(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월17일
(11) 등록번호 10-2719214
(24) 등록일자 2024년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/1018 (2013.01)
A61P 31/16 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7005392(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년10월01일
심사청구일자 2023년03월16일
(85) 번역문제출일자 2023년02월15일
(65) 공개번호 10-2023-0027328
(43) 공개일자 2023년02월27일
(62) 원출원 특허 10-2022-7002476
원출원일자(국제) 2014년10월01일
심사청구일자 2022년02월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/058652
(87) 국제공개번호 WO 2015/051010
국제공개일자 2015년04월09일
(30) 우선권주장
61/885,808 2013년10월02일 미국(US)
62/002,414 2014년05월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2013011347 A1*
WO2007117577 A2
WO2007109742 A2
WO2013011347 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메디뮨 엘엘씨
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이
후맙스 바이오메드 에스에이
스위스 체하-6500 벨린초나 비아 데이 가기니 3
(72) 발명자
벤자민 에보니
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
칼와드-리레이 니콜
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 36 항 심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 **중화 항-인플루엔자 A 항체 및 이의 용도**

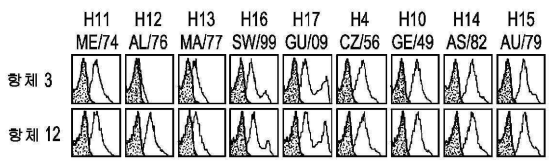
(57) 요 약

본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌에 결합할 수 있고 인플루엔자 A 바이러스의 1 이상의 1군 아형 및 1 이상의 2군 아형을 중화시킬 수 있는 항체 및 이의 결합 단편에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 결합 단편은 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16 및 H17 및 이들의 변이체에서 선택된 1 이상의 인플루엔자 A 바이러스 1군 아형 및 H3, H4, H7, H10, H14 및 H15 및 이들의 변이체에서 선택된 1 이상의 인플루엔자 A 바이러스 2군 아형에 결합하고/하거나 중화시킬 수 있다.

[대표도]

도 1

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 33/56983 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/734 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
G01N 2333/11 (2013.01)

(72) 발명자
맥아울리프 조세핀 마리
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
팔머-힐 프란세스
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
와치터 레슬리
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
유안 앤디
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
쥬 킹
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
코르티 다비드
스위스 체하-6500 벨린초나 비아 미라솔레 1 후맙스 바이오메드 에스에이 내
란자베치아 안토니오
스위스 체하-6500 벨린초나 비아 미라솔레 1 후맙스 바이오메드 에스에이 내
구아리노 바르바라
스위스 체하-6500 벨린초나 비아 미라솔레 1 후맙스 바이오메드 에스에이 내
데마르코 안나
스위스 체하-6500 벨린초나 비아 미라솔레 1 후맙스 바이오메드 에스에이 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌에 결합할 수 있고 인플루엔자 A 바이러스의 1 이상의 1군 아형 및 1 이상의 2군 아형을 중화시킬 수 있는 단리된 항체 또는 이의 결합 단편으로서, 항체 또는 이의 결합 단편은 서열번호 123의 HCDR1, 서열번호 124의 HCDR2, 서열번호 125의 HCDR3, 서열번호 128의 LCDR1, 서열번호 129의 LCDR2, 및 서열번호 130의 LCDR3을 포함하는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 결합 단편은 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 및 H16 및 이들의 변이체에서 선택된 1 이상의 인플루엔자 A 바이러스 1군 아형; 및 H3, H4, H7, H10, H14 및 H15 및 이들의 변이체에서 선택된 1 이상의 인플루엔자 A 바이러스 2군 아형을 중화시킬 수 있는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 결합 단편은 1군 아형: H1, H2, H5, H6 및 H9 및 2군 아형 H3 및 H7을 중화시킬 수 있거나; 또는 항체 또는 이의 결합 단편은 1군 아형: H1, H2, H5 및 H6 및 2군 아형 H3 및 H7을 중화시킬 수 있는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 결합 단편은 미세중화 어세이에서 인플루엔자 A 바이러스의 중화에 대해 0.01 ㎍/㎖~50 ㎍/㎖의 항체 범위의 50% 억제 농도(IC_{50} ㎍/㎖)로 표시되는 높은 중화 역가를 갖는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 서열번호 122에 대해 75% 이상의 동일성을 갖고, 서열번호 123의 HCDR1, 서열번호 124의 HCDR2, 및 서열번호 125의 HCDR3을 포함하는 VH, 및 서열번호 127에 대해 75% 이상의 동일성을 갖고, 서열번호 128의 LCDR1, 서열번호 129의 LCDR2, 및 서열번호 130의 LCDR3을 포함하는 VL을 포함하는 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열번호 122의 VH 및 서열번호 127의 VL에서 선택된 VH 및 VL을 포함하는 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 항체 또는 이의 결합 단편은 면역글로불린 분자, 단일클론 항체, 키메라 항체, CDR-그라프트된 항체, 인간화 항체, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, 이황화 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디, 다중특이적 항체, 이중-특이적 항체, 및 이특이적 항체로 이루어진 군에서 선택되는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, VH는 인간 배선(germline) 프레임워크 VH6-1을 포함하고, VL은 인간 배선 프레임워크 VK1-39를 포함하고, 이들의 조합인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 9

제1항에 있어서, Fc 영역을 포함하는 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 10

제1항에 있어서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 11

제10항에 있어서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 이의 결합 단편은 천연 Fc 항체에 비해 증강된 혈청 반감기를 갖는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 12

제10항에 있어서, 변이체 Fc 영역은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스로 번호매김한 221, 225, 228, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 250, 251, 252, 254, 255, 256, 257, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 308, 313, 316, 318, 320, 322, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 428, 433, 434, 435, 436, 440 및 443에서 선택된 1 이상의 위치에 변형을 포함하는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 13

제12항에 있어서, 변형은 치환, 삽입 및 결실에서 선택되는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 14

제10항에 있어서, 변이체 Fc 영역은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스로 번호매김한 221K, 221Y, 225E, 225K, 225W, 228P, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235E, 235F, 236E, 237L, 237M, 237P, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 250E, 250Q, 251F, 252L, 252Y, 254S, 254T, 255L, 256E, 256F, 256M, 257C, 257M, 257N, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265A, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298A, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 308F, 313F, 316D, 318A, 318S, 320A, 320S, 322A, 322S, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 326A, 326D, 326E, 326G, 326M, 326V, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 333A, 333D, 333G, 333Q, 333S, 333V, 334A, 334E, 334H, 334L, 334M, 334Q, 334V, 334Y, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 428L, 428F, 433K, 433L, 434A, 434W, 434Y, 436H, 440Y 및 443W에서 선택된 1 이상의 치환을 포함하는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 15

제14항에 있어서, 변이체 Fc 영역은 M252Y, S254T 및 T256E에서 선택된 1 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 16

제10항에 있어서, 변이체 Fc 영역은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스로 번호매김한 428 및 434에서 선택된 위치에 1 이상의 변형을 포함하는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 17

제10항에 있어서, 변이체 Fc 영역은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스로 번호매김한 428 및 434에서 선택된 위치에 1 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 18

제10항에 있어서, 변이체 Fc 영역은 428L, 428F, 434A, 424F, 434W 및 434Y에서 선택된 1 이상의 아미노산 치

환을 포함하는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 19

제10항에 있어서, Fc 변이체 항체 또는 이의 결합 단편은 FcRn에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 20

제10항에 있어서, Fc 변이체는 야생형 인간 IgG4 Fc 영역의 변이체인 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 21

제1항에 있어서, 항체는 IgG1, IgG2 또는 IgG4, 또는 이의 단편인 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 결합 단편을 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 23

제22항에 따른 단리된 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 24

제22항에 따른 핵산을 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 25

항체 또는 이의 결합 단편의 발현에 적합한 조건 하에서 제24항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 결합 단편을 제조하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 숙주 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 결합 단편을 단리하는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 27

제23항에 따른 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 28

항체 또는 이의 결합 단편의 발현에 적합한 조건 하에서 제27항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 결합 단편을 제조하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 숙주 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 결합 단편을 단리하는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 30

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 결합 단편 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 피험체에서 인플루엔자 A 감염의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 결합 단편, 25 mM His 및 0.15 M NaCl을 pH 6.0에서 포함하는, 피험체에서 인플루엔자 A 감염의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 피험체에서 인플루엔자 A 감염의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것인 항체 또는 이의 결합 단편.

청구항 33

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 결합 단편을 소형 분자 항바이러스 조성물과 조합하여 포함하는, 피험체에서 인플루엔자 A 감염의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 소형 분자 항바이러스 조성물은 뉴라미다아제 억제제 또는 아다만탄인 것인 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 소형 분자 항바이러스 조성물은 오셀타미비어, 자나미비어, 아만타딘, 리만타딘 및 이들의 조합에서 선택되는 것인 조성물.

청구항 36

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 피험체에서 인플루엔자 A 감염의 시험관내 진단을 위한 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스에 대해 광범위한 중화 활성을 갖는 항체 및 그러한 항체의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인플루엔자 바이러스는 전세계적으로 공중 보건에 상당히 위협이 되는, 연간 인플루엔자 유행병 및 때때로 광역적인 전염병을 야기시킨다. 계절성 인플루엔자 감염은 특히 어린이, 면역약화된 환자 및 노령층에서, 매년 200,000명 내지 500,000명의 사망률과 연관된다. 사망률은 전형적으로 광역적인 전염성 인플루엔자 발발 계절 동안 더 증가된다. 특히 서비스가 불충분한 개체군에서, 인플루엔자 감염을 예방하고 치료하기 위한 강력한 항바이러스성 치료제를 개발하고자 하는 상당히 불충족된 의료적 요구가 여전히 존재한다.

[0003] A형, B형 및 C형의 3가지 유형의 인플루엔자 바이러스가 존재한다. 인플루엔자 A 바이러스는 인간, 돼지, 닭 및 흰담비를 포함하여, 광범위한 새 및 포유동물을 감염시킬 수 있다. 인플루엔자 A 바이러스는 표면 당단백질 헤마글루티닌(HA) 및 뉴라미니다아제(NA)를 코딩하는 2개 유전자의 항원성 영역 내 대립유전자 변이를 기반으로 아형(subtype)으로 분류될 수 있다. HA는 수용체-결합하는 막 융합 당단백질로서, 바이러스 부착 및 표적 세포로의 진입을 매개하고; HA는 보호적 체액성 면역 반응의 주요 표적이다. HA 단백질은 구조가 삼량체이고, 단백질가수분해 성숙화시에, 구형 머리부(HA1) 및 줄기부(stalk) 영역(HA2)을 함유하는 pH-의존적, 준안정성 중간체로 절단되는, 3개의 동일한 단일 폴리펩티드 전구체, HA0의 복사물로 구성된다. 막 원위 "구형 머리부"는 대부분의 HA1 구조를 구성하고 주요 항원성 도메인 및 바이러스 진입을 위한 시알산 결합 포켓을 포함한다. HA2 및 일부 HA1 잔기로 조립된, 막 근위 "줄기부" 구조는 막 융합 및 세포로의 침투를 촉발하도록 후기 엔도솜의 저pH 환경에서 입체구조 변화를 겪는, 융합 기구를 함유한다. 인플루엔자 A 아형 간 서열 상동성 정도는 HA2 영역(51%-80% 상동성)에서 보다 HA1(아형 간에 34%-59% 상동성)에서 더 작다. 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 유발된 중화 항체는 가변성 HA1 구형 머리부를 표적화하여 바이러스 수용체 결합을 방해하고 일방적으로 종 특이적이다. 드물게, HA의 구형 머리부를 표적으로 하는 광범위한 교차반응성 단일클론 항체가 동정된 적이 있다(Krause J.C. *et al*. 2011 J. Virol.85; Whittle J. *et al*., 2011 PNAS 108; Ekiert DC *et al*., 2012 Nature 489; Lee PS *et al*., 2012 PNAS 109). 대조적으로, 줄기 영역의 구조는 비교적 보존적이며 최근에 바이러스 진입을 위한 pH-촉발 융합 단계를 방해하도록 HA 줄기부에 결합하는 소수의 광범위 중화 항체가 동정되었다(Ekiert D.C. *et al*., 2009 Science 324; Sui J. *et al*., Nat Struct Mol Biol 16; Wrammert J *et al*., 2011 J Exp Med 208; Ekiert D. C *et al*., 2011 Science 333; Corti D *et al*., 2010 J Clin Invest 120; Throsby M ., 2008 PLoS One 3). 이들 줄기부 반응성 중화 항체의 대부분은 인플루엔자 A 1군 바이러스에 특이적이거나 또는 2군 바이러스에 특이적이다. 아주 최근에, 1군 및 2군 바이러스 둘 모두에 교차 반응성인 줄기부

결합 항체가 단리되었다([Corti D. *et al.*, 2011 Science 333]; [Li GM *et al.*, 2012 PNAS 109] 및 [Cyrille D *et al.*, 2012 Science 337]; [Nakamura G *et al.*, 2013, Cell Host & Microbe 14]).

[0004] 지금까지, 모든 인플루엔자 A 바이러스 감염을 광범위하게 중화시키거나 또는 억제하거나 또는 인플루엔자 A 바이러스에 의해 야기된 질환을 약독화시키는 시판 항체가 존재하지 않았다. 따라서, 인플루엔자 A 바이러스의 복수의 1군 및 2군 아형에 대해 보호되는 새로운 항체에 대한 요구가 남아있다.

발명의 내용

[0005] **발명의 설명**

[0006] 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌에 결합하여 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 하나의 1군 아형 및 적어도 하나의 2군 아형을 중화시킬 수 있는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.

[0007] 바람직하게, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌에 결합할 수 있고 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 종의 인플루엔자 A 바이러스 1군 아형 및 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 종의 인플루엔자 A 바이러스 2군 아형을 중화시킬 수 있다. 더욱 바람직하게, 본 발명의 항체 또는 결합 단편은 인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌에 결합할 수 있고 적어도 5 종의 인플루엔자 A 바이러스 1군 아형 및 적어도 1 또는 2 종의 인플루엔자 A 바이러스 2군 아형을 중화시킬 수 있다.

[0008] 인플루엔자 A 바이러스의 헤마글루티닌 아형은 아형 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16 및 H17를 포함하는 1군 및 아형 H3, H4, H7, H10, H14 및 H15를 포함하는 2군으로 동정된, 2개의 주요 계통발생 분류군으로 분류된다. 일 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 결합 단편은 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16 및 H17 및 이들의 변이체에서 선택된 1 이상의 인플루엔자 A 바이러스 1군 아형 및 H3, H4, H7, H10, H14 및 H15 및 이들의 변이체에서 선택된 1 이상의 인플루엔자 A 바이러스 2군 아형에 결합하고/하거나 중화시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 결합 단편은 인플루엔자 A 바이러스 1군 아형 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16 및 H17 및 인플루엔자 A 바이러스 2군 아형 H3, H4, H7, H10, H14 및 H15에 결합하고/하거나 중화시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 결합 단편은 1군 아형 H1, H2, H5, H6, 및 H9 및 2군 아형 H3 및 H7에 결합하고/하거나 중화시킬 수 있다. 추가 실시양태에서, 항체 또는 결합 단편은 1군 아형 H1, H2, H5 및 H6 및 2군 아형 H3 및 H7에 결합하고/하거나 중화시킬 수 있다.

[0009] 본 발명은 출발 물질로서 개별 도너로부터 수집된 IgG 기억 B 세포 유래의 천연 발생 인간 단일클론 항체(mAb)의 단리를 기초로 한다. 최적화를 사용하여 본원에 기술된 바와 같이, 특징들이 개선된 항체 변이체를 생성시켰다. 최적화된 항체 변이체는 천연적으로 발생되지 않으며; 재조합 기술을 사용해 생성된다. 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 HA의 줄기부 영역에 결합하고 각각 1군 및 2군 아형에서 선택된, 인플루엔자 A 바이러스의 1 이상의 아형의 감염을 중화시킨다. 항-인플루엔자 A HA 줄기부-결합 항체인, 본 발명의 항체는 공개된 문헌(WO2013/011347A1에 기술된 항체 FI6v4) 및 실시예 5의 표 6에 도시된 항체와 비교하여 인플루엔자 A 바이러스에 대해 보다 광범위한 포괄 범위 또는 보다 양호한 중화 활성이 입증되었다. 부가적으로, 본 발명의 항체는 실시예 6의 도 1에 도시된 바와 같이 HA 성숙화를 차단하는데 있어서 다른 mAb(들) 보다 더 효율적이다.

[0010] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 6개 CDR 세트를 포함하고 이때 6개 CDR 세트는 다음으로 이루어진 군에서 선택된다:

[0011] (a) 서열번호 3의 HCDR1, 서열번호 4의 HCDR2, 서열번호 5의 HCDR3, 서열번호 8의 LCDR1, 서열번호 9의 LCDR2 및 서열번호 10의 LCDR3;

[0012] (b) 서열번호 13의 HCDR1, 서열번호 14의 HCDR2, 서열번호 15의 HCDR3, 서열번호 18의 LCDR1, 서열번호 19의 LCDR2, 서열번호 20의 LCDR3;

[0013] (c) 서열번호 23의 HCDR1, 서열번호 24의 HCDR2, 서열번호 25의 HCDR3, 서열번호 28의 LCDR1, 서열번호 29의 LCDR2 및 서열번호 30의 LCDR3;

[0014] (d) 서열번호 33의 HCDR1, 서열번호 34의 HCDR2, 서열번호 35의 HCDR3, 서열번호 38의 LCDR1, 서열번호 39의 LCDR2 및 서열번호 40의 LCDR3;

[0015] (e) 서열번호 43의 HCDR1, 서열번호 44의 HCDR2, 서열번호 45의 HCDR3, 서열번호 48의 LCDR1, 서열번호 49의 LCDR2 및 서열번호 50의 LCDR3;

[0016] (f) 서열번호 53의 HCDR1, 서열번호 54의 HCDR2, 서열번호 55의 HCDR3, 서열번호 58의 LCDR1, 서열번호 59의 LCDR2 및 서열번호 60의 LCDR3;

[0017] (g) 서열번호 63의 HCDR1, 서열번호 64의 HCDR2, 서열번호 65의 HCDR3, 서열번호 68의 LCDR1, 서열번호 69의 LCDR2 및 서열번호 70의 LCDR3;

[0018] (h) 서열번호 73의 HCDR1, 서열번호 74의 HCDR2, 서열번호 75의 HCDR3, 서열번호 78의 LCDR1, 서열번호 79의 LCDR2 및 서열번호 80의 LCDR3;

[0019] (i) 서열번호 83의 HCDR1, 서열번호 84의 HCDR2, 서열번호 85의 HCDR3, 서열번호 88의 LCDR1, 서열번호 89의 LCDR2, 서열번호 90의 LCDR3;

[0020] (j) 서열번호 93의 HCDR1, 서열번호 94의 HCDR2, 서열번호 95의 HCDR3, 서열번호 98의 LCDR1, 서열번호 99의 LCDR2 및 서열번호 100의 LCDR3;

[0021] (k) 서열번호 103의 HCDR1, 서열번호 104의 HCDR2, 서열번호 105의 HCDR3, 서열번호 108의 LCDR1, 서열번호 109의 LCDR2 및 서열번호 110의 LCDR3;

[0022] (l) 서열번호 113의 HCDR1, 서열번호 114의 HCDR2, 서열번호 115의 HCDR3, 서열번호 118의 LCDR1, 서열번호 119의 LCDR2 및 서열번호 110의 LCDR3;

[0023] (m) 서열번호 123의 HCDR1, 서열번호 124의 HCDR2, 서열번호 125의 HCDR3, 서열번호 128의 LCDR1, 서열번호 129의 LCDR2 및 서열번호 130의 LCDR3;

[0024] (n) 서열번호 133의 HCDR1, 서열번호 134의 HCDR2, 서열번호 135의 HCDR3, 서열번호 138의 LCDR1, 서열번호 139의 LCDR2 및 서열번호 140의 LCDR3; 및

[0025] (o) 서열번호 143의 HCDR1, 서열번호 144의 HCDR2, 서열번호 145의 HCDR3, 서열번호 148의 LCDR1, 서열번호 149의 LCDR2 및 서열번호 150의 LCDR3;

[0026] (p) 1 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 (a) 내지 (o) 중 어느 하나에 따른 6개 CDR 세트;

[0027] (q) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 또는 25개의 아미노산 치환을 포함하는 (a) 내지 (p) 중 어느 하나에 따른 6개 CDR 세트;

[0028] (r) 하기 (i) 내지 (vi)를 포함하는 (a) 내지 (q) 중 어느 하나에 따른 6개 CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3의 세트:

[0029] (i) 서열번호 3과 동일하거나 또는 서열번호 3에 대해 3개 또는 그 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 HCDR1;

[0030] (ii) 서열번호 4와 동일하거나 또는 서열번호 4에 대해 5개 또는 그 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 HCDR2;

[0031] (iii) 서열번호 5와 동일하거나 또는 서열번호 5에 대해 6개 또는 그 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 HCDR3;

[0032] (iv) 서열번호 6과 동일하거나 또는 서열번호 6에 대해 5개 또는 그 이하의 아미노산 잔기 치환 및/또는 하나의 결실을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 LCDR1;

[0033] (v) 서열번호 7과 동일하거나 또는 서열번호 7에 대해 5개 또는 그 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 LCDR2; 및

[0034] (vi) 서열번호 8과 동일하거나 또는 서열번호 8에 대해 1개 또는 그 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 LCDR3;

[0035] (s) 하기 (i) 내지 (vi)을 포함하는 (a) 내지 (r) 중 어느 하나에 따른 6개 CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3의 세트:

[0036] (i) 카밧 잔기 31이 S,

[0037] 카밧 잔기 32가 N 또는 Y,

[0038] 카밧 잔기 33이 N, S, 또는 R,

[0039] 카밧 잔기 34가 A,

[0040] 카밧 잔기 35가 V 또는 T,

[0041] 카밧 잔기 35A가 W,

[0042] 카밧 잔기 35B가 N인

[0043] HCDR1;

[0044] (ii) 카밧 잔기 50이 R,

[0045] 카밧 잔기 51이 T,

[0046] 카밧 잔기 52가 Y,

[0047] 카밧 잔기 52A가 Y,

[0048] 카밧 잔기 53이 R,

[0049] 카밧 잔기 54가 S,

[0050] 카밧 잔기 55가 K 또는 G,

[0051] 카밧 잔기 56이 W,

[0052] 카밧 잔기 57이 Y,

[0053] 카밧 잔기 58이 N 또는 Y,

[0054] 카밧 잔기 59가 D,

[0055] 카밧 잔기 60이 Y,

[0056] 카밧 잔기 61이 A,

[0057] 카밧 잔기 62가 E, V 또는 d,

[0058] 카밧 잔기 63이 S 또는 F,

[0059] 카밧 잔기 64가 V 또는 L,

[0060] 카밧 잔기 65가 K인

[0061] HCDR2;

[0062] (iii) 카밧 잔기 95가 S 또는 G,

[0063] 카밧 잔기 96이 G,

[0064] 카밧 잔기 97이 H,

[0065] 카밧 잔기 98이 I,

[0066] 카밧 잔기 99가 T,

[0067] 카밧 잔기 100이 V 또는 E,

[0068] 카밧 잔기 100A가 F,

[0069] 카밧 잔기 100B가 G,

[0070] 카밧 잔기 100C가 V 또는 L,

[0071] 카밧 잔기 100D가 N,

[0072] 카밧 잔기 100E가 V 또는 I,

[0073] 카밧 잔기 100F가 D,

[0074] 카밧 잔기 100G가 A,

[0075] 카밧 잔기 100F가 F 또는 Y,

[0076] 카밧 잔기 101이 D,

[0077] 카밧 잔기 102가 M, I 또는 V인

[0078] HCDR3;

[0079] (iv) 카밧 잔기 24가 R,

[0080] 카밧 잔기 25가 T, A 또는 부재하고,

[0081] 카밧 잔기 26이 S 또는 A,

[0082] 카밧 잔기 27이 Q,

[0083] 카밧 잔기 28이 S 또는 R,

[0084] 카밧 잔기 29가 L,

[0085] 카밧 잔기 30이 S, N 또는 R

[0086] 카밧 잔기 31이 S,

[0087] 카밧 잔기 32가 Y,

[0088] 카밧 잔기 33이 L, T 또는 D,

[0089] 카밧 잔기 34가 H인

[0090] LCDR1;

[0091] (v) 카밧 잔기 50이 A,

[0092] 카밧 잔기 51이 A, T 또는 S,

[0093] 카밧 잔기 52가 S 또는 T,

[0094] 카밧 잔기 53이 S 또는 T,

[0095] 카밧 잔기 54가 L 또는 R,

[0096] 카밧 잔기 55가 Q, L 또는 G,

[0097] 카밧 잔기 56이 S인

[0098] LCDR2; 및

[0099] (vi) 카밧 잔기 89가 Q,

[0100] 카밧 잔기 90이 Q 또는 L,

[0101] 카밧 잔기 91이 S,

[0102] 카밧 잔기 92가 R, 및

[0103] 카밧 잔기 93이 T인

[0104] LCDR3.

[0105] 본 발명은 6개 CDR: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3의 세트를 포함하는 항체 및 이의 결합 단편을 제공하고, 여기서 6개 CDR의 세트는 표 11 및 13에 도시되었다.

[0106] 본 발명의 변이체 항체 서열은 본원에 열거된 서열과 75% 또는 그 이상(예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 아미노산 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시양태에서 서열 동일성은 기준 서열(즉, 본원에서 열거된 서열)의 전체 길이에 대해 계산된다. 일부 추가 실시양태에서, 본원에 언급된 동일성 비율은 NCBI(National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)[Blosum 62 매트릭스;

갭 오픈 패널티=1 1 및 갭 확장 패널티=1]에 의해 명시된 디폴트 파라미터를 사용하는 BLAST 버전 2.1.3을 사용해 결정된다.

[0107] 변이체 항체는 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 따라서, 본원에 열거된 서열의 변이체도 역시 본 발명의 범주에 포함된다. 친화성 및/또는 역가(potency)가 개선된 항체의 변이체는 당분야에 공지된 방법을 사용해 얻을 수 있고 본 발명의 범주에 포함된다. 예를 들어, 아미노산 치환은 친화성이 더욱 개선된 항체를 얻는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레오티드 서열의 코돈 최적화를 사용하여 항체의 생산을 위한 발현 시스템에서 번역 효율을 개선시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 임의의 핵산 서열에 대한 통제된 진화 방법의 적용에 의해 항체 특이성 또는 중화 활성에 대해 최적화된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명의 범주에 속한다.

[0108] 본 발명은 하기에서 선택된 군에서 선택된 VH 및/또는 VL에 대해 적어도 75% 동일성을 갖는 VH 및/또는 적어도 75% 동일성을 갖는 VL을 포함하는 본 발명에 따른 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다:

[0109] (a) 서열번호 2의 VH 및 서열번호 7의 VL,

[0110] (b) 서열번호 12의 VH 및 서열번호 17의 VL,

[0111] (c) 서열번호 22의 VH 및 서열번호 27의 VL,

[0112] (d) 서열번호 32의 VH 및 서열번호 37의 VL,

[0113] (e) 서열번호 42의 VH 및 서열번호 47의 VL,

[0114] (f) 서열번호 52의 VH 및 서열번호 57의 VL,

[0115] (g) 서열번호 62의 VH 및 서열번호 67의 VL,

[0116] (h) 서열번호 72의 VH 및 서열번호 77의 VL,

[0117] (i) 서열번호 82의 VH 및 서열번호 87의 VL,

[0118] (j) 서열번호 92의 VH 및 서열번호 97의 VL,

[0119] (k) 서열번호 102의 VH 및 서열번호 107의 VL,

[0120] (l) 서열번호 112의 VH 및 서열번호 117의 VL,

[0121] (m) 서열번호 122의 VH 및 서열번호 127의 VL,

[0122] (n) 서열번호 132의 VH 및 서열번호 137의 VL,

[0123] (o) 서열번호 144의 VH 및 서열번호 147의 VL, 및

[0124] (p) 서열번호 152의 VH 및 서열번호 157의 VL.

[0125] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 결합 단편은 하기로 이루어진 군에서 선택된 VH 및 VL을 포함할 수 있다:

[0126] (a) 서열번호 2의 VH 및 서열번호 7의 VL,

[0127] (b) 서열번호 12의 VH 및 서열번호 17의 VL,

[0128] (c) 서열번호 22의 VH 및 서열번호 27의 VL,

[0129] (d) 서열번호 32의 VH 및 서열번호 37의 VL,

[0130] (e) 서열번호 42의 VH 및 서열번호 47의 VL,

[0131] (f) 서열번호 52의 VH 및 서열번호 57의 VL,

[0132] (g) 서열번호 62의 VH 및 서열번호 67의 VL,

[0133] (h) 서열번호 72의 VH 및 서열번호 77의 VL,

[0134] (i) 서열번호 82의 VH 및 서열번호 87의 VL,

[0135] (j) 서열번호 92의 VH 및 서열번호 97의 VL,

[0136] (k) 서열번호 102의 VH 및 서열번호 107의 VL,

[0137] (l) 서열번호 112의 VH 및 서열번호 117의 VL,

[0138] (m) 서열번호 122의 VH 및 서열번호 127의 VL,

[0139] (n) 서열번호 132의 VH 및 서열번호 137의 VL,

[0140] (o) 서열번호 144의 VH 및 서열번호 147의 VL, 및

[0141] (p) 서열번호 152의 VH 및 서열번호 157의 VL.

[0142] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 결합 단편은 면역글로불린 분자, 단일클론 항체, 키메라 항체, CDR-그라프트된 항체, 인간화 항체, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, 이황화 연결된(disulfide linked) Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디(diabody), 다중특이적(multispecific) 항체, 이중-특이적(dual-specific) 항체, 및 이특이적(bispecific) 항체로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0143] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 결합 단편은 인간 배선(germline) 프레임워크, 바람직하게는 VH6-1를 포함하는 VH 및/또는 인간 배선 프레임워크, 바람직하게는 VK1-39를 포함하는 VL을 포함한다. 바람직하게, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 결합 단편은 인간 배선 프레임워크 VH6-1을 포함하는 VH 및 인간 배선 프레임워크 VK1-39를 포함하는 VL을 포함한다. VH6 프레임워크는 항체에서 드물게 사용된다.

[0144] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 결합 단편은 Fc 영역을 포함하고, 바람직하게 항체는 IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 결합 단편이다.

[0145] 일 실시양태에서, 본 발명의 항체는 야생형 인간 IgG 불변 도메인에 대해 1 이상의 아미노산 치환을 갖는 인간 IgG 불변 도메인을 포함한다. 본 발명의 항체는 M252Y, S254T, 및 T256E("YTE") 아미노산 치환을 갖는 인간 IgG 불변 도메인을 포함하고, 여기서 아미노산 잔기는 카밧(Kabat)과 같은 EU 지수에 따라 번호매겨진다.

[0146] 본 발명은 또한 항체 또는 이의 결합 단편이 상기 기술된, 본 발명의 항체와 인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌에 대한 결합에 대해 경쟁하는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌에 결합할 수 있고 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 하나의 1군 아형 및 적어도 하나의 2군 아형을 중화시킬 수 있는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 또는 이의 단편, 또는 본 발명의 항체와 결합에 대해 경쟁하는 항체를 포함한다.

[0147] 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 단리된 핵산을 더 제공한다. 바람직하게, 핵산은 cDNA이다. 본 발명은 또한 본 발명의 항체의 경쇄 및 중쇄 및 CDR의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 따라서, 본원은 본 발명의 예시적인 항체의 경쇄 및 중쇄 및 CDR의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 본 발명의 예시적인 항체의 CDR, 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열에 대한 서열번호를 제공한다. 유전자 코드의 중복성으로 인해, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 이들 서열의 변이체가 존재하게 된다.

[0148] 본 발명은 본 발명에 따른 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 역시 더 제공하고, 바람직하게, 벡터는 발현 벡터이다.

[0149] 부가적으로, 본 발명은 본 발명에 따른 단리된 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 적합한 숙주 세포는 포유동물 세포, 예컨대 HEK 또는 CHO 세포에서 유도된 것들을 포함한다.

[0150] 또한, 본 발명은 항체 또는 이의 단편의 발현에 적합한 조건 하에서 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 본 발명의 항체 또는 단편의 제작 방법을 제공한다.

[0151] 이러한 방법은 숙주 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 단편을 단리하는 단계를 더 포함하고, 경우에 따라 단리된 항체 또는 단편을 조성물로 제제화시키는 단계를 포함한다.

[0152] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 더 제공한다.

[0153] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편, 히스티딘, 및 NaCl을 약 5.5 내지 약 6.5 범위의 pH에서, 바람직하게는 약 pH 6.0에서 포함하고; 보다 더 바람직하게는 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편, 약 20 내지 약 30 mM 히스티딘 및 약 0.1 내지 약 0.2 M NaCl을 약 5.5 내지 약 6.5 범위의 pH에서, 바람직하게는 약 pH 6.0에서 포함하고; 가장 바람직하게는 25 mM His 및 0.15 M NaCl을 약 5.5 내지 약 6.5 범위의 pH에서, 예를 들어 약 pH 6.0에서 포함하는 조성물을 제공한다.

[0154] 부가적으로, 본 발명은

[0155] - 피험체에서 인플루엔자 A 감염의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편;

[0156] - 피험체에서 인플루엔자 A 감염의 예방 또는 치료를 위한 약물의 제조에서 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편의 용도;

[0157] - 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편의 투여를 포함하는 피험체에서 인플루엔자 A 감염의 예방 또는 치료 방법;

[0158] - 세포로 인플루엔자 A 바이러스 진입을 위한 pH-촉발 융합 단계를 예방하기 위한 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편의 용도; 또는

[0159] - 인플루엔자 A 바이러스 HA 성숙화를 억제하기 위한 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편의 용도

[0160] 를 제공한다.

[0161] 본 발명의 예시적인 항체는 제한없이, 항체 3, 항체 5, 항체 6, 항체 8, 항체 10, 항체 11, 항체 12, 항체 13, 항체 14, 및 항체 15를 포함한다.

[0162] 본 발명은 또한 피험체에서 인플루엔자 A 감염의 시험관내 진단에서 본 발명에 따른 항체 또는 이의 결합 단편의 용도를 제공한다.

[0163] **상세한 설명**

[0164] **서론**

[0165] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같이 인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌(HA) 줄기부에 결합하고 인플루엔자 A 바이러스 감염 1군 및 2군 아형을 중화시킬 수 있는 인간 형태를 포함한, 항체를 비롯하여, 이의 단편, 유도체/접합체 및 조성물을 제공하고; 이러한 항-인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 항체를 본원에서는 본 발명의 항체라고 한다.

[0166] 본원에서 사용하는 용어, "중화하다"는 감염성 작용제, 예컨대 인플루엔자 A 바이러스에 결합하고, 그 감염성 작용제의 생물학적 활성, 예를 들어 독성을 감소시키는 항체, 또는 이의 결합 단편의 능력을 의미한다. 중화의 최소 요건은 감염성 작용제에 결합하는 항체, 또는 이의 결합 단편의 능력이다. 일 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 하나의 특정한 에피토프 또는 항원성 결정부에 면역특이적으로 결합한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 단백질의 적어도 하나의 특정한 에피토프 또는 항원성 결정인자에 면역특이적으로 결합한다.

[0167] 항체는 바이러스의 생활 주기 동안 다양한 시점에 감염성 작용제, 예컨대 인플루엔자 A 바이러스의 활성을 중화시킬 수 있다. 예를 들어, 항체는 바이러스와 1 이상의 세포 표면 수용체의 상호작용을 방해하여서 표적 세포와 바이러스 부착을 방해하게 된다. 다르게, 항체는 예를 들어 수용체-매개 내포작용에 의한 바이러스 내재화를 방해하여, 그 수용체와 바이러스의 1 이상의 부착후 상호작용을 방해한다.

[0168] 일 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은, 예를 들어 바이러스 및 엔도솜막의 융합을 방해하여서, 융합 과정을 방해해 인플루엔자 A의 활성을 중화시킨다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 HAO의 프로테아제 매개 절단을 방해하여, 바이러스 성숙화 및 HA2 바이러스 융합 펩티드의 형성을 방해한다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 인플루엔자 A 바이러스의 활성화에 필수적인, 프로테아제 매개 HAO 절단을 방해한다.

[0169] 면역글로불린이라고도 알려진, 본원에서 사용하는 용어 "항체" 및 "항체들"은 단일클론 항체(전체 길이 단일클론 항체를 포함), 인간 항체, 인간화 항체, 낙타화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fv(scFv), 단쇄 항체, 단일 도메인 항체, 도메인 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 목적 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편(예를 들어, 항원 결합 부분), 이황화 연결된 Fv(dsFv), 및 항-이디오타입(항-Id) 항체(예를 들어, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체를 포함), 인트라바디, 및 상기 임의의 에피토프-결합 단편을 포함한다. 구체적으로, 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 단편, 즉 적어도 하나의 항원-결합 부위를 포함하는 분자를 포함한다. 면역글로불린 분자는 임의의 이소타입(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 서브이소타입(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 알로타입(예를 들어, Gm, 예를 들어 G1m(f, z, a 또는 x), G2m(n), G3m(g, b, 또는 c), Am, Em, 및 Km(1, 2 또는 3))일 수 있다.

