



등록특허 10-2149069



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월28일
(11) 등록번호 10-2149069
(24) 등록일자 2020년08월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) *C07K 14/135* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7029324
- (22) 출원일자(국제) 2013년03월14일
심사청구일자 2018년03월07일
- (85) 번역문제출일자 2014년10월20일
- (65) 공개번호 10-2014-0135259
- (43) 공개일자 2014년11월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2013/000627
- (87) 국제공개번호 WO 2013/140247
국제공개일자 2013년09월26일
- (30) 우선권주장
61/613,197 2012년03월20일 미국(US)
61/655,310 2012년06월04일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2010149743 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 30 항

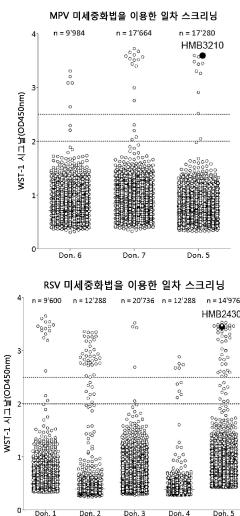
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 RSV, MPV 및 PVM를 중화하는 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화하는, 항체, 및 이의 항원 결합 단편들에 관한 것이다. 본 발명은, 그러한 항체 및 항체 단편을 암호화하는 핵산, 이를 생산하는 불멸화된 B 세포 및 배양된 형질 세포 및 이와 결합하는 폴리펩티드와 관련된 것이다. 게다가, 본 발명은 RSV 또는 MPV 감염 및 RSV 및 MPV 동시-감염을 진단, 치료 및 예방하는데 뿐만 아니라 스크리닝하는 방법에서 본 발명의 항체에 의해 인식되는 항체, 항체 단편 및 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화하는, 분리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이며,

여기서 항체는 단일클론 항체이고, 여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 64 내지 69중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 RSV, MPV 또는 PVM의 F 단백질의 아미노산 말단 부분 보존 영역(conserved region)에 결합하며,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

(i) 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 및 서열번호 3의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열 번호 5, 및 서열번호 35의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; 또는 (ii) 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 및 서열 번호 3의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5, 및 서열번호 6의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는, 분리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 RSV 및 MPV의 전-융합 F 단백질에 특이적으로 결합하고 후-융합 F 단백질에는 결합하지 않는 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 그룹 A 및 그룹 B MPV 뿐만 아니라 그룹 A 및 그룹 B RSV의 감염을 중화하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 MPV 하위그룹 A1, A2, B1 및 B2의 감염을 중화하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, RSV, MPV 또는 PVM의 50%를 중화하는데 필요한 항체 또는 단편의 농도는 500 ng/ml 이하인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제1항에 있어서, 서열번호 13, 또는 서열번호 17 중 어느 하나의 아미노산 서열에 적어도 80% 서열 상동성을 갖는 중쇄 가변영역 또는 서열번호 14, 또는 서열번호 37의 아미노산 서열에 적어도 80% 서열 상동성을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하되,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 CDR은 청구항 1의 CDR로 유지되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

삭제

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 항체, 정제 항체(purified antibody), 단쇄 항체(single chain antibody), Fab, Fab', F(ab')2, Fv 또는 scFv인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

제1항의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 분자이며, 여기서 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 7-12, 15, 16, 18, 36, 또는 38 중 어느 하나의 핵산 서열에 적어도 75% 동일한, 핵산 분자.

청구항 24

제23항의 핵산 분자를 포함하는 백터.

청구항 25

제1항, 제2항 내지 제4항, 제8항, 제15항, 제17항, 및 제19항 중에서 선택된 어느 하나의 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하거나; 또는 제24항의 백터를 포함하는 분리된 세포.

청구항 26

삭제

청구항 27

제1항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제23항의 핵산, 또는 제24항의 백터 및 약학적으로 허용가능한 희석제 (diluent) 또는 캐리어를 포함하는 RSV, MPV, 또는 PVM의 감염 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 28

일차 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

이차 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고,

여기서 상기 일차 항체는 제1항, 제2항 내지 제4항, 제8항, 제15항, 제17항, 및 제19항 중에서 선택된 어느 하나의 항의 항체이고,

상기 이차 항체는 RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염을 중화하는, RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 29

RSV, 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염 치료 또는 예방용으로 사용하기 위한, 제1항, 제2항 내지 제4항, 제8항, 제15항, 제17항, 및 제19항 중에서 선택된 어느 하나의 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 30

제1항, 제2항 내지 제4항, 제8항, 제15항, 제17항, 및 제19항 중에서 선택된 어느 하나의 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 백신의 항원이 정확한 형태로 특정 에피토프를 포함하는지를 체크하여 항-RSV 또는 항-MPV 백신의 퀄리티(quality)를 모니터하기 위한 조성물.

청구항 31

제1항, 제2항 내지 제4항, 제8항, 제15항, 제17항, 및 제19항 중에서 선택된 어느 하나의 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 RSV 또는 MPV 감염 감소용, 또는 RSV 또는 MPV 감염의 위험 낮추기용 조성물.

청구항 32

제1항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제23항의 핵산, 또는 제24항의 백터를 포함하는 RSV 또는 MPV의 *in-vitro* 감염 진단용 조성물.

청구항 33

백신용으로 사용하기 위한, 제1항, 제2항 내지 제4항, 제8항, 제15항, 제17항, 및 제19항 중에서 선택된 어느 하나의 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 34

RSV, 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염 치료 또는 예방용으로 사용하기 위한 제23항의 핵산.

청구항 35

RSV, 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염 치료 또는 예방용으로 사용하기 위한 제24항의 백터.

청구항 36

RSV, 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염 치료 또는 예방용으로 사용하기 위한 제25항의 분리된 세포.

청구항 37

백신용으로 사용하기 위한 제23항의 핵산.

청구항 38

백신용으로 사용하기 위한 제24항의 벡터.

청구항 39

백신용으로 사용하기 위한 제25항의 분리된 세포.

청구항 40

백신용으로 사용하기 위한 제27항의 약학적 조성물.

청구항 41

백신용으로 사용하기 위한 제28항의 약학적 조성물.

청구항 42

제25항의 분리된 세포 및 약학적으로 허용가능한 희석제(diluent) 또는 캐리어를 포함하는 RSV, MPV, 또는 PVM의 감염 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 43

제25항의 분리된 세포를 포함하는 RSV 또는 MPV의 *in-vitro* 감염 진단용 조성물.

청구항 44

제27항의 약학 조성을 포함하는 RSV 또는 MPV의 *in-vitro* 감염 진단용 조성물.

청구항 45

제28항의 약학 조성을 포함하는 RSV 또는 MPV의 *in-vitro* 감염 진단용 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 출원은 2012년 3월 20일 출원된 미국 가출원 No. 61/613,197 및 2012년 6월 4일 출원된 미국 가출원 No. 61/655,310의 우선권 효력을 주장하며, 우선권 출원에 의해 개시된 내용은 전부 본 명세서에 포함되어 있다.

배경 기술

[0002] 호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory Syncytial Virus (RSV)) 및 메타뉴모바이러스(Metapneumovirus (MPV)) 그리고 쥐의 뉴모니아 바이러스(Pneumonia Virus)는 대상 집단을 공유하고 신생아 및 면역력이 약화된 환자들에서 주요 건강상 문제를 대표하는 파라믹소바이러스(*paramyxo virus*)의 패밀리에 속하는 흔한 감기 바이러스들이다.

[0003] RSV는 전세계 유아 및 성인에서 급성 호흡관 질병을 야기하는 주요원인이다. RSV에 아동기에 감염된 어린이 0.5% 내지 3.2% 정도가 입원치료를 필요로하고(Thompson, W.W. et al., 2003, JAMA: *The Journal of the American Medical Association* 289:179-186), 어린이의 5% 내지 10%는 심각한 감염이 지속되고, 이후 천명(wheezing) 및 천식-유사 증상들에 취약하게 만드는 원인인 것으로 알려져 있다. RSV에 대한 면역력은 오래가지 못하고, 따라서 재감염은 빈번하다(Ogra, 2003, *Paediatric Respiratory Reviews* 5 Suppl A:S119-126).

[0004] 인간 MPV는 2001년에 처음으로 분리되었고 지금은 유아와 성인에서 급성 호흡기 감염증의 두번째로 주요 원인으

로 인식되고 있다; 2살 정도의 유아의 50% 이상 그리고 5살 정도의 모든 어린이들을 감염하는 것으로 짐작된다. MPV는 입원하는 어린 아이들의 호흡기 질환의 대략 5 내지 15% 정도를 차지한다. (Alto, 2004, *The Journal of the American Board of Family Practice / American Board of Family Practice* 17:466-469; Williams et al., 2004, *N Engl J Med* 350:443-450). MPV 감염은 위험에 노출된 미숙아, 미숙아의 만성 폐 질환, 울혈성 심장 질환 및 면역 결핍성 질환의 상당한 부담이 된다. (Martino et al., 2005, *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 11:781-796).

[0005] MPV 와 RSV의 동시 감염은 겨울철 흔히 유행하는 질병을 제공할 수 있다. 비록 어떠한 시너지적인 병리학이, 몇몇 MPV 및 RSV 동시-감염된 어린이들에서 관찰되는 특히 심각한 호흡기 질환을 유발하는 악화들이 이들 두 바이러스들 사이에서 일어날 수 있는지는 분명하지 않다(Greensill, 2003, *Emerging Infectious Diseases* 9:372).

[0006] 비록 MPV는 RSV에서 발견되는 비-구조적 유전자 NS1 및 NS2가 부족하나, 뉴모비리내(Pneumoviriniae) 아과의 뉴모바이러스(*Pneumovirus*) 속에 속하는 RSV 및 뉴모비리내(Pneumoviriniae) 아과의 메타뉴모바이러스(*Metapneumovirus*) 속에 속하는 MPV는 그들의 유전적 구조에서 몇 가지 유사성을 가진다. MPV 및 RSV 엔벨롭(envelopes)은 세가지 바이러스성 암호화된 막투과성 표면 당단백질(surface glycoproteins)을 포함한다: 주요 부착 단백질(major attachment protein) G, 융합 단백질(fusion protein) F, 및 작은 소수성 SH 단백질. 비록 RSV 및 MPV 엔벨롭은 기능적으로 유사한 단백질들을 포함하고 있으나, RSV 및 MPV의 F 단백질들은 단지 33%의 아미노산 서열 상동성을 공유할 뿐이라는 점은 주목할만한 점이다. 게다가, RSV 또는 MPV에 대항하여 만들어진 항혈청은 두 바이러스들을 교차-중화(cross-neutralize)하지 않으며 아직 어떠한 단일클론 항체도 RSV 및 MPV 둘다를 교차-중화할 수 있는 것이 분리되지 않았다.

[0007] RSV 및 MPV F 당단백질은 비리온 엔벨롭과 숙주 세포 원형질막 사이를 융합함으로써 바이러스의 침투를 겨냥한다. 감염후에, 세포 표면에서 발현된 F 단백질은 신시튜(syncytia)을 형성하기 위하여 가까운 세포들과 융합을 매개할 수 있다(Collins et al., 1984 *PNAS* 81:7683-7687). 두 경우에서, 단백질 가수분해성 절단에 의해 만들어지고 아미노산의 소수성 구간을 포함하는, 융합 웹타이드로 불리는, F 서브유닛의 N-말단은 융합을 개시하기 위하여 타겟 멤브레인으로 직접적으로 삽입된다. 타겟 세포에 결합하고 차후에 활성화된 이후에, 준안정상태의 (metastable) 전-융합 F 단백질은 타겟 세포 멤브레인 안으로 융합 웹타이드의 삽입을 이끄는 구조 재배열의 시리즈를 겪으며, 이는 바이러스 및 세포 멤브레인이 나란히 놓여진 형태인 안정한 나선형의 번들을 형성한 후에 뒤따른다. 이러한 구조적인 변형은 안정한 후-융합 F 단백질(post-fusion F protein)의 형성을 이끈다.

[0008] RSV 또는 MPV 감염에 대한 백신은 현재까지 구할 수 없다. 1960년대에 시험한 포르말린-불활성 및 알룸(alum)-애쥬반트 RSV 백신(FI-RSV)은 높은 입원율과 심지어 사망에까지 이르게하는, 고열과 심각한 폐렴증상을 유발하는 자연적인 RSV 감염을 이끄는 강화된 질병에 유아들이 취약하다는 것을 발견하였다. (Fulginiti et al., 1969, *American Journal of Epidemiology* 89:435-448; Kapikian et al., 1969, *American Journal of Epidemiology* 89:405-421; Kim et al., 1969, *American Journal of Epidemiology* 89:422-434). 비슷하게, 포르말린-불활성화된 MPV 백신은 어린 원숭이(cynomolgus macaques)에서 면역-매개된 강화된 질병이 관찰되었다(de Swart et al., 2007, *Vaccine* 25:8518-8528). 더욱이 리바비린(Ribavirin)과 같은 항바이러스성 치료법은 RSV 또는 MPV 감염에 효과적이라는 것을 증명하지 못하였다.

[0009] RSV 바이러스에 대한 보호에서 시험 항체의 역할에 대한 증거는 동물 연구 뿐만 아니라 역학(epidemiological)으로부터 알려지고 있다. 유아에서, 모계 전달된 항체의 역가는 심각한 질병에 대한 저항성과 관련이 있고 (Glezen et al., 1981, *The Journal of Pediatrics* 98:708-715) 성인에서 발생율과 하기도 판여의 통증은 혈청 RSV 중화 항체의 레벨이 높을 때 감소된다(McIntosh et al., 1978, *The Journal of Infectious Diseases* 138:24-32). 단일클론 항체, 파리비쥬맙(Palivizumab (Synagis))은 조산아에서 RSV 감염 예방을 위해 등록되었다. 그러나 파리비쥬맙은 RSV 감염 예방에 항상 효과적이지 않고, 치료학적으로 효과적이지 않다. 게다가, 바이러스 균주에 대한 저항성이 존재하여 동물에서는 파리비쥬맙의 존재하에서 RSV의 지속적인 복제가 뒤따른다 (Zhao and Sullender, 2005, *Journal of Virology* 79:3962-3968). 현재까지 MPV 감염 치료 또는 예방을 위한 단일클론 항체는 존재하지 않는다.

[0010] RSV 감염의 가장 심각한 형태를 위한 우수한 동물 모델 부족은 RSV 및 MPV는 숙주-세한적인 뉴모바이러스 병원균이라는 사실과 관련된다. RSV 및 MPV 감염 치료를 위한 새로운 약의 개발은 인간 질병의 모든 증상과 심각함을 보여줄 수 있는 동물 모델이 부족하여 가로막하고 있다. 게다가 RSV 및 MPV는 자연적인 쥐 병원균이 아니며, 심각하고, 비-생리학적인(non-physiologic) 바이러스의 접종에 대한 반응으로 오로지 제한적으로, 최소한으로

증상을 보이고 빠르게 중단된 일차 감염을 유도한다. 쥐의 뉴모니아 바이러스(PVM)는 인간 및 쥐의 RSV와 동일한 과, 아파, 및 속(*Pneumovirus*)에 속하는 자연적인 설치류의 뉴모니아바이러스 병원균이다. PVM F 단백질은 인간 PVM F 단백질과 단지 40%의 아미노산 상동성을 가지고 있으나, RSV에는 존재하지만 PVM에서는 존재하지 않는 M2-L 오버랩(overlap)을 제외하고 동일한 유전적 구조를 가진다. 자연발생적인 쥐 병원균 PVM에 의한 감염은 인간의 유아에서 발생하는 가장 심각한 RSV 형태의 증후와 증상을 대부분을 되풀이한다. PVM 감염은 호흡부전증 및 죽음을 이끄는 심각한 염증 반응을 동반하는 빠른 바이러스 복제에 의해 특징지어진다 (Rosemberg and Domachowske, 2008, *Immunology Letter* 118:6-12). 쥐에서 PVM 감염은 그러므로 인간의 RSV 및 MPV 감염에 대한 가장 관련성이 있는 동물 모델로 생각된다.

[0011] 파리비쥬맙의 치료적 무효력뿐만 아니라 MPV 감염에 대한 예방적 치료 및 RSV 및 MPV에 대한 백신의 부족은 이러한 중요한 인간 병원균들에 대한 새로운 예방 제제 및 치료 제제에 대한 필요성을 강조하고 있다. 동시-감염의 가능성과 확대는 RSV 및 MPV 둘 다의 감염을 치료하거나 무력화하는 것 뿐만 아니라 예방할 수 있는 단일 제제에 대한 요구를 높이고 있으며 이러한 제제를 시험할 수 있는 동물 모델을 필요로 한다. 그러므로, 예를 들어, 적어도 RSV 및 MPV, 그리고 바람직하게는 RSV, MPV 및 PVM의, 다양한 범위의 파라믹소바이러스 (*paramyxoviruses*)들로부터 보호하는 교차-반응성의 중화 항체들에 대한 요구가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 본 발명의 항체가 결합하는 폴리펩티드뿐만 아니라, RSV, MPV, 및 PVM의 감염을 중화하는 중화 항체들의 발견에 부분적으로 근거한다.

[0013] 따라서, 본 발명의 일 측면에서, 본 발명은 RSV, MPV, 및 PVM의 감염을 교차-중화하는, 분리된 항체, 예를 들어 단일클론 항체(monoclonal antibody), 인간 항체(human antibody), 인간 단일클론 항체(human monoclonal antibody), 항체 변이(antibody variant), 또는 항원 결합 단편을 포함한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명은 RSV 및 MPV 둘다의 감염을 중화하는, 분리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화하는, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0015] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 RSV의 전-융합(pre-fusion) F 단백질에 특이적으로 결합하고 RSV 후-융합(post-fusion) F 단백질에는 결합하지 않는, 분리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 RSV 및 MPV의 전-융합 F 단백질에 특이적으로 결합하고 후-융합 F 단백질에는 결합하지 않는, 분리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 RSV, MPV 및 PVM의 전-융합 F 단백질에 특이적으로 결합하고 후-융합 F 단백질에는 결합하지 않는, 분리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0016] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 서열번호 1-6, 19-23, 35, 39-42, 또는 53-54 중에서 선택된 어느 하나와 적어도 95% 서열 상동성을 갖는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(complementarity determining region, (CDR)) 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 상기 항체는 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다.

[0017] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1; 서열번호 2, 서열번호 20, 또는 서열번호 39의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3, 서열번호 21, 서열번호 40 또는 서열번호 53의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 상기 항체는 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다.

[0018] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 상기 항체는 (i) 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 및 서열번호 3의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5, 및 서열번호 35의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; (ii) 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 및 서열번호 3의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5, 및 서열번호 6의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; (iii) 각각 서열번호 1, 서열번호 39, 및 서열번호 40의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 41, 및 서열번호 42의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; (iv) 각각 서열번호 1, 서열번호

39, 및 서열번호 40의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5, 및 서열번호 6의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; (v) 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 및 서열번호 3의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 41, 및 서열번호 42의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; (vi) 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 및 서열번호 21의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 22, 및 서열번호 23의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; (vii) 각각 서열번호 1, 서열번호 39, 및 서열번호 53의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 41, 및 서열번호 54의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; (viii) 각각 서열번호 1, 서열번호 39, 및 서열번호 53의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 22, 및 서열번호 23의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; 또는 (ix) 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 및 서열번호 21의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 41, 및 서열번호 54의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하며, 여기서 상기 항체는 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다.

[0019] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 상기 항체는 (i) 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 및 서열번호 21의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 22 및 서열번호 23의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; (ii) 각각 서열번호 1, 서열번호 39, 및 서열번호 53의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 41, 및 서열번호 54의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; (iii) 각각 서열번호 1, 서열번호 39, 및 서열번호 53의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 22, 및 서열번호 23의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; 또는 (iv) 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 및 서열번호 21의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 4, 서열번호 41, 및 서열번호 54의 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하며, 여기서 상기 항체는 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다.

[0020] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 상기 항체는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하며, 여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다.

[0021] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 상기 항체는 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하며, 여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다.

[0022] 본 발명은 본원에서 HMB3210 (또는 3210); 또는 HMB2430 (또는 2430)으로 기술된, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 더 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 항체 또는 이의 단편은 HMB3210 또는 HMB2430을 생산하는 불멸성 B 세포 클론에 의해 발현된다.

[0023] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함한다. 또한 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하는 세포를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편에 결합하는 에피토프를 포함하는 분리되거나 정제된 면역성 폴리펩티드를 포함한다.

[0024] 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물, 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 벡터, 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 발현하는 세포, 또는 본 발명의 면역성 폴리펩티드, 및 약학적으로 허용가능한 희석제(diluent) 또는 캐리어(carrier)를 더 포함한다. 또한 본 발명은 일차 항

체(first antibody) 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이차 항체(second antibody) 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 포함하며, 여기서 상기 일차 항체는 본 발명의 항체이며, 상기 이차 항체는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이며, 이는 RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다, 또는 RSV, MPV, 및 PVM 세 모두의 감염을 중화한다.

[0025] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의, 본 발명의 핵산의, 본 발명의 핵산을 포함하는 백터의, 본 발명의 백터를 발현하는 세포의, 본 발명의 항체 또는 항체 단편에 결합하는 에피토프를 포함하는 분리되거나 정제된 면역성 폴리펩티드, 또는 (i) RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 동시-감염 치료 또는 경감용 의약품의 제조, (ii) 백신 또는 (iii) RSV 및/또는 MPV 바이러스 감염의 진단에서 본 발명의 약학 조성물의 용도는 또한 본 발명의 관점에서 고려된다. 더욱이, 정확한 형태(conformation)로 특정 에피토프를 포함하는 상기 백신의 항원을 체크하여 RSV 또는 MPV 또는 RSV와 MPV 둘다에 대한 백신의 퀄리티(quality)를 모니터하기 위한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도는 또한 본 발명의 관점에서 고려된다.

[0026] 다른 측면에서, 본 발명은 치료적으로 유효한 양의 본 발명의 항체 또는 항원 결합 항체 단편을, 이를 필요로하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 RSV 및 MPV 감염을 감소하거나 또는 RSV 및 MPV 감염의 위험을 낮추는 방법을 포함한다.

[0027] 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 치료에, (ii) RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염 치료 또는 경감용 의약품의 제조에, (iii) 백신으로, 또는 (iv) RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염을 중화할 수 있는 리간드를 스크리닝하는데 사용을 위한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0028] 본 발명은 부분적으로, 본 발명의 항체들이 결합하는 에피토프뿐만 아니라, RSV 및 MPV 모두 또는 RSV, MPV, 및 PVM를 교차-중화하는 항체들의 발견 및 분리에 근거한다. 그러한 항체들은 단지 하나의 또는 몇몇의 항체들 만이 RSV 및 MPV 모두 또는 RSV, MPV, 및 PVM를 중화하기 위해 필요하기에 바람직하다. 게다가, 그러한 교차-중화 항체는 RSV 및/또는 MPV 감염 치료를 위한 항체를 포함하는 의약품의 생산 비용을 줄이기 위하여 고역가에 생산된다. 게다가, 그러한 항체들에 의해 인식된 에피토프는 RSV 및 MPV 둘다에 대해 광범위한 보호를 유도할 수 있는 백신의 부분이 될 수 있다.

[0029] 비록 본 발명의 항체들은 본 발명의 몇몇 실시예에서 RSV, MPV, 및 PVM을 중화하는데, 예를 들어 백신 등의 개발, 질병의 치료 등에 관련되 것으로, 본 명세서에서는 RSV 및 MPV은 인간 병원균으로 개시하고 있으며, 반면 PVM은 쥐 병원균으로 개시한다. 본원에서 사용되어진, 용어 "RSV 및 MPV" 및 "RSV, MPV, 및 PVM"은 문맥에 따라서 상호교환적으로 사용된다.

[0030] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 RSV 및 MPV 둘다 또는 RSV, MPV, 및 PVM를 중화하는, 분리된 항체, 항체 변이 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 RSV는 인간 RSV이다. 다른 실시예에서, 상기 RSV는 소의 RSV이다. 본 발명의 항체는 인간 RSV (hRSV) 및 소의 RSV (bRSV) 모두를 중화한다. 다른 실시예에서, 상기 MPV는 인간 MPV이다.

[0031] 일 실시예에서, 본 발명은 또한 그룹 A 및 그룹 B RSV 둘다의 감염을 중화하는, 분리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 그룹 A 및 그룹 B MPV의 감염을 중화하는, 분리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 그룹 A 및 그룹 B MPV 둘다 뿐만 아니라, 그룹 A 및 그룹 B RSV 둘다의 감염을 중화하는, 분리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0032] 앞서 언급한 바와 같이, RSV, MPV, 및 PVM은 그들의 유전적인 구조에서 몇 가지 유사성을 가지고 있다. G 및 F 단백질의 아미노산 서열은 RSV 및 MPV 모두에서 A 그룹과 B 그룹으로 나뉘어진다; MPV는 다시 4개의 하위그룹으로 나뉜다: A1, A2, B1 및 B2. PVM은 그룹 또는 하위그룹으로 다시 나뉘지 않는다. 상기 RSV, MPV 또는 PVM F 단백질은 타입 I 트랜스-멤브레인(trans-membrane) 표면 단백질이며, 이는 N-말단 절단 시그널 펩타이드 및 C-말단 근처에 멤브레인 앵커(membrane anchor)를 가지고 있다. RSV 및 MPV F 단백질은 불활성화된 FO 전구체로 합성되며, 이는 동형 삼량체(homotrimers)로 조립되고 절단에 의해 활성화된다. 상기 F 단백질은 세개의 도메인(DI 내지 DIII), 융합 펩티드(FP) 그리고 세개의 헵타드(heptad)-반복 영역(HR-A, -B 및 -C)에 의해 만들어진다. RSV 및 MPV F 단백질은 비리온 엔벨롭(virion envelope) 및 호스트(host) 세포 원형질막 사이의 융합에 의한 바이러스의 침투를 총괄한다. 두 경우 모두, 단백질가수분해 절단에 의해 만들어지고 융합 펩티드를 포함하는, F 서브유닛의 N-말단이 직접적으로 융합을 개시하고자하는 타겟 멤브레인안으로 삽입된다. 타겟 세포에 결합하고 차후에 활성화된 이후에, 준안정상태의(metastable) 전-융합 F 단백질은 타겟 세포 멤브레인 안으로 융

합 팹타이드의 삽입을 이끄는 구조 재배열의 시리즈를 겪으며, 이는 바이러스 및 세포 멤브레인이 나란히 놓여진 형태인 안정한 나선형의 변들을 형성한 후에 뒤따른다. 이러한 구조적인 변형은 안정한 후-융합 F 단백질(post-fusion F protein)의 형성을 이끈다. 감염된 이후에, 감염된 세포의 세포 표면에 발현된 F 단백질은 많은 다핵질(syncytia)을 형성하는 인접한 비-감염된 세포들과 융합을 매개할 수 있다.

