준 프로토콜을 참조하였으며, 정제된 단백질은 BCA protein assay kit (Thermo)내 용액을 이용하여 562 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 그려진 표준 곡선에 따라 그 양을 정량하였다. 정제된 항체의 크기 및 순도는 환원성 SDS-PAGE로 분석하였다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 박테리아-반응성 인간화 항체인 h3F5H6 IgG는 약 150 kDa의 분자량을 가지며, 99 % 이상의 순도로 정제됨을 확인하였다.

[138] 실시예 19: 박테리아의 형광 표지

- [139] OD₆₀₀ 0.5~0.6 (3×10^8 CFU)까지 성장한 *S. aureus* MW2를 모아서, 세척하고, 70% ethanol로 1시간 동안 고정하였다. 그 고정된 박테리아를 0.02 mM FITC (Sigma-Aldrich)로 0.1 M Na₂CO₃ buffer (pH 8.5)에서 상온에서 30분간 표지하고, 무혈청 HBSS로 세척한 후, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 및 0.4% BSA를 포함하는 HBSS로 재현탁하였다.

[140] 실시예 20: 인 비트로에서 식균작용 어세이

- [141] 마우스 대식세포주, RAW 264.7를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여, 그 세포를 10% FBS, 100 U/mL의 penicillin 및 100 μ g/mL streptomycin를 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 배양하였다.
- [142] RAW 264.7 세포 및 마우스 복막 세포를 poly-L-lysine (Sigma) 코팅된 커버 글래스 상에서 12웰 플레이트(Nunc, Roskilde, Denmark)에서 밤새 배양하였다.

FITC-표지 *S. aureus* MW2를 PBS 또는 항체로 1시간 배양 후, 그 박테리아를 12 웰 플레이트에 첨가하고 1시간 배양 후, 그 세포를 4% paraformaldehyde (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)로 고정하고, PBS로 세척 후, Hoechst No. 33258 (Sigma-Aldrich)로 상온에서 핵을 동정하기 위하여 염색하였다. 그 마운팅된 세포를 LSM 710 laser scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 분석하였다. 식균작용 지수를 전에 기재된 것(Sun, R., L. Qiu, F. Yue, L. Wang, R. Liu, Z. Zhou, H. Zhang, and L. Song. 2013. *Fish Shellfish Immunol* 34: 38-45)과 같이, RAW 264.7 세포 및 마우스 복막 세포에서 식균된 FITC-표지된 *S. aureus* MW2의 수를 카운팅하여서 측정하였다.

[143] 실시예 21:마우스 복강에서 *S. aureus* MW2의 섭취

[144] 마우스 복강에서 식균작용에 대한 항체의 영향을 결정하기 위하여, 그 마우스에 i.p.로 FITC-labeled *S. aureus* MW2를 주사하고 1시간 후, 복막 세포를 모아서 특정 세포 마커들; anti-F4/80, CD11b, CD11c, 및 Gr-1 항체로 염색하였다. 복강 내 대식세포, 수지상 세포, 및 호중구의 식균작용을 FACSCanto™ II (Becton Dickinson)로 FACS 분석에 의하여 측정하였다.

[145] 실시예 22:인 비보에서 *S. aureus* MW2 감염에 대한 항체의 효과 분석

[146] BABL/c 마우스에 i.v.로 1.5×10^7 CFU의 *S. aureus* MW2를 주사한 후 정상 마우스 IgG, 단클론 항체 (m3F5H6), 정상 인간 IgG, 인간화된 항체 (h3F5H6)((25 mg/kg mouse)를 정맥내 주사하였다. 정상 마우스 IgG는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하였다. 항체 주사 후, 7 일(*S. aureus* MW2) 후의 생존률을 모니터하였다. *S. aureus* MW2 또는 감염 2일 후, 그 마우스를 희생하고, 기재된 조직들을 제거한 후 *S. aureus* MW2의 CFU 및 조직병리를 모니터하였다.

[147] 실시예 23:인 비보에서 *S. aureus* MW2 감염에 대한 보체가 제거된 마우스에서 항체의 효과 분석

[148] BABL/c 마우스에 i.p.로 cobra venom factor (CVF, 30 µg/mouse, Quidel, San Diego, CA, USA) 를 투여하고 6시간 후에 i.v.로 1×10^7 CFU의 *S. aureus* MW2를 주사한 후 인간화된 항체 (h3F5H6)((25 mg/kg mouse)를 정맥내 주사 후에 생존률을 모니터하였다.

[149] 실시예 23:인 비보에서 *E. coli* K1 감염에 대한 보체가 제거된 마우스에서 CpG-DNA의 효과 분석

[150] BABL/c 마우스에 i.p.로 CpG-DNA (50 µg/마우스)를 주사 한 후, 7일 후에 마우스에 i.p.로 CVF (30 µg/mouse) 를 투여하고 6시간 후에 혈청에서 보체 (C₃)의 양을 ELISA kit (Complement C3 mouse ELISA kit, Abcam, Cat. No. ab-157711)로 확인하였다. BABL/c 마우스에 i.p.로 CpG-DNA (50 µg/마우스)를 주사 한 후, 7일 후에 마우스에 i.p.로 CVF (30 µg/mouse) 를 투여하고 6시간 후에 5×10^6 CFU의 *E. coli* K1을 주사하였다. 주사된 마우스를 2일간 사망률 또는 회복을 관찰하였다.

[151] 실시예 24:인 비보에서 *E. coli* K1 감염에 대한 항체의 효과 분석

- [152] BABL/c 마우스에 i.p.로 5×10^6 CFU의 *E. coli* K1을 주사한 후, 정상 인간 IgG, 인간화된 항체 (h3F5H6)((25 mg/kg mouse)를 정맥내 주사하였다. 정상 마우스 IgG는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하였다. 항체 주사 후, 18 시간(*E. coli* K1) 후의 생존률을 모니터하였다.
- [153]
- [154] 상기의 실시예의 결과를 하기에서 상술한다.
- [155] CpG-DNA의 투여는 *S. aureus* MW2로 감염 후 조직에서 박테리아 제거를 촉진하고 마우스의 생존을 증가시킨다
- [156] 본 발명자들은 *S. aureus* MW2의 감염에 대한 항균 효과를 증명하기 위한 동물 모델로 선택하였고, 도 1A에 기재된 방법에 따라 실험을 수행하였다. 먼저 BALB/c 마우스에 복강내(i.p.) CpG-DNA 1826을 투여하고 7일 후, 그 마우스에 정맥내(i.v.) *S. aureus* MW2를 주사한 후, 생존률을 7일간 모니터하였다. 아무런 처리를 하지 않은 *S. aureus* MW2-주사된 마우스와 비교하여, 박테리아 감염 전에 CpG-DNA로 전처리된 마우스의 생존률은 60%까지(도 1B) 증가하였다.
- [157] 특정 조직에서 박테리아 감염의 평가를 위하여, 간, 폐, 신장 및 지라를 *S. aureus* MW2의 정맥내 주사 2일 후에 잘라내어서 그 조직을 균질화하고, 그 균질체를 아가 배지에서 배양하여 제거하여 CFU를 카운트하였다. 모든 테스트된 조직들은 박테리아에 의하여 감염되었고, 신장에서 최대 CFU를 가졌으며, 조직들에서 박테리아 로드는 CpG-DNA 1826의 전처리에 의하여 모두 감소하였다(도 1C).
- [158] 다음, 각 조직의 조직병리를 관찰하였다. 박테리아 감염 후 마우스의 신장에서 농양(abscess) 부위가 나타났으나, 그것은 감염 전에 CpG-DNA 1826로 전처리한 경우에 검출되지 않았다(도 1D). 따라서 본 발명자들은 마우스에 CpG-DNA의 전처리는 *S. aureus* MW2 감염 후 박테리아 제거를 촉진하고 생존률을 증가한다고 결론을 내렸다.
- [159] CpG-DNA 투여는 *S. aureus* MW2의 감염 후 골수, 지라, 복강의 세포군을 조절하고 보호한다
- [160] *S. aureus* MW2 감염에 대한 보호 효과와 관련된 기작을 조사하기 위하여, 본 발명자는 실험계획에 따라 BALB/c 마우스 유래 복강, 지라, 골수에서 FACS로 세포군을 분석하였다(도 1A). lymphoid 세포 (B 및 T 세포) 및 Myeloid 세포 (대식 세포, 수지상 세포, 및 호중구)의 군들은 여러 다른 조직에서 CpG-DNA 투여 및 *S. aureus* MW2 감염에 의하여 차별적으로 변하였다(도 2).
- [161] 복강에서 myeloid 세포 및 lymphoid 세포의 군 비율은 CpG-DNA에 의하여 역전되었다(도 2A). myeloid 세포군은 CpG-DNA 투여에 의하여 감소한 반면(PBS 대조군의 61%), 복강의 lymphoid 세포의 군은 CpG-DNA에 의하여 증가하였다(PBS 대조군의 160%). myeloid 세포의 주요군은 F4/80 +CD11b + 대식세포이었다. 비록 F4/80 -CD11c + 수지상 세포군은 매우 작지만, 그것은 CpG-DNA 투여에 의하여 증가하였다(PBS control의 3배). lymphoid 세포의 경우,

CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 T 세포군의 증가는 현저하였고(PBS 대조군의 4.6배), 총 B 세포군은 유사하였다.

- [162] 본 발명자들이 B 세포군을 상세하게 분석할 때, CpG-DNA에 의하여 B1 (CD23⁻) 세포군은 감소하였고, B2 (CD23⁺) 세포군은 약간 증가하였다. *S. aureus* MW2를 감염시켰을 때, 호중구를 제외한 모든 세포군이 감소하였고, CpG-DNA의 전처리는 비록 세포군 크기는 비처리 대조군에 비하여 작지만 세포군을 현저하게 회복시켰다(도 2A).
- [163] 골수에서, CpG-DNA에 의하여 myeloid 세포군은 증가하였고(PBS 대조군의 150%) lymphoid 군은 감소하였다(PBS 대조군의 65%)(도 2B). myeloid 세포의 주요 군은 F4/80⁺ Gr-1⁺ 호중구이었다. lymphoid 세포의 주요군은 B 세포, 특히 B1 세포이었다. 복강과 다르게, B-1 및 B-2 세포 군의 비율은 CpG-DNA에 의하여 변화되지 않았다. *S. aureus* MW2 감염은 모든 군의 현저한 감소를 유도하였고 CpG-DNA로 전처리에 의하여 그 감소는 역전되었다(도 2B).
- [164] 지라에서, CpG-DNA 투여에 의하여 유도된 세포군의 현저한 변화는 없었다(도 2C). *S. aureus* MW2를 감염시킬 때, lymphoid 세포군의 감소가 관찰되었다(PBS 대조군의 60%). CpG-DNA를 박테리아 감염 전에 전처리할 때, 세포군은 PBS 대조군보다 더 커졌다. *S. aureus* MW2 감염 단독만 비교하여, CpG-DNA로 전처리는 lymphoid 및 myeloid 세포군 모두를 2배 이상 증가시켰다(도 2C).
- [165] 이 결과들에 기초하여, 본 발명자들은 *S. aureus* MW2의 감염은 복강, 골수 및 지라에서 전체 세포수의 감소를 유도하였고, CpG-DNA로 마우스의 전처리는 이들 조직에서 면역 세포를 보호한다는 결론을 얻었다. 이 현상은 조직들에서 유도된 세포수는 감염된 마우스의 생존률을 증가한다는 것을 시사한다. 가장 중요하게, CpG-DNA는 B2 세포, T 세포, 및 대식세포와 같은 적응성 면역 세포를 증가시키는 방향으로 복강 세포의 군을 변화시켰다(도 2A). 따라서 본 발명자들은 복강 세포는 본 실험 시스템에서, CpG-DNA의 항균 효과와 관련된 주요 조절자라고 생각한다.
- [166] 인 비보 및 인 비트로에서 CpG-DNA 투여에 의한 박테리아-반응성 항체의 유도
- [167] 본 발명자들은 CpG-DNA 1826을 i.p.로 주사하고 항체의 생성을 확인하기 위하여 여러 시간에서 복강 및 혈청의 상등액을 분석하였다. Non-CpG-DNA 2041을 음성 대조군으로 사용하였다. 총 IgG의 레벨은 CpG-DNA 1826의 투여 후 3일 및 7일에서 복강 상등액에서 현저하게 증가하였으나, 혈청에서는 의미있는 변화가 없었다(도 3).
- [168] CpG-DNA의 투여가 *S. aureus* MW2 감염된 마우스의 생존률을 증가한다면, 일부 박테리아-반응성 항체가 복강에서 CpG-DNA 1826에 의하여 유도될 수 있을 것 같다. 본 발명자들은 CpG-DNA 1826의 투여 및 *S. aureus* MW2의 정맥내 주사 후에 마우스로부터 복강 상등액 및 혈청을 모았고(도 1A), *S. aureus* MW2에 반응하는 전체 IgG 및 IgG isotypes의 레벨을 *S. aureus* MW2로 코팅된 플레이트를 사용하여 측정하였다. CpG-DNA 단독은 복강에서 반응성 총 IgG의 증가를

유도하였으나, 혈청에서는 현저한 변화가 없었다. *S. aureus* MW2의 감염은 복강 및 혈청에서 반응성 IgG의 생성을 감소시켰다. 그러나, CpG-DNA 1826의 박테리아 감염전에 사전-투여는 반응성 IgG의 증가된 생성을 현저하게 유도하였다. IgG3 isotype는 모든 경우에서 가장 풍부하였고 *S. aureus* MW2-반응성 IgG3 isotype은 CpG-DNA-처리된 군에서 현저하게 증가하였다(도 4A, B).

