(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0090247
(43) 공개일자 2019년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/12 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/1217 (2013.01)
G01N 33/56911 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0008883
(22) 출원일자 2018년01월24일
심사청구일자 2018년01월24일

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김미경
강원도 춘천시 후석로 325, 104동 1305호(후평동, 춘천더샵아파트)
정지은
강원도 강릉시 신석길105번길 39-10(운산동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김정수

전체 청구항 수 : 총 23 항

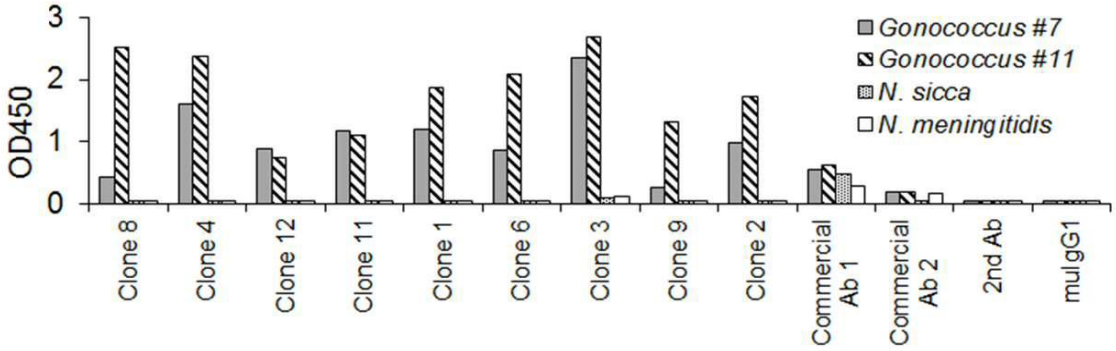
(54) 발명의 명칭 **임질균 특이적 항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 임질균(*Neisseria gonorrhoeae*)에 특이적으로 결합하는 임질균 특이적 항체, 또는 그 기능적 단편 및 이의 용도를 제공한다.

본 발명의 임질균 특이적 항체 및 이를 포함하는 조성물은 임질균의 검출, 임질의 진단 및 치료, 임질균의 검출 방법 및 임질 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 분석 방법에 있어서 환자 맞춤 진단 기술로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
G01N 2333/22 (2013.01)
(72) 발명자
이정현
경기도 의정부시 신흥로208번길 39-5, 203호(의정부동, 진영그린빌라)
김재석
서울특별시 송파구 올림픽로4길 42, 3동 606호(잠실동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 120170704
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 사회맞춤형 산학협력 선도대학 육성사업
연구과제명 저분자 고감도 항 25-(OH)-D 항체개발
기 여 율 40/100
주관기관 강원대학교 산학협력단
연구기간 2017.07.01 ~ 2018.01.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 120160840
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학 개인 기초연구지원 사업
연구과제명 항암제 내성기전관련 암줄기세포 특이적 세포막 단백체 발굴 및 이를 응용한 항암내성 치료법 개발 연구
기 여 율 10/100
주관기관 강원대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.01 ~ 2018.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 10047748
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 전략핵심소재기술개발사업
연구과제명 감염성질환의 다중 실시간 진단을 위한 자성항체융합소재 기술개발
기 여 율 10/100
주관기관 강원대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415148394
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 전략핵심소재기술개발사업
연구과제명 감염성질환의 다중 실시간 진단을 위한 자성항체융합소재 기술개발
기 여 율 40/100
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.01 ~ 2018.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

임질균(*Neisseria gonorrhoeae*)에 특이적으로 결합하는 임질균 특이적 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체가

서열번호 1로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

서열번호 7로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 8로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 9로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

서열번호 13으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 14로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 15로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

서열번호 19로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 20으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 21로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

서열번호 25로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 26으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 27로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

서열번호 31로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 32로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 33으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

서열번호 37로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 38로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 39로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

서열번호 43으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 44로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 45로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 49로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 50으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 51로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄와,

서열번호 4로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

서열번호 10으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 11로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 12로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

서열번호 16으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 17로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 18로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

서열번호 22로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 23으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 24로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

서열번호 28로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 29로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 30으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

서열번호 34로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 35로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 36으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

서열번호 40으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 41로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 42로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

서열번호 46으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 47로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 48로 기재되는 CDR-

L3 영역을 포함하는 경쇄; 및

서열번호 52로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 53으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 54로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄를 갖는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 기능적 단편은 단일 측쇄 항체(scFv)인 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 기능적 단편은 항원결합 분절(Fab)인 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 기능적 단편은 상기 CDR 부위를 포함하는 가변 도메인(variable domain)인 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 항체가 CDR-H1 영역, CDR-H2 영역, CDR-H3 영역, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 CDR 영역과의 아미노산 서열상동성이 80% 이상인 CDR 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 항체가 CDR-H1 영역, CDR-H2 영역, CDR-H3 영역, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 CDR 영역과의 아미노산 서열상동성이 90% 이상인 CDR 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 항체가 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편:

서열번호 1로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

서열번호 7로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 8로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 9로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 10으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 11로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 12로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

서열번호 13으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 14로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 15로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 16으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 17로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 18로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

서열번호 19로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 20으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 21로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 22로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 23으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 24로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

서열번호 25로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 26으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 27로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 29로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 30으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

서열번호 31로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 32로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 33으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 34로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 35로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 36으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

서열번호 37로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 38로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 39로 기재되는 CDR-H3

영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 40으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 41로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 42로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

서열번호 43으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 44로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 45로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 46으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 47로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 48로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체; 및

서열번호 49로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 50으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 51로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 52로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 53으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 54로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 항체가

서열번호 55로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 56으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

서열번호 57로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 58로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

서열번호 59로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 60으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

서열번호 61로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 62로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

서열번호 63으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 64로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

서열번호 65로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 66으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

서열번호 67로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

서열번호 69로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 70으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및

서열번호 71로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 72로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄로 구성되는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 또는 경쇄와의 아미노산 서열상동성이 80% 이상인 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 항체가 임질균 특이적 항체와의 아미노산 서열상동성이 70% 이상인 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체 또는 다클론 항체인 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항체 생산 세포주.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 임질균 특이적 항체; 또는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 임질균 특이적 항체에 표지물질을 결합한 컨쥬게이트를 포함하는 임질균 검출용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 임질균이 항생제 저항성 임질균인 것을 특징으로 하는 임질균 검출용 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 임질균이 페니실린, 테트라사이클린, 시프로플록사신 및 세프트리악손으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항생제에 저항성인 임질균인 것을 특징으로 하는 임질균 검출용 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 임질균이 WHO L 표준균주인 것을 특징으로 하는 임질균 검출용 조성물.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 표지물질이 효소, 루시퍼레이즈, 자성입자, 형광물질 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 임질균 검출용 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 임질균 특이적 항체를 포함하는 임질 치료용 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 임질균 특이적 항체; 또는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 임질균 특이적 항체에 표지물질을 결합한 컨쥬게이트를 포함하는 임질 진단용 조성물.

청구항 21

제20항의 임질 진단용 조성물을 포함하는 임질 진단용 키트.

