

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0133247 (43) 공개일자 2013년12월06일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 16/24</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-7018960 (22) 출원일자(국제) 2011년12월20일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2013년07월18일 (86) 국제출원번호 PCT/US2011/066130 (87) 국제공개번호 WO 2012/121775 국제공개일자 2012년09월13일 (30) 우선권주장 61/425,671 2010년12월21일 미국(US)		(71) 출원인 애브비 인코포레이티드 미국 일리노이주 60064 놀스 시카고 놀스 위키건 로드 1 (72) 발명자 우 청빈 중국 상하이 아파트먼트 602 #14 진 슈 로드 300 (74) 대리인 장훈

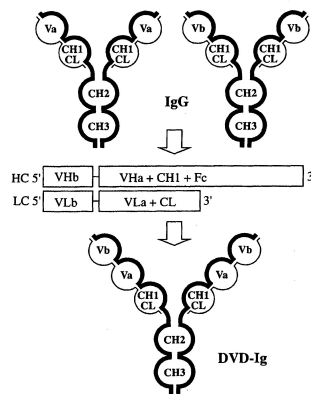
전체 청구항 수 : 총 76 항

(54) 발명의 명칭 **I L-1-알파 및 -베타 이특이적 이원 가변 도메인 면역글로불린 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 가공된 다가 및 다특이적 결합 단백질, 이의 제조 방법, 및 특히 질환의 예방, 진단 및/또는 치료에 사용하기 위한 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서,

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역이고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질로서,

상기 결합 단백질이, IL-1알파 및 IL-1베타로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원쌍에 결합할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 VD1 및 VD2가 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 3

VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서,

VD1은 제1 경중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경중쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질로서,

상기 결합 단백질이 IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 2) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 1) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 3); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 4); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 5)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원쌍에 결합할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인들이 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 및 47로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 n이 0인, 결합 단백질.

청구항 6

제1 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서,

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역이다]를 포함하는 제1 폴리펩타이드 쇠, 및

제2 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서,

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제2 폴리펩타이드 쇠

를 포함하는 결합 단백질로서,

상기 결합 단백질이 IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 2) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 1) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 3); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 4); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 5)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원쌍에 결합할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 VD1 및 VD2 중쇄 가변 도메인들이 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인들이 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 및 47로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 8

제1항, 제3항, 또는 제6항에 있어서, 상기 X1 또는 X2가 서열번호 1 내지 26으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열인, 결합 단백질.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 결합 단백질이 2개의 제1 폴리펩타이드 쇠 및 2개의 제2 폴리펩타이드 쇠를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 10

제1항, 제3항, 또는 제6항에 있어서, 상기 Fc 영역이 고유 서열 Fc 영역 및 변이 서열 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 및 IgD 기원의 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 12

제1항, 제3항, 또는 제6항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇠의 VD1 및 상기 제2 폴리펩타이드 쇠의 VD1이 각 각 동일한 제1 및 제2 모 항체 또는 이들의 항원 결합부로부터 획득되는, 결합 단백질.

청구항 13

제1항, 제3항, 또는 제6항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇠의 VD1 및 상기 제2 폴리펩타이드 쇠의 VD1이 각 각 상이한 제1 및 제2 모 항체 또는 이들의 항원 결합부로부터 획득되는, 결합 단백질.

청구항 14

제1항, 제3항, 또는 제6항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇄의 VD2 및 상기 제2 폴리펩타이드 쇄의 VD2가 각각 동일한 제1 및 제2 모 항체 또는 이들의 항원 결합부로부터 취득되는, 결합 단백질.

청구항 15

제1항, 제3항, 또는 제6항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇄의 VD2 및 상기 제2 폴리펩타이드 쇄의 VD2가 각각 상이한 제1 및 제2 모 항체 또는 이들의 항원 결합부로부터 취득되는, 결합 단백질.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 모 항체들이 상기 항원 상의 상이한 에피토프들에 결합하는, 결합 단백질.

청구항 17

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 상기 제2 항원에 결합하는 효능과 상이한 효능으로 상기 제1 항원에 결합하는, 결합 단백질.

청구항 18

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 상기 제2 항원에 결합하는 친화성과 상이한 친화성으로 상기 제1 항원에 결합하는, 결합 단백질.

청구항 19

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 사람 항체, CDR 이식된 항체, 및 사람화된 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 20

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 Fab 단편; F(ab')₂ 단편; 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인들로 이루어진 Fv 단편; dAb 단편; 분리된 상보성 결정 영역(CDR); 단일쇄 항체; 및 디아바디(diabody)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 21

제1항, 제3항, 또는 제6항에 있어서, 상기 결합 단백질이, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부, 또는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는, 결합 단백질.

청구항 22

제22항에 있어서, 상기 목적하는 성질이 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 항체 파라미터가 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약동학, 생체이용률, 조직 교차 반응성, 또는 이종상동성(orthologous) 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 24

4개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하는, 2개의 항원과 결합할 수 있는 결합 단백질로서,

2개의 폴리펩타이드쇄는 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서,

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역이다]를 포함하고;

2개의 폴리펩타이드쇄는 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서,

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하며,

상기 VD1 및 VD2 중쇄 가변 도메인들은 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인들은 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 및 47로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 25

4개의 폴리펩타이드쇄를 포함하는, 2개의 항원과 결합할 수 있는 결합 단백질로서,

2개의 폴리펩타이드쇄는 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서,

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역이고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하고;

2개의 폴리펩타이드쇄는 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서,

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하며,

상기 DVD-Ig가 IL-1알파(서열 1); IL-1알파(서열 2); IL-1알파(서열 3); IL-1알파(서열 4); IL-1베타(서열 1); IL-1베타(서열 2); IL-1베타(서열 3); IL-1베타(서열 4); 및 IL-1베타(서열 5)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 항원에 결합하는, 결합 단백질.

청구항 26

제1항, 제3항, 제6항, 제24항, 또는 제25항에 있어서, 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 상기 하나 이상의 표

적에 대한 결합 속도 상수(K_{on})가 적어도 약 $10^2 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^3 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^4 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^5 M^{-1} s^{-1}$; 및 적어도 약 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 27

제1항, 제3항, 제6항, 제24항, 또는 제25항에 있어서, 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 상기 하나 이상의 표적에 대한 해리 속도 상수(K_{off})가 최대 약 $10^{-3} s^{-1}$; 최대 약 $10^{-4} s^{-1}$; 최대 약 $10^{-5} s^{-1}$; 및 최대 약 $10^{-6} s^{-1}$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 28

제1항, 제3항, 제6항, 제24항, 또는 제25항에 있어서, 상기 하나 이상의 표적에 대한 해리 상수(K_D)가 최대 약 $10^{-7} M$; 최대 약 $10^{-8} M$; 최대 약 $10^{-9} M$; 최대 약 $10^{-10} M$; 최대 약 $10^{-11} M$; 최대 약 $10^{-12} M$; 및 최대 $10^{-13} M$ 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 29

제1항, 제3항, 제6항, 제24항, 또는 제25항에 따른 결합 단백질을 포함하는 결합 단백질 집합체로서, 상기 결합 단백질 집합체가, 면역부착 분자, 이미지화제, 치료제, 및 세포독성제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제제를 추가로 포함하는, 결합 단백질 집합체.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 제제가 방사성 표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 생물발광 표지, 자기 표지, 및 비오틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 이미지화제인, 결합 단백질 집합체.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 이미지화제가 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 및 ^{153}Sm 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방사성 표지인, 결합 단백질 집합체.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 제제가 항-대사물, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토카인, 항-혈관형성제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소, 및 아포토시스 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 치료제 또는 세포독성제인, 결합 단백질 집합체.

청구항 33

제1항, 제3항, 제6항, 제24항, 또는 제25항에 있어서, 상기 결합 단백질이, 결정화된 결합 단백질인, 결합 단백질.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 결정이 담체-부재 약제학적 제어 방출 결정인, 결합 단백질.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 결합 단백질이, 상기 결합 단백질의 가용성 대응물보다 큰 생체내 반감기를 갖는, 결합 단백질.

청구항 36

제33항에 있어서, 상기 결합 단백질이 생물학적 활성을 보유하는, 결합 단백질.

청구항 37

제1항, 제3항, 제6항, 제24항, 또는 제25항 중의 어느 한 항에 따른 결합 단백질 아미노산 서열을 암호화하는,

분리된 핵산.

청구항 38

제37항에 따른 분리된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 벡터가 pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO, 및 pBJ로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 벡터.

청구항 40

제38항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 숙주 세포가 원핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 숙주 세포가 이. 콜라이(E. Coli)인, 숙주 세포.

청구항 43

제40항에 있어서, 상기 숙주 세포가 진핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 진핵 세포가 원생동물 세포, 동물 세포, 식물 세포, 및 진균류 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 숙주 세포.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 진핵 세포가 포유동물 세포, 조류 세포, 또는 곤충 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 동물 세포인, 숙주 세포.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 숙주 세포가 CHO 세포인, 숙주 세포.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 숙주 세포가 COS인, 숙주 세포.

청구항 48

제43항에 있어서, 상기 숙주 세포가 효모 세포인, 숙주 세포.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 효모 세포가 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)인, 숙주 세포.

청구항 50

제45항에 있어서, 상기 숙주 세포가 곤충 Sf9 세포인, 숙주 세포.

청구항 51

결합 단백질을 제조하는 방법으로서,

결합 단백질을 제조하기에 충분한 조건하에서 배양 배지에서 제40항 내지 제50항 중 어느 한 항에 기재된 숙주 세포를 배양함을 포함하는, 결합 단백질을 제조하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 제조된 결합 단백질의 50% 내지 75%가 이원 특이적 4가 결합 단백질인, 방법.

청구항 53

제51항에 있어서, 제조된 결합 단백질의 75% 내지 90%가 이원 특이적 4가 결합 단백질인, 방법.

청구항 54

제51항에 있어서, 제조된 결합 단백질의 90% 내지 95%가 이원 특이적 4가 결합 단백질인, 방법.

청구항 55

제51항의 방법에 따라 제조된, 단백질.

청구항 56

제1항 내지 제36항 및 제55항 중 어느 한 항의 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, 하나 이상의 추가 치료제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 추가 치료제가 치료제, 이미지화제, 세포독성제, 혈관형성 억제제; 키나제 억제제; 공동-자극 분자 차단제; 부착 분자 차단제; 항-사이토카인 항체 또는 이의 기능성 단편; 메토타렉세이트; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; 검출가능한 표지 또는 리포터; TNF 길항제; 항류마티스제; 근육 이완제, 마약류, 비-스테로이드 소염 약물(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국부 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제, 항건선제, 코르티코스테로이드, 동화성 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역화제, 면역글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사성 약제, 항우울제, 항정신제, 자극제, 천식 약제, 베타 효능제, 흡입 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체, 사이토카인 또는 사이토카인 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 59

제1항 내지 제36항 및 제55항 중 어느 한 항의 결합 단백질을 피험체에게 투여하여 치료가 달성되는, 피험체의 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 장애가 류마티스성 관절염, 골관절염, 연소성 만성 관절염, 패혈성 관절염, 라임 관절염, 건선 관절염, 반응성 관절염, 척추관절증, 전신 홍반성 낭창, 크론 질환, 궤양성 대장염, 염증성 장 질환, 인슐린 의존성 진성 당뇨병, 갑상선염, 천식, 알레르기성 질환, 건선, 피부경화증, 이식편 대 숙주 질환, 기관 이식 거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역 질환, 유육종증, 동맥경화증, 파종성 혈관내 응고, 가와사키 질환, 그레이브 질환, 신 증후군, 만성 피로 증후군, 베게너 육아종증, 헤노흐-췌라인 자반증, 신장의 현미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 패혈성 쇼크, 독소 쇼크 증후군, 패혈증 증후군, 악액질, 감염성 질환, 기생충 질환, 후천성 면역결핍 증후군, 급성 횡단성 척수염, 헌팅톤 무도병, 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환, 뇌졸중, 원발성 담즙성 간경변, 용혈성 빈혈, 악성 종양, 심부전증, 심근경색, 에이즈 질환, 산발성 다분비선 제I형 결핍증 및 다분비선 제II형 결핍증, 슈미트 증후군, 성인성(급성) 호흡 곤란 증후군, 탈모증, 원형 탈모증, 혈청반응 음성 관절증, 관절증, 라이트 질환, 건선성 관절증, 궤양성 대장염성 관절증, 장병증성 활막염, 클라미디아증, 여시니아 및 살모넬라 관련 관절증, 척추관절증, 죽상 질환/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역 수포성 질환, 심상성 천포창, 낙엽성 천포창, 유천포창, 선상 IgA 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 콕스 양성 용혈성 빈혈, 후천성 악성 빈혈, 연소성 악성 빈혈, 근통성 뇌염/로알 프리(Royal Free) 질환, 만성 점막 피부 칸디다증, 거대 세포 동맥염, 원발성 경화성 간염, 잠복성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍 질환 증후군, 후천성 면역결핍 관련 질환, B형 간염, C형 간염, 공통 가변성 면역결핍증(공통 가변성 감마글로불린저혈증), 확

장형 심근증, 여성 불임증, 난소 부전증, 조속 난소 부전증, 섬유성 폐 질환, 잠복성 섬유조직 폐포염, 후-염증성 간질성 폐 질환, 간질성 폐렴, 결합 조직 질환 관련 간질성 폐 질환, 조합성 결합 조직 질환 관련 폐 질환, 전신성 경화증 관련 간질성 폐 질환, 류마티스성 관절염 관련 간질성 폐 질환, 전신성 홍반성 낭창 관련 폐 질환, 피부근염/다발성 근염 관련 폐 질환, 쇼그렌 질환 관련 폐 질환, 강직성 척추염 관련 폐 질환, 혈관염 범발성 폐 질환, 혈철증 관련 폐 질환, 약물-유도된 간질성 폐 질환, 섬유증, 방사선 섬유증, 폐색성 세기관지염, 만성 호산구성 폐렴, 림프구성 침윤성 폐 질환, 감염 후 간질성 폐 질환, 통풍성 관절염, 자가면역 간염, 1형 자가면역 간염(전형적 자가면역 또는 루포이드 간염), 2형 자가면역 간염(항-LKM 항체 간염), 자가면역 매개된 저혈당증, 흑색 극세포종에 따른 B형 인슐린 저항성, 부갑상선 기능저하증, 기관 이식과 관련된 급성 면역 질환, 기관 이식과 관련된 만성 면역 질환, 골관절증, 원발성 경화성 담관염, 1형 건선, 2형 건선, 특발성 백혈구감소증, 자가면역 호중구감소증, 신장 질환 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 혈관염, 라임 질환, 원판상 홍반성 낭창, 남성 불임증 특발증 또는 NOS, 정자 자가면역, 다발성 경화증(모든 아형), 교감성 안염, 결합 조직 질환에 속발성인 폐 고혈압증, 궤양성 결장증 증후군, 결절성 다발성 동맥염의 폐 징후, 급성 류마티스성 열, 류마티스성 척추염, 스틸 질환, 전신성 경화증, 쇼그렌 증후군, 다카야스 질환/동맥염, 자가면역 혈소판 감소증, 특발성 혈소판 감소증, 자가면역 갑상선 질환, 갑상선 기능항진증, 갑상선종증 자가면역 갑상선 기능저하증(하시모토 질환), 위축성 자가면역 갑상선 기능저하증, 원발성 점액수종, 수정체성 포도막염, 원발성 혈관염, 백반증 급성 간 질환, 만성 간 질환, 알콜성 경변, 알콜-유도 간 손상, 담즙 울혈, 특이체질성 간 질환, 약물-유도 간염, 비-알콜성 지방간염, 알레르기 및 천식, B 그룹 스트렙토코커스(streptococci)(GBS) 감염, 정신 장애(예를 들면, 우울증 및 정신분열증), Th2형 및 Th1형 매개 질환, 급성 및 만성 통증(상이한 형태의 통증), 및 폐암, 유방암, 위암, 방광암, 결장암, 췌장암, 난소암, 전립선암 및 직장암과 같은 암종 및 조혈 악성종양(백혈병 및 림프종), 무베타지방단백질혈증, 말초정색증, 급성 및 만성 기생충성 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프성모구성 백혈병(ALL), 급성 골수 백혈병(AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신부전증, 선암종, 공기 이소성 심방박동, AIDS 치매 합병증, 알콜-유도 간염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 접촉 피부염, 알레르기성 비염, 동종이식 거부, 알파-1-안티트립신 결핍, 근위축성 측색 경화증, 빈혈, 협심증, 전각 세포 퇴화, 항 cd3 치료요법, 항 인지질 증후군, 항-수용체 과민성 반응, 대동맥 및 말초 결찰증, 대동맥 해부, 동맥 고혈압, 동맥경화증, 동정맥 누공, 운동실조증, 심방세동(지연 또는 발작성), 심방조동, 동정맥 막힘, B 세포 림프종, 골 이식 거부, 골수 이식(BMT) 거부, 좌각차단, 버키트 림프종, 화상, 심장성 부정맥, 심장성 기절 증후군, 심장 중양, 심근증, 심폐 우회 염증 반응, 연골 이식 거부, 소뇌피질 퇴화, 소뇌 장애, 혼란 또는 다초점 심방 빈맥, 화학치료요법 관련 장애, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 알콜증, 만성 염증 병리, 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 만성 살리실레이트 중독, 결장직장 암종, 울혈성 심부전, 결막염, 접촉성 피부염, 폐 심장, 관상 동맥 질환, 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob) 질환, 배양 음성 패혈증, 낭성유증, 사이토카인 치료요법 관련 장애, 권투선수치매(Dementia pugilistica), 탈수초성 질환, 땀기 출혈열, 피부염, 피부학적 증상, 당뇨병, 진성 당뇨병, 당뇨병성 동맥경화 질환(diabetic atherosclerotic disease), 광범위 루이체 질환, 확장성 울혈성 심근증, 기저핵 장애, 중년 다운 증후군, CNS 도파민 수용체 차단 약물에 의해 유도된 약물-유도 운동 장애, 약물 과민증, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비질환, 후두개염, 엡스타인-바 바이러스 감염, 피부홍통증, 추체외로 및 소뇌 장애, 가족성 적혈구잠식성 림프조직구증, 태아 흉선 이식 거부, 프리드리히 운동실조증, 기능성 말초 동맥 장애, 진균류 패혈증, 가스 괴저, 위궤양, 사구체신염, 임의의 기관 또는 조직 이식 거부, 그람 음성 패혈증, 그람 양성 패혈증, 세포내 기관으로 인한 육아종, 모발 세포 백혈병, 할러포르텐-스파츠 질환(Hallervorden-Spatz disease), 하시모토 갑상선염, 고초열, 심장 이식 거부, 혈액소증, 혈액투석, 용혈성 요독 증후군/혈전성 혈소판감소성 자반증, 출혈, 간염 A, 히스 다발 부정맥, HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨 질환, 과운동성 장애, 과민성 반응, 과민성 폐렴, 고혈압, 운동 부족 장애, 시상하부-뇌하수체-부신피질계 평가, 특발성 애디슨 질환, 특발성 폐 섬유증, 항체 매개 세포독성, 무력증, 유아 척추 근육 위축증, 대동맥 염증, 인플루엔자 A, 이온화 방사선 노출, 홍채모양체염/포도막염/시신경염, 허혈-관류 손상, 허혈 뇌졸중, 연소성 류마티스 관절염, 연소성 척추 근육 위축증, 카포시 육종, 신장 이식 거부, 레지오넬라, 리슈마니아증, 나병, 피질척수계 병변, 지방부종, 간 이식 거부, 림프부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구증, 악성 흑색종, 뇌수막염, 수막염 균혈증, 대사성/특발성, 편두통, 미토콘드리아 다중 시스템 장애, 복합 연결 조직 질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 다발성 골수종, 다발성 전신 변성(멘셀 데제렌-토마스 쉬-드라거 및 마차도-조셉), 중증 근무력증, 세포내 마이코박테리움 아비움 감염증, 마이코박테리움 투베르쿨로시스, 골수이형성 증후군, 심근 경색, 심근 허혈 장애, 비인두 암종, 신생아 만성 폐 질환, 신염, 신증, 신경퇴행성 질환, 신경성 I 근육 위축증, 호중구감소성 발열, 비-호지킨 림프종, 복부 대동맥 및 이의 지류 폐색, 폐색성 동맥 장애, okt3 치료요법, 고환염/부고환염, 고환염/정관 복원 과정, 장기 비대, 골다공증, 췌장 이식 거부, 췌장 암종, 부종양 증후군/악성 고칼슘혈증, 부갑상선 이식 거부, 골반 염증 질환, 다년성 비염, 심막 질환, 말