- [169] 마우스에서 CpG-DNA에 의하여 유도되는 항체를 더 조사하기 위하여, PBS 또는 CpG-DNA 1826를 i.p.로 주사하고 7일 후 복강 상등액 및 혈청을 분석하였다. CpG-DNA-유도된 IgG가 여러 종의 Gram-positive 양성 박테리아에 결합할 수 있는지를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 ELISA 어세이를 *S. aureus*, *S. aureus* MW2, *S. epidermidis*, 또는 *S. pyogenes*.로 코팅된 플레이트를 사용하여 수행하였다.
- [170] 각 박테리아-반응성 IgG의 레벨은 복강 및 혈청에서 CpG-DNA 1826의 처리에 의하여 증가하였다(도 4C, D). CpG-DNA의 처리가 박테리아-반응성 항체를 생산하는 TLR9 신호전달을 활성화하는지를 조사하기 위하여, BALB/c TLR9 -/- 마우스를 사용하여 동일한 실험을 수행하였다. TLR9-/- 마우스의 복강 및 혈청에서, CpG-DNA 1826의 처리에 의하여 유도된 박테리아-반응성 항체들의 현저한 변화가 없었다(도 4E, F). 따라서 본 발명자들은 CpG-DNA가 박테리아-반응성 항체들의 생성을 TLR9를 통하여 유도한다는 결론을 얻었다.
- [171] 박테리아-반응성 항체의 생성이 인 비트로에서 CpG-DNA에 의하여 유도되는지를 결정하기 위하여, 복강의 면역 세포를 마우스로부터 모아서, 인 비트로에서 CpG-DNA 1826 및 non-CpG-DNA 2041로 자극한 후, 세포 배양 상등액을 항체들의 양을 측정하기 위하여 분석하였다. 도 5A에서 알 수 있는 바와 같이, 일반적인 IgG 생산이 PBS 또는 non-CpG-DNA와 비교하여 CpG-DNA에 대하여 현저하게 증가하였다. 마우스를 먼저 인 비보에서 CpG-DNA로 프라이밍한 후 복강 세포를 인 비트로에서 자극할 때, 기본 IgG 생성이 대조군보다 높았으나, CpG-DNA 처리의 추가적인 효과는 매우 약하였다(도 5A). *in vitro* 배양된 복막 세포로부터 분비된 항체의 결합력을 결정하기 위하여, 본 발명자들은 네 그람-양성균 종들로 박테리아-반응성 IgG의 양을 측정하였다. 박테리아-반응성 IgG의 생성은 CpG-DNA에 대하여 현저하게 증가하였으나, PBS 또는 non-CpG-DNA에 대해서는 반응성 항체가 거의 발견되지 않았다(도 5B).
- [172] B 세포가 박테리아-반응성 항체를 CpG-DNA에 반응하여 분비하는지를 조사하기 위하여, CpG-DNA 1826를 마우스에 i.p.로 주사하고 9일 후 마우스 복강의 면역 세포를 모아서, 복막 림프구로부터 CD23-CD19+ B 세포 (B1 세포) 및 CD23+CD19+ (B2 세포)를 소팅하였고(도 5C), CpG-DNA 1826로 인 비트로에서 그 세포를 자극하였다. B1 및 B2 세포 모두 IgG의 증가된 양을 CpG-DNA 자극에 대하여 분비하였다(도 5D). 그러나, 인 비트로에서 B 세포에

의한 IgG 생성의 레벨은 복강 세포의 분리 전에 CpG-DNA로 마우스를 전처리할 때 감소하였고, CpG-DNA에 의하여 B 세포 활성화의 조절을 시사한다(도 5D).

- [173] 그람-양성균-코팅된 플레이트를 사용하여 측정된 그람-양성균-코팅된 플레이트를 사용하여 측정된 각 박테리아-반응성 IgG의 레벨은 박테리아-반응성 IgG의 생성이 인 비트로에서 CpG-DNA 자극에 의하여 증가하고 인 비보에서 CpG-DNA으로 프라이밍은 항체-생성 활성을 조절한다는 것을 시사한다(도 5E). 이들 결과는 CpG-DNA-유도된 박테리아-반응성 항체는 CpG-DNA에 반응하여 복강의 B1 및 B2 세포 모두에서 생산하는 것을 시사한다.

- [174] CpG-DNA에 의하여 유도된 복강 내 박테리아-반응성 항체는 식균작용을 촉진함

- [175] 본 발명자들은 CpG-DNA에 의하여 유도된 복강내 박테리아-반응성 항체가 식균작용을 촉진하여 박테리아 감염에 저항할 수 있는지를 조사하였다. 본 발명자들은 PBS-주사된 마우스의 복강 상등액에서 다클론 항체를 정제하였다(도 6A). 복강 용액을 CpG-DNA 1826로 주사하고 7일 후에 마우스로부터 얻어서 다클론 항체를 정제하였다(도 6B). 복강 내 IgG의 양은 CpG-DNA 1826 투여에 의하여 PBS 대조군과 비교하여 약 2.5배 증가하였다($7.5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 대 $3 \mu\text{g}/\text{mouse}$). *S. aureus* MW2에 대한 항체의 결합력을 ELISA로 측정하였다. 그 결과들은 CpG-DNA 1826 투여에 의해 유도된 항체는 PBS-주사된 마우스 유래에 비하여 *S. aureus* MW2에 대한 더 높은 결합력을 가진다는 것을 나타내었다(도 6C).

- [176] 다음 본 발명자들은 식균작용과 관련한 이들 항체의 효과를 결정하였다. FITC-표지된 *S. aureus* MW2를 정제된 항체와 배양 후 식균작용 어세이를 공초점 현미경으로 마우스 대식세포주 RAW 264.7에서 수행하였다(도 6D, E). 식균작용 지수는 항체에 의하여 증가되었고, CpG-DNA 1826-주사된 복강 유래 항체들은 PBS-주사된 대조군 유래에 비하여 더 효과적이었다(1.19 배).

- [177] 박테리아-반응성 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 클론의 선택 및 식균작용에 대한 그 단클론 항체의 항균 효과

- [178] 본 발명자들은 CpG-DNA에 의하여 유도된 활성화된 B 세포 클론은 항균 항체를 분비하고 그 항체들은 복강에서 대식 세포, 수지상 세포 및 호중구를 통하여 식균작용을 촉진한다는 것을 제안하였다.

- [179] CpG-DNA-유도된 박테리아-반응성 항체를 분비하는 B 세포 클론을 구축하기 위하여, 마우스에 i.p.로 CpG-DNA 1826를 주사하고, 7일 후, 복막 세포를 모아서 SP2/0 myeloma 세포와 융합하였다. 본 발명자들은 *S. aureus* MW2에 대하여 반응하는 단클론 항체를 분비하는 하이브리도마 클론을 분리하고 m3F5H6이라 명명하였다(도 7).

- [180] 박테리아-반응성 단클론 항체의 가변 도메인의 클로닝

- [181] 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(V_H 및 V_L)을 코딩하는 cDNA 서열을 통상적인 중쇄 및 경쇄 프라이머를 사용하여 박테리아-반응성 단클론 항체를 생산하는

하이브리도마 세포(m3F5H6)로부터 클로닝하였다. DNA 시퀀싱에 의하여 확인된 서열들을 도 8에 나타내었다. 그 서열들을 IgBLAST 프로그램을 사용하여 공지된 서열과 호모로지를 분석하였다(Ye J, Ma N, Madden TL, Ostell JM. IgBLAST: Nucleic Acids Res. 2013; 41(Web Server issue):W34-40).

- [182] 단클론 항체 (m3F5H6 IgG)를 m3F5H6 클론-주사된 복수로부터 정제하고 SDS-PAGE로 분석하였다(도 9A). 3F5H6 IgG의 아이소타입 IgG2b이었고(도 9B), 그람 양성균에 대한 m3F5H6 IgG의 결합력을 ELISA로 확인하였다(도 9C).
- [183] m3F5H6 IgG의 RAW 264.7 세포의 식균작용에 대한 효과를 조사하기 위하여, 식균작용 어세이를 FITC-표지된 *S. aureus* MW2를 사용하여 PBS, 마우스 정상 IgG 또는 m3F5H6 IgG로 배양한 후 수행하였다(도 9D, E). 본 발명자들은 마우스 복강 세포의 식균작용에 대한 m3F5H6 IgG의 효과도 조사하였다(도 9F, G). 이 결과들은 m3F5H6 IgG가 RAW264.7 세포 및 마우스 복강 세포가 마우스 정상 IgG에 비하여 *S. aureus* MW2를 결합하는 활성을 증가시킨다는 것을 시사한다(1.5 ~ 1.8 배).
- [184] 마우스 복강에서 식균작용에 대한 m3F5H6 IgG의 효과를 직접적으로 조사하기 위하여, 마우스에 i.p.로 m3F5H6 IgG를 FITC-표지된 *S. aureus* MW2 세포로 전처리한 후 주사하였다. 그 다음에 대식세포, 수지상 세포 및 호중구와 같은 식균성 면역 세포의 효과를 확인하기 위하여 유세포분석법에 의하여 복강 세포를 분석하였다(도 9H). 정상 IgG 대조군과 비교하여, m3F5H6 IgG가 복강에서 대식세포 및 수지상 세포의 식균작용을 더 효과적으로 증가시켰다. 그러나 호중구의 식균작용에는 효과가 없었다. 이 결과는 m3F5H6 IgG가 마우스 복막 세포에서 더 효과적인 식균작용 매개자이고, 식균성 면역세포가 CpG-DNA에 의해 유도된 항체의 항균 효과와 관련될 수 있다는 것을 시사한다.
- [185] 단클론 항체 (m3F5H6 IgG) 의 박테리아-반응성
- [186] 단클론 항체 (m3F5H6 IgG)의 그람 양성균에 대한 결합력을 ELISA로 확인하였다(도 9C). 또한 단클론 항체 (m3F5H6 IgG) 의 그람 음성균 (도 10A). 및 세포내기생세균(도 10B) 에 대한 결합력을 ELISA로 확인하였다.
- [187] CpG-DNA 자극된 복막 B 세포 유래 박테리아-반응성 단클론 항체 (m3F5H6 IgG)가 *S. aureus* MW2의 감염에 대한 치료효과를 가진
- [188] m3F5H6 IgG의 마우스에서 *S. aureus* MW2의 감염에 대한 항균 효과를 입증하기 위하여, BALB/c 마우스를 *S. aureus* MW2로 감염시킨 후, PBS, 정상 IgG, 및 m3F5H6 IgG를 투여한 후 사망률, 조직 내 감염 및 조직병리를 실험 스케줄에 따라 관찰하였다(도 11A). 항체없이 *S. aureus* MW2로 감염된 모든 마우스는 감염 5일 후 사망하였으나, 30%의 정상 IgG 주사된 마우스 및 70%의 m3F5H6 IgG 주사된 마우스는 감염 후 7일까지 생존하였다(도 11B).
- [189] 특정 조직에서 *S. aureus* MW2의 감염을 조사하기 위하여, 간, 폐, 신장 및 지라를 감염 2일 후에 얻어서 CFU 어세이를 수행하였다. 본 발명자들은 조직, 특히 신장에서 m3F5H6 IgG의 투여에 의한 박테리아 로드가 감소한 것을

- 관찰하였다(도 11C). 조직들의 조직병리를 감염 2일 후 모니터하였다. 박테리아 버든은 신장에서만 발견되었고, *S. aureus* MW2 주사된 마우스와 비교하여 항체 주사된 마우스에서는 박테리아 버든(burden)이 현저히 적게 검출되었다(도 11D).
- [190] *S. aureus* MW2의 감염 30일 후에, 본 발명자들은 간, 폐, 신장 및 지라의 조직병리를 조사하였다. 박테리아 버든이나 많은 염증성 면역 세포가 항체-주사된 마우스의 신장에서는 검출되지 않았다(도 11E). 종합하면, 본 발명자들은 CpG-DNA-유도된 항체의 투여가 증가된 생존률을 유도하였고, 정상 IgG에 비하여 *S. aureus* MW2-주사된 마우스에서 더 높은 박테리아 제거의 효과를 유도한다는 것을 확인하였다.
- [191] 박테리아-반응성 인간화된 항체의 생산 및 특성
- [192] 임상에 단클론 항체의 적용을 위해서 그 항체들을 인간에서 면역원성을 감소시키는 인간화 작업을 수행하여야 한다. 따라서 본 발명자들은 얻어진 단클론 항체 m3F5H6의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 IgBLAST program (Ye J, Ma N, Madden TL, Ostell JM. IgBLAST: Nucleic Acids Res. 2013; 41(Web Server issue):W34-40)을 사용하여 분석하고 그 가변 도메인 서브타입이 마우스 VH1-Vk1에 속한다는 것을 발견하였다. m3F5H6 mAb의 인간화를 위하여, 본 발명자들은 VH1-Vk1 골격을 이 골격이 가장 공통적으로 인간 생식 계열(germ line) 레퍼토리에서 관찰된다는 사실(Caravella JA, Wang D, Glaser SM, Lugovskoy A. Curr Comput Aided Drug Des. 2010; 6(2):128-138)을 참고하여 선택하였다. 본 발명자들은 인간 VH1-Vk1 골격에 일부 골격 서열이 경우에는 Samalizumab 골격과 CDR 부위를 통상적으로 확립된 방법으로 접목하였다(Kabat EA, Wu TT. J Immunol. 1991; 147(5):1709-1719). m3F5H6 및 인간화된 단클론 항체 (h3F5H6) 유래 구조들을 모델화하고 비교하였고, 그들은 서로 동일하지 않지만 유사하다는 것을 나타내었다(도 12).
- [193] 본 발명자들은 재조합 인간화된 단클론 항체 (h3F5H6)를 HEK 293F 세포를 사용하여 생산하였고(도 13) 그것의 반응성을 평가하였다(도 14, 도 15). 그 인간화된 항체는 ELISA에 기반하여 Gram(+) 박테리아 (*S. aureus*, *S. aureus* MW2, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*) 와 Gram(-) 박테리아 (*A. baumannii*, *E. coli* K1, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* 11418, *K. pneumoniae* 40145, *K. pneumoniae* 41293) (도 14) 및 세포내 기생세균(*L. monocytogenes*, *S. typhimurium*) (도 15) 에 대해서는 특이적으로 반응함을 확인하였다.
- [194] 박테리아-반응성 인간화된 항체 (h3F5H6 IgG)는 *S. aureus* MW2 의 감염에 대한 치료 효과를 가진
- [195] 마우스에서 *S. aureus* MW2의 감염에 대한 h3F5H6 IgG의 항균 효과를 입증하기 위하여, BALB/c 마우스를 *S. aureus* MW2로 감염시킨 후, i.v.로 PBS, 정상 인간 IgG, 및 h3F5H6 IgG를 투여하고 사망률 및 조직병리를 실험 스케줄에 따라 관찰하였다(도 16A).
- [196] *S. aureus* MW2를 감염시킨 항체를 투여하지 않은 모든 마우스는 5일 후 모두

죽었지만, 10%의 정상 IgG 주사된 마우스와 30%의 h3F5H6 IgG 주사된 마우스는 감염 후 7일까지 생존하였다(도 16B). 조직들의 조직병리를 감염 후 2일에 모니터하였다. 항체 주사된 마우스가 *S. aureus* MW2만 주사된 마우스에 비교하여 박테리아 부하(burdens)는 신장에서만 발견되었고, 더 작은 박테리아 부하가 발견되었다(도 16C).