청구항 22

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 임질균 특이적 항체를 이용하여 시료 내에 임질균의 존재 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 임질균의 검출 방법.

청구항 23

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 임질균 특이적 항체를 이용하여, 개체로부터 분리된 생체 시료 내에 임질균의 존재 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 임질 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 분석 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 임질균 특이적 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항생제 저항성 임질균에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 임질은 성병 중 한가지로 나이제리아 고노리아(*Neisseria gonorrhoeae*, 임균) 그람음성균에 의해 발병되는 질환이다. 매년 7천 8백만 명 이상의 새로운 환자가 감염되고 있으며, 특히 세파로스포린 계열의 제3세대 항생제에 저항성을 보이는 균주가 나타나고 있어 세계 공중 보건에 큰 문제로 대두되고 있다.

[0003] 따라서, 임질을 조기에 진단 및 관리하여 컨트롤할 수 있는 빠르고 정확한 진단 제품의 개발에 대한 연구가 필요하며, 특히 항생제 저항성 임균(임질균)을 검출할 수 있는 면역크로마토그래피 기반의 신속 진단 제품이 필요한 실정이다.

[0004] 종래 기술에서는, 고노리아 임균(임질균) 진단법은 환자 샘플을 배양하거나 그람염색법 및 유전자증폭법에 의한 진단이 주로 이루어진다. 그람(Gram) 염색으로 특징적인 그람음성 쌍구균이 호중구(neutrophil) 내에 많이 관찰되면 임상상과 맞추어서 진단 가능하나 그람음성 쌍구균은 상재균으로 있어서 여성에서는 현미경 소견만으로 확진할 수 없어 추가 진단 검사가 필요하다. 현재 많이 사용되고 있는 분자진단법(PCR 및 multiplex PCR)은 배양 및 PCR 법에 시간이 걸리고 장비가 필요하여서, 신뢰도 높은 항체진단법이 필요한 실정이다.

[0005] 하지만, 면역학적 진단법은 고노리아에 대한 특이성이 낮으며, 다른 나이제리아 종(예를 들어, 나이제리아 메닌지티디스)에 대한 교차반응이 있어 추가적인 검사가 필요한 단점이 있다. 따라서 민감도 높으며 고노리아에 특이적으로 결합하는 항체가 필요한 실정이다.

[0006] 현재 임상에서는 특정 항생제가 포함된 배양액에서의 임균 생장이 억제된 최소 항생제 농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 기준으로 항생제 내성을 판정하는 방법을 이용하고 있으며, 특정 내성 유전자를 증폭하거나 항생제 내성 균주를 검출 가능한 면역크로마토그래피 기반의 진단제품이 상용화되어 있지 않다.

[0007] 또한, 현재 항생제 내성 균주에 대한 해결책으로써 솔리스로마이신(solithromycin, CEM-101), 게포티다신(gepotidacin, GSK2140944), 졸리플로다신(zoliflodacin, AZE0914/ETX0914)과 같은 새로운 고노리아 항균제가 임상 개발 단계에 있으나, 고노리아 치료제 및 백신뿐만 아니라 신속하게 고노리아 균을 검출할 수 있는 검출방법의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 특2001-0072121호 (2001.07.31.)

(특허문헌 0002) 한국공개특허 특1996-7002907호 (1996.05.23.)

(특허문헌 0003) 한국공개특허 특1991-0020441호 (1991.12.20.)

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0148986 February 9, 2016

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 발명자들은 신속하게 고노리아 균(특히, 항생제 저항성 임질균)을 검출할 수 있는 검출방법에 대하여 연구하던 중, 특정 아미노산 서열의 상보성 결정부위(CDR, complementarity determining region)를 갖는 항체가 세팔로스포린 계열의 제3세대 항생제에 저항성 특징을 보이는 WHO L 균주에 특이적으로 결합하고, 임상환자로부터 분리한 2종의 임상분리주에 특이적으로 결합하면서도, 임질균 근연종으로 알려진 수막염을 일으키는 나이제리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 및 음성대조균주에 교차반응을 나타내지 않음으로써 임질균 검출에 사용될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 임질균(*Neisseria gonorrhoeae*)에 특이적으로 결합하는 항체 및 이를 포함하는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 측면에 따라, 임질균(*Neisseria gonorrhoeae*)에 특이적으로 결합하는 임질균 특이적 항체, 또는 그 기능적 단편이 제공된다.

[0013] 일 구현예에서, 상기 항체는

[0014] 서열번호 1로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0015] 서열번호 7로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 8로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 9로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0016] 서열번호 13으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 14로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 15로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0017] 서열번호 19로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 20으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 21로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0018] 서열번호 25로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 26으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 27로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0019] 서열번호 31로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 32로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 33으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0020] 서열번호 37로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 38로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 39로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0021] 서열번호 43으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 44로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 45로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄; 및

[0022] 서열번호 49로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 50으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 51로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄와,

[0023] 서열번호 4로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0024] 서열번호 10으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 11로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 12로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0025] 서열번호 16으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 17로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 18로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0026] 서열번호 22로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 23으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 24로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0027] 서열번호 28로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 29로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 30으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0028] 서열번호 34로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 35로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 36으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0029] 서열번호 40으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 41로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 42로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0030] 서열번호 46으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 47로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 48로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄; 및

[0031] 서열번호 52로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 53으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 54로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄를 갖는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편일 수 있다:

[0032] 일 구현예에서, 상기 기능적 단편은 단일 측쇄 항체(scFv)이거나, 항원결합 분절(Fab)이거나, 상기 CDR 영역을 포함하는 가변 도메인(variable domain)일 수 있다.

[0033] 일 구현예에서, 상기 항체는 상기 기재된 CDR-H1 영역, CDR-H2 영역, CDR-H3 영역, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 CDR 영역과의 아미노산 서열상동성이 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상인 CDR 영역을 포함하는 항체, 또는 그 기능적 단편일 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 상기 항체는 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편일 수 있다:

[0035] 서열번호 1로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0036] 서열번호 7로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 8로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 9로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 10으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 11로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 12로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0037] 서열번호 13으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 14로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 15로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 16으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 17로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 18로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0038] 서열번호 19로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 20으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 21로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 22로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 23으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 24로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0039] 서열번호 25로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 26으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 27로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 29로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 30으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0040] 서열번호 31로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 32로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 33으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 34로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 35로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 36으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0041] 서열번호 37로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 38로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 39로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 40으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 41로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 42로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0042] 서열번호 43으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 44로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 45로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 46으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 47로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 48로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체; 및

[0043] 서열번호 49로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 50으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 51로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 52로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 53으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 54로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체.

[0044] 일 구현예에서, 상기 항체는 하기의 중쇄 및 경쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄로 구성되는 항체, 또는 그 기능적 단편일 수 있다:

[0045] 서열번호 55로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 56으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0046] 서열번호 57로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 58로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0047] 서열번호 59로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 60으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0048] 서열번호 61로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 62로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0049] 서열번호 63으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 64로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0050] 서열번호 65로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 66으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0051] 서열번호 67로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0052] 서열번호 69로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 70으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및

[0053] 서열번호 71로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 72로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.