초 동맥경화 질환, 말초 혈관 장애, 복막염, 악성빈혈, 폐포자충 폐렴, 폐렴, POEMS 증후군(다발신경병증, 장기 비대, 내분비병증, 모노클로날 감마글로불린혈증, 및 피부 변화 증후군), 관류 후 증후군, 펌프 후 증후군, MI 심장절개 후 증후군, 자간전증, 진행성 핵상 마비, 원발성 폐 고혈압, 방사선 치료요법, 레이노드 현상 및 질환, 레이노드 질환, 레프섬 질환, 일반 협소 QRS 빈맥, 신혈관성 고혈압, 재관류 손상, 제한성 심근병증, 육종, 피부경화증, 노인 무도병, 루이체형 노인성 치매, 혈청음성 관절병증, 쇼크, 겸상 적혈구 빈혈증, 피부 동종이식 거부, 피부 변화 증후군, 소장 이식 거부, 고형 종양, 특이적 부정맥, 척수 운동실조, 척수소뇌 퇴화, 스트렙토코커스 근염, 소뇌 구조적 병변, 아급성 경화성 범뇌염, 실신, 심혈관계 매독, 전신 아나필락시스, 전신 염증 반응 증후군, 전신 개시 연소성 류마티스 관절염, T-세포 또는 FAB ALL, 모세혈관 확장증, 폐색성 혈전 혈관염, 혈소판감소증, 독성, 이식, 외상/출혈, III형 과민성 반응, IV형 과민성, 불안정 협심증, 요독증, 요로 패혈증, 두드러기, 판막성 심장 질환, 하지 정맥, 혈관염, 정맥 질환, 정맥 혈전증, 심실 세동, 바이러스 및 진균류 감염, 바이탈 뇌염/무균성 수막염, 바이탈-연관 적혈구 식작용 증후군, 베르니케-코르사코프 증후군, 월슨 질환, 임의의 기관 또는 조직의 이종이식 거부, 급성 관상 증후군, 급성 특발성 다발성 신경염, 급성 염증 탈수 초성 다발성 근신경병증, 급성 허혈, 성인 스틸스 질환, 원형 탈모, 아나필락시스증(anaphylaxis), 항-인지질 항체 증후군, 재생불량성 빈혈, 동맥경화, 아토피성 습진, 아토피성 피부염, 자가면역 피부염, 스트렙토코커스 감염과 관련된 자가면역 장애, 자가면역 장병증, 자가면역 난청, 자가면역 림프구증식성 증후군(ALPS), 자가면역 심근염, 자가면역 조속 난소 부전증, 안건염, 기관지 확장증, 수포성 유천포창, 심혈관 질환, 악성 항-인지질 증후군, 셀리악 질환(celiac disease), 경추 척추증, 만성 허혈, 반흔성 유천포창, 다발성 경화증에 대한 위험을 갖는 임상적으로 분리된 증후군(cis), 유년기 개시 정신성 장애, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 누낭염, 피부근염, 당뇨 망막증, 진성 당뇨병, 요추간판 탈출증, 추간관 내장증, 약물 유도 면역 용혈성 빈혈, 심내막염, 자궁내막증, 내안구염, 상공막염, 다형 홍반, 중증 다형 홍반, 임신성 유천포창, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome)(GBS), 긴초열, 휴즈 증후군(Hughes syndrome), 특발성 파킨슨 질환, 특발성 간질 폐렴, IgE-매개 알레르기, 면역 용혈성 빈혈, 봉입체 근염, 감염성 안구 염증 질환, 염증 탈수초 질환, 염증성 심장 질환, 염증성 신장 질환, IPF/UIP, 홍채염, 각막염, 건성 각결막염, 쿠스마울 질환 또는 쿠스마울-마이어 질환, 란드리 마비, 랑게르한스 세포 조직구증, 망상 피반, 황반 변성, 현미경적 다발혈관염, 베체트병, 운동 뉴런 장애, 점막 유천포창, 다발성 기관 부전증, 중증 근무력증, 골수이형성 증후군, 심근염, 신경근 장애, 신경병증, 비-A 비-B 간염, 시신경염, 골 용해, 난소암, 소수관절 JRA, 말초 동맥 폐색성 질환(PAOD), 말초 혈관 질환(PVD), 말초 동맥 질환(PAD), 정맥염, 결절성 다발 동맥염(또는 결절성 동맥주위염), 다발 연골염, 류마티스성 다발 근육통, 백모증, 다발성 관절 JRA, 다발성 내분비 결핍 증후군, 다발성 근염, 류마티스 다발 근육통(PMR), 펌프 후 증후군, 1차 파킨슨병, 전립선 및 직장암 및 조혈 악성 종양(백혈병 및 림프종), 전립선염, 순수 적혈구 저형성증, 1차 부신 부전증, 재발성 시신경 척수염, 협착증, 류마티스 심장 질환, 사포(활막염, 여드름, 농포증, 골과 다형성증 및 골염), 피부경화증, 2차 아밀로이드증, 폐 쇼크, 상공막염, 좌골신경통, 2차 부신 부전증, 실리콘 관련 연결 조직 질환, 스네돈-윌킨슨(sneddon-wilkinson) 피부증, 강직성 척추염, 스티븐스-존슨 증후군(SJS), 전신 염증 반응 증후군, 일시적 동맥염, 톡소플라스믹 망막증, 독성 표피 괴사, 횡단 척수염, TRAPS(종양 괴사 인자 수용체, 1형 알레르기 반응, II형 당뇨병, 통상의 간질 폐렴 (UIP), 춘계 각결막염, 바이러스 망막염, 보그트-고야나기-하라다(Vogt-Koyanagi-Harada) 증후군(VKH 증후군), 습윤 황반 변성, 상처 치료, 여시니아 및 살모넬라 관련 관절병증을 포함하는 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 피험체에의 투여가 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복강내, 낭내, 연골내, 강내, 복내, 소뇌내, 소뇌심실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 일시주사(bolus), 질내, 직장, 협측, 설하, 비내, 및 경피로부터 선택되는 하나 이상의 방식에 의한 것인, 방법.

청구항 62

2개의 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 생성하는 방법으로서,

- 제1 항원과 결합할 수 있는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;
- 제2 항원과 결합할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;
- VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서,

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고,

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고,

C는 중쇄 불변 도메인이고,

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고,

X2는 Fc 영역이고

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제1 폴리펩타이드 쇄 및 제3 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계;

d) $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서,

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고,

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고,

C는 경쇄 불변 도메인이고,

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고,

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제2 폴리펩타이드 쇄 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; 및

e) 상기 제1 폴리펩타이드 쇄, 제2 폴리펩타이드 쇄, 제3 폴리펩타이드 쇄 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 발현시키는 단계

를 포함하여,

상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린이 생성되고,

상기 결합 단백질이 IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 2) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 1) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 3); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 4); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 5)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원쌍에 결합할 수 있는, 2개의 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 생성하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 VD1 및 VD2 중쇄 가변 도메인들이 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 및 46으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인들이 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 및 47로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 사람 항체, CDR 이식된 항체, 및 사람화된 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 65

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 Fab 단편; $F(ab')_2$ 단편; 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인들로 이루어진 Fv 단편; dAb 단편; 분리된 상보성 결정 영역(CDR); 단일쇄 항체; 및 디아바디로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 66

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는, 방법.

청구항 67

제62항에 있어서, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는, 방법.

청구항 68

제62항에 있어서, 상기 Fc 영역이 고유 서열 Fc 영역 및 변이 서열 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 69

제62항에 있어서, 상기 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 및 IgD 기원의 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 70

제66항에 있어서, 상기 목적하는 성질이 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택되는, 방법.

청구항 71

제67항에 있어서, 상기 목적하는 성질이 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택되는, 방법.

청구항 72

제70항에 있어서, 상기 항체 파라미터가 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약동학, 생체이용률, 조직 교차 반응성, 및 이중상동성 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 73

제71항에 있어서, 상기 항체 파라미터가 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약동학, 생체이용률, 조직 교차 반응성, 및 이중상동성 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 74

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 상기 제2 항원에 결합하는 친화성과 상이한 친화성으로 상기 제1 항원에 결합하는, 방법.

청구항 75

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 상기 제2 항원에 결합하는 효능과 상이한 효능으로 상기 제1 항원에 결합하는, 방법.

청구항 76

목적하는 성질을 갖는, 2개의 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 생성하는 방법으로서,

a) 제1 항원과 결합할 수 있고 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;

b) 제2 항원과 결합할 수 있고 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;

c) $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서,

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고,

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고,

C는 중쇄 불변 도메인이고,

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고,

X2는 Fc 영역이고

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제1 폴리펩타이드 쇠 및 제3 폴리펩타이드 쇠를 작제하는 단계;

d) VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서,

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고,

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고,

C는 경쇄 불변 도메인이고,

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고,

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고,

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제2 폴리펩타이드 쇠 및 제4 폴리펩타이드 쇠를 작제하는 단계; 및

e) 상기 제1 폴리펩타이드 쇠, 제2 폴리펩타이드 쇠, 제3 폴리펩타이드 쇠 및 제4 폴리펩타이드 쇠를 발현시키는 단계

를 포함하여,

목적하는 성질을 갖는, 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린이 생성되고,

상기 결합 단백질이 IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 2) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 1) 및 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 3); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 4); IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 5)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원쌍에 결합할 수 있는, 목적하는 성질을 갖는, 2개의 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 생성하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2010년 12월 21일자로 출원된 미국 임시출원 번호 제61/425,671호에 대한 우선권을 주장하고, 이의 내용은 본원에 인용된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 다가 및 다특이적 결합 단백질, 이의 제조 방법, 및 구체적으로는 급성 및 만성 염증 질환, 암 및 기타 질환의 진단, 예방 및/또는 치료에 있어서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 2개 이상의 항원에 결합하는 다특이적 항체와 같이 가공된 단백질이 당업계에서 공지되어 있다. 이러한 다특이적 결합 단백질은 세포 융합, 화학적 접합, 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성될 수 있다.

[0006] 이특이적 항체는 이특이적 항체의 목적하는 특성을 갖는 뮤린 모노클로날 항체(mAb)를 발현하는 2개의 상이한 하이브리도마 세포주의 체세포 융합을 기초로 하는 쿼드로마(quadroma) 기술(문헌: Milstein and Cuello (1983) Nature 305(5934):537-40 참조)을 사용하여 제조되었다. 수득한 하이브리드-하이브리도마(또는 쿼드로마) 세포주 내에서 2개의 상이한 면역글로불린(Ig) 중쇄 및 경쇄의 무작위 쌍 형성 때문에, 10개 이하의 상이한 Ig 종이 생성되고, 이 중에 단 하나만이 기능성 이특이적 항체이다. 잘못된 쌍을 형성한 부-생성물의 존재 및 현저히 감소된 생산 수율은 정교한 정제 과정이 요구됨을 의미한다.

[0007] 또한, 이특이적 항체는 2개의 상이한 mAb의 화학적 접합에 의해 제조될 수 있다(문헌: Staerz et al. (1985) Nature 314(6012): 628-31 참조). 이러한 접근법은 균질한 제제를 수득하지 않는다. 다른 접근법은 2개의 상이한 mAb 또는 보다 소형의 항체 단편의 화학적 접합을 사용하였다(문헌: Brennan et al. (1985) Science 229(4708):81-3 참조).

- [0008] 이특이적 항체를 제조하기 위해 사용되는 다른 방법은 이중-이기능성 가교링커를 사용하여 2개의 모 항체를 커플링하는 것이지만, 수득한 이특이적 항체는 가교링커와 모 항체의 반응이 부위-지정되지 않으므로 현저한 분자 이종성을 겪는다. 보다 균질의 제제의 이특이적 항체를 수득하기 위해, 2개의 상이한 Fab 단편을 부위-지정 방식으로 이들의 힌지 시스템 잔기에서 화학적으로 가교결합하였다(문헌: Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139(7):2367-75). 그러나, 이러한 방법은 완전한 IgG 분자가 아닌 Fab'2 단편을 수득한다.
- [0009] 광범위한 기타 재조합 이특이적 항체 포맷이 개발되었다(문헌: Kriangkum et al. (2001) Biomol. Eng. 18(2):31-40 참조). 이들 중에서, 탠덤(tandem) 단일-쇄 Fv 분자 및 디아바디(diabody), 및 이의 다양한 유도체가 가장 광범위하게 사용된다. 통상적으로, 이들 분자의 작제는 상이한 항원을 인식하는 2개의 단일-쇄 Fv(scFv) 단편으로부터 시작된다(문헌: Economides et al. (2003) Nat. Med. 9(1):47-52 참조). 탠덤 scFv 분자(taFv)는 추가의 펩타이드 링커를 사용하여 단순히 2개의 scFv 분자를 결합하는 직진형 포맷을 나타낸다. 이들 탠덤 scFv 분자에 존재하는 2개의 scFv 단편은 별도의 폴딩 실체를 형성한다. 다양한 링커를 사용하여 2개의 scFv 단편을 결합할 수 있고, 링커의 길이는 63개 이하의 잔기이다(문헌: Nakanishi et al. (2001) Ann. Rev. Immunol. 19:423-74 참조). 모 scFv 단편은 보통 세균에서 가용성 형태로 발현될 수 있지만, 탠덤 scFv 분자는 흔히 세균에서 불용성 응집체를 형성하는 것으로 관찰된다. 따라서, 재폴딩 프로토콜 또는 포유동물 발현 시스템의 사용이 통상적으로 가용성 탠덤 scFv 분자를 제조하는데 적용된다. 최근 연구에서, CD28 및 흑색 종-관련 프로테오글리칸에 대해 지시된 탠덤 scFv의 형질전환 토끼 및 소에 의한 생체내 발현이 보고되었다(문헌: Gracie et al. (1999) J. Clin. Invest. 104(10):1393-401). 당해 작제에서, 2개의 scFv 분자는 CH1 링커에 의해 결합되고, 이특이적 항체의 혈청 농도는 100mg/L 이하인 것으로 밝혀졌다. 도메인 순서의 변이 및 다양한 길이 또는 유연성을 갖는 중간 링커의 사용을 포함하는 다양한 전략을 사용하여 세균에서 가용성으로 발현시킬 수 있었다. 현재 몇몇 연구가, 매우 짧은 Ala3 링커 또는 긴 글라이신/세린 풍부 링커를 사용한 세균에서의 가용성 탠덤 scFv 분자의 발현을 보고하였다(문헌: Leung et al. (2000) J. Immunol. 164(12):6495-502; Ito et al. (2003) J. Immunol. 170(9):4802-9; Karni et al. (2002) J. Neuroimmunol. 125(1-2):134-40 참조). 최근 연구에서, 길이가 3개 또는 6개 잔기인 무작위 중간 링커를 함유하는 탠덤 scFv 레퍼토리의 파지 디스플레이를 사용하여 세균에서 가용성 및 활성 형태로 제조되는 분자를 농축시켰다. 이러한 접근법은 6개의 아미노산 잔기 링커를 갖는 탠덤 scFv 분자를 분리하였다(문헌: Arndt and Krauss (2003) Methods Mol. Biol. 207:305-21). 이러한 링커 서열이 탠덤 scFv 분자의 가용성 발현을 위한 일반적인 해결책을 나타내는지의 여부는 불명확하다. 그럼에도 불구하고, 이러한 연구는 지시된 돌연변이 유발과 병용하여 탠덤 scFv 분자의 파지 디스플레이가 세균에서 활성 형태로 발현될 수 있는 분자를 농축시키기 위한 강력한 도구임을 입증하였다.
- [0010] 이특이적 디아바디(Db)는 발현을 위해 디아바디 포맷을 사용한다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인을 결합하는 링커의 길이를 약 5개의 잔기로 감소시킴으로써 scFv 단편들로부터 제조된다(문헌: Peipp and Valerius (2002) Biochem. Soc. Trans. 30(4):507-11 참조). 이러한 링커 크기의 감소는 VH 및 VL 도메인의 교차 쌍 형성에 의한 2개의 폴리펩타이드 쇠의 이량체화를 촉진시킨다. 이특이적 디아바디는 동일 세포 내에서 VHA-VLB 및 VHB-VLA 구조(VH-VL 구성), 또는 VLA-VHB 및 VLB-VHA의 구조(VL-VH 구성) 중 어느 하나를 갖는 2개의 폴리펩타이드 쇠를 발현시킴으로써 제조된다. 광범위한 상이한 이특이적 디아바디는 과거에 제조되었고, 이들 대부분은 세균에서 가용성 형태로 발현된다. 그러나, 최근 비교 연구는 가변성 도메인의 배향이 활성 결합 부위의 발현 및 형성에 영향을 미칠 수 있음을 입증한다(문헌: Mack et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(15):7021-5 참조). 그럼에도 불구하고, 세균에서 가용성 발현은 탠덤 scFv 분자에 비해 중요한 이점을 나타낸다. 그러나, 2개의 상이한 폴리펩타이드 쇠는 단일 세포 내에서 발현되므로, 불활성 동종이량체가 활성 이종이량체와 함께 제조될 수 있다. 균질한 제제의 이특이적 디아바디를 수득하기 위해서 추가의 정제 단계의 수행이 필요하다. 이특이적 디아바디를 생성하는 한 접근법은 노브-인투-홀(knob-into-hole) 디아바디를 제조하는 것이다(문헌: Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14):6444-8.18 참조). 이것은 HER2 및 CD3에 대해 지시된 이특이적 디아바디에 대해 입증되었다. Val37을 Phe로 교환하고 Leu45를 Trp으로 교환함으로써 대형 노브이 VH 도메인에 도입되었고, 항-HER2 또는 항-CD3 가변 도메인에서, Phe98을 Met으로 돌연변이시키고 Tyr87을 Ala으로 돌연변이시킴에 의해 상보성 홀이 VL 도메인에 제조되었다. 이러한 접근법을 사용함으로써, 이특이적 디아바디의 제조는 모 디아바디에 의한 72%에서 노브 인투 홀 디아바디에 의한 90% 이상으로 증가될 수 있었다. 중요하게도, 생산 수율은 이들 돌연변이의 결과로서 단지 약간 감소한다. 그러나, 몇몇 작제물에 대해서 항원-결합 활성의 감소가 관찰되었다. 따라서, 이것은 당해 접근법이 결합 활성이 변경되지 않은 이종이량체 분자를 생산하는 돌연변이를 동정하기 위해서 다양한 작제물의 분석을 요구한다는 것을 말한다. 또한, 이러한 접근법은 불변 영역에서의 면역글로불린 서열을 돌연변이성 변형시키고, 따라서 비-고유 및 비-천연 형태의 항체 서열을 생성하는 것을 요구하고, 이는 면역원성을 증가시키고, 생체내 안정성을 열화시킬뿐만 아니라, 약동학을 바

람직하지 못하게 할 수 있다.

- [0011] 단일-쇄 디아바디(scDb)는 이특이적 디아바디-유사 분자(diabody-like molecule)의 형성을 개선하기 위한 대안의 전략을 나타낸다(문헌: Holliger and Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4):128-30; Wu et al. (1996) Immunotechnology 2(1):21-36 참조). 이특이적 단일-쇄 디아바디는 길이가 약 15개 아미노산 잔기인 추가의 중간 링커를 이용하여 2개의 디아바디-형성 폴리펩타이드 쇠를 결합함으로써 제조된다. 결론적으로, 단량체 단일-쇄 디아바디에 상응하는 분자량(50 내지 60kDa)을 갖는 모든 분자는 이특이적이다.
- [0012] 몇몇의 연구는 이특이적 단일쇄 디아바디가 세균에서 가용성 및 활성 형태로 발현되고, 대부분의 정제된 분자가 단량체로서 존재함을 입증하였다(문헌: Holliger and Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4):128-30; Wu et al. (1996) Immunotechnol. 2(1):21-36; Pluckthun and Pack (1997) Immunotechnol. 3(2):83-105; Ridgway et al. (1996) Protein Engin. 9(7):617-21). 따라서, 단일-쇄 디아바디는 탠덤 scFv의 이점(모든 단량체는 이특이적이다)과 디아바디의 이점(세균에서의 가용성 발현)을 조합한다.
- [0013] 보다 최근에, 디아바디는 Fc로 융합되어 이중-디아바디로 칭하는 보다 Ig-유사한 분자를 생성하였다(문헌: Lu et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(4):2856-65). 또한, IgG의 중쇄에서 2개의 Fab 반복체를 포함하고 4개의 항원 분자에 결합하는 다가의 항체 작제물이 기재되어 있다(문헌: PCT 공보 제WO 0177342호, 및 Miller et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61 참조).
- [0014] 당업계에서는 2개 이상의 항원에 결합하는 개선된 다가의 결합 단백질이 요구된다. 미국 특허 제7,612,181호는 고친화성으로 2개 이상의 항원에 결합하는 신규 계열의 결합 단백질을 제공하고, 이는 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-IgTM)이라고 칭한다. 본 발명은 2개 이상의 추가의 항원에 결합하는 추가의 신규 결합 단백질을 제공한다.

발명의 내용

- [0015] 본 발명은 2개 이상의 항원에 결합하는 다가 결합 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 고친화성으로 2개 이상의 항원에 결합하는 신규 계열의 결합 단백질을 제공한다.
- [0016] 한 실시형태에서, 본 발명은 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, C는 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 폴리펩타이드를 나타내고, X2는 Fc 영역을 나타내고, n은 0 또는 1이다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇠를 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 한 실시형태에서, 결합 단백질의 VD1 및 VD2는 중쇄 가변 도메인이다. 다른 실시형태에서, 중쇄 가변 도메인은 묶린 중쇄 가변 도메인, 사람 중쇄 가변 도메인, CDR 이식된 중쇄 가변 도메인, 및 사람화된 중쇄 가변 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, VD1 및 VD2는 동일한 항원에 결합한다. 다른 실시형태에서, VD1 및 VD2는 상이한 항원에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, C는 중쇄 불변 도메인이다. 예를 들면, X1은 링커이고, 단 X1은 CH1이 아니다. 예를 들면, X1은 AKTTPKLEEGEFSEAR(서열번호 1); AKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 2); AKTTPKLGG(서열번호 3); SAKTTPKLGG(서열번호 4); SAKTTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPTVS(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAAA(G₄S)₄(서열번호 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSVFIFPP(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP(서열번호 16); AKTTPP(서열번호 17); AKTTPPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP(서열번호 22), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 23); GENKVEYAPALMALS(서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS(서열번호 25); GHEAAVMQVQYPAS(서열번호 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP(서열번호 27); 및 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP(서열번호 28)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 링커이다. 한 실시형태에서, X2는 Fc 영역이다. 다른 실시형태에서, X2는 변이 Fc 영역이다.
- [0017] 한 실시형태에서, 본원에 개시된 결합 단백질은 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이고, 단 이것은 CH1이 아니고, X2는 Fc 영역이다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇠를 포함한다.
- [0018] 한 실시형태에서, 결합 단백질의 VD1 및 VD2는 경쇄 가변 도메인이다. 한 실시형태에서, 경쇄 가변 도메인은 묶린 경쇄 가변 도메인, 사람 경쇄 가변 도메인, CDR 이식된 경쇄 가변 도메인, 및 사람화된 경쇄 가변 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 한 실시형태에서, VD1 및 VD2는 동일한 항원에 결합한다. 다른 실시형태에서, VD1 및 VD2는 상이한 항원에 결합한다. 한 실시형태에서, C는 경쇄 불변 도메인이다. 다른 실시형태에서, X1은 링커이고, 단 X1은 CL1이 아니다. 한 실시형태에서, X1은 AKTTPKLEEGEFSEAR(서열번호 1);

AKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 2); AKTTPKLGG(서열번호 3); SAKTTPKLGG(서열번호 4); SAKTTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPTVS(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAAA(G₄S)₄(서열번호 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSVFIFPP(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP(서열번호 16); AKTTPP(서열번호 17); AKTTPPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP(서열번호 22), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 23); GENKVEYAPALMALS(서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS(서열번호 25); GHEAAVMQVQPAS(서열번호 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP(서열번호 27); 및 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP(서열번호 28)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 링커이다. 한 실시형태에서, 결합 단백질은 X2를 포함하지 않는다.