[0170] 인간 항체는 일반적으로 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 이황화 결합에 의해 중쇄에 연결되는 한편, 이황화 연결 개수는 상이한 면역글로불린 이소타입의 중쇄간에 다양하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 자리잡은 사슬내 이황화 브릿지를 갖는다. 각각의 중쇄는 가변 도메인(VH)의 한쪽 말단에 다수의 불변 도메인(CH)이 후속된다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인(VL) 및 그 다른 말단에 불변 도메인(CL)을 가지며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 배열되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 배열된다. 경쇄는 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 기반으로 람다 사슬 또는 카파 사슬로 분류된다. 카파 경쇄의 가변 도메인은 VK라고 본원에서 표시한다.

[0171] 본 발명의 항체는 전체길이 또는 온전한 항체, 항원 결합 단편을 포함한, 항체 단편, 천연 서열 항체 또는 아미노산 변이체, 인간, 인간화, 번역 후 변형, 키메라 또는 융합 항체, 면역접합체, 및 이의 기능적 단편을 포함한다. 항체는 바람직한 이펙트 기능 또는 혈청 반감기를 제공하도록 Fc 영역 내에서 변형될 수 있다. 이하 세션에서 보다 상세하게 기술하는 바와 같이, 적절한 Fc 영역을 가지면, 세포 표면에 결합된 나 항체는 예를 들어 항체-의존적 세포의 세포독성(ADCC)을 통해서 또는 보체 의존적 세포독성(CDC)으로 보체를 동원하여, 또는 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 상에 결합된 항체를 인식하고 이어서 항체 의존적 세포-매개 식세포작용(ADCP)으로 세포의 식세포작용을 야기하는 1 이상의 이펙터 리간드를 발현하는 비특이적 세포독성 세포를 동원하거나, 또는 일부 다른 기전을 통해서, 세포독성을 유도할 수 있다. 대안적으로, 부작용 또는 치료 합병증을 최소화하기 위해, 이펙터 기능을 제거하거나 또는 감소시키는 것이 바람직한 경우, 일정한 다른 Fc 영역을 사용해도 된다. 본 발명의 항체의 Fc 영역은 FcRn에 대한 결합 친화성을 증가시켜서 혈청 반감기가 증가되도록 변형될 수 있다. 대안적으로, Fc 영역은 혈청 반감기를 증가시키도록 PEG 또는 알부민, 또는 바람직한 효과를 일으키는 일부 다른 접합체에 접합될 수 있다.

[0172] 본 발명의 항-인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 항체는 포유동물에서 인플루엔자 A 바이러스 감염의 1 이상의 증상을 진단, 예방, 치료 및/또는 완화시키는데 유용하다.

[0173] 본 발명은 본 발명의 항-인플루엔자 바이러스 HA 줄기부 항체 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 인플루엔자 A 바이러스 감염을 예방하거나 또는 치료하기 위한 목적을 위해서, 조성물은 이러한 치료가 필요한 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 항-인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 항체 및 담체를 포함하는 제제를 제공한다. 일 실시양태에서, 제제는 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 치료 제제이다.

[0174] 일정 실시양태에서, 본 발명은 포유동물에서 인플루엔자 A 감염을 예방하거나 또는 치료하는데 유용한 방법을 제공하고, 이 방법은 포유동물에게 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 항체 치료 조성물은 의사의 지시에 따라서 단기(급성으로), 만성적으로, 또는 간헐적으로 투여될 수 있다.

[0175] 일정 실시양태에서 본 발명은 또한 적어도 항-인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 항체를 포함하는 제조 물품, 예컨대 멸균된 제형 및 키트를 제공한다. 시험관내에서 예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블랏에서 인플루엔자 A 바이러스의 검출 및 정량화를 위한 항체를 포함하는 키트를 제공한다. 검출에 유용한 이러한 항체는 표지 예컨대 형광발광성 또는 방사능표지성 표지가 제공될 수 있다.

[0176] **전문용어**

[0177] 본 발명을 상세하기 설명하기 전에, 본 발명은 특정 조성물 또는 공정 단계에 국한되지 않고, 다양할 수 있음을 이해한다. 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용되는 단수형 "한", "하나", 및 "그것"은 달리 문맥에서 명확하게 언급하지 않으면 복수형을 포함함을 주의한다.

[0178] 달리 정의하지 않으면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 관련된 분야의 통상적인 숙련가가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, [Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press]; [The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press]; 및 [Oxford Dictionary Of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press]는 본 발명에서 사용되는 많은 용어들에 대한 일반적인 사전을 당분야의 숙련가에게 제공한다.

[0179] 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회의 권고에 따라 한 글자 기호 또는 통상적으로 알려진 3글자 기호로 본원에서 언급한다. 유사하게, 뉴클레오티드는 그들의 통상적으로 허용되는 한글자 코드로 언급된다.

[0180] 항체의 가변 도메인, 상보성 결정 영역(CDR) 및 프레임워크 영역(FR)의 아미노산 번호매김은 달리 언급하지 않

으면, [Kabat *et al*. Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)]에 기재된 바와 같은 카밧 정의에 따른다. 이러한 번호매김 체계를 사용하면, 실제 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 그의 삽입에 상응하는 적거나 또는 부가된 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 이후에 단일 아미노산 삽입(카밧에 따라 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 이후에 삽입된 잔기(예를 들어, 카밧에 따라 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카밧 번호매김은 "표준" 카밧 번호매김 서열과 항체 서열의 상동성 영역의 정렬에 의해 소정 항체에 대해 결정될 수 있다. 프레임워크 잔기의 최대 정렬은 종종 Fv 영역에 대해 사용되도록, 번호매김 체계에서 "스페이서" 잔기의 삽입을 요구한다. 또한, 임의의 소정 카밧 부위 번호에서 일정 개별 잔기의 동일성은 종간 또는 대립유전자 분기로 인해 항체 사슬 마다 다양할 수 있다.

[0181] **항-인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 항체**

[0182] 일정 실시양태에서, 항체는 단리되고/되거나 정제되고/되거나 발열원 무함유 항체이다. 본원에서 사용되는 용어 "정제된"은 그 자연 환경의 성분으로부터 동정되고 분리되고/되거나 회수되는 다른 분자들, 예컨대 폴리펩티드, 핵산 분자를 의미한다. 따라서, 일 실시양태에서 본 발명의 항체는 정제된 항체이고, 여기서 이들은 그들의 자연 환경의 1 이상의 성분으로부터 분리된다. 본원에서 사용되는 용어 "단리된 항체"는 항원 특이성이 상이한 다른 항체 분자가 실질적으로 없는 항체(예를 들어, 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 이외의 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음)를 의미한다. 따라서, 일 실시양태에서 본 발명의 항체는 단리된 항체이고, 여기서 이들은 특이성이 상이한 항체로부터 분리된다. 전형적으로 단리된 항체는 단일클론 항체이다. 또한, 본 발명의 단리된 항체는 1 이상의 다른 세포 물질 및/또는 화학물이 실질적으로 없고 본원에서는 단리된 및 정제된 항체라고 한다. 본 발명의 일 실시양태에서, "단리된" 단일클론 항체의 조합은 특이성이 상이하고 잘 정의된 조성으로 조합된 항체를 의미한다. 항체의 제조 및 정제/단리 방법은 이하에서 보다 상세하게 기술한다.

[0183] 본 발명의 단리된 항체는 임의의 적합한 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 본원에 개시된 항체 아미노산 서열, 또는 임의의 단리되거나 또는 제제화된 항체를 포함한다.

[0184] 본 발명의 항체는 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 단백질에 특이적인 적어도 하나의 특정 에피토프에 면역특이적으로 결합한다. 본원에서 사용되는 용어 "에피토프"는 항체에 결합할 수 있는 단백질 결정부를 의미한다. 일반적으로 에피토프는 분자의 화학적 활성 표면 작용기 예컨대 아미노산 또는 당 측쇄를 포함하고 일반적으로 특이적 3차원 구조 특징과 특이적 전하 특징을 갖는다. 입체형태 및 비입체형태 에피토프는 후자가 아닌 전자에 대한 결합이 변성 용매의 존재 하에서 상실된다는 것으로 구별한다.

[0185] 일 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 적어도 H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16 또는 H17 또는 모든 인플루엔자 A HA 아형 중에서 보존되는 에피토프에 결합한다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 및 H16에서 선택된 1종 이상, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 종의 인플루엔자 A 바이러스 1군 아형 및 H3, H4, H7, H10, H14 및 H15에서 선택된 1종 이상, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 종의 2군 아형 중에 보존된 에피토프에 결합한다.

[0186] 일 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 적어도 17H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16 또는 H17 또는 모든 인플루엔자 A 아형에 약 0.01 ㎍/㎖ 내지 약 5 ㎍/㎖, 또는 약 0.01 ㎍/㎖ 내지 약 0.5 ㎍/㎖, 또는 약 0.01 ㎍/㎖ 내지 약 0.1 ㎍/㎖, 또는 약 5 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖, 0.5 ㎍/㎖, 0.1 ㎍/㎖, 또는 0.05 ㎍/㎖ 미만의 EC_{50}으로 결합한다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 및 H16에서 선택된 1종 이상, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 종의 인플루엔자 A 바이러스 1군 아형, 및 H3, H4, H7, H10, H14 및 H15에서 선택된 1종 이상, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 종의 2군 아형에 약 0.01 ㎍/㎖ 내지 약 5 ㎍/㎖, 또는 약 0.01 ㎍/㎖ 내지 약 0.5㎍/㎖, 또는 약 0.01 ㎍/㎖ 내지 약 0.1 ㎍/㎖, 또는 약 5 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖, 0.5 ㎍/㎖, 0.1 ㎍/㎖, 또는 0.05 ㎍/㎖ 미만의 EC_{50}으로 결합한다.

[0187] 일 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 선형 에피토프이거나, 또는 연속 에피토프인 에피토프를 인식한다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 비선형 또는 입체형태 에피토프를 인식한다. 일 실시양태에서, 에피토프는 HA2의 고도로 보존된 줄기부 영역에 위치한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항체 또는 결합 단편은 HA2의 고도로 보존된 줄기부 영역 내 입체형태 에피토프에 결합한다. 일 실시양태에서, 에피토프는 접촉

잔기로서 HA2의 줄기부 영역내 위치 18, 19, 42, 45에서 선택된 1 이상의 아미노산을 포함한다(위치들은 [Weiss et al., J. Mol. Biol.(1990) 212, 737-761(1990)]에 기술된 바와 같이 H3 번호매김 체계에 따라 번호매김됨). 보다 구체적인 실시양태에서, 에피토프는 접촉 잔기로서 HA2의 줄기부 영역 내 18, 19, 42 및 45에서 선택된 1 이상의 아미노산을 포함한다. 추가 실시양태에서, 에피토프는 접촉 잔기로서 HA2의 줄기부 영역 내 아미노산 18, 19, 42 및 45를 포함한다. 또 다른 추가 실시양태에서, 에피토프는 접촉 잔기로서 HA2의 줄기부 영역 내 아미노산 18, 19, 및 42를 포함한다.

[0188] 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편에 의해 인식되는 에피토프 또는 에피토프들은 수많은 용도를 가질 수 있다. 예를 들어, 정제형 또는 합성형에서 에피토프는 면역 반응을 상승시키는데 사용(즉, 백신으로서, 또는 다른 용도의 항체 생산용으로)되거나 또는 에피토프와 면역반응하는 항체에 대한 혈청을 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 일 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편에 인식되는 에피토프, 또는 이러한 에피토프를 갖는 항원은 면역 반응을 상승시키기 위한 백신으로 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 및 결합 단편은 예를 들어 백신 내 항원이 올바른 입체형태로 올바른 면역원성 에피토프를 함유하는지 여부를 결정하여, 백신의 품질을 모니터링하는데 사용될 수 있다.

[0189] **가변 영역**

[0190] 본원에서 사용되는 용어 "부모 항체"는 본원에서 정의되는, 변이체 또는 유도체의 제조를 위해 사용되는 아미노산 서열에 의해 코딩된 항체를 의미한다. 부모 폴리펩티드는 천연 항체 서열(즉, 천연 발생 대립유전자 변이체를 포함한, 천연 발생) 또는 천연 발생 서열의 기존 아미노산 서열 변형(예컨대 다른 삽입, 결실 및/또는 치환)을 갖는 항체 서열을 포함한다. 부모 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 부모 항체의 변이체이다. 본원에서 사용되는 용어 "변이체"는 부모 항체 서열에 1 이상의 아미노산 잔기(들)의 부가, 결실 및/또는 치환에 의해 "부모" 항체 아미노산 서열과 아미노산 서열이 상이한 항체를 의미한다.

[0191] 항체의 항원 결합부는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 항체의 1 이상의 단편을 포함한다. 항체의 항원-결합 기능은 전체 길이 항체의 단편에 의해서 수행될 수 있음이 확인된 바 있다. 용어 항체의 "항원 결합부"에 포함되는 결합 단편의 예에는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인, Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인, F(ab')2 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 이루어진, dAb 단편(Ward et al.,(1989) Nature 341:544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)이 포함된다. 또한, Fv 단편의 2개 도메인, VL 및 VH가 개별 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여, VL 및 VH 영역이 1가 분자를 형성하도록 쌍을 이룬 단일 단백질로 만들 수 있는 합성 링커를 통해 연결될 수 있다(단쇄 Fv(scFv)라고함; 예를 들어, [Bird et al.(1988) Science 242:423-426]; 및 [Huston et al.(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883]를 참조함). 이러한 단쇄 항체는 또한 용어 항체의 "항원 결합부" 내에 포함시키고자 한다. 이들 항체 단편은 당분야의 숙련가들에게 공지된 통상적인 기술을 사용해 얻어지며, 단편은 온전한 항체에서와 동일한 방식으로 활용성에 대해 스크리닝된다. 항원 결합부는 재조합 DNA 기술, 또는 온전한 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다.

[0192] 본 발명의 항체는 본원에 기술된 VH 및 VL 도메인을 포함하는, 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0193] 일정 실시양태에서, 정제된 항체는 표 1에 개시된 VH 및/또는 VL 서열 중 적어도 하나에 대해 소정의 동일성 비율을 갖는 VH 및/또는 VL을 포함한다. 또한 "상동성"을 포함하는, 본원에서 사용하는 용어 "서열 동일성 비율(%)"은 서열을 정렬하고 최대 서열 동일성을 얻기 위해 필요하면, 갭을 도입한 후, 기준 서열, 예컨대 부모 항체 서열의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 서열과 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 비율로서 정의되며, 서열 동일성의 일부분으로 임의의 보존성 치환은 고려하지 않는다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 수동이외에도, [Smith and Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482]의 국소 상동성 알고리즘, [Neddleman and Wunsch, 1970, J. MoI. Biol. 48, 443]의 국소 상동성 알고리즘, [Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 2444]의 유사성 조사법, 또는 이들 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 프로그램(위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)의 GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N 및 TFASTA)을 통해 생성시킬 수 있다.

[0194] 본 발명의 항체는 본원에 기술된 VH 아미노산 서열과 동일성이 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%인 VH 아미노산 서열을 포함한다. 항체는 본원에 기술된 VH 아미노산 서열의 아미노산 서열과 동일성이 적어도, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 VH 아미노산 서열을 포함한다.

[0195] 본 발명의 항체는 본원에 기술된 VL 아미노산 서열과 동일성이 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%인 VL 아미노산 서열을 포함한다. 항체는 본원에 기술된 VL 아미노산 서열과 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 VL 아미노산 서열을 포함한다.

[0196] 본 발명의 범주에 속하는 항체는 본원에 기술된 바와 같이, 인플루엔자 A 바이러스의 1 이상의 1군 아형 및 1 이상의 2군 아형을 중화시킬 수 있다.

[0197] **상보성 결정 영역(CDR)**

[0198] 가변 도메인(VH 및 VL)이 항원 결합 영역을 포함하지만, 가변성은 항체의 가변 도메인을 통해 균일하게 분포하지 않는다. 이는 경쇄(VL 또는 VK) 및 중쇄(VH) 가변 도메인 둘 모두 내, 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 절편에 집중된다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분을 프레임워크 영역(FR)이라고 한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 각각은 β-시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성하는, 3개 CDR에 의해 연결된 β-시트 입체구조를 대체로 채택하는 4개의 FR을 포함한다. 각 사슬의 CDR은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 모이고, 다른 사슬 유래의 CDR과 함께, 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다. (예를 들어, [Kabat *et al.*, 상동] 참조). 중쇄의 3 CDR은 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3이라고 지정하고, 경쇄의 3 CDR은 CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3이라고 지정한다. 카밧 번호매김 체계가 본원에서 사용된다. 이와 같이, CDR-H1은 대략 아미노산 31(즉, 제1 시스테인 잔기 이후 대략 9 잔기)에서 시작하고, 대략 5-7 아미노산을 포함하며, 다음 티로신 잔기에서 종결된다. CDR-H2는 CDR-H1의 종결부 이후에 15번째 잔기에서 시작하여, 대략 16-19 아미노산을 포함하고, 다음 아르기닌 또는 리신 잔기에서 종결된다. CDR-H3은 CDR-H2의 종결부 이후에 대략 33번째 아미노산에서 시작하여; 3-25개의 아미노산을 포함하고; 및 서열 W-G-X-G에서 종결되며, 이때 X는 임의의 아미노산이다. CDR-L1은 대략 잔기 24(즉, 시스테인 잔기 이후)에서 시작하고; 대략 10-17 잔기를 포함하고, 다음 티로신 잔기에서 종결된다. CDR-L2는 CDR-L1의 종결부 이후에 대략 16번째 잔기에서 시작하고 대략 7 잔기를 포함한다. CDR-L3은 CDR-L2의 종결부 이후에 대략 33번째 잔기에서 시작하여; 대략 7-11 잔기를 포함하고, 서열 F-G-X-G에서 종결되며, X는 임의의 아미노산이다. CDR는 항체마다 상당히 다양할 수 있음을 주의한다(그리고 정의에 의해 카밧 공통 서열과 상동성을 나타내지 않게된다).

[0199] 본 발명은 본원에 기술된 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 서열의 아미노산을 포함하는 중화 항-인플루엔자 A HA 줄기부 항체를 포함한다. 본원에 기술된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 예를 들어 항체 11, 항체 12, 항체 13, 항체 14 또는 항체 15의 아미노산 서열, 또는 서열번호 102, 112, 122, 132, 또는 142로 도시된 아미노산 서열에 아미노산 결실 및/또는 삽입을 비롯하여 보존성 아미노산 치환을 포함하는 서열을 포함한다. 보존성 아미노산 치환은 제1 아미노산을 제1 아미노산과 유사한 화학적 및/또는 물리적 특성(예를 들어, 전하, 구조, 극성, 소수성/친수성)을 갖는 제2 아미노산으로 치환하는 것을 의미한다. 보존성 치환은 다음의 그룹 내에서 한 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다: 리신(K), 아르기닌(R) 및 히스티딘(H); 아스파테이트(D) 및 글루타메이트(E); 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 세린(S), 트레오닌(T), 티로신(Y), K, R, H, D 및 E; 알라닌(A), 발린(V), 류신(L), 이소류신(I), 프롤린(P), 페닐알라닌(F), 트립토판(W), 메티오닌(M), 시스테인(C) 및 글리신(G); F, W 및 Y; C, S 및 T.

[0200] **프레임워크 영역**

[0201] 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분인, 4개의 프레임워크 영역(FR1, FR2, FR3, FR4)을 포함한다. 중쇄의 4개의 FR은 FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4로 명명되고, 경쇄의 4개의 FR은 FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4로 명명된다. 카밧 번호매김 체계가 본원에서 사용되었고, 표 1, [Kabat et al, 상동]을 참조한다. 이와 같이, FR-H1은 위치 1에서 시작하여 대략 아미노산 30에서 종결되고, FR-H2는 대략 아미노산 36에서 49까지이고, FR-H3은 대략 아미노산 66에서 94까지이며 FR-H4는 대략 아미노산 103에서 113까지이다. FR-L1은 아미노산 1에서 시작하여 대략 아미노산 23에서 종결되고, FR-L2은 대략 아미노산 35에서 49까지이고, FR-L3은 대략 아미노산 57에서 88까지이며 FR-L4는 대략 아미노산 98에서 107까지이다. 일정 실시양태에서, 프레임워크 영역은 카밧 번호매김 체계에 따른 치환, 예를 들어 FR-L1 내 106A에 삽입을 함유할 수 있다. 천연 발생 치환이외에도, FR 잔기의 1 이상의 변경(예를 들어, 치환)이 본원의 항체에 또한 도입될 수 있고, 단 중화 능력을 보유하는 것을 조건으로 한다. 일정 실시양태에서, 이들은 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부에 대한 항체의 결합 친화성을 개선 또는 최적화시킨다. 변형을 위한 프레임워크 영역 잔기의 예는 항원에 직접 비공유적으로 결합하는 것(Amit *et al.*, *Science*, 233:747-753(1986)); CDR의 입체구조와 상호작용/그에 영향을 미치는 것(Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917(1987)); 및/또는 VL-VH 경계면에 참여하는 것(미국 특허 제5,225,539호)을 포함한다.

[0202] 다른 실시양태에서 FR은 "배선화(germlining)"의 목적으로 1 이상의 아미노산 변화를 포함해도 된다. 예를 들어, 선택된 항체 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 배선 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열과 비교하고 이때 선택된 VL 및/또는 VH 사슬의 일정 프레임워크 잔기는 배선 입체구조와 상이(예를 들어, 파지 라이브러리를 제조하는데 사용된 면역글로불린 유전자의 체액성 돌연변이로 인함)하게 되면, 배선 입체구조로 선택된 항체의 변경된 프레임워크 잔기를 "역돌연변이"시키는 것이 바람직할 수 있다(즉, 배선 프레임워크 아미노산 서열과 동일하도록 선택된 아미노산의 프레임워크 아미노산 서열을 변화). 프레임워크 잔기의 이러한 "역돌연변이"(또는 "배선화")는 특이적 돌연변이를 도입시키기 위한 표준 분자 생물학적 방법(예를 들어, 부위-지정 돌연변이유발법; PCR-매개 돌연변이유발법 등)에 의해 수행될 수 있다.

[0203] **본 발명의 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열**

[0204] 상기 기술된 아미노산 서열 이외에도, 본 발명은 그 아미노산 서열에 상응하는 뉴클레오티드 서열 및 본 발명의 인간 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 일 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이들은 제한없이, 상기 기준 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한 본원에 기술된 항체의 CDR 및 FR을 포함하는 VH 및 VL 프레임워크를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 비롯하여 세포(예를 들어, 포유동물 세포)에서 그들의 효과적인 발현을 위한 발현 벡터를 제공한다. 폴리뉴클레오티드를 사용하여 항체를 제조하는 방법은 이하에 보다 상세하게 기술한다.

[0205] 본 발명은 또한 본원에 기술된 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대해서 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 엄격 또는 저엄격 혼성화 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "엄격성"은 프로브와 필터 결합된 핵산 간 상동성 정도를 표시하기 위한 혼성화 실험의 실험 조건(예를 들어, 온도 및 염 농도)을 의미하고, 엄격성이 높을수록, 프로브와 필터 결합된 핵산 간 상동성 비율이 높다.

[0206] 엄격 혼성화 조건은 제한없이, 약 45℃에서 6X 염화나트륨/시트르산나트륨(SSC) 중 필터-결합된 DNA에 혼성화 이후 약 50-65℃에서 0.2X SSC/0.1% SDS 중 1 이상의 세척, 고도의 엄격 조건 예컨대 약 45℃에서 6X SSC 중 필터-결합된 DNA에 혼성화 이후 약 65℃에서 0.1X SSC/0.2% SDS 중 1 이상의 세척, 또는 당분야의 숙련가에게 공지된 임의의 다른 엄격 혼성화 조건을 포함한다(예를 들어, [Ausubel, F.M. *et al.*, eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc.] 및 [John Wiley and Sons, Inc., NY at pages 6.3.1~6.3.6 and 2.10.3] 참조).

[0207] 실질적으로 동일한 서열은 다형성 서열, 즉 개체군 중 교체 서열 또는 대립유전자일 수 있다. 대립유전자 차이는 하나의 염기쌍만큼 적을 수 있다. 실질적으로 동일한 서열은 또한 침묵 돌연변이를 포함하는 서열을 포함하는, 돌연변이유발된 서열을 포함할 수 있다. 돌연변이는 1 이상의 잔기 변화, 1 이상의 잔기의 결실, 또는 1 이상의 추가 잔기의 삽입을 포함할 수 있다.

[0208] 폴리뉴클레오티드는 당분야에 공지된 임의 방법에 의해 얻을 수 있고, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있다. 예를 들면, 항체의 뉴클레오티드 서열이 알려져 있으면, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, [Kutmeier *et al.*, BioTechniques 17:242(1994)]에 기술된 바와 같음)로부터 조립할 수 있으며, 간략하게, 항체를 코딩하는 서열의 일부분을 함유하는 중복 올리고뉴클레오티드의 합성, 이들 올리고뉴클레오티드의 어닐링 및 결찰, 및 이후 PCR에 의해 결찰된 올리고뉴클레오티드의 증폭을 포함한다.

[0209] 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 적합한 공급원 유래의 핵산으로부터 생성시킬 수 있다. 특정 항체를 코딩하는 핵산을 함유하는 클론이 이용가능하지 않지만, 항체 분자의 서열이 알려져 있으면, 면역글로불린을 코딩하는 핵산은 화학적으로 합성하거나 또는 서열의 3' 및 5' 말단에 혼성화할 수 있는 합성 프라이머를 사용하여 PCR 증폭에 의해 또는 식별할 수 있는 특정 유전자 서열, 예를 들어 항체를 코딩하는 cDNA 라이브러리 유래 cDNA 클론에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 클로닝에 의해 적합한 공급원(예를 들어, 항체 cDNA 라이브러리, 또는 항체를 발현하는 임의의 조직 또는 세포, 예컨대 항체 발현에 대해 선택된 하이브리도마 세포로부터 생성된 cDNA 라이브러리, 또는 그로부터 단리된 핵산, 바람직하게는 폴리A+RNA)으로부터 얻을 수 있다. PCR을 통해 생성시킨 증폭된 핵산은 이후 당분야에 잘 알려진 임의의 방법을 사용해 복제가능한 클로닝 벡터에 클로닝시킬 수 있다.

[0210] 항체의 뉴클레오티드 서열 및 상응하는 아미노산 서열이 결정되면, 항체의 뉴클레오티드 서열은 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체를 생성하도록, 예를 들어 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 생성하도록, 뉴클레오티드

서열의 조작에 대해 당분야에서 잘 알려진 방법, 예를 들어 재조합 DNA 기술, 부위 지정 돌연변이유발법, PCR 등을 사용해 조작될 수 있다(예를 들어, [Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.] 및 [Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY]에 기술된 기술을 참조) 등을 사용해 조작될 수 있다.

[0211] **결합 특징**

[0212] 상기 기술된 바와 같이, 본 발명의 항-인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 항체는 다른 폴리펩티드에 비해 독점적으로 또는 우선적으로 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부 단백질, 펩티드, 서브유닛, 단편, 일부분 또는 임의의 이들의 조합의 적어도 하나의 명시된 에피토프 또는 항원성 결정부에 면역특이적으로 결합한다. 본원에서 사용하는 용어 "에피토프" 또는 "항원성 결정부"는 항체에 결합할 수 있는 단백질 결정부를 의미하고, 본원에서 사용하는 용어 "결합"은 바람직하게는 특이적인 결합을 의미한다. 이들 단백질 결정부 또는 에피토프는 일반적으로 분자의 화학적 활성 표면 그룹 예컨대 아미노산 또는 당 측쇄로 이루어지고 일반적으로 특이적인 3차원 구조 특징을 비롯하여 특이적인 전하 특징을 갖는다. 입체구조 및 비입체구조 에피토프는 전자와의 결합은 변성 용매의 존재 하에서 소실되고 후자는 그렇지 않다는 점에서 구별된다. 본원에서 사용되는 용어 "비연속 에피토프"는 단백질의 1차 서열에서 적어도 2 개별 영역으로부터 형성된 단백질 항원 상의 입체구조 에피토프를 의미한다.

[0213] 항원과 항체간 상호작용은 다른 비공유 단백질-단백질 상호작용에 대한 것과 동일하다. 대체로 4가지 유형의 결합 특징이 항체 및 항원 간에 존재한다: (i) 수소 결합, (ii) 분산력, (iii) 루이스산과 루이스 염기간의 정전기력, 및 (iv) 소수성 상호작용. 소수성 상호작용은 항체-항원 상호작용에 대한 주요 구동력이고, 분자의 유인력보다는 비극성기에 의한 물의 반발력을 기초로한다(Tanford, 1978). 그러나, 일정 물리력이 또한 항원-항체 결합에 기여하는데, 예를 들어, 상이한 항체 결합 부위를 갖는 에피토프 형상의 핏(fit) 또는 상보성이다. 게다가, 다른 재료 및 항원이 항체와 교차반응하여 유효 유리 항체를 위해 경쟁할 수 있다.

[0214] 항원 및 항체간 결합 특이성 및 친화성 상수의 측정은 본 발명의 항체를 사용하는 예방, 치료, 진단 및 연구 방법의 효능을 결정하는데 중추적인 요소이다. "결합 친화성"은 대체로 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그 결합 파트너(예를 들어, 항원) 간 비공유 상호작용의 총계의 강도를 의미한다. 달리 언급하지 않으면, 본원에서 사용되는 "결합 친화성"은 결합쌍의 구성원(예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유한 결합 친화성을 의미한다. 그 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 대체로 평형 해리 상수(Kd)로 표시되고 k_{off}/k_{on}의 비율로서 계산된다. 예를 들어, [Chen, Y., et al.,(1999) *J. Mol Biol* 293:865-881]를 참조한다. 친화성은 본원에 기술하고 예시한 것들을 포함하여, 당분야에 공통으로 알려진 방법에 의해 측정할 수 있다. 동력학적 특징규명을 위해 시판되는 예는 OCTET® 패밀리 오브 인스트루먼츠가 포함된다. 저친화성 항체는 대체로 항원에 서서히 결합하고 빨리 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화성 항체는 대체로 빠르게 항원에 결합하고 보다 길게 결합된 채로 유지되는 경향이 있다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법이 당분야에 알려져 있으며, 그들 중 임의의 방법을 본 발명의 목적을 위해 사용할 수 있다.

[0215] 결합 친화성의 결정은 실시예 섹션에 더욱 기술한 특정 기술, 및 당분야에 잘 알려진 방법을 사용해 측정할 수 있다. 그러한 방법 하나는 미표지된 항원의 역가 시리즈 존재하에서 최종 농도의 (^{125}I)-표지된 항원으로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트에 결합된 항원을 포획하여 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화성을 측정하는 다음의 방법에서 기술된 바와 같은 관심 항체의 Fab 형태 및 그의 항원을 사용해 수행되는 방사선표지된 항원 결합 어세이(RIA)에 의한 해리 상수 "Kd"의 측정을 포함한다(Chen, *et al.*,(1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). 어세이용 조건을 확립하기 위해서, 미세역가 플레이트(Dynex)를 50 mM 탄산나트륨(pH 9.6) 중 5 ㎍/mL의 포획 항-Fab 항체(Cappel Labs)로 밤새 코팅한 후, 실온(대략 23℃)에서 2 내지 5시간 동안 PBS 중 2%(w/v) 소혈청 알부민으로 차단시킨다. 비흡착 플레이트(Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합시킨다(예를 들어, [Presta *et al.*,(1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일관됨). 관심 Fab를 이어 밤새 항온반응시키지만, 이러한 항온반응은 평형상태에 도달을 보장하기 위해서 보다 긴 기간(예를 들어, 65시간) 동안 계속되어도 된다. 이후, 혼합물을 실온에서 항온반응(예를 들어, 1시간 동안)을 위해 포획 플레이트로 옮긴다. 이어서 용액을 제거하고 플레이트를 8회 PBS 중 0.1% Tween-20으로 세척한다. 플레이트가 건조되면, 150 ㎕/웰의 섬광제(MicroScint-20; Packard)를 부가하고, 플레이트를 10분간 Topcount 감마 카운터(Packard) 상에서 계측한다. 20%의 최대 결합과 균등하거나 또는 그 이하인 각각의 Fab의 농도를 경쟁 결합 어세이에 사용을 위해 선택한다.

[0216] 다른 예에서, Kd 값은 ~10 반응 유닛(RU)에서 고정화된 항원 CM5 칩을 사용해 25℃에서 BIAcore™-2000 또는 a BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)을 사용하여 표면 플라스몬 공명 어세이를 이용해 측정할 수 있다. 간략하게, 카르복시메틸화 덱스트란 바이오센서 칩(CM5, BIAcore Inc.)을 공급사의 설명서에 따라서 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드(EDC) 및 N-히드록시숙신이미드(NHS)로 활성화시킨다. 항원을 110 mM 아세트산나트륨, pH 4.8을 사용해 5 ㎍/mℓ(~0.2 uM)로 희석시킨 후 5 ㎕/분의 유속으로 주사하여 커플링된 단백질의 대략 10 반응 유닛(RU)에 도달시킨다. 항원의 주사 이후, 1 M 에탄올아민을 주사하여 미반응된 기를 차단시킨다. 동역학적 측정을 위해서, Fab의 2배 연속 희석물(0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 ㎕/분의 유속에 25℃에서 0.05% Tween 20을 함유한 PBS(PBST) 중에서 주사한다. 결합 속도(k_{on}) 및 해리 속도(k_{off})는 결합 및 해리 센소그램을 동시에 적합화시켜서 단순 일대일 랑그뮈어 결합 모델(BIAcore Evaluation Software version 3.2)을 사용해 계산하였다.

[0217] 온-속도가 상기 표면 플라스몬 공명 어세이에 의해서 10^6 M^{-1} S^{-1}를 초과하면, 온-속도는 분광계, 예컨대 스톱-플로우 장착 분광계(Aviv Instruments) 또는 교반 적색 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광계(ThermoSpectronic)로 측정하는 상승 농도의 항원 존재 하에서, 25℃에서 PBS, pH 7.2 중 20 nM 항-항원 항체(Fab 형태)의 형광 발광 강도(여기=295 nm; 발광=340 nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 발광 켄칭 기술을 사용해 측정할 수 있다. 본 발명에 따른 "온-속도" 또는 "결합의 속도" 또는 "결합 속도" 또는 "k_{on}"은 상기 기술한 바와 같이 BIAcore™-2000 또는 BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)을 사용하여 상기 기술된 동일한 표면 플라스몬 공명 기술로 결정할 수 있다.

[0218] 본 발명의 항체, 또는 이의 변경/돌연변이 유도체의 결합 특징의 결정에 적합한 방법 및 시약(이하 기술됨)은 당분야에 공지되어 있고/있거나 시판된다(미국 특허 제6,849,425호; 제6,632,926호; 제6,294,391호; 제6,143,574호). 또한, 이러한 동역학적 분석을 위해 디자인된 장비 및 소프트웨어가 시판된다(예를 들어, Biacore® A100, 및 Biacore® 2000 장비; Biacore International AB, Uppsala, 스웨덴).

[0219] 일 실시양태에서, 결합 단편 또는 이의 변이체를 포함한, 본 발명의 항체는 또한 인플루엔자 A 바이러스 폴리펩티드에 대한 그들의 결합 친화성 관점에서 기술되거나 또는 명시될 수 있다. 전형적으로, 고친화성 항체는 Kd가 10^{-7} M 미만이다. 일 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M 또는 10^{-15} M 미만 또는 이와 균등한 해리 상수 또는 Kd로 인플루엔자 A 폴리펩티드, 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합한다. 인플루엔자 A 폴리펩티드는 HA 폴리펩티드를 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M 또는 10^{-12} M 미만 또는 이와 균등한 해리 상수 또는 Kd로 인플루엔자 A 폴리펩티드, 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합한다. 본 발명은 임의의 개별적으로 언급한 값 사이의 범위 내인 해리 상수 또는 Kd로 인플루엔자 A 폴리펩티드에 결합하는 항체를 포함한다.

[0220] 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 5×10^{-2} sec^{-1}, 10^{-2} sec^{-1}, 5×10^{-3} sec^{-1} 또는 10^{-3} sec^{-1}, 5×10^{-4} sec^{-1}, 10^{-4} sec^{-1}, 5×10^{-5} sec^{-1}, 또는 10^{-5} sec^{-1}, 5×10^{-6} sec^{-1}, 10^{-6} sec^{-1}, 5×10^{-7} sec^{-1} 또는 10^{-7} sec^{-1} 미만 또는 이와 동등한 오프 속도(k_{off})로 인플루엔자 A 폴리펩티드 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 5×10^{-4} sec^{-1}, 10^{-4} sec^{-1}, 5×10^{-5} sec^{-1}, 또는 10^{-5} sec^{-1}, 5×10^{-6} sec^{-1}, 10^{-6} sec^{-1}, 5×10^{-7} sec^{-1} 또는 10^{-7} sec^{-1} 미만 또는 이와 동등한 오프 속도(k_{off})로 인플루엔자 A 폴리펩티드 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합한다. 본 발명은 또한 임의의 개별 언급된 값 사이 범위 내의 오프 속도(k_{off})로 인플루엔자 A 폴리펩티드에 결합하는 항체를 포함한다.