[0054] 일 구현예에서, 상기 항체는 상기 기재된 중쇄 또는 경쇄와의 아미노산 서열상동성이 80% 이상인 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 항체, 또는 그 기능적 단편이거나, 상기 기재된 임질균 특이적 항체와의 아미노산 서열상동성이 70% 이상인 항체, 또는 그 기능적 단편일 수 있다.

[0055] 상기 항체는 단일클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있다.

[0056] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 항체를 생산하는 세포주가 제공된다.

[0057] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 임질균 특이적 항체; 또는 상기 임질균 특이적 항체에 표지물질을 결합한 컨쥬게이트를 포함하는 임질균 검출용 조성물이 제공된다. 일 구현예에서, 상기 임질균은 항생제 저항성 임질균일 수 있으며, 바람직하게는 페니실린, 테트라사이클린, 시프로플록사신 및 세프트리악손으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항생제에 저항성인 임질균일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 임질균은 WHO L 표준균주일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 표지물질은 효소, 루시퍼레이즈, 자성입자, 형광물질 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0058] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 임질균 특이적 항체를 포함하는 임질 치료용 조성물이 제공된다.

[0059] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 임질균 특이적 항체; 또는 상기 임질균 특이적 항체에 표지물질을 결합한 컨쥬게이트를 포함하는 임질 진단용 조성물 및 상기 임질균 진단용 조성물을 포함하는 임질 진단용 키트가 제공된다.

[0060] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 임질균 특이적 항체를 이용하여 시료 내에 임질균의 존재 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 임질균의 검출 방법이 제공된다. 또한, 상기 임질균 특이적 항체를 이용하여, 개체로부터 분리된 생체 시료 내에 임질균의 존재 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 임질 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 분석 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0062] 본 발명에 의해, 특정 아미노산 서열의 상보성 결정부위(CDR)를 갖는 항체가 세팔로스포린 계열의 제3세대 항생제에 저항성 특징을 보이는 WHO L 균주에 특이적으로 결합하고, 임상환자로부터 분리한 2종의 임상분리주에 특이적으로 결합하면서도, 임질균 근연종으로 알려진 수막염을 일으키는 나이제리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 및 음성대조균주에 교차반응을 나타내지 않아서, 임질균 검출에 사용될 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0063] 따라서, 본 발명의 임질균 특이적 항체 및 이를 포함하는 조성물은 임질균의 검출, 임질의 진단 및 치료, 임질균의 검출 방법 및 임질 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 분석 방법에 있어서 환자 맞춤 진단 기술로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0064] **도 1**은 임질균 균주를 배양한 사진이다.

도 2는 세포 기반의 파이지 디스플레이(phage display) 기술을 이용한 임질균 특이적 항체 발굴 방법을 도식화한 것이다.

도 3은 임질균 세포주에 특이적으로 결합하는 파이지-나노항체를 선별한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 임질균 WHO L(표준균주) 세포주에 특이적으로 결합하는 파이지-나노항체를 선별한 결과이다.

도 5는 임질균 특이적 파이지-나노항체의 교차반응을 평가한 그래프이다.

도 6은 동물세포 발현 시스템에서 발현한 항-임질균 나노항체의 결합력 분석 결과이다.

도 7은 동물세포 발현 시스템에서 발현한 항-임질균 나노항체의 개별 임상분리주에 대한 결합력 분석 결과이다.

도 8은 임질균 특이적 항체로 선별된 9종 항체의 항체 중쇄가변영역(VH) 및 상기 항체 경쇄가변영역(VL)의 상보성 결정부위(CDR)의 아미노산 서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0067] 본 발명에서 사용되는 용어 "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 다클론 항체 및 단일클론 항체를 모두 포함하는 개념이다. 또한, 상기 용어는 키메라 항체(예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 이종결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.

[0068] 본 발명에서 사용되는 용어 "단일클론 항체"란 당해 분야에 공지된 용어로서 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도의 특이적인 항체를 의미한다. 통상적으로, 상이한 에피토프(epitope, 항원결정기)들에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론 항체와는 다르게, 단일클론 항체는 항원상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 단일클론 항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 또한 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 또 다른 장점을 갖는다.

[0069] 전형적으로, 면역글로불린은 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역(상기 부위는 "도메인"으로 또한 알려져 있음)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은, "상보성 결정 영역"(complementarity determining region, "CDR"로 표시됨)이라고 불리는 3개의 가변 영역 및 4개의 "구조 영역" (framework region)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬(쇄)의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.

[0070] 본 발명에서 사용되는 용어 "파이지 디스플레이 기술"은 파이지 라이브러리로부터 표적 항원과 유의적인 결합능을 나타내는 파이지만을 선별하는 것을 통해, 항원과의 결합능을 나타내는 scFv를 선별하는 기술을 나타낸다. 상기 기술에서, "패닝(panning)"은 파이지의 외벽(coat)에 펩타이드를 발현(display)하는 파이지 라이브러리로부터 표적 분자(항체, 효소, 세포표면 리셉터 등)와 결합하는 성질을 지닌 펩타이드를 표면에 발현하고 있는 파이지만을 선택해 내는 과정을 일컫는다. 이러한 과정을 3 내지 10회 반복하여, 표적 항원에 대하여 유의적인 결합능을 나타내는 scFv를 선별할 수 있고, 최종적으로 선별된 scFv를 임질균 특이적 항체로 제조할 수 있다.

[0072] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0074] 본 발명은 임질균(*Neisseria gonorrhoeae*)에 특이적으로 결합하는 임질균 특이적 항체, 또는 그 기능적 단편을 제공한다.

[0075] 본 발명에서는 임질균 특이적 나노항체를 스크리닝 및 선별하기 위하여 바이오패닝(도 2 참조)을 반복 진행하여 9종의 파이지-나노항체를 선별하였다(도 3 참조).

[0076] 구체적으로, 상기 항체는

[0077] 서열번호 1로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0078] 서열번호 7로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 8로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 9로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0079] 서열번호 13으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 14로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 15로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0080] 서열번호 19로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 20으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 21로 기재되는 CDR-

H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0081] 서열번호 25로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 26으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 27로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0082] 서열번호 31로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 32로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 33으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0083] 서열번호 37로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 38로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 39로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;

[0084] 서열번호 43으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 44로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 45로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄; 및

[0085] 서열번호 49로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 50으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 51로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 중쇄와,

[0086] 서열번호 4로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0087] 서열번호 10으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 11로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 12로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0088] 서열번호 16으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 17로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 18로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0089] 서열번호 22로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 23으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 24로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0090] 서열번호 28로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 29로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 30으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0091] 서열번호 34로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 35로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 36으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0092] 서열번호 40으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 41로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 42로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;

[0093] 서열번호 46으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 47로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 48로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄; 및

[0094] 서열번호 52로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 53으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 54로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄를 갖는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편일 수 있다.

[0095] 상기 기능적 단편은 단일 측쇄 항체(scFv)이거나, 항원결합 분절(Fab)이거나, 상기 CDR 영역을 포함하는 가변 도메인일 수 있다.