[0019] 한 실시형태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 둘 다 동일한 링커를 포함한다. 다른 실시형태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 상이한 링커를 포함한다. 다른 실시형태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 둘 다 짧은(약 6개의 아미노산) 링커를 포함한다. 다른 실시형태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 긴(6개 초과)의 아미노산) 링커를 포함한다. 다른 실시형태에서, 가변 중쇄는 짧은 링커를 포함하고, 가변 경쇄는 긴 링커를 포함한다. 다른 실시형태에서, 가변 중쇄는 긴 링커를 포함하고, 가변 경쇄는 짧은 링커를 포함한다.

[0020] 한 실시형태에서, 본원에 개시된 결합 단백질은 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서, VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고, C는 경쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, X2는 Fc 영역을 포함하지 않는다]를 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함한다.

[0021] 다른 실시형태에서, 본 발명은 2개의 폴리펩타이드쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공하고, 여기서 상기 제1 폴리펩타이드쇄는 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, X2는 Fc 영역이다]를 포함하고; 상기 제2 폴리펩타이드쇄는 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서, VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고, C는 경쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, X2는 Fc 영역을 포함하지 않는다]를 포함한다. 특정 실시형태에서, 이원 가변 도메인(DVD) 결합 단백질은 4개의 폴리펩타이드쇄를 포함하고, 여기서, 2개의 제1 폴리펩타이드쇄는 각각 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, X2는 Fc 영역이다]를 포함하고; 2개의 제2 폴리펩타이드쇄는 각각 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서, VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고, C는 경쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, X2는 Fc 영역을 포함하지 않는다]를 포함한다. 이러한 이원 가변 도메인(DVD) 단백질은 4개의 항원 결합 부위를 갖는다.

[0022] 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 결합 단백질은 하나 이상의 표적에 결합한다. 한 실시형태에서, 표적은 사이토카인, 세포 표면 단백질, 효소 및 수용체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 하나 이상의 표적의 생물학적 기능을 조절한다. 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 하나 이상의 표적을 중화시킨다. 본 발명의 결합 단백질은 림포카인, 모노카인, 폴리펩타이드 호르몬, 수용체, 또는 종양 마커로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 사이토카인에 결합한다. 예를 들면, 본 발명의 DVD-Ig는 하기 중 2개 이상에 결합할 수 있다: 인터류킨-1 알파(IL-1 α) 및 인터류킨-1 베타(IL-1 β).

[0023] 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 3) 및 IL-1 β (서열 1)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 52의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 53의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0024] 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 2) 및 IL-1 β (서열 1)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 54 및 서열번호 56으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열; 및 서열번호 55 및 서열번호 57로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 2) 및 IL-1 β (서열 1)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 54의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 55의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-1 α (서열 2) 및 IL-1 β (서열 1)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 56의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 57의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0025] 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 1) 및 IL-1 β (서열 1)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 58 및 서열번호 60으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열; 및 서열번호 59 및 서열번호 61로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 1) 및 IL-1 β (서열 1)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 58의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 59의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, IL-1 α (서열 1) 및 IL-1 β (서열 1)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호

호 60의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 61의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

- [0026] 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 3) 및 IL-1 β (서열 2)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 62의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 63의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0027] 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 4) 및 IL-1 β (서열 2)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 64의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 65의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0028] 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 4) 및 IL-1 β (서열 3)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 66의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 67의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0029] 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 4) 및 IL-1 β (서열 4)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 680의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 69의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0030] 한 실시형태에서, IL-1 α (서열 4) 및 IL-1 β (서열 5)에 결합하는 결합 단백질은 서열번호 70의 DVD-Ig 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 71의 DVD-Ig 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0031] 다른 실시형태에서, 본 발명은 VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1) n 은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, 여기서 상기 (X1) n 은 존재하거나 부재하고; (X2) n 은 Fc 영역이고, 여기서 상기 (X2) n 은 존재하거나 부재한다]을 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 한 실시형태에서, Fc 영역은 결합 단백질로부터 부재한다.
- [0032] 다른 실시형태에서, 본 발명은 VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1) n 은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, 여기서 상기 (X1) n 은 존재하거나 부재하고; (X2) n 은 Fc 영역을 포함하지 않고, 여기서 상기 (X2) n 은 존재하거나 부재한다]을 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 한 실시형태에서, (X2) n 은 결합 단백질로부터 부재한다.
- [0033] 다른 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 제1 폴리펩타이드쇄 및 제2 폴리펩타이드쇄를 포함하고, 여기서, 상기 제1 폴리펩타이드쇄는 제1 VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1) n 은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, 여기서 상기 (X1) n 은 존재하거나 부재하고; (X2) n 은 Fc 영역이고, 여기서 상기 (X2) n 은 존재하거나 부재한다]를 포함하고; 여기서, 상기 제2 폴리펩타이드쇄는 제2 VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1) n 은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, 여기서 상기 (X1) n 은 존재하거나 부재하고; (X2) n 은 Fc 영역을 포함하지 않고, 여기서 상기 (X2) n 은 존재하거나 부재한다]를 포함한다. 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 2개의 제1 폴리펩타이드쇄 및 2개의 제2 폴리펩타이드쇄를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, (X2) n 은 제2 폴리펩타이드로부터 부재한다. 또 다른 실시형태에서, Fc 영역은, 제1 폴리펩타이드 내에 존재하는 경우, 고유 서열 Fc 영역 및 변형 서열 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 및 IgD로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0034] 다른 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 4개의 폴리펩타이드쇄를 포함하는 2개의 항원에 결합하는 DVD-Ig이고, 여기서, 각각의 제1 폴리펩타이드쇄 및 제3 폴리펩타이드쇄는 VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1) n 은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, 여기서 상기 (X1) n 은 존재하거나 부재하고; (X2) n 은 Fc 영역이고, 여기서 상기 (X2) n 은 존재하거나 부재한다]를 포함하고; 여기서, 각각의 제2 폴리펩타이드쇄 및 제4 폴리펩타이드쇄는 VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1) n 은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고, 여기서 상기 (X1) n 은 존재하거나 부재하고; (X2) n 은 Fc 영역을 포함하지 않고, 여기서 상기 (X2) n 은

존재하거나 부재한다]를 포함한다.

[0035] 본 발명은 모 항체를 예비선택함으로써 DVD-Ig 결합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 한 실시형태에서, 2개의 항원에 결합하는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 제조하는 방법은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; b) 제2 항원에 결합하는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; c) 각각 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고; C 는 중쇄 불변 도메인이고; $(X1)_n$ 은 링커이고, 단, 이것이 $CH1$ 이 아니고, 여기서 상기 $(X1)_n$ 은 존재하거나 부재하고; $(X2)_n$ 은 Fc 영역이고, 여기서 상기 $(X2)_n$ 은 존재하거나 부재한다]를 포함하는 제1 폴리펩타이드 쇄 및 제3 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; d) $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; $VD2$ 는 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고; C 는 경쇄 불변 도메인이고; $(X1)_n$ 은 링커이고, 단, 이것이 $CH1$ 이 아니고, 여기서 상기 $(X1)_n$ 은 존재하거나 부재하고; $(X2)_n$ 은 Fc 영역을 포함하지 않고, 여기서 상기 $(X2)_n$ 은 존재하거나 부재한다]를 포함하는 제2 폴리펩타이드 쇄 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; 및 (e) 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 결합하는 DVD-Ig 분자가 생성되도록 제1 폴리펩타이드 쇄, 제2 폴리펩타이드 쇄, 제3 폴리펩타이드 쇄 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 발현시키는 단계를 포함한다.

[0036] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 목적하는 성질을 갖는, 2개의 항원에 결합하는 DVD-Ig 분자를 생성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 제1 항원에 결합하고 DVD-Ig 분자에 의해 나타내어지는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; b) 제2 항원에 결합하고 DVD-Ig 분자에 의해 나타내어지는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는, 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; c) $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고; C 는 중쇄 불변 도메인이고; $(X1)_n$ 은 링커이고, 단, 이것이 $CH1$ 이 아니고; 여기서 상기 $(X1)_n$ 은 존재하거나 부재하고; $(X2)_n$ 은 Fc 영역이고, 여기서 상기 $(X2)_n$ 은 존재하거나 부재한다]를 포함하는 제1 폴리펩타이드 쇄 및 제3 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; d) $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고; C 는 경쇄 불변 도메인이고; $(X1)_n$ 은 링커이고, 단, 이것이 $CH1$ 이 아니고; 상기 $(X1)_n$ 은 존재하거나 부재하고; $(X2)_n$ 은 Fc 영역을 포함하지 않고, 여기서, 상기 $(X2)_n$ 은 존재하거나 부재한다]를 포함하는 제2 폴리펩타이드 쇄 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; 및 e) 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 결합하는, 목적하는 성질을 갖는 이원 가변 도메인 면역글로불린이 생성되도록 제1 폴리펩타이드 쇄, 제2 폴리펩타이드 쇄, 제3 폴리펩타이드 쇄 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 발현시키는 단계를 포함한다.

[0037] 한 실시형태에서, 본원에 개시된 제1 폴리펩타이드 쇄 및 제2 폴리펩타이드 쇄의 $VD1$ 은 동일한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다. 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 제1 폴리펩타이드 쇄 및 제2 폴리펩타이드 쇄의 $VD1$ 은 상이한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다. 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 제1 폴리펩타이드 쇄 및 제2 폴리펩타이드 쇄의 $VD2$ 는 동일한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다. 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 제1 폴리펩타이드 쇄 및 제2 폴리펩타이드 쇄의 $VD2$ 는 상이한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다.

[0038] 한 실시형태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 동일한 항체이다. 다른 실시형태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 상이한 항체이다.

[0039] 한 실시형태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제1 항원에 결합하고, 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제2 항원에 결합한다. 특정 실시형태에서, 제1 항원 및 제2 항원은 동일한 항원이다. 다른 실시형태에서, 모 항체들은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프들에 결합한다. 다른 실시형태에서, 제1 항원 및 제2 항원은 상이한 항원이다. 다른 실시형태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 제2 항원에 결합하는 효능과 상이한 효능으로 제1 항원에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 제2 항원에 결합하는 친화성과 상이한 친화성으로 제1 항원에 결합한다.

- [0040] 다른 실시형태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 사람 항체, CDR 이식된 항체, 및 사람화된 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 한 실시형태에서, 항원 결합부는 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가의 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인들로 이루어진 Fv 단편, dAb 단편, 분리된 상보성 결정 영역(CDR), 단일쇄 항체, 또는 디아바디로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0041] 다른 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부, 또는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부에 의해 나타내어지는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는다. 대안으로, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타내어지는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는다. 한 실시형태에서, 목적하는 성질은 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 항체 파라미터는 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약동학, 생체이용률, 조직 교차 반응성, 및 이중상동성 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 한 실시형태에서, 결합 단백질은 다가이다. 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 다특이적이다. 본원에 기재된 다가 및/또는 다특이적 결합 단백질은 특히 치료학적 관점으로부터 목적하는 성질을 갖는다. 예를 들면, 다가 및/또는 다특이적 결합 단백질은 (1) 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가의 항체보다 신속하게 내재화(및/또는 동화)될 수 있고/있거나; (2) 효능제 항체일 수 있고/있거나; (3) 다가 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포의 세포 사멸 및/또는 아포토시스를 유도할 수 있다. 다가 및/또는 다특이적 결합 단백질의 하나 이상의 항원 결합 특이성을 제공하는 "모 항체"는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 내재화(및/또는 동화)되는 것일 수 있고/있거나; 효능제, 세포 사멸-유도 및/또는 아포토시스-유도 항체일 수 있고, 본원에 기재된 바와 같은 다가 및/또는 다특이적 결합 단백질은 이들 성질 중 하나 이상의 개선(들)을 나타낼 수 있다. 또한, 모 항체에는 이들 성질 중 임의의 하나 이상이 결여될 수 있지만, 본원에 기재된 바와 같이 다가 결합 단백질로서 작제되는 경우 이들 성질이 부여될 수 있다.
- [0042] 다른 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 하나 이상의 표적에 대해 약 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ 이상; 약 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 이상; 약 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 이상; 약 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 이상; 및 약 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 이상으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 결합 속도 상수(Kon)를 갖는다. 한 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 하나 이상의 표적에 대해 약 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ 내지 약 $10^3 M^{-1} s^{-1}$; 약 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 내지 약 $10^4 M^{-1} s^{-1}$; 약 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 내지 약 $10^5 M^{-1} s^{-1}$; 또는 약 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 내지 약 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 의 결합 속도 상수(Kon)를 갖는다.
- [0043] 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 하나 이상의 표적에 대해 약 $10^{-3} s^{-1}$ 이하; 약 $10^{-4} s^{-1}$ 이하; 약 $10^{-5} s^{-1}$ 이하; 및 약 $10^{-6} s^{-1}$ 이하로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 해리 속도 상수(Koff)를 갖는다. 한 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 하나 이상의 표적에 대해 약 $10^{-3} s^{-1}$ 내지 $10^{-4} s^{-1}$; $10^{-4} s^{-1}$ 내지 $10^{-5} s^{-1}$; 또는 $10^{-5} s^{-1}$ 내지 $10^{-6} s^{-1}$ 의 해리 속도 상수(Koff)를 갖는다.
- [0044] 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 하나 이상의 표적에 대해 약 $10^{-7} M$ 이하; 약 $10^{-8} M$ 이하; 약 $10^{-9} M$ 이하; 약 $10^{-10} M$ 이하; 약 $10^{-11} M$ 이하; 약 $10^{-12} M$ 이하; 및 $10^{-13} M$ 이하로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 해리 상수(K_D)를 갖는다. 한 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 이의 표적에 대해 $10^{-7} M$ 내지 $10^{-8} M$; $10^{-8} M$ 내지 $10^{-9} M$; $10^{-9} M$ 내지 $10^{-10} M$; $10^{-10} M$ 내지 $10^{-11} M$; $10^{-11} M$ 내지 $10^{-12} M$; 또는 $10^{-12} M$ 내지 $10^{-13} M$ 의 해리 상수(K_D)를 갖는다.
- [0045] 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 결합 단백질은 면역부착 분자, 이미지화제, 치료제, 및 세포독성 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제제를 추가로 포함하는 접합체이다. 한 실시형태에서, 이미지화제는 방사성 표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 생발광 표지, 자기 표지, 및 비오틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 상기 이미지화제는 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 및 ^{153}Sm 으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방사성 표지이다. 또 다른 실시형태에서, 치료제 또는 세포독성 제제는 항-대사물, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토카인, 항-혈관신생제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소, 및 아포토시스 유발 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0046] 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 결합 단백질은 세포 단백질, 및 면역부착 분자, 이미지화제, 치료제, 및 세포독성 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 제제에 결합한다. 한 실시형태에서, 이미지화제는 방사성 표지,

효소, 형광 표지, 발광 표지, 생물발광 표지, 자기 표지, 및 비오틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 이미징화제는 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 및 ^{153}Sm 으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방사성 표지이다. 또 다른 실시형태에서, 치료제 또는 세포독성 제제는 항-대사물, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토카인, 항-혈관신생제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소, 및 아포토시스 유발 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0047] 다른 실시형태에서, 상기 기재된 결합 단백질은 결정화된 결합 단백질이고, 결정으로서 존재한다. 한 실시형태에서, 결정은 담체-부재의 제어 방출 억제학적 결정이다. 또 다른 실시형태에서, 결정화된 결합 단백질은 상기 결합 단백질의 가용성 대응물보다 생체내에서 보다 큰 반감기를 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 결정화된 결합 단백질은 생물학적 활성을 보유한다.

[0048] 다른 실시형태에서, 상기 기재된 결합 단백질은 당화된다. 예를 들면, 당화는 사람 당화 패턴이다.

[0049] 본 발명의 한 양상은 상기 기재된 결합 단백질 중 임의의 하나를 암호화하는 분리된 핵산에 관한 것이다. 추가의 실시형태는 상기 기재된 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공하고, 여기서, 상기 벡터는 pcDNA, pTT(Durocher et al. (2002) Nucl. Acids Res. 30:2); pTT3(추가적 다중 클로닝 부위를 갖는 pTT); pEFBOS(Mizushima and Nagata, (1990) Nucl. Acids Res. 18:17); pBV; pJV; pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO 및 pBJ로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 한 실시형태에서, 벡터는 미국 특허 공개 제20090239259호에 기재된 벡터이다.

[0050] 다른 양상에서, 숙주 세포는 상기 개시된 벡터로 형질전환된다. 한 실시형태에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 다른 실시형태에서, 숙주 세포는 이.콜라이(E. coli)이다. 관련 실시형태에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 다른 실시형태에서, 진핵 세포는 원생생물 세포, 동물 세포, 식물 세포, 및 진균류 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 숙주 세포는 CHO, COS; NSO, SP2, PER.C6을 포함하지만 이들에 제한되지 않는 포유동물 세포; 또는 사카로마이세스 세레비시애(Saccharomyces cerevisiae)와 같은 진균류 세포; 또는 Sf9와 같은 곤충 세포이다.

[0051] 한 실시형태에서, 예를 들면, 상이한 특이성을 갖는 2개 이상의 DVD-Ig는 단일 제조법 숙주 세포에서 제조된다. 예를 들면, 항체 혼합물의 발현은 Oligoclones™(Merus B.V., The Netherlands)라고 칭하였다(미국 특허 제 7,262,028호 및 제 7,429,486호).

[0052] 본 발명의 다른 양상은 본원에 기재된 숙주 세포 중 임의의 하나를 결합 단백질을 제조하기에 충분한 조건 하에 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 본원에 기재된 결합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 한 실시형태에서, 이러한 방법에 의해 제조되는 결합 단백질 중 50% 내지 75%는 이원 특이적 4가 결합 단백질이다. 특정 실시형태에서, 이러한 방법에 의해 제조되는 결합 단백질 중 75% 내지 90%는 이원 특이적 4가 결합 단백질이다. 특정 실시형태에서, 제조되는 결합 단백질 중 90% 내지 95%는 이원 특이적 4가 결합 단백질이다.

[0053] 한 실시형태는 결합 단백질 방출용 조성물을 제공하고, 여기서, 당해 조성물은 최종적으로 상기 기재된 바와 같은 결정화된 결합 단백질 및 성분 및 하나 이상의 중합성 담체를 포함하는 제형을 포함한다. 예를 들면, 중합성 담체는 폴리(아크릴산), 폴리(시아노아크릴레이트), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(덱사이드), 폴리(에스테르), 폴리(락트산), 폴리(락틱-코-글리콜산) 또는 PLGA, 폴리(b-하이드록시부티레이트), 폴리(카프로락톤), 폴리(디옥사논); 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(하이드록시프로필) 메타크릴아미드, 폴리[(오르가노)포스파젠], 폴리(오르토 에스테르), 폴리(비닐 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 말레산 무수물-알킬 비닐 에테르 공중합체, 플루론산 폴리올, 알부민, 알기네이트, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 콜라겐, 피브린, 젤라틴, 하이알루론산, 올리고사카라이드, 글리카미노글리칸, 설페이트화 폴리사카라이드, 이들의 블렌드 및 공중합체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예를 들면, 당해 성분은 알부민, 슈크로스, 트레할로스, 락티톨, 젤라틴, 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린, 메톡시폴리에틸렌 글리콜, 또는 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다른 실시형태는 상기 개시된 유효량의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물을 치료하는 방법을 제공한다.