- [197] BALB/c 마우스에 i.p.로 cobra venom factor (CVF, 30 µg/mouse) 를 투여하고 6시간 후에 i.v.로 1×10^7 CFU의 *S. aureus* MW2를 주사한 후 인간화된 항체 (h3F5H6)((25 mg/kg mouse)를 정맥내 주사 후에 생존률을 모니터하였다. *S. aureus* MW2를 감염시킨 CVF를 투여하고 항체를 투여하지 않은 모든 마우스는 4일 후 모두 죽었지만, 20%의 h3F5H6 IgG 주사된 마우스는 감염 후 7일까지 생존하였다(도 17). 보체-비의존적으로 h3F5H6 IgG 항체가 *S. aureus* MW2 감염을 억제하는 것을 보여주었다.
- [198] CpG-DNA의 투여는 *E. coli* K1으로 감염 후 조직에서 박테리아 제거를 촉진하고 마우스의 생존을 증가시킨다
- [199] 본 발명자들은 *E. coli* K1의 감염에 대한 항균 효과를 증명하기 위한 동물 모델로 선택하였고, 도 18A에 기재된 방법에 따라 실험을 수행하였다. 먼저 BALB/c 마우스에 복강내(i.p.) CpG-DNA 1826을 투여하고 7일 후, 그 마우스에 복강내(i.p.) *E. coli* K1를 주사한 후, 생존률을 2일간 모니터하였다. 아무런 처리를 하지 않은 *E. coli* K1-주사된 마우스와 비교하여, 박테리아 감염 전에 CpG-DNA로 전처리된 마우스의 생존률은 100%까지(도 18B) 증가하였다.
- [200] 특정 조직에서 박테리아 감염의 평가를 위하여, 간, 폐, 신장 및 지라를 *E. coli* K1의 i.p. 주사 1일 후에 잘라내어서 그 조직을 균질화하고, 그 균질체를 아가 배지에서 배양하여 제거하여 CFU를 카운트하였다. 모든 테스트된 조직들 및 혈액과 복강에 박테리아에 의하여 감염되었으며, 조직들에서 박테리아 로드는 CpG-DNA 1826의 전처리에 의하여 모두 감소하였다(도 18C).
- [201] 다음, 각 조직의 조직병리를 관찰하였다. 박테리아 감염 후 마우스의 조직에서 농양(abscess) 부위는 검출되지 않았다(도 18D). 따라서 본 발명자들은 마우스에 CpG-DNA의 전처리는 *E. coli* K1 감염 후 박테리아 제거를 촉진하고 생존률을 증가한다고 결론을 내렸다.
- [202] 마우스에서 *E. coli* K1의 감염에 대한 CpG-DNA의 항균 효과가 보체-비의존적임을 입증하기 위하여, BALB/c 마우스에 복강내(i.p.) CpG-DNA 1826을 투여하고 7일 후, 그 마우스에 복강내(i.p.) CVF를 주사한 후, 혈청내 보체(C₃)의 양을 측정하였다(도 19A). CVF 투여후에 혈청에 보체가 모두 감소함을 확인하였다 (도 19B). CpG-DNA 1826을 투여하고 7일 후, 그 마우스에 복강내(i.p.) CVF를 주사한 후, 6시간 후에 *E. coli* K1을 i.p.로 감염시켰다 (도 19C). 박테리아 감염 전에 CpG-DNA로 전처리된 마우스의 생존률은 20%까지(도 19D) 증가하였다. 따라서 본 발명자들은 마우스에 CpG-DNA의 전처리는 *E. coli* K1 감염 후 보체-비의존적으로 박테리아 제거를 촉진하고 생존률을 증가한다고

결론을 내렸다.

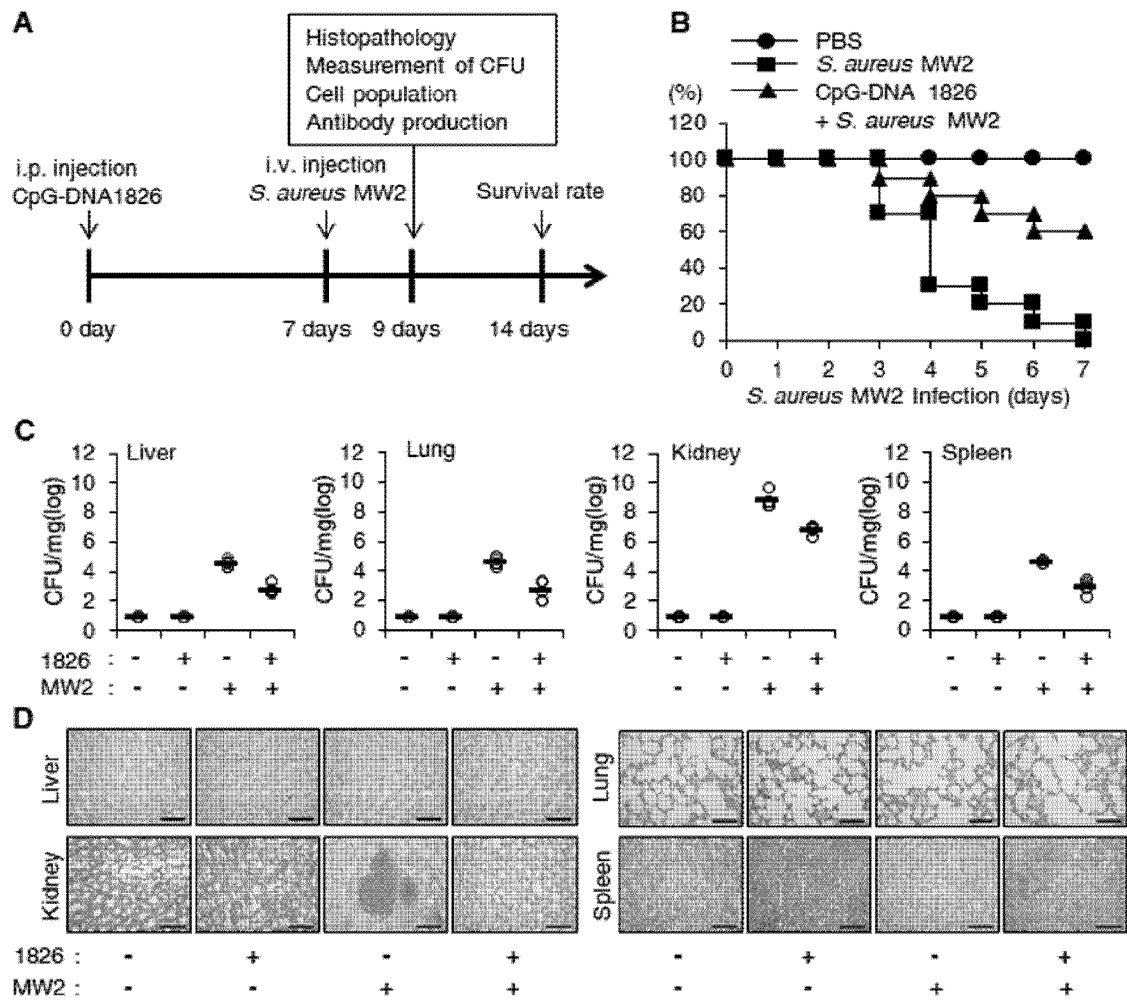
- [203] 박테리아-반응성 인간화된 항체 (h3F5H6 IgG)는 *E. coli* K1의 감염에 대한 치료 효과를 가짐
- [204] 마우스에서 *E. coli* K1의 감염에 대한 h3F5H6 IgG의 항균 효과를 입증하기 위하여, BALB/c 마우스 마우스에 i.p.로 *E. coli* K1로 감염시킨 후, i.v.로 PBS, 정상 인간 IgG, 및 h3F5H6 IgG를 투여하고 사망률을 관찰하였다. 인간화된 박테리아-반응성 항체 (h3F5H6 IgG)의 투여도 정상 IgG 보다 *E. coli* K1-감염된 마우스에서 더 높은 박테리아 제거와 생존률이 증가한다는 것을 확인하였다(도 20)

청구범위

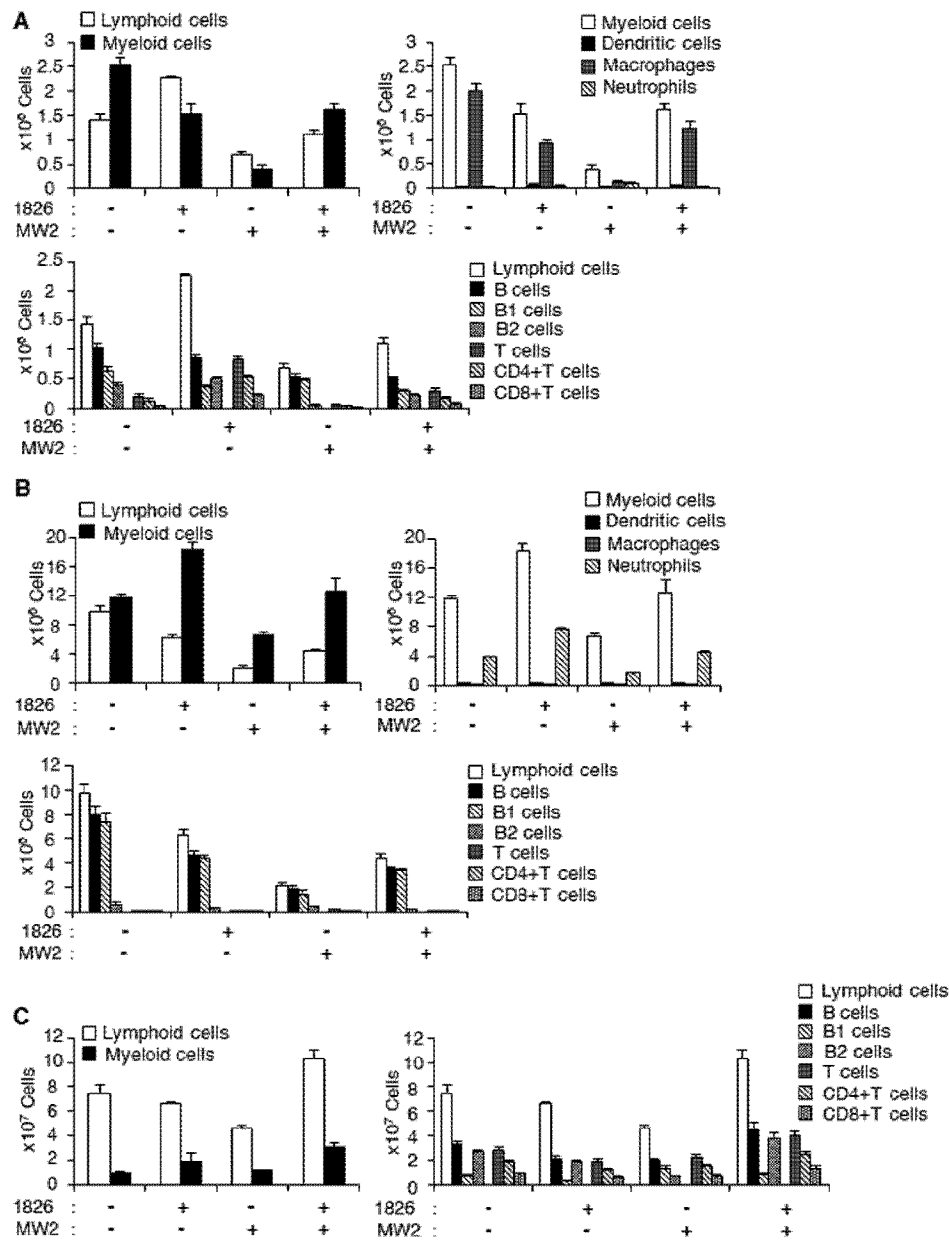
- [청구항 1] CpG-DNA에 의하여 생산된 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편에 있어서, 상기 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편은 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편:
서열번호 1로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 단클론 항체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 기능적 단편은 단일 측쇄 항체(scFv)인 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 기능적 단편은 항원결합 분절(Fab)인 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 기능적 단편은 제1항의 CDR부위를 포함하는 경쇄 또는 중쇄인 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 기능적 단편은 제1항의 CDR부위를 포함하는 가변 도메인(Variable domain)인 것을 특징으로 하는 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 단클론 항체는 서열번호 7 또는 서열번호 15로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8 또는 서열번호 16으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄인 것을 특징으로 하는 단클론 항체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 CpG-DNA는 서열번호 9로 기재되는 염기 서열인 것을 특징으로 하는 단클론 항체.
- [청구항 8] 제1항의 단클론 항체 또는 그 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 조성물은 그람 양성균, 그람 음성균, 세포내 기생균 또는 약제 내성균에 대해 항균활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 조성물은 메치실린-내성 황색 포도상 구균(MRSA), 포도상구균, 리스테리아, 살모넬라 또는 대장균에 대한 항균활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 11] CpG-DNA에 의하여 생산된 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편을 포함하는 항균용 조성물.
- [청구항 12] 제 11항에 있어서,
상기 단클론 항체, 또는 그 기능적 단편은 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:
서열번호 1로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR2 영역 및