[0096] 또한, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄의 가변 부위가 상기 CDR 영역의 아미노산 서열을 포함하거나 이들 서열과의 상동성이 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상인 서열을 포함할 수 있다.

[0097] 일 구현예에서, 상기 항체는 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그 기능적 단편일 수 있다:

[0098] 서열번호 1로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 2로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 3으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 5로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 6으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0099] 서열번호 7로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 8로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 9로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 10으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 11로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 12로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0100] 서열번호 13으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 14로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 15로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 16으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 17로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 18로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0101] 서열번호 19로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 20으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 21로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 22로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 23으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 24로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0102] 서열번호 25로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 26으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 27로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 29로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 30으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0103] 서열번호 31로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 32로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 33으로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 34로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 35로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 36으로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0104] 서열번호 37로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 38로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 39로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 40으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 41로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 42로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체;

[0105] 서열번호 43으로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 44로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 45로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 46으로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 47로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 48로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체; 및

[0106] 서열번호 49로 기재되는 CDR-H1 영역, 서열번호 50으로 기재되는 CDR-H2 영역 및 서열번호 51로 기재되는 CDR-H3 영역을 포함하는 중쇄 및 서열번호 52로 기재되는 CDR-L1 영역, 서열번호 53으로 기재되는 CDR-L2 영역 및 서열번호 54로 기재되는 CDR-L3 영역을 포함하는 경쇄로 구성되는 항체.

[0107] 일 구현예에서, 상기 항체는 하기의 중쇄 및 경쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄로 구성되는 항체, 또는 그 기능적 단편일 수 있다:

[0108] 서열번호 55로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 56으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0109] 서열번호 57로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 58로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0110] 서열번호 59로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 60으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0111] 서열번호 61로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 62로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0112] 서열번호 63으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 64로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0113] 서열번호 65로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 66으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0114] 서열번호 67로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄;

[0115] 서열번호 69로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 70으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및

[0116] 서열번호 71로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 72로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.

[0117] 일 구현예에서, 상기 항체는 상기 기재된 중쇄 또는 경쇄와의 아미노산 서열상동성이 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상일 수 있다. 또한, 상기 기재된 임질균 특이적 항체와의 아미노산 서열상

동성이 70% 이상인 항체, 또는 그 기능적 단편일 수 있다.

[0118] 상기 항체는 단일클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있다.

[0119] 본 발명은 또한 상기 항체를 생산하는 세포주를 제공한다. 구체적으로, 상기 항체는 scFv(single-chain variable fragment) 부분을 PCR 등의 방법으로 증폭한 후, 백본(backbone) 벡터에 서브클로닝(subcloning)하여 동물세포에 형질주입(transfection)하여 발현시킬 수 있다. 또한, 상기 기능적 단편(Fab, scFc, Vh/Vl)은 상기와 같은 동일한 방법으로 대장균에서 발현시킬 수 있다.

[0120] 상기 특정 서열의 상보성 결정부위(CDR)를 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 항체 경쇄가변영역(VL)을 갖는 항체는 세팔로스포린 계열의 제3세대 항생제에 저항성 특징을 보이는 WHO L 균주에 특이적으로 결합하고(도 4 및 도 6 참조), 임상환자로부터 분리한 2종의 임상분리주에 특이적으로 결합하며(도 7 참조), 임질균 근연종으로 알려진 수막염을 일으키는 나이제리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 및 음성대조균주에 교차반응을 나타내지 않는다는 것(도 5 및 도 6 참조)을 확인하였다.

[0121] 또한, 본 발명은 상기 임질균 특이적 항체; 또는 상기 임질균 특이적 항체에 표지물질을 결합한 컨쥬게이트를 포함하는 임질균 검출용 조성물을 제공한다.

[0122] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 임질균은 항생제 저항성 임질균일 수 있으며, 예를 들어, 페니실린, 테트라사이클린, 시프로플록사신 및 세프트리악손으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항생제에 저항성인 임질균일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 임질균은 WHO L 표준균주일 수 있으며, 이는 세계보건기구(WHO)에서 각 균주의 표현형, 유전적 특징 및 게놈 분석을 진행하여 품질 보증(quality assurance)을 제공하고 있는 표준균주 14종 중 하나이다. 임질균(*N. gonorrhoeae*) WHO L 표준균주는 페니실린, 테트라사이클린, 시프로플록사신 및 제3세대 세팔로스포린 항생제 계열의 세프트리악손에 저항성을 나타내는 특징을 갖고 있어, 항생제 저항성 임질균의 지표로서 사용되고 있다.

[0123] 일 구현예에서, 상기 표지물질은 효소, 루시퍼레이즈, 자성입자, 형광물질 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다. 그러나, 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0124] 본 발명에 따른 상기 검출용 조성물은 본 발명의 단일클론 항체 및 면역학적 분석에 사용되는 시약이 포함될 수 있다. 면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 항원-항체 결합을 원리로 하는 공지의 모든 정량분석방법에 사용되는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 상기 정량분석방법의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 면역블롯팅, 면역침전법, 효소면역분석법, 단백질 칩, 래피트 어세이 및 마이크로 어레이 방법 등이 있다.

[0125] 상기에서 적합한 담체로는 이에 한정되지는 않으나 가용성 담체, 예컨대 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액들 중 어느 한 가지(예를 들어, PBS) 또는 불용성 담체, 예컨대 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교덱스트란, 폴리사카라이드, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0126] 본 발명은 또한 상기 임질균 특이적 항체를 포함하는 임질 치료용 조성물을 제공한다.

[0127] 일 구현예에서, 상기 임질 치료용 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 희석제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0128] 구체적으로, 상기 조성물은 담체로는 단백질, 폴리펩티드, 리포좀, 다당, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 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.

[0129] 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.

[0130] 이러한 목적에 적합한 제형으로는 정제, 환제, 당제(dragee), 산제, 캡슐제, 시럽제, 용액제, 겔제, 현탁제, 에멀젼, 마이크로에멀젼 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 에멀젼 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.

[0131] 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.

[0132] 본 발명의 조성물 또는 약학적 제제의 유효성분으로서 상기 항체는 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.01 내지 50 ㎎/㎏ 체중, 바람직하게는 0.1 내지 20 ㎎/㎏ 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.

[0133] 본 발명은 또한 상기 임질균 특이적 항체; 또는 상기 임질균 특이적 항체에 표지물질을 결합한 컨쥬게이트를 포함하는 임질 진단용 조성물 및 상기 임질균 진단용 조성물을 포함하는 임질 진단용 키트를 제공한다.

[0134] 본 발명은 또한 상기 임질균 특이적 항체를 이용하여 시료 내에 임질균의 존재 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 임질균의 검출 방법을 제공한다. 또한, 상기 임질균 특이적 항체를 이용하여, 개체로부터 분리된 생체 시료 내에 임질균의 존재 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 임질 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 분석 방법을 제공한다.

[0135] 본 발명의 기능적 항체 단편으로는 Fab, Fab', F(ab') 2 , scFv, Diabody, Tribody, dsFv, CDR을 함유하는 펩타이드 등을 들 수 있다.