[0054] 또한, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 결합 단백질 및 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 억제학적 조성물을 제공한다. 추가의 실시형태에서, 억제학적 조성물은 장애를 치료하기 위한 하나 이상의 추가의 치료제를 포함한다. 예를 들면, 추가의 제제는 치료제, 이미징화제, 세포독성 제제, 혈관신생 억제제(항-VEGF 항체 또는 VEGF-트랩을 포함하지만 이들에 제한되지 않음), 키나제 억제제(KDR 및 TIE-2 억제제를 포함하지만 이들에 제한되지 않음), 공동-자극 분자 차단제(항-B7.1, 항-B7.2, CTLA4-Ig, 항-CD20을 포함하지만 이들에 제한되지

않음), 부착 분자 차단제(항-LFA-1 항체, 항-E/L 셀렉틴 항체, 소분자 억제제를 포함하지만 이들에 제한되지 않음), 항-사이토카인 항체 또는 이의 기능성 단편(항-IL-18, 항-TNF, 및 항-IL-6/사이토카인 수용체 항체를 포함하지만 이들에 제한되지 않음); 메토크렉세이트; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; 검출가능한 표지 또는 리포터; TNF 길항제; 항류마티스제; 근육 이완제, 마약류, 비-스테로이드 소염 약물(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항 미생물성 제제, 건선치료제, 코르티코스테로이드, 동화작용 스테로이드, 에리트르포이에틴, 면역화제, 면역글로불린, 면역저해제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사성 약제, 항우울 증제, 항정신병제, 자극제, 천식 의약, 베타 효능제, 흡입 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체, 사이토카인, 및 사이토카인 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0055]

다른 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 결합 단백질을 사람 피검체에 투여하여 사람 피검체내 표적 또는 표적들의 활성이 억제되어 하나 이상의 증상이 완화되거나 치료가 달성됨을 포함하는, 본원에 기재된 결합 단백질에 의해 결합될 수 있는 표적 또는 표적들이 유해한 장애를 앓는 사람 피검체를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 장애는 관절염, 골관절염, 연소성 만성 관절염, 패혈성 관절염, 라임 관절염, 건선 관절염, 반응성 관절염, 척추관절증, 전신 홍반성 낭창, 크론 질환, 궤양성 대장염, 염증성 장 질환, 인슐린 의존성 진성 당뇨병, 갑상선염, 천식, 알레르기성 질환, 건선, 피부 경화증, 이식편 대 숙주 질환, 기관 이식 거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역 질환, 유육종증, 동맥경화증, 파종성 혈관내 응고, 가와사키 질환, 그레이브 질환, 신 증후군, 만성 피로 증후군, 베게너 육아종증, 헤노흐-췌라인 자반증, 신장의 현미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 패혈성 쇼크, 독소 쇼크 증후군, 패혈증 증후군, 악액질, 감염성 질환, 기생충 질환, 후천성 면역결핍 증후군, 급성 횡단 척수염, 헌팅톤 무도병, 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환, 뇌졸중, 원발성 담즙성 간경변, 용혈성 빈혈, 악성 종양, 심부전증, 심근 경색, 애디슨 질환, 산발성 다분비선 결핍증 제I형 및 다분비선 결핍증 제II형, 슈미트 증후군, 성인성(급성) 호흡 곤란 증후군, 탈모증, 원형 탈모증, 혈청반응 음성 관절증, 관절증, 라이터 질환, 건선성 관절증, 궤양성 대장염성 관절증, 장병증성 활막염, 클라미디아증, 여시니아 및 살모넬라 관련 관절증, 척추관절증, 죽상 질환/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역 수포성 질환, 심상성 천포창, 낙엽성 천포창, 유천포창, 선상 IgA 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 콕스 양성 용혈성 빈혈, 후천성 악성 빈혈, 연소성 악성 빈혈, 근통성 뇌염/로얄 프리(Royal Free) 질환, 만성 점막 칸디다증, 거대 세포 동맥염, 원발성 경화성 간염, 잠복성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍 질환 증후군, 후천성 면역결핍 관련 질환, B형 간염, C형 간염, 공통 가변성 면역결핍증(공통 가변성 감마글로불린저혈증), 확장형 심근증, 여성 불임증, 난소 부전증, 조속 난소 부전증, 섬유성 폐 질환, 잠복성 섬유조직 폐포염, 후-염증성 간질성 폐 질환, 간질성 폐렴, 결합 조직 질환 관련 간질성 폐 질환, 조합성 결합 조직 질환 관련 폐 질환, 전신성 경화증 관련 간질성 폐 질환, 류마티스성 관절염 관련 간질성 폐 질환, 전신성 홍반성 낭창 관련 폐 질환, 피부근염/다발성 근염 관련 폐 질환, 쇼그렌 질환 관련 폐 질환, 강직성 척추염 관련 폐 질환, 혈관염 범발성 폐 질환, 혈철증 관련 폐 질환, 약물-유도된 간질성 폐 질환, 섬유증, 방사성 섬유증, 폐색성 세기관지염, 만성 호산구성 폐렴, 림프구 침윤성 폐 질환, 감염 후 간질성 폐 질환, 통풍성 관절염, 자가면역 간염, 1형 자가면역 간염(전형적 자가면역 또는 루포이드 간염), 2형 자가면역 간염(항-LKM 항체 간염), 자가면역 매개된 저혈당증, 흑색 극세포증에 따른 B형 인슐린 저항성, 부갑상선 기능저하증, 기관 이식과 관련된 급성 면역 질환, 기관 이식과 관련된 만성 면역 질환, 골관절증, 원발성 경화성 담관염, 1형 건선, 2형 건선, 특발성 백혈구감소증, 자가면역 호중구감소증, 신장 질환 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 혈관염, 라임 질환, 원판상 홍반성 낭창, 남성 불임증 특발증 또는 NOS, 정자 자가면역, 다발성 경화증(모든 아형), 교감성 안염, 결합 조직 질환에 속발성인 폐 고혈압증, 굿 패스튜어 증후군, 결절성 다발성 동맥염의 폐 징후, 급성 류마티스성 발열, 류마티스성 척추염, 스틸 질환, 전신성 경화증, 쇼그렌 증후군, 다카야스 질환/동맥염, 자가면역 혈소판 감소증, 특발성 혈소판 감소증, 자가면역 갑상선 질환, 갑상선 기능항진증, 갑상선종증 자가면역 갑상선 기능저하증(하시모토 질환), 위축성 자가면역 갑상선 기능저하증, 원발성 점액수종, 수정체성 포도막염, 원발성 혈관염, 백반증 급성 간 질환, 만성 간 질환, 알콜성 경변, 알콜-유도 간 손상, 담즙 울혈, 특이체질성 간 질환, 약물-유도 간염, 비-알콜성 지방간염, 알레르기 및 천식, B 그룹 스트렙토코커스(GBS) 감염, 정신 장애(예를 들면, 우울증 및 정신분열증), Th2형 및 Th1형 매개 질환, 급성 및 만성 통증(상이한 형태의 통증), 및 폐암, 유방암, 위암, 방광암, 결장암, 췌장암, 난소암, 전립선암 및 직장암과 같은 암 및 조혈 악성 종양(백혈병 및 림프종), 무베타지방단백혈증, 말단 청색증, 급성 및 만성 기생충성 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 급성 골수 백혈병(AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신부전증, 선암종, 공기 이소성 심방박동, AIDS 치매 합병증, 알콜-유도 간염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 접촉 피부염, 알레르기성 비염, 동종이식 거부, 알파-1-안티트립신 결핍증, 근위축성 측색 경화증, 빈혈, 협심증, 전각 세포 퇴화, 항 cd3 치료요법, 항 인지질 증후군, 항-수용체 과민성 반응, 대동맥 및 말초 동맥류, 대동맥 해부, 동맥 고혈압, 동맥경화증, 동정맥 누공, 운동실조증, 심방세

동(지연성 또는 발작성), 심방 조동, 동정맥 막힘, B 세포 림프종, 골 이식 거부, 골수 이식(BMT) 거부, 좌각 차단, 버키트 림프종, 화상, 심장성 부정맥, 심장성 기절 증후군, 심장 종양, 심근병증, 심폐 우회 염증 반응, 연골 이식 거부, 소뇌 피질 퇴화, 소뇌 장애, 혼란 또는 다초점 심방 빈맥, 화학치료요법 관련 장애, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 알콜증, 만성 염증 병리, 만성 림프성 백혈병(PLL), 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 만성 살리실레이트 중독, 결장직장 암증, 울혈성 심부전, 결막염, 접촉성 피부염, 폐 심장증, 관상 동맥 질환, 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob) 질환, 배양 음성 폐혈증, 낭포성 섬유증, 사이토카인 치료요법 관련 장애, 권투 선수 치매(Dementia pugilistica), 탈수초성 질환, Deng기 출혈열, 피부염, 피부학적 병태, 당뇨병, 진성 당뇨병, 당뇨병성 동맥경화 질환, 확산성 루이체 질환, 확장성 울혈성 심근증, 기저핵 장애, 중년 다운 증후군, CNS 도파민 수용체 차단 약물에 의해 유도된 약물-유도 운동 장애, 약물 과민증, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비 질환, 후두개염, 엡스타인-바 바이러스 감염, 피부 홍통증, 추체외로 및 소뇌 장애, 가족성 적혈구잠식성 림프조직구증, 태아 흡선 이식 거부, 프리드리히 운동실조증, 기능성 말초 동맥 장애, 진균류 폐혈증, 가스 괴저, 위궤양, 사구체신염, 임의의 기관 또는 조직 이식 거부, 그람 음성 폐혈증, 그람 양성 폐혈증, 세포내 기관으로 인한 육아종, 모발상 세포 백혈병, 할러포르텐-스파츠 질환(Hallervorden-Spatz disease), 하시모토 갑상선염, 고조열, 심장 이식 거부, 혈액소증, 혈액투석, 용혈성 요독 증후군/혈전성 혈소판감소성 자반증, 출혈, 간염(A), 히스 다발 부정맥, HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨 질환, 과운동성 장애, 과민성 반응, 과민성 폐렴, 고혈압, 운동 부족 장애, 시상하부-뇌하수체-부신피질계 평가, 특발성 애디슨 질환, 특발성 폐 섬유증, 항체 매개 세포독성, 무력증, 유아 척추 근육 위축증, 대동맥 염증, 인플루엔자 A, 이온화 방사선 노출, 홍채모양체염/포도막염/시신경염, 허혈-관류 손상, 허혈 뇌졸중, 연소성 류마티스 관절염, 연소성 척추 근육 위축증, 카포시 육종, 신장 이식 거부, 레지오넬라, 리슈마니아증, 나병, 피질척수계 병변, 지방부종, 간 이식 거부, 림프부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구증, 악성 흑색종, 뇌수막염, 수막염 균혈증, 대사성/특발성 질환, 편두통, 미토콘드리아 다중 시스템 장애, 복합 연결 조직 질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 다발성 골수종, 다발성 전신 변성(멘셀 데제린-토마스 쉬-드라거 및 마차도-조셉), 중증 근무력증, 세포내 마이코박테리움 아비움 감염증, 마이코박테리움 투베르쿨로시스, 골수이형성 증후군, 심근 경색, 심근 허혈 장애, 비인두 암증, 신생아 만성 폐 질환, 신염, 신증, 신경퇴행성 질환, 신경성 I 근육 위축증, 호중구감소성 발열, 비-호지킨 림프종, 복부 대동맥 및 이의 지류 폐색, 폐색성 동맥 질환, okt3 치료요법, 고환염/부고환염, 고환염/정관 복원 과정, 장기 비대, 골다공증, 체장 이식 거부, 체장 암증, 부종양 증후군/악성 고칼슘혈증, 부갑상선 이식 거부, 골반 염증 질환, 다년성 비염, 심막 질환, 말초 동맥경화 질환, 말초 혈관 장애, 복막염, 악성 빈혈, 폐포자충 폐렴, 폐렴, POEMS 증후군(다발성 신경병증, 장기 비대, 내분비병증, 모노클로날 감마글로불린혈증, 및 피부 변화 증후군), 관류 후 증후군, 펌프 후 증후군, MI 심장절개 후 증후군, 자간전증, 진행성 핵상 마비, 원발성 폐 고혈압, 방사선 치료요법, 레이노드 현상 및 질환, 레이노드 질환, 레프섬 질환, 일반 협소 QRS 빈맥, 신혈관성 고혈압, 재관류 손상, 제한성 심근병증, 육종, 피부경화증, 노인 무도병, 루이체형 노인성 치매, 혈청음성 관절병증, 쇼크, 겸상 적혈구 빈혈증, 피부 동종이식 거부, 피부 변화 증후군, 소장 이식 거부, 고형 종양, 특이적 부정맥, 척수 운동실조, 척수소뇌 퇴화, 스트렙토코커스 근염, 소뇌 구조적 병변, 아급성 경화성 범뇌염, 실신, 심혈관계 매독, 전신 아나필락시스, 전신 염증 반응 증후군, 전신 개시 연소성 류마티스 관절염, T-세포 또는 FAB ALL, 모세혈관 확장증, 폐색성 혈전 혈관염, 혈소판감소증, 독성, 이식, 외상/출혈, III형 과민성 반응, IV형 과민성, 불안정 협심증, 요독증, 요로 폐혈증, 두드러기, 판막성 심장 질환, 하지 정맥, 혈관염, 정맥 질환, 정맥 혈전증, 심실 세동, 바이러스 및 진균류 감염, 바이탈 뇌염/무균성 수막염, 바이탈-연관 적혈구 식작용 증후군, 베르니케-코르사코프 증후군, 윌슨 질환, 임의의 기관 또는 조직의 이종이식 거부, 급성 관상 증후군, 급성 특발성 다발성 신경염, 급성 염증 탈수초성 다발성 근신경병증, 급성 허혈, 성인 스틸스 질환, 원형 탈모증, 아나필락시스증(anaphylaxis), 항-인지질 항체 증후군, 재생불량성 빈혈, 동맥 경화증, 아토피성 습진, 아토피성 피부염, 자가면역 피부염, 스트렙토코커스 감염과 관련된 자가면역 장애, 자가면역 장병증, 자가면역 난청, 자가면역 림프구증식성 증후군(ALPS), 자가면역 심근염, 자가면역 조숙 난소 부전증, 안진염, 기관지 확장증, 수포성 유천포창, 심혈관 질환, 악성 항-인지질 증후군, 셀리악 질환(celiac disease), 경추 척추증, 만성 허혈, 반흔성 유천포창, 다발성 경화증에 대한 위험을 갖는 임상적으로 분리된 증후군(cis), 결막염, 유년기 개시 정신성 장애, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 누낭염, 피부근염, 당뇨병성 망막증, 진성 당뇨병, 요추간판 탈출증, 추간판 내장증, 약물 유도 면역 용혈성 빈혈, 심내막염, 자궁내막증, 내안구염, 상공막염, 다형 홍반, 중증 다형 홍반, 임신성 유천포창, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome)(GBS), 건초열, 휴즈 증후군(Hughes syndrome), 특발성 파킨슨 질환, 특발성 간질성 폐렴, IgE-매개 알레르기, 면역 용혈성 빈혈, 봉입체 근염, 감염성 안구 염증 질환, 염증 탈수초 질환, 염증성 심장 질환, 염증성 신장 질환, IPF/UIP, 홍채염, 각막염, 건성 각결막염, 쿠스마울 질환 또는 쿠스마울-마이어 질환, 란드리 마비, 랑게르한스 세포 조직구증, 망상 피반, 황반 변성, 현미경적 다발성 혈관염, 베체트병, 운동 뉴런 장애, 점막 유천포창, 다발성 기관 부전증, 중증 근무

력증, 골수이형성 증후군, 심근염, 신경근 장애, 신경병증, 비-A 비-B 간염, 시신경염, 골 용해, 난소암, 소수 관절 JRA, 말초 동맥 폐색성 질환(PAOD), 말초 혈관 질환(PVD), 말초 동맥 질환(PAD), 정맥염, 결절성 다발 동맥염(또는 결절성 동맥주위염), 다발 연골염, 류마티스성 다발 근육통, 백모증, 다발성 관절 JRA, 다발성 내분비 결핍 증후군, 다발성 근염, 류마티스성 다발성 근육통(PMR), 펌프 후 증후군, 1차 파킨슨병, 전립선 및 직장암 및 조혈 악성 종양(백혈병 및 림프종), 전립선염, 순수 적혈구 저형성증, 1차 부신 부전증, 재발성 시신경척수염, 협착증, 류마티스 심장 질환, 사포(활막염, 여드름, 농포증, 골형성 과다증 및 골염), 피부경화증, 2차 아밀로이드증, 폐 쇼크, 공막염, 좌골신경통, 2차 부신 부전증, 실리콘 관련 연결 조직 질환, 스넬돈-윌킨슨(sneddon-wilkinson) 피부증, 강직성 척추염, 스티븐스-존슨 증후군(SJS), 전신 염증 반응 증후군, 일시적 동맥염, 특소플라스믹 망막증, 독성 표피 괴사, 횡단 척수염, TRAPS(종양 괴사 인자 수용체, 1형 알레르기 반응, II형 당뇨병, 두드러기, 통상의 간질 폐렴(UIP), 혈관염, 춘계 결막염, 바이러스 망막염, 보그트-고야나기-하라다(Vogt-Koyanagi-Harada) 증후군(VKH 증후군), 습윤 황반 변성, 상처 치료, 여시니아 및 살모넬라 관련 관절증이다.

[0056] 한 실시형태에서, 본 발명의 조성물 및 방법으로 치료되거나 진단될 수 있는 질환은 원발성 및 전이성 암을 포함하지만 이들에 제한되지 않고, 이들로는 유방암, 결장암, 직장암, 폐암, 구인두암, 두경부암, 식도암, 위암, 췌장암, 간암, 방광암 및 담관암, 소장암, 노관암(신장암, 방광암 및 요로상피암을 포함), 여성 생식관암(자궁경부암, 자궁암 및 난소암, 및 유모막 암종 및 임신성 영양아세포 질환), 남성 생식관암(전립선암, 저장낭암, 고환암 및 생식 세포 종양을 포함), 내분비선암(갑상선암, 부신암 및 뇌하수체선암을 포함), 및 피부암, 및 혈관종, 흑색종, 육종(골 기원 암 및 연조직 기원의 암 및 카포시 육종을 포함), 뇌 종양, 신경 종양, 안구 종양, 및 수막 종양(성상세포종, 신경아교종, 교모세포종, 망막아세포종, 신경종, 신경아세포종, 신경초종, 및 뇌수막종을 포함), 조혈 악성 종양으로부터 기원하는 고형 종양, 예를 들면, 백혈병 및 림프종(호지킨 및 비호지킨 림프종 둘 다)이 포함된다.

[0057] 한 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부는, 단독으로 사용하거나 방사선 치료요법 및/또는 다른 화학치료제와 병용하여 사용하는 경우, 암을 치료하기 위해 또는 본원에 기재된 종양으로부터의 전이를 예방 또는 억제하는데 사용한다.

[0058] 다른 양상에서, 본 발명은 본원에 논의된 바와 같이, 제2 제제의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 본원에 개시된 결합 단백질 중 임의의 하나를 투여하는 단계를 포함하는, 장애를 앓는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 제2 제제는 부테노시드, 표피 성장 인자, 코르티코스테로이드, 사이클로스포린, 설파살라진, 아미노살리실레이트, 6-머캅토피린, 아자티오프린, 메트로니다졸, 리폭시게나제 억제제, 메살라민, 올살라진, 발살라지드, 항산화제, 트롬복산 억제제, IL-1 수용체 길항제, 항-IL-1 β mAb, 항-IL-6 또는 IL-6 수용체 mAb, 성장 인자, 엘라스타제 억제제, 피리디닐-이미다졸 화합물, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF의 항체 또는 효능제, CD2, CD3, CD4, CD8, CD-19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90의 항체 또는 이들의 리간드, 메토크렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, NASID, 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린 제제, IRAK, NIK, IKK, p38, MAP 키나제 억제제, IL-1 β 전환 효소 억제제, TNF α 전환 효소 억제제, T-세포 신호전달 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토카인 수용체, 가용성 p55 TNF 수용체, 가용성 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, 소염성 사이토카인, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β 로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0059] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복강내, 낭내, 연골내, 강내, 복내, 소뇌내, 소뇌심실내, 결장내, 자궁경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 볼루스, 질내, 직장, 협측, 설하, 비내, 및 경피로부터 선택되는 하나 이상의 방식에 의해 환자에게 투여된다.

[0060] 본 발명의 한 양상은 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질에 대한 하나 이상의 항-이디오타입 항체를 제공한다. 항-이디오타입 항체는, 이들에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 중쇄 또는 경쇄의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 또는 이들의 리간드 결합부, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 골격 영역, 또는 이의 임의의 일부가 포함되는 면역 글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 펩타이드를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1a는 이원 가변 도메인(DVD)-Ig 작제물의 도식적 표현이고, 2개의 모 항체 유래의 DVD-Ig의 생성을 위한 전략을 나타낸다.

도 1b는 작제물 DVD1-Ig, DVD2-Ig, 및 하이브리도마 클론인 2D13.E3(항-IL-1 α) 및 13F5.G5(항-IL-1 β) 유래의 2개의 키메라 단일-특이적 항체의 도식적 표현이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 본 발명은 2개 이상의 항원에 결합하는 다가 및/또는 다특이적 결합 단백질에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 DVD-Ig를 제조하기 위한 핵산, 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포뿐만 아니라 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig), 및 이의 약제학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 시험관내 또는 생체내에서 특이적 항원을 검출하기 위해 본 발명의 DVD-Ig를 사용하는 방법도 본 발명에 포함된다.

[0063] 본원에 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학적 및 기술적 용어들은 당업자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가질 것이다. 그러나, 용어의 의미 및 범위는 명확해야만 하고, 임의의 잠재적인 모호성이 존재하는 경우, 본원에 제공된 정의는 임의의 사전적 또는 외적인 정의에 대해 전례에 따른다. 또한, 정황상 달리 요구되지 않는 한, 단수의 용어는 복수도 포함하고, 복수의 용어는 단수도 포함할 것이다. 이러한 적용에 있어서, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, 용어 "포함하는" 및 "포함한다" 및 "포함된" 등의 다른 형태의 사용은 한정되지 않는다. 또한, "요소" 또는 "성분" 등의 용어는, 달리 구체적으로 언급하지 않는 한, 하나의 유니트를 포함하는 요소 및 성분, 및 하나 초과와 서브유니트를 포함하는 요소 및 성분 둘 다를 포함한다.

[0064] 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질과 핵산 화학 및 하이브리드화 등과 관련하여 사용된 용어 및 이들의 기술은 당업계에 공지되어 있고 일반적으로 사용되는 것이다. 본 발명의 방법 및 기술은 당업계에 공지되어 있고, 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서 전체에서 인용되고 논의되는 각종 일반적 문헌 및 보다 구체적인 문헌에 기술된 바와 같은 통상적인 방법에 따라 일반적으로 수행된다. 효소 반응 및 정제 기술은 당업계에서 일반적으로 수행되는 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 제조업자의 지침에 따라 수행한다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의학 및 약제 화학과 관련하여 사용된 용어 및 이들의 실험 절차 및 기술은 당업계에 공지되어 있고 일반적으로 사용되는 것이다. 화학 합성, 화학 분석, 약제, 제형, 및 전달, 및 환자의 치료에 대해서도 표준 기술을 사용한다.

[0065] 본 발명을 더 용이하게 이해할 수 있도록 사용된 용어들을 하기에 정의한다.

[0066] 용어 "폴리펩타이드"는 아미노산의 임의의 중합체 쇄를 말한다. 용어 "펩타이드" 및 "단백질"은 용어 폴리펩타이드와 상호교환적으로 사용되고, 또한 아미노산의 중합체 쇄를 의미한다. 용어 "폴리펩타이드"는 천연 또는 인공 단백질, 단백질 단편, 및 단백질 서열의 폴리펩타이드 유사체를 포함한다. 폴리펩타이드는 단량체 또는 중합체일 수 있다. 용어 "폴리펩타이드"는 본문에서 달리 모순되지 않는 한, 폴리펩타이드 및 이의 단편 및 변이체(변이체의 단편 포함)를 포함한다. 항원성 폴리펩타이드에 대해, 폴리펩타이드의 단편은 임의로 폴리펩타이드의 하나 이상의 인접 또는 비선형 에피토프를 함유한다. 하나 이상의 에피토프 단편의 정확한 경계는 당업계의 통상의 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 단편은 약 5개 이상의 인접 아미노산, 예를 들면, 약 10개 이상의 인접 아미노산, 약 15개 이상의 인접 아미노산, 또는 약 20개 이상의 인접 아미노산을 포함한다. 폴리펩타이드의 변이체는 본원에 기재된 바와 같다.

[0067] 용어 "분리된 단백질" 또는 "분리된 폴리펩타이드"는, 이의 기원 또는 유도 근원의 관점에 따라, 자연 상태로 수반되는 자연 관련 성분과 관련되어 있지 않거나; 동일한 종 유래의 다른 단백질을 실질적으로 포함하지 않거나; 상이한 종 유래의 세포에 의해 발현되거나; 자연에서 발생하지 않는, 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 따라서, 화학적으로 합성되거나, 자연적으로 기원하는 세포와 상이한 세포 시스템에서 합성된 폴리펩타이드는 이의 자연 관련 성분으로부터 "분리"될 것이다. 또한, 단백질은 당업계에 공지되어 있는 단백질 정제 기술을 사용하여, 분리에 의해 자연 관련 성분을 실질적으로 포함하지 않도록 할 수 있다.