[0221] 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 10^3 M^{-1} sec^{-1}, 5×10^3 M^{-1} sec^{-1}, 10^4 M^{-1} sec^{-1}, 5×10^4 M^{-1} sec^{-1}, 10^5 M^{-1} sec^{-1}, 5×10^5 M^{-1} sec^{-1}, 10^6 M^{-1} sec^{-1}, 5×10^6 M^{-1} sec^{-1}, 10^7 M^{-1} sec^{-1}, 또는 5×10^7 M^{-1} sec^{-1} 보다 크거나 또는 동등한 온 속도(k_{on})로 인플루엔자 A 폴리펩티드 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 10^5 M^{-1} sec^{-1}, 5×10^5 M^{-1} sec^{-1}, 10^6 M^{-1} sec-1, 5×

$10^6\ M^{-1}\ sec^{-1}$, $10^7\ M^{-1}\ sec^{-1}$ 또는 $5\times10^7\ M^{-1}\ sec^{-1}$ 보다 크거나 또는 동등한 온 속도(k_{on})로 인플루엔자 A 폴리펩티드 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합한다. 본 발명은 임의의 개별 언급된 값 사이의 범위 내에 온 속도(k_{on})로 인플루엔자 A 폴리펩티드에 결합하는 항체를 포함한다.

[0222] 일 실시양태에서, 결합 어세이는 직접 결합 어세이 또는 경쟁-결합 어세이로 수행될 수 있다. 결합은 표준 ELISA 또는 표준 유세포측정법을 사용해 검출할 수 있다. 직접 결합 어세이에서, 후보 항체는 그의 동족 항원과의 결합에 대해 시험된다. 다른 한편으로, 경쟁-결합 어세이는 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부에 결합하는 기지 항체 또는 다른 화합물과 경쟁하는 후보 항체의 능력을 평가한다. 대체로, 검출할 수 있는 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부와 항체의 결합을 허용하는 임의의 방법은 항체의 결합 특징을 검출하고 측정하기 위한 본 발명의 범주에 포함된다. 당분야의 숙련가는 이들 잘 알려진 방법을 인지하고 있으며 그러한 이유로 본원에서 상세하게 제공하지 않는다. 이들 방법은 또한 목적하는 특징을 제공하는 것에 대한 항체 패널을 스크리닝하는데 이용된다.

[0223] 본 발명의 항체는 인플루엔자 A 바이러스 HA 줄기부에 면역특이적으로 결합하고 인플루엔자 A 바이러스 감염을 중화시킬 수 있다. 중화 어세이는 실시예 섹션에서 본원에 기술된 바와 같이 또는 당분야에 알려진 다른 방법을 사용해 수행할 수 있다. 용어 "억제 농도 50%"(약어로는 "IC_{50}")는 인플루엔자 A 바이러스의 50% 중화를 위해 요구되는 억제제(예를 들어, 본 발명의 항체)의 농도를 의미한다. IC_{50} 값이 낮을수록 보다 강력한 억제제에 상응한다는 것을 당분야의 숙련가는 이해한다.

[0224] 일 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 결합 단편은 50% 억제 농도(IC_{50} μg/mℓ)로 표시되는 중화 역가가 약 0.01 μg/mℓ 내지 약 50 μg/mℓ 범위이거나, 또는 미세중화 어세이에서 인플루엔자 A 바이러스의 중화를 위해 약 0.01 μg/mℓ 내지 약 5 μg/mℓ의 항체 범위이거나, 또는 약 0.01 μg/mℓ 내지 약 0.1 μg/mℓ의 항체 범위이다. 본원에 기술된 미세중화 어세이에서 사용되는 항체의 최고 농도는 50 μg/mℓ이다. 본 발명의 항체의 높은 역가는 낮은 농도의 항체를 사용하여 인플루엔자 A 바이러스의 50% 중화를 획득할 수 있음을 의미한다.

[0225] 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 세포 사멸을 유도할 수 있다. "세포 사멸을 유도하는" 항체는 생존 세포를 비생존이되게하는 것이다. 시험관내 세포 사멸은 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존적 세포독성(CDC)에 의해 유도되는 세포 사멸과 구별하기 위해 보체 및 면역 이펙터 세포의 부재하에서 결정할 수 있다. 따라서, 세포 사멸에 대한 어세이는 열 불활성화 혈청(즉, 보체 부재)을 사용하고 면역 이펙터 세포 부재하에서 수행할 수 있다. 항체가 세포 사멸을 유도하는지 여부를 결정하기 위해서, 프로피디움 요오다이드(PI), 트립판 블루(Moore et al. *Cytotechnology* 17:1-11(1995)), 7AAD 또는 당분야에 공지된 다른 방법의 흡수에 의해 평가되는 막 온전성의 손실을 미처리 세포와 비교하여 평가할 수 있다.

[0226] 특별한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 아폽토시스를 통해 세포 사멸을 유도할 수 있다. "아폽토시스를 유도하는" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 세포질망상의 팽창, 세포 단편화, 및/또는 막 소포체(아폽토시스 바디라고함)의 형성으로 측정되는 프로그램화된 세포 사멸을 유도하는 것이다. 다양한 방법이 아폽토시스와 연관된 세포 사건을 평가하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 포스파티딜 세린(PS) 전이는 아넥신 결합에 의해 측정할 수 있으며; DNA 단편화는 DNA 래더링을 통해 평가할 수 있고; DNA 단편화와 함께 핵/크로마틴 응축은 저이배체 세포의 임의의 증가를 통해 평가할 수 있다. 바람직하게, 아폽토시스를 유도하는 항체는 아넥신 결합 어세이에서 미처리 세포에 비해서 아넥신 결합 유도가 약 2 내지 50배, 바람직하게 약 5 내지 50배, 및 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배가 되게 한다.

[0227] 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체-의존적 세포의 세포독성(ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포-매개 세포독성(CDC) 및/또는 항체 의존적 세포-매개 식세포작용(ADCP)를 통해 세포 사멸을 유도할 수 있다. 인간 IgG1 서브클래스 항체의 ADCC 활성 및 CDC 활성의 발현은 대체로 이펙터 세포 예컨대 킬러 세포, 자연 살해 세포 또는 활성화된 마크로파지의 표면 상에 존재하는 항체에 대한 수용체(이하에서는 "Fcγ R"이라함)에 항체의 Fc 영역의 결합을 포함한다. 다양한 보체 성분이 결합할 수 있다. 결합과 관련하여, 항체의 C 영역의 힌지 영역 및 제2 도메인(이하 "Cγ2 도메인"이라고 함)의 몇몇 아미노산 잔기가 중요(*Eur. J. Immunol.*, 23, 1098(1993), *Immunology*, 86, 319(1995), *Chemical Immunology*, 65, 88(1997))하고 Cγ2 도메인의 당 사슬 역시 중요(*Chemical Immunology*, 65, 88(1997))하다고 제안된 바 있다.

[0228] 관심 항체의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 제5,500,362호에 기술된 바와 같은, 시험관내 ADCC 어세이를 사용할 수 있다. 이 어세이는 또한 시판되는 키트, 예를 들어 CytoTox 96®(Promega)을 사용해 수행할 수

있다. 이러한 어세이에 유용한 이펙터 세포는 제한없이, 말초혈액 단핵 세포(PBMC), 자연 살해(NK) 세포, 및 NK 세포주를 포함한다. 형질전환 Fc 수용체(예를 들어, CD16) 및 회합된 신호전달 폴리펩티드(예를 들어, $FC_{\varepsilon}RI-\gamma$)를 발현하는 NK 세포주가 또한 이펙터 세포로 제공될 수 있다(WO 2006/023148). 예를 들어, 보체 활성화 및/또는 ADCC에 의해 용해를 매개하는 임의의 특정 항체의 능력을 어세이할 수 있다. 관심 세포를 성장시키고 시험관내에서 표지화시키고; 항체를 항원 항체 복합체에 의해 활성화될 수 있는 면역 세포, 즉 ADCC 반응에 관여하는 이펙터 세포와 조합한 세포 배양에 부가한다. 항체는 또한 보체 활성화를 위해 시험될 수 있다. 양쪽 경우에서, 세포용해는 용해된 세포로부터 표지의 방출에 의해 검출된다. 세포 용해 정도는 또한 상등액으로 세포질 단백질(예를 들어, LDH)의 방출을 검출하여 결정할 수 있다. 사실, 항체는 보체 및/또는 면역 세포의 공급원으로서 환자 자신의 혈청을 사용해 스크리닝할 수 있다. 그 이후에, 시험관내 시험에서 인간 ADCC를 매개할 수 있는 항체는 특정한 그 환자에서 치료적으로 사용될 수 있다. 관심 분자의 ADCC 활성은 또한 생체내에서, 예를 들어 동물 모델 예컨대 [Clynes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*(USA) 95:652-656(1998)]에 개시된 모델에서 평가할 수 있다. 또한, 항체의 ADCC, 경우에 따라 CDC 활성 수준을 조정(즉, 증가 또는 감소)시키는 기술이 당분야에 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호; 제6,194,551호; 제7,317,091호). 본 발명의 항체는 ADCC 및/또는 CDC를 유도할 수 있거나 또는 유도할 수 있는 능력을 갖도록 변형될 수 있다. ADCC 기능을 결정하는 어세이는 인간 ADCC 기능을 평가하기 위해 인간 이펙터 세포를 사용해 실시할 수 있다. 이러한 어세이는 또한 괴사 및/또는 아폽토시스 기전에 의한 세포 사멸을 유도, 매개, 증가, 차단하는 항체를 스크리닝하고자 하는 것들을 포함한다. 생존 염료를 이용하는 어세이, 검출 방법, 캐스파아제 분석, 및 DNA 파괴 측정 어세이를 포함한 이러한 방법들은 관심 항체를 사용해 시험관내에서 배양한 세포의 아폽토시스 활성을 평가하는데 사용될 수 있다.

[0229] **항체의 생산**

[0230] 다음으로는 본 발명에서 유용한 항체의 생산을 위한 예시적인 기술을 설명한다.

[0231] **단일클론 항체**

[0232] 단일클론 항체는 하이브리도마(Kohler et al., *Nature,* 256:495(1975); Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier, N.Y., 1981)), 재조합, 및 파지 디스플레이 기술, 또는 이들의 조합의 사용을 포함한 당분야에 공지된 광범위한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 본원에서 사용하는 용어 "단일클론 항체"는 실질적으로 균질하거나 또는 단리된 항체의 개체군에서 얻은 항체 또는 단리된 항체를 의미하고, 예를 들어, 그러한 개체군을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수도 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 단일클론 항체는 단일 항원성 부위에 대해서, 고도로 특이적이다. 또한, 상이한 결정부(에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체 조제물과 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 동일 결정부에 대해 유도된다. 그들의 특이성이외에도, 단일클론 항체는 다른 항체에 의해 오염되지 않고 합성된다는 점에서 유리하다. 수식어 "단일클론"은 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 이해하지 않는다. 제한하려는 의도없이 예를 들어, 단일클론 포유동물, 키메라, 인간화, 인간, 도메인, 디아바디, 백시바디, 선형 및 다중특이적 항체를 생성하는데 사용할 수 있는 단일클론 항체를 생산하는 대표적인 방법을 이하에 기술한다.

[0233] **하이브리도마 기술**

[0234] 하이브리도마 기술을 사용하는 특이적 항체에 대한 생산 및 스크리닝 방법은 일상적이며 당분야에서 잘 알려져 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터는 면역화에 사용된 항원에 특이적으로 결합하게되는 항체를 생산하거나 또는 생산할 수 있는 림프구를 유도하도록 상기 기술된 바와 같이 면역화된다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 면역화 이후에, 림프구를 단리하고 이어서 적합한 융합제 또는 융합 파트너, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용해 골수종 세포와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성시킨다(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103(Academic Press, 1986)). 일정 실시양태에서, 선택된 골수종 세포는 효과적으로 융합하고, 선택된 항체 생성 세포에 의해 항체의 안정한 고수준 생성을 지지하며, 미융합 부모 세포에 대해 선택된 선별 배지에 민감한 것들이다. 일 측면에서, 골수종 세포주는 쥣과동물(murine) 골수종 세포주, 예컨대 Salk Institute Cell Distribution Center(San Diego, Calif. USA)에서 입수할 수 있는 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양에서 유래된 것들, 및 American Type Culture Collection(Rockville, Md. USA)에서 입수할 수 있는 SP-2 및 유도체, 예를 들어 X63-Ag8-653 세포 등이 있다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 또한 인간 단일클론 항체의 생성을 위해 설명되었다

(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001(1984); 및 Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0235] 바람직한 특이성, 친화성, 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마가 동정되면, 그 클론은 제한 희석 과정에 의해 서브클로닝하고 표준 방법에 의해 성장시킨다(Goding, 상동). 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 예를 들어 마우스에 세포의 i.p. 주사에 의해 동물의 복수 종양으로서 생체내에서 성장될 수도 있다.

[0236] 서브클론에서 분비되는 단일클론 항체는 통상적인 항체 정제 과정 예컨대 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G-세파로스 사용) 또는 이온-교환 크로마토그래피, 친화성 태그, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 등에 의해 배양 배지, 복수액, 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다. 예시적인 정제 방법은 이하에 보다 상세하게 설명한다.

[0237] **재조합 DNA 기술**

[0238] 재조합 DNA 기술을 사용하여 특이적인 항체를 생산 및 스크리닝하는 방법은 당분야에서 일상적이고 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호). 단일클론 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 쉽게 단리 및/또는 서열분석될 수 있다(예를 들어, 쥣과동물 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여). 단리되면, DNA는 발현 벡터로 옮겨지고, 이어서 숙주 세포 예컨대 이.콜라이 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 항체 단백질을 생성하지 않는 골수종 세포로 전달하여, 재조합 숙주 세포에서 단일클론 항체를 합성한다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 리뷰 논문은 [Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262(1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188(1992)]를 포함한다. 파지 디스플레이 및 항체의 인간화에 의해 생성된 항체에 대해 이하에 기술하는 바와 같이, 재조합 항체에 대한 DNA 또는 유전 물질은 본 발명의 항체를 생성하기 위한 하이브리도마 이외에 공급원(들)에서 얻을 수 있다.

[0239] 항체 또는 이의 변이체의 재조합 발현은 대체로 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터의 제작을 필요로한다. 따라서, 본 발명은 프로모터에 작동적으로 연결된, 항체 분자, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 또는 이의 일부분, 또는 중쇄 또는 경쇄 CDR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 항체 분자의 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고(예를 들어, 미국 특허 제5,981,216호; 제5,591,639호; 제5,658,759호 및 제5,122,464호), 항체의 가변 도메인은 전체 중쇄, 전체 경쇄, 또는 전체 중쇄와 경쇄 둘 모두의 발현을 위한 벡터에 클로닝될 수도 있다.

[0240] 발현 벡터가 통상적인 기술에 의해 숙주 세포로 전달되면, 형질감염된 세포를 이어서 통상의 기술로 배양하여 항체를 생성시킨다. 따라서, 본 발명은 이종성 프로모터에 작동적으로 연결된, 본 발명의 항체 또는 이의 단편, 또는 이의 중쇄 또는 경쇄, 또는 이의 일부분, 또는 본 발명의 단쇄 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 숙주 세포를 포함한다. 이중 사슬 항체의 발현을 위한 일정 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 둘 모두를 코딩하는 벡터는 이하에 상세히 설명하는 바와 같이, 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위해 숙주 세포에서 공동발현된다.

[0241] 재조합 항체의 발현을 위한 숙주로 이용가능한 포유동물 세포주는 당분야에 잘 알려져 있고 제한없이 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포, 어린 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포 암종 세포(예를 들어, Hep G2), 인간 상피 신장 293 세포, 및 수많은 다른 세포주를 포함하여 American Type Culture Collection(ATCC)에서 입수할 수 있는 많은 불멸화 세포주를 포함한다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역후 처리 및 변형에 대한 특징 및 특이적인 기전을 갖는다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현되는 항체 또는 이의 일부의 올바른 변형 및 처리를 보장하도록 선택할 수 있다. 이러한 목적을 위해서, 유전자 생성물의 1차 전사체의 적절한 처리, 당화 및 인산화를 위한 세포내 기전을 보유하는 진핵생물 숙주 세포를 사용할 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포는 제한없이, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NSO(내생적으로 임의의 기능적 면역글로불린 사슬을 생성하지 않는 쥣과동물 골수종 세포주), SP20, CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 포함한다. 불멸화 인간 림프구에 의해 발생된 인간 세포주는 단일클론 항체를 재조합적으로 생성하는데 사용될 수 있다. 인간 세포주 PER.C6.(Crucell, 네델란드)를 사용해 단일클론 항체를 재조합적으로 생성시킬 수 있다.

[0242] 재조합 항체의 발현을 위한 숙주로서 사용할 수 있는 추가적인 세포주는 제한없이, 곤충 세포(예를 들어,

Sf21/Sf9, 트리코플러시아 니(*Trichoplusia ni*) Bti-Tn5b1-4) 또는 효모 세포(예를 들어, 에스. 세레비지아(*S. cerevisiae*), 피키아(*Pichia*), US7326681; 등), 식물 세포(US20080066200); 및 닭 세포(WO2008142124)를 포함한다.

[0243] 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체를 안정하게 발현하는 세포주에서 발현된다. 안정한 발현은 재조합 단백질의 장기간, 고수율 생성을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자를 안정하게 발현하는 세포주를 생성시켜도 된다. 숙주 세포를 발현 제어 성분(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 전사 종결부, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선별 마커 유전자를 포함하는 적절하게 조작된 벡터로 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA의 도입 이후에, 세포를 풍부 배지에서 1-2일동안 배양되게 한 후, 선별 배지로 교체시킨다. 재조합 플라스미드의 선별 마커는 선별에 대한 저항성을 부여하고, 플라스미드를 그들의 염색체에 안정하게 통합시킨 세포가 성장되어서 군집을 형성하고 이어 클론이되어 세포주로 팽창되도록 한다. 고수율의 안정한 세포주를 생성하는 방법은 당분야에 공지되어 있고 일반적으로 시약은 시판된다.

[0244] 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체를 일시적으로 발현하는 세포주에서 발현된다. 일시적 형질감염은 세포로 도입된 핵산이 세포의 게놈 또는 염색체 DNA에 통합되지 않는 과정이다. 실제로 세포에서 염색체외 성분, 예를 들어 에피솜으로 유지된다. 에피솜의 핵산의 전사 과정은 영향받지 않고 에피솜의 핵산에 의해 코딩되는 단백질이 생성된다.

[0245] 안정하게 또는 일시적으로 형질감염된 세포주는 단일클론 항체의 발현 및 생성을 일으키는 당분야에 공지된 세포 배양 배지 및 조건에서 유지된다. 일정 실시양태에서, 포유동물 세포 배양 배지는 예를 들어, DMEM 또는 Ham's F12를 포함하는 시판되는 배지 제제를 기초로 한다. 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지는 세포 성장 및 생물학적 단백질 발현 둘 모두의 증가를 뒷받침하도록 변형된다. 본원에서 사용되는 용어 "세포 배양 배지", "배양 배지" 및 "배지 제제"는 다세포 유기체 또는 조직 외부의 인공적인 시험관내 환경에서 세포의 유지, 성장, 전파 또는 확장을 위한 영양성 용액을 의미한다. 세포 배양 배지는 예를 들어 세포 성장을 촉진하도록 제제화된 세포 배양 성장 배지, 또는 재조합 단백질 생성을 촉진하도록 제제화된 세포 배양 생산 배지를 포함하여, 특별한 세포 배양 용도에 대해 최적화될 수 있다. 용어 영양분, 재료, 및 구성요소는 세포 배양 배지를 구성하는 성분들을 의미하고자 상호교환적으로 사용된다.

[0246] 일 실시양태에서, 세포주는 유가 방법(fed batch)을 사용해 유지된다. 본원에서 사용되는 "유가 방법"은 기본 배지로 처음 항온반응한 후 추가의 영양분이 유가 세포 배양에 공급되는 방법을 의미한다. 예를 들어, 유가 방법은 소정 기간 내에 정해진 공급 스케쥴에 따라 보충 배지를 부가하는 것을 포함한다. 따라서, "유가 세포 배양"은 세포, 전형적으로 포유동물 세포, 및 배양 배지가 초기에 배양 용기에 공급되고 부가의 배양 영양분이 연속적으로, 또는 개별 증분으로, 배양 종료전 주기적인 세포 및/또는 생성물 회수와 함께 또는 없이, 배양 동안 배양물에 공급되는 세포 배양을 의미한다.

[0247] 사용된 세포 배양 배지 및 그에 함유된 영양분은 당분야의 숙련가에게 공지이다. 일 실시양태에서, 세포 배양 배지는 기본 배지 및 1 이상의 가수분해물, 예를 들어, 대두 기반 가수분해물, 효모 기반 가수분해물, 또는 변형 기본 배지를 만드는 2가지 유형의 가수분해물의 조합물을 포함한다. 다른 실시양태에서, 추가의 영양분은 오직 기본 배지, 예컨대 농축 기본 배지를 포함하거나, 또는 오직 가수분해물, 또는 농축 가수분해물을 포함한다. 적합한 기본 배지는 제한없이, 둘베코의 변형 이글 배지(DMEM), DME/F12, 최소 필수 배지(MEM), 기본 배지 이글(BME), RPMI 1640, F-10, F-12, α-최소 필수 배지(α-MEM), 글래스고 최소 필수 배지(G-MEM), PF CHO(예를 들어, CHO 단백질 무함유 배지(Sigma) 또는 단백질 무함유 CHO 세포 용 EX-CELL™ 325 PF CHO 혈청 무함유 배지(SAFC Bioscience)), 및 이스코브 변형 둘베코 배지를 포함한다. 본 발명에서 사용할 수 있는 기본 배지의 다른 예에는 BME 기본 배지(Gibco-Invitrogen; [Eagle, H(1965) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 36] 참조); 둘베코 변형 이글 배지(DMEM, 분말)(Gibco-Invitrogen(# 31600); [Dulbecco and Freeman(1959) Virology 8, 396; Smith et al.(1960) Virology 12, 185. Tissue Culture Standards Committee, In Vitro 6:2, 93] 참조); CMRL 1066 배지(Gibco-Invitrogen(#11530); [Parker R. C. et al(1957) Special Publications, N.Y. Academy of Sciences, 5, 303] 참조)를 포함한다.

[0248] 기본 배지는 배지가 혈청(예를 들어, 태아 소 혈청(FBS), 말 혈청, 염소 혈청, 또는 당분야의 숙련가에게 알려진 임의의 다른 동물 유래 혈청)을 함유하지 않음을 의미하는, 혈청 무함유이거나, 또는 동물 단백질 무함유 배지 또는 화학적 제한 배지일 수 있다.

[0249] 기본 배지는 표준 기본 배지에서 발견되는 일정한 비영양성 성분, 예컨대 다양한 무기 및 유기 완충액, 계면활성제(들), 및 염화나트륨을 제거하기 위해 변형될 수 있다. 이러한 성분을 기본 세포 배지로부터 제거하는 것은

나머지 영양 성분의 농도를 증가시킬 수 있게 하고, 전체적인 세포 성장 및 단백질 발현을 개선시킬 수 있다. 또한, 생략된 성분은 세포 배양 조건의 요건에 따라서 변형된 기본 세포 배지를 함유하는 세포 배양 배지에 다시 부가할 수 있다. 일정 실시양태에서, 세포 배양 배지는 변형된 기본 세포 배지를 함유하고, 다음 영양분, 철 공급원, 재조합 성장 인자; 완충액; 계면활성제; 삼투압 조절제; 에너지원; 및 비동물성 가수분해물 중 적어도 하나를 함유한다. 또한, 변형된 기본 세포 배지는 선택적으로 아미노산, 비타민, 또는 아미노산과 비타민 둘 모두의 조합을 함유할 수 있다. 다른 실시양태에서, 변형된 기본 배지는 글루타민, 예를 들어, L-글루타민, 및/또는 메토트렉세이트를 더 함유한다.

[0250] 항체 생성은 당분야에 공지된 유가, 뱃치, 관류 또는 연속 공급 생물반응기를 사용하는 생물반응기 과정에 의해 대량으로 수행할 수 있다. 대규모 생물반응기는 용량이 적어도 1000 리터, 바람직하게는 용량이 약 1,000 내지 100,000 리터이다. 이들 생물반응기는 산소 및 영양분을 분배하기 위해서 교반기 임펠러를 사용할 수 있다. 소규모 생물반응기는 대체로 부피 용량이 대략 100 리터를 넘지 않는 세포 배양을 의미하고, 범위가 약 1 리터 내지 약 100 리터이다. 대안적으로, 1회 사용 생물반응기(SUB)가 대규모 또는 소규모 배양에 사용될 수 있다.

[0251] 온도, pH, 교반, 통기 및 접종 농도는 사용되는 숙주 세포 및 발현되는 재조합 단백질에 따라서 다양하다. 예를 들면, 재조합 단백질 세포 배양은 30 내지 45℃의 온도에서 유지될 수 있다. 배양 배지의 pH는 6.0 내지 8.0 pH 범위 내에, 일정 숙주 세포에 대해서, 최적 수준으로 그 pH를 유지하도록 배양 과정 동안 모니터링될 수 있다. 임펠러 구동 혼합을 교반을 위한 이러한 배양 방법에 대해 사용할 수 있다. 임펠러의 회전 속도는 대략 50 내지 200 cm/sec 팁 속도이지만, 배양하는 숙주 세포의 유형에 따라서, 당분야에 공지된 다른 에어리프트 또는 다른 혼합/통기 시스템을 사용할 수 있다. 다시 배양되는 선택된 숙주 세포에 따라서, 배양 중 대략 20% 내지 80% 공기 포화도의 용존 산소 농도를 유지하도록 충분한 통기가 제공된다. 대안적으로, 생물 반응기는 배양 배지에 공기 또는 산소를 직접 살포한다. 중공 섬유 막 에어레이터를 적용하는 기포 무함유 통기 시스템을 포함한, 다른 산소 공급 방법이 존재한다.

[0252] **파지 디스플레이 기술**

[0253] 단일클론 항체 또는 항체 단편은 [McCafferty *et al.*, *Nature,* 348:552-554(1990). Clackson *et al.*, *Nature,* 352:624-628(1991) 및 Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.,* 222:581-597(1991)]에 기술된 기술을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 이러한 방법에서 항체는 인간 림프구로부터 유래된 mRNA로부터 제조한 인간 VL 및 VH cDNA를 사용해 제조된, 재조합 조합성 항체 라이브러리, 바람직하게는 scFv 파지 디스플레이 라이브러리의 스크리닝에 의해 단리될 수 있다. 이러한 라이브러리를 제조 및 스크리닝하는 방법론은 당분야에 공지되어 있다. 파지디스플레이 라이브러리를 생성시키는 시판되는 키트(예를 들어, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; 및 the Stratagene SurfZAP™ phage display kit, catalog no. 240612)이외에도, 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는데 사용하기 위해 특히 다루기 쉬운 방법 및 시약의 예는 예를 들어, 미국 특허 제6,248,516호; 미국 특허 제6,545,142호; 제6,291,158호; 제6,291,159호; 제6,291,160호; 제6,291,161호; 제6,680,192호; 제5,969,108호; 제6,172,197호; 제6,806,079호; 제5,885,793호; 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,593,081호; 제6,582,915호; 제7,195,866호에서 확인할 수 있다. 따라서, 이들 기술은 단일클론 항체의 생성 및 단리를 위한 전통적인 단일클론 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안법이다.

[0254] 파지 디스플레이 방법에서, 기능적 항체 도메인은 그들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 보유하는 파지 입자의 표면 상에 전시된다. 특정 실시양태에서, 이러한 파지는 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들어, 인간 또는 쥣과동물)로부터 발현되는 항원-결합 도메인을 전시하는데 사용될 수 있다. 관심 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는 항원, 예를 들어 표지된 항원 또는 고체 표면이나 비드에 결합되거나 포획된 항원을 사용하여 선별 또는 동정할 수 있다. 이들 방법에서 사용하는 파지는 전형적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 재조합적으로 융합된 Fab, Fv 또는 이황화 안정화된 Fv 항체 도메인과 함께 파지로부터 발현된 fd 및 M13 결합 도메인을 포함하는 섬유상 파지이다.

[0255] 상기 참조문헌에 기술된 바와 같이, 파지 선별 이후, 파지로부터 항체 코딩 영역을 단리하고 인간 항체, 인간화 항체, 또는 임의의 다른 바람직한 항원 결합 단편을 생성시키는데 사용하며, 예를 들어 이하 상세하게 기술하는 바와 같이, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 박테리아를 포함하는 임의의 바람직한 숙주에서 발현시킨다. 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')2 단편을 재조합적으로 생성시키는 기술은 또한 예컨대 PCT 공개 WO 92/22324; [Mullinax *et al.*, BioTechniques 12(6):864-869(1992)]; 및 [Better *et al.*, Science 240:1041-1043(1988)]에 개시된 바와 같은 당분야에 공지된 방법을 사용하여 적용한다.

[0256] 단쇄 Fv 및 항체를 생성하는데 사용할 수 있는 기술의 예에는 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,258,498호에 기술된 것들을 포함한다. 따라서, 상기 기술된 기술 및 당분야에 공지된 것들을 사용하여 그 결합 도메인, 예를 들어 scFv를 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리시킨 재조합 항체를 생성시킬 수 있다.

[0257] **항체 정제 및 단리**

[0258] 항체 분자가 재조합 또는 하이브리도마 발현에 의해 생성되면, 면역글로불린 분자의 정제에 대해 당분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화성, 특히 특이적 항원 단백질 A 또는 단백질 G에 대한 친화성, 및 크기배제 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 가용성, 또는 단백질 정제에 대한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 정제를 용이하게 하기 위해서 이종성 폴리펩티드 서열(본원에서 "태그"라고 함)에 융합될 수 있다.

[0259] 재조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포내, 원형질 공간 내에서 생성하거나 또는 직접 배지로 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생성되면, 제1 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편의 미립자 찌거기를 예를 들어 원심분리 또는 한외여과를 통해 제거한다. [Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10:163-167(1992)]는 이.콜라이의 원형질 공간으로 분비되는 항체를 단리하는 과정을 기술한다. 항체가 배지로 분비되면, 그러한 발현 시스템으로부터의 상등액은 대체로 먼저 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘 또는 밀리포어 펠리콘 한외여과 유닛을 사용해 농축된다. 프로테아제 억제제 예컨대 PMSF는 단백질가수분해를 억제하기 위해 임의의 선행 단계에서 포함될 수 있고 항생제는 우연한 오염물 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

[0260] 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들어, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및/또는 친화성 크로마토그래피를 단독으로 또는 다른 정제 단계와 조합하여 사용하여 정제될 수 있다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소타입에 의존적이고 당분야의 숙련가에 의해 이해될 것이다. 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 물리적으로 안정한 매트릭스 예컨대 제어된 포어 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 획득할 수 있는 것보다 빠른 유속 및 짧은 처리 시간을 가능케한다. 항체가 CH_3 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX 수지(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술 예컨대 이온-교환 컬럼 상에서 분획화, 에탄올 침전법, 역상 HPLC, 실리카 상에서 크로마토그래피, 헤파린 상에서 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 상(예컨대 폴리아스파르트산 컬럼)에서 SEPHAROSE 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 암모늄 설페이트 침전법 등이 회수하려는 항체에 따라 이용가능하다.

[0261] 임의의 사전 정제 단계(들) 이후, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 약 2.5 내지 4.5의 pH에서 용리 완충액을 사용한 저 pH 소수성 상호작용을 겪을 수 있고 저염 농도(예를 들어, 약 0 내지 0.25 M 염)에서 수행될 수 있다.

[0262] 따라서, 일정 실시양태에서는 실질적으로 정제/단리된 본 발명의 항체를 제공한다. 일 실시양태에서, 이들 단리/정제된 재조합 발현 항체는 예방적 또는 치료적 효과를 매개하기 위해 환자에 투여될 수 있다. 예방적은 질환, 질병 또는 감염이 일어나는 것을 방지하도록 디자인되고 사용되는 약물 또는 치료이다. 치료제는 특정 질환, 질병 또는 감염의 치료에서 특히 고려된다. 치료 용량은 특정 질환, 질병 또는 감염을 치료하는데 필요한 양이다. 다른 실시양태에서, 이들 단리/정제된 항체는 인플루엔자 A 바이러스 감염을 진단하는데 사용될 수 있다.

[0263] **인간 항체**

[0264] 인간 항체는 당분야에 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 인간 항체는 마우스 또는 래트 가변 및/또는 불변 영역을 보유하는 항체와 연관된 일부 문제들을 피한다. 이러한 마우스 또는 래트 유래 단백질의 존재는 항체의 신속한 제거를 초래할 수 있거나 또는 환자에 의해 항체에 대한 면역 반응의 생성을 초래할 수 있다.

[0265] 인간 항체는 시험관내 방법에 의해 유도시킬 수 있다. 적합한 예에는 제한없이, 파지 디스플레이(MedImmune(이전에 CAT), Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion(formerly Proliferon), Affimed) 리보솜 디스플레이(MedImmune(이전에 CAT)), 효모 디스플레이 등을 포함한다. 파지 디스플레이 기술(예를 들어, 미국 특허 제5,969,108호)은 비면역화 도너로부터의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터, 시험관내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생성시키는데 사용될 수 있다. 이 기술에 따라서, 항체 V 도메인 유전자는 섬유상 박테리아 파지, 예컨대 M13 또는 fd의 주요 또는 소수 코트 단백질 유전자에 인프레임으로 클로닝되어서 파지 입자의 표면 상에 기능적 항체 단편으로서 전시된다. 섬유상 입자는 파지 게놈의 단일 가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성을 기초로 하는 선별은 역시 이들 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자

를 선별하는 결과를 가져온다. 따라서, 파지는 B-세포의 일부 특성을 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 형식으로 수행되며, 예를 들어, [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571(1993)]를 참조한다. V-유전자 절편의 몇몇 공급원을 파지 디스플레이를 위해 사용할 수 있다. [Clackson et al., *Nature,* 352:624-628(1991)]은 면역화된 마우스의 비장에서 유래된 V 유전자의 소규모 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 비면역화된 인간 도너 유래의 V 유전자 레퍼터리를 제작하였고 항원(자가 항원 포함)의 다양한 어레이에 대한 항체는 [Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991)], 또는 [Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734(1993)]에 의해 기술된 기술에 따라 실질적으로 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호를 참조한다.

[0266] 상기 기술된 바와 같이, 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성시켜도 된다(미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조함).

[0267] 면역글로불린 유전자는 V, D 및 J 유전자 절편 간 재결합, 이소타입 스위칭, 및 가변 영역 내 초돌연변이를 포함한, 면역 반응의 성숙화 동안 다양한 변형을 겪는다. 재결합 및 체세포 초돌연변이는 항체 다양성 및 친화성 성숙화의 생성을 위한 토대이지만, 또한 치료제로서 이러한 면역글로불린의 상업적 생산을 어렵게 만들거나 또는 항체의 면역원성 위험성을 증가시킬 수 있는 서열 부담을 일으킬 수 있다. 대체로, CDR 영역 내 돌연변이는 개선된 친화성 및 기능에 기여하는 듯 하지만, 프레임워크 영역 내 돌연변이는 면역원성의 위험성을 증가시킬 수 있다. 이러한 위험성은 항체의 활성이 부정적으로 영향받지 않도록 보장하면서 배선에 대한 프레임워크 돌연변이를 역전시켜 감소시킬 수 있다. 다양화 과정은 일부 구조적 부담을 일으킬 수 있거나 또한 이들 구조적 부담은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 기여하는 배선 서열 내에 존재할 수도 있다. 공급원과 무관하게, 불안정성, 응집, 생성물의 불균질성, 또는 높은 면역원성을 초래할 수 있는 가능한 구조적 부담을 제거하는 것이 바람직하다. 바람직하지 않은 부담의 예에는 짝없는 시스테인(이황화 결합 스크램블링, 또는 가변성 설프히드릴 부가물 형성을 초래할 수 있음), N-연결된 당화 부위(구조 및 활성의 불균질성을 초래)를 비롯하여, 탈아미드화(예를 들어, NG, NS), 이성질체화(DG), 산화(노출된 메티오닌), 및 가수분해(DP) 부위를 포함한다.

[0268] 따라서, 면역원성의 위험성을 감소시키고 약학적 특성을 개선시키기 위해서, 프레임워크 서열을 배선으로 역전시키고/시키거나, CDR을 배선으로 역전시키고/시키거나, 구조적 부담을 제거하는 것이 바람직할 수 있다.

[0269] 따라서, 일 실시양태에서, 특정 항체가 아미노산 수준에서 그의 개별 배선 서열과 상이한 경우, 항체 서열은 배선 서열로 역 돌연변이될 수 있다. 이러한 교정 돌연변이는 표준 분자 생물학적 기술을 사용하여, 1, 2, 3 또는 그 이상의 위치, 또는 임의의 돌연변이된 위치의 조합에서 일어날 수 있다.