- 서열번호 3으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4로 기재되는 CDR1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 단클론 항체.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 단클론 항체는 서열번호 7 또는 서열번호 15로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 8 또는 서열번호 16으로 기재되는 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 조성물은 메치실린-내성 황색 포도상구균(MRSA), 포도상구균, 리스테리아, 살모넬라 또는 대장균에 대한 항균활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 15] CpG-DNA를 동물에 투여하여 메치실린-내성 황색 포도상구균(MRSA), 포도상구균, 리스테리아, 살모넬라 또는 대장균에 대한 항균활성을 가지는 항체를 생산하는 방법.

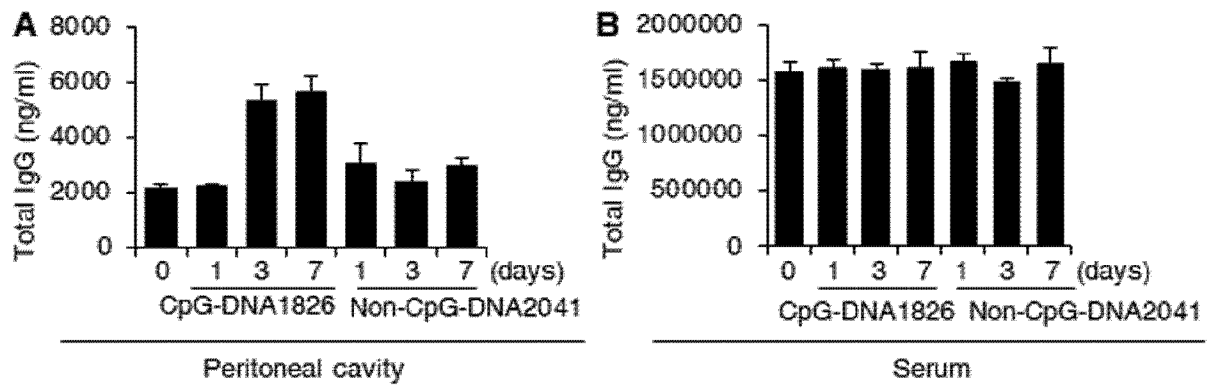
[도1]



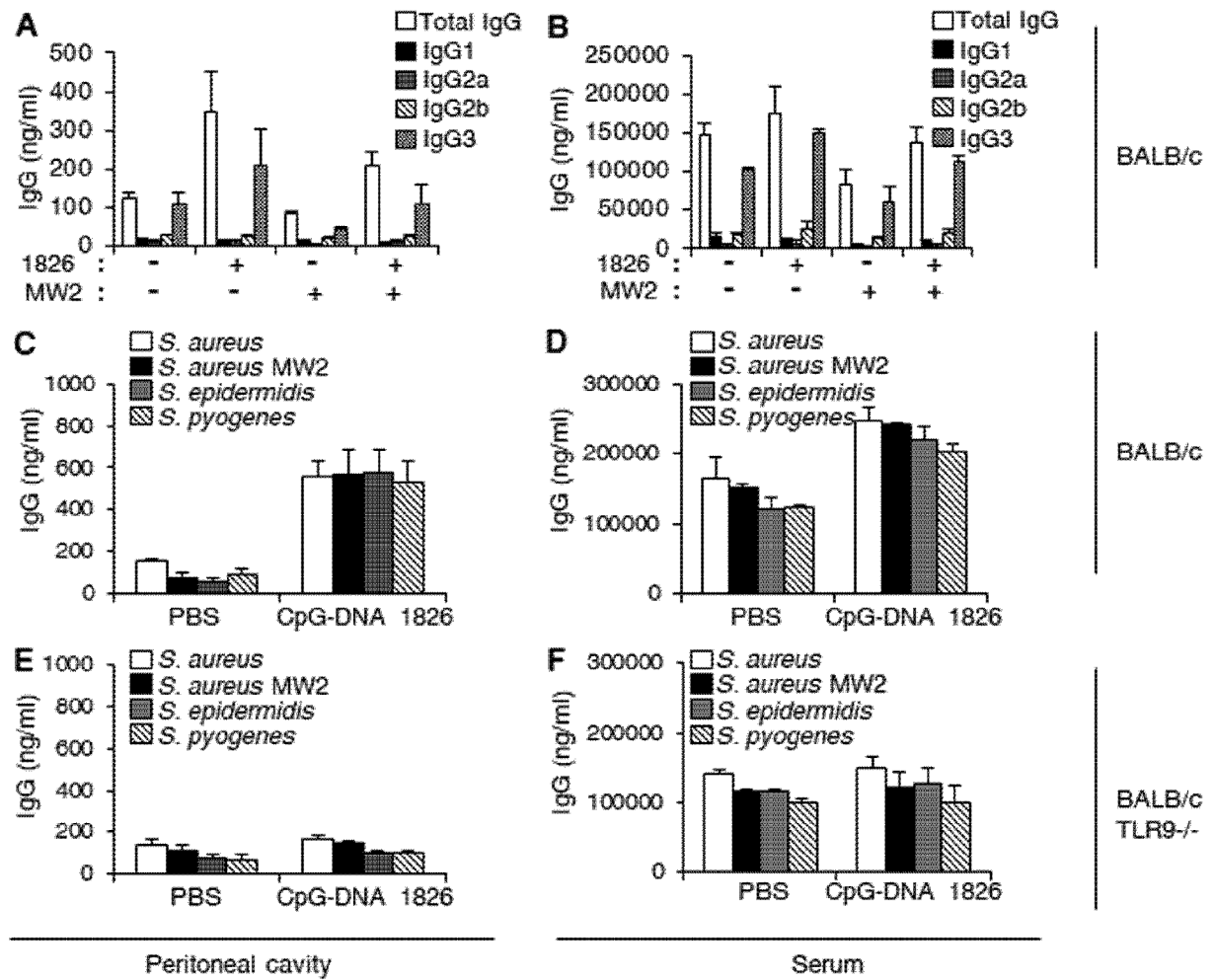
[도2]



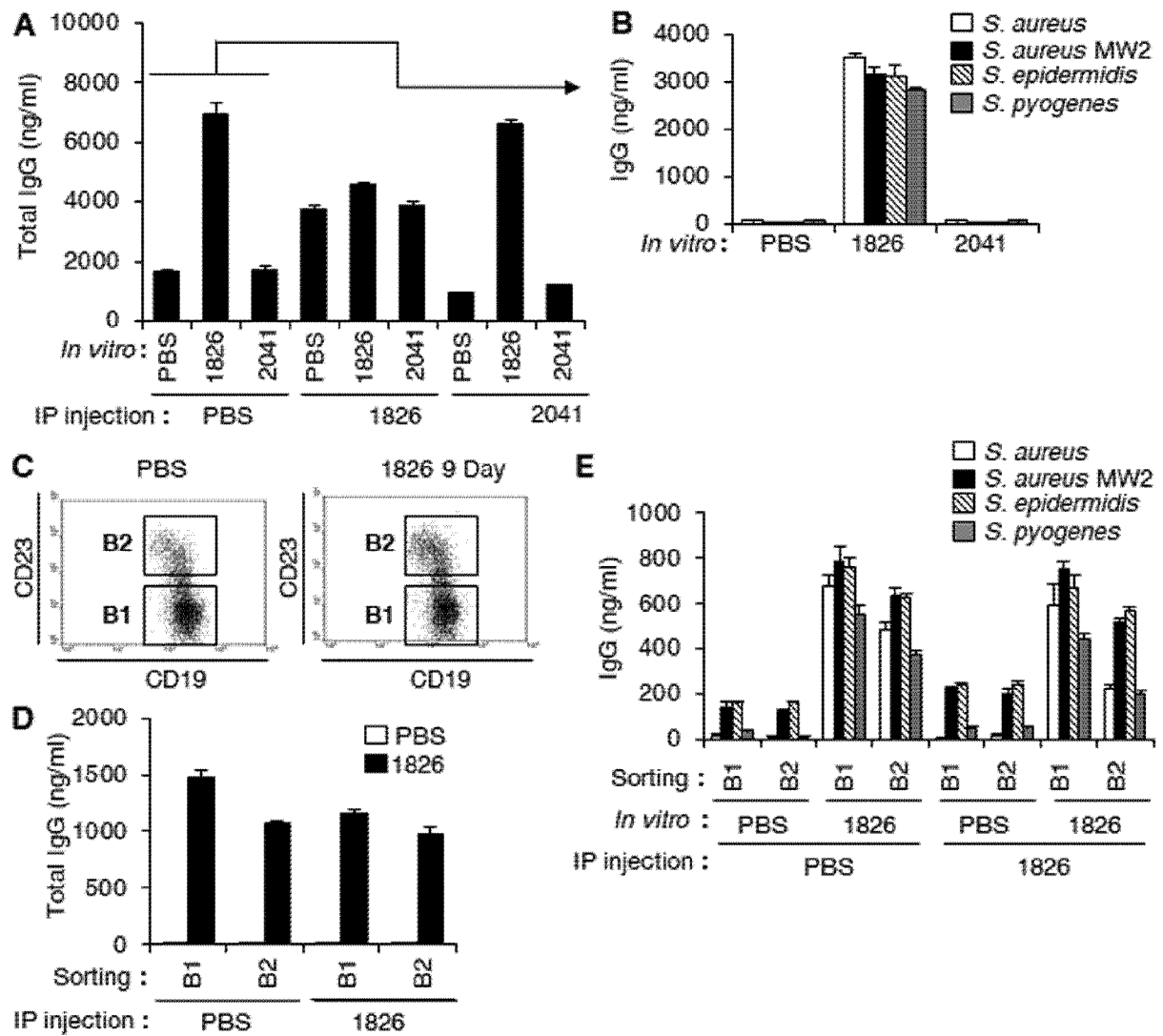
[도3]



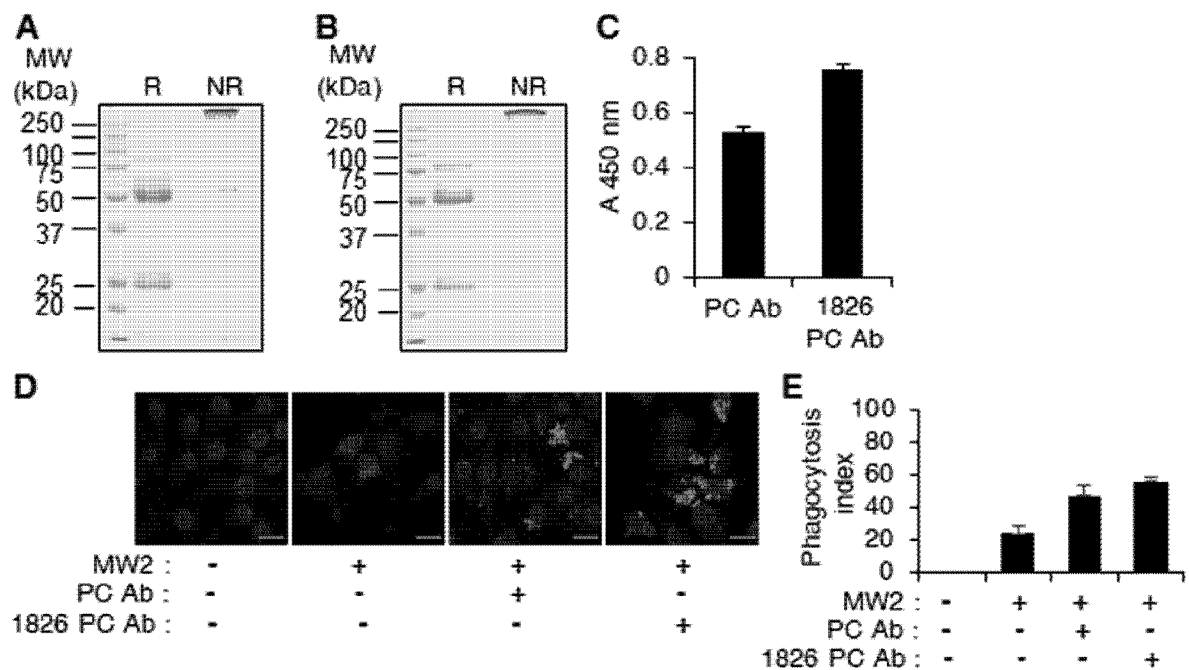
[도4]