[0136] Fab는 IgG를 단백질 분해효소 파파인으로 처리하여 수득되는 단편중(H쇄의 224번째의 아미노산 잔기로 절단된다), H쇄의 N 말단측 약 절반과 L쇄 전체가 디설파이드 결합(S-S 결합)으로 결합된 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0137] 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.

[0138] F(ab')2 는 IgG를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 수득되는 단편중(H쇄의 234번째의 아미노산 잔기로 절단된다), Fab가 힌지영역의 S-S 결합을 개재하여 결합된 것보다 약간 큰 분자량 약 10만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0139] 본 발명의 F(ab') 2 는 본 발명의 항체를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 수득할 수 있다. 또는 하기의 Fab'를 티오에테르 결합 또는 S-S 결합시켜 작제할 수 있다. Fab'는 상기 F(ab') 2 의 힌지영역의 S-S 결합을 절단한 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0140] scFv는 1개의 VH와 1개의 VL을 12잔기 이상의 적당한 펩타이드 링커(P)를 사용하여 연결한 VH-P-VL 내지는 VLP-VH 폴리펩타이드로, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

[0141] 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.

[0142] 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.

[0143] 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.

[0144] 또한, linker P 길이가 3-10 일 때는 tribody가 형성되어, tribody로 포함할 수 있다.

[0145] 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.

[0146] 인간 항체 유전다(gene)를 파이지 표면 단백질에 융합시킨 형태로 *E.coli*에서 발현시켜 파이지의 표면에 다양한 항체를 display 할 수 있다. 이 기술을 파이지 디스플레이라고 하며, 인체 내에 존재하는 다양한 조합의 항체 라이브러리(library)를 제작할 수 있다. 이 라이브러리로부터 패닝 방법에 의하여 특정 항원에 결합하는 인간 단일클론 항체를 선별할 수 있다.

[0148] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

[0150] **<실시예>**

[0151] **1. 나이제리아(*Neisseria*) 속 균주의 배양**

[0152] 환자로부터 분리한 8종의 나이제리아 속 균주[*N. gonorrhoeae*(임질균)], *N. sicca*(음성 대조균주), *N. meningitidis*(수막염균, 근연종) 및 *N. gonorrhoeae* WHO L 표준균주를 초콜릿 아가 플레이트(chocolate agar plate)에 배양하여 콜로니를 스크레이프하여(scrape) PBS 버퍼(인산 완충액)로 세척하였다. 그 후, 56 ℃에서 30분간 열처리하여 균주를 불활성화(inactivation)시켰다. 불활성화된 균주는 초콜릿 한천 플레이트에 다시 배양하여 사멸을 확인하였다(도 1 참조).

[0154] **2. 파이지 디스플레이(phage display) 기술을 이용한 임질균 세포 특이적 나노항체의 스크리닝 및 선별**

[0155] 임질균 특이적 나노항체를 스크리닝 및 선별하기 위하여 바이오패닝을 진행하였다. 바이오패닝을 진행하기 위해, 나노항체 라이브러리를 *N. sicca*(음성 대조균주)에 넣고 1시간 동안 교반하여 비특이적으로(non-specific) 결합하는 항체를 디플리션(depletion)시켰다. 디플리션된 나노항체 라이브러리는 임질균 임상분리주 8종 혼합물에 넣어 2시간 동안 반응시켰다. 비특이적 결합체를 세척하여 제거한 후, 임질균 혼합 균주에 결합한 특이적 파이지(phage)-나노항체를 얻기 위하여 100 mM 글리신(glycine, pH 2.1)을 넣고 인큐베이션한 후에 1 M 트리스-염산염(Tris-HCl, pH 8)으로 용출액을 중화시켰다. 파이지 나노항체를 증폭하기 위해, 용출된 용액을 TG1 세포(cell)에 넣어 준 뒤 파이지 나노항체를 발현하고 파이지 역가를 측정하여 다음 회(round)에 사용하였다. 총 3회(R1, R2, R3)까지 파이지 디스플레이를 진행하여 단일 콜로니(single colony)를 획득하였다(도 2 참조).

[0157] **3. 임질균 세포 특이적 저분자 항체의 선별**

[0158] 임질균 세포 특이적 나노항체를 선별하기 위하여 하기와 같이 파이지-ELISA를 진행하였다. 임질균 바이오패닝을 통해 획득한 콜로니 중 576개에 대하여 실험을 진행하였다. 임질균 파이지-나노항체를 실험 전 날 TG1에서 발현시켰다. 면역플레이트(Immunoplate)에 임질균 및 음성대조균주 용해물(lysate) 및 BSA(bovine serum albumin)를 코팅하였다. 다음날 코팅된 플레이트를 3번 PBST(0.05%)(Phosphate Buffered Saline with 0.05% Tween 20)로 세척한 후, MPBST(3% milk PBST)을 넣어 37 ℃에서 1시간 동안 인큐베이션을 진행하였다. 발현된 파이지-나노항체는 3% MPBST로 1시간동안 교반하면서 블로킹(blocking)하였다. 그 후, 파이지-나노항체를 블로킹된 플레이트에 넣고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 플레이트를 6번 PBST(0.05%)로 세척해주고 HRP 컨쥬게이션된 항-M13(horseradish peroxidase conjugated anti-M13) 항체를 플레이트에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 인큐베이션 후 6번 세척하고, TMB(Tetramethylbenzidine)를 넣어 발색을 관찰하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0159] 상기와 같이 실험하여 총 576개 클론 중 임질균 세포 특이적 80종 파이지-나노항체를 확인하였다. 또한, 80종

중 단일 DNA 서열을 가지는 최종 선별된 9종 파이지-나노항체의 임질균 세포주 특이적 결합을 도 3에 나타내었다.

[0161] **4. 임질균 WHO L 표준균주 특이적 나노항체의 선별**

[0162] 세계보건기구(WHO)에서는 임질균(*N. gonorrhoeae*) 표준균주 14종을 선정하여 각 균주의 표현형, 유전적 특징 및 게놈 분석을 진행하여 품질 보증(quality assurance)을 제공하고 있다. 그 중, 임질균(*N. gonorrhoeae*) WHO L 표준균주는 페니실린, 테트라사이클린, 시프로플록사신 및 제3세대 세팔로스포린 항생제 계열의 세프트리악손에 저항성을 나타내는 특징을 갖고 있다. 따라서, WHO L 표준균주에 대한 나노항체의 특이적 결합을 분석하였다.

[0163] 임질균 균주에 특이적 결합을 보이는 파이지-나노항체 80종에 대하여, 임질균 WHO L 표준균주에 대한 결합 여부를 파이지-ELISA 방법으로 확인하였다. 임질균 WHO L 표준균주 및 음성대조균주 용해물을 96-웰 면역플레이트에 코팅하여 파이지-나노항체를 반응시킨 후, TMB 기질(substrate)로 발색하여 결합 여부를 확인하였다.

[0164] 상기와 같이 실험하여 임질균 WHO L 표준균주에 특이적으로 결합하는 63종 파이지-나노항체를 확인하였다. 63종 중 단일 DNA 서열을 가지는 최종 선별된 9종 파이지-나노항체의 임질균 WHO L 표준균주 특이적 결합 결과를 도 4에 나타내었다.