[0270] **항체 단편**

[0271] 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체 단편 또는 이들 단편을 포함하는 항체이다. 항체 단편은 대체로 항원 결합 또는 이의 가변 영역인, 전체 길이 항체의 일부분을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd 및 Fv 단편을 포함한다. 디아바디: 선형 항체(미국 특허 제5,641,870호) 및 단쇄 항체 분자.

[0272] 전형적으로, 이들 단편은 당분야에 공지된 기술을 사용하여 온전한 항체의 단백질가수분해적(proteolytic) 분해를 통해 유도되었다. 그러나, 이들 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 scFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되고 그로부터 분비되어서, 이들 단편을 대량으로 손쉽게 생산할 수 있다. 일 실시양태에서, 항체 단편은 상기 기술된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 또한 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다(Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10:163-167(1992)). 다른 접근법에 따라서, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리할 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 당분야의 숙련가에게 자명하다. 다른 실시양태에서, 항체 선택은 단쇄 Fv 단편(scFv)이다. 일정 실시양태에서, 항체는 Fab 단편이 아니다. Fv 및 scFv는 불변 영역이 없는 온전한 결합 부위를 갖는 유일한 종이므로, 생체내 사용 동안 낮은 비특이적 결합에 적합하다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에서 이펙터 단백질의 융합을 일으키도록 제작될 수 있다.

[0273] 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 도메인 항체, 예를 들어 인간 항체의 중쇄(VH) 또는 경쇄(VL)의 가변 영역에 상응하는, 항체의 소형 기능적 결합 유닛을 함유하는 항체이다. 도메인 항체의 예에는 제한없이, Domantis(예를 들어, WO04/058821; WO04/081026; WO04/003019; WO03/002609; 미국 특허 제6,291,158호; 제6,582,915호; 제6,696,245호; 및 제6,593,081호)의 것들이 포함된다.

[0274] 본 발명의 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 선형 항체이다. 선형 항체는 항원-결합 영역의 쌍을 형성하는 직렬 Fd 절편(VH-CH1-VH-CH1)의 쌍을 포함한다. 예를 들어, [Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062(1995)]을 참조한다.

[0275] **다른 아미노산 서열 변형**

[0276] 상기 기술된 인간, 인간화 및/또는 키메라 항체이외에도, 본 발명은 또한 가변 경쇄(VL) 도메인 및/또는 가변 중쇄(VH) 도메인 및/또는 Fc 영역에 1 이상의 아미노산 잔기 및/또는 폴리펩티드 치환, 부가 및/또는 결실 및 번역후 변형을 포함하는 본 발명의 항체의 추가 변형, 및 그들의 변이체 및 이의 단편을 포함한다. 이러한 변형에는 항체 접합체가 포함되며 여기서 항체는 모이어티에 공유적으로 부착된다. 항체에 부착하기 적합한 모이어티는 제한없이, 단백질, 펩티드, 약물, 표지 및 세포독소를 포함한다. 항체에 대한 이들 변화는 인플루엔자 A의 치료 및/또는 진단에 적합하도록 항체의 (생화학적, 결합 및/또는 기능적)특징을 변경하거나 또는 미세하게 조율할 수 있다. 접합체를 형성시키는 방법, 아미노산 및/또는 폴리펩티드 변화 및 번역후 변형 방법은 당분야에 공지되어 있고, 그중 일부를 이하에 상세하게 설명한다.

[0277] 항체에 대한 아미노산 변화는 필수적으로 상기 동정된 항체 서열 또는 부모 항체 서열과 100% 미만으로 동일한 서열을 야기한다. 일정 실시양태에서, 본 명세서에서, 많은 항체는 본원에 기술된 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열에 대해 약 25% 내지 약 95% 서열 동일성을 갖는다. 따라서, 일 실시양태에서 변형된 항체는 본원에 기술된 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과 적어도 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, 변경된 항체는 본원에 기술된 항체의 중쇄 또는 경쇄 CDR1, CDR2, 또는 CDR3의 아미노산 서열과 적어도 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, 변경된 항체는 본원에 기술된 항체의 중쇄 또는 경쇄 FR1, FR2, FR3 또는 FR4의 아미노산 서열과 적어도 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0278] 일정 실시양태에서, 변경된 항체는 항체의 가변 영역 중 1 이상에 도입된 1 이상의 아미노산 변경(예를 들어, 치환, 결실 및/또는 부가)에 의해 생성된다. 다른 실시양태에서, 아미노산 변경은 프레임워크 영역에 도입된다. 프레임워크 영역 잔기의 1 이상의 변경은 항원에 대한 항체의 결합 친화성의 개선을 일으킬 수 있다. 이러한 결과는 프레임워크 영역이 CDR 영역과 상이한 종에서 유래된 인간화 항체에 이들 변화를 만들 경우 특히 진실이다. 변형되는 프레임워크 영역 잔기의 예는 비공유적으로 직접 항원에 결합하는 것들(Amit *et al.*, *Science*, 233:747-753(1986)); CDR의 입체형태와 상호작용/입체형태에 영향을 미치는 것들(Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917(1987)); 및/또는 VL-VH 경계면에 참여하는 것들(미국 특허 제5,225,539호 및 제6,548,640호)을 포함한다. 일 실시양태에서, 약 1 내지 약 5 프레임워크 잔기가 변경될 수 있다. 때때로, 이들은 초가변 영역 잔기 중 어떠한 것도 변경되지 않은 경우에도, 전임상 실험에서 사용하기 적합한 항체 돌연변이를 산출하기에 충분할 수 있다. 그러나, 정상적으로, 변경된 항체는 추가적인 초가변 영역 변경(들)을 포함하게 된다.

[0279] 변경된 항체를 생성하는데 유용한 한가지 과정은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발법"이라고 한다(Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085(1989)). 이 방법에서, 초가변 영역 잔기(들) 중 1 이상은 표적 항원과 그 아미노산의 상호작용을 변경시키기 위해 알라닌 또는 폴리알라닌 잔기(들)로 치환된다. 치환에 대한 기능적 감응성을 보여주는 초가변 영역 잔기(들)은 이후 치환 부위에 또는 그에 대해 추가 또는 다른 돌연변이를 도입하여 개량된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위를 사전에 결정하지만, 돌연변이의 성질 자체는 사전에 결정할 필요는 없다. 이러한 방식으로 생성된 Ala-돌연변이체는 본원에 기술된 바와 같이 그들의 생물학적 활성에 대해 스크리닝된다.

[0280] 일정 실시양태에서, 치환 변이체는 부모 항체(예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1 이상의 초가변 영역 잔기를 치환시키는 것을 포함한다. 대체로, 추가 개발을 위해 선택된 최종 변이체(들)는 그들이 생성된 부모 항체에 비해 생물학적 특성이 개선된다. 이러한 치환 변이체를 생성시키는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화성 성숙화를 포함한다([Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 254:889-896(1992)] 및 [Lowman *et al.*, *Biochemistry*, 30(45):10832-10837(1991)]). 간략하게, 몇몇 초가변 영역 부위(예를 들어, 6-7 부위)는 각 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환을 생성하도록 돌연변이된다. 이렇게 생성된 항체 돌연변이체는 각 입자 내에 포장된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 섬유상 파지 입자로부터 1가 방식으로 전시된다. 파지 전시

된 돌연변이체를 이어서 본원에 개시된 대로 그들의 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다.

[0281] 항체 서열의 돌연변이는 치환, 내부 결실을 포함한, 결실, 융합 단백질을 산출하는 부가를 포함하는, 부가, 또는 "침묵" 변화를 일으키는, 즉 그 변화가 기능적으로 균등한 항체를 생성하는, 아미노산 서열 내 및/또는 그에 인접한 아미노산 잔기의 보존성 치환을 포함한다. 보존성 아미노산 치환은 관여되는 잔기의 극성, 전하, 가용성, 소수성, 친수성, 및/또는 양쪽성 성질의 유사성을 기초로 이루어질 수 있다. 예를 들면, 비극성(소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 및 메티오닌을 포함하고; 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 및 글루타민을 포함하며; 양전하(염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 히스티딘을 포함하고; 음전하(산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 글리신 및 프롤린은 사슬 방향에 영향을 미칠 수 있는 잔기이다. 비보존성 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류의 구성원으로 교환하는 것을 수반한다. 또한, 바람직하다면, 비고전적인 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체가 항체 서열에 치환으로 또는 부가로 도입될 수 있다. 비고전적인 아미노산은 제한없이, 대체로 일반 아미노산의 D-이성질체, α-아미노 이소부티르산, 4-아미노부티르산, Abu, 2-아미노 부티르산, γ-Abu, ε-Ahx, 6-아미노 헥산산, Aib, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르류신, 노르발린, 히드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 시스트산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 시클로헥실알라닌, β-알라닌, 플루오로아미노산, 디자이너 아미노산 예컨대 β-메틸 아미노산, Cα-메틸 아미노산, Nα-메틸 아미노산, 및 아미노산 유사체를 포함한다.

[0282] 다른 실시양태에서, 항체의 적절한 입체형태에 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기도 역시 분자의 산화적 안정성을 개선시키고 비정상적인 가교를 방지하기 위해서, 일반적으로 세린으로 치환될 수도 있다. 반대로, 세린 결합(들)을 항체에 부가하여 그 안정성을 개선시킬 수도 있다(특히 항체가 항체 단편 예컨대 Fv 단편인 경우).

[0283] **변이체 Fc 영역**

[0284] Fc 영역의 변이체(예를 들면, 아미노산 치환 및/또는 부가 및/또는 결실)는 항체의 이펙터 기능을 증강시키거나 또는 감소시키고(예를 들면, 미국 특허 제5,624,821호; 제5,885,573호; 제6,538,124호; 제7,317,091호; 제5,648,260호; 제6,538,124호; WO 03/074679; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 99/58572; US 공개 특허 출원 제2006/0134105호; 제2004/0132101호; 제2006/0008883호 참조), 항체의 약동학적 특성(예를 들어, 반감기)을 변경(예를 들면, 미국 특허 제6,277,375호 및 제7,083,784호)시킬 수 있다고 알려져 있다. 따라서, 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체의 기능 및/또는 약동학적 특성을 변화시키기 위해서 Fc 영역에 1 이상의 변경을 일으킨 변경된 Fc 영역(본원에서 또한 "변이체 Fc 영역"이라함)을 포함한다. 이러한 변경은 Clq 결합 및 보체 의존적 세포독성(CDC) 또는 IgG에 대한 FcγR 결합, 및 항체-의존적 세포의 세포독성(ADCC), 또는 항체 의존적 세포-매개 식세포작용(ADCP)의 증가 또는 감소를 야기한다. 본 발명은 변이체 Fc 영역을 갖는 본원에 기술된 항체를 포함하고, 여기서 이펙터 기능을 미세 조율하거나, 바람직한 이펙터 기능을 강화 또는 감소, 제공하기 위해 변화가 가해진다. 따라서, 본 발명의 항체는 변이체 Fc 영역(즉, 이하에 기술된 바와 같이 변경된 Fc 영역)을 포함한다. 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 항체는 또한 본원에서 "Fc 변이체 항체"라고 한다. 본원에서 사용하는 천연은 미변형된 부모 서열을 의미하고 천연 Fc 영역을 포함하는 항체를 본원에서 "천연 Fc 항체"라고 한다. Fc 변이체 항체는 당분야의 숙련가에게 공지된 수많은 방법에 의해 생성될 수 있다. 비제한적인 예는 항체 코딩 영역의 단리(예를 들어, 하이브리도마로부터) 및 단리된 항체 코딩 영역의 Fc 영역에 1 이상의 바람직한 치환 수행을 포함한다. 다르게, 항체의 항원-결합 부위(예를 들어, 가변 영역)은 변이체 Fc 영역을 코딩하는 벡터에 서브클로닝될 수 있다. 일 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 천연 Fc 영역과 비교하여 이펙터 기능을 유도하는 유사한 수준을 보여준다. 다른 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 천연 Fc 와 비교하여 이펙터 기능의 보다 높은 유도를 나타낸다. 변이체 Fc 영역의 일부 특별한 실시양태를 이하에 상세하게 설명한다. 이펙터 기능을 측정하는 방법은 당분야에 잘 알려져 있다.

[0285] 항체의 이펙터 기능은 제한없이, 아미노산 치환, 아미노산 부가, 아미노산 결실 및 Fc 아미노산에 대한 번역후 변형(당화)의 변화를 포함하여, Fc 영역의 변화를 통해 변형된다. 이하에 설명하는 방법들을 사용하여 현 항체의 이펙터 기능, FcR에 대한 Fc 영역의 결합 특성 비율(예를 들면, 친화성 및 특이성)을 미세 조율하여서, 바람직한 특성을 갖는 치료 항체를 얻을 수 있다.

[0286] 본원에서 사용하는 Fc 영역은 제1 불변 영역 면역글로불린 도메인을 배제한 항체의 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 포함함을 이해한다. 따라서 Fc는 IgA, IgD, 및 IgG의 마지막 2 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 IgE 및 IgM의 마지막 3 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 이들 도메인의 N-말단 탄성 힌지를 의미한다. IgA

및 IgM의 경우 Fc는 J 사슬을 포함할 수 있다. IgG의 경우, Fc는 면역글로불린 도메인 Cgamma2 및 Cgamma3(Cγ2 및 Cγ3) 및 Cgamma1(Cγ1)과 Cgamma2(Cγ2) 사이의 힌지를 포함한다. Fc 영역의 경계가 다양하지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 그의 카르복실 말단에 잔기 C226 또는 P230를 포함하는 것으로 정의되고, 여기서 번호매김은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스에 따른다. Fc는 단리된 이 영역 또는 항체, 항체 단편, 또는 Fc 융합 단백질에서 이 영역을 의미한다. 제한없이 EU 인덱스로 번호매김한 위치 270, 272, 312, 315, 356 및 358을 포함하여, 수많은 상이한 Fc 위치에서 다형성이 관찰되었고, 따라서 종래 제시된 서열 및 서열들 간에 약간의 차이가 존재할 수 있다.

[0287] 일 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체와 비교시, 제한없이, FcRn, 이소폼 FcγRIA, FcγRIB, 및 FcγRIC을 포함한 FcγRI(CD64); FcγRII(이소폼 FcγRIIA, FcγRIIB, 및 FcγRIIC을 포함한 CD32); 및 FcγRIII(이소폼 FcγRIIIA 및 FcγRIIIB를 포함한 CD16)을 포함한 1 이상의 Fc 수용체에 대해 변경된 결합 친화성을 나타낸다.

[0288] 일 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 1 이상의 Fc 리간드에 대해 강화된 결합성을 갖는다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체 보다 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 5배, 또는 적어도 7배, 또는 적어도 10배, 또는 적어도 20배, 또는 적어도 30배, 또는 적어도 40배, 또는 적어도 50배, 또는 적어도 60배, 또는 적어도 70배, 또는 적어도 80배, 또는 적어도 90배, 또는 적어도 100배, 또는 적어도 200배, 또는 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 50배, 또는 25배 내지 100배, 또는 75배 내지 200배, 또는 100 내지 200배 높거나 또는 낮은 Fc 리간드에 대한 높거나 또는 낮은 친화성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체 보다 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 40%, 적어도 30%, 적어도 20%, 적어도 10%, 또는 적어도 5% 높거나 또는 낮은 Fc 리간드에 대한 친화성을 나타낸다. 일정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 Fc 리간드에 대해 높은 친화성을 갖는다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 Fc 리간드에 대해 낮은 친화성을 갖는다.

[0289] 특정한 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대해 증강된 결합성을 갖는다. 다른 특정 실시양태에서 Fc 변이체 항체는 Fc 수용체 FcγRIIB에 대해 증강된 결합성을 갖는다. 추가의 특정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 Fc 수용체 FcγRIIIA 및 FcγRIIB 둘모두에 대해 증강된 결합성을 갖는다. 일정 실시양태에서, FcγRIIIA에 대해 증강된 결합성을 갖는 Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체와 비교하여 FcγRIIB 수용체에 대해 결합이 부수적으로 증가하지 않는다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대해 감소된 결합성을 갖는다. 추가의 특정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 Fc 수용체 FcγRIIB에 대해 감소된 결합성을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIB에 대해 변경된 친화성을 나타내는 Fc 변이체 항체는 Fc 수용체 FcRn에 대해 증강된 결합성을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIB에 대해 변경된 친화성을 나타내는 Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 C1q에 대해 변경된 결합성을 갖는다.

[0290] 일 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 5배, 또는 적어도 7배, 또는 적어도 10배, 또는 적어도 20배, 또는 적어도 30배, 또는 적어도 40배, 또는 적어도 50배, 또는 적어도 60배, 또는 적어도 70배, 또는 적어도 80배, 또는 적어도 90배, 또는 적어도 100배, 또는 적어도 200배, 또는 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 50배, 또는 25배 내지 100배, 또는 75배 내지 200배, 또는 100 내지 200배 높거나 또는 낮은 FcγRIIIA 수용체에 대한 친화성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 40%, 적어도 30%, 적어도 20%, 적어도 10%, 또는 적어도 5% 높거나 또는 낮은 FcγRIIIA에 대한 친화성을 나타낸다.

[0291] 일 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 5배, 또는 적어도 7배, 또는 적어도 10배, 또는 적어도 20배, 또는 적어도 30배, 또는 적어도 40배, 또는 적어도 50배, 또는 적어도 60배, 또는 적어도 70배, 또는 적어도 80배, 또는 적어도 90배, 또는 적어도 100배, 또는 적어도 200배, 또는 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 50배, 또는 25배 내지 100배, 또는 75배 내지 200배, 또는 100 내지 200배 높거나 또는 낮은 FcγRIIB 수용체에 대한 친화성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 40%, 적어도 30%, 적어도 20%, 적어도 10%, 또는 적어도 5% 높거나 또는 낮은 FcγRIIB에 대한 친화성을 나타낸다.

[0292] 일 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 C1q에 대해 높거나 또는 낮은 친화성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 5배, 또는 적어도 7배, 또는 적어도 10배, 또는 적어도 20배, 또는 적어도 30배, 또는 적어도 40배, 또는 적어도 50배, 또는

적어도 60배, 또는 적어도 70배, 또는 적어도 80배, 또는 적어도 90배, 또는 적어도 100배, 또는 적어도 200배, 또는 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 50배, 또는 25배 내지 100배, 또는 75배 내지 200배, 또는 100배 내지 200배 높거나 또는 낮은 C1q 수용체에 대한 친화성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 40%, 적어도 30%, 적어도 20%, 적어도 10%, 또는 적어도 5% 높거나 또는 낮은 C1q에 대한 친화성을 나타낸다. 또 다른 특정 실시양태에서, C1q에 대해 변경된 친화성을 나타내는 Fc 변이체 항체는 Fc 수용체 FcRn에 대해 증강된 결합성을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, C1q에 대해 변경된 친화성을 나타내는 Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIB에 대해 변경된 결합성을 갖는다.

[0293] 항체가 항체 이펙터 기능으로서 당분야에서 집합적으로 알려진 복수의 과정들을 통해 공격 및 파괴를 지정할 수 있음은 당분야에서 잘 알려진 바이다. "항체-의존적 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"로 알려진 이들 과정 중 하나는 일정 세포독성 세포(예를 들어, 자연 살해(NK) 세포, 호중구, 및 마크로파지) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR)에 결합된 분비된 Ig가 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원-보유 세포에 특이적으로 결합할 수 있고 이어 세포독소로 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 형태를 의미한다. 세포의 표면에 대한 특이적 고친화성 IgG 항체는 세포독성 세포를 "무장시키고" 이러한 사멸에 필요하다. 세포의 용해는 세포외이고, 직접 세포 대 세포 접촉을 필요로하며 보체는 관여하지 않는다.

[0294] 용어 이펙터 기능에 포함되는 다른 과정은 보체 시스템에 의한 세포 파괴의 생물학적 사건을 의미하는 보체 의존적 세포독성(이하 "CDC"라고 함)이다. 보체 시스템은 병원성 박테리아 및 다른 외래 세포를 파괴하기 위해 항체와 조합되어 정상 혈장에서 발견되는 단백질의 복합 시스템이다.

[0295] 용어 이펙터 기능에 포함되는 또다른 과정은 세포-매개 반응으로서 1 이상의 이펙터 리간드를 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 세포 상에 결합된 항체를 인식한 후 세포의 식세포작용을 야기하는 항체 의존적 세포-매개 식세포작용(ADCP)이다.

[0296] Fc 변이체 항체는 1 이상의 FcγR 매개 이펙터 세포 기능을 결정하기 위한 시험관내 기능 어세이에 의해 특징규명되는 것으로 고려된다. 일정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 시험관내 기반 어세이에서와 유사한 생체내 모델(예컨대 본원에 설명하고 개시된 것들)에서의 결합 특성 및 이펙터 세포 기능을 갖는다. 그러나, 본 발명은 시험관내 기반 어세이에서 바람직한 표현형을 나타내지 않지만 생체내에서 바람직한 표현형을 나타내는 Fc 변이체 항체를 배제하지 않는다.

[0297] 일정 실시양태에서, Fc 변이체를 포함하는 항체는 천연 Fc 영역을 포함하는 항체에 비해 세포독성 또는 식세포작용 활성(예를 들어, ADCC, CDC 및 ADCP)이 증강된다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 5배 또는 적어도 10배 또는 적어도 50배 또는 적어도 100배, 또는 적어도 200배, 또는 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 50배, 또는 25배 내지 100배, 또는 75배 내지 200배, 또는 100 내지 200배 높은 세포독성 또는 식세포작용 활성을 갖는다. 다르게, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 세포독성 또는 식세포작용 활성이 낮다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 5배 또는 적어도 10배 또는 적어도 50배 또는 적어도 100배, 또는 적어도 200배, 또는 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 50배, 또는 25배 내지 100배, 또는 75배 내지 200배, 또는 100 내지 200배 낮은 세포독성 또는 식세포작용 활성을 갖는다.

[0298] 일정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체와 비교하여 감소된 ADCC 활성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 5배 또는 적어도 10배 또는 적어도 50배 또는 적어도 100배, 또는 적어도 200배, 또는 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 50배, 또는 25배 내지 100배, 또는 75배 내지 200배, 또는 100배 내지 200배 낮은 ADCC 활성을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해, 적어도 10%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 100%, 또는 적어도 200%, 또는 적어도 300%, 또는 적어도 400%, 또는 적어도 500% 만큼 감소된 ADCC 활성을 나타낸다. 일정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 검출가능한 ADCC 활성을 갖지 않는다. 특정 실시양태에서, ADCC 활성의 감소 및/또는 제거는 Fc 변이체 항체가 Fc 리간드 및/또는 수용체에 대해 나타내는 감소된 친화성에 기인할 수 있다.

[0299] 대안적인 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체와 비교시 높은 ADCC 활성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 5배 또는 적어도 10배 또는 적어도 50배 또는 적어도 100배 높은 ADCC 활성을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 적어도 10%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도

60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 100%, 또는 적어도 200%, 또는 적어도 300%, 또는 적어도 400%, 또는 적어도 500% 만큼 높은 ADCC 활성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 높은 ADCC 활성은 Fc 변이체 항체가 Fc 리간드 및/또는 수용체에 대해 나타내는 높은 친화성에 기인할 수 있다.

[0300] 특정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대해 증강된 결합성을 가지며 천연 Fc 항체에 비해 증강된 ADCC 활성을 갖는다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 증강된 ADCC 활성 및 증강된 혈청 반감기를 갖는다. 다른 특정 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대해 감소된 결합성을 가지며 천연 Fc 항체에 비해 감소된 ADCC 활성을 갖는다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 감소된 ADCC 활성 및 증강된 혈청 반감기 둘 모두를 갖는다.

[0301] 일정 실시양태에서, 세포독성은 CDC에 의해 매개되고 여기서 Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 증강되거나 또는 감소된 CDC 활성을 갖는다. 보체 활성화 경로는 분자, 예를 들어 동족 항원과 복합체를 이루는 항체에 보체 시스템(C1q)의 제1 성분의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해서, 예를 들어, [Gazzano-Santoro et al., 1996, *J. Immunol. Methods,* 202:163]에 설명된 바와 같은, CDC 어세이를 수행할 수 있다.

[0302] 일 실시양태에서, 본 발명의 항체는 천연 Fc 항체와 비교하여 증가된 CDC 활성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체보다 적어도 2배, 또는 적어도 3배, 또는 적어도 5배 또는 적어도 10배 또는 적어도 50배 또는 적어도 100배, 또는 적어도 200배, 또는 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 50배, 또는 25배 내지 100배, 또는 75배 내지 200배, 또는 100 내지 200배 높은 CDC 활성을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 적어도 10%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 100%, 또는 적어도 200%, 또는 적어도 300%, 또는 적어도 400%, 또는 적어도 500% 만큼 증가된 CDC 활성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, CDC 활성의 증가는 Fc 변이체 항체가 C1q에 대해 나타내는 높은 친화성에 기인할 수 있다.

[0303] 본 발명의 항체는 항체의 주요 작용 기전 중 하나, CDC를 증강시키는, COMPLEGENT® 기술(Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.)에 의해서 천연 Fc 항체와 비교시 높은 CDC 활성을 나타낼 수 있다. 항체의 이소타입, IgG3의 부분을 치료 항체를 위한 표준 이소타입인, IgG1의 상응하는 영역에 도입하는 이소타입 키메라현상이라는 접근법을 사용하여, COMPLEGENT® 기술은 IgG1의 바람직한 특징, 예컨대 ADCC, PK 프로파일 및 단백질 A 결합을 유지하면서, IgG1 또는 IgG3 이상으로 CDC 활성을 유의하게 증강시킨다. 또한, ADCC 및 CDC 활성이 증강된 우수한 치료 Mab(ACCRETAMAB®)를 생성하는 POTELLIGENT® 기술과 함께 사용할 수 있다.

[0304] 본 발명의 Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비하여 증강된 ADCC 활성 및 증강된 혈청 반감기를 갖는다.

[0305] 본 발명의 Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비해 CDC 활성이고 혈청 반감기가 증강될 수 있다.

[0306] 본 발명의 Fc 변이체 항체는 천연 Fc 항체에 비하여 증강된 ADCC 활성, 증강된 CDC 활성 및 증강된 혈청 반감기를 가질 수 있다.

[0307] Fc 영역을 포함하는 단백질의 혈청 반감기는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합 친화성을 증가시켜서 증가될 수 있다. 본원에서 사용하는 용어 "항체 반감기"는 그들의 투여 후 항체 분자의 평균 생존 시간의 척도인 항체의 약동학적 특성을 의미한다. 항체 반감기는 환자의 신체(또는 다른 포유동물) 또는 이의 특정 구획, 예를 들어 혈청에서 측정시, 즉 순환 반감기, 또는 다른 조직에서 면역글로불린의 기지량의 50%를 제거하는데 요구되는 시간으로 표시된다. 반감기는 면역글로불린 또는 면역글로불린 부류 마다 다양할 수 있다. 대체로, 항체 반감기 증가는 투여된 항체에 대해 순환되는 평균 체류 시간(MRT)의 증가를 야기한다.

[0308] 반감기 증가는 환자에 주어지는 약물의 양을 감소시킬뿐만 아니라 투여 빈도도 감소시킨다. 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해서, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기술된 바와 같이 항체(특히 항체 단편)에 구조 수용체 결합 에피토프를 도입할 수 있다. 본원에서 사용하는 용어 "구조 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 책임이 있는 IgG 분자(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 의미한다.

[0309] 대안적으로, 반감기가 증가된 본 발명의 항체는 Fc와 FcRn 수용체 간 상호작용에 관여하는 것으로 동정된 아미노산 잔기를 변형시켜서 생성시킬 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,821,505호 및 제7,083,784호; 및 WO 09/058492를 참조함). 또한, 본 발명의 항체의 반감기는 당분야에서 광범위하게 활용되는 기술을 통해서 PEG 또는 알부민에 접합하여 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Fc 변이체 영역을 포함하는 항체는 천연 Fc 영역을 포함하는 항체와 비교시 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 약 125%, 약 150% 또는 그

이상으로 반감기가 증가된다. 일부 실시양태에서, Fc 변이체 영역을 포함하는 항체는 천연 Fc 영역을 포함하는 항체와 비교시, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 이상, 또는 2배 내지 10배, 또는 5배 내지 25배, 또는 15배 내지 50배로 반감기가 증가된다.

[0310] 일 실시양태에서, 본 발명은 Fc 변이체를 제공하고, 여기서 Fc 영역은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스로 번호매김한 221, 225, 228, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 250, 251, 252, 254, 255, 256, 257, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 308, 313, 316, 318, 320, 322, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 428, 433, 434, 435, 436, 440, 및 443으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 위치에 변형(예를 들어, 아미노산 치환, 아미노산 삽입, 아미노산 결실)을 포함한다. 경우에 따라서, Fc 영역은 당분야의 숙련가에게 공지된 추가 및/또는 다른 위치에 변형을 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호; 제6,277,375호; 제6,737,056호; 제7,083,784호; 제7,317,091호; 제7,217,797호; 제7,276,585호; 제7,355,008호; 2002/0147311; 2004/0002587; 2005/0215768; 2007/0135620; 2007/0224188; 2008/0089892; WO 94/29351; 및 WO 99/58572를 참조함). 부가적으로, 유용한 아미노산 위치 및 특이적 치환은 미국 특허 제6,737,056호의 표 2, 및 6-10; US 2006/024298의 도 41에 제시된 표; US 2006/235208의 도 5, 12 및 15에 제시된 표; US 2006/0173170의 도 8, 9 및 10에 제시된 표 및 WO 09/058492의 도 8-10, 13 및 14에 제시된 표에 예시되어 있다.

[0311] 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 변이체를 제공하고, 여기서 Fc 영역은 카밧에 기술된 EU 인덱스로 번호매김된 221K, 221Y, 225E, 225K, 225W, 228P, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235E, 235F, 236E, 237L, 237M, 237P, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R. 243W, 243L 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 250E, 250Q, 251F, 252L, 252Y, 254S, 254T, 255L, 256E, 256F, 256M, 257C, 257M, 257N, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265A, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298A, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 308F, 313F, 316D, 318A, 318S, 320A, 320S, 322A, 322S, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 326A, 326D, 326E, 326G, 326M, 326V, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 333A, 333D, 333G, 333Q, 333S, 333V, 334A, 334E, 334H, 334L, 334M, 334Q, 334V, 334Y, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 428L, 428F, 433K, 433L, 434A, 424F, 434W, 434Y, 436H, 440Y 및 443W로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 치환을 포함한다. 경우에 따라, Fc 영역은 제한없이, US 미국 특허 제6,737,056호의 표 2, 및 6-10; US 2006/024298의 도 41에 제시된 표; US 2006/235208의 도 5, 12 및 15에 제시된 표; US 2006/0173170의 도 8, 9 및 10에 제시된 표 및 WO 09/058492의 도 8, 9 및 10에 제시된 표에 예시된 것들을 포함하여 당분야의 숙련가에게 공지된 추가 및/또는 다른 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0312] 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 변이체 항체를 제공하고, 여기서 Fc 영역은 카밧에 기재된 EU 인덱스로 번호매김한 228, 234, 235 및 331로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 위치에서 1 이상의 변형(예를 들어, 아미노산 치환, 아미노산 삽입, 아미노산 결실)을 포함한다. 일 실시양태에서, 변형은 카밧에 기재된 EU 인덱스로 번호매김한 228P, 234F, 235E, 235F, 235Y, 및 331S로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 치환이다.

[0313] 다른 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 변이체 항체를 제공하고, 여기서 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이고, 카밧에서 기재된 EU 인덱스로 번호매김한 228 및 235로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 위치에서 1 이상의 변형을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이고 비천연 발생 아미노산은 카밧에 기재된 EU 인덱스로 번호매김한 228P, 235E 및 235Y로 이루어진 군에서 선택된다.

[0314] 다른 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 변이체를 제공하고, 여기서 Fc 영역은 카밧에 기재된 EU 인덱스로 번호매김시 239, 330 및 332로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 위치에 적어도 하나의 비천연 발생 아미노산을 포함한다. 일 실시양태에서, 변형은 카밧에 기재된 EU 인덱스로 번호매김한 239D, 330L, 330Y, 및 332E로 이루어

진 군에서 선택된 적어도 하나의 치환이다.

[0315] 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 변이체 항체를 제공하고, 여기서 Fc 영역은 카밧에 기재된 EU 인덱스로 번호매김한 252, 254, 및 256로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 위치에서 적어도 하나의 비천연 발생 아미노산을 포함한다. 일 실시양태에서, 변형은 카밧에 기재한 EU 인덱스로 번호매김한 252Y, 254T 및 256E로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 치환이다. 본 발명의 특히 바람직한 항체에서, 변형은 카밧에 기재된 EU 인덱스로 번호매김한 3 치환 252Y, 254T 및 256E("YTE"로 알려짐)이다, 미국 특허 제7,083,784호를 참조한다.

[0316] 일정 실시양태에서, IgG 항체에 의해 유도된 이펙터 기능은 단백질의 Fc 영역에 연결된 탄수화물 모이어티에 강력하게 의존적이다(Claudia Ferrara et al., 2006, Biotechnology and Bioengineering 93:851-861). 따라서, Fc 영역의 당화는 이펙터 기능을 증가시키거나 또는 감소시키도록 변형될 수 있다(예를 들어, 다음 문헌들을 참조함: Umana *et al.*, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies *et al.*, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields *et al.*, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; 미국 특허 제6,602,684호; 제6,946,292호; 제7,064,191호; 제7,214,775호; 제7,393,683호; 제7,425,446호; 제7,504,256호; 미국 공개 특허 출원 제2003/0157108호; 제2003/0003097호; 제2009/0010921호; Potillegent™ technology(Biowa, Inc. Princeton, N.J.); GlycoMAb™ glycosylation engineering technology(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)). 따라서, 일 실시양태에서 본 발명의 항체의 Fc 영역은 아미노산 잔기의 변경된 당화를 포함한다. 다른 실시양태에서, 아미노산 잔기의 변경된 당화는 이펙터 기능 저하를 일으킨다. 다른 실시양태에서, 아미노산 잔기의 변경된 당화는 이펙터 기능의 증가를 일으킨다. 특정 실시양태에서, Fc 영역은 푸코실화가 감소된다. 다른 실시양태에서, Fc 영역은 비푸코실화된다(예를 들어, 미국 공개 특허 출원 제2005/0226867호 참조). 일 측면에서, 숙주 세포(예를 들어, CHO 세포, 작은 렘나)에서 생성시, 이펙터 기능, 특히 ADCC가 증가된 이들 항체는 부모 항체에 의해 생성된 항체와 비교하여 ADCC가 100배 이상인 고도로 탈푸코실화된 항체를 생성하도록 조작되었다(Mori *et al.*, 2004, Biotechnol Bioeng 88:901-908; Cox et al., 2006, Nat Biotechnol., 24:1591-7).

[0317] IgG 분자 상의 올리고사카라이드에 시알산의 부가는 그들의 항염증성 활성을 강화시키고 그들의 세포독성을 변경시킬 수 있다(Keneko *et al.*, Science, 2006, 313:670-673; Scallon et al., Mol. Immuno. 2007 Mar;44(7):1524-34). 상기 언급된 연구들은 시알릴화가 증가된 IgG 분자가 항염증성 특성을 갖는 반면, 시알릴화가 감소된 IgG 분자는 면역조절 특성이 증가되었다(예를 들어, ADCC 활성이 증가). 따라서, 항체는 구체적인 치료 용도를 위해 적절한 시알릴화 프로파일로 변형될 수 있다(미국 공개 특허 출원 제2009/0004179호 및 국제 공개 특허 출원 WO 2007/005786).

[0318] 일 실시양태에서, 본 발명의 항체의 Fc 영역은 천연 Fc 영역과 비교하여 변경된 시알릴화 프로파일을 포함한다. 일 실시양태에서, 본 발명의 항체의 Fc 영역은 천연 Fc 영역과 비교하여 증가된 시알릴화 프로파일을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체의 Fc 영역은 천연 Fc 영역과 비교하여 감소된 시알릴화 프로파일을 포함한다.

[0319] 일 실시양태에서, 본 발명의 Fc 변이체는 다른 기지의 Fc 변이체 예컨대 다음의 문헌에 개시된 것들로 조합될 수 있다: Ghetie *et al.*, 1997, Nat Biotech. 15:637-40; Duncan *et al.*, 1988, Nature 332:563-564; Lund *et al.*, 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund *et al.*, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins *et al.*, 1995, *Proc Natl. Acad Sci U S A* 92:11980-11984; Jefferis *et al.*, 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund *et al.*, 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis *et al.*, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund *et al.*, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour *et al.*, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie *et al.*, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy *et al.*, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu *et al.*, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie *et al.*, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); 미국 특허 제5,624,821호; 제5,885,573호; 제5,677,425호; 제6,165,745호; 제6,277,375호; 제5,869,046호; 제6,121,022호; 제5,624,821호; 제5,648,260호; 제6,528,624호; 제6,194,551호; 제6,737,056호; 제7,122,637호; 제7,183,387호; 제7,332,581호; 제7,335,742호; 제7,371,826호; 제6,821,505호; 제6,180,377호; 제7,317,091호; 제7,355,008호; 2004/0002587; 및 WO 99/58572. Fc 도메인의 다른 변형 및/또는 치환 및/또는 부가 및/또는 결실은 당분야의 숙련가에게 쉽게 이해될 것이다.