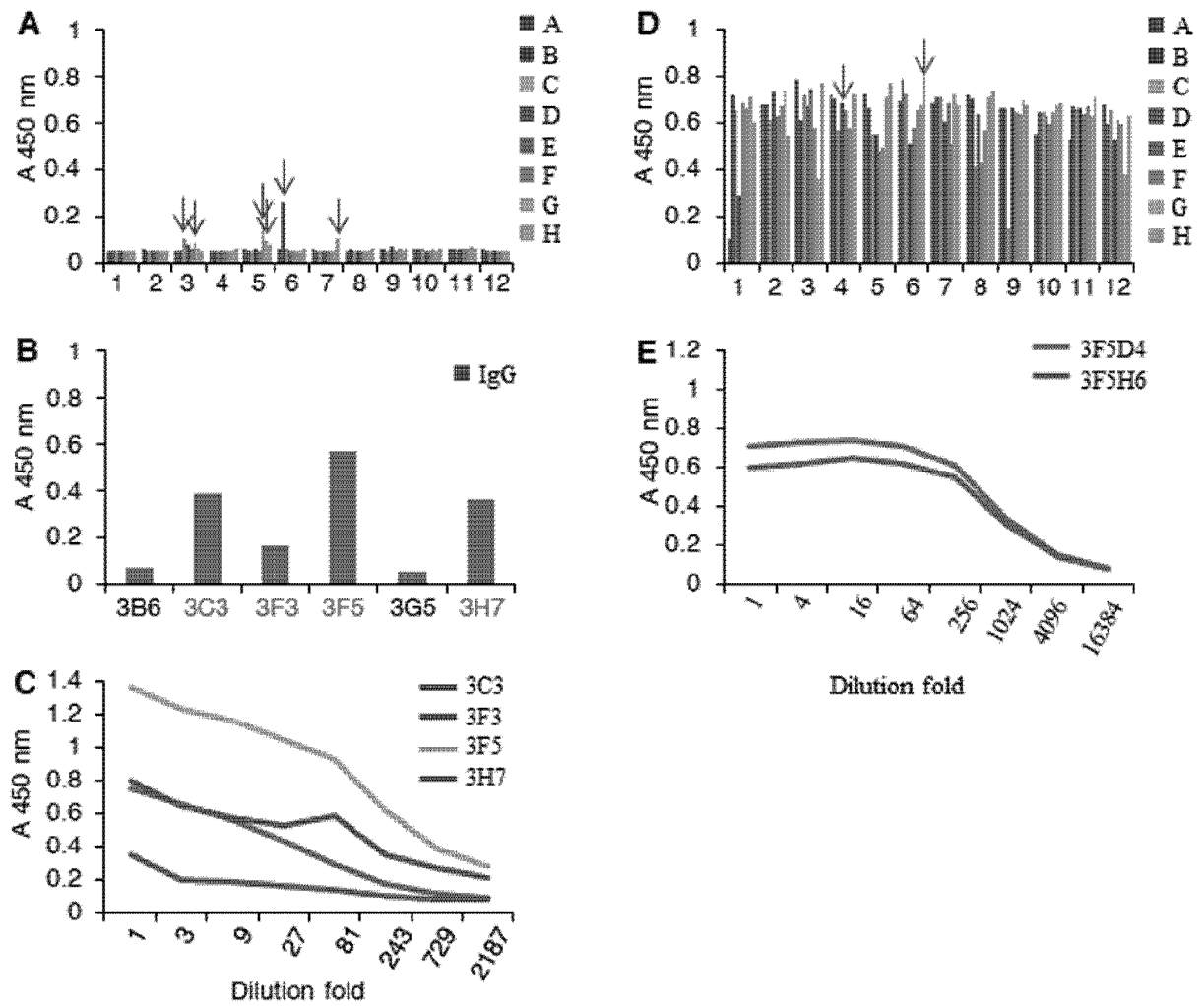
[도5]



[도6]

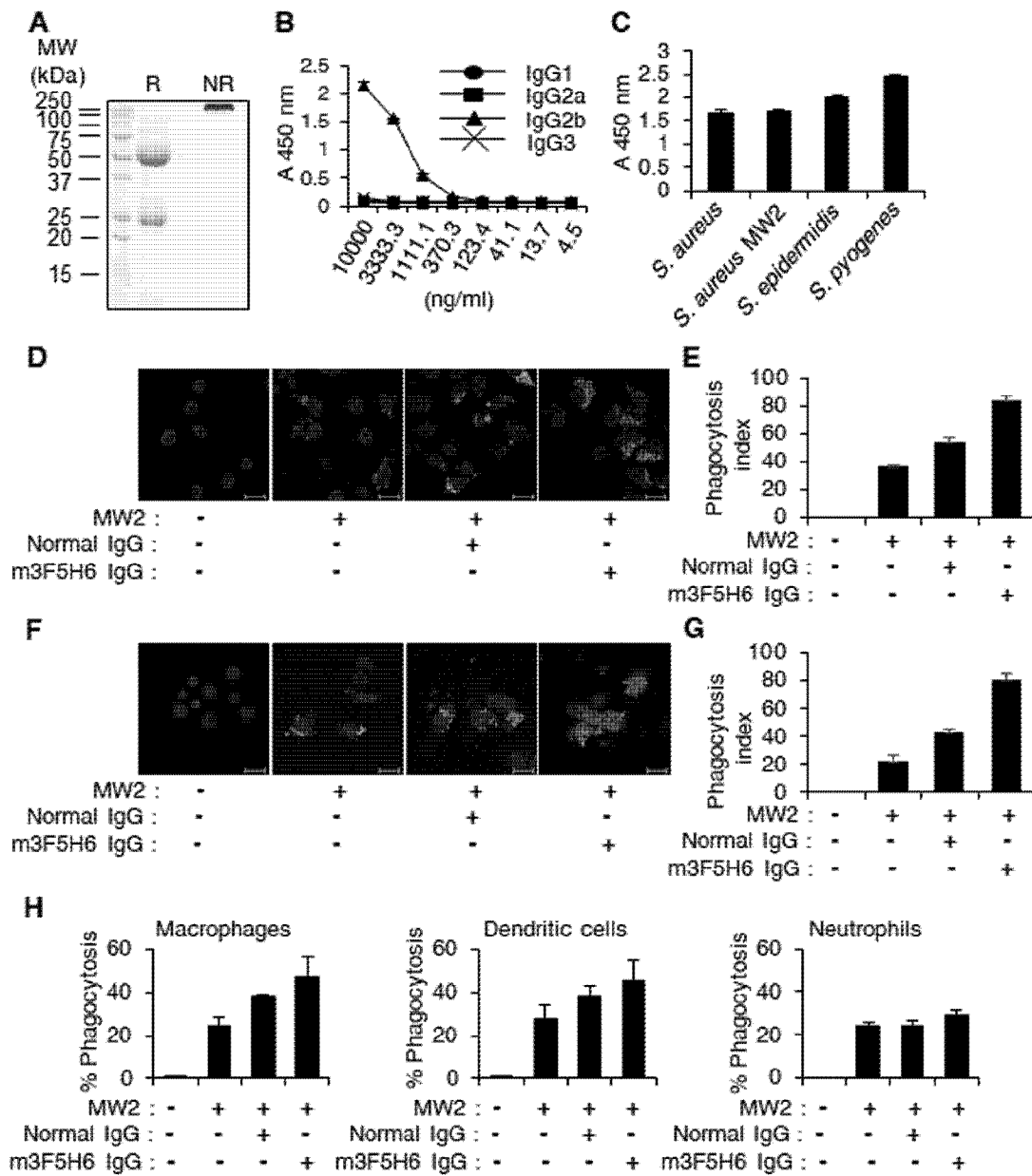


[도7]

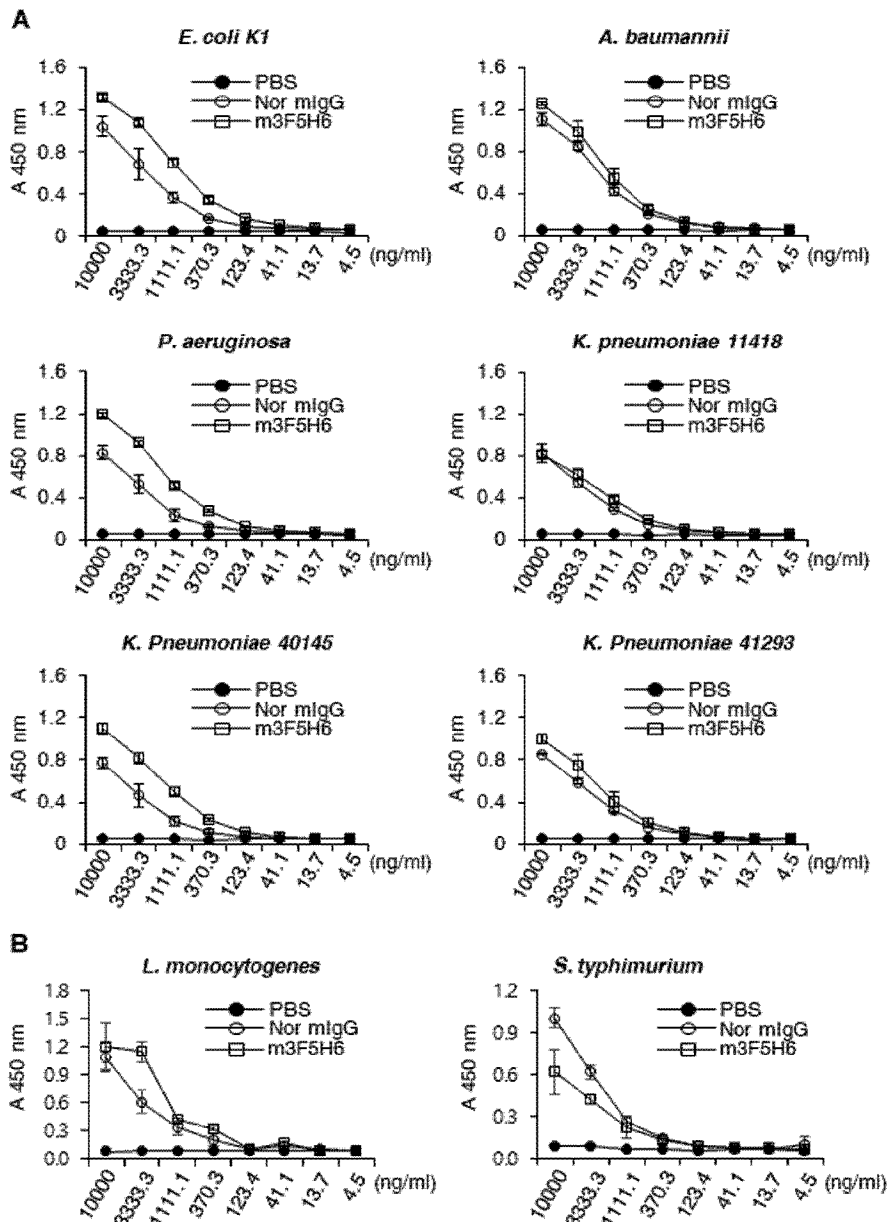


EDVGVYYQONGHSFPLDFGAGTKLELKR

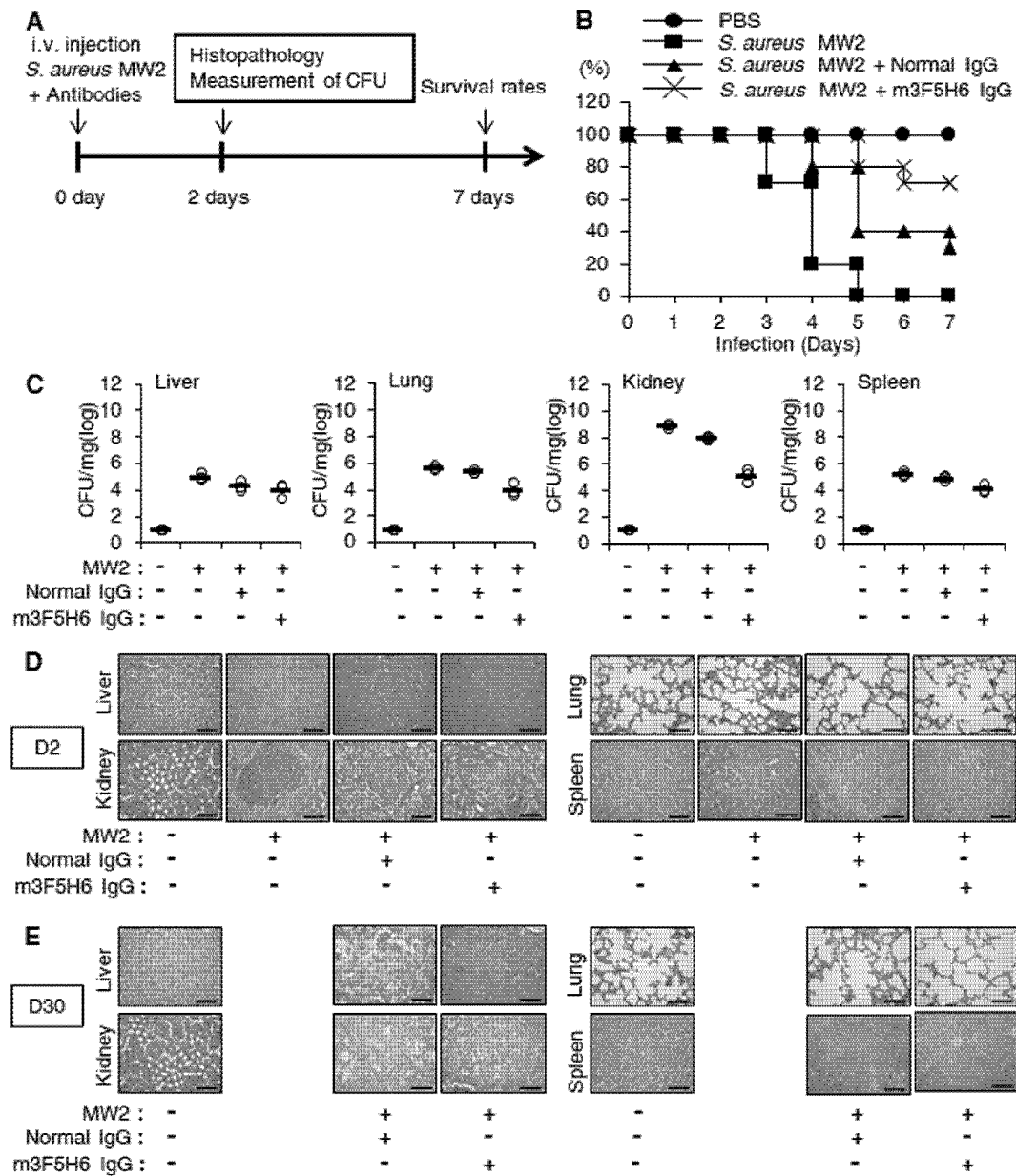
[도9]