[0166] **5. 임질균 특이적 선별 항체의 교차반응 평가**

[0167] 사람에 집락형성(colonization)하는 나이제리아 속 11종 중에 병원균으로 알려져 있는 균주는 임질균(*N. gonorrhoeae*) 및 수막염균(*N. meningitidis*) 2종이다. 따라서 수막염을 일으키는 *N. meningitidis* 근연종(closely related species)에 대하여 나노항체의 교차반응을 평가하였다.

[0168] 선별 항체 교차반응 평가를 위해 임질균 WHO L 표준균주에 특이적 결합을 보이는 파이지-나노항체 63종을 *N. meningitidis* 근연종에 결합 여부를 분석하였다. *N. gonorrhoeae, N. gonorrhoeae WHO L*(표준균주), 음성대조균주 및 *N. meningitidis*(근연종) 용해물을 면역플레이트에 코팅하여 파이지-나노항체를 반응시킨 후, ABTS[2,2′-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)] 기질로 발색하여 405 nm에서 흡광도 측정하여 그 결합 여부를 확인하였다.

[0169] 상기와 같이 실험하여 *N. meningitidis* 근연종에 결합하는 4종의 파이지-나노항체를 제외한 총 59종 파이지-나노항체를 선별하였다. 59종 중 단일 DNA 서열을 가지는 최종 선별된 9종 파이지-나노항체의 교차반응 평가 결과를 도 5에 나타내었다.

[0171] **6. 동물세포 발현 시스템에서 발현한 항-임질균 나노항체의 나이제리아 균주에 대한 결합력 분석**

[0172] 파이지-나노항체를 동물세포 발현 시스템에서 발현 가능하도록 클로닝 진행하여 나이제리아 균주에 대한 결합력을 분석하였다. 클로닝을 진행하기 위하여 선별한 파이지-나노항체의 scFv(single-chain variable fragment) 부분을 PCR 방법으로 증폭한 후, AgeI 및 HindIII 제한효소로 처리(digestion)하여 동물세포에서 발현 가능한 백본(backbone) 벡터에 서브클로닝(subcloning)을 진행하였다. 그 후, HEK293F 동물세포에 형질주입(transfection) 및 발현하여 상층액을 이용하여 나이제리아 균주에 대한 결합 여부를 분석하였다.

[0173] 선별된 9개 파이지-나노항체의 scFv 부분의 아미노산 서열은 하기 표 1 및 도 8과 같다.

표 1

[0174]

클론	도메인	CDR	서열번호	size
1	VH	H1, H2, H3	1, 2, 3	116
	VL	L1, L2, L3	4, 5, 6	110
2	VH	H1, H2, H3	7, 8, 9	122
	VL	L1, L2, L3	10, 11, 12	110
3	VH	H1, H2, H3	13, 14, 15	121
	VL	L1, L2, L3	16, 17, 18	110
4	VH	H1, H2, H3	19, 20, 21	127
	VL	L1, L2, L3	22, 23, 24	110

5	VH	H1, H2, H3	25, 26, 27	127
	VL	L1, L2, L3	28, 29, 30	110
6	VH	H1, H2, H3	31, 32, 33	121
	VL	L1, L2, L3	34, 35, 36	110
7	VH	H1, H2, H3	37, 38, 39	121
	VL	L1, L2, L3	40, 41, 42	110
8	VH	H1, H2, H3	43, 44, 45	121
	VL	L1, L2, L3	46, 47, 48	110
9	VH	H1, H2, H3	49, 50, 51	116
	VL	L1, L2, L3	52, 53, 54	110

[0175] 동물세포 발현 시스템에서 발현한 항-임질균 나노항체의 나이제리아 균주에 대한 결합 여부를 하기와 같이 분석하였다. 실험 전날, *N. gonorrhoeae, N. gonorrhoeae WHO L*(표준균주), 음성대조균주 및 *N. meningitidis*(근연종) 용해물을 면역플레이트에 코팅하였다. 다음날 코팅된 플레이트를 PBST(0.05%)로 3번 세척한 후, MPBST(3% milk PBST)을 넣어 37 ℃에서 1시간 인큐베이션 진행하였다. 발현된 파이지-나노항체는 3% MPBST로 1시간 동안 교반하면서 블로킹하였다. 그 후, 발현 상층액을 블로킹된 플레이트에 넣고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 플레이트를 PBST(0.05%)로 6번 세척해주고 HRP 컨쥬게이션된 항-마우스 항체를 플레이트에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 인큐베이션 후 6번 세척하고, TMB를 넣어 발색을 관찰하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0176] 상기와 같이 실험하여 동물세포에서 발현한 9종의 항-임질균 나노항체가 *N. gonorrhoeae* 및 *N. gonorrhoeae* WHO L 표준균주에 특이적으로 결합하며, *N. sicca* 및 *N. meningitidis* 음성대조균주에 교차반응하지 않는 것을 확인하였다(도 6 참조). 또한, 상용항체 1번(Artron, Antibody against *N. gonorrhoeae* Ab1)은 *N. sicca* 및 *N. meningitidis* 음성대조균주에 교차반응을 보였으며, 상용항체 2번(Artron, Antibody against *N. gonorrhoeae* Ab2)은 나이제리아 균주에 모두 결합하지 않는 것을 확인하였다. 결론적으로, 본 발명의 발명자가 개발한 9종의 항-임질균 나노항체가 2종의 상용항체보다 더 높은 결합력 및 특이성을 갖는 것으로 확인되었다.

[0178] **7. 동물세포 발현 시스템에서 발현한 항-임질균 나노항체의 개별 임상분리주 2종에 대한 결합력 분석**

[0179] 환자로부터 분리한 개별 임상분리주 2종[임균(gonococcus) 7번 및 11번]에 대하여 동물세포 발현 시스템에서 발현한 항-임질균 나노항체의 결합 여부를 분석하였다. 상기 임상분리주 2종은 환자로부터 분리한 임질 균주로서, 특히 7번 임균은 베타락탐 분해효소를 지니고 있다(#7: 페니실린 저항성, #11: 페니실린 감수성).

[0180] 개별 환자로부터 분리한 2종의 임균(gonococcus) 용해물을 면역플레이트에 코팅하여 발현 상층액을 반응시킨 후, TMB 기질로 발색하여 450 nm에서 흡광도 측정하여 결합 여부를 확인하였다.