[0320] **당화**

[0321] 항체의 이펙터 기능을 변경시키는 당화의 능력이외에도, 가변 영역에서 변형된 당화는 항원에 대한 항체의 친화성을 변경시킬 수 있다. 일 실시양태에서, 본 발명의 항체의 가변 영역의 당화 패턴은 변형된다. 예를 들어, 비당화 항체를 제조할 수 있다(즉, 항체가 당화가 결여됨). 당화는 예를 들어, 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시키도록 변경될 수 있다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어, 항체 서열 내 1 이상의 당화 부위를 변경하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 1 이상의 가변 영역 프레임워크 당화 부위를 제거하여 그 부위에서 당화가 제거되도록 1 이상의 아미노산 치환을 실시할 수 있다. 이러한 비당화는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 제5,714,350호 및 제6,350,861호에 상세하게 기술되어 있다. Fc 영역에 존재하는 당화 부위(예를 들어, IgG의 아스파라긴 297)를 제거하는 1 이상의 아미노산 치환을 수행할 수 있다. 또한, 비당화 항체는 필수 당화 기전이 결여된 박테리아 세포에서 생산할 수 있다.

[0322] **항체 접합체**

[0323] 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 당분야에 잘 알려진 방법을 사용해 물질에 접합되거나 또는 공유 부착된다. 일 실시양태에서, 부착된 물질은 치료제, 검출가능한 표지(본원에서는 리포터 분자라고도 함) 또는 고형 지지체이다. 항체에 부착을 위해 적합한 물질은 제한없이, 아미노산, 펩티드, 단백질, 폴리사카라이드, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 핵산, 햅텐, 약물, 호르몬, 지질, 지질 어셈블리, 합성 중합체, 중합성 미세입자, 생물학적 세포, 바이러스, 형광단, 발색단, 염료, 독소, 햅텐, 효소, 항체, 항체 단편, 방사성동위원소, 고체 매트릭스, 반고체 매트릭스 및 이들의 조합을 포함한다. 항체에 다른 물질을 공유적으로 부착시키거나 또는 접합시키는 방법은 당분야에 잘 알려져 있다.

[0324] 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 고형 지지체에 접합된다. 항체는 스크리닝 및/또는 정제 및/또는 제조 공정의 일부로서 고형 지지체에 접합된다. 대안적으로, 본 발명의 항체는 진단 방법 또는 조성물의 일부로서 고상 지지체에 접합될 수 있다. 본 발명에서 사용하기 적합한 고형 지지체는 전형적으로 실질적으로 액체상에서 불용성이다. 대량의 지지체가 이용가능하고 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 따라서, 고형 지지체는 고체 및 반고체 매트릭스, 예컨대 에어로졸 및 히드로겔, 수지, 비드, 바이오칩(박막 코팅된 바이오칩을 포함), 미세유체칩, 실리콘 칩, 다중웰 플레이트(미세역가 플레이트 또는 미세플레이트라고도 함), 막, 전도성 및 비전도성 금속, 유리(현미경 슬라이드 포함) 및 자성 지지체를 포함한다. 고형 지지체의 보다 특정한 예에는 실리카 겔, 중합성막, 입자, 유도체화된 플라스틱 필름, 유리 비드, 면, 플라스틱 비드, 알루미다 겔, 폴리사카라이드 예컨대 세파로스, 폴리(아크릴레이트), 폴리스티렌, 폴리(아크릴아미드), 폴리올, 아가로스, 아가, 셀룰로스, 덱스트란, 전분, 피콜, 헤파린, 글리코겐, 아밀로펙틴, 만난, 이눌린, 니트로셀룰로스, 디아조셀룰로스, 폴리비닐클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌(폴리(에틸렌 글리콜) 포함), 나일론, 라텍스 비드, 자성 비드, 상자성 비드, 초상자성 비드, 전분 등을 포함한다.

[0325] 일부 실시양태에서, 고형 지지체는 본 발명의 항체를 부착시키기 위해서, 제한없이, 히드록실, 카르복실, 아미노, 티올, 알데히드, 할로겐, 니트로, 시아노, 아미도, 우레아, 카르보네이트, 카르바메이트, 이소시아네이트, 설폰, 설포네이트, 설폰아미드, 설폭시드 등을 포함하여, 반응성 작용기를 포함할 수 있다.

[0326] 적합한 고상 지지체는 다양한 합성 프로토콜에 대한 적합성 및 바람직한 최종 용도를 기초로 선택될 수 있다. 예를 들어, 고형 지지체 본 발명의 항체를 부착하기 위해 아미드 결합 형성이 바람직한 경우, 대체로 펩티드 합성에 유용한 수지가 적용되며, 예컨대 폴리스티렌(예를 들어, Bachem Inc., Peninsula Laboratories 등에서 입수한 PAM-수지), POLYHIPE™ 수지(Aminotech(Canada)에서 입수), 폴리아미드 수지(Peninsula Laboratories에서 입수), 폴리에틸렌 글리콜이 그라프트된 폴리스티렌 수지(TentaGel™, Rapp Polymere, Tubingen, 독일), 폴리디메틸-아크릴아미드 수지(Milligen/Biosearch(캘리포니아)에서 입수가능), 또는 PEGA 비드((Polymer Laboratories)에서 입수) 등이 포함된다.

[0327] 일정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체 및/또는 그의 회합된 리간드를 검출할 수 있는, 진단 및 다른 어세이 목적을 위해 표지에 접합된다. 항체에 접합되고 본원에 기술된 본 발명의 방법 및 조성물에서 사용되는 표지는 280 nm 보다 높은 파장에서 최대 흡광을 나타내고, 항체가 공유적으로 부착될 때 그 스펙트럼 성질을 보유하는, 임의의 화학적 모이어티, 유기 또는 무기물이다. 표지는 제한없이, 발색단, 형광단, 형광발광 단백질, 인광성 염료, 탠덤 염료, 입자, 햅텐, 효소 및 방사성동위원소를 포함한다.

[0328] 일정 실시양태에서, 항체는 형광단에 접합된다. 이와 같이, 본 발명의 항체를 표지화하는데 사용되는 형광단은 제한없이, 피렌(미국 특허 제5,132,432호에 개시된 임의의 상응하는 유도체 화합물을 포함), 안트라센, 나프탈렌, 아크리딘, 스틸벤, 인돌 또는 벤진돌, 옥사졸 또는 벤족사졸, 티아졸 또는 벤조티아졸, 4-아미노-7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸(NBD), 시아닌(미국 특허 제6,977,305호 및 제6,974,873호의 임의의 상응하는 화합물 포

함), 카르보시아닌(미국 특허 출원 제09/557,275호; 미국 특허 제4,981,977호; 제5,268,486호; 제5,569,587호; 제5,569,766호; 제5,486,616호; 제5,627,027호; 제5,808,044호; 제5,877,310호; 제6,002,003호; 제6,004,536호; 제6,008,373호; 제6,043,025호; 제6,127,134호; 제6,130,094호; 제6,133,445호; 및 국제 공개 특허 출원 WO 02/26891, WO 97/40104, WO 99/51702, WO 01/21624; EP 1 065 250 A1의 임의의 상응하는 화합물 포함), 카르보스틸릴, 폴피린, 살리실레이트, 안트라닐레이트, 아줄렌, 페릴렌, 피리딘, 퀴놀린, 보라폴리아자인다센(미국 특허 제4,774,339호; 제5,187,288호; 제5,248,782호; 제5,274,113호; 및 제5,433,896호에 개시된 임의의 상응하는 화합물 포함), 잔텐(미국 특허 제6,162,931호; 제6,130,101호; 제6,229,055호; 제6,339,392호; 제5,451,343호; 제5,227,487호; 제5,442,045호; 제5,798,276호; 제5,846,737호; 제4,945,171호; 미국 특허 출원 제09/129,015호 및 제09/922,333호의 임의의 상응하는 화합물 포함), 옥사진(미국 특허 제4,714,763호에 개시된 임의의 상응하는 화합물 포함) 또는 벤족사진, 카르바진(미국 특허 제4,810,636호에 개시된 임의의 상응하는 화합물 포함), 페날레논, 쿠마린(미국 특허 제5,696,157호; 제5,459,276호; 제5,501,980호 및 제5,830,912호에 개시된 임의의 상응하는 화합물 포함), 벤조퓨란(미국 특허 제4,603,209호 및 제4,849,362호에 개시된 상응하는 화합물 포함) 및 벤즈페날레논(미국 특허 제4,812,409호에 개시된 임의의 상응하는 화합물 포함) 및 이의 유도체를 포함한다. 본원에서 사용하는, 옥사진은 레소루핀(미국 특허 제5,242,805호에 개시된 임의의 상응하는 화합물 포함), 아미노옥사지논, 디아미노옥사진, 그들의 벤조-치환된 유사체를 포함한다.

[0329] 특정한 실시양태에서, 본원에 기술된 항체에 접합된 형광단은 잔텐(로돌, 로다민, 플루오레세인 및 이의 유도체), 쿠마린, 시아닌, 피렌, 옥사진 및 보라폴리아자인다센을 포함한다. 다른 실시양태에서, 이러한 형광단은 설폰화된 잔텐, 불화 잔텐, 설폰화 쿠마린, 불화 쿠마린 및 설폰화 시아닌을 포함한다. 또한, 대체로, ALEXA FLUOR®, DyLight, CY® Dyes, BODIPY®, OREGON GREEN®, PACIFIC BLUE™, IRDYE®, FAM, FITC, 및 ROX™로 알려진, 상품명으로 판매되는 염료를 포함한다.

[0330] 항체에 부착된 형광단의 선택은 접합된 항체의 흡광 및 형광 발광 특성을 결정하게 된다. 항체 및 항체 결합 리간드에 사용할 수 있는 형광단 표지의 물리적 특성은 제한없이, 스펙트럼 특징(흡광, 발광 및 스토크스 이동), 형광발광 강도, 수명, 편광성 및 광-블리칭 속도, 또는 이들의 조합을 포함한다. 이들 물리적 특성 모두는 하나의 형광단을 다른 것으로부터 구별하는데 사용되어서, 복합 분석을 가능하게 한다. 일정 실시양태에서, 형광단은 480 nm가 넘는 파장에서 최대 흡광을 나타낸다. 다른 실시양태에서, 형광단은 488 nm 내지 514 nm에서 또는 이 근방(아르곤-이온 레이저 여기 공급원의 출력에 의해 여기되기에 적합)에서 또는 546 nm 근방(수은 아크 램프에 의한 여기에 특히 적합)에서 흡광한다. 다른 실시양태에서, 형광단은 조직 또는 전체 유기체 적용을 위해 NIR(근 적외선 영역)에서 발광될 수 있다. 예를 들어, 항체의 표지화가 세포 또는 유기체(예를 들어, 살아있는 동물)에서 수행되어야하면, 형광발광성 표지의 다른 바람직한 특성은 세포 투과성 및 낮은 독성을 포함할 수 있다.

[0331] 일정 실시양태에서, 효소는 표지이고 본원에 기술된 항체에 접합된다. 효소는 높은 어세이 감응도를 야기하게 검출가능한 신호의 증폭을 획득할 수 있어서 바람직한 표지이다. 효소 자체는 검출가능한 반응을 생성시키지 않지만, 전환된 기질이 형광발광, 비색 또는 발광 신호를 생성하도록 적절한 기질에 의해 접촉시 기질을 분해시키는 기능을 한다. 효소는 표지화 시약 상의 한 효소가 검출가능한 신호로 전환되는 다수의 기질을 생성시킬 수 있기 때문에 검출가능한 신호를 증폭시킨다. 효소 기질은 바람직한 측정가능 생성물, 예를 들어, 비색, 형광발광 또는 화학발광을 산출하도록 선택된다. 이러한 기질은 당분야에서 광범위하게 사용되고 당분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다.

[0332] 일 실시양태에서, 비색 또는 형광원 기질 및 효소의 조합은 구별되는 색상(각각 갈색 및 적색)을 산출하는, 옥시도리덕타아제 예컨대 홀스래디쉬 퍼옥시다아제 및 기질 예컨대 3,3'-디아미노벤지딘(DAB) 및 3-아미노-9-에틸카르바졸(AEC)을 사용한다. 검출가능한 생성물을 산출하는 다른 비색 옥시도리덕타아제 기질은 제한없이, 2,2-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)(ABTS), *o*-페닐렌디아민(OPD), 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), *o*-디아니시딘, 5-아미노살리실산, 4-클로로-1-나프톨을 포함한다. 형광원 기질은 제한없이, 호모바닐산 또는 4-히드록시-3-메톡시페닐아세트산, 환원된 페녹사진 및 Amplex® Red 시약 및 이의 변이체(미국 특허 제4,384,042호)를 포함한 환원된 벤조티아진, 디히드로플루오레세인(미국 특허 제6,162,931호)을 포함한 환원된 디히드로잔텐 및 디히드로로다민 123을 포함한 디히드로로다민을 포함한다. 퍼옥시다아제 기질인 티라미드(미국 특허 제5,196,306호; 제5,583,001호 및 제5,731,158호)는 효소의 작용이 티라미드 신호 증폭(TSA)으로 설명되는 과정으로 퍼록시다아제 작용에 의해 "제자리에 고정"되기 전에 고유하게 검출가능하다는 점에서 고유한 부류의 퍼옥시다아제 기질을 대표한다. 이들 기질은 현미경, 유세포측정, 광학 스캐닝 및 형광분석 형광법에 의한 그들의 후

속 검출을 위해 세포, 조직 또는 어레이인 샘플에서 항원을 표지화하는데 광범위하게 사용된다.

[0333] 다른 실시양태에서, 비색(및 일부 경우에서 형광원) 기질 및 효소 조합은 비색 기질 예컨대 5-브로모-6-클로로-3-인돌릴 포스페이트(BCIP), 6-클로로-3-인돌릴 포스페이트, 5-브로모-6-클로로-3-인돌릴 포스페이트, *p*-니트로페닐 포스페이트, 또는 *o*-니트로페닐 포스페이트와 조합하거나 또는 형광원 기질 예컨대 4-메틸움벨리페릴 포스페이트, 6,8-디플루오로-7-히드록시-4-메틸쿠마리닐 포스페이트(DiFMUP, 미국 특허 제5,830,912호) 플루오레세인 디포스페이트, 3-*O*-메틸플루오레세인 포스페이트, 레소루핀 포스페이트, *9H*-(1,3-디클로로-9,9-디메틸아크리딘-2-온-7-일) 포스페이트(DDAO 포스페이트), 또는 ELF 97, ELF 39 또는 관련 포스페이트(미국 특허 제5,316,906호 및 제5,443,986호)와 조합한 포스파타아제 효소 예컨대 산 포스파타아제, 알칼리 포스파타아제 또는 이러한 포스파타아제의 재조합 형태를 사용한다.

[0334] 글리코시다아제, 특히 베타-갈락토시다아제, 베타-글루쿠로니다아제 및 베타-글루코시다아제는 부가적인 적합한 효소이다. 적절한 비색 기질은 제한없이, 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 베타-D-갈락토피라노시드(X-gal) 및 유사한 인돌릴 갈락토시드, 글루코시드, 및 글루쿠로니드, *o*-니트로페닐 베타-D-갈락토피라노시드(ONPG) 및 p-니트로페닐 베타-D-갈락토피라노시드를 포함한다. 일 실시양태에서, 형광원 기질은 레소루핀 베타-D-갈락토피라노시드, 플루오레세인 디갈락토시드(FDG), 플루오레세인 디글루쿠로니드 및 그들의 구조적 변이체(미국 특허 제5,208,148호; 제5,242,805호; 제5,362,628호; 제5,576,424호 및 제5,773,236호), 4-메틸움벨리페릴 베타-D-갈락토피라노시드, 카르복시움벨리페릴 베타-D-갈락토피라노시드 및 불화 쿠마린 베타-D-갈락토피라노시드(미국 특허 제5,830,912호)를 포함한다.

[0335] 추가적인 효소는 제한없이, 적합한 기질이 알려져 있는, 히드롤라아제 예컨대 콜리네스테라아제 및 펩티다아제, 옥시다아제 예컨대 포도당 옥시다아제 및 사이토크롬 옥시다아제, 및 리덕타아제를 포함한다.

[0336] 화학발광을 생성하는 효소 및 그들의 적절한 기질이 일부 어세이에 바람직하다. 이들은 제한없이, 루시퍼라아제 및 애쿠오린의 천연 및 재조합 형태를 포함한다. 포스파타아제, 글리코시다아제 및 옥시다아제를 위한 화학발광-생성 기질 예컨대 안정한 디옥세탄, 루미놀, 이소루미놀 및 아크리디늄 에스테르를 포함하는 것들이 부가적으로 유용하다.

[0337] 다른 실시양태에서, 햅텐 예컨대 바이오틴이 또한 표지로서 이용된다. 바이오틴은 검출가능한 신호를 더욱 증폭시키기 위한 효소 시스템에서 기능할 수 있고, 단리 목적의 친화성 크로마토그래피에서 사용되는 태그로서 기능할 수 있기때문에 유용하다. 검출 목적을 위해서, 바이오틴에 대한 친화성을 갖는 효소 접합체, 예컨대 아비딘-HRP를 사용한다. 후속하여 퍼옥시다아제 기질을 부가하여 검출가능한 신호를 생성시킨다.

[0338] 햅텐은 또한 호르몬, 천연 발생 및 합성 약물, 오염원, 알레르겐, 어펙터 분자, 성장 인자, 케모카인, 사이토카인, 림포카인, 아미노산, 펩티드, 화학적 중간체, 뉴클레오티드 등을 포함한다.

[0339] 일정 실시양태에서, 형광발광 단백질은 표지로서 항체에 접합될 수 있다. 형광발광 단백질의 예에는 녹색 형광발광 단백질(GFP) 및 파이코빌리단백질 및 이의 유도체가 포함된다. 형광발광 단백질, 특히 파이코빌리단백질은 탠덤 염료 표지된 표지화 시약을 생성하는데 특히 유용하다. 이러한 탠덤 염료는 발광 스펙트럼이 형광발광 단백질의 흡광 스펙트럼의 파장으로부터 더 멀리 이동하는, 보다 큰 스토크스 이동을 획득하는 목적을 위해 형광발광 단백질 및 형광단을 포함한다. 이는 샘플 내 소량의 항원을 검출하는데 특히 유리하며 여기서 발광된 형광발광성 빛은 최대로 최적화되며, 달리 말해서, 발광된 빛이 형광발광된 단백질에 의해 전혀 또는 거의 재흡광되지않는다. 이를 수행하기 위해서, 형광발광 단백질 및 형광단은 에너지 전달 쌍으로 기능하며 여기서 형광발광 단백질은 형광단이 흡광하는 파장에서 발광하고 이어 형광단은 오직 형광발광 단백질에 의해 얻을 수 있는 것보다 형광발광 단백질로부터 먼 파장에서 발광한다. 특히 유용한 조합은 미국 특허 제4,520,110호; 제4,859,582호; 제5,055,556호에 개시된 파이코빌리단백질 및 미국 특허 제5,798,276호에 개시된 설포로다민 형광단, 또는 미국 특허 제6,977,305호 및 제6,974,873호에 개시된 설폰화 시아닌 형광단; 또는 미국 특허 제6,130,101호에 개시된 설폰화 잔텐 유도체 및 미국 특허 제4,542,104호에 개시된 조합들이다. 다르게, 형광단은 에너지 도너로 기능하고 형광발광 단백질은 에너지 억셉터이다.

[0340] 일정 실시양태에서, 표지는 방사능 동위원소이다. 적합한 방사능 재료의 예에는 제한없이, 요오드(^{121}I, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I), 탄소(^{14}C), 황(^{35}S), 중수소(^{3}H), 인듐(^{111}In, ^{112}In, ^{113m}In, ^{115m}In), 테크네튬(^{99}Tc, ^{99m}Tc), 탈륨(^{201}Ti), 갈륨(^{68}Ga, ^{67}Ga), 팔라듐(^{103}Pd), 몰리브데늄(^{99}Mo), 제논(^{135}Xe), 플루오린(^{18}F), ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, 및 ^{97}Ru를 포함한다.

[0341] **의료 치료 및 용도**

[0342] 본 발명의 항체 및 이의 결합 단편은 인플루엔자 A 바이러스 감염의 치료, 인플루엔자 A 바이러스 감염의 예방 및/또는 인플루엔자 A 바이러스 감염의 검출, 진단 및/또는 예후를 위해 사용될 수 있다.

[0343] 진단 방법은 항체 또는 항체 단편을 샘플과 접촉시키는 것을 포함한다. 이러한 샘플은 예를 들어 비강 경로, 부비강, 타액선, 폐, 간, 췌장, 신장, 귀, 눈, 태반, 소화관, 심장, 난소, 뇌하수체, 부신, 갑상선, 뇌 또는 피부에서 채취한 조직일 수 있다. 검출, 진단 및/또는 예후 방법은 또한 항원/항체 복합체의 검출을 포함한다.

[0344] 일 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 이의 결합 단편의 유효량을 피험체에게 투여하여 피험체를 치료하는 방법, 또는 항체 또는 이의 결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 실질적으로 정제된다(즉, 그의 효과를 제한하거나 또는 바람직하지 않은 부작용을 일으키는 물질이 실질적으로 없음). 일 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 노출후, 또는 피험체가 인플루엔자 A 바이러스에 노출된 후 또는 인플루엔자 A 바이러스에 감염된 후에 투여된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 노출전, 또는 인플루엔자 A 바이러스에 아직 노출되지 않았거나 또는 인플루엔자 A 바이러스에 감염되지 않은 피험체에게 투여된다. 일 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 1 이상의 인플루엔자 A 아형에 대해 혈청 음성인 피험체에 투여된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 1 이상의 인플루엔자 A 아형에 대해 혈청-양성인 피험체에게 투여된다. 일 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 감염 또는 증상 개시의 1, 2, 3, 4, 5일 내에 피험체에게 투여된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 감염 또는 증상 개시후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일 후, 및 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 내에 피험체에게 투여될 수 있다.

[0345] 일 실시양태에서, 방법은 피험체에서 인플루엔자 A 바이러스 감염을 감소시킨다. 다른 실시양태에서, 방법은 피험체에서 인플루엔자 A 바이러스 감염을 지연시키거나, 예방하거나, 또는 위험성을 감소시킨다. 일 실시양태에서, 피험체는 포유동물이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 피험체는 인간이다. 일 실시양태에서, 피험체는 제한없이, 예를 들어 면역약화된 피험체를 포함하여, 인플루엔자 A 바이러스 감염의 특히 위험성이 있거나 또는 그에 감응성인 것을 포함한다.

[0346] 치료는 단일 용량 스케쥴이거나 또는 복수 용량 스케쥴이고 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 수동 면역으로 사용될 수 있다.

[0347] 일 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 1 이상의 항바이러스 약물과 조합하여 피험체에게 투여된다. 일 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편은 1 이상의 소형 분자 항바이러스 약물과 조합하여 피험체에게 투여된다. 소형 분자 항바이러스 약물은 뉴라미니다아제 억제제 예컨대 오셀타미비어(TAMIFLU®), 자나미비어(RELENZA®) 및 아다만탄 예컨대 아만타딘 및 리만타딘을 포함한다.

[0348] 다른 실시양태에서, 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 감염의 예방 또는 치료를 위한 약물로서 사용하기 위한 조성물을 제공한다. 다른 실시양태에서, 피험체의 치료 및/또는 피험체의 진단을 위한 약물의 제조에서 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편 및/또는 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편이 결합하는 에피토프를 포함하는 단백질의 용도를 제공한다.

[0349] 본 발명에서 기술한 바와 같은 항체 및 이의 단편은 또한 인플루엔자 A 바이러스의 진단을 위한 키트에서 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체에 결합할 수 있는 에피토프는 보호성 항-인플루엔자 A 바이러스 항체의 존재를 검출하여 백신화 과정의 효율을 모니터링하기 위한 키트에서 사용할 수 있다. 본 발명에서 기술한 바와 같이, 항체, 항체 단편, 또는 이의 변이체 및 유도체는 바람직한 면역원성을 갖는 백신 제조를 모니터링하기 위한 키트에서 사용될 수 있다.

[0350] 본 발명은 또한 단일클론 항체를 1 이상의 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, 약학 조성물의 제조 방법을 제공하고, 여기서 항체는 본원에 기술된 본 발명에 따라 단일클론 항체이다.

[0351] 다양한 전달 시스템이 알려져 있고, 제한없이 리포솜 내 캡슐화, 미세입자, 미세캡슐, 항체 또는 항체 단편을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 세포내섭취, 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서 핵산의 제작, 전기영동 전달 기술에 의한 나형 뉴클레오티드 산의 전달([Muthumani et al., PLoS One. 2013 Dec 31;8(12):e84234. doi: 10.1371/journal.pone.0084234. eCollection 2013) 등을 포함하여, 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편을 투여하는데 사용될 수 있다. 도입 방법은 제한없이, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비내, 경막외, 및 경구 경로를 포함한다. 조성물은 임의의 편리한 경로, 예를 들어 주입 또는 볼러스 주사, 상

피 또는 점성 내막(예를 들어, 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여되고 제한없이 소형 분자 항바이러스 조성물을 포함하는 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소일 수 있다. 폐투여는 예를 들어 흡입기 또는 분무기의 사용, 및 에어로졸화제 포함 제제의 사용을 적용할 수 있다. 적용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 제어 방출 시스템으로 전달될 수 있다.

[0352] 본 발명은 또한 약학 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 본 발명의 항체 또는 이의 결합 단편의 치료 유효량, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본원에서 사용하는 용어 "약학적으로 허용가능한"은 정부 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 또는 미국 약전에 열거되거나 또는 동물, 및 보다 구체적으로 인간에서 사용하기 위한 다른 일반적으로 인식되는 약전에 열거된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제와 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 의미한다. 이러한 약학 담체는 멸균 액체, 예컨대 페트롤륨, 동물, 식물 또는 합성 기원, 예컨대 땅콩유, 대두유, 미네랄유, 참깨유 등을 포함한, 오일 및 물일 수 있다. 약학 조성물이 정맥내에 투여되는 경우 물이 바람직한 담체이다. 염수액 및 수성 덱스트로스 및 글리세롤 용액이 또한 특히 주사 용액용 액상 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 약학 부형제는 전분, 포도당, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 바람직하다면, 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁물, 에멀션, 정제, 알약, 캡슐, 분말, 지속 방출 제제의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 좌제로서, 전통적인 결합제 및 담체 예컨대 트리글리세리드와 함께 제제화될 수 있다. 경구 제제는 표준 담체 예컨대 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 마그네슘 카르보네이트 등을 포함한다. 일 실시양태에서, 약학 조성물은 환자에게 적절한 투여를 위한 형태를 제공하기 위해서, 적합한 양의 담체와 함께, 바람직하게는 정제한 형태로, 항체 또는 이의 결합 단편의 치료 유효량을 함유한다. 제제는 투여 방식을 적합화시켜야 한다.

[0353] 전형적으로, 항체 치료를 위해서, 환자에 투여되는 용량은 환자 체중을 기준으로 약 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 이다.

도면의 간단한 설명

[0354] **도면 목록**

도 1a는 아형 H11, H12, H13, H16, H17, H4, H10, H14, 및 H15의 표면 발현된 HA 단백질에 항체 3 및 항체 12의 결합을 도시한다. 막대그래프는 백색으로 세포수 대 HA 형질감염된 세포와 항체 결합의 형광 강도 또는 회색으로 모의 형질감염된 세포를 도시한다. 도 1b는 항체 3, 항체 12, 또는 MPE8v3(비관련 융합 단백질 항체)(Corti D et al., 2013, Nature 501)의 존재하에서 A/푸에르토리코/8/23 및 닭 적혈구 세포의 저 pH 유도된 융합의 억제율을 도시한다. 도 1c 및 1d는 5, 10 또는 20분 동안 트립신으로 분해 후 미절단(HA0), 재조합 H1 HA의 면역블랏을 도시한다. 분해 반응은 1c에서 HA 단독(투입량), 또는 FI6v4(WO2013/011347A1에 개시됨), 항체 3, FE17.23(구형 헤드 특이적 mAb)(Corti D et al., 2010, J Clin Invest 120) 또는 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)로 사전처리된 HA, 및 1d에서 HA 단독(투입량), 또는 항체 3, 항체 12, 항체 14, 또는 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)로 사전처리된 HA를 포함한다.

도 2는 상승량의 항체 3, 항체 11, 항체 12 및 항체 14의 존재하에서 A/HK/8/68 감염된 MDCK 세포의 NK 세포 매개 사멸율을 도시한다.

도 3은 항체 3, 항체 11, 항체 12, 및 항체 14, 또는 비관련 이소타입 대조군(Ctrl. IgG)의 상승량 존재하에서 A/HK/8/68 HA 발현 MDCK 표적 세포를 식세포작용하는 마크로파지의 백분율을 도시한다.

도 4는 항체 3, 항체 11, 항체 12, 및 항체 14의 상승량 존재하에서 A/PR/8/34 감염된 MDCK 세포의 보체 의존적 사멸율을 도시한다.

도 5는 상이한 농도의 항체 3 또는 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)를 H1N1 인플루엔자 바이러스의 치사량으로 감염전 4시간째 마우스에 투여시 각 실험군에서 동물의 생존률을 도시한다.

도 6은 상이한 농도의 항체 3 또는 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)는 H3 인플루엔자 바이러스의 치사량으로 감염전 4시간째 마우스에 투여한 각 실험군에서 동물의 생존률을 도시한다.

도 7은 마우스를 H1N1 인플루엔자 바이러스의 치사량으로 감염시키고 상이한 시점(감염 후 1일 및 2일)에 30 mg/kg의 항체 3 또는 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)를 처치시 각 그룹에서 동물의 생존률을 도시한다.

도 8은 마우스를 H3 인플루엔자 바이러스의 치사량으로 감염시키고 상이한 시점(감염 후 3일, 4일 및 5일)에 30 mg/kg의 항체 3 또는 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)로 처치한 각 실험군에서 동물의 생존률을 도시한다.

도 9는 마우스를 H1N1 인플루엔자 바이러스의 치사량으로 감염시키고 감염 후 1일에 2 mg/kg의 항체 3, 항체 11, 항체 12, 항체 14 또는 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)로 처치한 각 실험군에서 동물의 생존률을 도시한다.

도 10은 마우스를 H3 인플루엔자 바이러스의 치사량으로 감염시키고 감염 후 2일에 3 mg/kg의 항체 3, 항체 11, 항체 12, 항체 14 또는 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)로 처치한 각 실험군에서 동물의 생존률을 도시한다.

도 11은 마우스를 H1N1 인플루엔자 바이러스의 치사량으로 감염시키고 25 mg/kg의 5일간 BID의 오셀타미비어 치료, 10 mg/kg의 항체 12, 또는 10 mg/kg의 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)의 치료를 상이한 시점(감염 4시간전, 감염 후 1일, 또는 2일 후)에 개시한 각 실험군에서 동물의 생존률을 도시한다.

도 12는 마우스를 H3 인플루엔자 바이러스의 치사량으로 감염시키고 및 5일간 1일 2회(BID) 25 mg/kg 경구 오셀타미비어의 치료, 또는 단일 용량 10 mg/kg의 항체 12, 또는 10 mg/kg의 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)의 치료를 다양한 시점(감염 후 1, 2, 3, 또는 4일)에 개시한 각 실험군에서 동물의 생존률을 도시한다.

도 13은 마우스를 H3 인플루엔자 바이러스의 치사량으로 감염시키고 2.5 mg/kg 또는 0.3 mg/kg 단일 용량의 항체 12, 25 mg/kg의 5일간 BID의 오셀타미비어, 또는 2.5 mg/kg 또는 0.3 mg/kg의 항체 12 및 25 mg/kg의 5일간 BID의 오셀타미비어의 조합을 감염 후 2일에 처치한 각 실험군에서 동물의 생존률을 도시한다.

도 14는 H5N1 인플루엔자 바이러스의 치사량을 감염시키고 25 mg/kg 단일 용량 항체 12, 25 mg/kg의 5일간 BID의 오셀타미비어, 또는 비관련 대조군 항체(Ctrl. IgG)를 감염 후 1, 2, 또는 3일에 처치후 각 실험군에서 흰담비의 생존률을 도시한다.

도 15는 MARM 선별에서 사용된 인플루엔자 A 바이러스주의 HA2 단백질의 정렬을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0355] **실시예**

[0356] **실시예 1. 기억 B 세포로부터 단리된 인간 단일클론 항체의 제작 및 최적화**

[0357] CD22+ IgG+ B 세포는 이종아형 항체의 고역가에 대해 선별한 도너의 저온저장된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 분류하였고 엡스테인 바 바이러스(EBV) 및 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 2006 및 공급 세포를 사용하여 3세포/웰에서 불멸화시켰다. 항체를 함유하는 배양 상등액을 14일 후에 회수하고 ELISA 결합 어세이로 스크리닝하여서 각각 H5(A/베트남/1203/04) 및 H7(A/NLD/03) 헤마글루티닌(HA)에 대한 결합 활성을 결정하였다. 4종의 B 세포 클론(항체 1, 항체 4, 항체 7, 및 항체 9)이 양쪽 HA에 특이적으로 결합하는 것으로 확인되어서 수집하였다. 이들 클론의 VH 및 VL 유전자를 서열분석하고 카밧 데이타베이스를 사용하여 VH 및 VL V, D 및 J 단편에 대해 수행된 상동성 분석에 따라 클론이 관련되어 있음을 확인하였다.중요한 것은, 항체 4의 VH가 발린(항체 5에서 코딩) 또는 글루타메이트(항체 6에서 코딩)를 코딩하는 HCDR3에서 축퇴성 뉴클레오티드 부위를 갖는 것으로 확인되었다. 4종 항체의 VH 및 VL 유전자를 IgG1 발현 벡터(클로닝이 용이하도록 소수의 서열 변형 및 또는 코돈 최적화로 5종 항체가 생성됨; 항체 3, 항체 5, 항체 6, 항체 8 및 항체 10; 하기 실시예들에서 사용함)에 클로닝하였고 HEK 또는 CHO 세포에서 유도된 포유동물 세포주의 일시적 형질감염에 의해 재조합 항체를 생성시켰다. 감염된 세포 유래 상등액을 배양 7-10일 후에 수집하였고, IgG는 단백질 A 크로마토그래피에 의해 친화성 정제하고, PBS에 투석하였다. 항체 3을 더욱 최적화시켜서 프레임워크 영역에 위치하는 비배선 코딩된 체세포 돌연변이를 배선 코딩된 아미노산으로 변화시키고, CDR 영역에 대해 인색 돌연변이유발을 수행한 변이체를 생성시켰다. 상이한 돌연변이를 함유하는 전체 IgG 구성체를 상기 기술한 바와 같이 발현시키고 미정제 상등액을 ELISA로 스크리닝하여서 H3 및 H1 HA 단백질에 대해 높은 결합 활성을 갖는 클론을 선별하였다. ELISA는 상등액 유래 IgG를 포획하고 정규화하기 위해서 0.15 ㎍/mL의 토끼 항-인간 IgG의 코팅 농도를 사용하여 수행한 후, 0.5 ㎍/mL의 바이오틴화된 HA 아형 H1(A/캘리포니아/7/04(H1N1)) 또는 아형 H3(A/퍼스/16/09(H3N2))을 부가하고 1시간 동안 항온반응시켰다. 결합은 스트렙타비딘-HRP(1:5000)을 부가하여 검출하였고, 발색 흡광은 450 nm에서 판독하였다. 양호한 결합성을 부여하는 유리한 단일 돌연변이를 조합하고 조합 라이브러리로 클로닝하여서, 상기 기술된 바와 같이 발현시키고 ELISA로 스크리닝하였다. 이러한 라이브러리 접근법은 추가로 형질규명한 5종의 추가 항체 3 변이체를 생성시켰다(항체 11-15).

[0358] **실시예 2. 항-HA 중화 항체(nAb)는 상이한 아형의 HA에 결합한다**

[0359] 항-HA 항체의 에피토프가 상이한 아형의 HA 간에 보존되었는지 여부를 조사하기 위해서, HA 교차 반응성 ELISA 결합 어세이를 수행하였다. 384-웰 Maxisorb ELISA 플레이트를 밤새 4℃에서 PBS 중 0.5 ㎍/㎖ 재조합 HA(rHA), 아형 H1(A/캘리포니아/7/09(H1N1)), 아형 H2(A/돼지/MO/06(H2N3)), 아형 H3(A/퍼스/16/09(H3N2)), 아형 H5(A/베트남/1203/04(H5N1)), 아형 H6(A/쇠오리/HK/W312/97(H6N1)), 아형 H7(A/네덜란드/219/03(H7N7)) 및 아형 H9(A/닭/HK/G9/97(H9N2))로 코팅하였다. 이 플레이트를 0.1% v/v Tween-20을 함유하는 PBS로 세척하여 미코팅된 단백질을 제거한 후 1%(w/v) 카세인(Thermo Scientific) 함유 차단 용액을 부가하고 실온에서 1시간 동안 항온반응시켰다. 차단 용액을 버리고 차단 용액(카세인-PBS(Thermo Scientific) 중 3배 연속 희석된 항-HA 항체를 부가하고 실온에서 1시간 동안 항온반응시켰다. 플레이트를 3회 세척하고 결합된 항체는 퍼록시다아제-접합된 마우스 항-인간 IgG 항체(Jackson)를 사용해 검출하였다. 항체의 결합 활성은 수퍼시그널 피코 기질(Thermo Scientific)의 부가 후 화학발광 신호를 측정하거나 또는 테트라메틸벤지딘(TMB) 1 성분 기질(KPL)과 항온반응한 후 반응 종료를 위해 2 N 황산 부가한 후 450 nm에서 색상 변화를 측정하여 계산하였다.