[0068] 용어 "회수하는"은, 예를 들면, 당업계에 공지되어 있는 단백질 정제 기술을 사용하여, 분리에 의해 자연 관련 성분을 실질적으로 포함하지 않는 폴리펩타이드와 같은 화학 종을 제공하는 과정을 말한다.

[0069] 용어 "생물학적 활성"은 분자의 임의의 하나 이상의 고유 생물학적 성질(생체내에서 발견되는 바와 같이 천연에

존재하거나, 또는 재조합 수단에 의해 제공되거나 가능한 경우이든지 관계없이)을 말한다. 생물학적 성질은 수용체로의 결합; 세포 증식의 유도, 세포 성장의 억제, 기타 사이토카인의 유도, 아포토시스의 유도, 및 효소 활성을 포함하지만 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 생물학적 성질은 Ig 분자의 활성을 유도한다.

[0070] 항체, 단백질, 또는 펩타이드의 제2 화학 종과의 상호작용과 관련하여, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은, 상기 상호작용이 화학 종 상의 특정 구조(예를 들면, 항원 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미하고, 예를 들면, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특이적 단백질 구조를 인식하여 여기에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 대해 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응에서 에피토프 A (또는 유리된 미표지 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0071] 용어 "항체"는 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄의 4개의 폴리펩타이드 쇄로 이루어진 임의의 면역글로불린(Ig) 분자, 또는 Ig 분자의 필수적인 에피토프 결합 특징을 보유하는 이들의 임의의 기능성 단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체를 의미한다. 이러한 돌연변이체, 변이체, 또는 유도체 항체 포맷은 당업계에 공지되어 있다. 이의 비제한적 실시형태가 하기에 논의된다.

[0072] 전장(full-length) 항체에서, 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 약어로 LCVR 또는 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 1개 도메인, CL로 이루어진다.

[0073] VH 및 VL 영역은, 골격 영역(FR)이라고 칭하는 보다 보존된 영역 사이에 배치된 상보성 결정 영역(CDR)이라고 칭하는 초가변성 영역들로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단으로부터 카복시 말단-으로 하기 순서대로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들면, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스로 이루어질 수 있다.

[0074] 용어 "Fc 영역"은 온전한 항체의 파파인 소화에 의해 생성될 수 있는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. Fc 영역은 고유 서열 Fc 영역 또는 변이 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고, 임의로 CH4 도메인을 포함한다. 항체 이펙터 기능을 변경시키기 위한 Fc 부분 내의 아미노산 잔기의 대체가 당업계에 공지되어 있다(미국 특허 제 5,648,260호 및 제5,624,821호). 항체의 Fc 부분은 몇몇의 중요한 이펙터 기능, 예를 들면, 사이토카인 유도, ADCC, 식세포작용, 보체 의존적 세포독성(CDC) 및 항체와 항원-항체 복합체의 반감기/제거율 등을 매개한다. 소정 경우에, 이러한 이펙터 기능은 치료 항체에 바람직하지만, 다른 경우에는 치료 목적에 따라서 불필요하거나 심지어 유해할 수도 있다. 특정 사람 IgG 아이소타입, 특히 IgG1 및 IgG3은 각각 Fc γ R 및 보체 C1q에 대한 결합을 통해 ADCC 및 CDC를 매개한다. 신생 Fc 수용체(FcRn)는 항체의 혈행 반감기를 결정하는 중요한 성분이다. 또 다른 실시형태에서, 항체의 불변 영역, 예를 들면, 항체의 Fc 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 대체되어, 항체의 이펙터 기능이 변경된다. 면역글로불린의 2개의 동일한 중쇄의 이량체화는 CH3 도메인의 이량체화에 의해 매개되고, 힌지 영역 내에서 디설파이드 결합에 의해 안정화된다(Huber et al. (1976) Nature 264:415-20; Thies et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:67-79.). 중쇄-중쇄 디설파이드 결합을 방지하기 위한 힌지 영역 내의 시스테인 잔기의 돌연변이는 CH3 도메인의 이량체화를 불안정화시킬 것이다. CH3 이량체화에 관여하는 잔기들은 동정되었다(Dall'Acqua (1998) Biochem. 37:9266-73.). 따라서, 1개의 반쪽-Ig를 생성할 수 있다. 흥미롭게도, 이들 1개의 반쪽 Ig 분자는 IgG 및 IgA 서브클래스 둘 다에 대해 자연에서 발견되었다(Seligman (1978) Ann. Immunol. 129:855-70; Biewenga et al. (1983) Clin. Exp. Immunol. 51:395-400). FcRn: Ig Fc 영역의 화학양론은 2:1인 것으로 측정되었고(West et al. (2000) Biochem. 39:9698-708), 반쪽 Fc는 FcRn 결합을 매개하기에 충분하다(Kim et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:542-548.). CH3 이량체화에 중요한 잔기가 CH3 베타 시트 구조의 내부 계면 상에 위치하는 반면에, FcRn 결합에 관여하는 영역이 CH2-CH3 도메인의 외부 계면 상에 위치하므로, CH3 도메인의 이량체화를 붕괴시키기 위한 돌연변이는 FcRn 결합에 대해 보다 큰 역효과를 갖지 않을 수 있다. 그러나, 반쪽 Ig 분자는 통상의 항체보다 작은 크기로 인하여 조직 침투에 있어서 소정 이점을 가질 수 있다. 한 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 본 발명의 결합 단백질의 불변 영역, 예를 들면, Fc 영역에서 대체되어 중쇄의 이량체화가 붕괴되어 반쪽 DVD Ig 분자가 생성된다. IgG의 소염 활성화는 IgG Fc 단편의 N-결합된 글리칸의 시알릴화에 완전히 의존한다. 소염 활성화에 대한 정확한 글리칸 요건을 결정하여 적절한 IgG1 Fc 단편을 생성하여 효능이 크게 개선된 완전한 재조합 시알릴화된 IgG1 Fc를 생성할 수 있다(Anthony et al. (2008) Science 320:373-376).

- [0075] 용어 항체의 "항원 결합부"는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 하나 이상의 항체 단편을 말한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 항체 실시형태는 또한 이특이적, 이중 특이적, 또는 다중 특이적 포맷일 수 있고; 2개 이상의 상이한 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 용어 항체의 "항원-결합부"에 포함되는 결합 단편의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체 단일 아암의 VL 및 VH 도메인들로 이루어진 Fv 단편; (v) 하나의 가변 도메인을 포함하는 dAb 단편(Ward et al. (1989) Nature 341:544-546, PCT 공보 제WO 90/05144호); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)이 포함된다. 또한, Fv 단편의 두 도메인, VL 및 VH는 별도의 유전자에 의해 암호화되지만, VL 및 VH 영역은, 재조합 방법을 이용하여, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자(단일쇄 Fv(scFv)로서 공지됨; 예를 들면 문헌[Bird et al. (1998) Science 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조)를 형성하는 단일 단백질 쇄로서 제조되도록 하는 합성 링커에 의해 결합될 수 있다. 또한, 이러한 단일쇄 항체는 용어 항체의 "항원 결합부"에 포함되는 것으로 의도된다. 단일쇄 항체의 다른 형태, 예를 들면, 디아바디(diabody)도 포함된다. 디아바디는, VH 및 VL 도메인들이 단일 폴리펩타이드 쇄에서 발현되지만, 동일 쇄 상의 두 도메인 사이에 쌍을 이루도록 하기에는 너무 짧은 링커를 사용하여 상기 도메인들이 다른 쇄의 상보성 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원 결합 부위를 생성하는, 2가의 이특이적 항체이다(예를 들면, 문헌[Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123] 참조). 이러한 항체 결합부는 당업계에 공지되어 있다(Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York, 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)). 추가로, 단일쇄 항체는 또한 상보성 경쇄 폴리펩타이드와 함께 1쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 1쌍의 탠덤 Fv 절편(VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 "선형 항체"를 포함한다(Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062; 및 미국 특허 제5,641,870호).
- [0076] 용어 "다가 결합 단백질"은 본 명세서 전반에 걸쳐 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 결합 단백질을 나타내기 위해 사용된다. 한 실시형태에서, 다가 결합 단백질은 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖도록 조작되고, 일반적으로 자연 발생 항체가 아니다. 용어 "다특이적 결합 단백질"은 2개 이상의 관련 또는 비관련 표적에 결합하는 결합 단백질을 말한다.
- [0077] 본 발명의 이원 가변 도메인(DVD) 결합 단백질은 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하고, 4가 또는 다가의 결합 단백질이다. DVD는 단일 특이적(즉, 1개의 항원에 결합할 수 있음)이거나, 다중 특이적(즉, 2개 이상의 항원에 결합할 수 있음)일 수 있다. 2개의 중쇄 DVD 폴리펩타이드 및 2개의 경쇄 DVD 폴리펩타이드를 포함하는 DVD 결합 단백질은 DVD-Ig로서 나타낸다. DVD-Ig의 각각의 반쪽은 하나의 중쇄 DVD 폴리펩타이드, 및 하나의 경쇄 DVD 폴리펩타이드, 및 2개의 항원 결합 부위를 포함한다. 각각의 결합 부위는 항원 결합 부위당 항원 결합에 관여하는 총 6개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0078] 용어 "이특이적 항체"는 쿼트로마 기술(문헌[Milstein and Cuello (1983) Nature 305(5934):537-40 참조], 2개의 상이한 모노클로날 항체의 화학적 접합(문헌[Staerz et al. (1985) Nature 314(6012): 628-31], 또는 Fc 영역에 돌연변이를 도입하는 늑 인투 홀 또는 유사한 접근법(문헌[Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14):6444-8.18]에 의해, 하나만이 기능성 이특이적 항체인 상이한 다중 면역글로불린 중을 얻음으로써 생성되는 전장 항체를 말한다. 분자 기능에 의해, 이특이적 항체는 이의 2개의 결합 아암(한 쌍의 HC/LC) 중 하나 상의 하나의 항원(또는 에피토프)에 결합하고 이의 제2 아암(다른 쌍의 HC/LC) 상의 다른 항원(또는 에피토프)에 결합한다. 이러한 정의에 따라, 이특이적 항체는 2개의 구분된 항원 결합 아암(특이성 및 CDR 서열 둘 다)을 갖고, 이것이 결합하는 각각의 항원에 대해 1가이다.
- [0079] 용어 "이원-특이적 항체"는 이의 결합 아암(한 쌍의 HC/LC)의 각각에서 2개의 상이한 항원(또는 에피토프)에 결합할 수 있는 전장 항체를 말한다(PCT 공보 제WO 02/02773호 참조). 따라서, 이원-특이적 결합 단백질은 동일한 특이성 및 동일한 CDR 서열을 갖는 2개의 동일한 항원 결합 아암을 갖고, 이것이 결합하는 각각의 항원에 대해 2가이다.
- [0080] 결합 단백질의 "기능성 항원 결합 부위"는 표적 항원에 결합하는 부위이다. 항원 결합 부위의 항원 결합 친화성은 필수적으로 항원 결합 부위가 유도되는 모 항체만큼 강하지 않지만, 항원에 결합하는 능력은 항원에 결합하는 항체를 평가하기 위해 공지된 다수의 방법 중 임의의 하나를 사용하여 측정가능해야만 한다. 또한, 본원에서 다가의 항체의 항원 결합 부위의 항원 결합 친화성은 정량적으로 동일할 필요는 없다.
- [0081] 용어 "사이토카인"은 세포간 매개체로서 다른 세포 집단에 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질

에 대한 일반적 용어이다. 이러한 사이토카인의 예로는 림포카인, 모노카인 및 통상적인 폴리펩타이드 호르몬이다.

[0082] 사이토카인 중에서, 사람 성장 호르몬, N-메티오닐 사람 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 펠라신; 프로렐라신; 난포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 및 황체 호르몬(LH)과 같은 당단백질 호르몬; 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토젠; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 물러리안-억제 물질; 마우스 생식선 자극 호르몬-관련 펩타이드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); NGF-알파와 같은 신경 성장 인자; 혈소판-성장 인자; 태반 성장 인자, TGF-알파 및 TGF-베타와 같은 형질전환 성장 인자(TGF); 인슐린-유사 성장 인자-1 및 -11; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도성 인자; 인터페론-알파, -베타 및 -감마 콜로니 자극 인자(CSF)(예를 들면, 대식세포-CSF(M-CSF))와 같은 인터페론; 과립구 대식세포-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, 및 IL-33과 같은 인터류킨(IL); TNF-알파 또는 TNF-베타와 같은 종양 괴사 인자; 및 LIF 및 키티리칸(KL)을 포함하는 기타 폴리펩타이드 인자가 포함된다. 용어 사이토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 등가물 기원의 단백질을 포함한다.

[0083] 용어 "링커"는 펩타이드 결합에 의해 결합된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드를 나타내는데 사용되고, 하나 이상의 항원 결합부를 결합하는데 사용된다. 이러한 링커 폴리펩타이드는 문헌(예를 들면, 문헌[Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123] 참조)에 널리 공지되어 있다. 예시적인 링커로는 AKTTPKLEEGEFSEAR(서열번호 1); AKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 2); AKTTPKLGG(서열번호 3); SAKTTPKLGG(서열번호 4); SAKTTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPTVS(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAAA(G₄S)₄(서열번호 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSVFIFPP(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP(서열번호 16); AKTTPP(서열번호 17); AKTTPPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP(서열번호 22), GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 23); GENKVEYAPALMALS(서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS(서열번호 25); GHEAAVMQVQPAS(서열번호 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP(서열번호 27); 및 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP(서열번호 28)가 포함되지만, 이들에 제한되지 않는다.

[0084] 면역글로불린 불변 도메인은 중쇄 또는 경쇄 불변 도메인을 말한다. 사람 IgG 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있다.

[0085] 용어 "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 말하고, 즉, 개개의 항체를 포함하는 집단은 최소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고 단일 항원에 대해 지시된 것이다. 또한, 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 항체 제제와는 반대로, 각각의 mAb는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 수식어 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의해 항체 생성을 요구하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0086] 용어 "사람 항체"는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 사람 항체는 예를 들면, CDR에서 및 특히, CDR3에서, 사람 배선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기(예를 들면, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 용어 "사람 항체"는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 배선으로부터 유도된 CDR 서열이 사람 골격 서열 상으로 이식된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

[0087] 용어 "재조합 사람 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 분리된 모든 사람 항체, 예를 들면, 숙주 세포내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체(하기 섹션 II C에서 추가로 기재됨), 재조합, 조합적 사람 항체 라이브러리로부터 분리된 항체(Hoogenboom (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy and Highsmith (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavalondo and Larrick (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom and Chames (2000) Immunol. Today 21:371-378), 사람 면역글로불린 유전자에 대해 형질전환된 동물(예를 들면, 마우스)로부터 분리된 항체(문헌[Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann and Green (2002) Current Opin. Biotechnol. 13:593-597; Little et al (2000) Immunol. Today 21:364-370] 또는 사람 면역글로불린 유전자 서열을 기타 DNA 서열로 스폴라이싱함을 포함하는 임의의 기

타 수단에 의해 제조되거나 발현되거나 생성되거나 분리된 항체를 포함한다. 이러한 재조합 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 소정 실시형태에서, 이러한 재조합 사람 항체는 시험관내 돌연변이유발(또는, 사람 Ig 서열에 대해 형질전환된 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)되고, 따라서, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 사람 배선 VH 및 VL 서열로부터 유도되고 이와 관련된 것이지만 생체내 사람 항체 배선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0088] "친화성 성숙된" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화성을 개선하는, 하나 이상의 CDR에서 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 예시 친화성 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화성을 가질 것이다. 친화성 성숙된 항체는 당업계에서 공지된 과정에 의해 생성된다. 문헌 [Marks et al. (1992) Bio/Technology 10:779-783]은 VH 및 VL 도메인 서플링에 의한 친화성 성숙을 기재한다. CDR 및/또는 골격 잔기의 무작위 돌연변이유발은 문헌 [Barbas et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813; Schier et al. (1995) Gene 169:147-155; Yelton et al. (1995) J. Immunol. 155:1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol. 154(7):3310-9; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896]에 기재되어 있고, 활성 개선 아미노산 잔기를 이용한 선택적 돌연변이유발 위치, 접촉 또는 과돌연변이 위치에서의 선택적 돌연변이는 미국 특허 제6,914,128호에 기재되어 있다.

[0089] 용어 "키메라 항체"는 한 종 유래의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열과 다른 종 유래의 불변 영역 서열을 포함하는 항체, 예를 들면, 무린 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 사람 불변 영역에 결합된 항체를 말한다.

[0090] 용어 "CDR 이식된 항체"는 한 종 유래의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만, VH 및/또는 VL의 하나 이상의 CDR 영역의 서열이 다른 종의 CDR 서열로 대체된 항체, 예를 들면, 무린 CDR 중 하나 이상(예를 들면, CDR3)이 사람 CDR 서열로 대체된 무린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 말한다.

[0091] 용어 "사람화된 항체"는 비-사람 종(예를 들면, 마우스) 유래의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만 VH 및/또는 VL 서열의 적어도 일부가 보다 "사람-유사", 즉 사람 배선 가변 서열과 보다 유사한 서열로 변경된 항체를 말한다. 사람화된 항체의 한 형태는 비-사람 CDR 서열을 사람 VH 및 VL 서열에 도입하여 상응하는 사람 CDR 서열이 대체된 CDR-이식된 항체이다. 또한, "사람화된 항체"는 목적하는 항원에 면역특이적으로 결합하고 실질적으로 사람 항체의 아미노산 서열을 갖는 골격(FR) 영역 및 실질적으로 비-사람 항체의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 또는 변이체, 이의 유도체, 유사체 또는 단편이다. CDR과 관련하여 용어 "실질적으로"는 비-사람 항체 CDR의 아미노산 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR을 말한다. 사람화된 항체는 실질적으로 모든 하나 이상, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv)을 포함하고, 여기서, 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-사람 면역글로불린(즉, 공여자 항체)의 CDR에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 골격 영역은 사람 면역글로불린 컨센스 서열의 CDR이다. 한 실시형태에서, 사람화된 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 사람 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 사람화된 항체는 적어도 중쇄의 가변 도메인뿐만 아니라 경쇄 둘 다를 함유한다. 또한, 항체는 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 사람화된 항체는 사람화된 경쇄만을 함유한다. 몇몇 실시형태에서, 사람화된 항체는 사람화된 중쇄만을 함유한다. 특정 실시형태에서, 사람화된 항체는 경쇄 및/또는 사람화된 중쇄의 사람화된 가변 도메인만을 함유한다.

[0092] 용어 "캐뻛 넘버링", "캐뻛 정의" 및 "캐뻛 라벨링"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 당해 분야에서 인식되는 이들 용어는 항체 또는 이의 항원 결합부의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 다른 아미노산 잔기보다 더 가변성인(즉, 초가변성) 아미노산 잔기의 넘버링 시스템을 말한다[Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391, 및 Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]. 중쇄 가변 영역에 관해서, 초가변성 영역은 CDR1에 대해 아미노산 위치 31 내지 35, CDR2에 대해 아미노산 위치 50 내지 65, 및 CDR3에 대해 아미노산 위치 95 내지 102의 범위이다. 경쇄 가변 영역에 관해서, 초가변성 영역은 CDR1에 대해 아미노산 위치 24 내지 34, CDR2에 대해 아미노산 위치 50 내지 56, 및 CDR3에 대해 아미노산 89 내지 97의 범위이다.

[0093] 용어 "CDR"은 항체 가변 서열 내의 상보성 결정 영역을 말한다. 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역에는 3개의 CDR이 존재하고, 각각의 가변 영역에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 지정된다. 용어 "CDR 세트"는 항원에 결합하는 단일 가변 영역 내에 발생하는 3개의 CDR의 그룹을 말한다. 이들 CDR의 정확한 경계는 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되었다. 캐뻛에 의한 기술된 시스템(Kabat et al., Sequences of Proteins of

Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))은 항체의 임의의 가변 영역에 적용될 수 있는 명확한 잔기 넘버링 시스템을 제공할 뿐만 아니라 3개의 CDR을 정의하는 정확한 잔기 경계를 제공한다. 이들 CDR은 캐뱃 CDR로서 언급될 수 있다. 초티아 및 동료들은 아미노산 서열의 수준에서 다양성이 큰에도 불구하고 캐뱃 CDR 내에 특정 아-부위는 거의 동일한 펩타이드 백본 입체구조를 채택하고 있음을 밝혔다[Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 및 Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883]. 이들 아부위는 L1, L2 및 L3 또는 H1, H2 및 H3으로서 지정되었고, 여기서, "L" 및 "H"는 각각 경쇄 및 중쇄 영역을 지칭한다. 이들 영역은 초티아 CDR로서 언급될 수 있고, 이는 캐뱃 CDR과 중복되는 경계를 갖는다. 캐뱃 CDR과 중복되는 CDR을 정의하는 다른 경계는 패들란에 의해 기재되어 있다[Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139 및 MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-45]. 또 다른 CDR 경계 정의는 상기 시스템 중 하나를 엄격하게 따르지는 않지만, 특정 잔기 또는 잔기 그룹 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 현저한 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험적 발견의 관점에서 이들은 단축되거나 연장될 수 있지만 그럼에도 불구하고 캐뱃 CDR과 중복될 것이다. 본원에서 사용된 방법은 이들 시스템 중 어느 하나에 따라 정의된 CDR을 사용할 수 있지만, 소정 실시형태는 캐뱃 또는 초티아 정의된 CDR을 사용한다.

[0094] 용어 "골격" 또는 "골격 서열"은 CDR을 제외한 가변 영역의 나머지 서열을 말한다. CDR 서열의 정확한 정의는 상이한 시스템에 의해 결정될 수 있기 때문에, 골격 서열의 의미는 부응하여 상이하게 해석된다. 또한, 6개의 CDR(경쇄의 CDR-L1, -L2, 및 -L3, 및 중쇄의 CDR-H1, -H2, 및 -H3)은 경쇄 및 중쇄 상의 골격 영역을 각각의 쇄 상에 4개의 서브-영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)으로 나누고, 여기서, CDR1은 FR1과 FR2 사이에 위치하고, CDR2는 FR2와 FR3 사이에 위치하고, CDR3은 FR3과 FR4 사이에 위치한다. FR1, FR2, FR3 또는 FR4로서 특정 서브-영역을 구체화하지 않고 다른 것으로 나타낸 골격 영역은 단일의 자연 발생 면역글로불린 쇄의 가변 영역 내의 조합된 FR을 나타낸다. FR은 4개의 서브-영역 중 하나를 나타내고, FR들은 골격 영역을 구성하는 4개의 서브-영역 중 2개 이상을 나타낸다.