[도10]



[도11]



[도12]

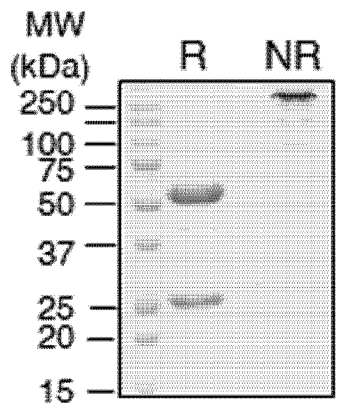
VH

	10	20	30	40	50	60
m3F5H6	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS	[GYSFTGYMH]	WVKQSHVKSLEWIG	[RINPYNGATSY		
hVH1	QVQLQQSGSELKKPGASVKISCKAS	[GYSFTDYIIL]	WVRQNPVGKLEWIG	[HIDPYYGSSNY		
h3F5H6	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS	[GYSFTGYMH]	WVRQNHVKLEWIG	[RINPYNGATSY		
	▲ ▲		▲▲			
	70	80	90	100	110	
m3F5H6	NQNFKD] KASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCAG	[DYGSSYFDY]	WGQGTTTLTVSS			
hVH1	NLKFKG] RVTITADQSTTTAYMELSSLRSEDTAVYYCGR	[-SKRDYFDY]	WGQGTTTLTVSS			
h3F5H6	NQNFKD] RATLTVDKSTTTAYMELHSLTSEDTAVYYCAG	[DYGSSYFDY]	WGQGTTTLTVSS			
	* * * *	▲ ▲	**			

VL

	10	20	30	40	50
m3F5H6	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSC	[RASQSISDYLH]	WYQOKSHESPRLLIK	[YASQSIG]	
hVk1	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITC	[KASQDINSYLS]	WFQOKPGKAPKLLIY	[RANRLVD]	
h3F5H6	DIVMTQSPSSLSASPGDRVTITC	[RASQSISDYLH]	WYQOKSHKAPKLLIK	[YASQSIG]	
	▲ ▲		* ▲▲ *		
	60	70	80	90	100
m3F5H6	GIPSRFSGSGSGSDFTLTSLNSVEPEDVGVYYC	[QNGHSFPLT]	FGAGTKLELKR		
hVk1	GVPSRFSGSGSGSDTYTLTISLQPEDFAVYYC	[LQYDEFPYT]	EGGGTKLEIKR		
h3F5H6	GVPSRFSGSGSGSDTYTLTISLQPEDFAVYYC	[QNGHSFPLT]	EGGGTKLEIKR		
		*			

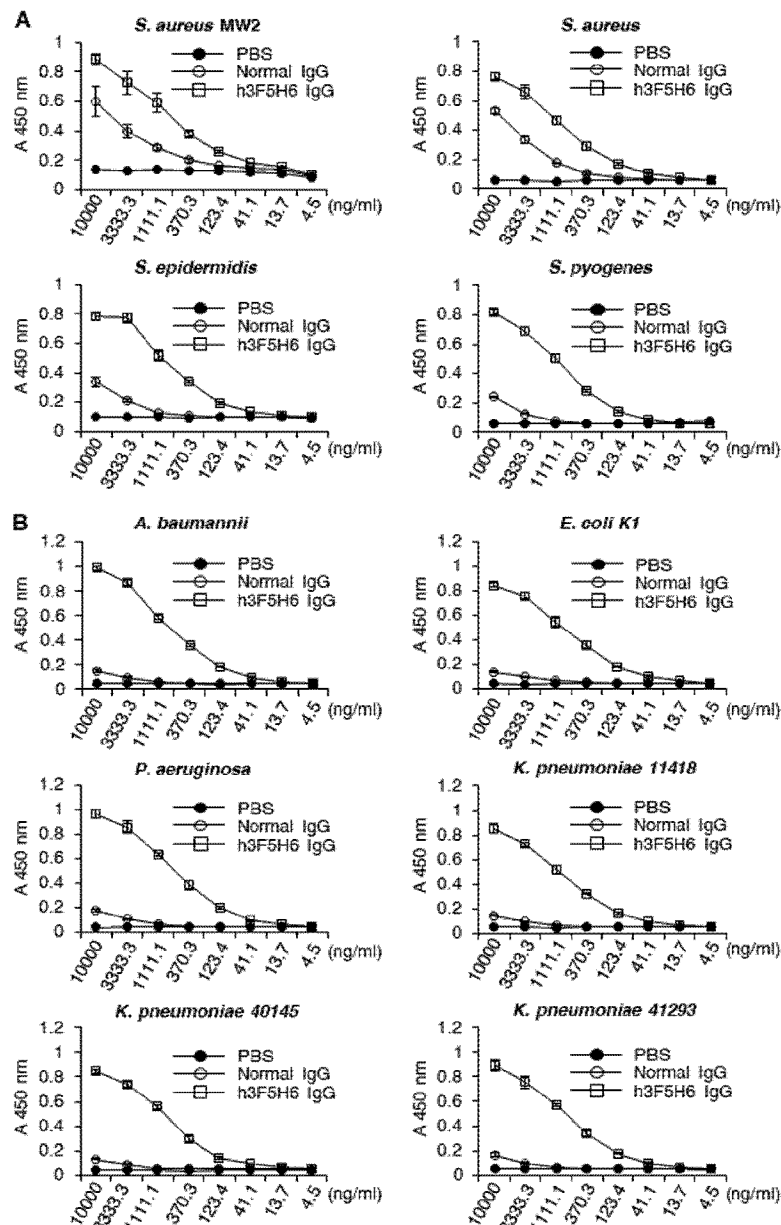
[도13]



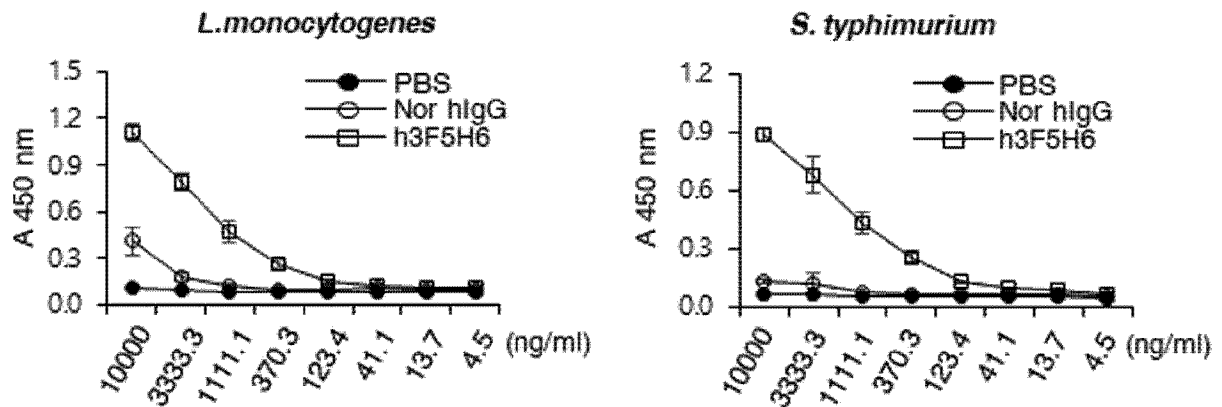
R : reducing

NR : non-reducing

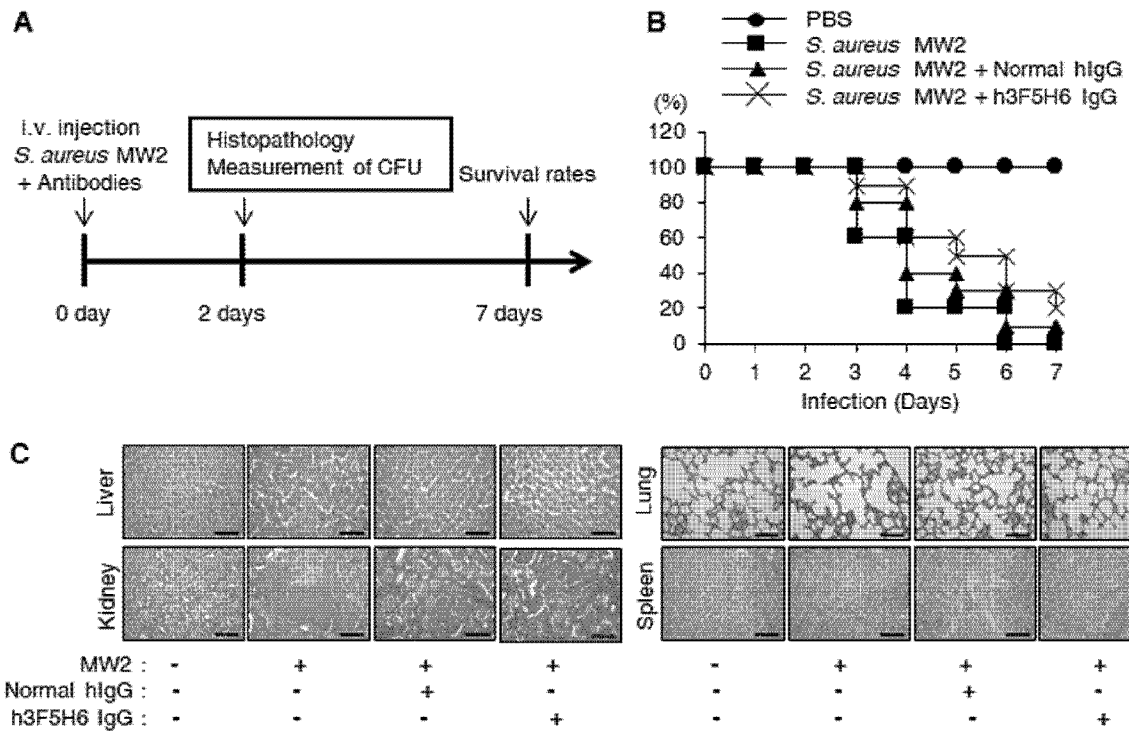
[도14]



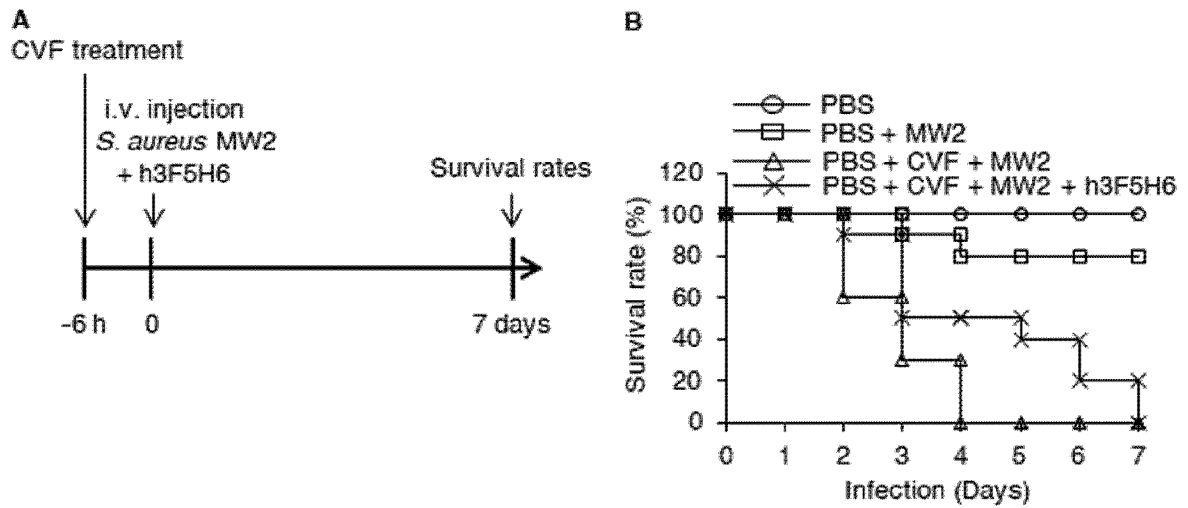
[도15]