표 1

표 1

	ELISA 에 의한 rHA 와의 결합 (EC_{50}, ug/ml)						
	H1 A/CA/7/09	H2 A/돼지/MO/06	H5 A/VN/1203/04	H6 A/HK/W312/97	H9 A/HK/G9/97	H3 A/퍼스/16/09	H7 A/NLD/219/03
항체 3	0.026	0.028	0.022	0.043	0.012	0.019	0.020
항체 5	0.045	0.048	0.041	0.047	>6	0.030	0.024
항체 6	0.311	0.213	0.256	0.214	>6	0.064	0.116
항체 8	0.069	0.058	0.044	0.091	>6	0.067	0.015
항체 10	0.073	0.075	0.058	0.097	2.699	0.049	0.034

[0360]

[0361] 표 1은 조사한 모든 항-HA IgG가 아형 H1, H2, H3, H5, H6, H9 및 H7의 재조합 HA에 결합함을 보여준다. 아형 H9의 재조합 HA는 시험된 항체의 최고 농도(6 ㎍/㎖)에서 항체 3 및 항체 10에 의해 인식되지만, 항체 5, 항체 6 및 항체 8에 의해 인식되지 않았다. 이는 이들 항-HA IgG 대부분의 에피토프가 상이한 아형의 HA 분자 중에 보존됨을 시사한다.

표 2

표 2

	ELISA 에 의한 rHA 와의 결합 (EC_{50}, ug/ml)						
	H1 A/CA/7/09	H2 A/돼지/MO/06	H5 A/VN/1203/04	H6 A/HK/W312/97	H9 A/HK/G9/97	H3 A/퍼스/16/09	H7 A/NLD/219/03
항체 3	0.045	0.095	0.099	0.072	0.171	0.129	0.258
항체 11	0.085	0.126	0.168	0.129	0.164	0.176	0.553
항체 12	0.059	0.088	0.084	0.083	0.098	0.028	0.061
항체 13	0.050	0.062	0.080	0.097	0.161	0.023	0.049
항체 14	0.048	0.079	0.061	0.073	0.095	0.030	0.064
항체 15	0.028	0.042	0.035	0.043	0.065	0.032	0.035

[0362]

[0363] 표 2는 시험된 모든 항-HA IgG 변이체가 유사한 EC_{50} 값으로 1군 아형 H1, H2, H5, H6 및 H9의 재조합 HA에 결합함을 보여준다. 그러나, 2군 HA 단백질(H3 및 H7)에 결합하는 모든 변이체, 항체 11 및 항체 3은 항체 12-15와 비교하여 높은 EC_{50} 값으로 감소된 활성을 보였다.

[0364] 보다 다양한 HA 아형을 포함하여 이들 결합 결과를 확장시키기 위해, 본 발명자는 HA 감염된 세포와의 결합을

기반으로 유세포측정을 사용해 추가의 결합 실험을 수행하였다. 이 어세이에서, HEK 세포를 아형 H4 A/오리/체코슬로바키아/56(H4N6)), 아형 H10(A/닭/독일/N49(H10N7)), 아형 H11(A/오리/멤피스/546/74(H11N9)), 아형 H12(A/오리/알베르타/60/76(H12N5)), 아형 H13(A/갈매기/매릴랜드/704/77(H13N6)), 아형 H14(A/청둥오리/아스트라칸/263/82(H14N5)), 아형 H15(A/슴새/서호주/2576/79(H15N9)), 아형 H16(A/검은머리 갈매기/스웨덴/2/99(H16N3)), 및 아형 H17(A/작은 노랑 어깨 박쥐/과테말라/164/2009(H17N10))의 전체 길이 야생형 HA 발현 플라스미드로 일시적 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후, 세포를 트립신으로 탈착시키고, 5 ㎍/㎖의 항체 3 또는 항체 12와 얼음 상에서 1시간 동안 항온반응시켰다. 이러한 항온반응 시간 후, 세포-표면 발현된 HA 단백질에 결합된 항체를 이어서 염소 항-인간 IgG 일광 649(Jackson ImmunoResearch)로 염색하고 유세포측정으로 검출하였다. 도 1a는 항체가 각각의 아형 유래의 HA 발현 세포(흰색) 대 모의 감염된 세포(회색)에 결합시 형광발광 강도의 이동을 보여준다. 항체 3은 H12를 제외하고 조사된 모든 HA에 결합된 반면, 항체 12는 두 군 (1군 H11, H12, H13, H16, 및 H17 및 2군 H4, H10, H14, 및 H15) 유래의 조사된 모든 HA에 결합하였다

[0365] **실시예 3. Octet를 사용한 항체 3 및 항체 5 IgG1에 대한 HA 결합의 동역학적 특징규명**

[0366] 친화성 측정은 384 슬랜티드-웰 플레이트에서 ForteBio Octet QK 384 동역학 분석기(Menlo Park, CA)를 사용해 수행하였다. 모든 시약은 Octet 동역학 완충액(ForteBio)에 희석하였다. 상이한 아형: 아형 H1(A/캘리포니아/7/04(H1N1)) 및 아형 H3(A/퍼스/16/09(H3N2))의 His-태깅된 HA를 10 ㎍/mL로 항-His 센서상에 고정시켰다. 항-HA mAb 결합/해리를 이어서 0 mAb 대조군과 함께, 100 nM로부터 2배 희석하여 모니터링하였다.

[0367] 결합 및 해리 미가공 데이타를 0 mAb 대조군에서 임의의 이동에 대해 보정한 후, 친화성 그래프 핏팅을 위해 GraphPad Prism(San Diego, CA)에 전환발송하였다. 데이타는 > 5 x10^{-6} sec^{-1}의 부과 한계로 포괄적인 결합/해리 핏칭을 사용해 핏팅하였다. 도 3에 도시한 바와 같이, 항체 둘 모두는 검출 한계 하에서 느린 해리 속도로 pM 수준으로 H1에 대해 매우 높은 친화성을 갖는다. 두 항체의 유사한 K_{on}, K_{off} 및 Kd가 nM 이하 수준에서 H3 삼량체로 관찰되었다.

표 3

[0368]

표 3

	Octet에 의한 rHA에 대한 PanA mAb의 동역학적 결합 분석					
	H1 A/CA/7/09			H3 A/퍼스/16/09		
	K_{on} ($e5\ M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} ($e^{-5}s^{-1}$)	Kd (pM)	K_{on} ($e5\ M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} ($e^{-5}s^{-1}$)	Kd (pM)
항체 3	5.3	<5	11	3.3	62	188
항체 5	10	<5	5	2.6	88	338

[0369] **실시예 4. 상이한 아형의 바이러스에 대한 항-HA IgG1의 시험관내 교차 반응성 중화 활성**

[0370] 미세중화 어세이(MNA)는 판독치로서 뉴라미니다아제 활성(NA)을 사용하는 이전에 기술된 가속 바이러스 억제 어세이로부터 변형시켰다(Hassantoufighi, A. *et al*. 2010, Vaccine 28:790). 간략하게, MNA는 항생제, 글루타민(완전 MEM 배지) 및 10%(v/v) 태아 소 혈청이 보충된 MEM 배지(Invitrogen)에서 배양한 MDCK 세포에 대해 수행하였다. 60 $TCID_{50}$ (50% 조직 배양 감염 용량)의 바이러스를 이중 웰로서 0.75 ㎍/㎖ 트립신(Worthington)을 함유하는 완전 MEM 배지 중 384-웰 플레이트 중 항체의 3배 희석물에 부가하고, 실온에서 30분 항온반응 후, 2x10^{4} 세포/웰을 플레이트에 부가하였다. 대략 40시간 동안 33℃에 5% CO_2 배양기에서 항온반응 후, NA 활성은 각 웰에 형광발광 표지된 기질, 메틸움벨리페릴-N-아세틸 뉴라민산(MU-NANA)(Sigma)을 부가하고 37℃에서 1시간 동안 항온반응시켜 측정하였다. NA 활성으로 대표되는 바이러스 복제는 다음의 설정을 사용해 형광계 Envison(PerkinElmer)에서 형광발광성을 판독하여 정량하였다: 여기 355 nm, 발광 460 nm; 웰당 10 플래쉬. 중화 역가(50% 억제 농도 [IC_{50}])는 세포 대조군 웰과 비교하여 50% 만큼 형광발광 신호를 감소시킨 최종 항체 농도로 표시하였다. 표 4 및 5는 이하에 조사한 상이한 아형의 인플루엔자 A 바이러스를 항-HA가 중화하였음을 보여준다: H1-PR34(A/푸에르토리코/8/34(H1N1)); H1-PR34-OR(A/푸에르토리코/8/오셀타미비어 내성을 부여하는 NA 274Y(N2 번호매김) 돌연변이를 함유하는 34(H1N1)); H1-FM47(A/포트 몬마우쓰/1/47(H1N1)); H1-NJ76(A/뉴저지

/8/76(H1N1)); H1-Kaw86(A/카와사키/9/86(H1N1)); H1-TX91(caA/텍사스/36/91(H1N1)): H1-BJ95(ca A/베이징/262/95(H1N1)); H1-Nca199(ca A/뉴칼레도니아/20/99(H1N1)); H1-SD07(ca A/사우쓰 다코타/6/07(H1N1)); H1-CA09(ca A/캘리포니아/7/09(H1N1)); H1-CA09-OR(ca A/캘리포니아/7/오셀타미비어 내성을 부여하는 NA 274Y(N2 번호매김) 돌연변이를 함유하는 09(H1N1)); H5-VN04(ca A/베트남/1203/04(H5N1)); H5-HK03(ca A/홍콩/213/03(H5N1)); H9-HK97(ca A/닭/홍콩/G9/97(H9N2); H2-JP57(ca A/일본/57(H2N2)); H2-MO06(ca A/돼지/미주리/06(H2N3)); H6-HK97(ca A/쇠오리/홍콩/W312/97(H6N1)); H6-AB85(ca A/청둥오리/알베르타/89/85(H6N2)); H3-HK68(A/홍콩/8/68(H3N2)); H3-Vic75(A/빅토리아/3/75(H3N2)); H3-LA87(A/로스앤젤레스/7/09(H3N2)); H3-SD93(A/산둥/9/93(H3N2)); H3-WH95(ca A/우한/359/95(H3N2)); H3-Syd97(ca A/시드니/5/97(H3N2)); H3-WH95-OR(ca A/우한/359/오셀타미비어 내성을 부여하는 NA 274Y(N2 번호매김) 돌연변이를 함유하는 95(H3N2)); H3-Pa99(ca A/파나마/2007/99(H3N2)); H3-Wy03(A/와이오밍/03/03(H3N2)); H3-WI05(A/위스콘신/67/05(H3N2)); H3-퍼스09(ca A/퍼스/16/09(H3N2)), H3-VC11(A/빅토리아/361/11(H3N2)); H7-NLD03(ca A/네덜란드/219/03(H7N7)); H7-BC04(ca A/브리티쉬 콜럼비아/CN-6/04(H7N3-LP); H7-ANU13(ca A/안후이/1/13(H7N9).

표 4

표 4

감염성 바이러스의 중화(IC_{50} ug/ml)

	바이러스	항체 3	항체 5	항체 6	항체 8	항체 10
1 군	H1-PR34	1.07	1.13	4.37	3.02	2.15
	H1-FM47	0.92	0.86	3.04	1.37	1.11
	H1-NJ76	1.41	1.64	2.60	2.26	0.15
	H1-Kaw86	0.58	1.01	3.51	2.11	1.62
	H1-TX91	0.60	0.76	2.20	0.70	0.48
	H1-BJ95	3.41	5.06	20.86	10.60	4.46
	H1-Ncal99	0.79	0.85	3.00	2.06	1.26
	H1-SD07	0.97	1.61	6.27	2.62	1.37
	H1-CA09	2.19	2.52	5.56	4.50	1.62
	H2-MO06	2.27	2.38	2.90	2.62	1.04
	H5-VM04	2.11	2.60	8.87	3.90	2.21
	H5-HK03	4.64	1.18	10.45	1.82	1.60
	H6-HK97	1.77	2.27	3.23	2.97	1.05
	H9-HK97	1.79	2.43	16.47	26.39	1.76
2 군	H3-HK68	0.68	0.39	2.04	2.82	0.85
	H3-Vic75	0.75	0.57	1.09	3.83	0.91
	H3-LA87	4.19	3.54	12.60	>50	4.59
	H3-SD93	9.39	6.92	19.50	>50	11.65
	H3-WH95	3.96	3.72	10.54	>50	8.70
	H3-Syd97	3.75	3.03	6.54	>50	9.29
	H3-Pa99	17.74	16.74	25.82	>50	18.71
	H3-Wy03	0.63	0.77	4.70	>50	1.52
	H3-WI05	2.44	2.83	6.76	>50	4.46
	H3-Perth09	1.49	2.22	5.03	>50	2.56
	H7-NLD03	4.78	4.14	>50	12.75	3.80
	H7-BC04	4.72	5.35	>50	14.69	3.59

[0371]

[0372] 표 4는 항-HA 항체가 조사된 모든 1군 인플루엔자 A 바이러스를 중화시킴을 보여준다. 항체 8을 제외한 모든 항-HA는 시험된 모든 H3 인플루엔자 A 바이러스에 대해 중화 활성이 입증되었고 항체 6을 제외한 모든 항-HA 항체는 H7-NLD03(ca A/네델란드/219/03(H7N7)); H7-BC04(ca A/브리티쉬 컬럼비아/CN-6/04(H7N3-LP)에 대해 중화 활성을 나타내었다.

표 5

[0373]

표 5

	바이러스	감염성 바이러스의 중화 (IC_{50} ug/ml)					
		항체 3	항체 11	항체 12	항체 13	항체 14	항체 15
1군	H1-PR34	2.17	0.88	1.07	1.30	1.25	1.47
	H1-PR34-OR	1.39	0.73	0.69	0.88	0.83	0.90
	H1-FM47	1.04	0.43	0.28	0.50	0.44	0.35
	H1-NJ76	0.57	0.13	0.12	0.12	0.11	0.25
	H1-Kaw86	1.01	0.53	0.28	0.41	0.35	0.48
	H1-TX91	0.92	0.11	0.12	0.09	0.09	0.13
	H1-BJ95	2.98	1.01	1.31	1.86	2.09	1.81
	H1-Ncal99	1.16	0.66	0.61	0.77	0.67	0.79
	H1-SD07	2.04	0.98	0.78	1.35	1.05	0.81
	H1-CA09	2.07	0.90	0.98	1.23	1.07	1.17
	H1-CA09-OR	2.10	0.87	0.84	1.05	1.23	1.35
	H1-BS10	2.16	1.15	1.25	1.23	1.93	1.89
	H2-JP57	0.46	0.31	0.35	0.47	0.67	0.33
	H2-MO06	1.09	0.60	0.53	0.57	0.65	0.83
	H5-VM04	1.19	0.57	0.31	0.56	0.33	0.28
	H5-HK03	0.71	0.21	0.17	0.17	0.21	0.05
	H6-AB85	0.69	0.24	0.32	0.29	0.26	0.19
	H6-HK97	0.63	0.40	0.45	0.55	0.26	0.33
	H9-HK97	1.18	0.36	0.31	0.29	0.44	0.35
2군	H3-HK68	1.37	0.46	0.42	0.44	0.65	0.50
	H3-Vic75	1.12	0.46	0.32	0.43	0.44	0.35
	H3-LA87	2.04	0.80	0.82	1.00	0.83	0.83
	H3-SD93	3.57	1.11	1.32	1.56	1.57	1.43
	H3-WH95	5.63	2.45	2.09	2.77	2.77	3.32
	H3-WH95-OR	7.70	2.26	2.34	3.01	3.09	3.48
	H3-Syd97	6.50	1.53	1.56	2.18	1.82	1.79
	H3-Pa99	9.00	2.18	2.04	2.62	4.36	3.39
	H3-WI05	2.62	1.07	1.09	1.19	1.19	1.30
	H3-Perth09	1.30	0.17	0.25	0.28	0.47	0.50
	H3-VC11	3.40	0.85	0.83	1.03	1.15	1.29
	H7-NLD03	4.74	0.94	0.83	2.45	1.16	1.30
	H7-BC04	2.95	0.71	0.78	0.96	0.86	1.25
	H7-ANU13	4.26	nd	2.56	nd	2.12	nd

[0374] 표 5는 항체 변이체(항체 11-15)가 부모 항체 3보다 감소된 IC_{50} 값으로 조사된 모든 1군 및 2군 인플루엔자 A 바이러스를 중화시키는데 더 효율적임을 보여준다. 또한, 항체들은 오셀타미비어 내성(OR)이 부여된 NA 단백질로 조작된 돌연변이를 갖는 3종 바이러스도 역시 중화시켰다.

[0375] **실시예 5. 돼지 기원 H3N2 바이러스에 대한 항-HA IgG의 중화 활성**

[0376] 새롭게 출현한 돼지-기원 H3N2 바이러스(A/미네소타/11/2010 및 A/인디아나/10/2011)에 대한 항-HA 항체 3 및 변이체(항체 11-15)의 중화 활성을 실시예 4에 설명된 바와 같은 미세중화 어세이로 측정하였다. 항체 FI6v4(WO2013/011347A1에 기수로딤)를 대조군 항체로 사용하였다. 2회의 독립 실험으로 표 6에 나타낸 바와 같이, 항체 3 및 항체 변이체(항체 11-15)는 돼지-기원 A/인디아나/10/2011 H3N2 바이러스를 중화시키는데 FI6v4보다 더 효과적이었다. 항체 3 및 항체 변이체는 돼지-기원 A/미네소타/11/2010 H3N2 바이러스를 강력하게 중화시킨 반면 FI6v4는 시험된 항체의 최고 농도(50㎍/㎖)에서 중화에 실패하였다.

표 6

표 6

H3N2 바이러스	중화 활성 (IC_{50} ug/ml)						
	FI6 v4	항체 3	항체 11	항체 12	항체 13	항체 14	항체 15
돼지-기원	>50	2.2	1.6	1.1	1.6	1.4	0.9
A/미네소타/11/2010	>50	4.2	1.5	1.2	1.4	2.3	2.7
돼지-기원	13.7	3.1	2.8	2.5	2.2	3.3	5.5
A/인디아나/10/2011	29.3	3.7	2.1	1.8	3.9	2.9	3.9

[0377]

[0378] **실시예 6. 항-HA 중화 항체는 인플루엔자 융합 및 프로테아제-매개 HAO 절단을 억제한다.**

[0379] 항체 매개 융합 억제를 시험하기 위해서, 저 pH 유도 적혈 세포 융합 어세이를 이전에 기술된 변형 프로토콜을 통해 수행하였다(Wang T.T. et al., 2010 PLoS Pathog. 6). 간략하게, A/푸에르토리코/8/34 바이러스(10×10^6 TCID50)를 얼음 상에서 10분간 인간 적혈 세포(2% 최종 적혈 세포 농도)와 항온반응시켰다. 항체 3, 항체 12, 및 비관련 항체 MPE8v3의 희석물을 RT에서 30분간 바이러스와 항온반응시켰다. 적혈 세포를 이어서 37℃에서 30분간 바이러스-항체 혼합물에 부가하고 최종적으로 아세트산나트륨 완충액(0.5 M pH 5.0)을 37℃에서 추가 45분간 부가하였다. 샘플을 6분간 400xg에서 원심분리하고 추가 45분간 RT에서 항온반응시킨 후 다시 6분간 400xg에서 원심분리하여 적혈 세포를 펠렛화시켰다. 이어서 상등액을 ELISA 플레이트로 옮겨서 540 nm에서 흡광도를 측정하여 방출된 NADPH의 양을 측정하였다(도 1b). 결과는 항체 3 및 항체 12가 바이러스 융합을 강력하게 억제시키는 반면, 파라믹소바이러스의 융합 단백질에 대한 인간 단일클론 항체, MPE8v3(Corti et al., 2013 Nature 501)는 저 pH 유도 융합을 억제할 수 없었다.

[0380] HA 성숙화의 항체 매개 차단을 조사하기 위해서, A/뉴칼레도니아/20/99(H1N1)의 재조합 HA를 15:1(mAb:HA)의 몰비율로 40분간 항체 3, FI6v4, FE17.23 또는 동위원소 대조군 항체와 항온반응시켰다. 항체-HA 혼합물을 이어서 2.5 ㎍/㎖의 TPCK-처리 트립신에 노출시키고 5, 10 및 20분간 37℃에서 항온반응시켰다. 샘플을 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리한 후 인플루엔자 A 바이러스주의 HA2 및 HA0을 인식하는 바이오틴화된 인간 mAb(FO32)(Humabs)를 사용하는 웨스턴 블랏을 위해 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다(도 1c). 결과는 항체 3이 프로테아제-매개 HAO 절단을 차단하는데 FI6v4 보다 더 강력함을 보여주었다. 대조적으로, HA 구형 머리부를 인식하고 대조군 항체인 인간 단일클론 항체, FE17.23은 프로테아제-매개 HAO 절단을 억제할 수 없었다. 개별 실험에서, 본 발명자는 상기 기술된 동일한 조건을 사용하여 항체 3과 비교하여 항체 12 및 항체 14의 프로테아제 절단 억제를 비교하였다(도 1d). 결과는 항체 12, 항체 13이 항체 3과 유사한 프로테아제 절단 차단 능력을 가짐을 보여주었다.

[0381] **실시예 7. 항-HA 항체는 Fc-이펙터 기능을 나타낸다**

[0382] 항체는 Fc-이펙터 기능 예컨대 항체 의존적 세포의 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포 식세포작용(ADCP), 및 보체 의존적 사멸(CDC)을 통해 바이러스 감염된 세포를 제거하는 잠재력을 갖는다. 항-HA 항체가 ADCC 활성을 나타내는지 확인하기 위해서, 본 발명자는 인간 자연 살해(NK) 세포의 존재 하에서 바이러스 감염된 세포를 사멸시키는 그 능력을 시험하였다. ADCC 어세이는 20의 MOI로 A/홍콩/8/68이 감염된 MDCK 세포에 대해 수행하였다. 감염된 세포를 일련의 항체 희석물과 항온반응시킨 후, 6:1의 이펙터 대 표적 비율에서, 인간 PBMC(Miltenyi)로부터 음성적으로 선별한 정제된 NK 세포와 항온반응시켰다. 감염된 세포, 항체, 및 NK 세포 혼합물을 4시간 동안 항온반응시키고 세포 사멸은 LDH 방출(Roche)에 의해 측정하였다. 도 2는 모든 4종 항-HA 줄기부 항체는 감염된 MDCK 세포에 대해 용량 의존적 사멸을 나타내었다.

[0383] 식세포작용을 매개하는 항-HA 항체의 능력을 측정하기 위해서, 본 발명자는 표적 세포로서 A/홍콩/8/68에서 유래된 HA로 안정하게 형질감염된 MDCK 세포를 사용하였다. 인간 단핵구를 PBMC로부터 단리하였고, 마크로파지로 분화시키기 위해 M-CSF 존재하에서 7일 동안 배양하였다. 인간 마크로파지 및 HA-발현 표적 세포를 각각 바이올렛 및 그린의 형광발광으로 표지하였다(CellTrace Violet 또는 CSFE, Invitrogen). 표지된 이펙터 및 표적 세포를 일련의 항체 희석물 존재하에서 6:1 비율로 2시간 동안 항온반응시킨 후, 유세포측정법으로 분석하였다.

식세포작용 비율은 그린 표적 세포에 대해서도 양성인 바이올렛 염색된 마크로파지 비율로 측정하였다(이중 양성). 도 3은 모든 항-HA 항체가 유사한 수준의 ADCP를 보임을 보여주며, 예상대로 대조군 항체는 식세포작용을 보이지 않았다.

[0384] 감염된 세포의 사멸을 매개하는데 보체와 함께 작용하는 항-HA 항체의 능력을 측정하기 위해서, 본 발명자는 CDC 어세이를 수행하였다. 이 어세이에서, MDCK 세포는 2의 MOI로 A/푸에르토리코/8/34를 감염시키고, 1:18의 이펙터 대 표적 비율로 일련의 항체 희석물, 및 토끼 유래 보체(Cedarlane)와 항온반응시켰다. 세포 사멸은 LDH 방출(Roche)로 측정하였다. 도 4는 모든 항-HA 항체가 보체 존재 하에서 세포 사멸을 매개하는 능력을 보여줌을 보여준다.

[0385] **실시예 8. 항-HA 항체의 예방 및 치료 효과**

[0386] 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 인간 중화 항체(nAb)의 보호성 효능은 6 내지 8주령 BALB/c(Harlan Laboratories) 마우스 모델에서 평가하였다. 마우스는 치사 바이러스 공격 전 또는 후에 상이한 용량의 nAb로 처리하였다.

[0387] 예방적 활성(도 5 & 6) 8마리의 그룹당 마우스를 0.1, 0.3, 1, 3 및 10 mg/kg 용량의 단일 복강내 주사(IP)로서 항체 3, 또는 10 mg/kg의 인간 이소타입 비관련 대조군 IgG를 100 ㎕ 부피에서 투여하였다. 투약 후 4시간째, 50 ㎕ 부피의 A/캘리포니아/7/09(H1N1)(H1-CA09) 또는 7:1 A/PR/8:A/HK/8/68 HA(H3N1)(H3-HK68) 재조합체의 7회 50% 마우스 치사 용량(7 MLD_{50})을 비내 접종하였다. 바이러스 공격 당일 또는 하루 전에 마우스의 체중 측정을 하고 체중 감량 및 생존에 대해 14일 동안 매일 모니터링하였다(체중 감량≥ 25%인 마우스를 안락사시킴). 항체 3은 용량 의존적 방식으로 보호성을 부여하였다. 1 mg/kg 또는 그 이상의 항체 3의 IP 주사는 H1-CA09(도 5) 및 H3-HK68(도 6)로 공격한 동물에서 완전한 보호성을 제공하였다. 보다 낮은 항체 용량(0.3 mg/kg)도 역시 90% 보호성으로 고도로 보호하였다. 예상한 바와 같이, 10 mg/kg의 이소타입 대조군 mAb를 받은 마우스는 모두 감염의 치사 공격에서 생존하지 못하였다.

[0388] 치료적 활성(도 7 & 8) 마우스를 H1-CA09의 3 MLD_{50}로 접종하고 감염 24시간 및 48시간 후(h.p.i.)에 항체 3을 주사(도 7)하거나 또는 72, 96 및 120 h.p.i.로 5 MLD_{50}의 H3-HK68을 주사하였다(도 8). 24 및 48 h.p.i.에서 30 mg/kg의 항체 3의 IP 처치는 H1-CA09로 공격한 마우스의 75-100%를 보호하였고, 72 및 96 h.p.i에서 H3-HK68로 공격한 마우스의 87.5-100%를 보호하였다. H1 및 H3 모델에서 0 또는 24 h.p.i.에서 동일 용량의 비관련 이소타입 대조군 항체의 처치는 각각 0 또는 12.5%의 생존률로 치사 공격으로부터 마우스를 보호하는데 실패하였다.

[0389] 항체 3 변이체의 치료적 활성(도 9 & 10) 마우스를 3 MLD_{50}의 H1-CA09로 접종하고 24 h.p.i.에 항체를 주사하거나(도 9) 또는 7 MLD_{50} H3-HK68을 접종하고 48 h.p.i.에 항체를 주사하였다(도 10). 2 mg/kg의 항체 3 및 변이체 mAb(항체 11, 항체 12, 및 항체 14)의 IP 처치는 H1-CA09로 공격한 마우스의 87.5-100%를 보호하였고, 및 3 mg/kg 용량의 상이한 nAb는 H3-HK68로 공격한 마우스의 50-87.5%를 보호하였다. 예상한 바와 같이, H1 및 H3 모델에서 24 또는 48 h.p.i에 동일 용량의 비관련 이소타입 대조군 항체 처치는 각각 0 또는 12.5%의 생존률로 마우스를 보호하는데 실패하였다.

[0390] **실시예 9. 항-HA 항체 및 소형 분자 억제제 오셀타미비어의 치료 효과**

[0391] 소형 분자 뉴라미니다아제(NA) 억제제, 오셀타미비어, 및 병용 요법의 효과와 항-HA nAb의 보호 효능을 직접 비교하기 위해서, 본 발명자는 실시예 8에 설명된 인플루엔자 감염 마우스 모델을 사용하였다.

[0392] 항-HA nAb 및 오셀타미비어의 치료적 비교(도 11 & 12) 마우스를 3 MLD_{50} 의 H1-CA09로 접종하고 4시간 전, 감염 후 1일 또는 2일에 개시한 10 mg/kg의 항체 12 또는 25 mg/kg의 5일간 BID의 오셀타미비어로 처치하였다(도 11). 감염 전 및 감염 후 1일에 항체 12에 의한 치료는 H1-CA09로 공격된 마우스를 100% 보호한 반면,오셀타미비어로 처치한 모든 동물은 감염을 견지지 못하였다. 감염 전 4시간에 동일 용량의 비관련 이소타입 대조군으로 처치된 모든 동물은 0% 생존률로 폐사하였다. 부가적으로, 마우스를 7 MLD_{50}의 H3-HK68로 접종한 후 10 mg/kg의 항체 12 또는 25 mg/kg의 5일간 BID의 오셀타미비어의 치료를 감염 후 1, 2, 3, 또는 4일에 개시하였다(도 12). 감염 후 1, 2, 또는 3일에 항체 12로 처치한 동물은 100% 생존률을 나타낸 반면, 동일 시점에 오셀타미비어로 처치는 오직 60%-20% 생존률을 보였다. 예상한 바와 같이, 감염 후 1일에 동일 용량의 비관련 이소타입 대조군 항체 1를 처치한 마우스는 10%의 생존률로 감염에 굴복하였다.

[0393] 항-HA nAb 및 오셀타미비어의 치료적 병용(도 13) 항-HA mAb와 오셀타미비어의 조합물의 부가적 효과를 평가하기 위해서, 마우스를 7 MLD_{50}의 H3-HK68로 접종하고 감염 후 3일에 최적이하 농도의 항체 12(2.5 또는 0.3 mg/kg), 25 mg/kg의 5일간 BID의 오셀타미비어, 또는 항체 12(2.5 또는 0.3 mg/kg) 및 25 mg/kg의 5일간 BID의 오셀타미비어의 조합물을 처치하였다(도 13). 항체 12 또는 오셀타미비어 단독 치료는 오직 10-20%의 동물을 보호한데 반해서, 오셀타미비어와 병용한 2.5 mg/kg의 항체 12의 치료는 80%의 동물을 보호하였고, 오셀타미비어와 병용한 0.3 mg/kg의 항체 12는 50%의 동물을 보호하였다.

[0394] **실시예 10. 흰담비에서 H5N1 인플루엔자 감염에 대한 항-HA 항체 및 소형 분자 억제제의 치료 효과**

[0395] 고병원성 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 항-HA nAb 및 오셀타미비어의 보호 효능을 5 내지 6월령 인플루엔자 혈청-음성 흰담비(삼중 F 농장)에서 평가하였다. 모든 흰담비는 1 mL(대략 0.5 mL/nare) 중 1 LD_{90}의 A/VN/1203/04(H5N1) 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스를 비내 공격하고, 25 mg/kg의 단일 용량의 항체 12 또는 25 mg/kg의 5일간 BID의 오셀타미비어를 감염 후 1, 2, 또는 3일에 개시하여 치료하였다. 생존률을 각 군(n=7)에 대해 계산하였다(도 14). 감염 후 1, 2, 또는 3일에 개시하여 항체 12로 치료한 흰담비를 비롯하여 감염 후 1일에 오셀타미비어로 처리한 것들은 생존률 100%로 보호되었다. 그러나, 오셀타미비어 치료를 감염 후 2일 및 3일에 개시한 경우, 흰담비는 각각 오직 71% 생존률(12일의 평균 폐사일) 및 29% 생존률(9일의 평균 폐사일)을 보였다. 예상한 바와 같이, 감염 후 1일에 25 mg/kg의 비관련 이소타입 대조군 항체를 처치한 동물은 0% 생존률로 생존에 실패하였다.

[0396] **실시예 11. 단일클론 항체 내성 돌연변이체(MARM)의 선별에 의한 에피토프 동정**

[0397] 항체 내성 돌연변이를 3종의 H3N2 바이러스로부터 2가지 상이한 방법을 사용해 단리하였다. A/아이치/2/68(아이치/68) H3N2는 바이러스 및 항체의 혼합물을 10 x96웰 플레이트의 웰 당 30,000 TCID50으로 MDCK 세포에 흡착시키기 전 1시간 동안 고농도의 항체 12(125xIC_{50})와 항온반응시키고 항체 12(10XIC_{50}) 존재하에서 배양하였다. 감염 후 3일까지 감염된 세포에 대해 세포 변성 효과(CPE)를 나타내는 3종의 추정 항체12 HK2/68 MARM를 단리하였다. HA 유전자를 RT-PCR로 증폭시킨 후 서열분석하였다. 서열 분석은 부모 서열과 비교하여 2 비동의 치환을 밝혀주었다(표 7). 이들 2 뉴클레오티드 변화는 각각 HA2의 고도로 보존된 줄기부 영역에서 아미노산 위치 18 및 19에서 이소류신(I)이 아르기닌(R)으로, 그리고 아스파르트산(D)이 티로신(Y)으로의 단일 아미노산 치환을 코딩한다. 다르게, 인플루엔자 H3N2 바이러스, A/위스콘신/67/2005(WI05), 및 ca A/파나마/2007/1999(Pa99)의 연속 계대를 2-5XIC_{50}에서 00XIC_{50}까지 항체 12의 상승 농도 존재하에 증식시켰다. 잠재적인 탈출 돌연변이체를 한계희석에 의해 서브클로닝하고 그들의 동족 HA 유전자를 서열 분석하였다. HA2의 위치 19에서 D에서 Y로 단일 아미노산 변화 및 위치 42에서 글루타민(Q)에서 R로의 단일 아미노산 변화가 동정되었다. 또한, D19Y와 조합하여 HA1 중 위치 156에서 히스티딘(H)에서 Q로의 아미노산 치환, 또는 HA2 중 잔기 45에 I에서 N으로 아미노산 변화와 조합하여 위치 19에 D에서 아스파라긴(N)으로의 아미노산 치환, 또는 Q42R과 조합하여 HA1에 위치 196에서 알라닌(A)에서 트레오닌(T)으로의 변화가 있는 이중 돌연변이가 관찰되었다(표 7). 유사하게, Pa99가 최대 100 x IC_{50}의 항체 12 농도 존재 하에서 연속 계대될 때, 단일 아미노산 치환이 HA2 잔기 42(Q42R) 및 45(I45T)에서 선별되었다(표 7). 표 7에 도시한 대표적인 MARM 변이체를 미세중화 어세이에서 사용하여 항체 12에 의한 중화에 대한 이들 MARM의 표현형적 감응성을 더욱 평가하였다. 그 결과 시험관내 선택된 돌연변이 D19Y, H156Q/D19Y, D19N/I45N, Q42R 또는 A196T/Q42R를 포함하는 WI05 MARM; Q42R 또는 I45T를 포함하는 Pa99 MARM, 및 돌연변이 D19Y 또는 I18R을 보유하는 아이치/68 MARM은 중화 항체에 덜 감수성이었고, 각각 그들의 부모 야생형 균주와 비교시 계산된 IC_{50} 값이 Pa99 내성 클론에 대해 > 8배부터 WI05에 대해 > 180배 범위로 증가된 것으로 확인되었다(표 8). 항체 12에 의한 중화에 대한 감수성에 대해 이들 아미노산 치환의 효과를 평가하기 위해서, 개별 돌연변이를 코딩하는 재조합 A/홍콩/1-5/68(rHK68) H3 변이체를 생성시키고, 미세중화 어세이를 사용해 평가하였다. 표 9에 도시한 바와 같이, H3 rHK68_I18R 및 rHK68_D19Y 변이체는 시험된 최고 농도(~200 ㎍/mL)에서 항체 12에 대한 내성을 나타냈고 야생형 rHK68 바이러스와 비교하여 항체 12 중화에 대한 감수성이 > 130배 감소되었다. rHK68에서 단일 아미노산 변화 Q42R은 항체 12에 의한 중화에 대한 감수성이 보통 정도로 약 8배 감소되었다. 그러나, 선택된 MARM의 HA 단백질에서 동정된 아미노산 치환(K156Q, A196T, I45N 또는 I45T)은 미세중화 어세이에서 항체 12에 대한 이러한 치환을 코딩하는 재조합 HK68 바이러스의 감수성을 변경시키지 않았다. 이들 결과는 항체 12가 HA2의 고도로 보존된 줄기부 영역에 입체형태 에피토프를 인식하고 위치 18, 19 42 또는 45의 아미노산이 핵심 접촉 잔기임을 시사한다.