[0033] 파리비쥬맙 및 모타비쥬맙에 대한 에피토프들은 잔기 255-275에 의해 형성된 후-융합 RSV F 단백질 항원결정 부위II (또한 사이트 A라고 불림)에서 발견된다. MAB19 및 101F은 잔기 422-438에 의해 형성된 RSV의 후-융합 RSV F 단백질 항원결정 부위 IV (또한 사이트 C로 불림)를 타겟으로 한다. MAB19는 임상시험에서 시험되었으나 충분한 효능을 보이는데 실패하였다(Johnson et al., 1999, *The Journal of Infectious Diseases* 180:35-40; Meissner et al., 1999, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1183-1188).

[0034] 효력 발생을 위하여, 항체들은 전-융합 F 단백질을 인식해야하는데, 이는 바이러스 침입을 차단하기 적절한 형태이며, 바람직하게 유인용으로 행동할 수 있는 풍부한 후-융합 F 단백질의 인식을 피해야한다. 이는 항체를 소비하고 효능을 감소시키게 된다. 지금까지 RSV 후-융합 F 단백질이 아닌 RSV 전-융합 F 단백질을 인식하는 항체가 분리되지 않았다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명은 RSV 전-융합 F 단백질과 특이적으로 결합하고 RSV 후-융합 F 단백질과는 결합하지 않는, 분리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 RSV 및 MPV의 전-융합 F 단백질과 특이적으로 결합하지만 후-융합 F 단백질과는 결합하지 않는, 분리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 RSV, MPV, 및 PVM의 전-융합 F 단백질과는 특이적으로 결합하지만 후-융합 F 단백질과는 결합하지 않는 항체를 제공한다.

[0036] 본 발명은 RSV, MPV 및 PVM의 F 단백질에 결합하는 항체를 제공한다. RSV 및 MPV 사이 또는 RSV 및 PVM F 단백질 사이에, 각각 단지 대략 33% 및 40%의 아미노산 서열 상동성을 가지고 있다는 사실에도 불구하고, 본 발명의 항체는 RSV, MPV 및 PVM F 단백질에 존재하는 공유 에피토프를 인식한다. 이 에피토프는 파리비쥬맙, 모타비쥬맙, mAb 101F 등과 같이 지금까지 알려진 항체들에 의해 인식되어진 그것들과는 다르다. 본 발명의 항체들은 예를 들어, 항원결정 부위 II (모타비쥬맙 및 파리비쥬맙에 의해 인식되는), 또는 항원결정 부위 IV (recognized by mAb 101F에 의해 인식되는), 또는 항원결정 부위 I (mAb 131-2A에 의해 결합되는) 중 어디에도 결합하지 않는다. RSV F 단백질에 본 발명의 항체의 의해 인식되는 에피토프는 또한 RSV에만 오로지 특이적인 항체, mAb D25에 의해 인식되는 것과 구별된다. 게다가, MPV F 단백질에 본 발명의 항체에 의해 인식되는 에피토프들은 mAb 234 (이는 RSV F 단백질의 항원결정 부위 II에 부합하는 MPV F 단백질의 에피토프를 인식한다)에 의해 인식되는 것과 구별된다. 일반적으로, 본 발명의 항체들은 입체 배좌의(conformational) 에피토프를 인식한다. 일 실시예에서, 입체 배좌의 에피토프는 오로지 비-리듀싱 조건하에서만 존재한다. 다른 실시예에서, 입체배좌의 에피토프는 F 단백질의 아미노산 잔기들 사이의 이황화 결합의 존재에 의존한다.

[0037] 여기서 보이는 바와 같이 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 RSV 및 MPV 둘다의 몇몇 다른 스트레인들에 특이적으로 결합하고, 그리고 RSV 및 MPV 둘다를 중화한다. 게다가, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은, 모든 부합하는 MPV 하위 그룹들(즉 A1, A2, B1, 및 B2)을 포함하는, 그룹 A MPV 및 그룹 B MPV 둘다 뿐만 아니라 그룹 A RSV 및 그룹 B RSV 둘다에 특이적으로 결합하고 교차-중화한다.

[0038] 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 높은 중화 능력(neutralizing potency)을 가진다. RSV, MPV 및 PVM의 50% 중화를 위해 필요한 본 발명의 항체의 농도는 예를 들어, 약 500 ng/ml 또는 그 이하이다. 일 실시예에서, RSV, MPV 및 PVM의 50% 중화를 위해 필요한 본 발명의 항체의 농도는, 약 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60 또는 약 50 ng/ml 또는 이하이다. 이것은 RSV, MPV 및 PVM의 50% 중화를 위해 단지 낮은 농도의 항체가 필요하다는 것을 의미한다. 특이성(Specificity) 및 역가(potency)는 본 발명의 통상의 기술자에게 잘 알려진 표준 분석법을 이용하여 측정될 수 있다.

[0039] 본 발명의 항체는 인간 항체(human antibodies), 단일클론 항체(monoclonal antibodies), 인간 단일클론 항체(human monoclonal antibodies), 재조합 항체(recombinant antibodies) 또는 정제된 항체(purified antibodies)일 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 항체의 단편을 제공하며, 특히 단편은 항체의 항원-결합 능력을 보유한다. 그러한 단편은 단쇄 항체(single chain antibodies), Fab, Fab' F(ab')₂, Fv 또는 scFv을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 비록 청구항을 포함한 발명의 상세한 설명이, 몇몇 부분에서, 분명하게 항체의 항원 결합 단편(들), 항체 단편(들), 변이(들) 및/또는 유도체(들)이라고 언급할 수 있으나, 용어 "항체" 또는 "본 발명의 항체"는 항체의 모든 범주, 즉, 항체의 항원 결합 단편(들), 항체 단편(들), 변이(들) 및/또는 유도체(들)을 포함하는 것으로 이해된다.

[0040] 각각 중쇄의 3개의 CDRs 및 경쇄의 3개의 CDRs를 포함하는, 본 발명의 몇몇 항체들의 중쇄 및 경쇄의 서열은 결정된다. CDR 아미노산의 위치는 IMGT 넘버링 시스템에 따라 정의된다. 본 발명의 항체의 CDRs, 중쇄들, 경쇄들을 암호화하는 핵산 분자의 서열뿐만 아니라, CDRs, 중쇄들, 경쇄들의 서열은 서열 목록에 개시되어 있다. 항체 중쇄들의 CDRs 는 각각 CDRH1 (또는 HCDR1), CDRH2 (또는 HCDR2) 및 CDRH3 (또는 HCDR3)로 언급되어진다. 유사하게, 항체 경쇄들의 CDRs 는 각각 CDRL1 (또는 LCDR1), CDRL2 (또는 LCDR2) 및 CDRL3 (또는 LCDR3)로 언급되어진다. 표 1은 본 발명의 모범적인 항체들의 각각의 중쇄 및 경쇄의 6개의 CDRs 아미노산 서열에 대한 서열 번호 숫자를 제공한다.

[0041] 하기 표 1은 RSV, MPV 및 PVM을 중화하는 항체들의 CDR 폴리펩티드에 대한 서열목록 숫자를 나타낸다.

표 1

	CDR 폴리펩티드 서열번호					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
3210 변이 1	1	2	3	4	5	6
3210 변이 2	1	2	3	4	5	6
3210 변이 3	1	2	3	4	5	35
3210 변이 4	1	39	40	4	41	42
3210 변이 5	1	39	40	4	5	6
3210 변이 6	1	2	3	4	41	42
2430 변이 1	19	20	21	4	22	23
2430 변이 2	19	20	21	4	22	23
2430 변이 3	1	39	53	4	41	54
2430 변이 4	1	39	53	4	22	23
2430 변이 5	19	20	21	4	41	54

[0043] 일 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 서열번호 1-6, 19-23, 35, 39-42, 또는 53-54 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 상동성을 가지는 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR 을 포함한다. 항체 3210 및 항체 2430 의 변이의 CDRs는 각각 도 24 및 도 25에서 제공된다(CDRs 은 볼드체로 강조하였다).

[0044] 다른 실시예에서, 본 발명은 3210 변이 1, 3210 변이 2, 3210 변이 3, 3210 변이 4, 3210 변이 5, 3210 변이 6, 2430 변이 1, 2430 변이 2, 2430 변이 3, 2430 변이 4 또는 2430 변이 5로부터 중쇄 CDRs 하나 이상(즉, 하나, 둘 또는 모든 셋)을 포함하는 중쇄를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다.

[0045] 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 1 또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1; 서열번호 2, 서열번호 20 또는 서열번호 39의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3, 서열번호 21, 서열번호 40 또는 서열번호 53의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 1 또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1; 서열번호 2, 서열번호 20 또는 서열번호 39의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3, 서열번호 21, 서열번호 40 또는 서열번호 53의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 을 포함한다. 특정 실시예에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 항체 단편은 (i) CDRH1에 서열번호 1, CDRH2에 서열번호 2 및 CDRH3에 서열번호 3, (ii) CDRH1에 서열번호 1, CDRH2에 서열번호 39 및 CDRH3에 서열번호 40, (iii) CDRH1에 서열번호 19, CDRH2에 서열번호 20 및 CDRH3에 서열번호 21, 또는 (iv) 또는 CDRH1에 서열번호 1, CDRH2에 서열번호 39, 및 CDRH3에 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다.

[0046] 또한 제공되는 것은 3210 변이 1, 3210 변이 2, 3210 변이 3, 3210 변이 4, 3210 변이 5, 3210 변이 6, 2430 변이 1, 2430 변이 2, 2430 변이 3, 2430 변이 4 또는 2430 변이 5로부터 하나 이상(즉, 하나, 둘 또는 모든 셋)의 경쇄 CDRs를 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편이다. 일 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1; 서열번호 5, 서열번호 22 또는 서열번호 41의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2; 및 서열번호 6, 서열번호 23, 서열번호 35, 서열번호 42 또는 서열번호 54의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3를 포함한다. 특정 실시예에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 항체 단편은 (i) CDRL1에 서열번호 4, CDRL2에 서열번호 5, 및 CDRL3에 서열번호 6; (ii) CDRL1에 서열번호 4, CDRL2에 서열번호 5, 및 CDRL3에 서열번호 35; (iii) CDRL1에 서열번호 4, CDRL2에 서열번호 41 및 CDRL3에 서열번호 42; (iv) CDRL1에 서열번호 4, SCDRL2에 서열번호 22, 및 CDRL3에 서열번호 23; 또는 (v) CDRL1에 서열번호 4,

CDRL2에 서열번호 41, 및 CDRL3에 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0047] 일 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 표 1에 기재된 항체 3210 변이 1의 CDRs 모두를 포함하고, RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 표 1에 기재된 항체 3210 변이 2의 CDRs 를 모두 포함하고 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 항체 3210 변이 3의 CDRs 모두를 포함하고, RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 항체 3210 변이 4의 CDRs 모두를 포함하고, RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 항체 3210 변이 5의 CDRs 모두를 포함하고, RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 항체 3210 변이 6의 CDRs 모두를 포함하고, RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다.

[0048] 일 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 표 1에 기재된 항체 2430 변이 1의 CDRs 모두를 포함하고, RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 표 1에 기재된 항체 2430 변이 2의 CDRs 를 모두 포함하고 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 항체 2430 변이 3의 CDRs 모두를 포함하고, RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 항체 2430 변이 4의 CDRs 모두를 포함하고, RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 항체 2430 변이 5의 CDRs 모두를 포함하고, RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화한다.

[0049] 본 발명의 바람직한 항체들의 중쇄 가변영역 (VH) 및 경쇄 가변영역 (VL) 아미노산 서열에 대한 서열번호와 이들을 암호화하는 핵산 서열에 대한 서열번호를 표 2에 나타냈다.

[0050] 하기 표 2는 RSV, MPV 및 PVM를 중화하는 항체를 위한 V_H 및 V_L 아미노산 및 핵산 잔기의 서열번호를 나타낸다.

표 2

	V_H 사슬	V_L 사슬	V _H 및 V _L 아미노산 및 핵산 잔기 서열번호			
			V _H 아미노산	V _L 아미노산	V _H 핵산	V _L 핵산
3210 변이 1	VH.1	VL	13	14	15	16
3210 변이 2	VH.2	VL	17	14	18	16
3210 변이 3	VH.2	VL.3	17	37	18	38
3210 변이 4	VH.3	VL.4	49	50	51	52
3210 변이 5	VH.3	VL	49	14	51	16
3210 변이 6	VH.2	VL.4	17	50	18	52
2430 변이 1	VH.1	VL	29	30	31	32
2430 변이 2	VH.2	VL	33	30	34	32
2430 변이 3	VH.3	VL.2	59	60	61	62
2430 변이 4	VH.3	VL	59	30	61	32
2430 변이 5	VH.2	VL.2	33	60	34	62

[0052] 일 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 서열번호 13, 17, 29, 33, 49 또는 59중 어느 하나에 나열된 서열에 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 서열번호 14, 30, 37, 50 또는 60에 나열된 서열에 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 도 24 및 25에 제공된 서열에 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 또는 경쇄 가변영역을 포함한다.

[0053] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 이는 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화하고, 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영

역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함한다.

[0054] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 이는 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화하고, 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함한다.

[0055] 본 발명의 항체의 예들은 HMB3210 변이 1, HMB3210 변이 2, HMB3210 변이 3, HMB3210 변이 4, HMB3210 변이 5, HMB3210 변이 6, HMB2430 변이 1, HMB2430 변이 2, HMB2430 변이 3, HMB2430 변이 4 또는 HMB2430 변이 5를 포함하나, 이들에 제한되지 않는다.

[0056] 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편으로써 동일한 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 단편, 또는 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁하는 항체를 더 포함한다.

[0057] 표 1 및 2에서 볼 수 있듯이, 개시된 항체들의 CDRs, 중쇄들 및 경쇄들은 그들의 결합 능력 및 중화 능력을 유지하는 새로운 항체들을 제공하기 위하여 상호교환될 수 있다. 본 발명의 항체들은 표 1에서 제공되는 CDRs 또는 표 2에서 제공되는 중쇄 및 경쇄들의 어떤 조합을 포함하는 항체 및 항원 결합 단편을 포함한다.

[0058] 본 발명의 항체는 동일한 에피토프에 대해 다른 항체로부터 하나 또는 그 이상의 CDRs를 그리고 항체로부터 하나 또는 그 이상의 CDRs를 포함하는 하이브리드 항체 분자를 포함한다. 일 실시예에서 그러한 하이브리드 항체는 동일한 에피토프에 다른 항체들로부터의 세 개의 CDRs 및 본 발명의 항체로부터 세 개의 CDRs를 포함한다. 바람직한 하이브리드 항체는 (i) 같은 에피토프에 대한 다른 항체로부터의 세 개의 중쇄 CDRs 및 본 발명의 항체로부터의 세 개의 경쇄 CDRs, 또는 (ii) 같은 에피토프에 대한 다른 항체로부터의 세 개의 경쇄 CDRs 및 본 발명의 항체로부터의 세 개의 중쇄 CDRs를 포함한다.

[0059] 변이 항체들은 또한 본 발명의 관점에 포함되어진다. 따라서, 본 명세서에 나열된 서열의 변이들은 또한 본 발명의 관점에 포함되어진다. 그러한 변이들은 *in vivo*에서 면역 반응 동안 또는 *in vitro*에서 불멸화된 B 세포 클론의 배양에서 체세포 돌연변이에 의해 반들어진 자연적인 변이들을 포함한다. 다르게 말해서, 변이들은 유전적 코드의 축퇴(degeneracy) 때문에 발생할 수 있고 또는 전사 또는 번역에서 오류때문에 만들어질 수 있다.

[0060] 게다가 향상된 친화도(affinity) 및/또는 역가(potency)를 갖는 항체 서열들의 변이들은 기술분야에 알려진 방법들을 이용하여 얻을 수 있으며 본 발명의 관점에서 포함되어진다. 예를 들어, 아미노산 치환은 더 향상된 친화도를 갖는 항체를 얻는데 이용될 수 있다. 대신에, 뉴클레오티드 서열의 코돈 최적화는 항체의 생산을 위한 발현 시스템에서 번역의 효율을 향상시키기 위하여 이용될 수 있다. 게다가, 본 발명의 핵산 서열 중 어느 하나에 유도 진화(directed evolution) 방법의 적용에 의한 항체 특이성 또는 중화력을 위해 최적화된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 또한 본 발명의 관점에 포함된다.

[0061] 일 실시예에서, 변이 항체 서열은 본 명세서에 나열된 서열과 70& 이상(즉, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 아미노산 서열 상동성을 공유할 수 있다. 몇몇 실시예에서 그러한 서열 상동성은 참조 서열(reference sequence)의 전장에 대해 측정하였다(즉, 명세서에 나열된 서열들). 몇몇 추가적인 실시예에서, 본원에 언급되어진 바와 같이, 퍼센트 유사성(percentage identity)은 NCBI에 명기된 디폴트 파라미터를 이용하여 BLAST version 2.1.3 를 이용해 결정되어진다(the National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosom 62 matrix; gap open penalty=11 and gap extension penalty=1].

[0062] 다른 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 경쇄 및 중쇄 및 CDRs의 일부 또는 전부를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본원에 제공된 것은 본 발명의 바람직한 항체들의 경쇄 및 중쇄 및 CDRs 의 전부 또는 일부를

암호화하는 핵산 서열이다. 표 2는 본 발명의 몇몇 예시적인 항체들의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 암호화하는 핵산 서열에 대한 서열번호를 제공한다. 표 3은 본 발명의 바람직한 항체들의 CDRs를 암호화하는 핵산 서열에 대한 서열번호를 제공한다. 유전적 코드의 불필요한 중복(redundancy) 때문에, 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 이러한 핵산 서열의 변이들은 존재할 것이다.

[0063] 표 3은 RSV, MPV 및 PVM을 중화하는 항체의 CDR 폴리뉴클레오티드 서열번호를 나타낸다.

표 3

	CDR 폴리뉴클레오티드 서열번호					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
3210 변이 1	7	8	9	10	11	12
3210 변이 2	7	8	9	10	11	12
3210 변이 3	7	8	9	10	11	36
3210 변이 4	43	44	45	46	47	48
3210 변이 5	43	44	45	10	11	12
3210 변이 6	7	8	9	46	47	48
2430 변이 1	24	25	26	10	27	28
2430 변이 2	24	25	26	10	27	28
2430 변이 3	55	44	56	57	47	58
2430 변이 4	55	44	56	10	27	28
2430 변이 5	24	25	26	57	47	58

[0065] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 핵산 서열은 본 발명의 항체의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 핵산에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 핵산 서열은 본 발명의 항체의 경쇄 또는 중쇄 CDR을 암호화하는 핵산의 서열을 가진다. 예를 들어, 본 발명에 따른 핵산 서열은 서열번호 7-12, 15, 16, 18, 24-28, 31-32, 34, 36, 38, 43-48, 51-52, 55-58, 또는 61-62의 핵산 서열에 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0066] 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 핵산 서열은 도 24 및 25에서 제공되는 본 발명의 항체의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 핵산에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0067] 추가로 본 발명의 관점에 포함되는 것은 벡터, 예를 들어, 발현 벡터이며, 이는 본 발명에 따른 핵산 서열을 포함한다. 그러한 벡터들로 변형된 세포들은 또한 본 발명의 관점에 포함된다. 그러한 세포들의 예들은 진핵세포, 예를 들어, 효모 세포, 동물 세포 또는 식물 세포를 포함하나, 이들에 제한되지 않는다. 일 실시예에서 세포들은 포유류, 예를 들어 인간, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, 미엘로마(myeloma) 또는 하이브리도마 세포(hybridoma cells)이다.

[0068] 본 발명은 또한 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편을 결합할 수 있는 에피토프에 결합하는 단일클론 항체들에 관한 것이다.

[0069] 단일클론 및 재조합 항체들은 그들이 유도된 것에 대한 각각의 폴리펩티드 또는 다른 항원들의 정체 및 동정에 특히 유용하다. 본 발명의 항체들은 면역분석법(immunoassays), 방사 면역 검정법(radioimmunoassays (RIA)) 또는 효소 결합 면역 흡착법(enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA))에서 시약으로 적용될 수 있다는 것이 추가적인 유용성이다. 이러한 적용에서, 항체들은 방사성 동위 원소, 형광 분자 또는 효소와 같은 분석적으로-검출되는 시약으로 레이블될 수 있다. 항체들은 또한 항원들의 분자 동정 및 특징규명(에피토프 맵핑(epitope mapping))에 이용될 수 있다.

[0070] 본 발명의 항체는 RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다에 감염된 세포와 같은, 관심대상이 되는 세포들을 포함한 부위의 이미징을 가능하게하기 위한 검출가능한 레이블에 커플링되거나 치료 부위에 운송하기 위한 약물에 커플링될 수 있다. 항체를 약물 및 검출가능한 레이블에 커플링하는 방법은, 검출가능한 레이블을 이용한 이미징 방법으로, 업계에 잘 알려져 있다. 레이블된 항체는 광범위하게 레이블을 이용하는, 많은 분석법에서 이용될 수 있다. 본 발명의 항체와 관심대상이 되는 에피토프(에피토프 또는 RSV 또는 MPV 또는 둘 다) 사이의 항체-항원 복합체의 형성의 발견은 항체에 검출가능한 물질을 부착함으로써 가능할 수 있다. 적절한 검출 방법은 방사성

핵종(radionuclides), 효소(enzymes), 조효소(coenzymes), 형광 물질(fluorescers), 화학 발광(chemiluminescers), 색원체(chromogens), 효소 물질 또는 보조인자(enzyme substrates or co-factors), 효소 억제제(enzyme inhibitors), 보결분자단 복합체(prosthetic group complexes), 자유 라디칼(free radicals), 미립자(particles), 염료(dyes) 등과 같은 레이블의 사용을 포함한다. 적절한 효소의 예들은 호스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), β -갈اكت토시다제(β -galactosidase), 또는 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase)을 포함하고; 적절한 보결분자단 복합체의 예로는 스트랩트아비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적절한 형광물질의 예로는 웜벨리페론(umbelliferone), 플루오레세인(fluorescein), 플루오레세인 이소티아시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인(dichlorotriazinylamine fluorescein), 단실 클로라이드(dansyl chloride) 또는 피코에리트린(phycocerythrin)을 포함하고; 발광 물질의 예로는 루미놀(luminol)을 포함하고; 생물발광 물질의 예로는 루시페라제(luciferase), 루시페린(luciferin) 및 애큐오린(aequorin)을 포함하고; 적절한 방사성 물질의 예로는 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , 또는 $^{3\text{H}}$ 를 포함한다. 그러한 레이블된 시약들은 방사성면역분석법, 효소 면역분석법, 예를 들어 ELISA같은, 형광 면역분석법, 등과 같은 잘 알려진 다양한 분석법에 이용될 수 있다 (예를 들어, US 3,766,162; US 3,791,932; US 3,817,837; 및 US 4,233,402 참고).

[0071]

본 발명에 따른 항체는 사이토톡신, 치료물질, 또는 방사성 금속 이온 또는 방사성 동위원소와 같은, 치료법적인 모이어티에 컨쥬게이트될 수 있다. 방사성 동위원소의 예로는 ^{131}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{211}At , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{109}Pd , ^{99}Tc , ^{111}In , 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그러한 항체 컨쥬게이트는 주어진 생물학적 반응을 변형하는데 이용될 수 있다; 약물 모이어티(drug moiety)는 전통적인 화학적 치료법적 물질로 제한적으로 이해되어서는 안된다. 예를 들어 약물 모이어티는 복적으로 하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 도 있다. 그러한 단백질들은 예를 들어 아브린(abrin), 리신 A(ricin A), 슈도모나스 엑소톡신(pseudomonas exotoxin), 또는 디프테리아 특신(diphtheria toxin)과 같은 특신을 포함할 수 있다.

[0072]

항체에 그러한 치료법적 모이어티를 컨쥬게이트하는 기술은 잘 알려져 있다. 예를 들어, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316; 및 Thorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119-158 참고.

[0073]

대안으로, 항체 또는 이의 항원 단편은 US 4,676,980에 기술되어진 것처럼 항체 혜테로컨쥬게이트(heteroconjugate)를 형성하기 위하여, 2차 항체 또는 이의 항체 단편에 컨쥬게이트될 수 있다. 게다가, 링커(linkers)는 본 발명의 항체와 레이블 사이에 이용될 수 있다(예를 들어, US 4,831,175). 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 업계에서 잘 알려진 방사성 요오드, 인듐, 이트륨, 또는 다른 방사능 입자와 직접적으로 레이블될 수 있다(예를 들어, US 5,595,721). 치치(Treatment)는 동시에 또는 나중에 투여되어진 컨쥬게이트 및 비-컨쥬게이트 항체들로 치료의 조합을 이를 수 있다(예를 들어, WO00/52031; WO00/52473).