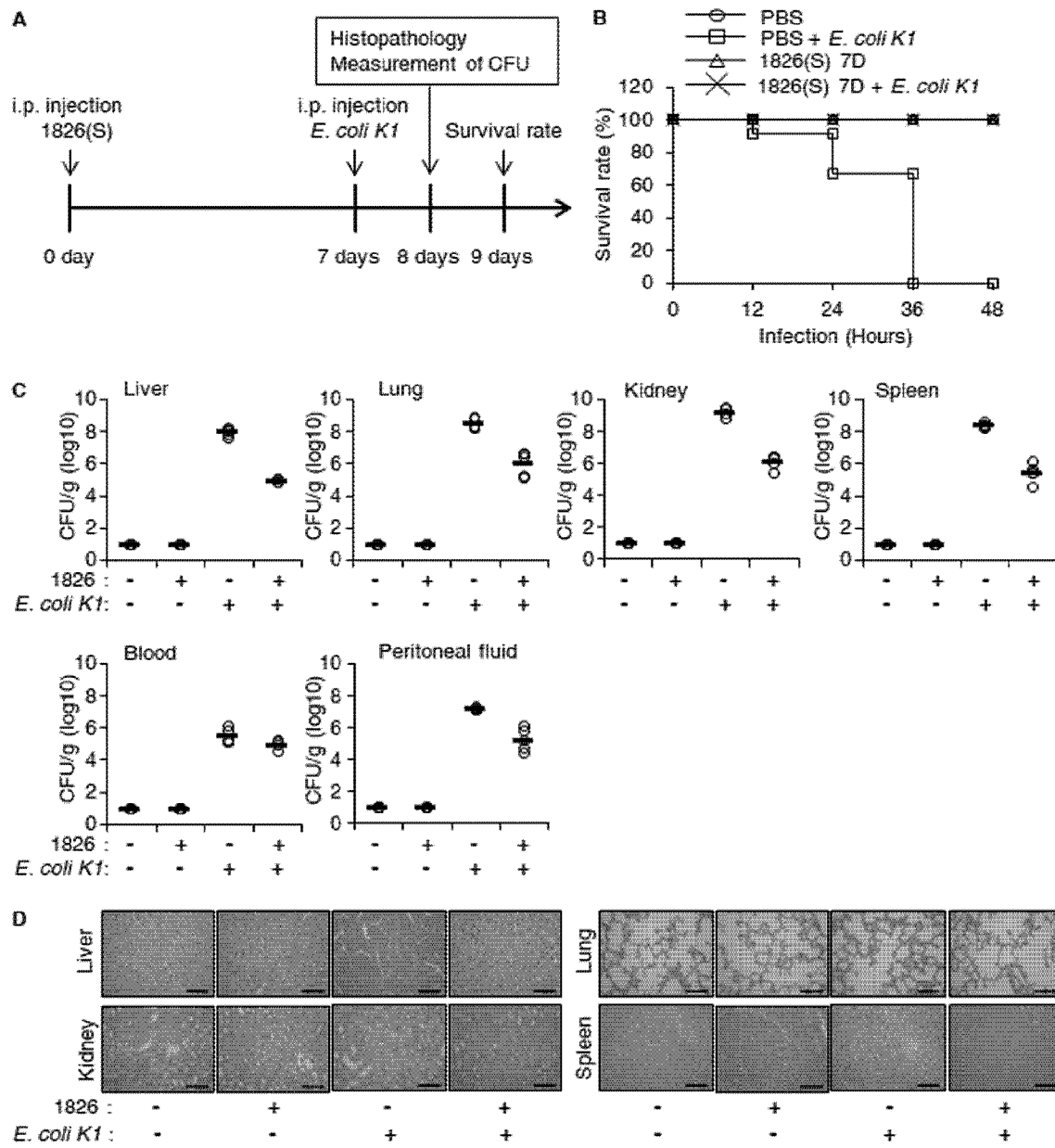
[도16]



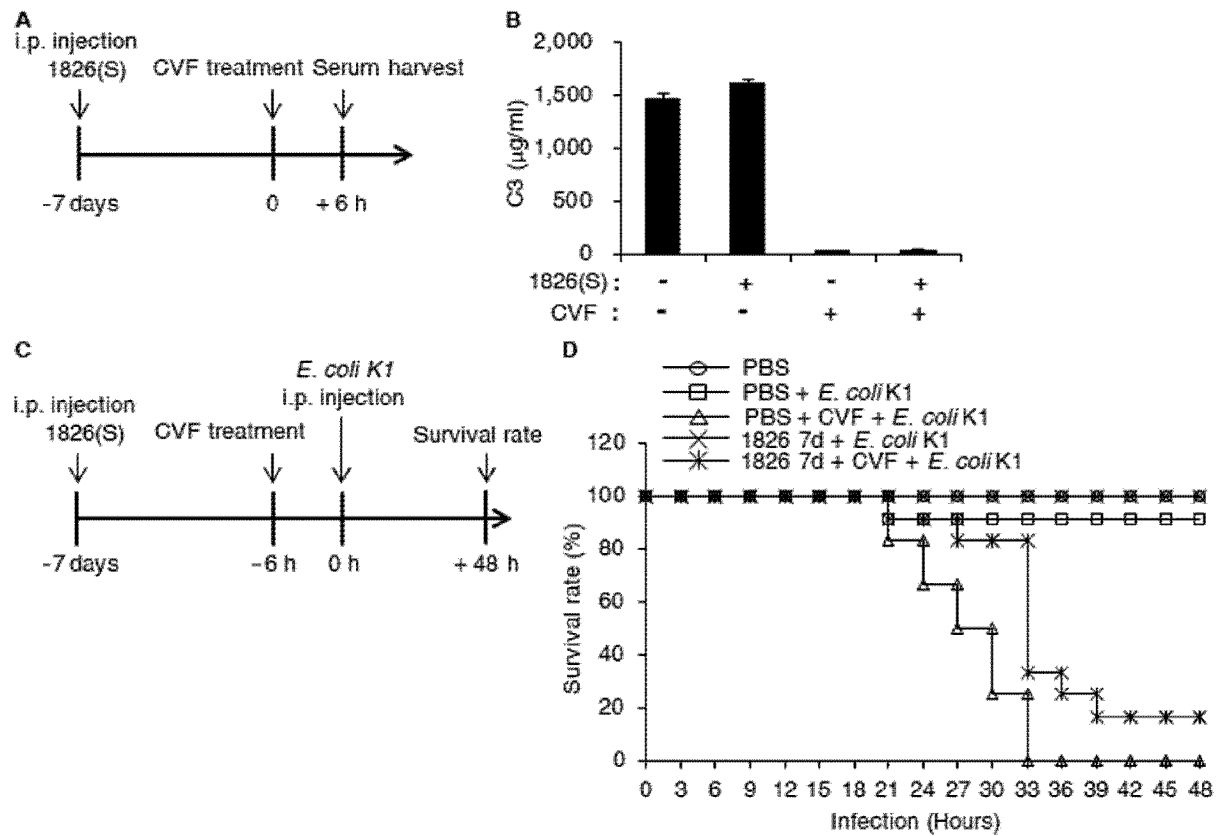
[도17]



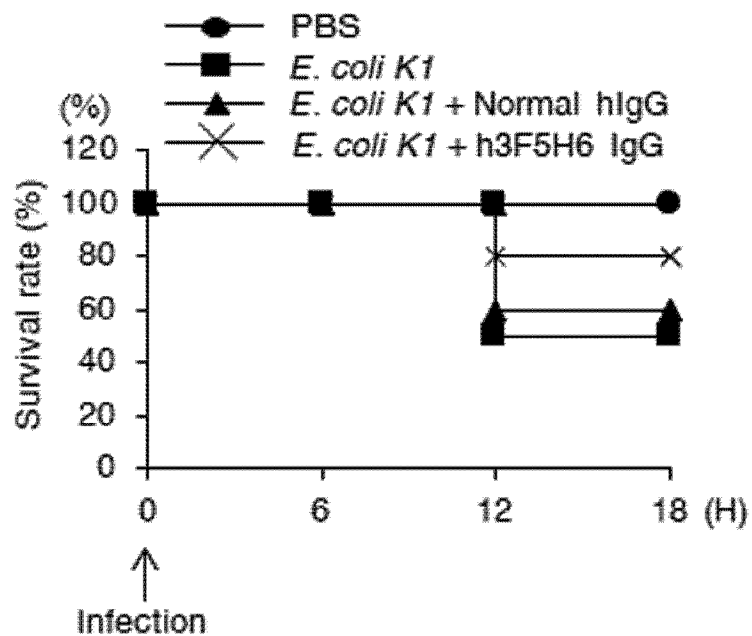
[도18]



[도19]



[도20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/002302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/12(2006.01)i, A61P 31/04(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/12; A61K 9/127; C07H 21/02; A61P 31/04; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: CpG-DNA, antibody, anti-bacteria, Staphylococcus, Listeria, E. coli

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, Dongbum et al. Immunostimulation and anti-DNA antibody production by backbone modified CpG-DNA. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009, vol. 379, pages 362-367 See pages 362, 363, 366; and table 1.	11,14,15
A		1-10,12,13
X	KIM, Dongbum et al. Activation of Toll-like receptor 9 and production of epitope specific antibody by liposome-encapsulated CpG-DNA. BMB Reports. 2011, vol. 44, no. 9, pages 607-612 See pages 607, 611.	11,14,15
X	KARBACH, Julia et al. Therapeutic administration of a synthetic CpG oligodeoxynucleotide triggers formation of anti-CpG antibodies. Cancer Research. 2012, vol. 72, no. 17, pages 1-7 See abstract; and pages 1, 6.	11,14,15
A	KIM, Dongbum et al. Production of antibodies with peptide-CpG-DNA-liposome complex without carriers. BMC Immunology. 2011, vol. 12, Article No. 29, pages 1-15 See the entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 28 MAY 2019 (28.05.2019)	Date of mailing of the international search report 28 MAY 2019 (28.05.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/002302

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005-0244380 A1 (KRIEG, Arthur M. et al.) 03 November 2005 See the entire document.	1-15
PX	KIM, Te Ha et al. CpG-DNA exerts antibacterial effects by protecting immune cells and producing bacteria-reactive antibodies. Scientific Reports. 02 November 2018(online publication date), vol. 8, Article No. 16236, pages 1-14 See pages 1, 3, 7, 11.	11,14,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/002302

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2005-0244380 A1	03/11/2005	AT 328890 T	15/06/2006
		AT 332966 T	15/08/2006
		AT 420171 T	15/01/2009
		AT 509102 T	15/05/2011
		AU 1912795 A	16/02/1996
		AU 2004-218696 A1	04/11/2004
		AU 2004-218696 B2	06/11/2008
		AU 5242498 A	22/05/1998
		AU 713040 B2	18/11/1999
		AU 775185 B2	22/07/2004
		AU 9724901 A	07/02/2002
		CA 2194761 A1	01/02/1996
		CA 2194761 C	19/12/2006
		CA 2270345 A1	07/05/1998
		CA 2270345 C	13/05/2014
		CA 2560114 A1	01/02/1996
		CN 100338086 C	19/09/2007
		CN 101265285 A	17/09/2008
		CN 1235609 A	17/11/1999
		DE 69535036 T2	18/01/2007
		DE 69535036 T3	07/07/2011
		DE 69736331 T2	09/08/2007
		DK 0772619 T3	09/10/2006
		DK 0772619 T4	21/02/2011
		DK 0948510 T3	30/10/2006
		EP 0772619 B1	07/06/2006
		EP 0772619 B2	08/12/2010
		EP 0948510 B1	12/07/2006
		EP 1167377 A2	02/01/2002
		EP 1167377 A3	08/09/2004
		EP 1167377 B1	07/01/2009
		EP 1167377 B2	08/08/2012
		EP 1167378 A2	02/01/2002
		EP 1167378 A3	17/08/2005
		EP 1167378 B1	11/05/2011
		EP 1167379 A2	02/01/2002
		EP 1167379 A3	08/09/2004
		EP 1714969 A2	25/10/2006
		EP 1714969 A3	03/03/2010
		EP 1746159 A2	24/01/2007
		EP 1746159 A3	25/11/2009
		EP 2322615 A1	18/05/2011
		EP 2360252 A1	24/08/2011
		EP 2360252 B1	08/02/2017
		EP 2360252 B8	12/04/2017
		ES 2267100 T3	01/03/2007
		ES 2267100 T5	08/04/2011
		ES 2268736 T3	16/03/2007
		ES 2320315 T3	21/05/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/002302