[0095] 용어 "배선 항체 유전자" 또는 "유전자 단편"은 특정 면역글로불린의 발현을 위해 유전학적 재배열 및 돌연변이를 유발하는 성숙 과정을 거치지 않는 비-립프성 세포에 의해 암호화된 면역글로불린 서열을 말한다(예를 들면, 문헌[Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3):183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484:13-30] 참조). 본 발명의 다양한 실시형태에 의해 제공되는 이점 중 하나는 배선 항체 유전자가 성숙 항체 유전자보다 종에서 개체의 필수 아미노산 서열 구조 특징을 보존할 가능성이 높고, 따라서 당해 종에서 치료학적으로 사용되는 경우 외래 공급원으로서 인식될 가능성이 낮다는 인지에 기인한다.

[0096] 용어 "중화"는 결합 단백질이 항원에 특이적으로 결합하는 경우 항원의 생물학적 활성에 대응하는 것을 말한다. 한 실시형태에서, 중화 결합 단백질은 사이토키인에 결합하여 약 20% 이상, 40% 이상, 60% 이상, 80% 이상 또는 85% 이상으로 생물학적 활성을 감소시킨다.

[0097] 용어 "활성"은 2개 이상의 항원에 대한 DVD-Ig의 결합 특이성 및 친화성과 같은 활성을 포함한다.

[0098] 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 폴리펩타이드 결정인자를 포함한다. 소정 실시형태에서, 에피토프 결정인자로는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설포닐과 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹이 포함되고, 소정 실시형태에서는 특이적인 3차원 구조 특징, 및/또는 특이적 하전 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합되는 항원의 일 영역이다. 따라서, 에피토프는 특이적 결합 파트너 상의 상보성 부위에 결합하는 것으로 공지되어 있는 항원(또는 이의 단편)의 영역의 아미노산 잔기로 이루어진다. 항원성 단편은 1개 초과에 에피토프를 함유할 수 있다. 소정 실시형태에서, 항체는 단백질 및/또는 거대분자의 복합 혼합물에서 자신의 표적 항원을 인식할 때 항원에 특이적으로 결합한다고 한다. 항체가 교차-경쟁(하나가 다른 하나의 결합 또는 조절 효과를 방지한다)하는 경우, 항체는 "동일한 에피토프에 결합한다"라고 한다. 추가로, 에피토프의 구조적인 정의(중첩, 유사, 동일)는 유용하지만, 기능적 정의는 흔히 이들이 구조적(결합) 및 기능적(조절, 경쟁) 파라미터를 포함하기 때문에 보다 관련되어 있다.

[0099] 용어 "표면 플라스몬 공명"은 예를 들면, BIAcore® 시스템(BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)을 이용하여 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도의 변경을 검출하여 생체특이적 상호작용을 실시간 분석할 수 있는 광학 현상을 말한다. 추가의 상세 설명에 대해서는 문헌[Jonsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; 및 Johnsson et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277]을 참조한다.

[0100] 용어 "K_{on}"는 당업계에 공지된 바와 같이, 예를 들면, 항체/항원 복합체를 형성하기 위한 항원에 대한 결합 단백질

질(예를 들면, 항체)의 결합을 나타내는 결합 속도 상수(on rate constant)를 말한다. 또한, " K_{on} "은 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이 용어 "결합 속도 상수" 또는 " k_a "로 공지되어 있다. 표적 항원에 대한 항체의 결합 속도 또는 항체와 항원 사이의 복합체 형성 속도를 나타내는 상기 값은 하기의 식으로 나타낸다:

[0101] 항체("Ab") + 항원("Ag") $\rightarrow$ Ab-Ag.

[0102] 용어 " K_{off} "는 당업계에 공지되어 있는 바와 같이, 예를 들면, 항체/항원 복합체로부터 결합 단백질(예를 들면, 항체)의 해리에 대한 해리 속도 상수 또는 "해리 속도 상수"를 말한다. 또한, " K_{off} "는 본원에서 상호 교환적으로 사용되는 용어 "해리 속도 상수" 또는 " k_d "로서도 공지되어 있다.

[0103] 상기 값은 하기의 식에 나타낸 바와 같이 시간 경과에 따라 Ab-Ag 복합체가 유리된 항체 및 항원으로의 분리 또는 표적 항원으로부터의 항체의 해리를 나타낸다:

[0104] Ab + Ag $\leftarrow$ Ab-Ag.

[0105] 용어 " K_D "는 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이 "평형 해리 상수" 또는 " KD "를 나타내고, 평형상태에서의 적정 측정에서 또는 해리 속도 상수(k_{off})를 결합 속도 상수(k_{on})로 나누어 수득된 값을 말한다. 결합 속도 상수, 해리 속도 상수 및 평형 해리 속도 상수는 항원에 대한 항체의 결합 친화성을 나타내는데 사용된다. 결합 및 해리 속도 상수를 측정하기 위한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 형광-기반 기술의 사용은 평형 상태에서 생리학적 완충액 중의 샘플을 실험하기 위한 높은 민감성 및 능력을 제공한다. 다른 실험 접근법 및 장비, 예를 들면, BIAcore®(생체분자 상호작용 분석) 검정을 사용할 수 있다[예를 들면, 제조원(BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden)으로부터 구입가능한 장비]. 추가로, KinExA®(동력학 배제 검정) 검정(제조원: Sapidyn Instruments (Boise, Idaho))도 사용할 수 있다.

[0106] "표지" 및 "검출가능한 표지"는 특이적 결합 파트너, 예를 들면, 항체 또는 분석물에 부착된 잔기를 의미하고, 예를 들면, 항체 및 분석물과 같은 특이적 결합 쌍의 구성원 사이의 반응을 검출가능하게 하고, 표지된 특이적 결합 파트너, 예를 들면, 항체 또는 분석물은 "검출가능하게 표지된" 것으로서 언급된다. 따라서, 용어 "표지된 결합 단백질"은 결합 단백질의 동정을 위해 제공되는 표지가 도입된 단백질을 말한다. 한 실시형태에서, 표지는 가시적 또는 장치적 수단, 예를 들면, 방사선표지된 아미노산의 도입 및 마크된 아비딘(예를 들면, 광학적 또는 비색 측정 방법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소적 활성을 함유하는 스트렙타아비딘)에 의해 검출될 수 있는 비오틴일 모이어티의 폴리펩타이드로의 부착에 의해 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 검출가능한 마커이다. 폴리펩타이드에 대한 표지의 예로는 하기가 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다: 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종(예를 들면, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho 또는 ^{153}Sm), 크로마젠, 형광 표지(예를 들면, FITC, 로다민, 란타니드 인), 효소 표지(예, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제); 화학발광 마커; 비오틴일 그룹; 2차 리포터(예를 들면, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 및 에피토프 태그)에 의해 인식되는 소정의 폴리펩타이드 에피토프; 및 자성 체제, 예를 들면, 가돌리늄 킬레이트. 면역검정을 위해 통상적으로 사용되는 표지의 대표적 예로는 빛을 생성하는 모이어티, 예를 들면, 아크리디늄 화합물, 및 형광을 생성하는 모이어티, 예를 들면, 플루오레세인이 포함된다. 기타 표지는 본원에 기재되어 있다. 이와 관련하여, 모이어티 자체는 검출가능하게 표지될 수 없지만, 또 다른 모이어티와 반응시 검출가능하게 될 수 있다. "검출가능하게 표지된"의 사용은 후자 유형의 검출가능한 표지를 포함하는 것으로 의도된다.

[0107] 용어 "접합체"는 제2 화학 모이어티, 예를 들면, 치료제 또는 세포독성제에 화학적으로 결합된 결합 단백질(예를 들면, 항체)을 의미한다. 용어 "체제"는 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자, 또는 생물학적 물질로부터 제조된 추출물을 나타낸다. 한 실시형태에서, 치료제 또는 세포독성제로는 백일해 독소, 탁술, 사이토칼라진 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-테하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 플로마이신, 및 이들의 유사체 또는 동족체가 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 면역검정과 관련하여 사용되는 경우, 접합체 항체는 검출 항체로서 사용되는 검출가능하게 표지된 항체일 수 있다.

[0108] 용어 "결정" 또는 "결정화된"은 결정 형태로 존재하는 결합 단백질(예를 들면, 항체) 또는 이의 항원 결합부를 말한다. 결정은 물질의 고체 상태의 일 형태이고, 무정형 고체 상태 또는 액정 상태와 같은 다른 형태와 별개이다. 결정은 원자, 이온, 분자(예를 들면, 항체와 같은 단백질) 또는 분자 어셈블리(예를 들면, 항원/항체 복

합체)의 규칙적이고 반복적인 3차원 배열로 이루어진다. 이들 3차원 배열은 당업계에 널리-공지된 특이적인 수학적 관계에 따라 배열된다. 결정에서 반복되는 기본 단위 또는 빌딩 블록은 비대칭 단위라고 칭한다. 주어진 명확한 결정학적 대칭에 일치하는 배열 내의 비대칭 단위의 반복은 결정의 "유니트 셀"을 제공한다. 모든 3차원에서 규칙적 번역에 의한 유니트 셀의 반복은 결정을 제공한다. 문헌[Giege and Ducruix (1999) Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York]을 참조한다.

[0109] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 2개 이상의 뉴클레오타이드(리보뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오타이드 중 어느 하나)의 중합체 형태, 또는 뉴클레오타이드 유형 중 어느 하나의 변형된 형태를 의미한다. 이 용어에는 단일 및 이중 가닥 형태의 DNA가 포함된다.

[0110] 용어 "분리된 폴리뉴클레오타이드"는, 그 기원의 관점에 따라, "분리된 폴리뉴클레오타이드"가 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오타이드의 전부 또는 일부와 관련되어 있지 않거나; 자연에서 결합되지 않은 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 결합되거나; 또는 보다 큰 서열의 일부로서 자연에서 발생하지 않는, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 게놈, cDNA 또는 합성 기원 또는 이들의 일부 조합)를 의미할 것이다.

[0111] 용어 "벡터"는 결합된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 나타내는 것으로 의도된다. 벡터의 한 유형은 추가의 DNA 분절이 라이게이션될 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 나타내는 "플라스미드"이다. 다른 유형의 벡터는 추가의 DNA 분절이 바이러스 게놈에 라이게이션될 수 있는 바이러스 벡터이다. 소정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다(예를 들면, 세균 복제 기원을 갖는 세균 벡터 및 에피솜성 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들면, 비에피솜성 포유동물 벡터)는 숙주 세포에 도입시 숙주 세포의 게놈으로 통합될 수 있고, 이로써 숙주 게놈에 따라 복제된다. 또한, 소정 벡터는 작동적으로 결합된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")로서 나타난다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 흔히 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 형태의 벡터이기 때문에 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 등가 기능을 하는 바이러스 벡터(예를 들면, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터도 포함하는 것으로 의도된다.

[0112] 용어 "작동적으로 결합된"은 기술된 구성성분이 의도한 방식으로 기능하도록 하는 관계에 있는 병치 상태를 말한다. 암호화 서열에 "작동적으로 결합된" 제어 서열은 암호화 서열의 발현이 제어 서열에 적합한 조건 하에서 달성되는 방식으로 라이게이션된다. "작동적으로 결합된" 서열로는 목적하는 유전자에 인접한 발현 제어 서열 및 목적하는 유전자를 제어하기 위하여 트랜스로 또는 일정 거리를 두고 작용하는 발현 제어 서열이 둘 다 포함된다. 용어 "발현 제어 서열"은 이들이 라이게이션된 암호화 서열의 발현 및 프로세싱을 수행하는데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열을 말한다. 발현 제어 서열로는 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효과적인 RNA 프로세싱 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, 코작 컨센서스 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 필요한 경우 단백질 분비를 향상시키는 서열이 포함된다. 이러한 제어 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 다르며; 원핵생물에서, 이러한 제어 서열로는 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결 서열이 포함되고; 진핵생물에서, 이러한 제어 서열에는 일반적으로 프로모터 및 전사 종결 서열이 포함된다. 용어 "제어 서열"은 그 존재가 발현 및 프로세싱에 필수적인 구성성분을 포함하는 것으로 의도되고, 그 존재가 유리한 추가 성분, 예를 들면, 리더 서열 및 융합 파트너 서열도 포함할 수 있다.

[0113] "형질전환"은 외인성 DNA가 숙주 세포로 유입되는 임의의 공정을 말한다. 형질전환은 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 자연 또는 인공 조건 하에 일어날 수 있다. 형질전환은 이중 핵산 서열을 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포로 삽입하기 위한 임의의 공지된 방법에 따라 달라질 수 있다. 이러한 방법은 형질전환되는 숙주 세포에 기초하여 선택되고, 그 예로는 바이러스 감염, 전기천공, 리포펙션, 및 입자 충격이 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 이러한 "형질감염된" 세포는 삽입된 DNA가 자가 복제성 플라스미드로서 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제할 수 있는 안정적으로 형질감염된 세포를 포함한다. 또한, 이들 세포는 삽입된 DNA 또는 RNA를 한정된 시간 동안 일시적으로 발현하는 세포도 포함한다.

[0114] 용어 "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")는 외인성 DNA가 도입된 세포를 나타내는 것으로 의도된다. 한 실시형태에서, 숙주 세포는 예를 들면, 미국 특허 번호 제7,262,028호에 기재된 숙주 세포와 같이, 항체를 암호화하는 2개 이상의(예를 들면, 다중) 핵산을 포함한다. 이러한 용어는 특정 피검체 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손도 나타내는 것으로 의도된다. 후속 세대에는 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 소정 변형이

일어날 수 있기 때문에, 이러한 자손은 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 여전히 포함된다. 한 실시형태에서, 숙주 세포는 임의의 생물계로부터 선택된 원핵생물 및 진핵생물 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 진핵생물 세포로는 원생생물, 진균, 식물 및 동물 세포가 포함된다. 다른 실시형태에서, 숙주 세포로는 원핵생물 세포주 이.콜라이; 포유동물 세포주 CHO, HEK 293, COS, NSO, SP2 및 PER.C6; 곤충 세포주 Sf9; 및 진균 세포 사카로마이세스 세레비지아가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0115] 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성 및 조직 배양 및 형질전환(예를 들면, 전기천공, 리포펙션)에는 표준 기술을 사용할 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조업자의 지침에 따라 수행하거나 당업계에서 일반적으로 수행하는 바와 같이 또는 본 명세서에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다. 상기 기술 및 절차들은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 그리고 본 명세서에 걸쳐 인용되고 논의된 각종 일반 문헌 및 보다 구체적인 문헌들에 기술된 바와 같이 일반적으로 수행할 수 있다. 예를 들면, 문헌[Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)]을 참조한다.

[0116] 당업계에 공지된 바와 같은 "유전자전이 유기체"는 전이유전자를 함유하는 세포를 가진 유기체를 말하고, 여기서, 유기체(또는 이 유기체의 선조)에 도입된 전이유전자는 유기체에서 자연적으로 발현되지 않는 폴리펩타이드를 발현한다. "전이유전자"는 유전자전이 유기체가 발생하는 세포의 계통으로 안정하게 작동적으로 통합되어, 유전자전이 유기체의 하나 이상의 세포 유형 또는 조직에서 암호화된 유전자 산물의 발현을 지시하는 DNA 작제물이다.

[0117] 용어 "조절하다" 및 "조정하다"는 목적하는 분자의 활성(예를 들면, 사이토카인의 생물학적 활성)에 있어서 변화 또는 변경을 말한다. 조정은 목적하는 분자의 소정 활성 또는 기능의 정도(magnitude)에 있어서의 증가 또는 감소일 수 있다. 분자의 활성 및 기능의 예로는 결합 특징, 효소 활성, 세포 수용체 활성화, 및 신호 전달이 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0118] 마찬가지로, 용어 "조정 인자"는 목적하는 분자의 활성 또는 기능(예를 들면, 사이토카인의 생물학적 활성)을 변화 또는 변경시킬 수 있는 화합물이다. 예를 들면, 조정 인자는 이 조정 인자의 부재시 관찰되는 활성 또는 기능의 정도에 비하여 분자의 소정 활성 또는 기능의 정도에 있어서의 증가 또는 감소를 야기할 수 있다. 소정 실시형태에서, 조정 인자는 분자의 하나 이상의 활성 또는 기능의 정도를 감소시키는 억제제이다. 예시 억제제로는 단백질, 펩타이드, 항체, 펩티바디(peptibody), 탄수화물 또는 유기 소분자가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 펩티바디는 예를 들면, PCT 공개 제WO 01/83525호에 기술되어 있다.

[0119] 용어 "효능제(agonist)"는 목적하는 분자와 접촉했을 때 효능제의 부재시 관찰되는 활성 또는 기능의 정도에 비하여 당해 분자의 소정 활성 또는 기능의 정도에 있어서의 증가를 야기하는 조정 인자를 말한다. 목적하는 특정 효능제로는 항원에 결합하는 폴리펩타이드, 핵산, 탄수화물, 또는 임의의 다른 분자가 포함될 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0120] 용어 "길항제" 또는 "억제제"는 목적하는 분자와 접촉했을 때, 길항제의 부재시 관찰되는 활성 또는 기능의 정도에 비하여 당해 분자의 소정 활성 또는 기능의 정도에 있어서의 감소를 야기하는 조정 인자를 말한다. 목적하는 특정 길항제로는 항원의 생물학적 또는 면역학적 활성을 차단 또는 조정하는 것이 포함된다. 항원의 길항제 및 억제제로는 항원에 결합하는 단백질, 핵산, 탄수화물, 또는 임의의 다른 분자가 포함될 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0121] 용어 "유효량"은 장애 또는 이의 하나 이상의 증상의 중증도 및/또는 지속기간을 감소시키거나 개선시키거나, 장애의 진행을 억제하거나 예방하거나, 장애를 퇴행시키거나, 재발, 발병, 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 개시 또는 진행을 억제하거나 예방하거나, 장애를 검출하거나, 또는 다른 치료요법(예를 들면, 예방제 또는 치료제)의 예방학적 또는 치료학적 효과(들)를 증진시키거나 개선시키는데 충분한 치료요법의 양을 말한다.

[0122] 용어 "환자" 및 "피검체"는 영장류(예를 들면, 사람, 원숭이, 및 침팬치), 비-영장류(예를 들면, 소, 돼지, 낙타, 라마, 말, 염소, 토끼, 양, 햄스터, 기니아 피그, 고양이, 개, 래트, 마우스, 및 고래)를 포함하는 포유동물, 조류(예를 들면, 오리 또는 거위), 및 상어와 같은 동물을 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 바람직하게, 환자 또는 피검체는 질환, 장애 또는 병태에 대해 치료되거나 평가되는 사람, 질환, 장애 또는 병태의 위험이 있는 사람, 질환, 장애 또는 병태를 갖는 사람, 및/또는 질환, 장애 또는 병태에 대해 치료되는 사람과 같은 사람이다.

[0123] 용어 "샘플"은 가장 광범위한 의미로 사용된다. "생물학적 샘플"로는 생물체 또는 이전 생물체에서 유래하는

임의의 양의 물질이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 생물체로는 사람, 마우스, 래트, 원숭이, 개, 토끼 및 다른 동물이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 이러한 물질로는 혈액(예를 들면, 전혈), 혈장, 혈청, 뇨, 양수, 윤활액, 내피 세포, 백혈구, 단핵구, 기타 세포, 기관, 조직, 골수, 림프절 및 비장이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0124] "구성성분", "구성성분들" 및 "하나 이상의 구성성분"은 일반적으로 본원에 기재된 방법 및 당업계에 공지된 기타 방법에 따라, 시험 샘플(예를 들면, 환자 뇨, 혈청 또는 혈장 샘플)의 검정을 위한 키트에 포함될 수 있는 포획 항체, 검출 또는 접합체 항체, 대조군, 캘리브레이터, 일련의 캘리브레이터, 민감성 패널, 컨테이너, 완충액, 희석제, 염, 효소, 효소에 대한 보조 인자, 검출 시약, 전처리 시약/용액, 기질(예를 들면, 용액으로서) 및 종료 용액 등을 말한다. 따라서, 본 개시와 관련하여, "하나 이상의 구성성분", "구성성분" 및 "구성성분들"은 예를 들면, 항-분석물(예를 들면, 항-폴리펩타이드) 항체에 결합함에 의해 고정 지지체 상에 임의로 고정화된 폴리펩타이드와 같은 분석물을 포함하는 조성물과 같은 상기된 바와 같은 폴리펩타이드 또는 다른 분석물을 포함할 수 있다. 몇몇 구성성분들은 용액 중에 존재할 수 있거나 검정에 사용하기 위해 재구성용으로 동결건조될 수 있다.

[0125] "대조군"은 분석물을 함유하지 않는 것으로 공지된 조성물("음성 대조군") 또는 분석물을 함유한 것으로 공지된 조성물("양성 대조군")을 말한다. 양성 대조군은 공지된 농도의 분석물을 포함할 수 있다. "대조군", "양성 대조군" 및 "캘리브레이터"는 공지된 농도의 분석물을 포함하는 조성물을 언급하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. "양성 대조군"은 검정 수행 특징을 확립하기 위해 사용될 수 있고, 시약(예를 들면, 분석물)의 완전성(integrity)의 유용한 지표이다.

[0126] "예비결정된 컷오프" 및 "예비결정된 수준"은 일반적으로 예비결정된 컷오프/수준에 대해서 검정 결과를 비교함으로써 진단/예후/치료 효능을 평가하기 위해 사용되는 검정 컷오프 값을 말하고, 여기서, 예비결정된 컷오프/수준은 이미 다양한 임상학적 파라미터(예를 들면, 질환의 중증도, 진행성/비진행성/개선 등)와 연계되어 있거나 관련되어 있다. 본 개시는 예시적인 예비결정된 수준을 제공할 수 있지만, 컷오프 값이 면역검정(예를 들면, 사용된 항체 등)의 성질에 따라 다양할 수 있음은 널리 공지되어 있다. 추가로, 본 개시에 기초하여 다른 면역검정을 위한 면역검정-특이적 컷오프 값을 획득하기 위해, 다른 면역검정에 대해서 본원에 기재된 내용을 채택한다는 것은 당업자의 기술 범위 내이다. 예비결정된 컷오프/수준의 정확한 값은 검정 사이에 다양할 수 있는 반면, 본원에 기재된 바와 같은 상호관련성(존재하는 경우)이 일반적으로 적용가능해야만 한다.