[0074]

본 발명의 항체는 고체 지지체에 부착될 수 있다. 추가적으로, 본 발명의 항체 또는 이의 기능적인 항체 단편은 예를 들어, 그들의 순환 반감기(circulating half-life)를 증가시키기 위하여 폴리머(polymer)에 공유 컨쥬게이션(covalent conjugation)에 의해 화학적으로 변형되어질 수 있다. 폴리머 및 페터드에 그들을 부착시키기 위한 방법의 예들은 US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 및 US 4,609,546에서 볼 수 있다. 몇몇 실시예에서, 폴리머는 폴리옥시에틸레이트 폴리올(polyoxyethylated polyols) 및 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol (PEG))로부터 선택될 수 있다. PEG는 실온에서 물에 용해되며 일반식 $R(O-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-O-R$ 을 가지며, 여기서 R은 수소 또는 알킬 또는 알카놀 그룹과 같은 보호기일 수 있다. 일 실시예에서 보호기는 1 내지 8 사이의 탄소일 수 있다. 다른 실시예에서 보호기는 메틸이다. n은 양의 정수를 나타낸다. 일 실시예에서 n은 1 내지 1,000 사이이다. 다른 실시예에서, n은 2 내지 500 사이이다. 일 실시예에서 PEG는 1,000 내지 40,000의 분자량을 가진다. 다른 실시예에서 PEG는 2,000 내지 20,000 의 분자량을 가진다. 다른 실시예에서

PEG는 3,000 내지 12,000의 분자량을 가진다. 일 실시예에서 PEG는 적어도 하나의 하이드록시기를 가진다. 다른 실시예에서 PEG는 말단 하이드록시기를 가진다. 다른 실시예에서 말단 하이드록시기는 억제제에 있는 자유 아미노기와 반응하기 위하여 활성화된다. 그러나, 반응기의 타입 및 양은 본 발명의 공유결합으로 컨쥬게이트된 PEG/항체를 얻기위해 다양할 수 있다는 것으로 이해되어질 것이다.

[0075] 수용성 폴리옥시에틸레이트 폴리올은 또한 본 발명에서 이용될 수 있다. 그들은 폴리옥시에틸레이트 소르비톨(polyoxyethylated sorbitol), 폴리옥시에틸레이트 글루코스(polyoxyethylated glucose), 폴리옥시에틸레이트 글리세롤(polyoxyethylated glycerol (POG)), 등을 포함한다. 일 실시예에서, POG가 이용된다. 임의의 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 폴리옥시에틸레이트 글리세롤의 글리세롤 뼈대는 모노-, 디-, 트리글리세라이드에서 예를 들어 동물 및 인간에서 자연적으로 발생한 동일한 백본이기때문에, 이러한 분지(branching)는 분명하게 체내에서 외부 물질로 보여지지 않을 것이다. 몇몇 실시예에서 POG는 PEG와 마찬가지로 동일한 범위의 분자량을 가진다. 순환 반감기 증가를 위해 이용될 수 있는 다른 약물 전달 시스템은 리포좀(liposome)이다. 리포좀 운반 시스템을 제조하는 방법은 업계의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 다른 약물 전달 시스템은 업계에 잘 알려져 있고 예를 들어 Poznansky et al. (1980) 및 Poznansky (1984)에서 참조할 수 있다.

[0076] 본 발명의 항체는 정제된 형태로 제공될 수 있다. 일반적으로, 항체는 조성물 내에서, 실질적으로 다른 폴리펩티드가 없는 상태로 존재할 것이며, 예를 들어, 조성물의 90% 미만 (중량), 보통 60% 미만 그리고 더 일반적으로 50% 미만이 다른 폴리펩티드로 구성된다.

[0077] 본 발명의 항체는 인간이 아닌(또는 이형의) 호스트에서, 예를 들어 쥐에서, 면역성을 가질 수 있다. 특히, 항체는 인간이 아닌 호스트에서는 면역성이나, 인간 호스트에서는 그러하지 않은 이디오토프(idiotope)를 가질 수 있다. 인간 용도의 본 발명의 항체는 쥐, 염소, 토끼, 생쥐, 비-영장류, 등과 같은 호스트로부터 쉽게 분리될 수 없고, 인간화(humanization)에 의해 또는 제노-마이스(xeno-mice)로부터 일반적으로 얻어질 수 없는 것들을 포함한다.

[0078] 본 발명의 항체는 임의의 아이소타입(예를 들어, IgA, IgG, IgM, 즉 α , γ , 또는 μ 중쇄)일 수 있으나, 대개 IgG 일 수 있다. IgG 아이소타입에서, 항체들은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위클래스일 수 있다. 본 발명의 항체는 κ 또는 λ 경쇄를 가질 수 있다.

0079 항체의 생산

[0080] 본 발명에 따른 항체는 업계에 잘 알려진 임의의 방법으로 만들어질 수 있다. 예를 들어, 하이브리도마 기술을 이용하여 단일클론 항체를 만드는 일반적인 방법론은 잘 알려진 것이다 (Kohler, G. and Milstein, C., 1975; Kozbar et al. 1983). 일 실시예에서, WO2004/076677 에 기술된 대체적인 EBV 불멸화 방법이 사용되었다.

[0081] WO 2004/076677에 기술된 방법을 이용하여, 본 발명의 항체를 생산하는 B 세포는 EBV 및 다클론 B 세포 활성제와 변형될 수 있다. 세포 성장 및 분화의 추가적인 자극제는 선택적으로 효율을 더 증가시키기 위한 변형단계 동안 추가되어질 수 있다. 이러한 자극제는 IL-2 및 IL-15과 같은 사이토카인일 수 있다. 일 측면에서, IL-2는 불멸화 효율을 더 향상시키기 위한 불멸화 단계 동안 추가되나, 이러한 사용이 필수적이지는 않다. 이러한 방법을 이용하여 생산된 불멸화된 B 세포는 그다음 업계에서 알려진 방법을 이용하여 배양될 수 있고 항체는 거기에 서 분리된다.

[0082] WO 2010/046775에 기술된 방법을 이용하여, 형질 세포는 제한된 수로 배양될 수 있으며 또는 마이크로웰 배양 플레이트에서 단일 형질 세포로 배양될 수 있다. 항체는 형질세포 배양에서 분리되어질 수 있다. 게다가, 형질 세포 배양으로부터, RNA는 추출되어질 수 있고 PCR은 업계에서 알려진 방법을 이용하여 수행되어질 수 있다. 항체의 VH 및 VL 영역은 RT-PCR에 의해 증폭되어질 수 있고, 배열 순서가 밝혀질 수 있고 HEK293T 세포 또는 다른 호스트 세포안으로 그 다음 형질주입되어지는 발현 벡터로 클론되어질 수 있다. 발현 벡터 안의 핵산 클로닝, 호스트 세포의 형질주입, 형질주입된 호스트 세포의 배양, 및 생산된 항체의 분리는 업계의 통상의 기술자에게 알려진 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0083] 필요할 경우, 항체는 더 정제될 수 있으며, 이는 여과, 원심분리, 및 HPLC 또는 친화성 크로마토 그래피 등 다양한 크로마토 그래피 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 제약 수준의 항체를 생산하는 방법을 포함하는, 항체, 예를 들어 단일클론 항체의 여과 기술은, 업계에 잘 알려져 있다.

[0084] 본 발명의 항체 단편은 펩신(pepsin) 또는 파파인(papain)과 같은, 효소로 소화(digestion) 및/또는 화학적 환

원에 의한 이화 결합의 절단을 포함하는 방법에 의한 항체로부터 얻어질 수 있다. 대신에, 항체의 단편들은 중쇄 또는 경쇄의 서열의 일부를 클로닝 또는 발현하여 얻어질 수 있다. 항체 "단편"은 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 항체의 경쇄 및 중쇄로부터 유래되는 단일-사슬 Fv 단편 (scFv) 을 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 본 발명의 항체의 CDR을 포함하는 scFv를 포함한다. 또한 포함되는 것은 단쇄 항체 뿐만 아니라, 경쇄 또는 중쇄 모노머 및 다이머, 단일 도메인 중쇄 항체, 단일 도메인 경쇄 항체이며, 예를 들어, 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 단쇄 Fv는 웨티드 링커에 의해 합류된다.

[0085] 본 발명의 항체 단편은 1가의(monovalent) 또는 다가의(multivalent) 상호작용을 전할 수 있고 앞서 기술되어진 다양한 구조에 포함될 수 있다. 예를 들어, scFv 분자는 3가의 "트리아바디(triabody)" 또는 4가의 "테트라바디(tetraabody)"를 만들기 위해 합성될 수 있다. scFv 분자는 2가의 미니바디(minibodies)를 만드는 Fc 영역의 도메인을 포함할 수 있다. 추가로, 본 발명의 서열은 다톤이적 분자의 구성요소일 수 있으며, 여기서 본 발명의 서열들은 본 발명의 에피토프 및 다른 타겟과 결합할 수 있는 분자의 다른 영역들을 타겟으로 할 수 있다. 바람직한 분자들은 이중특이적 Fab2, 삼중특이적 Fab3, 이중특이적 scFv, 및 다이아바디(diabodies)를 포함할 수 있으나(Holliger and Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9: 1126-1136), 이에 제한되지 않는다.

[0086] 분자생물학의 기본적인 기술들이 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 암호화하는 DNA 서열을 준비하는데 이용될 수 있다. 목적으로 하는 DNA 서열들은 완전히 또는 부분적으로 올리고뉴클레오티드 합성 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 부위-특이적 돌연변이 및 중합효소 연쇄반응(PCR) 기술은 적절하게 사용될 수 있다.

[0087] 임의의 적절한 호스트 세포/벡터 시스템은 본 발명의 항체 분자 또는 이의 단편들을 암호화하는 DNA 서열의 발현을 위하여 사용될 수 있다. 박테리아성, 예를 들어 E. coli, 및 다른 미생물계는 사용될 수 있고, 어느 정도는, Fab 및 F(ab')2 단편 및 특히 Fv 단편 및 단쇄 항체 단편, 예를 들어 단쇄 Fvs 와 같은 항체 단편의 발현을 위하여 사용될 수 있다. 진핵세포의, 예를 들어 포유류의, 호스트 세포 발현 시스템은, 완벽한 항체 분자를 포함하는, 더 큰 항체 분자의 생산을 위해 이용될 수 있다. 적절한 포유류 호스트 세포는 CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, 미엘로마 또는 하이브리도마 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0088] 본 발명은 본 발명의 항체 분자를 암호화하는 DNA로부터 단백질의 발현에 적합한 상태하에 본 발명의 핵산을 암호화하는 벡터를 포함하는 호스트 세포를 배양하는 단계, 및 항체 분자를 분리하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 항체 분자의 생산을 위한 공정을 제공한다.

[0089] 상기 항체 분자는 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드 코딩 서열이 호스트 세포를 형질주입하기 위해 사용될 필요가 있는 유일한 경우에, 오로지 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 중쇄 및 경쇄 둘다를 포함하는 산물을 생산을 위하여, 세포주는 두개의 벡터로 형질주입될 수 있으며, 첫 번째 벡터는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하고 두 번째 벡터는 중쇄 폴리펩티드를 암호화한다. 대안적으로, 단일 벡터는 사용될 수 있으며, 상기 벡터는 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함한다.

[0090] 대안적으로, 본 발명에 따른 항체는 (i) 호스트 세포에서 본 발명에 따른 핵산 서열을 발현하는 단계, 및 (ii) 발현된 항체 산물을 분리하는 단계에 의해 생산되어질 수 있다. 추가적으로, 상기 방법은 (iii) 분리된 항체를 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

[0091] 변형된 B 세포 및 배양된 형질세포는 복적으로 하는 특이성 또는 기능의 항체 생산을 위하여 스크리닝될 수 있다.

[0092] 스크리닝 단계는 임의의 면역분석법에 의해, 예를 들어, ELISA, 조직 또는 세포(형질주입된 세포를 포함)의 염색에 의해, 중화 분석(neutralization assay)에 의해 또는 목적으로 하는 특이성 또는 기능을 확인하기 위해 업계에서 잘 알려진 다른 방법들 중 어느 하나에 의해 수행될 수 있다. 분석법은 하나 또는 그 이상의 항원들의 간단한 인식을 바탕으로 선택할 수 있고 또는 목적으로 하는 기능에 추가적으로 근거하여 선택할 수 있다. 예를 들어, 단지 항원-결합 항체들보다 오히려 항체를 중화하는 것을 선택하기 위해, 타겟 세포의, 시그널링 케스케이드, 그드르이 형태, 그들의 성장율, 그들의 다른 세포에 영향을 주는 능력과 다른 세포에 의해 또는 다른 시약에 의해 또는 조건의 변경에 의한 영향에 대한 반응, 그들의 분화 상황 등과 같은, 특징을 변경할 수 있는 항체를 선택하기 위해 타겟 세포의 특성을 변경할 수 있다.

[0093] 개별적인 변형된 B 세포 클론은 그 다음 양성 변형된 B 세포 배지로부터 생산될 수 있다. 양성 세포 혼합물로부터 개별적인 클론 분리를 위한 클로닝 단계는 한계 회석(limiting dilution), 현미조작(micromanipulation), 세포 분별(cell sorting) 또는 업계에 잘 알려진 다른 방법에 의한 단일 세포 축적(deposition)을 이용하여 수행되어질 수 있다.

- [0094] 배양된 형질 세포로부터 핵산을 분리, 클로닝, 그리고 업계에서 잘 알려진 방법을 사용하여 HEK293T 세포 또는 다른 알려진 호스트 세포에서 발현될 수 있다.
- [0095] 불멸화된 B 세포 클론 또는 본 발명의 형질주입된 호스트-세포는 다양한 방식으로 이용될 수 있는데, 예를 들어, 단일클론 항체의 원천으로, 관심이 있는 단일클론 항체를 암호화하는 핵산(DNA 또는 mRNA)의 원천으로, 연구용도 등으로 이용될 수 있다.
- [0096] 본 발명은 RSV, MPV 및 PVM의 감염을 중화하고 모두의 감염을 중화하는 항체를 생산하는 불멸화된 B 기억 세포 또는 형질주입된 호스트 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0097] 본 발명의 불멸화된 B 세포 클론 또는 배양된 형질세포는 차후의 재조합 발현을 위한 항체 유전자의 클로닝을 위한 핵산의 원천으로 이용될 수 있다. 재조합체 소스로부터 발현은 안정성, 재현성, 배양 용이성 등에 대한 이유로, B 세포 또는 하이브리도마로부터 발현보다는 약학적 목적으로 더 일반적이다.
- [0098] 따라서 본 발명은 (i) 하나 이상의 핵산(예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄 mRNAs)을 관심이 있는 항체를 암호화하는 배양된 형질 세포 또는 B 세포 클론으로부터 수득하는 단계; 핵산을 발현 벡터 안으로 삽입하는 단계 및 (iii) 그 호스트 세포 안에 관심이 있는 항체의 발현을 가능하게 하기 위하여 호스트 세포 안으로 벡터를 형질 주입하는 단계를 포함하는 재조합 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0099] 유사하게, 본 발명은 (i) 관심이 있는 항체를 암호화하는 배양된 형질 세포 또는 B 세포 클론으로부터 핵산(들)을 시퀀싱하는 단계; 및 (ii) 그 호스트 세포 내에서 관심이 있는 항체의 발현을 가능하게 하기 위하여 호스트 세포 안으로 삽입을 위한 핵산(들)을 제조하기 위하여 (i) 단계로부터 서열 정보를 이용하는 단계를 포함하는, 재조합 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 핵산은, 할 필요는 없지만, 단계 (i) 및 (ii) 사이에서 제한 부위(restriction sites)를 도입하기 위하여 코돈 유세지를 변경 및/또는 전사 및/또는 번역 조절 서열 (translation regulatory sequences) 최적화를 위하여 조작될 수 있다.
- [0100] 본 발명은 또한 관심이 있는 항체를 암호화하는 하나 또는 그 이상의 핵산으로 호스트 세포를 형질주입하는 단계를 포함하는, 형질주입된 호스트 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 여기서 상기 핵산은 불멸화된 B 세포 클론으로부터 유래되거나 또는 본 발명의 배양된 형질 세포로부터 유래된 핵산이다. 따라서 처음 핵산 제조를 한 후 호스트 세포를 형질주입하기 위하여 그것을 사용하는 과정은 다른 시간에 다른 사람들에 의해 다른 장소에서(예를 들어 다른 국가에서) 수행될 수 있다.
- [0101] 이러한 본 발명의 재조합 세포는 그 다음 발현 및 배양 목적으로 이용될 수 있다. 이들은 특히 큰-스케일의 약품 생산을 위한 항체 발현을 위해 유용한다. 이들은 또한 약학 조성물의 유효 성분으로 이용될 수 있다. 임의의 적절한 배양 기술들이 이용될 수 있으며, 이들에 제한되지 않고, 정지배양(static culture), 회전병 배양(roller bottle culture), 복수액(ascites fluid), 유공 섬유 타입 바이오리액터 카트리지(hollow-fiber type bioreactor cartridge), 모듈형 미니발효기(modular minifermenter), 교반 탱크(stirred tank), 미세전달체 배양(microcarrier culture), 세라믹 코어 판류(ceramic core perfusion), 등을 포함한다.
- [0102] B 세포 또는 형질 세포로부터 면역글로불린 유전자를 얻고 시퀀싱하는 방법은 업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Chapter 4 of Kuby Immunology, 4th edition, 2000 참조).
- [0103] 형질주입된 호스트 세포는 효모균, 동물 세포, 특히 포유류 세포(예를 들어, CHO 세포, NS0 세포, PER.C6 또는 HKB-11 세포, 미엘로마 세포와 같은 인간 세포)를 포함하는 진핵 세포이며, 식물 세포일 수 있다. 바람직한 발현 호스트는 본 발명의 항체를 글라이코실레이트할 수 있으며, 특히 인간에서 그 스스로는 면역성을 가지지 않는 탄수화물 구조를 가지고 할 수 있다. 일 실시예에서 형질주입된 호스트 세포는 무혈청 배지에서 자랄 수 있다. 다른 실시예에서 형질주입된 호스트 세포는 동물-유래된 산물의 존재 없이 배지에서 자랄 수 있다. 형질주입된 호스트 세포는 또한 세포주를 제공하기 위하여 배양될 수 있다.
- [0104] 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 관심이 있는 항체를 암호화하는 하나 또는 그 이상의 핵산 분자(예를 들어, 경쇄 및 중쇄 유전자)를 제조하는 방법을 제공한다: (i) 본 발명에 따른 불멸화된 B 세포 클론을 제조하는 단계 또는 형질 세포를 배양하는 단계; (ii) 관심이 있는 항체를 암호화하는 핵산을, B 세포 클론 또는 배양된 형질세포로부터 수득하는 단계. 게다가, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, 관심이 있는 항체를 암호화하는 핵산 서열을 수득하는 방법을 제공한다: (i) 본 발명에 따른 불멸화된 B 세포 클론을 제조하는 단계 또는 형질 세포를 배양하는 단계; (ii) 관심이 있는 항체를 암호화하는, B 세포 클론 또는 배양된 형질세포로부터 수득한 핵산을 시퀀싱하는 단계.

- [0105] 본 발명은 또한, 본 발명의 변형된 B 세포 클론 또는 배양된 형질 세포로부터 얻은 핵산을 수득하는 단계를 포함하는, 관심이 있는 항체를 암호화하는 핵산 분자(들)을 제조하는 방법을 제공한다. 따라서 처음 B 세포 클론 또는 배양된 형질 세포를 처음 수득하는 단계 및 그 다음 B 세포 클론 또는 배양된 형질 세포로부터 핵산(들)을 얻는 단계는 다른 시간에 다른 사람에 의해 다른 장소에서(예를 들어, 다른 나라에서) 수행될 수 있다.
- [0106] 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, 항체(예를 들어, 약학 용도를 위해)를 제조하는 방법을 제공한다: (i) 관심이 있는 항체를 발현하는 선별된 B 세포 클론 또는 배양된 형질 세포로부터 하나 또는 그 이상의 핵산(예를 들어, 중쇄 및 경쇄 유전자)를 수득 및/또는 시퀀싱하는 단계; (ii) 발현 벡터를 제조하기 위하여 핵산(들)을 내부로 삽입하는 단계 또는 핵산(들) 서열(들)을 이용하는 단계; (iii) 관심이 있는 항체를 발현할 수 있는, 호스트 세포를 형질 주입하는 단계; (iv) 관심이 있는 항체가 발현되는 조건하에서 형질 주입된 호스트 세포를 배양 또는 계대배양하는 단계; 및, 선택적으로, (v) 관심이 있는 항체를 정제하는 단계.
- [0107] 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 항체 제조 방법을 제공한다: 관심이 있는 항체가 발현되는 조건 하에서 형질주입된 호스트 세포 집단을 배양 또는 계대 배양하는 단계 및, 선택적으로, 관심이 있는 항체를 정제하는 단계, 여기서 상기 형질주입된 호스트 세포 집단은 (i) 앞서 기술된 제조된 B 세포 클론 또는 배양된 형질 세포에 의해 생산되는 관심이 있는 선별된 항체를 암호화하는 핵산(들)을 준비하는 단계, (ii) 발현 벡터 안으로 핵산(들)을 삽입하는 단계, (iii) 관심이 있는 항체를 발현할 수 있는 호스트 세포 안에 벡터를 형질주입하는 단계, 및 (iv) 관심이 있는 항체를 생산하기 위하여 삽입된 핵산을 포함하는 형질주입된 호스트 세포를 배양 또는 계대 배양하는 단계에 의해 제조된다. 따라서 처음 재조합 호스트 세포를 제조하는 단계 및 그 다음 항체를 발현하기 위하여 그것을 배양하는 단계는 다른 시간에 다른 사람에 의해 다른 장소에서(예를 들어, 다른 나라에서) 수행될 수 있다.
- [0108] **에피토프(Epitopes)**
- [0109] 앞서 언급된 바와 같이, 본 발명의 항체는 그들이 결합하는 에피토프를 보여주는데 이용할 수 있다. 본 발명의 발명자들은 본 발명의 항체를 중화하는 것은 후-융합 F 단백질은 아닌, 전-융합 F 단백질에서 발견되는 에피토프를 겨냥한 것을 발견하였다. 일 실시예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 RSV 전-융합 F 단백질과는 결합하나, RSV 후-융합 F 단백질과는 결합하지 않는다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 RSV 및 MPV의 전-융합 F 단백질과는 결합하나, 후-융합 F 단백질과는 결합하지 않는다. 일 실시예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 RSV, MPV 및 PVM의 전-융합 F 단백질과는 결합하나, 후-융합 F 단백질과는 결합하지 않는다.
- [0110] 본 발명의 항체에 결합하는 에피토프는 선형(연속적) 또는 입체 형태의(불연속적)일 수 있다. 일 실시예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 입체 형태의 에피토프에 결합한다. 다른 실시예에서, 상기 입체 형태의 에피토프는 오로지 비-리듀싱 컨디션 하에서만 존재한다. 임의의 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 항체에 의해 결합된 상기 입체 형태의 에피토프는 F 단백질에 아미노산 잔기들 사이에 이항화 결합의 존재에 의존한다.
- [0111] 다른 실시예에서, 본 발명의 항체에 결합하는 에피토프는 RSV 후-융합 F 단백질에 나타나는 항원결정 부위 I, 항원결정 부위 II, 항원결정 부위 IV 및 MPV F 단백질에 대응하는 부위와 구별된다. 다른 실시예에서, 항체 및 본 발명의 항원 결합 단편은 RSV의 F 단백질에 결합하기 위한 파리비쥬맙, 모타비쥬맙, mAb 101F, mAb 131-2A 또는 mAb D25 와 교차-경쟁하지 않으며; MPV의 F 단백질에 결합하는 mAb 234와도 교차-경쟁하지 않는다.
- [0112] 다른 실시예에서, 본 발명의 항체들에 결합하는 영역은 RSV F 단백질의 N-말단 부분에 위치하는 폴리펩티드, 연속 잔기 SAVSKGYLSALRTGWTTSIT (서열번호 63)를 포함한다. 이 폴리펩티드의 코어 부분은 Y(x1)S(x2)LRTGW 잔기에 의해 형성되며, 이것은 RSV, MPV 및 PVM 사이에서 잘 보존되어 있다. 그리고 여기서 상기 (x1) 위치에서 아미노산은 L, F, 또는 K, 일 수 있으나 이에 한정되지 않고, 그리고 여기서 (x2) 위치에서 아미노산은 A 또는 V 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 항체에 결합하는 폴리펩티드 변이들의 예는 YLSALRTGW (서열 번호 64), YLSVLRTGW (서열번호 65), YFSALRTGW (서열번호 66), YFSVLRTGW (서열번호 67), YKSALRTGW (서열번호 68), 및 YKSVLRTGW (서열번호 69)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0113] 본 발명의 항체에 결합하는 폴리펩티드는 많은 용도를 가진다. 정제 또는 합성된 형태의 폴리펩티드 및 이의 폴리펩티드 변이는 면역 반응을 유발(즉 백신으로, 또는 다른 용도를 위한 항체의 생산을 위하여)하는데 사용될 수 있고, 또는 에피토프 또는 이의 미모토프와 면역반응하는 항체를 위한 혈청을 스크리닝 하는 용도로 이용될

수 있다. 일 실시예에서 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 변이 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 변이를 포함한 항원들은 본 발명에 기술되어진 바와 같이 동일한 퀄리티(quality)의 항체를 포함하는 면역 반응을 유발하기 위한 백신으로 이용될 수 있다. 본 발명의 항체 및 항체 단편은 또한 백신 퀄리티를 모니터링하는 방법에 이용될 수 있다. 특히 항체는 백신에 항원이 정확한 형태에서 정확한 면역성 에피토프를 포함하는지를 체크하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 상기 백신의 항원이 정확한 형태에서 정확한 에피토프를 포함하는지를 체크하여, RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘 다에 대한 백신의 퀄리티를 모니터링하기 위한, 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 용도는 또한 본 발명의 관점에서 고려될 수 있다.