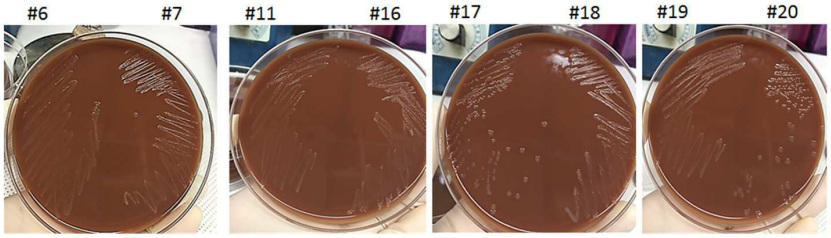
[0181] 상기와 같이 실험하여 동물세포에서 발현한 9종의 항-임질균 나노항체가 2종의 개별 임상분리주에 특이적으로 결합하며 *N. sicca* 및 *N. meningitidis* 음성대조균주에 교차반응하지 않는 것을 확인하였다(도 7 참조). 이에 비하여, 상용항체 1번은 *N. sicca* 및 *N. meningitidis* 음성대조균주에 교차반응을 보였으며, 상용항체 2번은 나이제리아 균주에 모두 결합하지 않는 것으로 확인되었다. 결론적으로 본 발명의 발명자가 개발한 9종의 항-임질균 나노항체가 2종의 상용항체보다 임상분리주에 대하여 더 높은 결합력을 지니는 것으로 확인되었다.

[0183] **8. 결론**

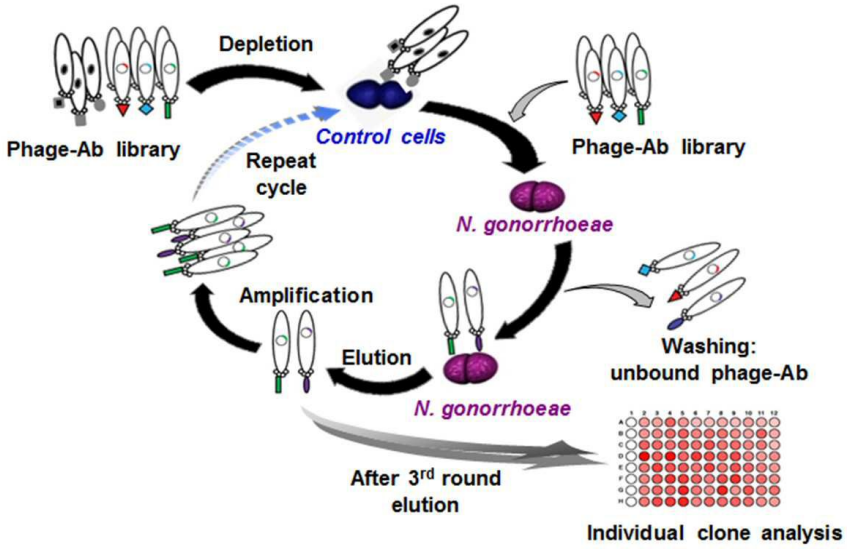
[0184] 본 발명에서는 고노리아 환자 임상분리주 8종을 기반으로 한 파이지-디스플레이 바이로패닝 기술을 이용하여 임균에 특이적으로 결합하는 서로 다른 항-임질균 나노항체 9종을 발굴하였다. 항체의 유용성을 검증하기 위하여 세계보건기구(WHO)에서 선정한 표준균주 중 세팔로스포린 계열의 제3세대 항생제에 저항성 특징을 보이는 WHO L 균주에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였으며, 임질균 근연종으로 알려진 수막염을 일으키는 나이제리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 및 음성대조균주에 항체 교차반응 분석하여 교차반응 없음을 확인하였다. 또한 고노리아 임상환자로부터 분리한 개별 임균 2종에 대하여 특이적 결합을 하는 단일 클론 항체를 확보하였다.