[0127] 본원에 기재된 바와 같은 진단 검정에 사용된 바와 같은 "전처리 시약", 예를 들면, 용해, 침전 및/또는 가용화 시약은 임의의 세포를 용해시키고/시키거나 시험 샘플에 존재하는 임의의 분석물을 가용화시키는 시약이다. 전처리는 본원에서 추가로 기재한 바와 같이 모든 샘플에 대해 필수적인 것은 아니다. 다른 것들 중에서도, 분석물(예를 들면, 목적하는 폴리펩타이드)의 가용화는 샘플에 존재하는 임의의 내인성 결합 단백질로부터 분석물을 방출할 수 있을 수 있다. 전처리 시약은 동종성(분리 단계를 요구하지 않음) 또는 이종성(분리 단계를 요구함)일 수 있다. 이종성 전처리 시약을 사용하여, 다음 단계의 검정을 진행하기 전에 시험 샘플로부터 침전된 분석물 결합 단백질을 제거한다.

[0128] 본원에 기재된 면역검정 및 키트와 관련하여 "품질 대조군 시약"은 캘리브레이터, 대조군 및 민감성 패널을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다. "캘리브레이터" 또는 "표준물"은 전형적으로 항체 또는 분석물과 같은 분석물의 농도의 보간(interpolation)을 위한 캘리브레이션(표준) 곡선을 작성하기 위해 사용된다(예를 들면, 하나 이상, 예를 들면, 다수). 대안으로, 예비결정된 양성/음성 컷오프에 가까운 단일 캘리브레이터가 사용될 수 있다. 다중 캘리브레이터(즉, 하나 이상의 캘리브레이터 또는 다양한 양의 캘리브레이터(들))가 "민감성 패널"을 포함하도록 연계하여 사용될 수 있다.

[0129] "위험"은 현재 또는 향후 몇몇 시점에서 발생하는 특정 사건의 가능성 또는 가망성을 말한다. "위험도 계층화(Risk stratification)"는 담당자가 환자를 특정 질환, 장애 또는 병태의 발병의 저, 중, 고 또는 최고 위험으로 분류할 수 있게 해주는 일련의 공지된 임상적 위험 인자를 말한다.

[0130] 특이적 결합쌍(예를 들면, 항원(또는 이의 단편) 및 항체(또는 이의 항원적으로 반응성인 단편))의 구성원 사이의 상호작용과 관련하여 "특이적" 및 "특이성"은 상호작용의 선택적 반응성을 말한다. 어구 "특이적으로 결합하는" 및 이의 유사 어구는 항체(또는 이의 항원적 반응성 단편)가 분석물(또는 이의 단편)에 특이적으로 결합하지만 다른 실체에는 특이적으로 결합하지 않는 능력을 말한다.

[0131] "특이적 결합 파트너"는 특이적 결합쌍의 구성원이다. 특이적 결합쌍은 화학적 또는 물리적 수단을 통해 서로

특이적으로 결합하는 2개의 상이한 분자를 포함한다. 따라서, 통상의 면역검정의 항원 및 항체 특이적 결합 쌍에 추가로, 다른 특이적 결합 쌍은 비오틴 및 아비딘(또는 스트렙타아비딘), 탄수화물 및 렉틴, 상보적 뉴클레오타이드 서열, 이펙터 및 수용체 분자, 보조 인자 및 효소, 효소 억제제 및 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 특이적 결합 쌍은 본래의 특이적 결합 구성원의 유사체, 예를 들면, 분석물-유사체인 구성원을 포함할 수 있다. 면역반응성 특이적 결합 구성원은 분리되거나 재조합적으로 제조되는지에 관계없이 항원, 항원 단편, 및 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 포함하는 항체 및 이의 복합체, 단편, 및 변이체(변이체의 단편을 포함)를 포함한다.

[0132] "변이체"는 아미노산의 부가(예를 들면, 삽입), 결실, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열에 있어서 소정의 폴리펩타이드(예를 들면, IL-18, BNP, NGAL 또는 HIV 폴리펩타이드 또는 항-폴리펩타이드 항체)와는 상이하지만 소정의 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 보유하는(예를 들면, 변이체 IL-18은 IL-18에 결합하기 위해 항-IL-18 항체와 경쟁할 수 있다) 폴리펩타이드를 의미한다. 아미노산의 보존성 치환, 즉, 아미노산을 유사한 성질(예를 들면, 친수성 및 하전 정도 및 하전 영역의 분포)의 상이한 아미노산으로 대체하는 것은 당해 분야에서 전형적으로 최소의 변화를 포함하는 것으로서 인식된다. 이들 최소의 변화는 부분적으로 당업계(예를 들면, 문헌 [Kyte et al. (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132] 참조)에서 이해되는 바와 같이 아미노산의 하이드로패틱 지수(hydrophobic index)를 고려함으로써 동정될 수 있다. 아미노산의 하이드로패틱 지수는 소수성 및 하전의 고려를 기준으로 한다. 유사한 하이드로패틱 지수의 아미노산이 치환되어 여전히 단백질 기능을 보유할 수 있다는 것은 당업계에 공지되어 있다. 한 양상에서, ± 2 의 하이드로패틱 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 또한, 아미노산의 친수성은 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 유도하는 치환을 밝히기 위해 사용될 수 있다. 펩타이드와 관련하여 아미노산의 친수성을 고려하여 펩타이드의 최대 국소 평균 친수성을 계산할 수 있고, 이는 항원성 및 면역원성과 상호관련된 것으로 보고된 유용한 측정값이다(예를 들면, 문헌[미국 특허 제4,554,101호] 참조). 유사한 친수성값을 갖는 아미노산의 치환은 생물학적 활성, 예를 들면, 당업계에서 이해되는 바와 같은 면역원성을 보유하는 펩타이드를 유도할 수 있다. 한 양상에서, 치환은 서로 ± 2 이내의 친수성값을 갖는 아미노산으로 수행된다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값은 둘 다 아미노산의 특정 측정에 의해 영향을 받는다. 당해 관찰과 일관되게, 생물학적 기능과 양립할 수 있는 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 하전, 크기 및 다른 성질에 의해 나타나는 바와 같이, 아미노산, 및 특히 아미노산의 측정의 상대적 유사성에 의존하는 것으로 이해된다. 또한, "변이체"는 단백질 용해, 인산화, 또는 기타 번역 후 변형과 같은 차등적으로 가공되었으나 이의 생물학적 활성 또는 항원 반응성, 예를 들면, IL-18에 결합하는 능력을 보유하는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 기재하기 위해 사용될 수 있다. 용어 "변이체"는 본원에서 달리 언급되지 않는 경우 변이체의 단편을 포함한다.

[0133] I. DVD 결합 단백질의 생성

[0134] 본 발명은 하나 이상의 표적에 결합하는 이원 가변 도메인 결합 단백질 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 하나의 실시형태에서, 결합 단백질은 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 가변 도메인이고, $VD2$ 는 제2 가변 도메인이고, C 는 불변 도메인이고, $X1$ 은 아미노산 또는 폴리펩타이드이고, $X2$ 는 Fc 영역이고 n 은 0 또는 1이다]를 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함한다. 본 발명의 결합 단백질은 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 본 발명은 발현 벡터, 숙주 세포 및 결합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0135] A. 모 모노클로날 항체의 생성

[0136] DVD 결합 단백질의 가변 도메인은 목적하는 항원에 결합하는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 포함하는, 모 체로부터 수득될 수 있다. 이들 항체는 천연에 존재할 수 있거나 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0137] MAbs는 하이브리도마, 재조합 및 파지 디스플레이 기술 또는 이의 조합을 포함하는 당업계에 공지된 광범위한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, mAb는 당업계에 공지된 기술을 포함하여 예를 들면, 문헌[Harlow et al. (1998) Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.); Hammerling et al. (1981) in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, NY)]에 교시된 하이브리도마 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체에 제한되지 않는다. 용어 "모노클로날 항체"는 임의의 진핵, 원핵 또는 파지 클론을 포함하여 단일 클론으로부터 유래되지만 이를 생성시키는 방법에 의해 유래되지 않는 항체를 언급한다. 하이브리도마는 하기 실시예 1에서 논의되는 바와 같이 선별하고 클로닝하고 추가로 강한 하이브리도마 성장, 고 항체 생산 및 목적하는 항체 성질을 포함하여 목적하는 성질에 대해 스크리닝한다. 하이브리도마는 동일유전자계 동물, 면역계가 결핍된 동물, 예를 들면, 누드 마우스와 같은 생체내에서 또는 시험관내 세포 배양에서 배양하고 증식시킬 수

있다. 하이브리도마를 선별하고 클로닝하고 증식시키는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 특정 실시형태에서, 하이브리도마는 상기 논의된 바와 같이 마우스 하이브리도마이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 하이브리도마는 래트, 양, 돼지, 염소, 소 또는 말과 같은 비사람, 비마우스 종에서 제조된다. 또 다른 실시형태에서, 하이브리도마는 사람 하이브리도마이고 이때 사람 비-분비 골수종이 특이적 항원에 결합하는 항체를 발현하는 사람 세포와 융합된다.

[0138] 제조합 mAb는 문헌[미국 특허 제5,627,052호, PCT 공개 제WO 92/02551호; 및 Babcock et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848]에 기재된 바와 같이 선택된 림프구 항체 방법(SLAM)과 같이 당업계에 언급된 과정을 사용하여 단일의 분리된 림프구로부터 생성된다. 본 방법에서, 목적하는 항체를 분비하는 단일 세포, 예를 들면, 면역화된 동물로부터 유래된 림프구는 동정되고, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 cDNA를 역전사효소 PCR에 의해 세포로부터 수득하고 이어서 이들 가변 영역을 적절한 면역글로불린 불변 영역(예를 들면, 사람 불변 영역)과 관련하여 COS 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 생체내 선별된 림프구로부터 유래된 증폭된 면역글로불린 서열로 형질감염된 숙주 세포를 이어서 추가 분석하고 예를 들면, 형질감염된 세포를 선별하여 목적하는 항원에 대한 항체를 발현하는 세포를 분리함에 의해 선별할 수 있다. 증폭된 면역글로불린 서열은 추가로 예를 들면, 문헌[PCT 공개 제WO 97/29131호 및 제WO 00/56772호]에 기재된 바와 같은 시험관내 친화성 성숙화 방법에 의해 추가로 조작할 수 있다.

[0139] 모노클로날 항체는 또한 사람 면역글로불린 좌의 일부 또는 전부를 포함하는 비-사람 동물을 목적하는 항원으로 면역화시켜 제조된다. 하나의 실시형태에서, 비-사람 동물은 사람 면역글로불린 좌의 대형 단편을 포함하고 마우스 항체 생산이 결핍된 유전자 조작된 마우스 군주인 XENOMOUSE 유전자 전이 마우스이다. 문헌[Green et al. (1994) Nature Genet. 7:13-21 및 미국 특허 제5,916,771호; 제5,939,598호; 제5,985,615호; 제5,998,209호; 제6,075,181호; 제6,091,001호; 제6,114,598호 및 제6,130,364호]을 참조한다. 또한, PCT 공개 제WO 91/10741호; 제WO 94/02602호; 제WO 96/34096호; 제WO 96/33735호; 제WO 98/16654호; 제WO 98/24893호; 제WO 98/50433호; 제WO 99/45031호; 제WO 99/53049호; 제WO 00 09560호; 및 제WO 00/037504호도 참조한다. XENOMOUSE 유전자 전이 마우스는 완전하게 사람 항체의 성인계 사람 목록을 생산하고, 항원 특이적인 사람 Mab를 생성한다. XENOMOUSE 유전자 전이 마우스는 사람 중쇄 유전자좌 및 κ (카파) 경쇄 유전자좌의 메가염기 크기의 배선 형태 YAC 단편의 도입을 통해 사람 항체 목록의 약 80%를 포함한다[본원에 참고인용된 Mendez et al. (1997) Nature Genet. 15:146-156; Green and Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188: 483-495 참조].

[0140] 또한, 본 발명의 항체 제조에는 시험관내 방법도 사용할 수 있는데, 여기서, 항체 라이브러리를 스크리닝하여 목적하는 결합 특이성을 갖는 항체를 동정한다. 제조합 항체 라이브러리를 선별하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[미국 특허 제5,223,409호; PCT 공개 제WO 92/18619호; 제WO 91/17271호; 제WO 92/20791호; 제WO 92/15679호; 제WO 93/01288호; 제WO 92/01047호; 제WO 92/09690호; 및 제WO 97/29131호; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nucl. Acid Res. 19:4133-4137; 및 Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982; 및 미국 특허 공개 제20030186374호] 등에 설명된 방법을 포함한다.

[0141] 본 발명의 모 항체는 또한 당업계에 공지된 다양한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인은 파지 입자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 파지 입자 표면에 나타난다. 특히, 당해 파지는 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들면, 사람 또는 뮤린)로부터 발현된 항원-결합 도메인을 나타내는데 사용될 수 있다. 목적하는 항원과 결합하는 항원 결합 도메인 발현 파지는 예를 들면, 표지된 항원 또는 고정 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 사용하여 선별되거나 동정될 수 있다. 이들 방법에 사용되는 파지는 전형적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 제조합적으로 융합된 Fab, Fv 또는 디설파이드 안정화된 Fv 항체 도메인을 갖는 파지로부터 발현된 fd 및 M13 결합 도메인을 포함하는 필라멘트형 파지이다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예는 문헌[Brinkman et al. (1995) J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al. (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al. (1997) Gene 187 9-18; Burton et al. (1994) Advances Immunol. 57:191-280; PCT 공보 제WO 90/02809호; 제WO 91/10737호; 제WO 92/01047호; 제WO 92/18619호; 제WO 93/11236호; 제WO 95/15982호; 및 제WO 95/20401호; 및 미국 특허 제

5,698,426호; 제5,223,409호; 제5,403,484호; 제5,580,717호; 제5,427,908호; 제5,750,753호; 제5,821,047호; 제5,571,698호; 제5,427,908호; 제5,516,637호; 제5,780,225호; 제5,658,727호; 제5,733,743호; 및 제5,969,108호]에 기재된 것들을 포함한다.

[0142] 파지 선별 후, 파지로부터 항체 암호화 영역을, 하기에 상세히 기재되는 바와 같이 분리할 수 있고 이를 사용하여 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균을 포함하는 임의의 목적하는 숙주에서 발현되는 사람 항체 또는 임의의 다른 목적하는 항원 결합 단편을 포함하는 전체 항체를 생산할 수 있다. 예를 들면, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합으로 생산하기 위한 기술은 또한 문헌[PCT 공개 제WO 92/22324호; Mullinax et al. (1992) BioTechniques 12(6):864-869; 및 Sawai et al. (1995) AJRI 34:26-34; 및 Better et al. (1998) Science 240:1041-1043]에 기재된 것들과 같은 방법을 당업계에 공지된 방법을 사용하여 사용될 수 있다. 단일쇄 Fv 및 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있는 기술의 예는 문헌[미국 특허 제4,946,778호 및 제5,258,498호; Huston et al. (1991) Methods Enzymol. 203:46-88; Shu et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995-7999; 및 Skerra et al. (1988) Science 240:1038-1040]에 기재된 것들을 포함한다.

[0143] 파지 디스플레이에 의한 재조합 항체 라이브러리의 스크리닝에 대한 대안으로, 대형 조합 라이브러리에 대해 당업계에 공지된 기타 방법을 적용하여 본 발명의 이원 특이성 항체를 동정할 수 있다. 한가지 유형의 또 다른 발현 시스템은 문헌[PCT 공개 제WO 98/31700, Szostak and Roberts에 의함, Roberts and Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302]에 기재된 바와 같이 재조합 항체 라이브러리가 RNA 단백질 융합으로서 발현되는 것이다. 당해 시스템에서, 공유 융합은 mRNA 및 3' 말단에 푸로마이신, 펩티딜 수용체 항생제를 함유하는 합성 mRNA의 시험관내 해독에 의해, 암호화된 펩타이드 또는 단백질 사이에서 형성된다. 따라서, 특이적 mRNA는 암호화된 펩타이드 또는 단백질, 예를 들면, 항체 또는 이의 일부(예를 들면, 항체 결합부 또는 이의 일부)의 이원 특이성 항원에 대한 성질을 기준으로 mRNA의 배합 혼합물(예를 들면, 조합 라이브러리)로부터 집적될 수 있다. 당해 라이브러리의 스크리닝으로부터 회수된 항체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열은 상기된 바와 같이(예를 들면, 포유동물 숙주 세포에서) 재조합 수단에 의해 발현될 수 있고 특히, 본래에 선별된 서열에 돌연변이가 도입된 mRNA-펩타이드 융합을 추가로 스크리닝함에 의해 또는 상기된 바와 같은 재조합 항체의 친화성 성숙화를 위한 기타 방법에 의해 친화성이 추가로 성숙화될 수 있다.

[0144] 또 다른 방법에서, 본 발명의 항체는 또한 당업계에 공지된 효모 디스플레이 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 효모 디스플레이 방법에서, 유전학적 방법을 사용하여 항체 도메인을 효모 세포벽에 부착시키고 이들을 효모의 표면에 나타나게 할 수 있다. 특히, 당해 효모를 사용하여 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들면, 사람 또는 무린)로부터 발현되는 항원 결합 도메인이 나타나게 할 수 있다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 효모 디스플레이 방법의 예는 문헌[미국 특허 제6,699,658호]에 기재된 것들을 포함한다.

[0145] 상기된 항체는 추가로 변형시켜 CDR 이식된 및 사람화된 모 항체를 생성시킬 수 있다. CDR-이식된 모 항체는 사람 항체 기원의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하고 이때, V_H 및/또는 V_L의 하나 이상의 CDR 영역은 목적하는 항원에 결합하는 무린 항체의 CDR 서열로 대체된다. 임의의 사람 항체 기원의 골격 서열은 CDR 이식을 위한 주형으로서 작용할 수 있다. 그러나, 당해 골격상로의 직쇄 대체는 흔히 항원에 대한 결합 친화성을 약간 손상시킨다. 사람 항체가 본래의 무린 항체와 보다 동일할수록 무린 CDR과 사람 골격의 조합이 CDR내에서 뒤틀림을 유발하여 친화성을 감소시킬 가능성이 보다 적어진다. 따라서, CDR을 제외한 무린 가변 골격을 대체하도록 선택된 사람 가변 골격은 무린 항체 가변 영역 골격과 65% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이 바람직할 수 있다. CDR을 제외한 사람 및 무린 가변 영역은 70% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이 보다 바람직할 수 있다. 하나의 실시형태에서, CDR을 제외한 사람 및 무린 가변 영역은 무린 항체 가변 영역 골격과 75% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이 보다 더 바람직할 수 있다. 특정 실시형태에서, CDR을 제외한 사람 및 무린 가변 영역은 무린 항체 가변 영역 골격과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이 가장 바람직할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 당해 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있고(문헌참조: EP 특허 제239,400호; PCT 공보 제WO 91/09967호; 미국 특허 제5,225,539호; 제5,530,101호; 및 제5,585,089호), 베니어링 또는 재표면화(문헌참조: EP 특허 제592,106호 및 제EP 519,596호; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Protein Engin. 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973), 및쇄 서플링(미국 특허 제5,565,352호) 및 항-이디오타입 항체가 있다.

[0146] 사람화된 항체는 비-사람 종 기원의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 사람 면역글로불린 분자 기원의 골격 영역을 갖는, 목적하는 항원에 결합하는 비-사람 종 항체 기원의 항체 분자이다. 공지된 사람 Ig 서열은 예를 들면, 본원에 전반적인 내용이 참조로서 인용되는 하기 인터넷 주소 및 문헌에 기재되어 있다:

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/;
 www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
 www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;
 www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
 www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html;
 www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/;
 pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/;
 www.pebio.com/pa/340913/340913.html-; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-
 u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-
 ks.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html;
 aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html;
 www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu-blic/INTRO.html;
 www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/;
 www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
 abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html;
 www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caaewg/caaewg.htm;
 www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
 www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.abo-ut.fmolina/Web-
 pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr-oducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al.,
 Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). 당해 입수된 서열을 사용하
 여 당업계에 공지된 바와 같이 면역원성을 감소시키거나 결합, 친화성, 결합율, 해리율, 결합도(avidity), 특이
 성, 반감기 또는 임의의 기타 적합한 특징을 감소시키거나 증진시키거나 변형시킬 수 있다.

[0147]

사람 골격 영역내 골격 잔기는 상응하는 CDR 공여자 항체로 대체하여 항원 결합을 변화, 바람직하게는 개선시킬 수 있다. 이들 골격 대체는 예를 들면, CDR 및 골격 잔기의 상호작용에 대해 모델링하여 항원 결합과 서열 비교에 중요한 골격 잔기를 동정하여 특정 위치에서의 특정 골격 잔기를 동정함에 의해 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 동정된다(미국 특허 제5,585,089호; Riechmann et al. (1998) Nature 332:323). 입체 면역글로불린 모델은 통상적으로 유용하고 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 설명하고 나타내는 컴퓨터 프로그램은 유용하다. 이들 디스플레이의 조사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서 가능한 잔기의 역할에 대한 분석, 즉, 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기가 선별될 수 있고 컨센서스 및 입수 서열로부터 조합될 수 있어 표적 항원에 대한 증가된 친화성과 같은 목적하는 항체 성질이 달성된다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적으로 및 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 주는데 관여한다. 항체는 문헌[Jones et al. (1986) Nature 321:522; Verhoeyen et al. (1998) Science 239:1534; Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901; Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol. 151:2623; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Prot. Engin. 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973; PCT 공개 제WO 91/09967호, 국제 특허 출원 번호 제PCT/US98/16280호; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; PCT 공보 제WO90/14443호, WO90/14424, WO90/14430, EU 특허 제EP229,246호, 제EP 592,106호; 제EP 519,596호; 제EP 239,400호, 미국 특허 제5,565,332호; 제5,723,323호; 제5,976,862호; 제5,824,514호; 제5,817,483호; 제5,814,476호; 제5,763,192호; 제5,723,323호; 제5,766,886호; 제5,714,352호; 제6,204,023호; 제6,180,370호; 제5,693,762호; 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,225,539호; 및 제4,816,567호]에 기재된 것들을 제한 없이 포함하는 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 사람화될 수 있다.