[0114] 본 발명의 항체에 결합하는 폴리펩티드는 또한 상기 폴리펩티드에 결합하는 리간드(ligands)를 스크리닝하는데 유용하게 이용될 수 있다. 그러한 리간드는 낙타, 상어, 및 다른 종들로부터의 것을 포함하는 항체, 항체의 단편, 웨პ티드, 과지 디스플레이 기술 산물, 압타머, 아드넥틴(adnectins) 또는 다른 바이러스성 또는 세포성 단백질의 단편을 포함하나, 이에 제한되지 않으며; 이러한 리간드는 에피토프를 차단할수 있으며 그래서 감염을 예방한다. 그러한 리간드는 본 발명의 관점에서 고려될 수 있다.

약학 조성물

[0116] 본 발명은 하나 또는 그 이상의 본 발명의 항체 또는 항체 단편; 그러한 항체 또는 단편을 암호화하는 핵산; 핵산을 암호화하는 벡터; 또는 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편에 의해 인식되는 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 또한 약학적으로 허용 가능한 캐리어(carrier) 또는 부형제(excipient)를 포함할 수 있다. 비록 캐리어 또는 부형제는 투여를 가능하게 할 수 있으나, 본 조성물을 받는 개체에 해로운 항체의 생산을 그 자체로 유도하지 않는다. 독성이 전혀 없다. 적절한 캐리어는, 단백질, 폴리펩티드, 리포좀, 폴리사카라이드, 폴리락티 애씨드, 폴리글리콜 애씨드, 고분자 아미노산, 아미노산 코폴리머 및 비활성화된 바이러스 파티클과 같은 크고, 천천히 대사되는 거대분자(macromolecules)일 수 있다.

[0117] 약학적으로 허용 가능한 염은 이용될 수 있으며, 예를 들어, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트 및 세레이트와 같은 미네랄 산 염, 또는 아세테이트, 프로페오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트와 같은 유기산의 염이 이용될 수 있다.

[0118] 치료적 조성물에서 약학적으로 허용 가능한 캐리어는 추가적으로, 물, 살린(saline), 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체를 포함할 수 있다. 추가적으로, 습윤제 또는 유화제와 같은 보조제 또는 pH 버퍼링 물질은 조성물에 존재할 수 있다. 그러한 캐리어는 약학 조성물이 개체에 의한 소화를 위한, 타블렛, 필, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리 및 혼탁액으로 제형화될 수 있도록 한다.

[0119] 본 발명의 관점에서 몇 가지 투여 형태로 조성물이 존재한다; 다음의 형태를 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 예를 들어 주사(injection) 또는 주입(infusion)에 의한, 예를 들어 일시 주사 또는 연속적인 주입에 의한 비경구 투여를 위한 적절한 형태를 가질 수 있다. 주사 또는 주입을 위한 산물의 경우, 유성 또는 수성 비히클에서 혼탁액, 용액 또는 유화제의 형태를 가질 수 있으며 혼탁제, 방부제, 안정화제 및 분산제와 같은 제형화제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 항체 분자는 적절한 무균 액체와 사용하기 전에, 재구성을 위하여 건조 형태일 수 있다.

[0120] 제형화 후에, 본 발명의 조성물은 개체에 직접적으로 투여될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 포유류, 예를 들어 인간 개체를 대상으로 투여에 적합할 것이다.

[0121] 본 발명의 약학 조성물은 다음과 같은 다양한 경로에 의해 투여되지만, 이에 제한되지 않으며, 경구(oral), 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 복강 내, 경막 내, 뇌실 내, 경피, 피부를 통해, 국소, 피하, 비강, 경구로(enteral), 설하, 질 내 또는 직장 경로로 투여될 수 있다. 하이포스프레이(Hyposprays)는 또한 본 발명의 약학적 조성물을 투여하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 치료적 조성물은 액체 용액 또는 혼탁액으로, 주사제로서 제조될 수 있다. 용액에서, 또는 혼탁액에서 위한, 적합한 고체 형태는 주사전에 액체 비히클이 제조될 수 있다.

[0122] 조성물의 직접적인 전달은 일반적으로 피하, 복강 내, 정맥 내 또는 근육 내를 통해 달성될 수 있거나 또는 조직의 사이 공간으로 전달될 수 있다. 상기 조성물은 또한 병소(lesion)에 투여될 수 있다. 투여 치료는 단일 투여 스케줄 또는 다회 투여 스케줄일 수 있다. 알려진 항체-기반 의약품은 예를 들어 의약품이 매일, 매주, 매월 전달되어져야 하는지와 같은, 투여 빈도와 관련된 지침을 제공한다. 빈도 및 투여량은 증상의 심각성에 따라 달

라질 수 있다.

[0123] 본 발명의 조성물은 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물은 액체 용액 또는 혼탁액 중 하나로, 주사제로 제조될 수 있다. 용액에서, 또는 혼탁액에서를 위한, 적합한 고체 형태는 주사전에 액체 비히클이 제조될 수 있다(예를 들어, 방부제가 포함된 멸균수를 갖는 재구성을 위한 Synagis™ 및 Herceptin™과 같은, 동결건조 조성물). 상기 조성물은 예를 들어, 연고, 크림 또는 파우더와 같은, 국소 투여를 위해 제조될 수 있다. 상기 조성물은 예를 들어, 타블렛 또는 캡슐과 같은, 스프레이같은, 또는 시럽과 같은, (선택적으로 향이 가미된) 경구 투여를 위해 제조될 수 있다. 상기 조성물은 미세 분말 또는 스프레이를 이용하여 예를 들면, 흡입 디바이스(inhaler)와 같은, 폐 투여를 위해 제조될 수 있다. 상기 조성물은 좌제 또는 폐서리(pessary)로 제조될 수 있다. 상기 조성물은 비강, 귀 또는 안구 투여 등을 위해 드롭(drops)과 같이 제조될 수 있다. 상기 조성물은 조합된 조성물이 개체에 투여되기 직전에 재구성되도록 고안된 키트 형태일 수 있다. 예를 들어, 동결건조된 항체는 멸균수 또는 멸균 완충액을 가지는 키트 형태로 제공될 수 있다.

[0124] 이 조성물의 유효 성분은 항체 분자, 이의 항체 단편 또는 변이 및 유도체일 것으로 이해될 것이다. 그래서 위장관에서 분해에 민감할 것이다. 따라서 만약 조성물이 위장관을 이용하여 투여된다면, 조성물은 분해로부터 항체를 보호할 수 있으나 위장관으로부터 흡수될 때 항체를 방출할 수 있는 물질을 포함할 필요가 있을 것이다.

[0125] 약제학적으로 허용되는 캐리어에 대한 철저한 고려는 Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472에서 이용될 수 있다.

[0126] 본 발명의 약학 조성물은 일반적으로 5.5 및 8.5 사이의 pH를 가지며, 몇몇 실시예에서는 6 내지 8, 다른 실시예에서는 약 7의 pH를 가질 수 있다. 상기 pH는 완충액을 이용하여 유지될 수 있다. 상기 조성물은 무균 및/또는 발열물질 제거상태일 수 있다. 상기 조성물은 인간에 대해 등장성일 수 있다. 일 실시예에서 본 발명의 약학 조성물은 밀폐 용기에 공급된다.

[0127] 약학 조성물은 본 발명의 하나 또는 그 이상의 항체 및/또는 본 발명의 항체와 결합하는 에피토프를 포함하는 폴리펩티드를 충분한 양, 즉, 목적하는 질병 또는 상태를 치료, 개선, 감소 또는 예방하기에 충분한 양 또는 검출가능한 치료적 효과를 나타내기 충분한 양을 포함할 것이다. 치료적 효과는 또한 병원성 역가 또는 신체 증상에서 감소 또는 개선을 포함한다. 임의의 특정 개체에 대한 정확한 효과적인 양은 그들의 사이즈, 무게, 및 건강, 상태의 특성 및 정도, 그리고 치료제 또는 투여를 위해 선별된 치료제 조합들에 의해 달라질 수 있다. 주어진 상황에 효과적인 양은 통상적인 실험에 의해 결정되고 임상적인 판단 범위에 있다. 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 효과적인 투여량은 일반적으로 투여되는 각 개체에 본 발명의 조성물을 약 0.01mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 또는 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 이 될 수 있다. 알려진 항체-기반 의약품은 예를 들어, Herceptin™은 21 mg/ml 용액을 정맥내 주입하여 투여하고, 초기 로딩 투여량은 4 mg/kg 체중이고 주간 유지 투여량은 2 mg/kg 체중이고; Rituxan™은 매주 375 mg/m² 투여된다; 등과 같은 지침이 제공된다.

[0128] 일 실시예에서 조성물은 추가적(additive) 또는 시너지(synergistic)적 치료 효과를 제공하기 위하여 본 발명의 항체를 하나보다 더 많이(예를 들어 2, 3, 등) 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 조성물은 하나 또는 그 이상의 (예를 들어, 2, 3 등)의 본 발명의 항체 및 RSV, MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다에 대한 하나 또는 그 이상의 (예를 들어, 2, 3 등)의 추가적인 항체를 포함할 수 있다. 게다가, 본 발명의 항체는 예를 들어, 인플루엔자 A, 또는 인플루엔자 B 바이러스와 같은 다른 병원균들에 특이적인 항체들과 함께 투여되고 이것은 본 발명의 관점에 포함될 수 있다. 본 발명의 항체는 RSV 또는 MPV 이외의 특정 바이러스에 대한 항체로부터 결합되어/동시에 또는 별개의 횟수로 투여될 수 있다.

[0129] 다른 실시예에서, 본 발명은 둘 또는 그 이상의 항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 여기서 첫 번째 항체는 본원에서 정의되어진 본 발명의 항체이며 두 번째 항체는 RSV, MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다 또는 약학 조성물이 투여되는 개체에 동시에 감염될 수 있는 다른 병원균들에 특이적인 항체이다.

[0130] RSV, MPV 및 PVM에 특이적이고 이를 중화하는, 본 발명의 항체의 예로는, HMB3210 변이 3, HMB3210 변이 1, HMB3210 변이 2, HMB3210 변이 4, HMB3210 변이 5, HMB3210 변이 6, HMB2430 변이 1, HMB2430 변이 2, HMB2430 변이 3, HMB2430 변이 4 또는 HMB2430 변이 5를 포함하며, 이에 제한되지는 않는다.

[0131] 일 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB3210 변이 1 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB3210 변이 2 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB3210 변이 3 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제

공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB3210 변이 4 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB3210 변이 5 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시예에서 본 발명은 항체 HMB3210 변이 6 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0132] 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB2430 변이 1 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB2430 변이 2 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB2430 변이 3 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB2430 변이 4 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 항체 HMB2430 변이 5 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0133] 본 발명의 항체는 예를 들어, 화학요법 화합물들(chemotherapeutic compounds)과, 방사선 치료법, 등과 같은 다른 치료방법들과 (함께 또는 별도로) 투여될 수 있다. 일 실시예에서, 치료 화합물들은 Tamiflu™와 같은 항-바이러스 화합물을 포함한다. 그러한 조합 치료법은 단독으로 투여될 때 각 개체의 치료제들과 관련된 치료 효능에서 추가적인 또는 시너지적인 향상을 제공한다. 용어 "시너지(synergy)"는 둘 또는 그 이상의 활성제의 조합된 효과가 각각의 활성제의 개별적인 효과의 총 합보다 더 클때를 설명하는 것으로 사용되었다. 따라서 둘 또는 그 이상의 물질의 조합된 효과가 활성 또는 과정의 "시너지적 억제"를 가져올 때, 활성 또는 과정의 억제는 각각의 활성제들의 억제 효과의 총 합보다 더 크다는 것을 의미한다. 용어 "시너지적 치료 효과"는 둘 또는 그 이상의 치료법들의 조합으로 관찰되는 치료 효과를 의미하고, 여기서 치료 효과(임의의 다수의 파라미터로 측정된)는 각각의 개체의 치료법으로 관찰되는 개개의 치료 효과의 총합보다 더 크다.

[0134] 항체는 이전에 반응이 없는 것으로 보여졌던 즉, RSV 또는 MPV 감염 치료에 굴절이 있는(refractive) 것으로 보여졌던, 개체들에 투여될 수 있다. 그러한 치료는 항-바이러스성 제제를 이용한 이전 치료를 포함할 수 있다. 이것은 예를 들어, RSV, MPV 또는 RSV 및 MPV 모두의 항-바이러스 저항성 스트레인으로 감염때문일 수 있다.

[0135] 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 항체들을 포함할 수 있으며, 여기서 항체는 본 조성물내의 전체 단백질의 적어도 50 중량%(예를 들어, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상)을 구성할 수 있다. 그러한 조성물에서, 항체는 정제된 형태일 수 있다.

[0136] 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 약학 조성물을 제조하는 방법을 제공한다:(i) 본 발명의 항체를 제조하는 단계; 및 (ii) 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용 가능한 캐리어를 정제된 항체와 혼합하는 단계.

[0137] 다른 실시예에서, 약학 조성물을 제조하는 방법은 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용 가능한 캐리어와 항체를 혼합하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 항체는 본 발명의 변형된 B 세포 또는 배양된 형질세포로부터 수득되어진 단일클론 항체이다. 따라서 첫 번째 단일클론 항체를 수득하는 단계 및 그 다음 약품을 제조하는 단계를 위한 과정은 다른 시간에 다른 사람에 의해 다른 장소(예를 들어, 다른 나라에서) 수행될 수 있다.

[0138] 치료 목적으로 항체 또는 B 세포를 전달하기 위한 대안으로서, 핵산은 목적으로 하는 치료 효과를 제공하기 위하여 *in situ* 개체에서 발현되어질 수 있기 때문에, 개체에 B 세포 또는 배양된 형질 세포로부터 유래된 관심이 있는 단일클론 항체(또는 이의 활성 단편)을 암호화하는 핵산(일반적으로 DNA)을 운반하는 것이 가능한다. 적절한 유전자 치료법 및 핵산 전달 벡터들은 업계에 잘 알려져 있다.

[0139] 본 발명의 조성물은 면역성 조성물일 수 있으며, 몇몇 실시예에서는 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의해 인식되는 에피토프를 포함하는 항원을 포함하는 백신 조성물일 수 있다. 본 발명에 따른 백신은 예방적(즉, 감염을 방지하는) 또는 치료적(즉, 감염을 치료 또는 개선하는)일 수 있다.

[0140] 조성물은 특히 여러번 투여하는 형태로 포장하는 경우, 항균제를 포함할 수 있다. 세제를, 즉, Tween 80과 같은 Tween (폴리소르베이트)를 포함할 수 있다. 세척제는 일반적으로 예를 들어 0.01% 이하와 같이, 낮은 농도로 존재한다. 조성물은 또한 등장성을 주기 위하여 나트륨 염(예를 들어, 염화나트륨)을 포함할 수 있다. 10±2 mg/ml 농도의 NaCl이 전형적이다.

[0141] 게다가, 조성물은 당 알코올을(예를 들어, 만니톨) 또는 이당류(예를 들어, 수크로스 또는 트레할로스)를, 예를 들어 15-30 mg/ml (예를 들어, 25 mg/ml)에서 포함할 수 있으며, 특히 그들이 동결건조되는 경우 또는 동결건조된 물질로부터 재구성된 물질을 포함하는 경우 그러하다. 동결건조용 조성물의 pH는 동결건조 이전에 5 내지

8, 또는 5.5 내지 7, 또는 6.1 주변에서 조절될 수 있다.

[0142] 본 발명의 조성물은 하나 또는 그 이상의 면역 조절 제제를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 면역 조절 제제의 하나 또는 그 이상은 애쥬반트(adjuvant)를 포함한다.

[0143] 본 발명의 에피토프 조성물은 RSV 및 MPV 감염을 효과적으로 해결하기 위하여 체액성 면역 반응 뿐만 아니라 세포 매개 면역 반응을 모두 유도할 수 있다. 이러한 면역 반응은 RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 모두에 노출 시 빠르게 반응할 수 있는 지속성(예를 들어, 중화) 항체 및 세포 매개 면역을 유도할 수 있다.

[0144] 의료적 치료 및 용도

[0145] 본 발명의 항체 및 항체 단편 또는 이의 변이 및 유도체(derivatives)는 RSV 또는 MPV 감염 또는 RSV 및 MPV 둘다로 동시-감염(co-infection)의 치료용; RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염 예방용; 또는 RSV 또는 MPV 감염 진단용으로 이용될 수 있다.

[0146] 진단 방법은 샘플과 항체 또는 항체 단편을 접촉하는 단계를 포함할 수 있다. 그러한 샘플은 예를 들어, 비강, 누강(sinus cavities), 침샘, 폐, 간, 췌장, 신장, 귀, 눈, 태반, 소화관, 심장, 난소, 뇌하수체, 부신, 감상선, 뇌, 또는 피부로부터 채취한 조직 샘플일 수 있다. 또한 진단 방법은 항원/항체 복합체의 검출을 포함할 수 있다.

[0147] 따라서 본 발명은 치료에 사용을 위한 (i) 본 발명에 따른 항체, 항체 단편, 또는 이의 변이 및 유도체 (ii) 본 발명에 따른 불멸화된 B 세포 클론, (iii) 본 발명의 항체에 결합할 수 있는 에피토프 또는 (iv) 리간드, 바람직하게, 치료에 사용을 위한 본 발명의 항체에 결합하는 에피토프와 결합할 수 있는, 항체를 제공한다.

[0148] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 항체, 항체 단편, 또는 이의 변이 및 유도체 또는 리간드, 바람직하게 본 발명의 항체와 결합하는 에피토프와 결합할 수 있는 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 방법을 개체 내에서 감소된 RSV 또는 MPV 감염을 가져온다. 다른 실시예에서, 상기 방법은 개체에서 RSV 또는 MPV 감염을 예방, 위험 감소 또는 연기한다.

[0149] 본 발명은 또한 (i) 본 발명에 따른 항체, 항체 단편, 또는 이의 변이 및 유도체, (ii) 본 발명에 따른 불멸화된 B 세포 클론, (iii) 본 발명의 항체에 결합할 수 있는 에피토프 또는 (iv) 리간드, 바람직하게 본 발명의 항체에 결합할 수 있는 에피토프에 결합하는 항체, 또는 (v) (i) RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염을 치료 또는 경감하기 위한 의약품 제조, (ii) 백신 또는 (iii) RSV 및 MPV 감염의 진단에서 본 발명의 약학 조성물, 의 용도를 제공한다.

[0150] 본 발명은 RSV 또는 MPV 감염의 예방 또는 치료용 의약품으로써 사용을 위한 본 발명의 조성물을 제공한다. 또한 개체의 치료 및/또는 개체에서 진단을 위한 의약품의 제조에서 항체가 결합하는 에피토프를 포함하는 단백질 및/또는 본 발명의 항체의 용도를 제공한다. 또한 본 발명의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시예에서 상기 개체는 인간일 수 있다. 치료법적 처리의 효능을 체크하기 위한 한 방법으로 본 발명의 조성물의 투여 후에 질병 증상을 모니터링하는 단계를 포함한다. 치료는 단일 투여 스케줄 또는 다회 투여 스케줄로 될 수 있다.

[0151] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 항체, 항체 단편, 불멸화된 B 세포 클론, 에피토프 또는 조성물은 치료가 필요한 개체에 투여될 수 있다. 그러한 개체는 이에 제한되지는 않으나, 특히 예를 들어 면역시스템이 손상된 개체를 포함한, RSV 또는 MPV 감염에 감수성 또는 감염 위험이 있는 개체를 포함한다. 상기 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 또한 수동 면역(passive immunization) 또는 능동 예방접종(active vaccination)에 사용될 수 있다.

[0152] 본 발명에서 기술된 항체 및 이의 단편은 RSV 또는 MPV 감염의 진단을 위한 키트에 사용될 수 있다. 게다가, 본 발명의 항체에 결합할 수 있는 에피토프는 보호되는 항-RSV 또는 항-MPV 항체들의 존재를 검출하여 예방접종 과정의 효율성을 모니터링하기 위한 키트에 사용될 수 있다. 본 발명에 기술된 항체, 항체 단편, 이의 변이 및 유도체는 또한 목적으로 하는 면역원성을 가지는 백신 제조를 모니터링하기 위한 키트에 사용될 수 있다.

[0153] 본 발명은 또한 (i) 치료에, (ii) RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염 치료 또는 경감을 위한 의약품 제조에, (iii) 백신으로, 또는 (iv) RSV 또는 MPV 또는 RSV 및 MPV 둘다의 감염을 중화할 수 있는 리간드를 스크리닝하는데 사용하기 위한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 특이적으로 결합하는 에피토프를 제공한다.

[0154] 본 발명은 또한 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 캐리어와 단일클론 항체를 혼합하는 단계를 포함하는 약을 제조하는 방법을 제공하며, 여기서 단일클론 항체는 본 발명의 형질주입된 호스트 세포로부터 수득된 단일클론 항체이다. 따라서 처음 단일클론 항체를 수득하는 단계(예를 들어, 그것을 발명 및/또는 제조하는 단계) 및 약학적 캐리어(들)과 그것을 그 다음 혼합하는 단계를 위한 과정은 다른 시간에 다른 사람에 의해 다른 장소(예를 들어, 다른 나라에서)에서 수행될 수 있다.

[0155] 본 발명의 변형된 B 세포 또는 배양된 형질 세포로 시작하면서 다양한 단계의 배양, 계대배양, 클로닝, 서브클로닝, 시퀀싱, 핵산 제조 등은 각 단계에서 선택적으로 최적화로 변형된 B 세포 또는 배양된 형질 세포에 의해 발현된 항체를 영속시키기 위하여 수행될 수 있다. 일 실시예에서, 앞선 방법들은 항체를 암호화하는 핵산에 적용되어지는 최적화 기술들(예를 들어, 친화성 성숙(affinity maturation) 또는 최적화)을 더 포함한다. 본 발명은 그러한 단계 동안에 사용되고 제조되는 모든 세포, 핵산, 백터, 서열, 항체 등을 포함한다.

[0156] 모든 이러한 방법들에서, 발현 호스트에서 사용되는 핵산은 특정 핵산 서열을 삽입, 삭제 또는 변경하기 위해 조작될 수 있다. 그러한 조작으로부터의 변화는 제한 부위 도입의 변경, 코돈 유세지 보정, 전사 및/또는 번역 조절 서열 추가 또는 최적화를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한 암호화된 아미노산을 고치는 핵산을 변경하는 것도 가능하다. 예를 들어, 항체의 아미노산 서열안으로 하나 또는 그 이상의(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 등) 아미노산 치환, 삭제 및/또는 삽입을 도입하는데 유용할 수 있다. 그러한 점 돌연변이는 효과기 기능, 항원-결합 친화도, 변역후 변형, 면역원성 등을 변경할 수 있거나, 공유결합의 부착을 위한 아미노산(예를 들어, 레이블(labels))을 도입할 수 있으며 또는 태그(예를 들어 정제 목적으로)를 도입할 수 있다. 돌연변이는 선별된 후(예를 들어, 문자적 진화), 특이적 부위에 도입될 수 있으며 또는 랜덤으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체의 CDR 영역, 중쇄 가변영역, 또는 경쇄 가변영역 중 어느 것을 암호화하는 하나 또는 그 이상의 핵산은 암호화된 핵산안에 다른 특성을 도입하기 위하여 무작위로 또는 방향성있게 돌연변이될 수 있다. 그러한 변화는 반복 과정의 결과일 수 있으며 여기서 초기 변화는 유지되고 다른 뉴클레오티드 위치에서 새로운 변화가 도입된다. 게다가, 독립적인 단계에서 달성된 변화는 결합될 수 있다. 암호화된 아미노산 안으로 도입된 다른 특성들은, 강화된 친화성을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

용어

[0157] [0158] 본원에서 사용된, 용어 "항원 결합 단편", "단편" 및 "항체 단편"은 항체의 항원-결합 활성을 유지하는 본 발명의 항체의 임의의 단편을 가리키는 의미로 서로 바꿔서 사용된다. 항체 단편들의 예는 단쇄 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 또는 scFv를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 게다가, 본원에서 사용된 용어 "항체"는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 모두 포함한다.

[0159] 본원에서 사용된, "항체를 중화하는"은 중화할수 있는 것으로, 즉, 호스트에서 감염을 개시 및 영속하는 병원균의 능력을 방지, 억제, 감소, 지연 또는 간섭할 수 있는 것이다. 용어 "항체를 중화하는" 및 "중화하는 항체" 또는 "중화하는 항체들"은 여기서 서로 바꿔서 사용된다. 이러한 항체들은 단독으로 또는 결합하여, 본원에 정의된 진단 도구 또는 생산 도구로써 능동적 예방접종과 관련된, 적절한 제형으로 예방적 또는 치료적 제제로서 사용될 수 있다.

[0160] 용어 "포함하는"은 "이루어진", 뿐만 아니라 "함유하는"을 포함하며, 예를 들어 X를 포함하는 조성물은 X로만 이루어질 수도 있고, X+Y와 같은 어떤 것을 추가하는 것을 포함할 수 있다.