표 7

표 7. 항체 12 내성 돌연변이체의 H3 HA 에서 동정된 아미노산 치환

H3N2 바이러스	뉴클레오티드 변화	HA 에서 아미노산 변화	HA 서브유닛 내 위치
A/위스콘신/67/2005	G1090T	D19Y	HA2
	C156A, G1090T	H156Q, D19Y	HA1, HA2
	A1160G	Q42R	HA2
	G634A, A1160G	A196T, Q42R	HA1,HA2
	G1090A, T1169A	D19N, I45N	HA2,HA2
ca A/파나마/2007/99	A1160G	Q42R	HA2
	T1169C	I45T	HA2
A/아이치/2/68	G1090T	D19Y	HA2
	T1088G	I18R	HA2

[0398]

표 8

표 8. 항체 12 중화(Neut)에 대한 H3 내성 변이체의 감수성

부모 H3N2 바이러스	시험된 MARM 의 HA 에서 아미노산 변화	Avg. Neut. (μg/ml)	야생형 바이러스 대비 배수 변화
A/위스콘신/67/2005	야생형	1.09	
	D19Y	>200	>180
	Q42R	>200	>180
	H156Q/D19Y	>200	>180
	D19N/I45N	>200	>180
	A196T/Q42R	>200	>180
ca A/파나마/2007/99	야생형	6.68	
	Q42R	>600	>90
	I45T	54.51	8.16
A/아이치/2/68	야생형	3.98	
	D19Y	>50	>12
	I18R	>50	>12

[0399]

표 9

표 9. 항체 12 중화(Neut)에 대한 rHK68 H3 변이체의 감수성

재조합체 바이러스_돌연변이	Avg. Neut. (μg/ml)	야생형 바이러스 대비 배수 변화
rHK68 야생형	1.42	1
rHK68_I18R	>200	>130
rHK68_D19N	3.04	2.01
rHK68_D19Y	>200	>130
rHK68_Q42R	11.13	7.82
rHK68_I45N	1.94	1.28
rHK68_I45T	3.38	2.23
rHK68_K156Q	3.33	2.34
rHK68_A196T	4.06	2.85

[0400]

표 10

표 10. 항-HA 항체 시리즈 VH 동일성 비율

VH 동일성 비율

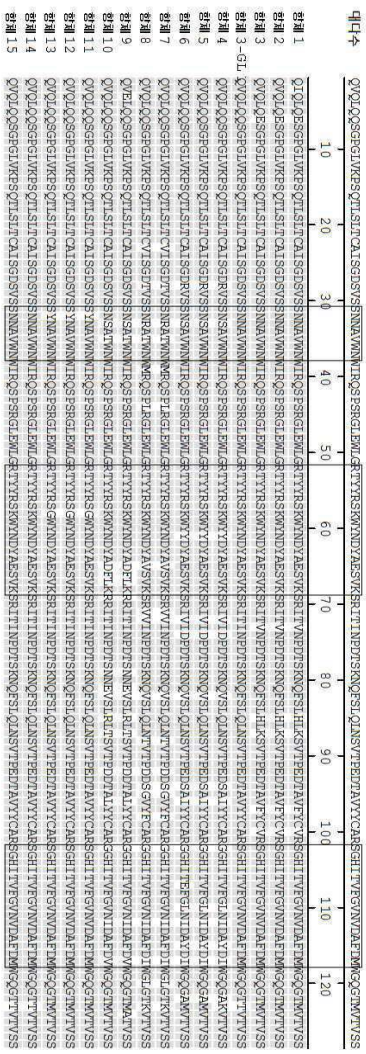
분기	1	2	3	3-GL	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1		99.2	99.2	93.8	82.8	83.6	82.8	78.9	78.9	82.0	83.6	93.0	93.0	93.0	93.8	93.8	1
2	0.8		100.0	94.5	83.6	84.4	83.6	79.7	79.7	82.8	84.4	93.8	93.8	93.8	94.5	94.5	2
3	0.8	0.0		94.5	83.6	84.4	83.6	79.7	79.7	82.8	84.4	93.8	93.8	93.8	94.5	94.5	3
3-GL	6.5	5.7	5.7		88.3	88.3	87.5	84.4	84.4	85.2	86.7	97.7	97.7	97.7	100.0	100.0	3-GL
4	19.6	18.6	18.6	12.8		99.2	98.4	85.2	85.2	82.0	83.6	86.7	86.7	86.7	88.3	88.3	4
5	18.6	17.6	17.6	12.8	0.8		99.2	84.4	84.4	82.8	84.4	87.5	87.5	87.5	88.3	88.3	5
6	19.6	18.6	18.6	13.7	1.6	0.8		83.6	83.6	82.0	83.6	86.7	86.7	86.7	87.5	87.5	6
7	24.8	23.7	23.7	17.6	16.6	17.6	18.6		100.0	80.5	82.0	82.8	82.8	82.8	84.4	84.4	7
8	24.8	23.7	23.7	17.6	16.6	17.6	18.6	0.0		80.5	82.0	82.8	82.8	82.8	84.4	84.4	8
9	20.6	19.6	19.6	16.6	20.6	19.6	20.6	22.7	22.7		98.4	84.4	84.4	84.4	85.2	85.2	9
10	18.6	17.6	17.6	14.7	18.6	17.6	18.6	20.6	20.6	1.6		85.9	85.9	85.9	86.7	86.7	10
11	7.4	6.5	6.5	2.4	14.7	13.7	14.7	19.6	19.6	17.6	15.6		100.0	100.0	97.7	97.7	11
12	7.4	6.5	6.5	2.4	14.7	13.7	14.7	19.6	19.6	17.6	15.6	0.0		100.0	97.7	97.7	12
13	7.4	6.5	6.5	2.4	14.7	13.7	14.7	19.6	19.6	17.6	15.6	0.0	0.0		97.7	97.7	13
14	6.5	5.7	5.7	0.0	12.8	12.8	13.7	17.6	17.6	16.6	14.7	2.4	2.4	2.4		100.0	14
15	6.5	5.7	5.7	0.0	12.8	12.8	13.7	17.6	17.6	16.6	14.7	2.4	2.4	2.4	0.0		15
	1	2	3	3-GL	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	

항체 1
항체 2
항체 3
항체 3-GL
항체 4
항체 5
항체 6
항체 7
항체 8
항체 9
항체 10
항체 11
항체 12
항체 13
항체 14
항체 15

[0401]

표 11

표 11. 항-HA 항체 시리즈 VH 정렬



[0402]

표 12

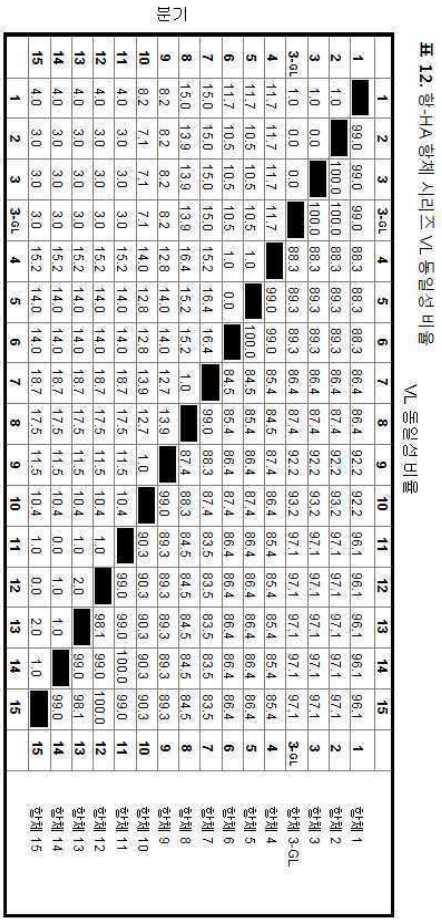


표 12. 항-HA 항체 시리즈 VL 동일성 비율

VL 동일성 비율

분기

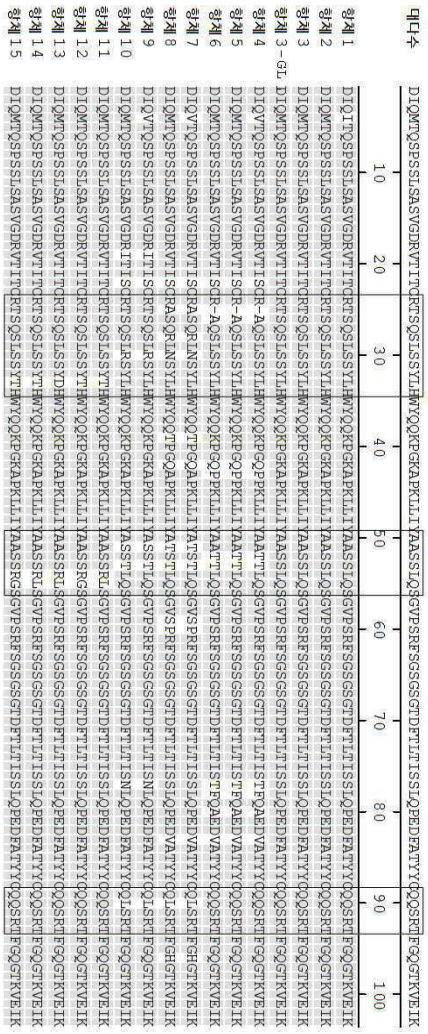
	1	2	3	3-GL	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1		99.0	99.0	99.0	88.3	88.3	88.3	86.4	86.4	92.2	92.2	96.1	96.1	96.1	96.1	97.1	1
2	1.0		100.0	100.0	88.3	89.3	89.3	86.4	87.4	92.2	93.2	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	2
3	1.0	0.0		100.0	88.3	89.3	89.3	86.4	87.4	92.2	93.2	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	3
3-GL	1.0	0.0	0.0		88.3	89.3	89.3	86.4	87.4	92.2	93.2	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	3-GL
4	11.7	11.7	11.7	11.7		99.0	99.0	85.4	84.5	87.4	86.4	85.4	85.4	85.4	85.4	85.4	4
5	11.7	10.5	10.5	10.5	1.0		100.0	84.5	85.4	86.4	87.4	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	5
6	11.7	10.5	10.5	10.5	1.0	0.0		84.5	85.4	86.4	87.4	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	6
7	15.0	15.0	15.0	15.0	15.2	16.4	16.4		99.0	88.3	87.4	83.5	83.5	83.5	83.5	83.5	7
8	15.0	13.9	13.9	13.9	16.4	15.2	15.2	1.0		87.4	88.3	84.5	84.5	84.5	84.5	84.5	8
9	8.2	8.2	8.2	8.2	12.8	14.0	14.0	12.7	13.9		99.0	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	9
10	8.2	7.1	7.1	7.1	14.0	12.8	12.8	13.9	12.7	1.0		90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	10
11	4.0	3.0	3.0	3.0	15.2	14.0	14.0	18.7	17.5	11.5	10.4		99.0	99.0	100.0	99.0	11
12	4.0	3.0	3.0	3.0	15.2	14.0	14.0	18.7	17.5	11.5	10.4	1.0		98.1	99.0	100.0	12
13	4.0	3.0	3.0	3.0	15.2	14.0	14.0	18.7	17.5	11.5	10.4	1.0	2.0		99.0	98.1	13
14	4.0	3.0	3.0	3.0	15.2	14.0	14.0	18.7	17.5	11.5	10.4	0.0	1.0	1.0		99.0	14
15	4.0	3.0	3.0	3.0	15.2	14.0	14.0	18.7	17.5	11.5	10.4	1.0	0.0	2.0	1.0		15
	1	2	3	3-GL	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	

항체 1
항체 2
항체 3
항체 3-GL
항체 4
항체 5
항체 6
항체 7
항체 8
항체 9
항체 10
항체 11
항체 12
항체 13
항체 14
항체 15

[0403]

표 13

표 13. 항-HA 항체 시리즈 VL 정렬



[0404]

[0405] 인플루엔자 A 참조문헌:

Corti, D., et al. 2010. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. J Clin Invest 120:1663-1673.

Corti, D., et al. 2011. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. Science 333:850-856.

Corti D., et al. 2013. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. Nature 501(7467):439-43.

Ekiert, D. C. et al. 2009. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. Science 324: 246-251.

Ekiert, D. C. et al .2011. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. Science 333:843-850.

Ekiert, D.C., et al. 2012. Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. Nature 489: 526-532.

Krause, J. C., et al. 2011. A broadly Neutralizing human monoclonal antibody that recognizes a conserved, novel epitope on the globular head of the influenza H1N1 virus hemagglutinin. J. Virol. 85:10905-10908.

Lee, P.S., et al. 2012. Heterosubtypic antibody recognition of the influenza virus hemagglutinin receptor binding site enhanced by avidity. Proc Natl Acad Sci U S A. 109: 17040-17045

Li G.M. et al 2012. Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. Proc Natl Acad Sci U S A.109:9047-9052.

[0406]

Nakamura G. et al 2013. An *in vivo* human-plasmablast enrichment technique allows rapid identification of therapeutic influenza a antibodies. Cell host microbe 14:93-103

Sui, J., et al. 2009. Structure and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. Nat Struct Mol Biol 16: 265-273.

Throsby, M., et al. 2008. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. PLoS One 3: e3492

Wang T.T., et al., 2010. Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. PLoS Pathog. 6(2):e1000796.

Whittle, J. R. R., et al. 2011. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:14216-14221.

Wrammert, J., et al. 2011. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. J Exp Med. 208:181-193.

[0407]

[0408] **서열 목록 정보**

항체 1 (원본 cDNA)

서열번호 1

cagatacagctgcaggagtcgggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctcactcacctgtgccat
ctccggggacagtgtctctagcaacaatgctgtttggaactggatcaggcagtccccatcgagaggccttga
gtggctgggaaggacatactacaggtccaagtggtataatgattatgcagaatctgtgaaaagtcgaataa
ccgtcaatccagacacatccaagaaccagttctccctgcacctgaagtctgtgactcccgaggacacggct
gtgttttactgtgtacgatctggccacattacggtttttggagtgaatgttgacgcttttgatatgtggggccaagg
gacaatggtcaccgtctcttcag

서열번호 2

QIQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNNAVWNWIRQSPSRGLEWLG
RTYYRSKWYNDYAESVKSRITVNPDTSKNQFSLHLKSVTPEDTAVFYCVRS
GHITVFGVNVDAFDMWGQGTMVTVSS

서열번호 3 HCDR1 SNNAVWN
서열번호 4 HCDR2 RTYYRSKWYNDYAESVKS
서열번호 5 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

서열번호 6

gacatccagatcacccagtcgccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtaaccatcacttgccgg
acaagtcagagccttagtagctatttacattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatc
tatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactct
caccatcagtagtctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagtcggacgttcggccaagg
gaccaaggtggaaatcaaa

서열번호 7

DIQITQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYLHWYQQKPGKAPKLLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 8 LCDR1 RTSQSLSSYLH

[0409]

서열번호 9 LCDR2 AASSLQS
서열번호 10 LCDR3 QQSRT

항체 2 (항체 1 의 발현형)

서열번호 11

caggtacagctgcaggagtcgggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctcactcacctgtgccat
ctccggggacagtgtctctagcaacaatgctgtttggaactggatcaggcagtccccatcgagaggccttga
gtggctgggaaggacatactacaggtccaagtggtataatgattatgcagaatctgtgaaaagtcgaataa
ccgtcaatccagacacatccaagaaccagttctccctgcacctgaagtctgtgactcccgaggacacggct
gtgttttactgtgtacgatctggccacattacggtttttggagtgaatgttgacgcttttgatatgtggggccaagg
gacaatggtcaccgtctcttcag

서열번호 12

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNNAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYNDYAESVKSRITVNPDTSKNQFSLHLKSVTPEDTAVFYCVR
SGHITVFGVNVDAFDMWGQGTMVTVSS

서열번호 13 HCDR1 SNNAVWN
서열번호 14 HCDR2 RTYYRSKWYNDYAESVKS
서열번호 15 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

서열번호 16

gacatccagatgacccagtcgccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtaaccatcacttgccgg
acaagtcagagccttagtagctatttacattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatc
tatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactct
caccatcagtagtctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagtcggacgttcggccaagg
gaccaaggtggaaatcaaa

서열번호 17

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYLHWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

[0410]

서열번호 18 LCDR1 RTSQSLSSYLH
서열번호 19 LCDR2 AASSLQS
서열번호 20 LCDR3 QQSRT

항체 3 (코돈 최적화된 항체 2)

서열번호 21
caggtccagctgcaggagagcggccccggactggtcaagccttcacagacactgagcctgacatgcgcc
attagcggagatagcgtgagctccaacaatgccgtgtggaactggatcaggcagtctccaagtcgaggac
tggagtggctgggacgaacatactatagatccaagtggtacaatgactatgctgaatcagtgaaaagccg
aattactgtcaaccccgatacctccaagaatcagttctctctgcacctgaaaagtgtgaccctgaggacac
agccgtgttctactgcgtcagaagcggccatatcaccgtctttggcgtcaatgtggatgctttcgatatgtggg
ggcaggggactatggtcaccgtgtcaagc

서열번호 22
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNNAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYNDYAESVKSRITVNPDTSKNQFSLHLKSVTPEDTAVFYCVR
SGHITVFGVNVDAFDMWGQGTMVTVSS

서열번호 23 HCDR1 SNNAVWN
서열번호 24 HCDR2 RTYYRSKWYNDYAESVKS
서열번호 25 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

서열번호 26
gatattcagatgacccagagcccttccagcctgtccgcttcagtgggggatcgagtgaccattacctgccga
accagccagagcctgagctcctacctgcactggtatcagcagaagcccggcaaagcccctaagctgctg
atctacgccgcttctagtctgcagtccggagtgcccaagccggttctccggatctgggagtggaaccgacttta
ccctgacaatttcaagcctgcagcccgaggatttcgctacatactactgtcagcagagcagaactttcgggc
agggcactaaggtggagatcaaa

[0411]

서열번호 27
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYLHWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 28 LCDR1 RTSQSLSSYLH
서열번호 29 LCDR2 AASSLQS
서열번호 30 LCDR3 QQSRT

항체 4 (원본 cDNA) HCDR3 의 축퇴성 뉴클레오티드, t 또는 a

서열번호 31
caggtccagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctcactcacctgtgccat
ctccggggacagagtctctagcaacagtgctgtttggaactggatcaggcagtccccatcgagaggcctcg
agtggctgggaaggacatattacaggtccaaatggtattatgattatgcagaatctgtgaaaagtcgaatagt
tatcgacccagacacatccaagaaccaggtctccctgcagttgaattctgtgactcccgaggactcggctat
atattactgtgcaagaggtggccacattacggtgtttgggctgaatattgacgcttatgatatttggggccaag
gggcaaaggtcaccgtgtcttcag

서열번호 32
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDRVSSNSAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYYDYAESVKSRIVIDPDTSKNQVSLQLNSVTPEDSAIYYCARG
GHITVFGLNIDAYDIWGQGAKVTVSS

서열번호 33 HCDR1 SNSAVWN
서열번호 34 HCDR2 RTYYRSKWYYDYAESVKS
서열번호 35 HCDR3 GGHITVFGLNIDAYDI

서열번호 36
gacatccaggtgacccagtctccgtcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatctcttgccggg
cacagagccttagcagctacttacattggtatcagcagaaaccagggcaaccccctaaactcctgatctat
gctgcaaccactttgcaaagtggggtcccatcacggttcagtggtagtggatctgggacagatttcactctca
ccatcagtactttccaagctgaagatgttgccacttactattgtcaacagagtcggacgttcggccaagggac
caaggttgaaatcaaac

[0412]

서열번호 37
DIQVTQSPSSLSASVGDRVTISCRAQSLSSYLHWYQQKPGQPPKLLIYAATT
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISTFQAEDVATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 38 LCDR1 RAQSLSSYLH
서열번호 39 LCDR2 AATTLQS
서열번호 40 LCDR3 QQSRT

항체 5 (항체 4 HCDR3 V 의 발현형)

서열번호 41
caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctcactcacctgtgccat
ctccggggacagagtctctagcaacagtgctgtttggaactggatcaggcagtccccatcgagaggcctcg
agtggctgggaaggacatattacaggtccaaatggtattatgattatgcagaatctgtgaaaagtcgaatagt
tatcgacccagacacatccaagaaccaggtctccctgcagttgaattctgtgactcccgaggactcggctat
atattactgtgcaagaggtggccacattacggtgtttgggctgaatattgacgcttatgatatttggggccaag
gggcaatggtcaccgtctcttcag

서열번호 42
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDRVSSNSAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYYDYAESVKSRIVIDPDTSKNQVSLQLNSVTPEDSAIYYCARG
GHITVFGLNIDAYDIWGQGAMVTVSS

서열번호 43 HCDR1 SNSAVWN
서열번호 44 HCDR2 RTYYRSKWYYDYAESVKS
서열번호 45 HCDR3 GGHITVFGLNIDAYDI

[0413]

서열번호 46
gacatccagatgacccagtctccgtcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatctcttgccggg
cacagagccttagcagctacttacattggtatcagcagaaaccagggcaaccccctaaactcctgatctat
gctgcaaccactttgcaaagtggggtcccatcacggttcagtggtagtggatctgggacagatttcactctca
ccatcagtactttccaagctgaagatgttgccacttactattgtcaacagagtcggacgttcggccaagggac
caaggtggagatcaaac

서열번호 47
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRAQSLSSYLHWYQQKPGQPPKLLIYAATT
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISTFQAEDVATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 48 LCDR1 RAQSLSSYLH
서열번호 49 LCDR2 AATTLQS
서열번호 50 LCDR3 QQSRT

항체 6 (항체 4 HCDR3 E 의 발현형)

서열번호 51
caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctcactcacctgtgccat
ctccggggacagagtctctagcaacagtgctgtttggaactggatcaggcagtccccatcgagaggcctcg
agtggctgggaaggacatattacaggtccaaatggtattatgattatgcagaatctgtgaaaagtcgaatagt
tatcgacccagacacatccaagaaccaggtctccctgcagttgaattctgtgactcccgaggactcggctat
atattactgtgcaagaggtggccacattacggagtttgggctgaatattgacgcttatgatatttggggccaag
gggcaatggtcaccgtctcttcag

서열번호 52
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDRVSSNSAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYYDYAESVKSRIVIDPDTSKNQVSLQLNSVTPEDSAIYYCARG
GHITEFGLNIDAYDIWGQGAMVTVSS

서열번호 53 HCDR1 SNSAVWN
서열번호 54 HCDR2 RTYYRSKWYYDYAESVKS

[0414]

서열번호 55 HCDR3 GGHITEFGLNIDAYDI

서열번호 56
gacatccagatgacccagtctccgtcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatctcttgccggg
cacagagccttagcagctacttacattggtatcagcagaaaccagggcaaccccctaaactcctgatctat
gctgcaaccactttgcaaagtggggtcccatcacggttcagtggtagtggatctgggacagatttcactctca
ccatcagtactttccaagctgaagatgttgccacttactattgtcaacagagtcggacgttcggccaagggac
caaggtggagatcaaac

서열번호 57
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRAQSLSSYLHWYQQKPGQPPKLLIYAATT
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISTFQAEDVATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 58 LCDR1 RAQSLSSYLH
서열번호 59 LCDR2 AATTLQS
서열번호 60 LCDR3 QQSRT

항체 7 (원본 cDNA)

서열번호 61
caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctccctcacctgtgtcat
ctccggagacactgtctctagcaacagagctacttggaattggatgaggcagtccccattgagaggccttga
gtggctgggaaggacatactacaggtccaagtggtataatgattacgcagtttctgtgaaaagtcgagtagt
catcaacccagacacatccaagaaccaagtctccctgcagttgaacactgtgactcccgatgactcgggtg
tatacttttgtgcaagaggtggccacatcacggtctttggagtgaatattgacgcttttgacatctggggcctcg
ggacaaaggtcaccgtctcttcag

서열번호 62
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCVISGDTVSSNRATWNWMRQSPLRGLEWL
GRTYYRSKWYNDYAVSVKSRVVINPDTSKNQVSLQLNTVTPDDSGVYFCAR
GGHITVFGVNIDAFDIWGLGTKVTVSS

[0415]

서열번호 63 HCDR1 SNRATWN
서열번호 64 HCDR2 RTYYRSKWYNDYAVSVKS
서열번호 65 HCDR3 GGHITVFGVNIDAFDI

서열번호 66
gacatccaggtgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagttaccatctcttgccggg
caagtcagagacttaatagttatctacattggtatcagcagacaccagggcaagccccgaagctgctgatct
atgcaacgtccactttgcaaagtggggtctcaccaagattcagtggcagtggatctgggacagatttcactct
caccatcagcagtctccaacctgaagatgttgcaacttactactgtcaattgagtcggacgttcggccacgg
gaccaaggttgaaatcaaac

서열번호 67
DIQVTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQRLNSYLHWYQQTPGQAPKLLIYATS
TLQSGVSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQLSRTFGHGTKVEIK

서열번호 68 LCDR1 RASQRLNSYLH
서열번호 69 LCDR2 ATSTLQS
서열번호 70 LCDR3 QLSRT

항체 8 (항체 7의 발현형)

서열번호 71
caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctccctcacctgtgtcat
ctccggagacactgtctctagcaacagagctacttggaattggatgaggcagtccccattgagaggccttga
gtggctgggaaggacatactacaggtccaagtggtataatgattacgcagtttctgtgaaaagtcgagtagt
catcaacccagacacatccaagaaccaagtctccctgcagttgaacactgtgactcccgatgactcgggtg
tatacttttgtgcaagaggtggccacatcacggtctttggagtgaatattgacgcttttgacatctggggcctcg
ggacaaaggtcaccgtctcttcag

[0416]

서열번호 72
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCVISGDTVSSNRATWNWMRQSPLRGLEWL
GRTYYRSKWYNDYAVSVKSRVVINPDTSKNQVSLQLNTVTPDDSGVYFCAR
GGHITVFGVNIDAFDIWGLGTKVTVSS

서열번호 73 HCDR1 SNRATWN
서열번호 74 HCDR2 RTYYRSKWYNDYAVSVKS
서열번호 75 HCDR3 GGHITVFGVNIDAFDI

서열번호 76
gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagttaccatctcttgccggg
caagtcagagacttaatagttatctacattggtatcagcagacaccagggcaagccccgaagctgctgatct
atgcaacgtccactttgcaaagtggggtctcaccaagattcagtggcagtggatctgggacagatttcactct
caccatcagcagtctccaacctgaagatgttgcaacttactactgtcaattgagtcggacgttcggccacgg
gaccaaggtggaaatcaaac

서열번호 77
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQRLNSYLHWYQQTPGQAPKLLIYATS
TLQSGVSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQLSRTFGHGTKVEIK

서열번호 78 LCDR1 RASQRLNSYLH
서열번호 79 LCDR2 ATSTLQS
서열번호 80 LCDR3 QLSRT

항체 9(원본 cDNA)
서열번호 81
caagtagagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctcactcacctgtgccat
ctccggggacagtgtctctagcaacagtgctacttggaactggatcaggcagtccccatcgagaggccttg
agtggctgggaaggacatactacaggtccaagtggtataatgattatgcagattttctgaaaaggcgaataa
ccatcaatccagacacatccaacaacgaggtctccctgcggctgacctctgtgactcccgacgacacggct
ttgtattactgtgcaagaggtggccacattacggtgtttggagtgaatattgacgcctttgacgtctggggccaa
gggacaatggccaccgtctcttcag

[0417]

서열번호 82
QVELQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYNDYADFLKRRITINPDTSNNEVSLRLTSVTPDDTALYYCARG
GHITVFGVNIDAFDVWGQGTMATVSS

서열번호 83 HCDR1 SNSATWN
서열번호 84 HCDR2 RTYYRSKWYNDYADFLKR
서열번호 85 HCDR3 GGHITVFGVNIDAFDV

서열번호 86
gacatccaggtgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagaatcaccatctcttgccgga
caagtcagagccttaggagctatttacattggtatcagcaaaaaccagggaaagcccctaagctcctgatct
atgcttcatccactttacaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctc
accatcagcaatctccaacctgaagattttgcaacttactactgtcaactgagtcggacgttcggccaaggg
accaaggttgaaatcaaac

서열번호 87
DIQVTQSPSSLSASVGDRITISCRTSQSLRSYLHWYQQKPGKAPKLLIYASST
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISNLQPEDFATYYCQLSRTFGQGTKVEIK

서열번호 88 LCDR1 RTSQSLRSYLH
서열번호 89 LCDR2 ASSTLQS
서열번호 90 LCDR3 QLSRT

항체 10(항체 9의 발현형)

서열번호 91
caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctcactcacctgtgccat
ctccggggacagtgtctctagcaacagtgctacttggaactggatcaggcagtccccatcgagaggccttg
agtggctgggaaggacatactacaggtccaagtggtataatgattatgcagattttctgaaaaggcgaataa
ccatcaatccagacacatccaacaacgaggtctccctgcggctgacctctgtgactcccgacgacacggct

[0418]

ttgtattactgtgcaagaggtggccacattacggtgtttggagtgaatattgacgcctttgacgtctggggccaa
gggacaatggtcaccgtctcttcag

서열번호 92
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYNDYADFLKRRITINPDTSNNEVSLRLTSVTPDDTALYYCARG
GHITVFGVNIDAFDVWGQGTMVTVSS

서열번호 93 HCDR1 SNSATWN
서열번호 94 HCDR2 RTYYRSKWYNDYADFLKR
서열번호 95 HCDR3 GGHITVFGVNIDAFDV

서열번호 96
gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagaatcaccatcttgccgga
caagtcagagccttaggagctatttacattggtatcagcaaaaaccagggaaagcccctaagctcctgatct
atgcttcatccactttacaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctc
accatcagcaatctccaacctgaagattttgcaacttactactgtcaactgagtcggacgttcggccaaggg
accaaggtggagatcaaac

서열번호 97
DIQMTQSPSSLSASVGDRITISCRTSQSLRSYLHWYQQKPGKAPKLLIYASS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISNLQPEDFATYYCQLSRTFGQGTKVEIK

서열번호 98 LCDR1 RTSQSLRSYLH
서열번호 99 LCDR2 ASSTLQS
서열번호 100 LCDR3 QLSRT

항체 11

서열번호 101
caggtccagctgcagcagagcggccccggactggtcaagccttcacagacactgagcctgacatgcgcc
attagcggagatagcgtgagctcctacaatgccgtgtggaactggatcaggcagtctccaagtcgaggact

[0419]

ggagtggctgggacgaacatactatagatccgggtggtacaatgactatgctgaatcagtgaaaagccga
attactatcaaccccgatacctccaagaatcagttctctctgcagctgaacagtgtgacccctgaggacaca
gccgtgtactactgcgccagaagcggccatatcaccgtctttggcgtcaatgtggatgctttcgatatgtgggg
gcaggggactatggtcaccgtgtcaagc

서열번호 102
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSYNAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSGWYNDYAESVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
SGHITVFGVNVDAFDMWGQGTMVTVSS

서열번호 103 HCDR1 SYNAVWN
서열번호 104 HCDR2 RTYYRSGWYNDYAESVKS
서열번호 105 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

서열번호 106
gatattcagatgacccagagcccttccagcctgtccgcttcagtgggggatcgagtgaccattacctgccga
accagccagagcctgagctcctacacgcactggtatcagcagaagcccggcaaagcccctaagctgctg
atctacgccgcttctagtcggctgtccggagtgccaagccggttctccggatctgggagtggaaccgacttta
ccctgacaatttcaagcctgcagcccgaggatttcgctacatactactgtcagcagagcagaactttcgggc
agggcactaaggtggagatcaaa

서열번호 107
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SRLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 108 LCDR1 RTSQSLSSYTH
서열번호 109 LCDR2 AASSRLS
서열번호 110 LCDR3 QQSRT

항체 12

[0420]

서열번호 111

caggtccagctgcagcagagcggccccggactggtcaagccttcacagacactgagcctgacatgcgcc
attagcggagatagcgtgagctcctacaatgccgtgtggaactggatcaggcagtctccaagtcgaggact
ggagtggctgggacgaacatactatagatccgggtggtacaatgactatgctgaatcagtgaaaagccga
attactatcaaccccgatacctccaagaatcagttctctctgcagctgaacagtgtgacccctgaggacaca
gccgtgtactactgcgccagaagcggccatatcaccgtctttggcgtcaatgtggatgctttcgatatgtgggg
gcaggggactatggtcaccgtgtcaagc

서열번호 112

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSYNAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSGWYNDYAESVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
SGHITVFGVNVDAFDMWGQGTMVTVSS

서열번호 113 HCDR1 SYNAVWN
서열번호 114 HCDR2 RTYYRSGWYNDYAESVKS
서열번호 115 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

서열번호 116

gatattcagatgacccagagcccttccagcctgtccgcttcagtgggggatcgagtgaccattacctgccga
accagccagagcctgagctcctacacgcactggtatcagcagaagcccggcaaagcccctaagctgctg
atctacgccgcttctagtcgggggtccggagtgccaagccggttctccggatctgggagtggaaccgacttt
accctgacaatttcaagcctgcagcccgaggatttcgctacatactactgtcagcagagcagaactttcggg
cagggcactaaggtggagatcaaa

서열번호 117

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SRGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 118 LCDR1 RTSQSLSSYTH
서열번호 119 LCDR2 AASSRGS
서열번호 120 LCDR3 QQSRT

[0421]

항체 13

서열번호 121

caggtccagctgcagcagagcggccccggactggtcaagccttcacagacactgagcctgacatgcgcc
attagcggagatagcgtgagctcctacaatgccgtgtggaactggatcaggcagtctccaagtcgaggact
ggagtggctgggacgaacatactatagatccgggtggtacaatgactatgctgaatcagtgaaaagccga
attactatcaaccccgatacctccaagaatcagttctctctgcagctgaacagtgtgacccctgaggacaca
gccgtgtactactgcgccagaagcggccatatcaccgtctttggcgtcaatgtggatgctttcgatatgtgggg
gcaggggactatggtcaccgtgtcaagc

서열번호 122

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSYNAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSGWYNDYAESVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
SGHITVFGVNVDAFDMWGQGTMVTVSS

서열번호 123 HCDR1 SYNAVWN
서열번호 124 HCDR2 RTYYRSGWYNDYAESVKS
서열번호 125 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

서열번호 126

gatattcagatgacccagagcccttccagcctgtccgcttcagtgggggatcgagtgaccattacctgccga
accagccagagcctgagctcctacgaccactggtatcagcagaagcccggcaaagcccctaagctgctg
atctacgccgcttctagtcggctgtccggagtgccaagccggttctccggatctgggagtggaaccgacttta
ccctgacaatttcaagcctgcagcccgaggatttcgctacatactactgtcagcagagcagaactttcgggc
agggcactaaggtggagatcaaa

서열번호 127

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYDHWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SRLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 128 LCDR1 RTSQSLSSYDH
서열번호 129 LCDR2 AASSRLS

[0422]

서열번호 130 LCDR3 QQSRT

항체 14

서열번호 131

caggtccagctgcagcagagcggccccggactggtcaagccttcacagacactgagcctgacatgcgcc
attagcggagatagcgtgagctccaacaatgccgtgtggaactggatcaggcagtctccaagtcgaggac
tggagtggctgggacgaacatactatagatccaagtggtacaatgactatgctgaatcagtgaaaagccg
aattactatcaaccccgatacctccaagaatcagttctctctgcagctgaacagtgtgaccctgaggacac
agccgtgtactactgcgccagaagcggccatatcaccgtctttggcgtcaatgtggatgctttcgatatgtggg
ggcaggggaccacagtcaccgtctcctca

서열번호 132

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNNAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYNDYAESVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
SGHITVFGVNVDAFDMWGQGTTVTVSS

서열번호 133 HCDR1 SNNAVWN
서열번호 134 HCDR2 RTYYRSKWYNDYAESVKS
서열번호 135 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

서열번호 136

gatattcagatgacccagagcccttccagcctgtccgcttcagtgggggatcgagtgaccattacctgccga
accagccagagcctgagctcctacacgcactggtatcagcagaagcccggcaaagcccctaagctgctg
atctacgccgcttctagtcggctgtccggagtgccaagccggttctccggatctgggagtggaaccgacttta
ccctgacaatttcaagcctgcagcccgaggatttcgctacatactactgtcagcagagcagaactttcgggc
agggcactaaggtggagatcaaa

서열번호 137

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SRLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

[0423]

서열번호 138 LCDR1 RTSQSLSSYTH
서열번호 139 LCDR2 AASSRLS
서열번호 140 LCDR3 QQSRT

항체 15

서열번호 141

caggtccagctgcagcagagcggccccggactggtcaagccttcacagacactgagcctgacatgcgcc
attagcggagatagcgtgagctccaacaatgccgtgtggaactggatcaggcagtctccaagtcgaggac
tggagtggctgggacgaacatactatagatccaagtggtacaatgactatgctgaatcagtgaaaagccg
aattactatcaaccccgatacctccaagaatcagttctctctgcagctgaacagtgtgaccctgaggacac
agccgtgtactactgcgccagaagcggccatatcaccgtctttggcgtcaatgtggatgctttcgatatgtggg
ggcaggggaccacagtcaccgtctcctca