도면

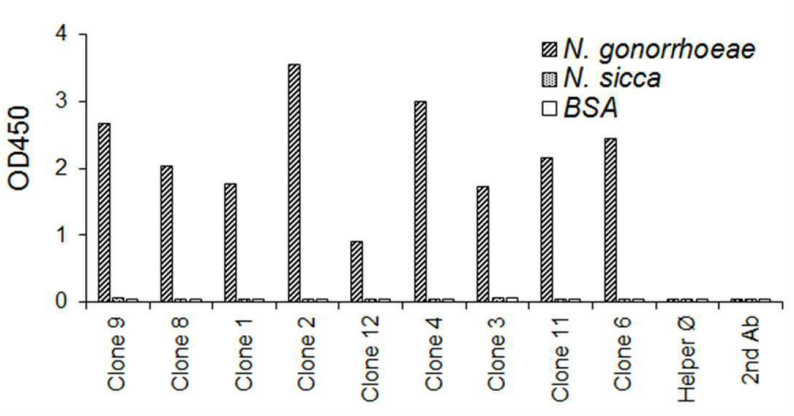
도면1



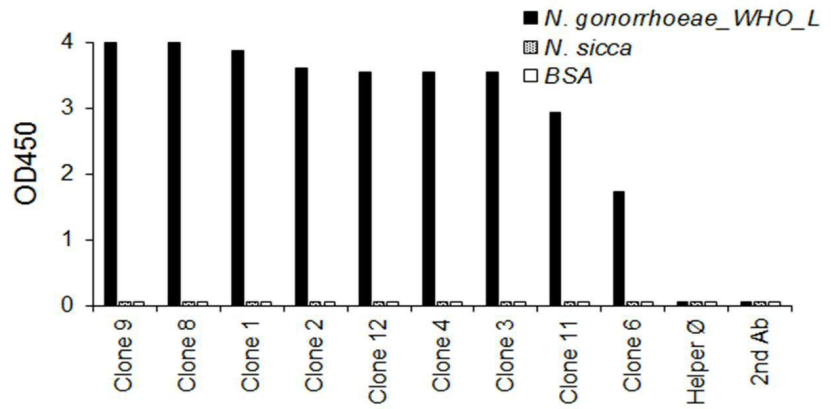
도면2



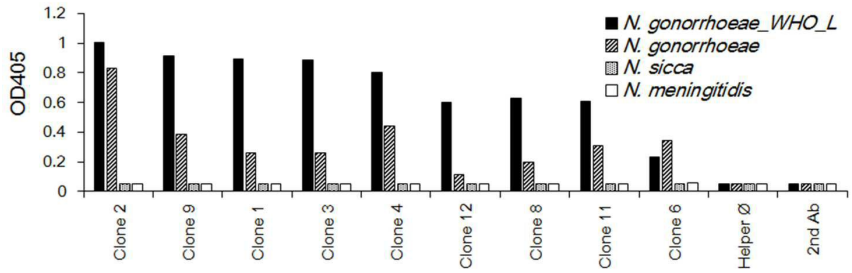
도면3



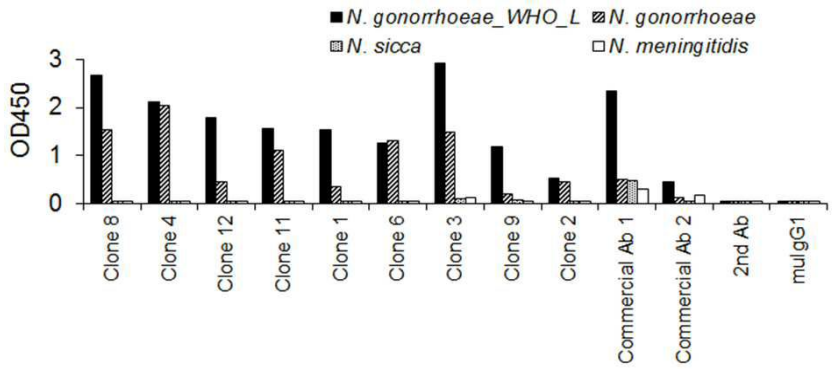
도면4



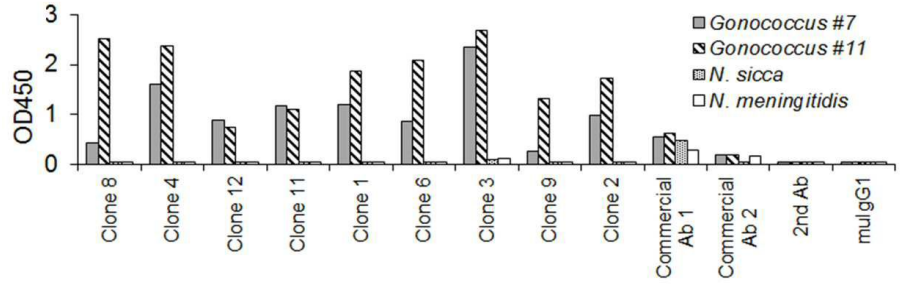
도면5



도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> KANGWON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH & UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION

<120> An antibody specific for Neisseria gonorrhoeae and the use thereof

<130> P171245

<160> 72

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 1-CDR H1

<400> 1

Ser Gly Tyr Ser Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 1-CDR H2

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 1-CDR H3

<400> 3

Arg Thr Asn Gly Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 1-CDR L1

<400> 4

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 1-CDR L2

<400> 5

Ala Asp Ser His Arg Pro Ser

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 1-CDR L3

<400> 6

Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 2-CDR H1

<400> 7

Ser Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 2-CDR H2

<400> 8

Gly Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 2-CDR H3

<400> 9

Lys Gly Pro Thr Thr Leu Gly Pro Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 2-CDR L1

<400> 10

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 2-CDR L2

<400> 11

Ser Asn Ser Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 2-CDR L3

<400

> 12

Ala Ser Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val
1 5 10

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 3-CDR H1

<400> 13

Ser Asn Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 3-CDR H2

<400> 14

Val Ile Ser His Asp Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 3-CDR H3

<400> 15

Lys Asp Pro Ser Tyr Phe Arg Pro Arg Lys Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 3-CDR L1

<400> 16

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Clone 3-CDR L2

<400> 17

Asp Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 3-CDR L3

<400> 18

Gly Ser Trp Asp Ala Ser Leu Asn Ala Tyr Val

1 5 10

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 4-CDR H1

<400> 19

Ser Asp Tyr Ala Met Ser

1 5

<

210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 4-CDR H2

<400> 20

Ala Ile Ser Pro Gly Ser Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 4-CDR H3

<400> 21

Lys His Ser Arg Arg Leu Leu Pro Thr Trp Gly Ser Tyr Asp Asn Gly
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 4-CDR L1

<400> 22

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 4-CDR L2

<400> 23

Ala Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 4-CDR L3

<400> 24

Gly Ser Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val
1 5 10

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 6-CDR H1

<400> 25

Ser Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 6-CDR H2

<400> 26

Leu Ile Ser His Gly Gly Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 6-CDR H3

<400> 27

Arg Tyr Leu Val Asp Leu Tyr Pro Arg Arg Thr Ser Tyr Asp Tyr Ala

1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 6-CDR L1

<400> 28

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Ser

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 6-CDR L2

<400> 29

Ala Asn Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 6-CDR L3

<400> 30

Gly Thr Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 8-CDR H1

<400> 31

Ser Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 8-CDR H2

<400> 32

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

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 8-CDR H3

<400> 33

Arg Gly Ala Pro Arg Val Lys Ser Tyr Lys Phe Asp Tyr

1 5 10

<

210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 8-CDR L1

<400> 34

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Tyr

1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 8-CDR L2

<400> 35

Phe Asp Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 8-CDR L3

<400

> 36

Ala Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Tyr Val

1 5 10

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 9-CDR H1

<400> 37

Ser Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 9-CDR H2

<400> 38

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

1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 9-CDR H3

<400> 39

Lys Gly Arg Arg Tyr Lys Ser Gly Ile Lys Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 9-CDR L1

<400> 40

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Clone 9-CDR L2

<400> 41

Ser Asp Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 9-CDR L3

<400> 42

Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu Ser Ala Tyr Val

1 5 10

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 11-CDR H1

<400> 43

Ser Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 11-CDR H2

<400> 44

Leu Ile Ser His Gly Gly Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 11-CDR H3

<400> 45

Lys Gly Ala Ser His Val Leu Pro Gly Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 11-CDR L1

<400> 46

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 11-CDR L2

<400> 47

Tyr Asn Ser His Arg Pro Ser

1 5

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 11-CDR L3

<400> 48

Gly Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Ala Tyr Val

1 5 10

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 12-CDR H1

<400> 49

Ser Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 12-CDR H2

<400> 50

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

1 5 10 15

Gly

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 12-CDR H3

<400> 51

Arg Trp Ala Gly Asn Phe Asp Tyr

1 5

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 12-CDR L1

<400> 52

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn

1 5 10

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 12-CDR L2

<400> 53

Ala Asn Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 12-CDR L3

<400> 54

Gly Ser Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Ala Tyr Val Phe

1 5 10

<210> 55

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 1-VH

<400> 55

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

85 90 95

Ala Arg Thr Asn Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 56

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 1-VL

<400> 56

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu

85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 57

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 2-VH

<400> 57

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Lys Gly Pro Thr Thr Leu Gly Pro Ser Ala Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 58

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 2-VL

<400> 58

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Ser Leu

85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 59

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 3-VH

<400> 59

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser His Asp Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser 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 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Pro Ser Tyr Phe Arg Pro Arg Lys Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210

> 60

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 3-VL

<400> 60

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Asp Ala Ser Leu

85 90 95

Asn Ala Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 61

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 4-VH

<400> 61

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Pro Gly Ser Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser 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 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys His Ser Arg Arg Leu Leu Pro Thr Trp Gly Ser Tyr Asp Asn

100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 62

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Clone 4-VL

<400> 62

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

1 5 10 15

Gly Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ala Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Asp Tyr Ser Leu

85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 63

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 6-VH

<400> 63

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Leu Ile Ser His Gly Gly Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser 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 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Leu Val Asp Leu Tyr Pro Arg Arg Thr Ser Tyr Asp Tyr

100 105 110

Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 64

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 6-VL

<400> 64

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ala Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Tyr Ser Leu

85 90 95

Ser Gly Tyr Val Leu Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 65

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 8-VH

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser 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 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Pro Arg Val Lys Ser Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 8-VL

<400> 66

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Phe Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Ser Ser Leu

85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu

100 105 110

<210> 67

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 9-VH

<400> 67

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser 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 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Gly Arg Arg Tyr Lys Ser Gly Ile Lys Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 68

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 9-VL

<400> 68

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 69

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 11-VH

<400> 69

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Ser His Gly Gly Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser 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 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ala Ser His Val Leu Pro Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210
> 70

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 11-VL

<400> 70

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Trp Asp Tyr Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 71

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 12-VH

<400> 71

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

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser His Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser 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 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Lys Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Ala Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 72

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 12-VL

<400> 72

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

Ser Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Asp Tyr Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110