[0161] 용어 "실질적으로"는 "완전히" 배제하는 것은 아니며, 예를 들어 Y로부터 "실질적으로 없는" 조성물이라는 것은 완전히 Y가 없을 수 있다. 필요하다면, 용어 "실질적으로"는 발명의 정의에서 생략될 수 있다.

[0162] 용어 "약"은 예를 들어, x ± 5%, 또는 x ± 7%, 또는 x ± 10%, 또는 x ± 12%, 또는 x ± 15%, 또는 x ± 20%와 같은 절대값 x 와 관련된 것을 의미한다.

[0163] 본원에서 사용된 용어 "질병"은 일반적으로 동의어로 의도되고, 용어 "장애" 또는 "상태(의학적 상태(medical condition))"와 상호 바꿔서 사용되며, 이것은 정상적인 작동기능이 손상된 부위의 상태 또는 인간 또는 동물의 신체의 비정상적인 상태를 반영하는 모든 경우에 사용되며, 일반적으로 동물 또는 인간이 삶의 감소된 기간 또는 질을 가지고 야기하고 구별되는 징후 및 증상에 의해 분명히 나타난다.

[0164] 본원에 정의된 바와 같이, 개체 또는 환자의 "치료"에 대한 것은 방지(prevention), 예방(prophylaxis), 개선(attenuation), 경감(amelioration) 및 치료(therapy)를 포함하는 것으로 의도된다. 용어 "개체" 또는 "환자"

는 여기서 인간을 포함하는 모든 포유류를 의미하는 것으로 서로 바꿔서 사용되어진다. 개체의 예로는 인간, 소, 개, 고양이, 말, 염소, 양, 돼지 및 토끼를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 환자는 인간이다.

도면의 간단한 설명

[0165]

도 1은 *in vitro* 에서 RSV 또는 MPV 바이러스 감염을 중화하는 그들의 능력을 위한 7 공여자(Don. 1 내지 7)로부터 EBV-불멸화된 기억 B 세포들에 의해 생산된 단일클론 항체들을 스크리닝한 결과를 보여준다.

도 2는 단일클론 항체 HMB2430, HMB3210, 234 mAb 및 파리비쥬맙에 의한 RSV 및 MPV의 중화 결과를 보여준다.

도 3은 ELISA로 측정된 단일클론 항체 모타비쥬맙, 234 mAb, HMB2430 및 HMB3210에 의한 RSV F 또는 파상풍(Tetanus) 특신 단백질에 대한 결합을 보여준다.

도 4는 표시된 비-레이블된 항체들이 다양 존재할 때 RSV-감염된 Hep-2 세포들에 레이블된 단일클론 항체들의 결합을 보여준다.

도 5는 웨스턴 블롯(Western blot analysis)에 의해 측정된 것으로 리듀싱-컨디션(reducing conditions) 또는 비-리듀싱 컨디션(non-reducing conditions)하에서 RSV-Hep-2-감염 세포들의 용해물(lysates)로부터 RSV F 단백질에 단일클론 항체 HMB2430, HMB3210, 234 mAb, 및 모타비쥬맙의 결합을 보여준다.

도 6은 웨스턴 블롯에 의해 측정된 것으로 리듀싱 또는 비-리듀싱 컨디션하에서 MPV-LLC-MK2-감염된 세포들의 용해물로부터 MPV F 단백질에 단일클론 항체 HMB3210 및 234 mAb의 결합을 보여준다.

도 7은 RSV 롱 스트레인(Long strain)과 단일클론 항체 HMB2430, HMB3210, 234 mAb 및 파리비쥬맙에 의한 PZ-MARM6 분리주의 중화 결과를 보여준다.

도 8은 N-glycosidase PNG-ase F의 존재(+) 또는 부재(-)하에서 리듀싱 SDS-PAGE 젤 이후 배양하여 HMB3210v2를 분석한 결과를 보여준다. 블랙박스로 강조한 것은 당화된(glycosylated) HMB3210 경쇄의 마이너(minor) 부분이다.

도 9는 단일클론 항체 HMB3210v2 및 HMB3210v3에 의한 MPV I-PV 03/01-6621 및 RSV A2의 중화 결과를 보여준다.

도 10은 단일클론 항체 HMB3210v2 및 HMB3210v3에 의한 MPV 및 RSV 스트레인의 패널의 중화 결과를 보여준다.

도 11은 HMB3210 및 HMB2430 단일클론 항체 생식선 변이에 의한 MPV I-PV 03/01-6621 및 RSV A2의 중화 결과를 보여준다.

도 12는 HMB3210 또는 파리비쥬맙과 RSV F 후-융합 재조합 단백질의 동시-배양 또는 HMB3210 또는 파리비쥬맙과 동시에 배양하지 않은 RSV F 후-융합 재조합 단백질의 사이즈 배제 크로마토그래피 분석 결과를 보여준다.

도 13은 HMB3210 또는 파리비쥬맙과 RSV F 전-융합 재조합 단백질의 동시-배양 또는 HMB3210 또는 파리비쥬맙과 동시에 배양하지 않은 RSV F 전-융합 재조합 단백질의 사이즈 배제 크로마토그래피 분석 결과를 보여준다.

도 14는 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance)에 의해 측정한 것으로 전-융합 및 후-융합 RSV F 단백질에 HMB3210v3 또는 파리비쥬맙(PVZ)의 결합을 보여준다.

도 15는 인간 단일클론 항체 HMB3210v3 및 D25에 의한 바이러스 중화 및 바이러스 확산 억제를 보여준다.

도 16은 RSV 또는 MPV 감염에서 HMB3210v3 및 파리비쥬맙의 예방 효능을 보여준다.

도 17은 RSV로 감염된 STAT1 결핍 쥐에서 HMB3210의 치료 효능을 보여준다.

도 18은 치사량의 PVM로 감염된 쥐에서 HMB3210의 예방 및 치료 효능을 보여준다.

도 19는 PVM로 치사감염 이후 3, 4, 또는 5일째에 HMB3210v3로 처리한 쥐에서 폐 바이러스의 역가 증가를 블럭킹하는 것을 보여준다.

도 20은 치사량의 PVM로 감염된 쥐에서 와일드 타입 Fc 또는 LALA 돌연변이를 갖는 HMB3210v3 변이의 예방적 및 치료적 효능을 보여준다.

도 21은 파라인플루엔자 바이러스 5 (PIV5)와 비교하여 RSV, BRSV, PVM 및 MPV 서열에서 HMB3210에 의해 인식되는 YLSALR 페티드의 높은 보존성을 강조하는 얼라이먼트(alignment)를 보여준다.

도 22는 YLSALR 웨티드의 위치 및 가까운 파리비쥬맙(PVZ) 사이트의 위치를 보여주는 전-융합 RSV F 단백질의 모델 및 RSV F 단백질의 전- 및 후- 융합 형태에서 PVZ 및 HMB3210v3의 재배열을 강조하는 리본 다이어그램을 보여준다.

도 23은 364 RSV, 162 MPV, 8 BRSV 및 5 PVM 스트레인에서 HMB3210 코어 에피토프의 높은 보존성을 보여준다.

도 24는 HMB3210의 다양한 중쇄 및 경쇄 변이 서열을 보여준다.

도 25는 HMB2430의 다양한 중쇄 및 경쇄 변이 서열을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0166] 본 발명의 바람직한 구현들은 다음의 실시예들을 통해 제공된다. 다음 실시예들은 본 발명의 통상의 기술자들이 본 발명을 이해하기 위한 하나의 방식을 대표하는 것이다. 실시예들은 본 발명의 범위를 다르게 제한하는 방식으로 이해되어서는 안된다.

[0167] 실시예 1. RSV 및 MPV 둘 다를 교차-중화할 수 있는 인간 기억 B 세포로부터 단일클론 항체들을 분리 및 특징규명

[0168] 125 혈액 공여자들의 집단으로부터 우리는 RSV 및 MPV에 대한 높은 혈청 항체 역가를 보이는 7 공여자를 선택하였다. CD22+ IgG+ B 세포는 동결보존된 말초혈액 단핵 세포(PBMCs)로부터 분류되고 Epstein Barr Virus (EBV) 및 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 2006를 이용하고, 배양보조 세포로 조사된 동종이계의 PBMCs를 이용하여 3 내지 5 cells/well로 불멸화하였다. 배양 상청액은 14일 후에 회수하였으며, RSV strain A2에 의한 Hep-2 세포 및 MPV A1 I-PV-03/01-6621 strain에 의한 LLC-MK2 cells의 감염에 근거한 미세중화법(microneutralization assay)을 이용하여 중화 항체의 존재를 분석하였다. 니트(neat) 상청액은 각각 6 또는 8일 간 배양된 Hep-2 or LLC-MK2 target cells의 첨가 이전에 실온에서 1시간 동안 50-100 TCID₅₀ 바이러스와 함께 배양하였다. 생존 세포들은 3시간 또는 4시간 동안 WST-1 시약(Roche)을 배지에 첨가하여 분광 광도계를 이용하여 측정하였다.

[0169] 세 개의 독립된 실험으로부터, MPV를 중화한 36 단일클론 항체들(mAbs)은(도 1, 왼쪽 패널) 분리되고 ; 5개의 독립적인 실험으로부터, RSV를 중화하는 136 mAbs(도 1, 오른쪽 패널)은 분리되었다. 2차 스크리닝은 그다음 분리된 mAbs가 MPV 및 RSV를 모두 중화할 수 있는지 시험하기 위하여 수행하였다. 이 전략을 이용하기 위하여, 동일한 공여자(Don.5)로부터 분리된 두 개의 mAbs가 RSV 및 MPV를 교차-중화하기 위해 발견되었다:(i) 초기에 RSV의 중화에 근거하여 선택된 HMB2430 및 (ii) 초기에 MPV의 중화에 근거하여 선택된 HMB3210.

[0170] HMB2430 및 HMB3210의 VH 및 VL 유전자는 IgG1 발현 벡터 안으로 클론되고 재조합 mAbs는 293 프리스타일 세포(Freestyle cells) (293F)의 일시적인 형질주입에 의해 생산되었다. 형질주입된 세포로부터 얻은 상청액은 배양 10일 이후에 수집되었고 IgG는 프로테인 A 어피니티 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 두 개의 mAbs는 IMGT database를 이용하여 수행되는 상동성 분석에 따를 때, 대부분의 V 및 J 유전자 단편들 (IGHV3-21*01,IGHJ4*02, IGLV1-40*01 및 IGLJ1*01)을 공유하였으며, IGHD 유세지(usage) (각각 HMB2430 및 HMB3210에서 D3-10*01 및 D5-24*01)에서 N 영역 및 체세포 돌연변이의 패턴에서 차이가 있었으며, 그러므로 클론적으로 관련된 것으로 생각되지 않았다.

[0171] HMB2430 및 HMB3210의 최대 억제 반감 농도(IC50)는 최대 50 이상의 세포를 감염시킨 바이러스의 양 (TCID₅₀)으로 설명되는 미세중화법을 이용하여 결정되어진다. IC50 값은 가변 경사가 있는 4-파라미터 비선형 회귀 장착 중화 곡선의 보간(interpolation)에 의해 산출하였다. 분석 결과는 도 2 및 표 4에 나타냈다.

표 4

	mAbs IC50 (ng/ml)			
바이러스 (그룹)	HMB2430	HMB3210	파리비쥬맙	234
RSV A2 (A)	146	86	524	>20000
MPV I-PV 03/01-6621 (A1)	393	52	>20000	7

[0173] 실시예 2. 모든 RSV 및 MPV 그룹 및 하위-그룹에 대한 반응성의 규모

[0174] HMB2430 및 HMB3210의 반응성 규모를 측정하기 위하여, 정제된 mAbs는 다음의 RSV 및 MPV 스트레인을 이용하여, Hep-2 RSV-감염된 세포 또는 LLC-MK2 MPV-감염된 세포에 결합하는 FACS에 의해 시험하였다: RSV A2 (A, 1961 Australia; A/A2/61), RSV Long (A, Maryland US, 1956; A/Long/56), RSV Randall (A, Chicago US, 1958; A/Randall/58), RSV 9320 (B, Massachusetts US, 1977; B/9320/77), WV/14617/85 (B, Huntington West Virginia, 1985; B/14617/85), 18537 (B, Washington District of Columbia US, 1962; B/18537/62), MPV I-PV-03/01-6621 (A1, Pavia IT, 2001; A1/6621/01), MPV I-PV-02/06-8938 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8938/06), I-PV-03/04-4702 (B1, Pavia IT, 2004; B1/4702/04) 및 I-PV-02/04-3817 (B2, Pavia IT, 2004; B2/3817/04). 동시에, 세개의 이전에 기술된 mAbs를 시험하였다:(i) 모타비쥬맙, RSV-특이적; (ii) mAb 234, MPV-특이적; 및 (iii) F032, 인플루엔자 A-특이적 (음성 대조군으로 사용됨). 모든 mAbs는 10 μ g/ml에서 감염 또는 비감염 세포들에 결합하는지 시험하였다. SHMB2430 및 HMB3210는 시험된 모든 6 RSV 스트레인 및 모든 4 MPV 스트레인, 알려진 RSV 및 MPV 그룹 및 하위-그룹들과 반응하였다. (표 5). 대조적으로, 모든 6 시험된 RSV 스트레인들과 반응한 모타비쥬맙은 시험된 4 MPV 스트레인들중 어느것과도 반응하지 않았다. 역으로, 시험된 모든 4 MPV 스트레인들과 반응한 234 mAb들은 시험된 6 RSV 중 어느것과도 반응하지 않았다.

[0175] 하기 표 5는 각각 RSV 또는 MPV의 다른 스트레인들에 의해 감염된 Hep-2 또는 LLC-MK2 세포들의 염색을 나타낸 것이며, 유세포 분석기(flow cytometry)에 의해 측정된 F032 (음성 대조군), 모타비쥬맙, 234, HMB2430 및 HMB3210에 의해 각각 나타냈다.

표 5

바이러스	단일클론 항체 (10 μ g/ml)				
	F032	모타비쥬맙	mAb 234	HMB2430	HMB3210
RSV A/A2/61		+		+	+
RSV A/Long/56		+		+	+
RSV A/Randall/58		+		+	+
RSV B/18537/62		+	-	+	+
RSV B/14617/85		+		+	+
RSV B/9320/77		+		+	+
MPV A1/6621/01			+	+	+
MPV A2/8938/06			+	+	+
MPV B1/4702/04			+	+	+
MPV B2/3817/04			+	+	+
Mock LLC-MK2					
Mock Hep-2					

[0177] (-) <5% 염색된 세포

[0178] (+) >50% 염색된 세포

[0179] 실시예 3. ELISA 및 형질주입된 세포의 염색에 의한 RSV 및 MPV의 재조합 F 단백질의 결합

[0180] RSV 및 MPV 바이러스에서 HMB2430 및 HMB3210에 의해 인식된 타겟 항원을 확인하기 위하여, 두 mAbs-를 분석하였으며, 동시에 모타비쥬맙 및 mAb 234를 분석하였다. 이는 일시적 형질주입된 293F 세포로부터 생산된 RSV (A2 스트레인)의 동형 삼량체 수용성 F 단백질에 결합할 수 있는 능력을 확인하기 위해서이다. 도 3에서 보이는 바와 같이, HMB2430 및 HMB3210 모두는 특이적으로 ELISA에 의해 RSV F 단백질과 반응하였고, 모타비쥬맙과는 비교되는 구별되는 결합 프로파일을 보여주었다. 게다가, HMB2430 및 HMB3210은, RSV (A2 스트레인) 또는 MPV (NL/1/99 B1 스트레인)로부터 전장 F 단백질을 암호화하는 포유류의 밸런 백터로 일시적으로 형질주입된 세포내부 293F 세포를 염색하였고(표 6), 이것은 HMB2430 및 HMB3210은 RSV 및 MPV F 단백질 둘다에 존재하는 공유된 에피토프(shared epitope)를 인식한다는 것을 나타낸다. 이러한 발견은 특별히 RSV 및 MPV F 단백질들이 단지 33-35%의 아미노산 서열 상동성을 가진다는 것을 고려할 때 놀라운 것이다. 예상대로 파리비쥬맙 및 모타비쥬맙

은 RSV F 단백질을 발현하는 세포에 결합하였으나 MPV F 단백질을 발현하는 것에는 결합하지 않았다(표 6). 역으로, 234 mAb는 MPV F 단백질을 발현하는 세포들에 결합하였으나, RSV F 단백질을 발현하는 세포에는 결합하지 않았다(표 6).

[0181] 하기 표 6은 유세포 분석기를 이용하여 측정한, 비형질주입된 293F 세포 또는 RSV 또는 MPV F 단백질로 형질주입된 293F 세포의 염색을 나타낸다.

표 6

[0182]	항체 ($10 \mu\text{g/ml}$)	293F + RSV F (A/A2/61;A)	293F + MPV F (NL/1/99;B1)	293F 비형질주입
HMB3210	+	+		
HMB2410	+	+		
파리비쥬맙	+			
모타비쥬맙	+			
234			+	

[0183] (-) <5% 염색된 세포

[0184] (+) >50% 염색된 세포

[0185] 실시예 4. RSV 감염된 세포에서 억제 결합 분석(inhibition binding assay)을 이용한 에피토프 맵핑

[0186] HMB2430 및 HMB3210에 의해 인식된 F 단백질 에피토프를 파악하기 위하여, RSV A2 스트레인으로 감염한 Hep-2 세포를 이용하여 결합 측정법의 억제를 계획하였다. RSV F 단백질-특이적 mAbs 의 다음 패널들을 구입하거나 유전자 합성을 통하여 생산하였다: (i) 모타비쥬맙, 항원결정 부위(antigenic site)II에 특이적; (ii) 101F, 항원 결정 부위 IV에 특이적; (iii) 확실치 않은 특이도의 D25; (iv) 131-2a, 항원결정 부위 I에 특이적. mAbs는 비오틴으로 레이블되고 70~80%의 최대 결합도를 달성하는데 필요한 mAb의 최적 농도를 결정하기 위하여 Hep-2 감염 세포에 대한 결합을 시험하였다. 비오틴-결합된 mAbs는 그 다음으로 그들의 결합(형광단- 결합된 스트렙트아비딘을 이용하여 측정된)이 50배 이상의 동형 또는 이형 비레이블된 mAbs로 RSV A2-감염 세포의 전-배양에 의해서 억제되는지 아닌지를 평가하기 위한 프로브(probes)로 사용되었다. 예상되는 바와 같이, 비오틴-레이블된 HMB2430의 결합은 비레이블된 HMB2430과 세포를 전배양하여 블러킹되었으나, 비레이블된 HMB3210에 의해서는 부분적으로 블러킹되었다(도 4). 대조적으로, 시험된 모든 다른 비오틴-레이블된 mAbs의 결합은 HMB2430 또는 HMB3210 와 전-배양에 의해서 막히지 않았다. (도 4). 이러한 결과들은 HMB2430 및 HMB3210 은 RSV 및 MPV에 공유되는 F 단백질에 있는 오버랩핑(overlapping) 에피토프들을 부분적으로 인식한다는 것을 가리킨다. 그리고 이러한 에피토프들은 F 단백질 항원결정 부위 II (모타비쥬맙 및 파리비쥬맙에 의해 인식되는), 항원결정 부위 IV (mAb 101F에 의해 인식되는), 및 항원결정 부위 I (mAb 131-2A에 의해 인식되는)에 있는 에피토프들과는 구별된다. 게다가, RSV F 단백질의 mAbs HMB2430 및 HMB3210에 의해 인식되는 에피토프들은 mAb D25에 의해 인식되는 알려지지 않은 에피토프와도 구별된다.

[0187]

[0188] 실시예 5. 리듀싱(reducing) 및 비-리듀싱(non-reducing) 컨디션하에서 RSV 및 MPV F 단백질과의 단일클론 항체의 반응성

[0189] 더 정확하게 HMB2430 및 HMB3210이 RSV 및 MPV 둘다의 F 단백질을 인식하는지 확인하기 위하여, 웨스턴 블로트으로 두 개의 mAbs의 RSV 및 MPV F 단백질 염색능력을 테스트하였다. Hep-2 세포는 RSV로 감염하였고, LLC-MK2 세포는 MPV로 감염하였으며, 순한 세정제로 용해하였으며 리듀싱 컨디션(reducing condition) 및 비-리듀싱 컨디션(non-reducing conditions)하에서 SDS-PAGE 겔을 걸어주었다. 단백질은 그다음 PVDF 멤브레인으로 옮겼고 그다음 HMB2430, HMB3210, 모타비쥬맙 또는 234 mAb과 배양하였다. MAb 결합은 ECL Western Blotting Detection reagent와 결합하여 항-인간 HRP-컨쥬게이트 항체로 감지하였다. F 단백질에 결합된 HMB2430 및 HMB3210 은 비-리듀싱 컨디션하에서 RSV-감염된 세포(도 5) 및 MPV-감염된 세포(도 6)으로부터 유래되었다. 상기 MPV-특이적 mAb 234(이는 RSV F 단백질에 있는 항원결합 부위 II 와 잘 들어맞는 MPV F 단백질의 에피토프를

인식한다)는 비-리듀싱 컨디션하에서 MPV F 단백질에 결합하지만, RSV F 단백질에는 결합하지 않는다. 대조적으로, 리듀싱 및 비-리듀싱 두 컨디션 모두에서 RSV F 단백질에 결합된 RSV-특이적 mAb 모타비쥬맙은, 주로 선형 에피토프를 인식한다는 것을 확인하는 것이다. 이러한 결과들은 모타비쥬맙 및 파리비쥬맙과는 다르게, HMB2430 및 HMB3210은 RSV 및 MPV F 단백질에 있는 아미노산 잔기들 사이의 이황화 결합의 존재에 의존적인 입체배좌의 (conformational) 에피토프를 인식한다는 것을 시사한다.

[0190] **실시예 6. HMB2430 및 HMB3210에 의한 모든 RSV 및 MPV 그룹 및 하위-그룹의 중화**

[0191] 정제된 HMB2430 및 HMB3210 mAbs는 각각 Hep-2 세포 또는 LLC-MK2 세포의 RSV 또는 MPV 감염을 중화하는 능력에 대해 테스트하였다. 다음의 RSV 및 MPV 스트레이인들이 테스트되었다: RSV A2 (A, 1961 Australia; A/A2/61), RSV Long (A, Maryland US, 1956; A/Long/56), RSV Randall (A, Chicago US, 1958; A/Randall/58), RSV 9320 (B, Massachusetts US, 1977; B/9320/77), WV/14617/85 (B, Huntington West Virginia, 1985; B/14617/85), 18537 (B, Washington District of Columbia US, 1962; B/18537/62), RSV 9727/2009 (B, Pavia IT, 2009; B/9727/09), RSV 9736/2009 (B, Pavia IT, 2009; B/9736/09), RSV 9847/2009 (B, Pavia IT, 2009; B/9847/09), MPV I-PV-03/01-6621 (A1, Pavia IT, 2001; A1/6621/01), MPV I-PV-02/06-8938 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8938/06), I-PV-02/06-8908 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8908/06), I-PV-02/06-8909 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8909/06), I-PV-03/04-4702 (B1, Pavia IT, 2004; B1/4702/04) and I-PV-02/04-3817 (B2, Pavia IT, 2004; B2/3817/04).

[0192] 동일한 실험에서 HMB2430 및 HMB3210은 파리비쥬맙 (RSV-specific) 및 234 mAb (MPV-specific)와 비교되었다. HMB3210은 알려진 RSV 및 MPV 그룹 및 하위 그룹을 대표하는, 테스트된 모든 11 RSV 및 모든 MPV 스트레이인을 중화하였다(표 7). HMB2430은 테스트된 모든 11 RSV 스트레이인들 및 테스트된 모든 A1 및 A2 MPV 스트레이인들을 중화하였으나, 테스트된 B1 또는 B2 MPV 스트레이인을 중화하지 않았다. 예상한 바와 같이, 파리비쥬맙은 테스트된 모든 11 RSV 스트레이인들을 중화하였으나, 테스트된 6 MPV 스트레이인들중 어느것도 중화하지 않았으며 반면에 234 mAb는 테스트된 모든 6 MPV 스트레이인을 중화하였으나 테스트된 11 RSV 스트레이인중 어느것도 중화하지 않았다.

[0193] HMB3210 및 HMB2430은 강력하게 테스트된 모든 11 RSV 스트레이인들을 중화하였다(각각, 0.070 및 0.133 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 평균 IC50 값, 이러한 값은 파리비쥬맙의 IC50 값(0.284 $\mu\text{g}/\text{ml}$)보다 평균 5.4 및 2.6 배 더 높은 값이다.). HMB3210은 강력하게 테스트된 모든 6 MPV 스트레이인들을 중화하였으며(IC50 평균 값 0.113 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 이것은 234의 IC50 값 (0.046 $\mu\text{g}/\text{ml}$)보다 1.7배 더 낮다.

[0194] 하기 표 7은 RSV 및 MPV 스트레이인의 중화를 나타낸 것이다.