서열번호 142

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNNAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYNDYAESVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
SGHITVFGVNVDAFDMWGQGTTVTVSS

서열번호 143 HCDR1 SNNAVWN
서열번호 144 HCDR2 RTYYRSKWYNDYAESVKS
서열번호 145 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

서열번호 146

gatattcagatgacccagagcccttccagcctgtccgcttcagtgggggatcgagtgaccattacctgccga
accagccagagcctgagytcctacacgcactggtatcagcagaagcccggcaaagcccctaagctgctg
atctacgccgcttctagtcgggggtccggagtgccaagccggttctccggatctgggagtggaaccgacttt
accctgacaatttcaagcctgcagcccgaggatttcgctacatactactgtcagcagagcagaactttcggg
cagggcactaaggtggagatcaaa

[0424]

서열번호 147
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SRGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 148 LCDR1 RTSQSLSSYTH
서열번호 149 LCDR2 AASSRGS
서열번호 150 LCDR3 QQSRT

항체 3-GL

서열번호 151
caggtccagctgcagcagagcggccccggactggtcaagccttcacagacactgagcctgacatgcgcc
attagcggagatagcgtgagctccaacaatgccgtgtggaactggatcaggcagtctccaagtcgaggac
tggagtggctgggacgaacatactatagatccaagtggtacaatgactatgctgaatcagtgaaaagccg
aattactatcaaccccgatacctccaagaatcagttctctctgcagctgaacagtgtgaccctgaggacac
agccgtgtactactgcgccagaagcggccatatcaccgtctttggcgtcaatgtggatgctttcgatatgtggg
ggcaggggaccacagtcaccgtctcctca

서열번호 152
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNNAVWNWIRQSPSRGLEWL
GRTYYRSKWYNDYAESVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
SGHITVFGVNVDAFDMWGQGTTVTVSS

서열번호 153 HCDR1 SNNAVWN
서열번호 154 HCDR2 RTYYRSKWYNDYAESVKS
서열번호 155 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

서열번호 156
gatattcagatgacccagagcccttccagcctgtccgcttcagtgggggatcgagtgaccattacctgccga
accagccagagcctgagctcctacctgcactggtatcagcagaagcccggcaaagcccctaagctgctg
atctacgccgcttctagtctgcagtccggagtgcccaagccggttctccggatctgggagtggaaccgacttta
ccctgacaatttcaagcctgcagcccgaggatttcgctacatactactgtcagcagagcagaactttcgggc
agggcactaaggtggagatcaaa

[0425]

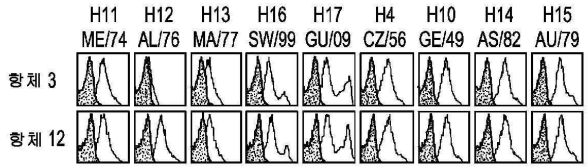
서열번호 157
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYLHWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

서열번호 158 LCDR1 RTSQSLSSYLH
서열번호 159 LCDR2 AASSLQS
서열번호 160 LCDR3 QQSRT

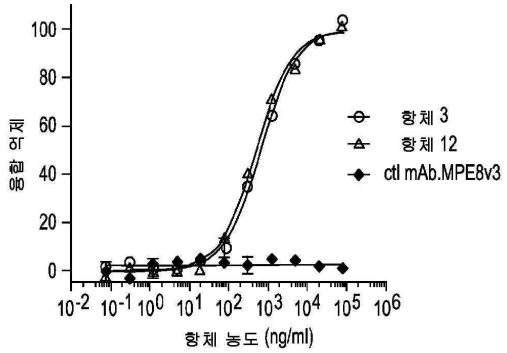
[0426]

도면

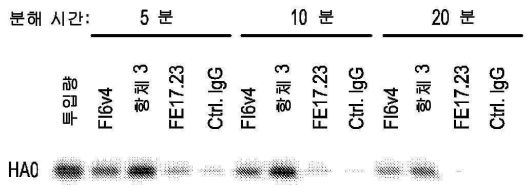
도면1a



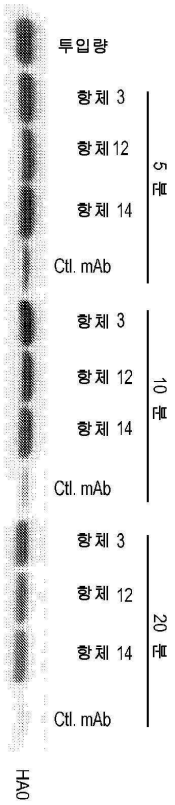
도면1b



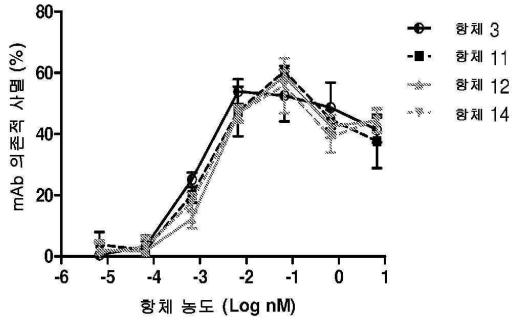
도면1c



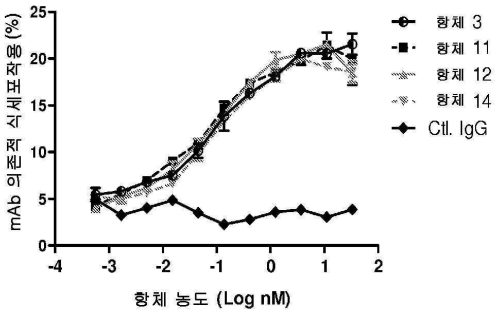
도면1d



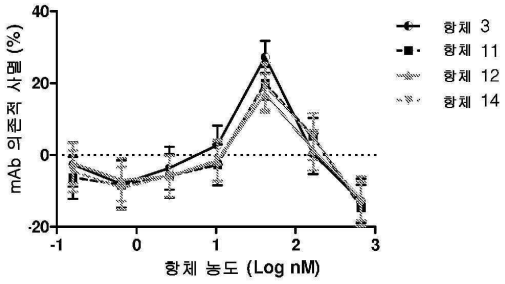
도면2



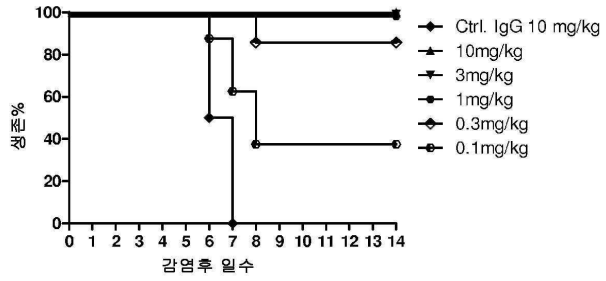
도면3



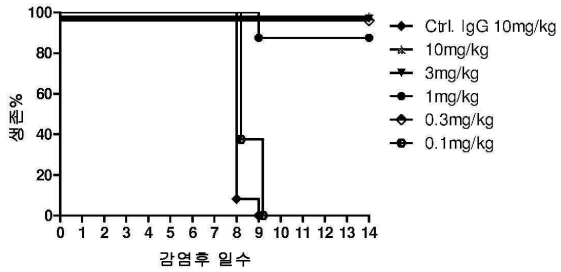
도면4



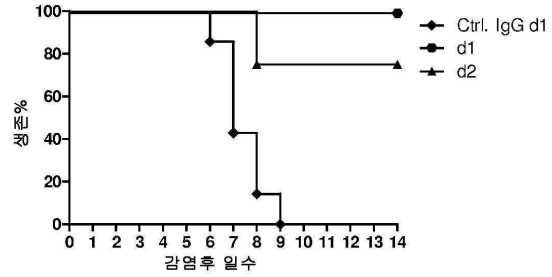
도면5



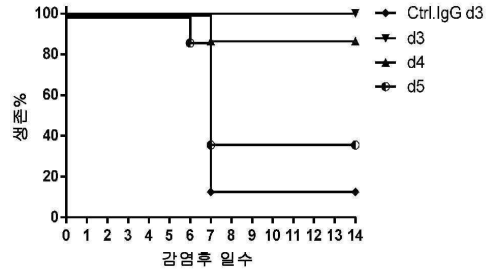
도면6



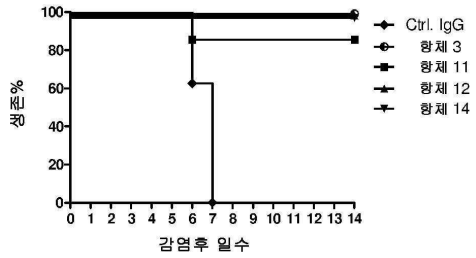
도면7



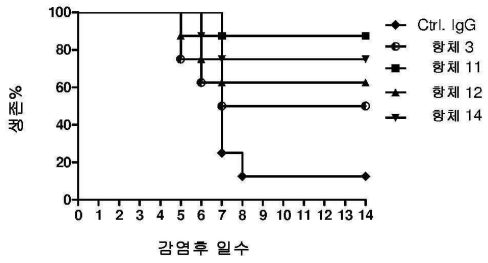
도면8



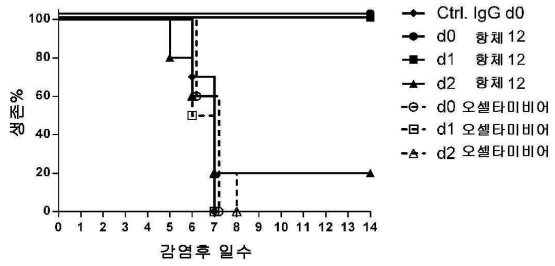
도면9



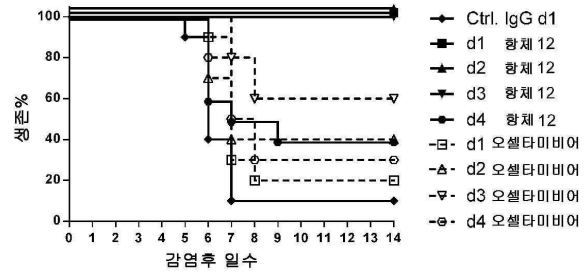
도면10



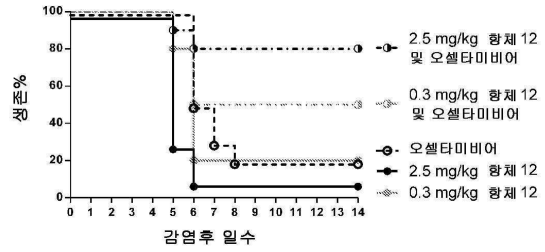
도면11



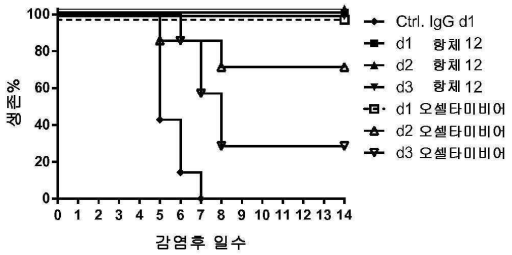
도면12



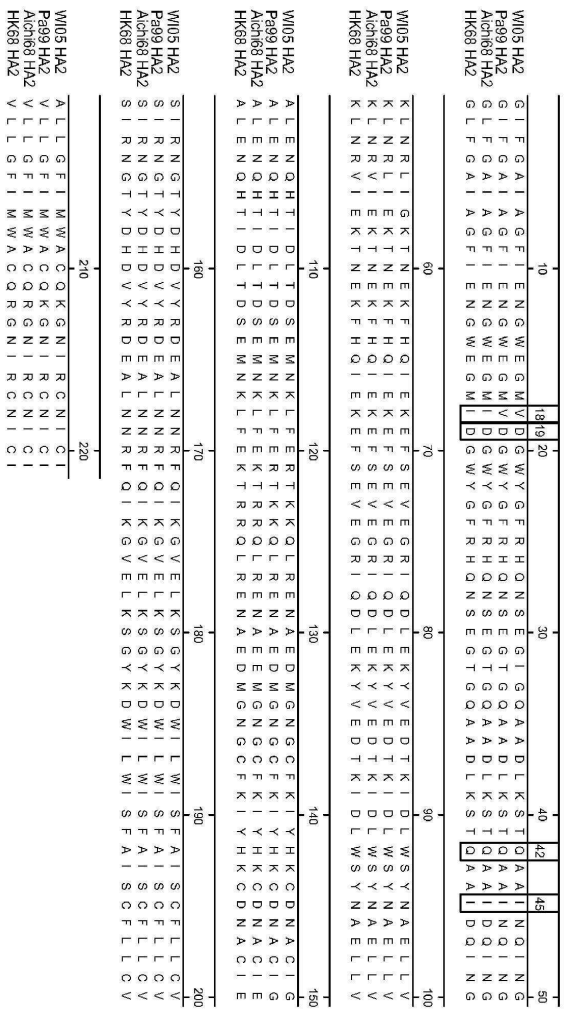
도면13



도면14



도면15



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MEDIMMUNE, LLC

HUMABS BIOMED SA

<120> NEUTRALIZING ANTI-INFLUENZA A ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> FLUA-100WO1

<140> PCT/US2014/058652

<141> 2014-10-01

<150> 62/002,414

<151> 2014-05-23

<150> 61/885,808

<151> 2013-10-02

<160> 172

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 1

cagatacagc tgcaggagtc gggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacaatg ctgtttggaa ctggatcagg 120

cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggtat 180

aatgattatg cagaatctgt gaaaagtcga ataaccgtca atccagacac atccaagaac 240

cagttctccc tgcacctgaa gtctgtgact cccgaggaca cggctgtgtt ttactgtgta 300

cgatctggcc acattacggt ttttggagtg aatgttgacg cttttgatat gtggggccaa 360

gggacaatgg tcaccgtctc ttcag 385

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Val Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu His Leu Lys Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Phe Tyr Cys Val Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val

100 105 110

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

115 120 125

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 3

Ser Asn Asn Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 4

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 5

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10 15

<210> 6

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 6

gacatccaga tcacccagtc gccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtaacc 60

atcacttgcc ggacaagtca gagccttagt agctatttac attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agtcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg 300

gaaatcaaa 309

<210> 7

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 8
Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 9
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 10

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 11

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 11

caggtacagc tgcaggagtc gggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacaatg ctgtttggaa ctggatcagg 120

cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggtat 180

aatgattatg cagaatctgt gaaaagtcga ataaccgtca atccagacac atccaagaac 240

cagttctccc tgcacctgaa gtctgtgact cccgaggaca cggctgtgtt ttactgtgta 300

cgatctggcc acattacggt ttttggagtg aatgttgacg cttttgatat gtggggccaa 360

gggacaatgg tcaccgtctc ttcag 385

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 12

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Val Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu His Leu Lys Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Phe Tyr Cys Val Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val

100 105 110

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

115 120 125

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 13

Ser Asn Asn Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 14

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 15

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10 15

<210> 16

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 16

gacatccaga tgacccagtc gccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtaacc 60

atcacttgcc ggacaagtca gagccttagt agctatttac attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agtcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg 300

gaaatcaaa 309

<210> 17

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 17

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 18

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 19

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 20

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 21

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 21

caggtccagc tgcaggagag cggccccgga ctggtcaagc cttcacagac actgagcctg 60

acatgcgcca ttagcggaga tagcgtgagc tccaacaatg ccgtgtggaa ctggatcagg 120

cagtctccaa gtcgaggact ggagtggctg ggacgaacat actatagatc caagtggtac 180

aatgactatg ctgaatcagt gaaaagccga attactgtca accccgatac ctccaagaat 240

cagttctctc tgcacctgaa aagtgtgacc cctgaggaca cagccgtgtt ctactgcgtc 300

agaagcggcc atatcaccgt ctttggcgtc aatgtggatg ctttcgatat gtgggggcag 360

gggactatgg tcaccgtgtc aagc 384

<210> 22

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 22

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Val Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

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

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 23
Ser Asn Asn Ala Val Trp Asn
1 5

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 24
Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val
1 5 10 15
Lys Ser

<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 25

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10 15

<210> 26

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 26

gatattcaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60

attacctgcc gaaccagcca gagcctgagc tcctacctgc actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc tgcagtccgg agtgccaagc 180

cggttctccg gatctgggag tggaaccgac tttaccctga caatttcaag cctgcagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaaggtg 300

gagatcaaa 309

<210> 27

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 27

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 28

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 29

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 30

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 31

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 31

caggtccagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagagtctct agcaacagtg ctgtttggaa ctggatcagg 120

cagtccccat cgagaggcct cgagtggctg ggaaggacat attacaggtc caaatggtat 180

tatgattatg cagaatctgt gaaaagtcga atagttatcg acccagacac atccaagaac 240

caggtctccc tgcagttgaa ttctgtgact cccgaggact cggctatata ttactgtgca 300

agaggtggcc acattacggt gtttgggctg aatattgacg cttatgatat ttggggccaa 360

ggggcaaagg tcaccgtgtc ttcag 385

<210> 32

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 32

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Arg Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Val Ile Asp Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Ser Ala Ile
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Leu Asn Ile
100 105 110

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

115 120 125

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 33

Ser Asn Ser Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 34

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 34

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ala Glu Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 35

Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Leu Asn Ile Asp Ala Tyr Asp Ile

1 5 10 15

<210> 36

<211> 307

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 36

gacatccagg tgacccagtc tccgtcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atctcttgcc gggcacagag ccttagcagc tacttacatt ggtatcagca gaaaccaggg 120

caacccccta aactcctgat ctatgctgca accactttgc aaagtggggt cccatcacgg 180

ttcagtggta gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagtacttt ccaagctgaa 240

gatgttgcca cttactattg tcaacagagt cggacgttcg gccaagggac caaggttgaa 300

atcaaac 307

<210> 37

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 37

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Leu
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Ala Thr Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Phe Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 38

Arg Ala Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 39

Ala Ala Thr Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 40

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 41

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 41

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagagtctct agcaacagtg ctgtttggaa ctggatcagg 120

cagtccccat cgagaggcct cgagtggctg ggaaggacat attacaggtc caaatggtat 180

tatgattatg cagaatctgt gaaaagtcga atagttatcg acccagacac atccaagaac 240

caggtctccc tgcagttgaa ttctgtgact cccgaggact cggctatata ttactgtgca 300

agaggtggcc acattacggt gtttgggctg aatattgacg cttatgatat ttggggccaa 360

ggggcaatgg tcaccgtctc ttcag 385

<210> 42

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 42

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Arg Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Val Ile Asp Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Ser Ala Ile
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Leu Asn Ile
100 105 110

Asp Ala Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Ala Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 43

Ser Asn Ser Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 44

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ala Glu Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 45

Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Leu Asn Ile Asp Ala Tyr Asp Ile

1 5 10 15

<210> 46

<211> 307

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 46

gacatccaga tgacccagtc tccgtcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atctcttgcc gggcacagag ccttagcagc tacttacatt ggtatcagca gaaaccaggg 120

caaccccta aactcctgat ctatgctgca accactttgc aaagtggggt cccatcacgg 180

ttcagtggta gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagtacttt ccaagctgaa 240

gatgttgcca cttactattg tcaacagagt cggacgttcg gccaagggac caaggtggag 300

atcaaac 307

<210> 47

<211> 102

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Phe Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly

85 90 95

Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 48

Arg Ala Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 49

Ala Ala Thr Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 50

Gln Gln Ser Arg Thr
1 5

<210> 51

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 51

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagagtctct agcaacagtg ctgtttggaa ctggatcagg 120

cagtccccat cgagaggcct cgagtggctg ggaaggacat attacaggtc caaatggtat 180

tatgattatg cagaatctgt gaaaagtcga atagttatcg acccagacac atccaagaac 240

caggtctccc tgcagttgaa ttctgtgact cccgaggact cggctatata ttactgtgca 300

agaggtggcc acattacgga gtttgggctg aatattgacg cttatgatat ttggggccaa 360

ggggcaatgg tcaccgtctc ttcag 385

<210> 52

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 52

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Arg Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Val Ile Asp Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Ser Ala Ile
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly His Ile Thr Glu Phe Gly Leu Asn Ile
100 105 110

Asp Ala Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Ala Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 53

Ser Asn Ser Ala Val Trp Asn
1 5

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213>
Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 54

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ala Glu Ser Val
1 5 10 15
Lys Ser

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 55

Gly Gly His Ile Thr Glu Phe Gly Leu Asn Ile Asp Ala Tyr Asp Ile
1 5 10 15

<210> 56

<211> 307

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 56

gacatccaga tgacccagtc tccgtcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atctcttgcc gggcacagag ccttagcagc tacttacatt ggtatcagca gaaaccaggg 120

caacccccta aactcctgat ctatgctgca accactttgc aaagtggggt cccatcacgg 180

ttcagtggta gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagtacttt ccaagctgaa 240

gatgttgcca cttactattg tcaacagagt cggacgttcg gccaagggac caaggtggag 300

atcaaac 307

<210> 57

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 57

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Leu
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Ala Thr Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Phe Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 58

Arg Ala Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 59

Ala Ala Thr Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 60

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 61

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 61

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctccctc 60

acctgtgtca tctccggaga cactgtctct agcaacagag ctacttggaa ttggatgagg 120

cagtccccat tgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggtat 180

aatgattacg cagtttctgt gaaaagtcga gtagtcatca acccagacac atccaagaac 240

caagtctccc tgcagttgaa cactgtgact cccgatgact cgggtgtata cttttgtgca 300

agaggtggcc acatcacggt ctttggagtg aatattgacg cttttgacat ctggggcctc 360

gggacaaagg tcaccgtctc ttcag 385

<210> 62

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 62

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Val Ile Ser Gly Asp Thr Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Thr Trp Asn Trp Met Arg Gln Ser Pro Leu Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Val Val Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn Thr Val Thr Pro Asp Asp Ser Gly Val
85 90 95

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Ile
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Leu Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 63

Ser Asn Arg Ala Thr Trp Asn

1 5

<210> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 64

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 65

Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Ile Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 66

<211> 310

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 66

gacatccagg tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagttacc 60

atctcttgcc gggcaagtca gagacttaat agttatctac attggtatca gcagacacca 120

gggcaagccc cgaagctgct gatctatgca acgtccactt tgcaaagtgg ggtctcacca 180

agattcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctccaacct 240

gaagatgttg caacttacta ctgtcaattg agtcggacgt tcggccacgg gaccaaggtt 300

gaaatcaaac 310

<210> 67

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 67

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Leu Asn Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 68

Arg Ala Ser Gln Arg Leu Asn Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 69

Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 70

Gln Leu Ser Arg Thr

1 5

<210> 71

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 71

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctccctc 60

acctgtgtca tctccggaga cactgtctct agcaacagag ctacttggaa ttggatgagg 120

cagtccccat tgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggtat 180

aatgattacg cagtttctgt gaaaagtcga gtagtcatca acccagacac atccaagaac 240

caagtctccc tgcagttgaa cactgtgact cccgatgact cgggtgtata cttttgtgca 300

agaggtggcc acatcacggt ctttggagtg aatattgacg cttttgacat ctggggcctc 360

gggacaaagg tcaccgtctc ttcag 385

<210> 72

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 72

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Val Ile Ser Gly Asp Thr Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Thr Trp Asn Trp Met Arg Gln Ser Pro Leu Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Val Val Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn Thr Val Thr Pro Asp Asp Ser Gly Val
85 90 95

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Ile
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Leu Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 73

Ser Asn Arg Ala Thr Trp Asn
1 5

<210> 74

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 74

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 75

Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Ile Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 76

<211> 310

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 76

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagttacc 60

atctcttgcc gggcaagtca gagacttaat agttatctac attggtatca gcagacacca 120

gggcaagccc cgaagctgct gatctatgca acgtccactt tgcaaagtgg ggtctcacca 180

agattcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctccaacct 240

gaagatgttg caacttacta ctgtcaattg agtcggacgt tcggccacgg gaccaaggtg 300

gaaatcaaac 310

<210> 77

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 77

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

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

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 78

Arg Ala Ser Gln Arg Leu Asn Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 79

Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 80

Gln Leu Ser Arg Thr
1 5

<210> 81

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220
><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 81

caagtagagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctacttggaa ctggatcagg 120

cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggtat 180

aatgattatg cagattttct gaaaaggcga ataaccatca atccagacac atccaacaac 240

gaggtctccc tgcggctgac ctctgtgact cccgacgaca cggctttgta ttactgtgca 300

agaggtggcc acattacggt gtttggagtg aatattgacg cctttgacgt ctggggccaa 360

gggacaatgg ccaccgtctc ttcag 385

<210> 82

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 82

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Asp Phe Leu Lys Arg Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Asn Asn
65 70 75 80

Glu Val Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Pro Asp Asp Thr Ala Leu
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Ile
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Ala Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 83

Ser Asn Ser Ala Thr Trp Asn
1 5

<210> 84

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 84

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Asp Phe Leu

1 5 10 15

Lys Arg

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 85

Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Ile Asp Ala Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 86

<211> 310

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 86

gacatccagg tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagaatcacc 60

atctcttgcc ggacaagtca gagccttagg agctatttac attggtatca gcaaaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct tcatccactt tacaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tctccaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaactg agtcggacgt tcggccaagg gaccaaggtt 300

gaaatcaaac 310

<210> 87

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 87

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

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

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 88

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Arg Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 89

Ala Ser Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 90

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 90

Gln Leu Ser Arg Thr

1 5

<210> 91

<211> 385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 91

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctacttggaa ctggatcagg 120

cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggtat 180

aatgattatg cagattttct gaaaaggcga ataaccatca atccagacac atccaacaac 240

gaggtctccc tgcggctgac ctctgtgact cccgacgaca cggctttgta ttactgtgca 300

agaggtggcc acattacggt gtttggagtg aatattgacg cctttgacgt ctggggccaa 360

gggacaatgg tcaccgtctc ttcag 385

<210> 92

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 92

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

1 5 10 15

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

Glu Val Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Pro Asp Asp Thr Ala Leu
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Ile
100 105 110
Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 93
Ser Asn Ser Ala Thr Trp Asn
1 5

<210> 94
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 94
Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Asp Phe Leu

1 5 10 15

Lys Arg

<210> 95

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 95

Gly Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Ile Asp Ala Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 96

<211> 310

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 96

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagaatcacc 60

atctcttgcc ggacaagtca gagccttagg agctatttac attggtatca gcaaaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct tcatccactt tacaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tctccaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaactg agtcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg 300

gagatcaaac 310

<210> 97

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 97

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

1 5 10 15

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Leu Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 98
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 98
Arg Thr Ser Gln Ser Leu Arg Ser Tyr Leu His
1 5 10
<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide
<400> 99
Ala Ser Ser Thr Leu Gln Ser
1 5
<210> 100

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 100

Gln Leu Ser Arg Thr
1 5

<210> 101

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 101

caggtccagc tgcagcagag cggccccgga ctggtcaagc cttcacagac actgagcctg 60

acatgcgcca ttagcggaga tagcgtgagc tcctacaatg ccgtgtggaa ctggatcagg 120

cagtctccaa gtcgaggact ggagtggctg ggacgaacat actatagatc cgggtggtac 180

aatgactatg ctgaatcagt gaaaagccga attactatca accccgatac ctccaagaat 240

cagttctctc tgcagctgaa cagtgtgacc cctgaggaca cagccgtgta ctactgcgcc 300

agaagcggcc atatcaccgt ctttggcgtc aatgtggatg ctttcgatat gtgggggcag 360

gggactatgg tcaccgtgtc aagc 384

<210> 102

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 102

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val

100 105 110

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

115 120 125

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 103

Ser Tyr Asn Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 104

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 104

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 105

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 105

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10 15

<210> 106

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 106

gatattcaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60

attacctgcc gaaccagcca gagcctgagc tcctacacgc actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc ggctgtccgg agtgccaagc 180

cggttctccg gatctgggag tggaaccgac tttaccctga caatttcaag cctgcagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaaggtg 300

gagatcaaa 309

<210> 107

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 107

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 108
Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Thr His

1 5 10

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 109
Ala Ala Ser Ser Arg Leu Ser
1 5

<210> 110
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 110

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 111

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 111

caggtccagc tgcagcagag cggccccgga ctggtcaagc cttcacagac actgagcctg 60

acatgcgcca ttagcggaga tagcgtgagc tcctacaatg ccgtgtggaa ctggatcagg 120

cagtctccaa gtcgaggact ggagtggctg ggacgaacat actatagatc cgggtggtac 180

aatgactatg ctgaatcagt gaaaagccga attactatca accccgatac ctccaagaat 240

cagttctctc tgcagctgaa cagtgtgacc cctgaggaca cagccgtgta ctactgcgcc 300

agaagcggcc atatcaccgt ctttggcgtc aatgtggatg ctttcgatat gtgggggcag 360

gggactatgg tcaccgtgtc aagc 384

<210> 112

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 112

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val

100 105 110

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

115 120 125

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 113

Ser Tyr Asn Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 114

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 114

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 115

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 115

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10 15

<210> 116

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 116

gatattcaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60

attacctgcc gaaccagcca gagcctgagc tcctacacgc actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc gggggtccgg agtgccaagc 180

cggttctccg gatctgggag tggaaccgac tttaccctga caatttcaag cctgcagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaaggtg 300

gagatcaaa 309

<210> 117

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 117

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 118

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Thr His

1 5 10

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 119

Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser

1 5

<210> 120

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 120

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 121

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 121

caggtccagc tgcagcagag cggccccgga ctggtcaagc cttcacagac actgagcctg 60

acatgcgcca ttagcggaga tagcgtgagc tcctacaatg ccgtgtggaa ctggatcagg 120

cagtctccaa gtcgaggact ggagtggctg ggacgaacat actatagatc cgggtggtac 180

aatgactatg ctgaatcagt gaaaagccga attactatca accccgatac ctccaagaat 240

cagttctctc tgcagctgaa cagtgtgacc cctgaggaca cagccgtgta ctactgcgcc 300

agaagcggcc atatcaccgt ctttggcgtc aatgtggatg ctttcgatat gtgggggcag 360

gggactatgg tcaccgtgtc aagc 384

<210> 122

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 122

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110
Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 123
Ser Tyr Asn Ala Val Trp Asn
1 5

<210> 124
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 124
Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val
1 5 10 15
Lys Ser

<210> 125
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 125

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10 15

<210> 126

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 126

gatattcaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60

attacctgcc gaaccagcca gagcctgagc tcctacgacc actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc ggctgtccgg agtgccaagc 180

cggttctccg gatctgggag tggaaccgac tttaccctga caatttcaag cctgcagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaaggtg 300

gagatcaaa 309

<210> 127

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 127

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 128

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Asp His

1 5 10

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 129

Ala Ala Ser Ser Arg Leu Ser

1 5

<210> 130

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 130

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 131

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 131

caggtccagc tgcagcagag cggccccgga ctggtcaagc cttcacagac actgagcctg 60

acatgcgcca ttagcggaga tagcgtgagc tccaacaatg ccgtgtggaa ctggatcagg 120

cagtctccaa gtcgaggact ggagtggctg ggacgaacat actatagatc caagtggtac 180

aatgactatg ctgaatcagt gaaaagccga attactatca accccgatac ctccaagaat 240

cagttctctc tgcagctgaa cagtgtgacc cctgaggaca cagccgtgta ctactgcgcc 300

agaagcggcc atatcaccgt ctttggcgtc aatgtggatg ctttcgatat gtgggggcag 360

gggaccacag tcaccgtctc ctca 384

<210> 132

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 132

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110

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

115 120 125

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 133

Ser Asn Asn Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 134

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 134

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 135

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 135

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met

1 5 10 15

<210> 136

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 136

gatattcaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60

attacctgcc gaaccagcca gagcctgagc tcctacacgc actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc ggctgtccgg agtgccaagc 180

cggttctccg gatctgggag tggaaccgac tttaccctga caatttcaag cctgcagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaaggtg 300

gagatcaaa 309

<210> 137

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 137

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 138

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Thr His

1 5 10

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 139

Ala Ala Ser Ser Arg Leu Ser

1 5

<210> 140

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 140

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 141

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 141

caggtccagc tgcagcagag cggccccgga ctggtcaagc cttcacagac actgagcctg 60

acatgcgcca ttagcggaga tagcgtgagc tccaacaatg ccgtgtggaa ctggatcagg 120

cagtctccaa gtcgaggact ggagtggctg ggacgaacat actatagatc caagtggtac 180

aatgactatg ctgaatcagt gaaaagccga attactatca accccgatac ctccaagaat 240

cagttctctc tgcagctgaa cagtgtgacc cctgaggaca cagccgtgta ctactgcgcc 300

agaagcggcc atatcaccgt ctttggcgtc aatgtggatg ctttcgatat gtgggggcag 360

gggaccacag tcaccgtctc ctca 384

<210> 142

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 142

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 143

Ser Asn Asn Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 144

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 144

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 145

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 145

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met

1 5 10 15

<210> 146

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 146

gatattcaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60

attacctgcc gaaccagcca gagcctgagy tcctacacgc actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc gggggtccgg agtgccaagc 180

cggttctccg gatctgggag tggaaccgac tttaccctga caatttcaag cctgcagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaaggtg 300

gagatcaaa 309

<210> 147

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 147

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 148

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 148

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Thr His
1 5 10

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 149

Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser
1 5

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 150

Gln Gln Ser Arg Thr
1 5

<210> 151

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 151

caggtccagc tgcagcagag cggccccgga ctggtcaagc cttcacagac actgagcctg 60

acatgcgcca ttagcggaga tagcgtgagc tccaacaatg ccgtgtggaa ctggatcagg 120

cagtctccaa gtcgaggact ggagtggctg ggacgaacat actatagatc caagtggtac 180

aatgactatg ctgaatcagt gaaaagccga attactatca accccgatac ctccaagaat 240

cagttctctc tgcagctgaa cagtgtgacc cctgaggaca cagccgtgta ctactgcgcc 300

agaagcggcc atatcaccgt ctttggcgtc aatgtggatg ctttcgatat gtgggggcag 360

gggaccacag tcaccgtctc ctca 384

<210> 152

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 152

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 153

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 153

Ser Asn Asn Ala Val Trp Asn

1 5

<210> 154

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 154

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 155

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 155

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met

1 5 10 15

<210> 156

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 156

gatattcaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60

attacctgcc gaaccagcca gagcctgagc tcctacctgc actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc tgcagtccgg agtgccaagc 180

cggttctccg gatctgggag tggaaccgac tttaccctga caatttcaag cctgcagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaaggtg 300

gagatcaaa 309

<210> 157

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 157

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 158

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 159

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 159

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 160

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 160

Gln Gln Ser Arg Thr

1 5

<210> 161

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Asn or Tyr

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Asn, Ser or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Val or Thr

<400> 161

Ser Xaa Xaa Ala Xaa Trp Asn

1 5

<210> 162

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Lys or Gly

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Asn or Tyr

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Glu, Val or Asp

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223>

Ser or Phe

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> Val or Leu

<400> 162

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Xaa Trp Tyr Xaa Asp Tyr Ala Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Lys

<210> 163

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Ser or Gly

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Val or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Val or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Val or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Phe or Tyr

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> Met, Ile or Val

<400> 163

Xaa Gly His Ile Thr Xaa Phe Gly Xaa Asn Xaa Asp Ala Xaa Asp Xaa

1 5 10 15

<210> 164

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Thr, Ala or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ser or Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ser or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Ser, Asn or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Leu, Thr or Asp

<400> 164

Arg Xaa Xaa Gln Xaa Leu Xaa Ser Tyr Xaa His

1 5 10

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220

><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Ala, Thr or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(4)

<223> Ser or Thr

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Leu or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Gln, Leu or Gly

<400> 165

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser

1 5

<210> 166

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Gln or Leu

<400> 166

Gln Xaa Ser Arg Thr

1 5

<210> 167

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 167

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val

100 105 110

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

115 120 125

<210> 168

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 168

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

<210> 169

<211> 221

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 169

Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Ile

20 25 30

Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile

35 40 45

Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Gly Lys Thr Asn Glu Lys Phe His

50 55 60

Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu

65 70 75 80

Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala

85 90 95

Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp

100 105 110

Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Arg Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu

115 120 125

Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys

130 135 140

Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp

145 150 155 160

Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val

165 170 175

Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala

180 185 190

Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys Val Ala Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp

195 200 205

Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile

210 215 220

<210> 170

<211> 221

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 170

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

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

Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys
130 135 140
Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp
145 150 155 160
Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val
165 170 175
Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala
180 185 190

Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp
195 200 205
Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
210 215 220

<210> 171

<211> 221

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 171

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr
20 25 30

Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile
35 40 45

Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His
50 55 60

Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu
65 70 75 80

Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala
85 90 95

Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp
100 105 110

Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu
115 120 125

Asn Ala Glu Glu Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys
130 135 140

Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp
145 150 155 160

Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val
165 170 175

Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala
180 185 190

Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp
195 200 205

Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
210 215 220

<210> 172

<211> 221

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 172

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr
20 25 30

Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile
35 40 45

Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His
50 55 60

Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu
65 70 75 80

Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala
85 90 95

Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp
100 105 110

Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu
115 120 125

Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys
130 135 140

Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp
145 150 155 160

Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val
165 170 175

Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala
180 185 190

Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp
195 200 205

Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile

210 215 220