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		ES 2320315 T5	05/12/2012
		ES 2366201 T3	18/10/2011
		ES 2624859 T3	17/07/2017
		HK 1044949 A1	27/01/2012
		JP 2001-503267 A	13/03/2001
		JP 2003-144184 A	20/05/2003
		JP 2003-286174 A	07/10/2003
		JP 2004-024261 A	29/01/2004
		JP 2004-041224 A	12/02/2004
		JP 2004-043466 A	12/02/2004
		JP 2004-215670 A	05/08/2004
		JP 2008-169216 A	24/07/2008
		JP 2008-289495 A	04/12/2008
		JP 2009-148296 A	09/07/2009
		JP 2010-150280 A	08/07/2010
		JP 3468773 B2	17/11/2003
		JP 4126252 B2	30/07/2008
		JP 5082063 B2	28/11/2012
		KR 10-0689942 B1	09/03/2007
		KR 10-2000-0052994 A	25/08/2000
		NZ 335397 A	24/11/2000
		PT 772619 E	31/10/2006
		PT 948510 E	29/12/2006
		US 2003-0026782 A1	06/02/2003
		US 2003-0050261 A1	13/03/2003
		US 2003-0050263 A1	13/03/2003
		US 2003-0053229 A1	20/03/2003
		US 2003-0100527 A1	29/05/2003
		US 2003-0191079 A1	09/10/2003
		US 2004-0087534 A1	06/05/2004
		US 2004-0087538 A1	06/05/2004
		US 2004-0106568 A1	03/06/2004
		US 2004-0132685 A1	08/07/2004
		US 2004-0142469 A1	22/07/2004
		US 2004-0143112 A1	22/07/2004
		US 2004-0147468 A1	29/07/2004
		US 2004-0152656 A1	05/08/2004
		US 2004-0152657 A1	05/08/2004
		US 2004-0162258 A1	19/08/2004
		US 2004-0162262 A1	19/08/2004
		US 2004-0167089 A1	26/08/2004
		US 2004-0171150 A1	02/09/2004
		US 2004-0181045 A1	16/09/2004
		US 2004-0198688 A1	07/10/2004
		US 2004-0229835 A1	18/11/2004
		US 2005-0004061 A1	06/01/2005
		US 2005-0004062 A1	06/01/2005
		US 2005-0009774 A1	13/01/2005
		US 2005-0032736 A1	10/02/2005
		US 2005-0037403 A1	17/02/2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/002302

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2005-0037985 A1	17/02/2005
		US 2005-0049215 A1	03/03/2005
		US 2005-0049216 A1	03/03/2005
		US 2005-0054602 A1	10/03/2005
		US 2005-0059625 A1	17/03/2005
		US 2005-0070491 A1	31/03/2005
		US 2005-0101554 A1	12/05/2005
		US 2005-0101557 A1	12/05/2005
		US 2005-0123523 A1	09/06/2005
		US 2005-0148537 A1	07/07/2005
		US 2005-0171047 A1	04/08/2005
		US 2005-0182017 A1	18/08/2005
		US 2005-0215500 A1	29/09/2005
		US 2005-0233995 A1	20/10/2005
		US 2005-0233999 A1	20/10/2005
		US 2005-0239732 A1	27/10/2005
		US 2005-0239736 A1	27/10/2005
		US 2005-0244379 A1	03/11/2005
		US 2005-0245477 A1	03/11/2005
		US 2005-0267057 A1	01/12/2005
		US 2005-0267064 A1	01/12/2005
		US 2005-0277604 A1	15/12/2005
		US 2005-0277609 A1	15/12/2005
		US 2006-0003955 A1	05/01/2006
		US 2006-0058251 A1	16/03/2006
		US 2006-0089326 A1	27/04/2006
		US 2006-0094683 A1	04/05/2006
		US 2007-0009482 A9	11/01/2007
		US 2007-0010470 A9	11/01/2007
		US 2007-0065467 A1	22/03/2007
		US 2007-0066553 A1	22/03/2007
		US 2007-0078104 A1	05/04/2007
		US 2007-0202128 A1	30/08/2007
		US 2008-0026011 A1	31/01/2008
		US 2008-0031936 A1	07/02/2008
		US 2009-0202575 A1	13/08/2009
		US 2010-0125101 A1	20/05/2010
		US 2011-0081366 A1	07/04/2011
		US 6194388 B1	27/02/2001
		US 6207646 B1	27/03/2001
		US 6239116 B1	29/05/2001
		US 6429199 B1	06/08/2002
		US 6481860 B1	19/11/2002
		US 6653292 B1	25/11/2003
		US 7223741 B2	29/05/2007
		US 7402572 B2	22/07/2008
		US 7517861 B2	14/04/2009
		US 7524828 B2	28/04/2009
		US 7674777 B2	09/03/2010
		US 7713529 B2	11/05/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/002302

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 7723022 B2	25/05/2010
		US 7723500 B2	25/05/2010
		US 7879810 B2	01/02/2011
		US 7888327 B2	15/02/2011
		US 7935675 B1	03/05/2011
		US 8008266 B2	30/08/2011
		US 8058249 B2	15/11/2011
		US 8114848 B2	14/02/2012
		US 8129351 B2	06/03/2012
		US 8148340 B2	03/04/2012
		US 8158592 B2	17/04/2012
		US 8258106 B2	04/09/2012
		US 8309527 B2	13/11/2012
		WO 96-02555 A1	01/02/1996
		WO 98-18810 A1	07/05/1998

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/12(2006.01)i, A61P 31/04(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/12; A61K 9/127; C07H 21/02; A61P 31/04; A61K 39/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CpG-DNA, 항체(antibody), 항균(anti-bacteria), 포도상구균(Staphylococcus), 리스테리아(Listeria), 대장균(E. coli)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, DONGBUM 등, 'Immunostimulation and anti-DNA antibody production by backbone modified CpG-DNA', Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 379권, 페이지 362-367 페이지 362, 363, 366; 및 표 1 참조.	11, 14, 15
A		1-10, 12, 13
X	KIM, DONGBUM 등, 'Activation of Toll-like receptor 9 and production of epitope specific antibody by liposome-encapsulated CpG-DNA', BMB Reports, 2011, 44권, 9호, 페이지 607-612 페이지 607, 611 참조.	11, 14, 15
X	KARBACH, JULIA 등, 'Therapeutic administration of a synthetic CpG oligodeoxynucleotide triggers formation of anti-CpG antibodies', Cancer Research, 2012, 72권, 17호, 페이지 1-7 요약; 및 페이지 1, 6 참조.	11, 14, 15
A	KIM, DONGBUM 등, 'Production of antibodies with peptide-CpG-DNA-liposome complex without carriers', BMC Immunology, 2011, 12권, Article No. 29, 페이지 1-15 전체 문헌 참조.	1-15

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 05월 28일 (28.05.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 05월 28일 (28.05.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



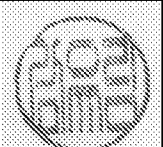
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2005-0244380 A1 (KRIEG, ARTHUR M. 등) 2005.11.03 전체 문헌 참조.	1-15
PX	KIM, TE HA 등, 'CpG-DNA exerts antibacterial effects by protecting immune cells and producing bacteria-reactive antibodies' , Scientific Reports, 2018.11.02(온라인 공개일), 8권, Article No. 16236, 페이지 1-14 페이지 1, 3, 7, 11 참조.	11,14,15

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2005-0244380 A1

2005/11/03

AT 328890 T

2006/06/15

AT 332966 T

2006/08/15

AT 420171 T

2009/01/15

AT 509102 T

2011/05/15

AU 1912795 A

1996/02/16

AU 2004-218696 A1

2004/11/04

AU 2004-218696 B2

2008/11/06

AU 5242498 A

1998/05/22

AU 713040 B2

1999/11/18

AU 775185 B2

2004/07/22

AU 9724901 A

2002/02/07

CA 2194761 A1

1996/02/01

CA 2194761 C

2006/12/19

CA 2270345 A1

1998/05/07

CA 2270345 C

2014/05/13

CA 2560114 A1

1996/02/01

CN 100338086 C

2007/09/19

CN 101265285 A

2008/09/17

CN 1235609 A

1999/11/17

DE 69535036 T2

2007/01/18

DE 69535036 T3

2011/07/07

DE 69736331 T2

2007/08/09

DK 0772619 T3

2006/10/09

DK 0772619 T4

2011/02/21

DK 0948510 T3

2006/10/30

EP 0772619 B1

2006/06/07

EP 0772619 B2

2010/12/08

EP 0948510 B1

2006/07/12

EP 1167377 A2

2002/01/02

EP 1167377 A3

2004/09/08

EP 1167377 B1

2009/01/07

EP 1167377 B2

2012/08/08

EP 1167378 A2

2002/01/02

EP 1167378 A3

2005/08/17

EP 1167378 B1

2011/05/11

EP 1167379 A2

2002/01/02

EP 1167379 A3

2004/09/08

EP 1714969 A2

2006/10/25

EP 1714969 A3

2010/03/03

EP 1746159 A2

2007/01/24

EP 1746159 A3

2009/11/25

EP 2322615 A1

2011/05/18

EP 2360252 A1

2011/08/24

EP 2360252 B1

2017/02/08

EP 2360252 B8

2017/04/12

ES 2267100 T3

2007/03/01

ES 2267100 T5

2011/04/08

ES 2268736 T3

2007/03/16

ES 2320315 T3

2009/05/21

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		ES 2320315 T5	2012/12/05
		ES 2366201 T3	2011/10/18
		ES 2624859 T3	2017/07/17
		HK 1044949 A1	2012/01/27
		JP 2001-503267 A	2001/03/13
		JP 2003-144184 A	2003/05/20
		JP 2003-286174 A	2003/10/07
		JP 2004-024261 A	2004/01/29
		JP 2004-041224 A	2004/02/12
		JP 2004-043466 A	2004/02/12
		JP 2004-215670 A	2004/08/05
		JP 2008-169216 A	2008/07/24
		JP 2008-289495 A	2008/12/04
		JP 2009-148296 A	2009/07/09
		JP 2010-150280 A	2010/07/08
		JP 3468773 B2	2003/11/17
		JP 4126252 B2	2008/07/30
		JP 5082063 B2	2012/11/28
		KR 10-0689942 B1	2007/03/09
		KR 10-2000-0052994 A	2000/08/25
		NZ 335397 A	2000/11/24
		PT 772619 E	2006/10/31
		PT 948510 E	2006/12/29
		US 2003-0026782 A1	2003/02/06
		US 2003-0050261 A1	2003/03/13
		US 2003-0050263 A1	2003/03/13
		US 2003-0053229 A1	2003/03/20
		US 2003-0100527 A1	2003/05/29
		US 2003-0191079 A1	2003/10/09
		US 2004-0087534 A1	2004/05/06
		US 2004-0087538 A1	2004/05/06
		US 2004-0106568 A1	2004/06/03
		US 2004-0132685 A1	2004/07/08
		US 2004-0142469 A1	2004/07/22
		US 2004-0143112 A1	2004/07/22
		US 2004-0147468 A1	2004/07/29
		US 2004-0152656 A1	2004/08/05
		US 2004-0152657 A1	2004/08/05
		US 2004-0162258 A1	2004/08/19
		US 2004-0162262 A1	2004/08/19
		US 2004-0167089 A1	2004/08/26
		US 2004-0171150 A1	2004/09/02
		US 2004-0181045 A1	2004/09/16
		US 2004-0198688 A1	2004/10/07
		US 2004-0229835 A1	2004/11/18
		US 2005-0004061 A1	2005/01/06
		US 2005-0004062 A1	2005/01/06
		US 2005-0009774 A1	2005/01/13
		US 2005-0032736 A1	2005/02/10
		US 2005-0037403 A1	2005/02/17

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2005-0037985 A1	2005/02/17
US 2005-0049215 A1	2005/03/03
US 2005-0049216 A1	2005/03/03
US 2005-0054602 A1	2005/03/10
US 2005-0059625 A1	2005/03/17
US 2005-0070491 A1	2005/03/31
US 2005-0101554 A1	2005/05/12
US 2005-0101557 A1	2005/05/12
US 2005-0123523 A1	2005/06/09
US 2005-0148537 A1	2005/07/07
US 2005-0171047 A1	2005/08/04
US 2005-0182017 A1	2005/08/18
US 2005-0215500 A1	2005/09/29
US 2005-0233995 A1	2005/10/20
US 2005-0233999 A1	2005/10/20
US 2005-0239732 A1	2005/10/27
US 2005-0239736 A1	2005/10/27
US 2005-0244379 A1	2005/11/03
US 2005-0245477 A1	2005/11/03
US 2005-0267057 A1	2005/12/01
US 2005-0267064 A1	2005/12/01
US 2005-0277604 A1	2005/12/15
US 2005-0277609 A1	2005/12/15
US 2006-0003955 A1	2006/01/05
US 2006-0058251 A1	2006/03/16
US 2006-0089326 A1	2006/04/27
US 2006-0094683 A1	2006/05/04
US 2007-0009482 A9	2007/01/11
US 2007-0010470 A9	2007/01/11
US 2007-0065467 A1	2007/03/22
US 2007-0066553 A1	2007/03/22
US 2007-0078104 A1	2007/04/05
US 2007-0202128 A1	2007/08/30
US 2008-0026011 A1	2008/01/31
US 2008-0031936 A1	2008/02/07
US 2009-0202575 A1	2009/08/13
US 2010-0125101 A1	2010/05/20
US 2011-0081366 A1	2011/04/07
US 6194388 B1	2001/02/27
US 6207646 B1	2001/03/27
US 6239116 B1	2001/05/29
US 6429199 B1	2002/08/06
US 6481860 B1	2002/11/19
US 6653292 B1	2003/11/25
US 7223741 B2	2007/05/29
US 7402572 B2	2008/07/22
US 7517861 B2	2009/04/14
US 7524828 B2	2009/04/28
US 7674777 B2	2010/03/09
US 7713529 B2	2010/05/11

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 7723022 B2	2010/05/25
US 7723500 B2	2010/05/25
US 7879810 B2	2011/02/01
US 7888327 B2	2011/02/15
US 7935675 B1	2011/05/03
US 8008266 B2	2011/08/30
US 8058249 B2	2011/11/15
US 8114848 B2	2012/02/14
US 8129351 B2	2012/03/06
US 8148340 B2	2012/04/03
US 8158592 B2	2012/04/17
US 8258106 B2	2012/09/04
US 8309527 B2	2012/11/13
WO 96-02555 A1	1996/02/01
WO 98-18810 A1	1998/05/07