표 7

바이러스	중화 IC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	파리비쥬맙	mAb 234	HMB2430	HMB3210
RSV A/A2/61	0.617	-	0.350	0.184
RSV A/Long/56	0.599	-	0.361	0.187
RSV A/Randall/58	0.440	-	0.179	0.116
RSV A/9846/09	0.283	-	0.123	0.06
RSV A/9835/09	0.284	-	0.076	0.063
RSV B/18537/62	0.143	-	0.094	0.034
RSV B/14617/85	0.129	-	0.096	0.038
RSV B/9727/09	0.275	-	0.084	0.051
RSV B/9320/77	0.069	-	0.021	0.012
RSV B/9736/09	0.092	-	0.027	0.007
RSV B/9847/09	0.209	-	0.053	0.026
MPV A1/6621/01	-	0.040	0.744	0.071
MPV A2/8938/06	-	0.044	1.049	0.045
MPV A2/8908/06	-	0.057	2.795	0.066
MPV A2/8909/06	-	0.012	0.161	0.007
MPV B1/4702/04	-	0.019	-	0.029
MPV B2/3817/04	-	0.106	-	0.465

[0196] 실시예 7. RSV 및 MPV 바이러스 이스케이프 돌연변이(escape mutants) 선택의 부족

HMB3210, 파리비쥬맙 및 234 mAb은 *in vitro*에서 RSV 또는 MPV 단일클론 항체 저항성 돌연변이(MARMs)를 선별하는 능력을 위해 테스트되었다. 몇가지 시도에도 불구하고, 32x10e6 RSV A/Long/58 TCID50 및 16x10e6 MPV A1/6621/01 TCID50에 대하여 테스트하였을 때, 임의의 RSV 또는 MPV MARMs를 선별하는데 실패하였다. 대조적으로, 파리비쥬맙은 높은 빈도로 MARMs를 선별하였다. (총 85 독립적인 파리비쥬맙 MARMs는 16x-10e6 RSV A/Long/58 TCID50의 투입으로부터 분리되었으며, 이는 185,000 TCID50에서 1의 빈도와 들어맞는다). 같은 실험 조건하에 MAb 234는 어떠한 MPV MARMs도 선별하지 않았다. 234 mAb MARMs를 분리하는 어려움은 Ulbrandt et al. (J General Virol 2008)에 보고된 것과 일치하며, 이는 적은 양의 MARMs를 분리하기 위해 높은 수주의 바이러스가 필요하다는 것을 보여주었다. 탈출된 바이러스는 NL/1/99 MPV B1 분리체를 이용하여 돌연변이 K242N를 보여주었다. 독립적인 파리비쥬맙 MARMs (PZ-MARMs)는 수집되고 그들 중 10개의 F 단백질은 완전히 서열이 부석되었다(표 8). PZ-MARM2, PZ-MARM3, PZ-MARM4, PZ-MARM5, PZ-MARM6, PZ-MARM8 및 PZ-MARM10은 동일한 두 아미노산 돌연변이를 공유하였다(P101S/K272T); PZ-MARM1은 같은 위치에 두 개의 아미노산 돌연변이를 또한 가졌다 으나 다른 종류의 아미노산으로 변화되었다 (P101S/K272Q); PZ-MARM7는 단일 아미노산 돌연변이를 (K272N) 다시 272 위치에서 가졌다; 마지막으로, Z-MARM9는 다른 PZ-MARMs와 마찬가지로 돌연변이를 가졌으며 262 위치에 고유의 돌연변이를 가졌다 (P101S/N262Y). 이 영역에서(뉴클레오티드 위 827 및 828) 점 돌연변이(point mutations)는 이미 알려졌고(Zhao et al. Virology 2004) 그리고 결과적으로 272 위치에서 두 개의 다른 아미노산 변화가 있었다 (K272Q 및 K272M). 첫 번째 돌연변이는 (즉, K272Q) 본원에 기술된 PZ-MARM1에 존재하였다. 이러한 점 돌연변이를 가져오는 바이러스들은 완전히 코튼랫에서 파리비쥬맙의 예방 효과에 대하여 저항성을 나타냈으며(Zhao et al. Virology 2004), 다른것들과 마찬가지로 몇몇 돌연변이들이 파리비쥬맙으로 예방적으로 처리된 RSV-감염된 면역억제 코튼랫에서 만들어졌다.

[0198] HMB3210, HMB2430 및 파리비쥬맙은 그 다음 Hep-2 세포의 PZ-MARM6 감염을 중화하는 그들의 능력을 시험하였다. 파리비쥬맙은 PZ-MARM6을 중화하지 않았으나, 반면에 HMB3210 및 HMB2430은 강력하게 이러한 바이러스들을 야생형 바이러스들에서 관찰되는 것과 비교되는 수준으로 강력하게 중화하였다(도 7).

[0199] 이러한 결과는 *in vitro*에서, HMB3210 및 HMB2430은 RSV 또는 MPV MARMs을 선별하지 않았다는 것을 증명한다. 이러한 결과는 HMB3210 및 HMB2430에 의해 인식되는 타겟 에피토프는 극도로 보존되고 항체 결합을 파괴하는 돌연변이는 극히 드물다는 생각과 일치하거나 또는 바이랄 피트니스(viral fitness)의 순실과 관련될 것이다.

[0200] 하기 표 8은 파리비쥬맙으로 선별된 RSV MARMs에서 아미노산 변이를 보여준다.

표 8

	아미노산 위치 (핵산 위치)				
	101 (314)	262 (797)	272 (827)	272 (828)	272 (829)
RSV A/Long/56	P	N	K	K	K
PZ-MARM1	S (C to T)		Q (A to C)		
PZ-MARM2	S (C to T)			T (A to C)	
PZ-MARM3	S (C to T)			T (A to C)	
PZ-MARM4	S (C to T)			T (A to C)	
PZ-MARM5	S (C to T)			T (A to C)	
PZ-MARM6	S (C to T)			T (A to C)	
PZ-MARM7	P				N (G to T)
PZ-MARM8	S (C to T)			T (A to C)	
PZ-MARM9	S (C to T)	Y (A to T)			
PZ-MARM10	S (C to T)			T (A to C)	

[0202] 실시예 8. LCDR3에서 글라이코슬레이션 부위의 제거는 HMB3210 활성에 영향을 미치지 않는다.

[0203] HMB3210 가변 경쇄는 113번 위치의 LCDR3에서 N-글라이코슬레이션 모티프(NxS/T, 여기서 x는 임의의 아미노산 이지만, 프롤린은 아니다)를 가진다(IMGT numbering).

[0204] 113번 위치(N113)의 아스파라긴은 점라인(germline) 서열에 존재하는 세린으로 대체된다. 가변영역의 글라이코

실레이션 모티프의 존재는 항체 활성에 부정적 또는 긍정적인 영향을 가져올 것이며 항체 이질성(heterogeneity)의 원인이 될 수 있는 것으로 인식된다. HMB3210 경쇄에서 글리칸(glycan)의 존재는 N-글리코시다제 PNGase F의 존재 또는 부존재 상태에서 배양한 후에 리듀싱 SDS-PAGE gel에서 평가하였다(도 8). 이러한 분석은 경쇄의 소수집단은 정말로 당화된다는 것을 가리켰다. N113 잔기는 그 다음 제거되고 이에 해당하는 점라인-암호화된 세린 잔기가 회복된다. 동시에, 경쇄의 프레임워크-1 영역(P7T)에서 다른 체세포 돌연변이는 또한 7번 위치에서 점라인-암호화된 프롤린 잔기를 회복하기 위하여 제거되었다 (IGLV1-40*02 유전자에 해당하는 IMGT numbering). HMB3210 중쇄 VH.2 (SEQ ID 17) 및 HMB3210 경쇄 VL.3에 의해 만들어지는 새로운 HMB3210 변이 (HMB3210v3로 불리는)는 그 다음 생산되고, HMB3210v2 (HMB3210 중쇄 VH.2 (서열번호 17) 및 경쇄 VL 서열번호 14에 의해 만들어지는)와 동시에 RSV A2 및 MPV I-PV 03/01-6621 스트레이인에 대한 그들의 중화 활성을 테스트하였다. 이러한 변이(HMB3210v3)는 시험한 RSV 및 MPV 스트레이인들 모두에 대해 약간 향상된 중화도를 보였고(도 9), 따라서 경쇄 클라이코실레이션 부위의 제거는 RSV 및 MPV 타겟 에피토프에 대한 결합에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 두 항체 변이들은 그 다음 RSV 및 MPV 바이러스를 패널에 대하여 동시에 시험을 하였고 테스트된 모든 바이러스들에 대하여 비교될 수 있는 활성을 가진다는 것을 보여주었다(도 10). 결론적으로, HMB3210v3는 가변 경쇄에서 당화되지 않았으며, 중쇄에서 단지 8개의 아미노산 체세포 돌연변이를 가지고 경쇄에서 4개의 아미노산 체세포 돌연변이를 가지는 점라인 경쇄 및 중쇄 유전자와 비교하여 전체적으로 저조하게 돌연변이되었다: S58A (HCDR2), I65S (HCDR2), Y66D (HFR3), V71A (HFR3), N85T (HFR3), Y88F (HFR3), V101I (HFR3), Y103F (HFR3), G56D (LCDR2), S65N (LCDR2), G78A (LFR3) 및 S109R (LCDR3) (모든 위치는 IMGT numbering에 따른 것이다)

[0205] 실시예 9. MPV와 HMB3210 and HMB2430의 교차-반응성(cross-reactivity)은 체세포 돌연변이에 의존한다.

RSV 및 MPV에 대한 HMB2430 및 HMB3210의 교차-반응성에서 체세포 돌연변이의 역할에 대한 이해를 얻기 위하여, 모든 mAbs의 점라인 버전을 합성하고 그들의 RSV A2 및 MPV I-PV 03/01-6621 스트레이인을 중화하는 능력을 테스트하였다. HMB2430 및 HMB3210 점라인 mAbs(각각 HMB2430-GL 및 HMB3210-GL)들은 HMB2430-GL의 경우에는 VH.3 및 VL.2로 만들었고 HMB3210-GL의 경우에는 VH.3 및 VL.4로 만들었다. 두 개의 mAbs의 점라인 형태는 체세포 돌연변이된 HMB3210 및 HMB2430를 오리지날에서 관찰되는 것과 비교할만한 수준으로 RSV를 충분하게 중화하였다(도 11). 그러나, HMB3210-GL 및 HMB2430-GL은 MPV를 중화하는데 실패하였고, 따라서, 체세포 돌연변이는 MPV 중화에 필수적이라는 것을 나타낸다. 중쇄 또는 경쇄의 체세포 돌연변이가 MPV의 중화에 둘다 책임이 있는지 더 알아보기 위하여, 점라인으로 구성하고 거기서 경쇄 또는 중쇄를 가진 항체들을 생산하였다: VH.3 및 VL에 의해 만들어진 HMB2430-VHGL-VLSM; VH.2 및 VL.2에 의해 만들어진 HMB2430-VHSM-VLGL; VH.3 및 VL에 의해 만들어진 HMB3210-VHGL-VLSM; VH.2 및 VL.4에 의해 만들어진 HMB3210-VHSM-VLGL. HMB3210의 중쇄에서 체세포 돌연변이의 제거는 RSV 또는 MPV 바이러스의 중화에 영향을 미치지 않았다. 그러나, 비록 RSV의 중화는 유지할지라도, HMB2430의 중쇄에서 체세포 돌연변이의 제거는 MPV의 중화에 영향을 미쳤다. HMB2430 및 HMB3210 둘다의 경쇄에서 체세포 돌연변이의 제거는 MPV 중화를 없앴고, 반면에 RSV 중화는 영향을 미치지 않았다(도 11). 이를 생각해보면, 이러한 발견은 HMB3210 및 HMB2430는 처음에 RSV에 의해 선별되었고 뒤따라서 체세포 돌연변이의 축적을 통하여, MPV에 대한 교차-반응성을 발달되었다. 전체적으로 경쇄 CDRs에서 단지 3개의 체세포 돌연변이만이 RSV-특이적 점라인 항체에서 MPV 교차-반응성의 수집에 중요하다. 흥미로운 것은, HMB2430 및 HMB3210(클론적에 의해 관련은 아니지만) HMB2430 및 HMB3210은 109번 위치에서 LCDR3 S에서 R로 동일한 체세포 돌연변이를 공유한다.

[0207] 실시예 10. 전- 및 후- 융합 F 단백질 형태의 HMB3210 인식

C-말단 히스티딘 태그를 갖는 RSV F 잔기 26-136 및 147-512를 암호화하는 DNA 구조(RSV 스트레이인 A2의 융합 펩티드 없는 F 엑토도메인에 상응하는)는 최적화되고 합성된 코돈이다. 재조합 F는 Sf21 세포에서 배콜로바이러스(baculovirus) 발현 벡터를 이용하여 발현시켰고 니켈 친화도 및 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용하여 상청액으로부터 정제하였다. 유사한 구조가 이미 후-융합 F 단백질의 결정형 구조를 해결하기 위하여 사용되었다(Swanson et al. PNAS 2011 및 McLellan et al. J Virol 2011). 단백질은 SDS-PAGE gel에서 비-리듀싱 컨디션하에서 분석하였고 \approx 65-70 kDa에서 밴드를 보였다. 그리고 S200 컬럼으로 SEC에 의해 분석하였을 때 "후-융합" RSV F 단백질은 삼량체 F 단백질의 MW에 상응하고 인간 IgG1 항체의 용출용적과 오버랩되는 \approx 150 kDa의 확실한 분자량을 갖는 대칭적인 피크를 보였다. "후-융합" F 단백질은 HMB3210 또는 파리비쥬맙과 배양되었

고 두 혼합물은 S200 컬럼을 이용하였다. 파리비쥬맙과 "후-융합" F 단백질의 배양은 F 단백질 단독으로 하였을 때와 비교하여, 용출 피크를 더 낮은 용출 용적(≈ 300 kDa의 MW)으로 이동하였으며, 이것은 이미 보고된 바와 같이, 파리비쥬맙은 "후-융합" F 단백질에 결합하였다는 것을 나타낸다. 중요한 것은, "후-융합" F 단백질과 HMB3210의 배양이 용출 용적의 이동을 가져오지 않는다는 것이다(도 12). "후-융합" F 단백질 및 HMB3210 이 독립적인 분자로 용출된다는 사실은 HMB3210은, 파리비쥬맙과 달리, "후-융합" F 단백질과 결합하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0209]

전장 전-융합 RSV F 단백질의 안정화된 형태는 Magro et al. PNAS 2012 에 의해 채용된 전략에 따라 합성되었고, 이는 4 개의 아미노산 잔기(L481, D489, S509 및 D510)를 시스테인으로 치환하고, 9 개의 염기성 아미노산 잔기 (R106, R108, R109, K131, K132, R133, K134, R135 및 R136)를 두 개의 F 단백질 절단 부위에서 퓨린 절단 부위를 제거하기 위하여 N 잔기로 치환하였다. F 단백질 서열은 추가적으로 트랜스멤브레인 영역 이후에 TEV 절단 부위의 삽입에 의해 변형되었고, 그 다음 정제를 가능하게 하기 위하여 C-말단에 GFP 및 6-His 태그로 변형하였다. PIV-5 전-융합 F 구조에 따라, 4개의 도입된 시스테인은 위치하고, 어느정도는 단량체간 이황화 결합의 형성은 가능한데, 오로지 F 단백질이 전-융합 형태일 때만 가능하였다. 그러나 후-융합 구조안으로 다시 접혀졌을 때는 그러하지 않았다. 따라서 이것은 전-융합 F 단백질의 안정화를 가능하게 하는 것이다. 안정화된 전-융합 F 단백질은 Magro et al. 에서 이형체로 되는 것이라고 기술하였다. 그것은 추가적인 시스테인 잔기들은 이황화 결합을 형성하지 않는 문자 비율을 포함하기 때문이다. 여기서 기술된 F 단백질 구조는 Sf21 세포 안의 배콜로바이러스 발현 벡터를 이용하여 생산되었고, 순한 세정제를 이용하여 세포 멤브레인으로부터 용해되고 나켈 어피니티 및 사이즈 배제 크로마토그래피를 이용하여 정제되었다. 정제된 전-융합 F 단백질은 S200 컬럼으로 SEC에 의해 분석하였고 삼량체 F 단백질의 MW에 상응하는 ≈ 150 kDa 의 확실한 분자량을 갖는 대칭적인 피크로 용출되었고 이것은 인간 IgG1 항체의 용출용적과 오버랩된다. 파리비쥬맙과 "전-융합" F 단백질의 배양은 F 단백질 단독으로 하였을 때와 비교하여, 용출 피크를 더 낮은 용출 용적(≈ 300 kDa의 MW)으로 이동하였으며, 더 큰 응집을 형성하는 것과 관련이 있을 수도 있는 컬럼의 보이드 볼륨(void volume)에서 용출되는 큰 분자량의 복하체형성을 유도하였다. 용출 볼륨에서 유사한 이동은 HMB3210v2을 전-융합 단백질과 함께 배양하였을 때 관찰되었다(도 13). 이러한 결과는 파리비쥬맙은 전-융합 및 후-융합 형태의 F 단백질 모두에 결합한다는 것을 보여주고, 반면에 HMB3210 은 선택적으로 F 단백질의 전-융합 형태를 인식한다는 것을 보여준다. 두 F 단백질(전- 및 후- 융합 형태)은 또한 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 테스트되었다. 유사한 친화도를 가지고 전- 및 후-융합 단백질 모두에 결합한 파리비쥬맙과는 달리, HMB3210v3 는 선택적으로, 높은 친화도를 가지고 전-융합 F 단백질에 결합하였다(파리비쥬맙의 Kd 상수가 2 nM인 것과 비교하여 0.1 nM 을 나타내었다).(도 14)

[0210]

실시예 11. HMB3210v3는 두 동물 파라믹소바이러스 소합포성폐염바이러스(bovine respiratory syncytial virus, BRSV) 및 쥐의 뉴모니아 바이러스(pneumonia virus of mice (PVM))를 교차-중화 한다.

[0211]

HMB3210의 반응성 정도는 다른 종류의 두 동물 바라믹소바이러스들을 이용하여 측정하였다: BRSV 및 PVM, 두 바이러스들은 각각 F 단백질에서 RSV 와 81% 및 40%의 아미노산 동일성을 공유한다. HMB3210 은 PVM 스트레인 15 및 BRSV 스트레인 RB94 를 중화하는 능력을 확인하기 위해 테스트되었고 각각 100 ng/ml 및 10 ng/ml의 IC50 값으로, 이들 바이러스들에 대해 효과적임을 보여주었다. 이러한 결과는 인간 파라믹소바이러스 RSV 및 MPV에 뿐만 아니라, HMB3210는 파라믹소바이러스 과에 해당하는 다른 두 바이러스들에 대해서도 효과적이라는 것을 보여준다.

[0212]

실시예 12. HMB3210에 의한 바이러스 확산 억제

[0213]

HMB3210 및 D25 RSV-특이적 항체의 세포대세포(cell-to-cell) 바이러스 확산을 막는 능력을 측정하였다. 이것은 중화활성과 독립적인 항-RSV 항체의 뚜렷한 특성인 것으로 보고되고 있다. RSV A 또는 B 스트레인과 Hep-2 세포를 감염하였고, 다른 농도의 항체를 20 시간 후에 추가하였고, IS50로 여기서 정의된 바이러스 확산을 억제하는 50% 항체 농도를 결정하기 위하여 3일에 신시듭의 형성을 측정하였다. 두 항체들은 바이러스 확산을 억제하였으나, 더 높은 농도에서 억제하였다. 흥미로운 것은, 이러한 분석에서 HMB3210은 더 강력한 중화 항체 D25의 것과 비교할만한 IS50 를 보였다.(도 15).

[0214]

실시예 13. RSV, MPV 및 PVM에 대한 HMB3210의 예방적 및 치료적 효능

[0215] RSV 쥐 모델에서 HMB3210는 RSV 폐 역가를 감소하는데 파리비쥬맙 보다 평균 5 내지 10배 이상의 능력이 있었고 0.12 mg/kg만큼 낮은 농도에서 효과적이었다(도 16a). MPV 쥐 모델에서 HMB3210는 동등하게 효과적이었다(도 16b). HMB3210의 치료적 능력을 테스트하기 위하여 RSV로 STAT1-결핍 쥐를 감염시켰고 감염 후 1, 2 또는 3일에 HMB3210을 투여하였다. 이러한 모델이 한계에도 불구하고, 바이러스의 약한 복제때문에, HMB3210는 모든 시간에서 치료적 효과를 보였고 바이러스 역가 및 폐에서 염증성 사이토카인 감소를 보였다(도 17).

[0216] 급성 하기도 감염의 더 많은 복수의 동물 모델에서 HMB3210를 테스트하기 위하여, PVM과 그것의 교차-반응성을 이용하였다. PVM은 매우 낮은 접종에도 쥐에서 치명적인 질병을 야기하고 인간에서 심각한 RSV 및 MPV 감염 특징을 나타낸다. 예방적인 상태에서, HMB3210은 0.12 mg/kg에서 치사로부터, 그리고 0.6 mg/kg에서 체질량 감소로부터 쥐를 완전히 보호하였다(도 18a). 게다가 치료적 상태에서, HMB3210은 30 및 5 mg/kg으로 둘다의 감염 후에 3일 이상 투여하였을 때, 죽음으로부터 보호하였고, 30 mg/kg으로 4 또는 5일 주었을 때 분명하게 보호할 수 있었다(도 18b-d). 이러한 시스템에서, 이전에 기술된(Bonville et al., 2004, Journal of Virology 78:7984-7989) 것처럼, 인간의 치료를 위해 유일하게 승인된 기본적인 케어인, 리바비린(Ribavirin)은 효과적이지 않았다. 중요한 것은, HMB3210의 치료법적 전달은 폐의 바이러스 RNA 증가를 효과적으로 더 차단하였다(도 19). in vivo에서 효과기(effectector) 메카니즘의 역할을 설명하기 위하여 보체 및 Fc 리셉터 결합이 부족한 돌연변이체(HMB3210-LALA)를 IgG1 HMB3210와 비교하였다. 두 항체들은 in vitro에서 중화 활성을 비교하였고 동일한 것으로 보였다. 예방적인 상태에서 제한적인 양을 투여하였을 때(0.12 mg/kg), HMB3210-LALA은 심각하게 효능이 감소된 것으로 보였다(도 20a). 대조적으로, 치료적 상태에서 사용하였을 때, HMB3210-LALA은 모든 시험한 투여량에서 HMB3210 만큼 효과적이었다(도 20b). 리바비린은 효과적이지 않았던 PVM 감염 모델에서, HMB3210의 치료적 효능은, 여러 요인들이 복합되었기 때문일 것인데, 이러한 요인들로는 강력한 중화 및 확산 억제 능력, 유인용으로 행동하는 많은 수의 후-융합 단백질에 의한 항체 소비를 피하는 전-융합 단백질의 선택적인 인식, 및 이스케이프 돌연변이체(escape mutants) 선별 실패와 같은 것들이 있다. 놀랍게도, PVM 쥐 모델에서, HMB3210의 치료적 효능은 효과기 작용을 필요로 하지 않으며, 이것은 in vivo에서 항체 활성을 주로 바이러스의 중화 및 바이러스 확산 억제에 의존한다는 것을 나타낸다.

[0217] 실시예 14. HMB3210은 전-융합 F 단백질에 잘 보존된 베타 가닥에 결합되고, 이것은 후-융합 F 단백질에는 접근이 가능하지 않다.

[0218] HMB3210에 의해 인식되는 에피토프를 확인하기 위하여, 인간 RSV F 단백질의 완전한 서열을 커버하는 7,095 조작화된 웨브타이드의 라이브러리를 스크리닝하였다. 실시예 5에서 보여지는 실험은 HMB3210을 비-리듀싱 조건하에서 RSV 및 MPV F 단백질을 웨스턴 블로트으로 반응시켰다는 것을 보여주었고, 이는 HMB3210은 음이온 세정제 SDS의 존재에서 그것의 형태가 안정한 에피토프를 타겟으로 하는 것을 제시하는 것이다(도 5 및 6). 라이브러리 스크리닝 접근법은 이어지는 잔기(spanning residues) SAVSKGYLSALRTGWYTSVIT (서열번호 63), F2의 N-말단 영역에서 추정되는 HMB3210 에피토프의 동정을 이끌었다. 이 영역의 코어 서열, YLSALRTGW (서열번호 64)은 RSV, MPV, BRSV and PVM에서 폐 보존되어 있고 (도 21), 변이들 YLSVLRTGW (서열번호 65), YFSALRTGW (서열번호 66), YFSVLRTGW (서열번호 67), YKSALRTGW (서열번호 68) 및 YKSVLRTGW (서열번호 69)은 HMB3210에 의해 여기서 인식되어진다. 이 서열은 후-융합 RSV F 단백질의 표면에 노출되어있지 않으나, PIV5 F 단백질 구조를 중심으로 만들어진 RSV 전-융합 F 단백질의 모델에서(Yin, et al., 2006, Nature 439:38-44), 이 서열은 파리비쥬맙에 의해 타겟으로 되는 루프 영역에 근접하여 노출된 베타-가닥(strand)에 위치하는 것으로 예상된다(도 22). 이러한 맵핑은 실시예 10에서 보여지는 전-융합 F 단백질에 대한 HMB3210의 특이성과 일치한다. 이러한 에피토프는 가까이 있으나, 파리비쥬맙에 의해 인식되는 것과는 별개이며, 364 HRSV, 162 HMPV, 8 BRSV 및 5 PVM 스트레인을 포함하는 551 바이러스 스트레인들 중에 잘 보존되어 있는 YLSVLRTGW 서열이 중심이 되었다(도 23).

[0219] 서열 및 서열 번호 표

표 9

서열 번호	설명	서열
1	CDRH1 aa	GFTFSSYS
2	CDRH2 aa	ISASSSYS
3	CDRH3 aa	ARARATGYSSITPYFDI
4	CDRL1 aa	SSNIGAGYD
5	CDRL2 aa	DNN
6	CDRL3 aa	QSYDRNLSGV
7	CDRH1 nuc	ggattcacccatcgatgtttatgc
8	CDRH2 nuc	attagtgcaggatcgatgtttacgc
9	CDRH3 nuc	gcgagagctcccccaactggctacagttccattacccctactttgacatt
10	CDRL1 nuc	agtcacacatccccccaggttatgtat
11	CDRL2 nuc	gataacaac
12	CDRL3 nuc	cagtcctatgcaggaaacctgagtggtgtc
13	중쇄 aa	EEQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSSISASSSYSDYADSAKGRFTISRDNAKTSFLQM NSLRAEDTAIYFCARARATGYSSITPYFDIWGQGTIVTVSS
14	중쇄 aa	QSVVTQTPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYDNNNRPSGVPDFSASKSGTSASLAITGLQAED ADYYCQSVDRLNSGVFGTGTKVTVL
15	중쇄 nuc	gaggaacagctgttagatctggggggggctggtaagccctgggggggtccctgagactctcc tgtgcaggccatcgatgttacccatcgatgttatacgatgaaatgggtccgcccaggccaggaa ggggctggagatgggtctatccattatgtgcaggatcgatgttacccatcgatgttacccatcg aaggccgattcaccatctccatcgatgtgcaggatcgatgttacccatcgatgttacccatcg gagagccgaggacacggcatctatctgtgcaggatcgatgttacccatcgatgttacccatcg ccccctactttgacatttggggccaggaaacctgggtcaccgtctccatcg

[0220]

豆 10

16	중쇄 nuc	cagtctgtcgacgcagacgcctcagtgtggggccccaggcaggggtcacatctcc gactgggagcagctccaacatcgggcagggttatgargtacactgggtaccagcaacttccagg aacagccccaaactctcatctatgataacaacaatcgaccctcagggttccggaccgattct ctgcctccaagtcgtgcacccctcagctccctggccatcaccgggtccaggctcagggtgaggatgaggc tgatttactgcgcagtcctatgacaggaacctgagtggtgttcggaaactgggaccacaaggtcac cgtcttag
17	중쇄 aa	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSSISASSSYSDYADSAKGRFTISRDNAKTSFLQMN NSLRAEDTAIYFCARARATGYSSITPYFDIWGQGTLVTVSS
18	중쇄 nuc	gagggtcgacgtggggaggcctggtaagcctgggggtccctgagactctcc tgtgcgcctctggattcaccttcagttatagcatgaactgggtccgcaggctccaggaa ggggcctggagggtgggtccatccattatgtcaagtagcagttacagcgttacgcagactcaggc aaggggccgatttcacccatctccagagacaacgcgaagaccctcactgtttctgcaaatacgc gagagccgaggacacggctatctttctgtgcgagagctggcactggctacagttccattta ccccctactttgcattttggggcagggaaccttgcacccgtctcactcag
19	CDRH1 aa	GFAFTGYG
20	CDRH2 aa	ITAGSSYI
21	CDRH3 aa	ARVASPLVRLHLDY
22	CDRL2 aa	AND
23	CDRL3 aa	QSYDRTLSVV
24	CDRH1 nuc	ggattcgcatttcactgggtatggt
25	CDRH2 nuc	atcaactgcgtggaaagctcacatc
26	CDRH3 nuc	gcgagagttgcgtctctgggtggactccacttagactac
27	CDRL2 nuc	gctaacgcac
28	CDRL3 nuc	cagtcctatgacccgcaccctgagtgtagtg
29	중쇄 aa	EVHLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFAFTGYGLNWVRQPV GKGLEWVSSITAGSSYIDYAESVKGRFTISRDNGKNTLFLQMN SDLRADDTAVYYCARVASPLVRLHLDYWVGQGALTVSS
30	중쇄 aa	QSVLTPPPMSGAPGQRVTISCTGGSSNIGAGYDVQWYQQL PGAAPKLLIYANDNRPSGVPDFSGSKSGTGSLSVIAGLRAE DEADYYCQSYDRTLSVVFGGGTKLTVL

[0221]

五 11

[0222]

표 12

44	CDRH2 nuc	atctcaagtcctcttagttacatc
45	CDRH3 nuc	gccccggctagagcaacaggctataacagcattactccttacttgacate
46	CDRL1 nuc	tcatccaaacatcgcc
47	CDRL2 nuc	ggaaacagc
48	CDRL3 nuc	cagtcttatgattcttcgtctggagtc
49	중쇄 aa	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWWSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARARATGYNSITPYFDIWGQGTLVTVSS
50	증쇄 aa	QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYGNNSRPSGVPDFSGSKSGTSASLAITGLQAED ADYYCQSYDSSLGFGTGTKVTVL
51	증쇄 nuc	gagggtgcagctgggtggagagccggaggccggactggtaaaccctggccgggtactgagactgtc atgcgcaggcaaggccgttcacatttcgcgttctactctatgaactgggtgcgcacagggtctggca agggactgggtgggtcttagtatctcaagtcctcttagttacatctactatgcgcaggactccgtgaa ggaaagggttcacatctacgcgcataacgcaaaaatagcgttatctgcgcaggatgtttccctga gagccgaaagacaccgcgttactattgcgcgggttagagacaacaggctataacaggcattac tccttactttgacatctggggacacgggcacactgggtgcacgcgttcctca
52	증쇄 nuc	cagtccgtcgtaactcagccccaaggcgtcagggggcacctggcaggggtcacaatctcat gcactgggtccatccaaacatccgcgtgggtacgcgtgcactggtatcgcgcgtccgg aacagcacctaagctgcgtatctacggaaacagcaatccgcattctggatccccatgcgcgcgcgc agcggatccaaatctggccaggctgcctactggcttacaggctgcaggcaggagcggaa gccgattactatgcgcgtttatgattttctctgtgtggatcttcgcacccggcacaaggatcac cgtccctg
53	CDRH3 aa	ARVAVSPMVRGLHFDY
54	CDRL3 aa	QSYDSSLSSVV
55	CDRH1 nuc	ggctttaccttttagtcctactct
56	CDRH3 nuc	gcccgcgtcgctagccctatggtgccggggctgcattttgattat
57	CDRL1 nuc	tcttcaaacatccgcgtgggtacgcac
58	CDRL3 nuc	cagagctacgattcatccctgagcgtggtc
59	증쇄 aa	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWWSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARVAVSPMVRGLHFDYWGQGTLVTVSS

[0223]

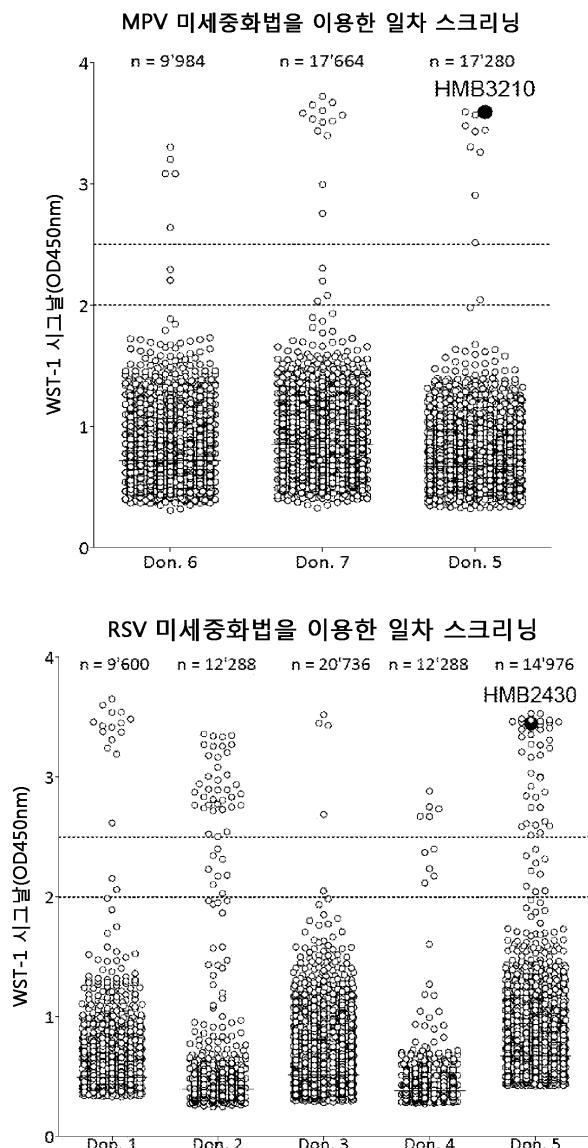
표 13

60	증쇄 aa	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYGNSNRPSGVPDFSGSKSGTSASLAITGLQAED ADYYCQSYDSSLVVFGGGTQLTVL
61	증쇄 nuc	gaagtgcagctggtggaaatctggggcgccatggtaaaacccgtggcaaggactctgaggctgtcc tgtgtgtctgtggcttacccttagctctactctatgaaactgggtgcgcacaggcacccgtgaagg ggactggagtgggtctctagatctcaagctctctagttacatctactatgtgactccgtgaagg gcgggttacccatctcaagagataacgcaaaaaaaaatgcgtatctgcagatgaattccctgagg gcagaagacacagccgtactattgcggccgcgtcgctagccatatggtgccggggctgcatt ttgattattggggacaggaaactctggtgaccgtctcatcc
62	증쇄 nuc	cagagcgtcgtaccatccgtgagccgcacccatccgtgacggccgcacccggccagcgagtgactattcc tgttaccggcagtttcaaacatccgtgtggatcgacgtgcactggatcagcagctgcctgg aacagcacctaagctgtgtatctacgggaacagcaatccgtgtggatccctgatagattc agcggatccaaatctggccaccatgtgcctactggatattacagggtgcaggcagaggacgaa gccgattactattgcagagctacgatccatccctgagcgtgttcggaggcggcacaact gactgtcctg
63	aa	SAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
64	aa	YLSALRTGW
65	aa	YLSVLRTGW
66	aa	YFSALRTGW
67	aa	YFSVLRTGW
68	aa	YKSALRTGW
69	aa	YKSVLRTGW

[0224]

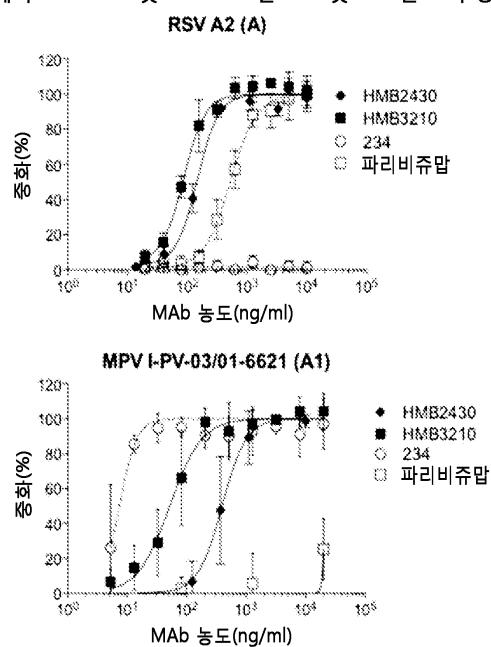
도면

도면1

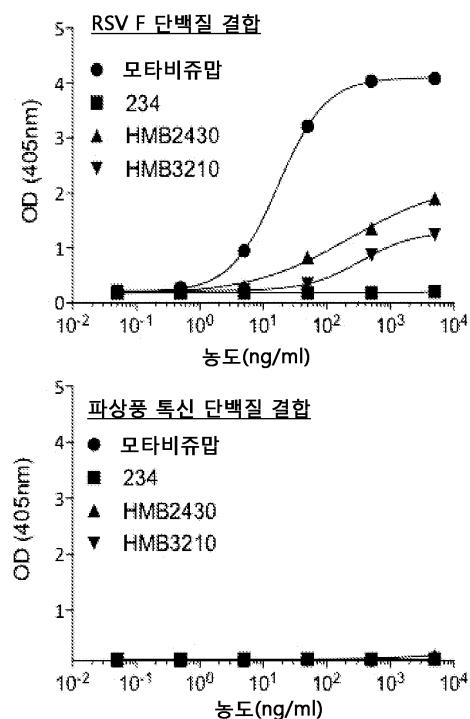


도면2

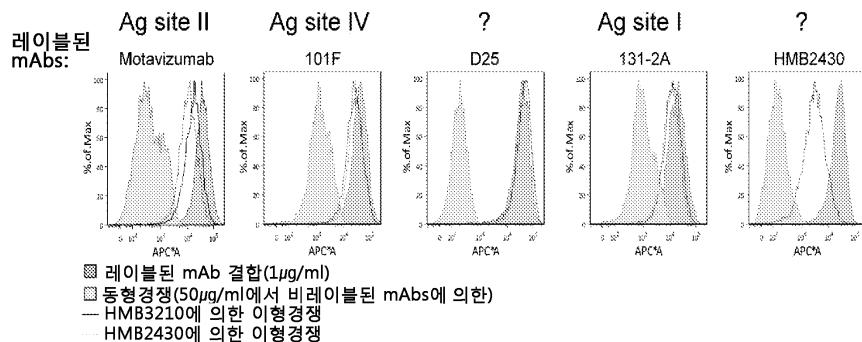
in vitro에서 HMB2430 및 HMB3210은 RSV 및 MPV를 교차 중화한다



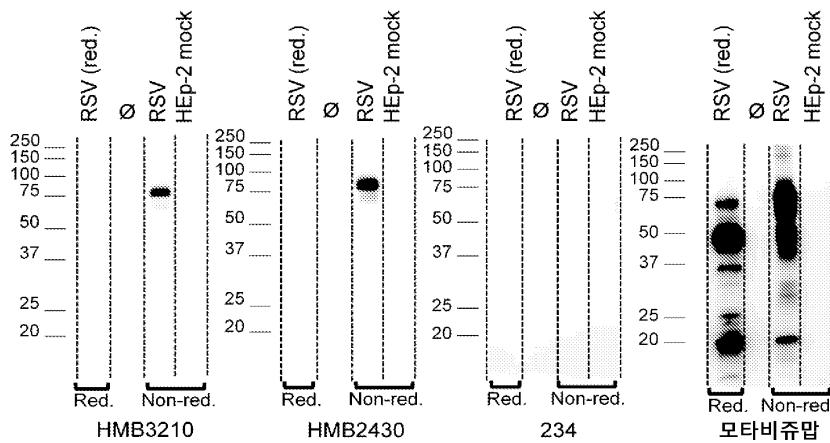
도면3



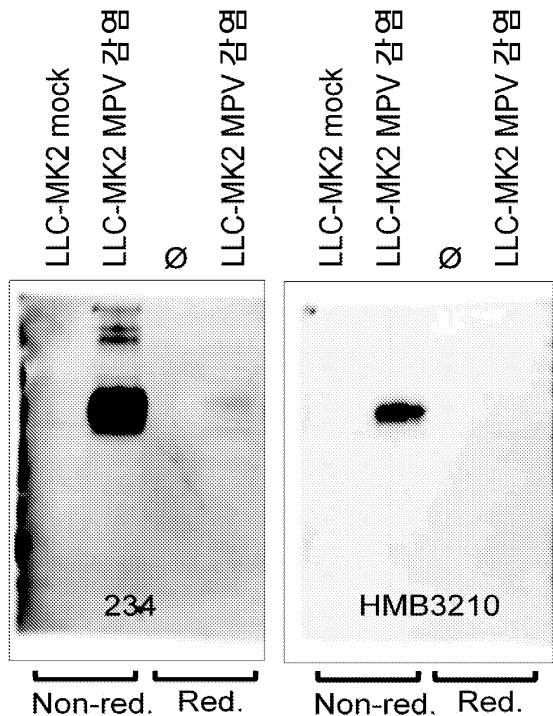
도면4



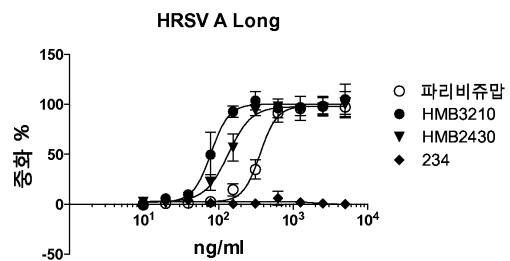
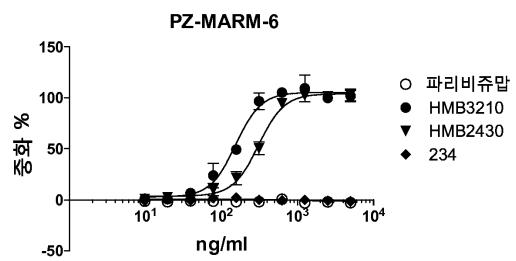
도면5



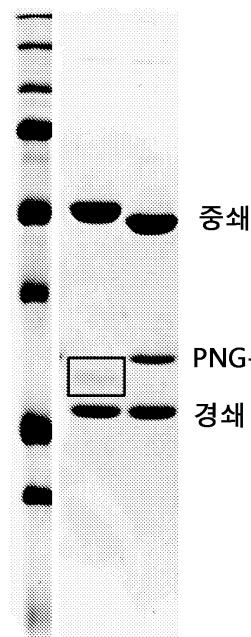
도면6



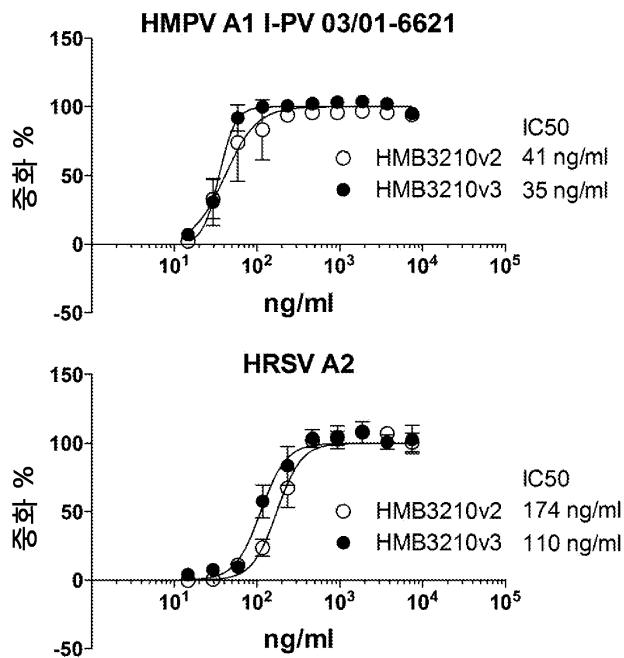
도면7



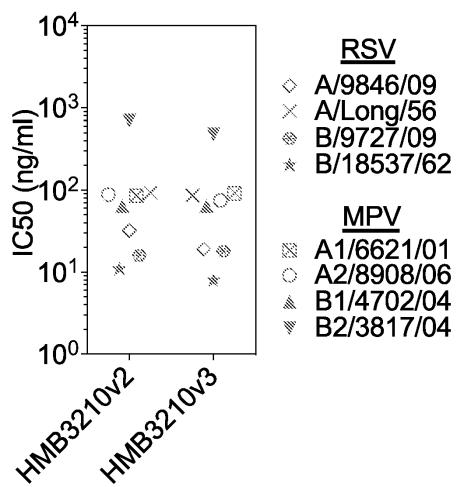
도면8



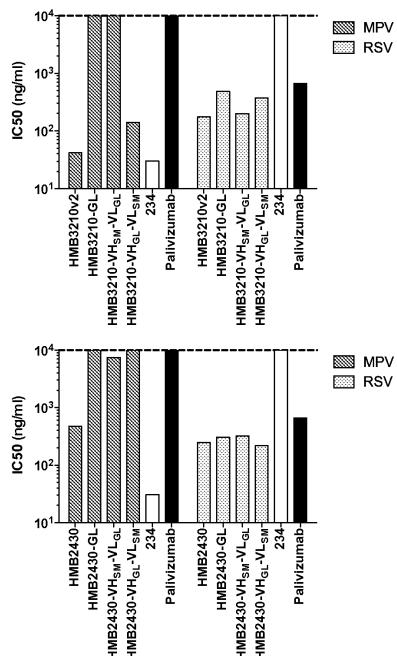
도면9



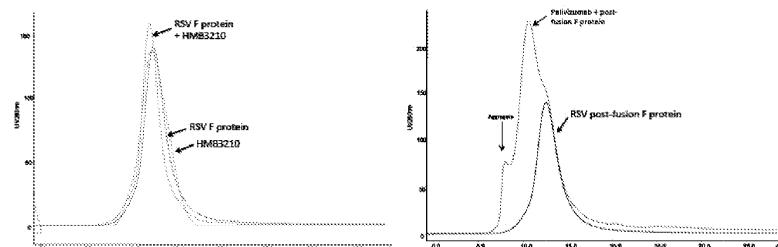
도면10



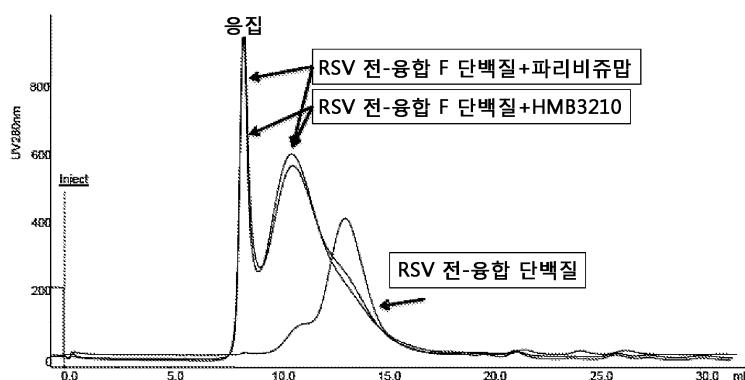
도면11



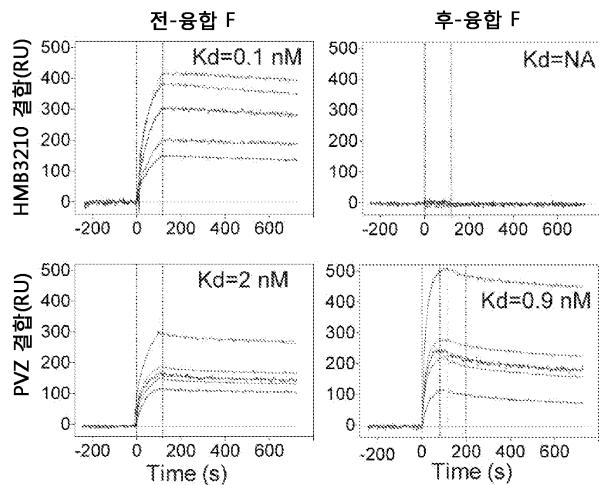
도면12



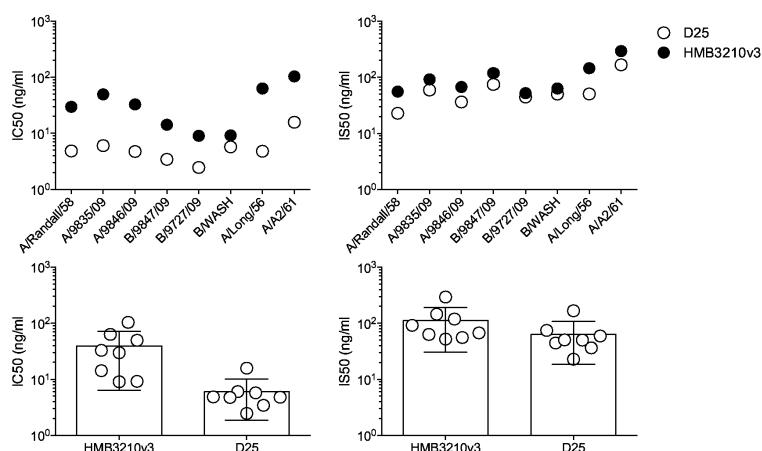
도면13



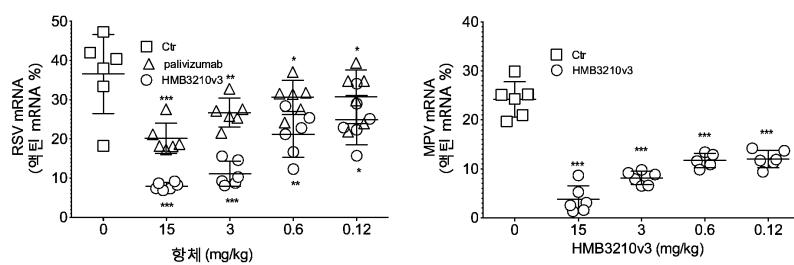
도면14



도면15



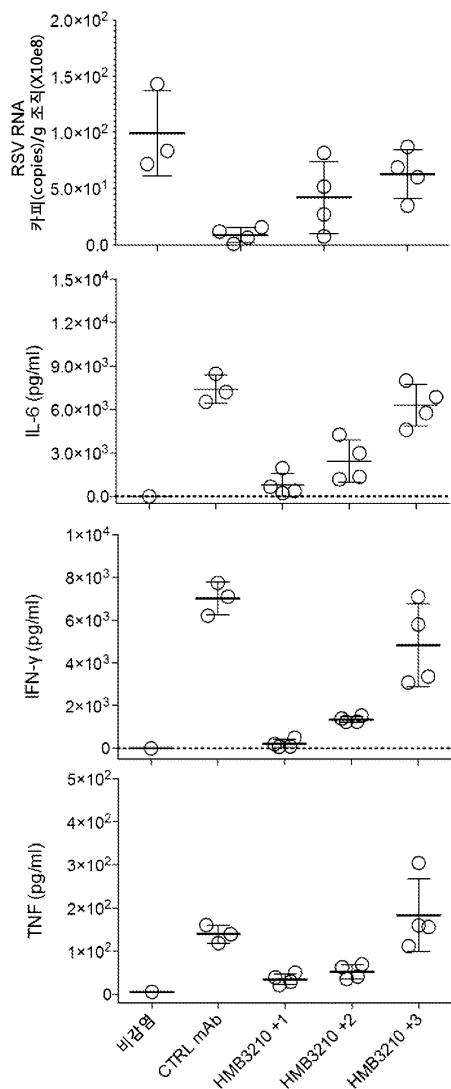
도면16



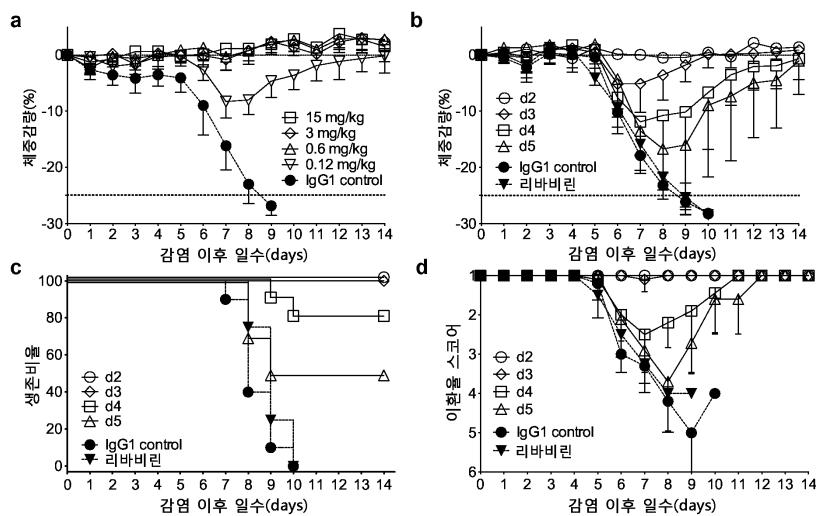
(A)

(B)

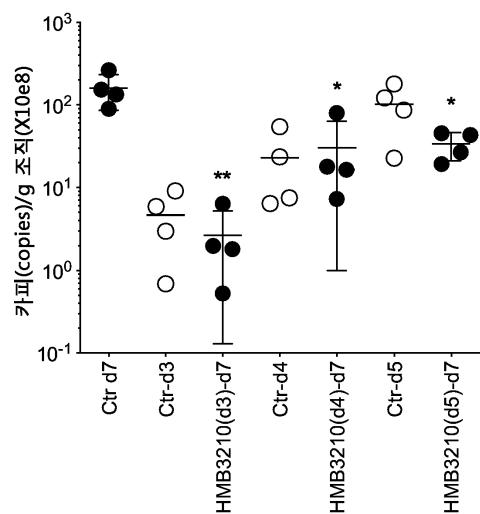
도면17



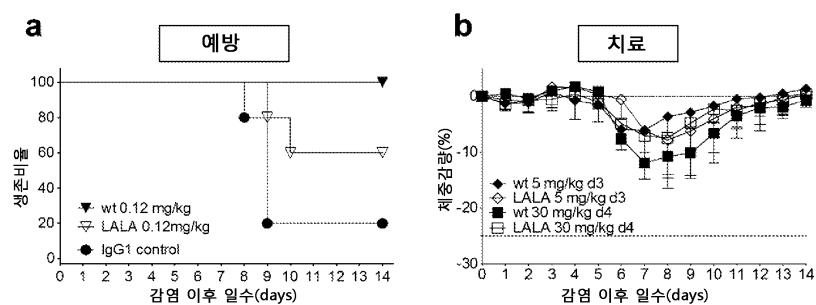
도면18



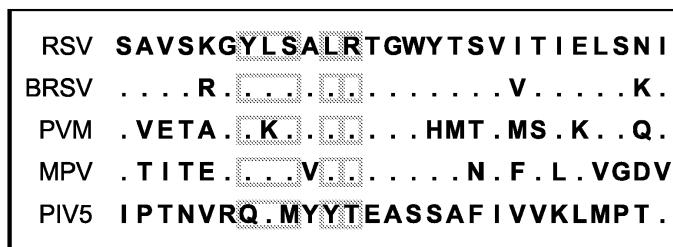
도면19



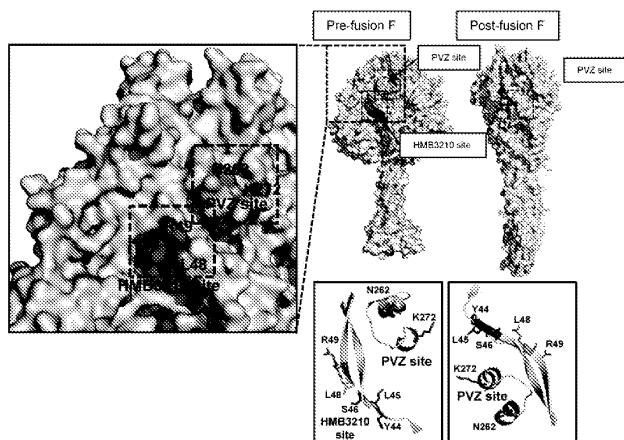
도면20



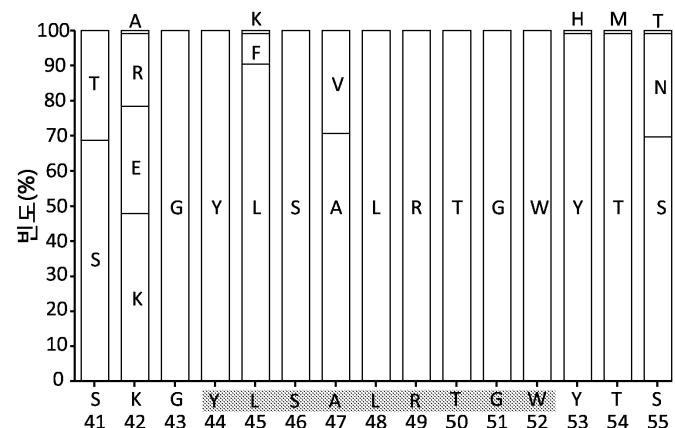
도면21



도면22



도면23



도면24a**HMB3210 서열**

VH.1 뉴클레오티드

gaggaacagctgcttagagtctggggaggcctggtaaggcctgggggtccctgagactctct
 gtcagcctctggattcacccatcagttatagcatgaactgggtccggcaggctccaggaa
 gggctggagtggtctcatccattatgtcaagtagcgttacagcattacgcagactcagcg
 aaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagacctcactgtttctgcaaataaacagcc
 tgagagccgaggacacggctatctattctgt**gcgagagctcggcaactggctacagttccat**
tacccctactttgacatttggggccagggaaacctggtaccgtctcctcag

VH.1 아미노산

EEQLLESGGGLVKPGGLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWRQAPGKGLEWVSS**ISASSSYS**DYADSA
 KGRFTISRDNAKTSFLQMNSLRAEDTAIYFC**ARARATGYSSITPYFDI**WGQTLTVSS

VH.2 뉴클레오티드

gaggtgcagctggggagtgctggggaggcctggtaaggcctgggggtccctgagactctct
 gtcagcctctggattcacccatcagttatagcatgaactgggtccggcaggctccaggaa
 gggctggagtggtctcatccattatgtcaagtagcgttacagcattacgcagactcagcg
 aaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagacctcactgtttctgcaaataaacagcc
 tgagagccgaggacacggctatctattctgt**gcgagagctcggcaactggctacagttccat**
tacccctactttgacatttggggccagggaaacctggtaccgtctcctcag

VH.2 아미노산

EVQLVESGGGLVKPGGLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWRQAPGKGLEWVSS**ISASSSYS**DYADSA
 KGRFTISRDNAKTSFLQMNSLRAEDTAIYFC**ARARATGYSSITPYFDI**WGQTLTVSS

도면24b**HMB3210 서열**

VL 뉴클레오티드

cagtctgtcgacgcagccctcagtgctggggcccaggcagagggtcaccatctcc
gcactgggagc**agtcacatcgccccaggttatgt**tacactggtaccagcaacttccagg
aacagcccaaactcctcatctat**gataacaaca**atcgaccctcaggggtccggaccattc
tctgcctcaagtctggcacccctcagccctggccatcaccgggtccaggctgaggatgagg
ctgattattactgc**cagtctatgacaggaaacctgagtggtc**tccggaactgggaccaaggt
caccgtcctag

VL 아미노산

QSVVTQTPSVSGAPGQRVTISCTGS**SSNIGAGYD**VHWYQQLPGTAPKLLIY**DNNNRPSGV**PDRF
SASKSGTSASLAIITGLQAEDADYYC**QSYDRNLSGV**FGTGTKVTVL

VL.3 뉴클레오티드

cagtctgtcgacgcagccctcagtgctggggcccaggcagagggtcaccatctcc
gcactgggagc**agtcacatcgccccaggttatgt**tacactggtaccagcaacttccagg
aacagcccaaactcctcatctat**gataacaaca**atcgaccctcaggggtccggaccattc
tctgcctcaagtctggcacccctcagccctggccatcaccgggtccaggctgaggatgagg
ctgattattactgc**cagtctatgacaggagcctgagtggtc**tccggaactgggaccaaggt
caccgtcctag

VL.3 아미노산

QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS**SSNIGAGYD**VHWYQQLPGTAPKLLIY**DNNNRPSGV**PDRF
SASKSGTSASLAIITGLQAEDADYYC**QSYDRSLSGV**FGTGTKVTVL

도면24c**HMB3210 서열**

VH.3 (VH-GL)

gaggtcagctggagagcggaggcggactggtaaacctggcgggtcactgagactgtcat
gcgcagcaagcgg**ttcacattcagctctactt**atgaactgggtgcacaggctcctggcaa
gggactggagtggtctctagt**atctcaagctctatgttacatctactatgcagactccgt**
aaggaaaggttaccatctcacgcgatacgcacaaaatgcctgtatctgcagatgaattccc
tgagagccgaagacaccgcgttactattgc**ccccggctagagaacaggctataacagcat**
tactccttactttgacatctgggacaggcacactggtaccgtctcctca

VH.3 (VH-GL)

EVQLVESGGGLVKPGGLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKGLEWVSS**ISSSSSYI**YYADSV
KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARATGYN**SITPYFDI**WGQTL**TVSS

VL.4 (VL-GL)

Cagtccgtcgactcagccccaagcgtcagggggcacctggcaggggtcacaatctcat
gcactgggt**cctcatccacatcgccgt**gggtacgcgtgcactggtatcagcagctgcctgg
aacagcacctaagctgtatctac**ggaaacagca**atcgccatctggatcccgatagattc
agcggatccaatctggcaccagtgcctactggctattacagggtgcaggcagaggacaa
ccgattactattgc**cagtctatgattttctgtctggagtc**tccggcaccggcacaagg
caccgtcctg

VL.4 (VL-GL)

QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS**SSNIGAGYD**VHWYQQLPGTAPKLLIY**GNS**NRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAIITGLQAEDADYYC**QSYDSSL**SGVFGTGTKVTVL

도면25a**HMB2430 서열**

VH.1 뉴클레오티드

gaggtgcacctggagtctgggggaggcctggtaaggcctgggggtccctgagactctcct
 gtgcagcctctgg**attcgcattcactggatgg**tctaaattgggtccggccagggtccaggaa
 gggcctggagtgggttcat**ccatcactgctggaaagtcatacatc**gactacgcagagtca
 aaggccgattcaccatccagagacaacggcaagaatacactgttccctgcaa
 tgagagccgacacacggctgttattactgt**gcgagagttgcgttcctctggggact**
ccacttagactactggggccagggagccctggtcaccgtctcctcag

VH.1 아미노산

EVHLVESGGGLVKPGSRLSCAAS**GFAFTGYGLNWRQVPKGLEWVSSITAGSSYIDYAESV**
 KGRFTISRDNGKNTLFLQMSDLRADDTAVYYC**ARVASPLVRGLHLDYWGQGALVTVSS**

VH.2 뉴클레오티드

gaggtgcagctggagtctgggggaggcctggtaaggcctgggggtccctgagactctcct
 gtgcagcctctgg**attcgcattcactggatgg**tctaaattgggtccggccagggtccaggaa
 gggcctggagtgggttcat**ccatcactgctggaaagtcatacatc**gactacgcagagtca
 aaggccgattcaccatccagagacaacggcaagaatacactgttccctgcaa
 tgagagccgacacacggctgttattactgt**gcgagagttgcgttcctctggggact**
ccacttagactactggggccagggagccctggtcaccgtctcctcag

VH.2 아미노산

EVQLVESGGGLVKPGSRLSCAAS**GFAFTGYGLNWRQVPKGLEWVSSITAGSSYIDYAESV**
 KGRFTISRDNGKNTLFLQMSDLRADDTAVYYC**ARVASPLVRGLHLDYWGQGALVTVSS**

도면25b**HMB2430 서열**

VL 뉴클레오티드

cagtcgtgctgacgcagccggccctcaatgtccggggccccaggcagagggtcaccatctc
 gcaactggggcagtcacaatcgggcaggttatgtatgtcagtgttaccagaactccagg
 agcagcccccaactccatcatctatgtaacgacaatcgccctcagggtccctgaccattc
 tctggctccaatgttgcacactcaggctcccttagtcatcgctggccctggctgaggatgagg
 ctgttattactgcagtcatacgaccgcaccctgagtgtagtgtttcggcggagggaccaagct
 gaccgtcctgg

VL 아미노산

QSVLTQPPSMSGAPGQRVTISCTGG**SSNIAGYD**VQWYQQLPGAAPKLLIY**ANDNRPSGVPDFR**
 SGSKSGTSGSLVIAGLRAEDEADYYC**QSYDRTLSVV**FGGGTKLTVL

VH.3 (VH-GL) 뉴클레오티드

gaagtgcagctggtaatctggggcgggctggtaaacactggcggaaagtctgaggctgtcc
 gtgtctgttagtggcttaccttagtcactatgtactgggtgcacaggcacctggcaa
 gggactggagtgggtctctagtatctcaacttcataactatgtactccgt
 aaggccgggttacacatctcaagagataacgcaaaaaatgcgttatctgcagatgaattccc
 tgaggcagaagacacagccgttactattgc**gccccgcgtcgctagccctatgg**tgcggggct
gcattttgattattggggacaggaaactctggtaccgtctcatcc

VH.3 (VH-GL) 아미노산

EVQLVESGGGLVKPGGLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKGLEWSS**ISSSSYIYYADSV**
 KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARVASPMVRGLHFIDY**WGQTLTVSS

VL.2 (VL-GL) 뉴클레오티드

CAGAGCGTCCTGACCCAGCACCATCCGTGAGCGGCACCCGGCCAGCGAGTGACTATTCCT
 GTACCGGCAGT**TCTTCAAACATCGGCGCTGGGTACGAC**GTGCACTGGTATCAGCAGCTGCCTGG
 AACAGCACCTAACTGCTGATCTAC**GGAACAGCA**ATCGGCCATCTGGAGTCCCCGATAGATT
 AGGGATCAAATCTGGCACAGTGCCTACTGGCTATTACAGGGCTGCAGGCAGAGGACGAAG
 CCGATTACTATTGC**CAGAGCTACGATTCATCCCTGAGCGTGGT**TCGGAGGCAGCACAAACT
 GACTGTCCTG

VL.2 (VL-GL) 아미노산

QSVLTQPPSVGAPGQRVTISCTGS**SSNIAGYD**VHWYQQLPGTAPKLLIY**GNSNRPSGVPDFR**
 SGSKSGTSASLAITGQAEDYYC**QSYDSSLSSVV**FGGGTKLTVL

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Humabs BioMed SA

<120> ANTIBODIES THAT NEUTRALIZE BOTH RSV AND MPV AND USES THEREOF

<130> HMB0014-201-US

<150> 61/613,197

<151> 2012-03-20

<150> 61/655,310

<151> 2012-06-04

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Ser Ala Ser Ser Ser Tyr Ser

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

Ile

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Asn Asn

1

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Ser Tyr Asp Arg Asn Leu Ser Gly Val

1 5 10

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggattcacct tcagtagtta tagc 24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

attagtgcaa gtacgtttt cagg 24

<210> 9

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gcgagagctc gggcaactgg ctacagttcc attaccctt actttgacat t 51

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

agctccaaca tcggggcagg ttatgat	27
<210> 11	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	
 gataacaac	9
<210> 12	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 12	
 cagtcctatg acaggaacct gagtggtgtc	30
<210> 13	
<211> 124	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 13	

Glu Glu Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys 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
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Ser Ser Ile Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Ala

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 14

<

211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Asn

85 90 95

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

100 105 110

<210> 15

<211> 373

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400

> 15

gaggaacacgc tgcttagagtc tgggggaggc ctggtaagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatagca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtgcaa gtagcagttt cagcgattac 180

gcagactcag cgaaggcccg attcaccatc tccagagaca acgccaagac ctcactgtt 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatct atttctgtgc gagagctgg 300

gcaactggct acagttccat tacccttac tttgacattt gggccaggaa accctggtc 360

accgtctcct cag 373

<210> 16

<211> 331

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

cagtctgtcg tgacgcagac gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgcactg ggaggcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcaa	120
cttccaggaa cagccccaa actcctcatc tatgataaca acaatcgacc ctcagggtc	180
ccggaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat caccgggctc	240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtctatg acaggaacct gagtggtgtc	300
ttcggaaactg ggaccaaggt caccgtccta g	331

<210> 17

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Ser Ser Ile Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Ala

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 373

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gaggtgcagc tggtgaggc tgggggaggc ctggtaagc ctgggggtc cctgagactc	60
tcctgtcag ccctggatt cacccatcg agttatagca tgaactgggt ccgcaggct	120
ccagggagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtgc aa gtacgatgtt cagcgattac	180
gcagactcg cgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagac ctcactgtt	240
ctgcaa atga acagcctgag agccgaggac acggctatct atttctgtgc gagagctcg	300
gcaactggct acagttccat tacccttac ttgacattt gggccagg aaccctggtc	360

accgtctcct cag	373
----------------	-----

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Gly Phe Ala Phe Thr Gly Tyr Gly

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ile Thr Ala Gly Ser Ser Tyr Ile

1 5

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Arg Val Ala Ser Pro Leu Val Arg Gly Leu His Leu Asp Tyr

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 22

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Asn Asp

1

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Ser Tyr Asp Arg Thr Leu Ser Val Val

1	5	10
---	---	----

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

ggattcgcattcactgggtatgg	24
-------------------------	----

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

atcactgctggaaagctatcatc	24
-------------------------	----

<210> 26

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

gcgagatgg cgttcctct ggttcgggga ctccacttag actac	45
<210> 27	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 27	
 gctaacgac	 9
<210> 28	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 28	
 cagtcctatg accgcaccct gagtgtatgt	 30
<210> 29	
<211> 122	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 29	

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Gly Leu Asn Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Leu Gln Met Ser Asp Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 30

<211> 110

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
Leu Ile Tyr Ala Asn Asp Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Val Ile Ala Gly Leu

65 70 75 80

Arg Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Thr

85 90 95

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

100 105 110

<210> 31

<211> 367

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

gaggtgcacc tggtgagtc tggggaggc ctggtaaagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtcag cctctggatt cgcatcaact ggttatggtc taaattgggt ccggcaggtt	120
ccagggagg gcctggagtgcgttcatcc atcaactgctg gaagctcata catcgactac	180
gcagagttagt ctaaggccgtt accaccatc tccagagaca acggcaagaa tacactgttc	240
ctgcaaattgtt gcgacctgat agccgacgac acggctgtct attactgtgc gagagttgc	300
tctccctgtt ttcggggactt ccacttagac tactggggcc agggagccctt ggtcacccgtc	360
tcctcag	367

<210> 32

<211> 331

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

cagtcgtgc tgacgcagcc gcctcaatg tccggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgcactg gggcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtgcagt gtaccagcaa	120
cttccaggag cagccccaa actcctcatc tatgctaacg acaatcgcc ctcagggtc	180
cctgaccat tcctggctc caagtctggc acctcaggct ccctagtcat cgctggctc	240
cgggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtctatg accgcacct gagtgttagtg	300
ttcgccggag ggaccaagct gaccgtcctg g	331

<210> 33

<211> 122

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Leu Asn Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Asp Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 34

<211> 367

<212>

> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

gaggtgcagc tggtgagtc tgggggaggc ctggtaagc ctgggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cgcatcaact ggttatggtc taaattgggt ccgccaggtt	120
ccagggagg gcctggagtg ggttcatcc atcaactgctg gaagctata catgactac	180
gcagagttag tgaaggccg attcacatc tccagagaca acggcaagaa tacactgttc	240
ctgcaaatga ggcacctgag agccgacgac acggctgtct attactgtgc gagagttcg	300
tctcctctgg ttccccact ccacttagac tactggggcc agggagccct ggtcaccgtc	360
tcctcag	367

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gln Ser Tyr Asp Arg Ser Leu Ser Gly Val

1 5 10

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

cagtcctatg acaggagcct gagtggtgtc 30

<210> 37

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Ser

85 90 95

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

100 105 110

<210> 38

<211> 331

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

cagctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgcactg ggaggcagctc caacatcggt gcaggttatg atgtacactg gtaccagcaa	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatac tatgataaca acaatcgacc ctcaggggtc	180
ccggaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat caccgggctc	240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acaggagcct gagtggtgtc	300
ttcggaaactg ggaccaaggt caccgtccata g	331

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile

1 5

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

1 5 10 15

Ile

<210>

> 41

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Asn Ser

1

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Val

1 5 10

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

ggcttcacat tcagtccta ctct 24

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

atctcaagct cctctagtta catc 24

<210> 45
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 45
gccccggctta gagcaacagg ctataacagc attactcctt actttgacat c 51
<210> 46
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 46
tcatccaaca tcggc 15
<210> 47
<211> 9
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 47
gggaacagc 9
<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 48
cagtcattatg attttctct gtctggagt 30
<210> 49
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Ala Arg Ala Thr Gly Tyr Asn Ser Ile Thr Pro Tyr Phe Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

<210> 51

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

gaggtgcagc	tggtgagag	cggaggcga	ctggtaaac	ctggcggtc	actgagactg	60
tcatgcgcag	caagcggtt	cacattcagc	tcctactcta	tgaactgggt	gacaggct	120
cctggcaagg	gactggagtg	ggtctcttagt	atctcaagct	cctctagtt	catctactat	180
gcagactccg	tgaaggaaag	gttaccatc	tcacgcata	acgcacaaaa	tagcctgtat	240
ctgcagatga	attccctgag	agccgaagac	accgctgtct	actattgcgc	ccggctaga	300
gcaacaggct	ataacagcat	tactcattac	tttgacatct	ggggacaggg	cacactggtg	360

accgtctcct	ca	372
------------	----	-----

<210> 52

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

cagtcgtcg	tcactcagcc	tccaagcgtc	agcggggcac	ctggcagcg	ggtcacaatc	60
tcatgcactg	ggtcctcatc	caacatcgcc	gctgggtacg	acgtgcactg	gtatcagcag	120
ctgcctggaa	cagcacctaa	gctgctgatc	tacggaaaca	gcaatcgcc	atctggagtc	180
cccgatagat	tcagcggatc	caaactggc	accagtgcct	cactggctat	tacaggctg	240
caggcagagg	acgaagccga	ttactattgc	cagtcttatg	attcttctct	gtctggagtc	300

ttcggcaccc	gcacaaaagt	caccgtcctg	330
------------	------------	------------	-----

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Ala Arg Val Ala Ser Pro Met Val Arg Gly Leu His Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Val Val

1 5 10

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

ggcttacct ttagtccta ctct 24

<210> 56

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

gccccgcgtcg ctagccatat ggtgcggggg ctgcatttg attat 45

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

tcttcaaaca tcggcgctgg gtacgac 27

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

cagagctacg attcatccct gagcgtggc 30

<210> 59

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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	
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Val Ala Ser Pro Met Val Arg Gly Leu His Phe Asp Tyr Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 60

<211> 110

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu			
65	70	75	80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser			
85	90	95	

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

100 105 110

<210> 61

<211> 366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

gaagtgcagc tgggtgaaatc tgggggcggg ctggtaaac ctggcgaaag tctgaggctg	60
---	----

tcctgtgtc ctagtggctt taccttttagc tcctactcta tgaactgggt gcgcacaggca	120
--	-----

cctggcaagg gactggagtg ggtctctagt atctcaagct cctctagttt catctactat	180
---	-----

gctgactccg tgaaggccg gttcaccatc tcaagagata acgcaaaaaa tagcctgtat	240
--	-----

ctgcagatga attcccttag ggcagaagac acagccgtgt actattgcgc ccgcgtcgct	300
---	-----

agccctatgg tgccccggct gcatttttat tattggggac agggaaactct ggtgaccgtc	360
--	-----

tcatcc	366
--------	-----

<210> 62

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 62

cagagcgtcc tgaccctggcc accatccgtg agcggcgac ccggccagcg agtgcattt	60
--	----

tcctgttaccg gcagtttttc aaacatcgcc gctgggtacg acgtgcactg gtatcagcag	120
--	-----

ctgcctggaa cagcacctaa gctgctgatc tacggaaaca gcaatcgcc atctggatc	180
---	-----

cccgatagat tcagcgatc caaatctggc accagtgcct cactggatc tacaggctg	240
--	-----

caggcagagg acgaagccga ttactattgc cagagctacg attcatccct gagcgtggtc	300
---	-----

ttcgaggcg gcacaaaact gactgtccgt	330
---------------------------------	-----

<210> 63

<211> 21

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 63

Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp Tyr

1 5 10 15

Thr Ser Val Ile Thr

20

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Tyr Leu Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Tyr Phe Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Tyr Phe Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Tyr Lys Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Tyr Lys Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp

1 5