[0148]

B. 모 모노클로날 항체를 선별하기 위한 기준

[0149]

본 발명의 한 실시형태는 DVD-Ig 분자내 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는 모 항체를 선별하는 것이다. 하나의 실시형태에서, 목적하는 성질은 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 항체 파라미터는 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약동력학, 생체이용률, 조직 교차 반응성, 및 이종상동성 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0150] **B1. 항원에 대한 친화성**

[0151] 치료학적 mAb의 목적하는 친화성은 항원의 성질 및 목적하는 치료학적 엔드포인트에 따라 다양할 수 있다. 한 실시형태에서, 모노클로날 항체는 당해 상호작용이 통상적으로 고친화성 상호작용 (예를 들면, $< \text{pM} - < \text{nM}$ 범위)임으로 사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용을 차단하는 경우 보다 높은 친화성($K_d = 0.01 - 0.50 \text{ pM}$)을 갖는다. 이 경우에, 이의 표적에 대한 mAb 친화성은 이의 수용체에 대한 사이토카인(리간드)의 친화성 이상이어야만 한다. 한편, 보다 적은 친화성을 갖는 mAb ($> \text{nM}$ 범위)는 예를 들면, 시퀀스터(sequester) 및 A- β 아밀로이드의 명백한 순환 종과 결합하는, 잠재적으로 순환하는 병원성 단백질, 예를 들면, 모노클로날 항체를 제거하는데 치료학적으로 효과적일 수 있다. 다른 경우에, 부위 지시된 돌연변이 유발에 의해 기존의 고친화성 mAb의 친화성을 감소시키거나 표적에 대해 낮은 친화성을 갖는 mAb를 사용하여 잠재적인 부작용을 피할 수 있는데, 예를 들면, 고친화성 mAb는 이의 의도된 표적 모두를 격리/중화시켜 표적화된 단백질의 기능을 완전히 고갈/제거할 수 있다. 이러한 시나리오에서, 저친화성 mAb는 질환 증상(병리학적 또는 과생성 수준)에 관여할 수 있는 표적의 일부를 격리/중화시켜 표적의 일부가 계속해서 이의 정상적인 생리학적 기능을 수행할 수 있게 한다. 따라서, 용량을 조정하고/하거나 부작용을 감소시키기 위해 K_d 를 감소시킬 수 있다. 모 mAb의 친화성은 목적하는 치료학적 결과를 달성하기 위해 세포 표면 분자를 적당히 표적화하는데 역할을 수행할 수도 있다. 예를 들면, 표적이 고밀도로 암 세포상에 및 저 밀도로 정상 세포상에 발현되는 경우, 저친화성 mAb는 정상 세포 보다는 종양 세포상의 다수의 표적물에 결합하여 ADCC 또는 CDC를 통해 종양 세포를 제거할 수 있고 따라서 치료학적으로 바람직할 수 있는 효과를 가질 수 있다. 따라서, 목적하는 친화성을 갖는 mAb의 선별은 가용성 및 표면 표적 둘다를 위해 적절할 수 있다.

[0152] 리간드와의 상호작용시 수용체를 통한 신호 전달은 수용체 리간드 상호작용의 친화성에 의존할 수 있다. 유사하게, 표면 수용체에 대한 mAb의 친화성은 세포내 신호 전달의 성질을 결정할 수 있고 mAb는 효능제 또는 길항제 신호를 전달할 수 있는 것으로 생각할 수 있다. mAb 매개 신호 전달의 친화성 기반 성질은 이의 부작용 프로파일 에 영향을 줄 수 있다. 따라서, 치료학적 모노클로날 항체의 목적하는 친화성 및 목적하는 기능은 시험관내 및 생체내 실험에 의해 결정될 필요가 있다.

[0153] 결합 단백질(예를 들면, 항체)의 목적하는 K_d 는 목적하는 치료학적 결과에 따라 실험적으로 결정될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 동일한 항원에 대한 DVD-Ig의 목적하는 친화성 이상의 특정 항원에 대한 친화성(K_d)을 갖는 모 항체가 선택된다. 주어진 DVD-Ig 분자에 대한 모 항체는 동일한 항체이거나 상이한 항체일 수 있다. 항원 결합 친화성 및 동력학은 바이아코어(Biacore) 또는 또 다른 유사 기술에 의해 평가된다. 한 실시형태에서, 각각의 모 항체는 최대 약 10^{-7} M ; 최대 약 10^{-8} M ; 최대 약 10^{-9} M ; 최대 약 10^{-10} M ; 최대 약 10^{-11} M ; 최대 약 10^{-12} M ; 및 최대 약 10^{-13} M 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원에 대한 해리 상수(K_d)를 갖는다. VD1이 수득된 제1 모 항체 및 VD2가 수득된 제2 모 항체는 각각의 항원에 대해 유사하거나 상이한 친화성(K_D)을 가질 수 있다. 각각의 모 항체는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 적어도 약 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 및 적어도 약 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원에 대한 결합 속도 상수(K_{on})를 갖는다. VD1이 수득된 제1 모 항체 및 VD2가 수득된 제2 모 항체는 각각의 항원에 대해 유사하거나 상이한 결합율 상수(K_{on})를 가질 수 있다. 하나의 실시형태에서, 각각의 모 항체는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 최대 약 10^{-3} s^{-1} ; 최대 약 10^{-4} s^{-1} ; 최대 약 10^{-5} s^{-1} ; 및 최대 약 10^{-6} s^{-1} 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원에 대한 해리율 상수(K_{off})를 갖는다. VD1이 수득된 제1 모 항체 및 VD2가 수득된 제2 모 항체는 각각의 항원에 대해 유사하거나 상이한 해리율 상수(K_{off})를 가질 수 있다.

[0154] **B2. 효능**

[0155] 모 모노클로날 항체의 목적하는 친화성/효능은 목적하는 치료학적 결과에 의존할 것이다. 예를 들면, 수용체-리간드(R-L) 상호작용에 대해 친화성(k_d)은 R-L k_d (pM 범위) 이상이다. 예를 들면, 병리학적 순환 단백질의 단순한 제거를 위해, k_d 는 예를 들면, 다양한 종의 순환 A- β 펩타이드의 제거를 위해 낮은 nM 범위일 수 있다. 추가로, k_d 는 또한 표적이 예를 들면, A β 올리고머에서 mAb 표적화 특정 형태의 에피토프인 다중 카피의 동일한 에피토프를 발현하는지에 따라 다양할 것이다.

[0156] VD1 및 VD2가 동일한 항원에 결합하지만 구분되는 에피토프를 갖는 경우, DVD-Ig는 동일한 항원에 대해 4개의 결합 부위를 함유함에 따라서 결합가(avidity) 및 DVD-Ig의 겉보기 K_d 를 증가시킨다. 하나의 실시형태에서, DVD-Ig에서 목적하는 것 이하의 K_d 를 갖는 모 항체가 선택된다. 모 mAb의 친화성 고려는 또한 DVD-Ig가 4개 이

상의 동일한 항원 결합 부위(즉, 단일 mAb로부터 DVD-Ig)를 함유하는지에 의존할 수 있다. 이 경우에, 겔보기 Kd는 결합가로 인해 mAb 보다 클 것이다. 이러한 DVD-Ig는 표면 수용체를 가교결합시키거나, 중화 효능을 증가 시키거나 병리학적 단백질의 제거를 증진시키는 것 등을 위해 사용될 수 있다.

[0157] 하나의 실시형태에서 동일한 항원에 대해 DVD-Ig의 목적하는 중화 효능 이상의 특이적 항원에 대한 중화 효능을 갖는 모 항체가 선택된다. 중화 효능은 표적 의존적 생분석에 의해 측정될 수 있고, 이때 적당한 유형의 세포는 측정가능한 신호(즉, 증식 또는 사이토카인 생산)를 표적 자극에 응답하여 생성하고 mAb에 의한 표적 중화는 용량-의존적 방식으로 신호를 감소시킬 수 있다.

[0158] B3. 생물학적 기능

[0159] 모노클로날 항체는 잠재적으로 여러 기능을 수행할 수 있다. 이들 기능중 몇몇은 표 1에 기재한다. 이들 기능은 시험관내 분석(예를 들면, 세포 기반 및 생화학적 분석) 및 생체내 동물 모델 둘다에 의해 평가될 수 있다.

표 1

치료 항체에 대한 몇몇의 잠재적 적용

표적 (클래스)	작용 기전 (표적)
가용성 (사이토카인, 기타)	활성의 중화 (예를 들면, 사이토카인) 제거율 향상 (예를 들면, Aβ 올리고머) 반감기 증가 (예를 들면, GLP 1)
세포 표면 (수용체, 기타)	효능제 (예를 들면, GLP1 R; EPO R 등) 길항제 (예를 들면, 인테그린 등) 세포독성 (CD 20 등)
단백질 침전물	제거 / 분해 향상 (예를 들면, Aβ 플라크, 아밀로이드 침전물)

[0160]

[0161] 본원의 실시예에 기재된 구분되는 기능을 갖는 mAb(표 1)는 목적하는 치료학적 결과를 달성하기 위해 선택될 수 있다. 2개 이상의 선택된 모노클로날 항체를 이어서 DVD-Ig 포맷에 사용하여 단일 DVD-Ig 분자에 2개의 구분된 기능을 달성할 수 있다. 예를 들면, DVD-Ig는 특이적 사이토카인의 기능을 중화시키는 모 mAb를 선별하고, 병리학적 단백질의 제거를 증진시키는 모 mAb를 선별함에 의해 제조될 수 있다. 유사하게, 하나의 수용체에 대해 효능제 기능을 갖는 하나의 mAb 및 다른 수용체에 대해 길항제 효능을 갖는 다른 mAb와 같은, 2개의 상이한 세포 표면 수용체를 인지하는 2개의 모 모노클로날 항체를 선별할 수 있다. 각각 구분된 기능을 갖는 이들 2개의 선택된 모노클로날 항체를 사용하여 단일 분자에서 선택된 모노클로날 항체의 2개의 구분된 기능(효능제 및 길항제)을 갖는 단일 DVD-Ig 분자를 작제할 수 있다. 유사하게, 각각의 수용체 리간드(예를 들면, EGF 및 IGF)의 결합을 각각 차단하는 세포 표면 수용체에 대한 2개의 길항작용 모노클로날 항체는 DVD-Ig 포맷에 사용될 수 있다. 역으로, 길항작용 항-수용체 mAb(예를 들면, 항-EGFR) 및 중화성 항-가용성 매개체(예를 들면, 항-IGF1/2) mAb는 DVD-Ig를 제조하기 위해 선별될 수 있다.

[0162] B4. 에피토프 인식

[0163] 상이한 영역의 단백질은 상이한 기능을 수행할 수 있다. 예를 들면, 사이토카인의 특정 영역이 사이토카인 수용체와 상호작용하여 수용체 활성화를 유도할 수 있는 반면에 당해 단백질의 다른 영역은 사이토카인을 안정화시키기 위해 요구될 수 있다. 이 경우에 사이토카인 상에 수용체 상호작용 영역에 특이적으로 결합하여 사이토카인-수용체 상호작용을 차단하는 mAb를 선별할 수 있다. 몇몇 경우에, 예를 들면 다중 리간드에 결합하는 특정 케모카인 수용체, 단지 하나의 리간드와 상호작용하는 에피토프(케모카인 수용체 상의 영역)에 결합하는 mAb를 선별할 수 있다. 다른 경우에, 모노클로날 항체는 직접적으로 생리학적 기능의 단백질에 대해 관여하지 않는 표적상의 에피토프에 결합할 수 있지만 이들 영역으로의 mAb의 결합은 생리학적 기능을 방해하거나(입체 장애) 단백질이 기능하지 않도록(어느 리간드도 결합할 수 없도록 수용체 형태를 변화시킨 다중 리간드를 갖는 수용체에 대한 mAb) 단백질의 형태를 변화시킬 수 있다. 사이토카인의 이의 수용체로의 결합을 차단하지 않지만 신호 전달을 차단하는 항-사이토카인 모노클로날 항체가 또한 동정되었다(예를 들면, 125-2H, 항-IL-18 mAb).

[0164] 에피토프 및 mAb 기능의 예는 수용체-리간드(R-L) 상호작용의 차단(R-상호작용 부위에 결합하는 중화성 mAb); 감소된 R-결합 또는 R-결합 부재를 유발하는 입체 장애를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. Ab는 수용체 결합 부위와는 다른 부위에서 표적에 결합할 수 있지만, 형태적 변화를 유도함에 의해 수용체 결합 및 표적의 기능을

방해하고 R에 결합하는 기능(예를 들면, Xolair)을 제거하여 신호 전달을 차단한다(125-2H).

[0165] 한 실시형태에서, 모 Ab는 최대 효능을 위해 적당한 에피토프를 표적화할 필요가 있다. 당해 에피토프는 DVD-Ig에서 보존되어야만 한다. mAb의 결합 에피토프는 공동-결정분석, mAb 항원 복합체의 제한된 단백질용해 + 질량 분광측정 펩타이드 맵핑(Legros et al. (2000) Protein Sci. 9:1002-10), 파지 디스플레이된 펩타이드 라이브러리(O'Connor et al. (2005) J. Immunol. Methods 299:21-35), 및 돌연변이 유발(Wu et al. (2003) J. Immunol. 170:5571-7)을 포함하는, 여러 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0166] **B5. 생리화학적 및 약제학적 성질:**

[0167] 항체를 사용한 치료학적 치료는 흔히 수 mg/kg의 고용량의 투여를 필요로한다(전형적으로 분자량이 높은 결과로서 질량을 기초로 낮은 효능 때문에). 환자 순응을 수용하고 만성 질환 치료법 및 외래환자 치료를 적당히 해결하기 위해, 치료학적 mAb를 피하(s.c.) 또는 근육내(i.m.) 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 피하 투여를 위한 최대 바람직한 용량은 약 1.0 mL이고 따라서 용량당 주사 횟수를 제한하기 위해 >100 mg/mL의 농도가 바람직할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 치료학적 항체는 1회 용량으로 투여된다. 그러나 당해 제형의 개발은 단백질-단백질 상호작용(예를 들면, 면역원성 위험을 잠재적으로 증가시키는 응집) 및 프로세스 및 전달동안에 한계(예를 들면, 점도)에 의해 제한된다. 결과적으로, 임상적 효능을 위해 요구되는 대용량 및 관련된 개발 한계점이 항체 제형의 잠재력 및 고용량 치료계획에서의 피하 투여를 완전하게 사용하는 것을 제한한다. 단백질 분자 및 단백질 용액의 생리화학적 및 약제학적 성질, 예를 들면, 안정성, 용해도 및 점도 특징이 가장 중요하다는 것은 명백하다.

[0168] **B5.1. 안정성:**

[0169] "안정한" 항체 제형은 본원의 항체가 필수적으로 이의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 저장시 생물학적 활성을 보유하는 제형이다. 안정성은 선택된 시간동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 제형중의 항체는 실온(약 30℃) 또는 40℃에서 1개월 이상동안 안정하고/하거나 약 2 내지 8℃에서 1년 이상 또는 2년 이상동안 안정하다. 추가로 하나의 실시형태에서, 당해 제형은 이후 "동결/해동 사이클"로서 언급되는 제형의 동결(예를 들면 -70℃까지) 및 해동 후 안정하다. 또 다른 예에서, "안정한" 제형은 약 10% 미만 및 약 5% 미만의 단백질이 제형내에 응집체로서 존재하는 제형일 수 있다.

[0170] 연장된 시간동안 다양한 온도에서 시험관내 안정한 DVD-Ig는 바람직할 수 있다. 이것은 승온, 예를 들면, 40℃에서 2 내지 4주동안 시험관내 안정한 모 mAb의 신속한 스크리닝에 의해 달성될 수 있고 이어서 안정성을 평가할 수 있다. 2 내지 8℃에서 저장동안에, 당해 단백질은 12개월 이상동안, 예를 들면 24개월 이상동안 안정함을 나타낸다. 안정성(단량체성 온전한 분자의 %)은 양이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, SDS-PAGE, 및 생활성 시험과 같은 다양한 기술을 사용하여 평가될 수 있다. 공유 및 형태적 변형을 분석하기 위해 사용될 수 있는 분석 기술의 보다 이해할 수 있는 목록은 문헌[참조: Jones (1993) Analytical methods for the assessment of protein formulations and delivery systems. In: Cleland, J. L.; Langer, R., editors. Formulation and delivery of peptides and proteins, 1st edition, Washington, ACS, pg. 22-45; 및 Pearlman and Nguyen (1990) Analysis of protein drugs. In: Lee, V. H., editor. Peptide and protein drug delivery, 1st edition, New York, Marcel Dekker, Inc., pg. 247-301]을 참조한다.

[0171] 이중성 및 응집체 형성: 항체의 안정성은 제형이 약 10% 미만, 및 하나의 실시형태에서 약 5% 미만, 또 다른 실시형태에서 약 2% 미만 또는 하나의 실시형태에서 응집체로서 존재하는 GMP 항체 물질중 0.5% 내지 1.5% 미만의 범위내일 수 있도록 한다. 크기 배제 크로마토그래피는 단백질 응집체의 검출에서 민감성이고 재생가능하고 매우 강력한 방법이다.

[0172] 낮은 응집체 수준뿐만 아니라, 항체는 하나의 실시형태에서 화학적으로 안정해야만 한다. 화학적 안정성은 이온 교환 크로마토그래피(예를 들면, 양이온 또는 음이온 교환 크로마토그래피), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 또는 등전점 포커싱 또는 모세관 전기영동과 같은 다른 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들면, 항체의 화학적 안정성은 2 내지 8℃에서 12개월 이상동안 저장 후 양이온 교환 크로마토그래피에서 비변형된 항체를 나타내는 피크를 저장 시험 전의 항체와 비교하여 20% 이하, 하나의 실시형태에서 10% 이하 또는 또 다른 실시형태에서, 5% 이하로 증가시킬 수 있다.

[0173] 하나의 실시형태에서, 모 항체는 구조적 위상을 나타낸다; 올바른 디설파이드 결합 형성 및 올바른 폴딩: 항체의 2차 또는 3차 구조에서의 변화로 인한 화학적 불안정성은 항체 활성에 영향을 줄 수 있다. 예를 들면, 항체의 활성에 의해 저적된 바와 같은 안정성은 2 내지 8℃에서 12개월 이상의 저장 후 항체의 활성을 저장 시험 전

의 항체 용액과 비교하여 50% 이하, 하나의 실시형태에서 30% 이하 또는 10% 이하 또는 하나의 실시형태에서 5% 또는 1% 이하로 감소시킬 수 있다. 적합한 항원 결합 분석을 사용하여 항체 활성을 측정할 수 있다.

[0174] **B5.2. 용해도**

[0175] mAb의 "용해도"는 올바르게 폴딩된 단량체성 IgG의 생성과 관련이 있다. IgG의 용해도는 따라서 HPLC에 의해 평가될 수 있다. 예를 들면, 가용성 (단량체성) IgG는 HPLC 크로마토그램에 단일 피크를 생성시키는 반면 불용성 (예를 들면, 다량체 및 응집된)은 다수의 피크를 생성시킨다. 당업자는 따라서 통상적인 HPLC 기술을 사용하여 IgG의 용해도를 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 용해도를 분석하기 위해 사용될 수 있는 분석 기술의 보다 이해될 수 있는 목록을 위해 문헌(참조: Jones (1993) *Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London, London, UK*. Editor(s): Shamlou, P. Ayazi. *Process. Solid-Liq. Suspensions*, 93-117. Publisher: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK and Pearlman and Nguyen (1990) *Advances Parenteral Sci.* 4:247-301)을 참조한다. 치료학적 mAb의 용해도는 흔히 적당한 용량을 위해 요구되는 고농도로 제형화시키는데 있어서 중요하다. 본원에 명시된 바와 같이, > 100 mg/mL의 용해도가 효율적인 항체 용량을 수용하기 위해 요구될 수 있다. 예를 들면, 항체 용해도는 초기 연구 단계에서 약 5mg/ml 이상일 수 있고 하나의 실시형태에서, 진보 과정 과학 단계에서 약 25 mg/mL 이상 또는 하나의 실시형태에서 약 100 mg/mL 이상, 또는 하나의 실시형태에서 약 150mg/ml일 수 있다. 단백질 분자의 고유 성질, 예를 들면, 단백질 용액의 물리-화학적 성질, 예를 들면, 안정성, 용해도, 점도가 중요함은 당업자에게 자명하다. 그러나 당업자는 광범위한 부형제가 최종 단백질 제형의 성질에 이롭게 영향을 주는 첨가제로서 사용될 수 있음을 인지할 것이다. 이들 부형제는 다음을 포함할 수 있다: (i) 액체 용매, 공용매(예를 들면, 알콜, 예를 들면, 에탄올); (ii) 완충제(예를 들면, 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 아미노산 완충제); (iii) 당 또는 당 알콜 (예를 들면, 슈크로스, 트레할로스, 프럭토스, 라피노스, 만니톨, 소르비톨, 텍스트란); (iv) 계면활성제(예를 들면, 폴리소르베이트 20, 40, 60, 80, 폴록사머); (v) 등장성 개질제 (예를 들면, 염, 예를 들면, NaCl, 당, 당 알콜); 및 (vi) 기타 (예를 들면, 방부제, 킬레이팅제, 항산화제, 킬레이팅 물질(예를 들면, EDTA), 생분해성 중합체, 담체 분자(예를 들면, HSA, PEG)).

[0176] 점도는 항체 제조 및 항체 프로세싱(예를 들면, 정용여과/한외여과), 충전-마무리 공정(펌핑 양상, 여과 양상) 및 전달 양상(주사능, 정교한 장치 전달)과 관련하여 매우 중요한 파라미터이다. 낮은 점도는 항체 용액이 보다 높은 농도가 되도록 할 수 있다. 이것은 동일 용량이 보다 적은 용적으로 투여될 수 있게 해준다. 적은 주사 용액은 주사시 통증을 보다 낮게 한다는 이점을 갖게 하고 당해 용액은 환자내 주사시 통증을 감소시키기 위해 등장성일 필요는 없다. 항체 용액의 점도는 100(1/s)의 전단 비율에서 항체 용액 점도는 200mPa s미만이거나 하나의 실시형태에서 125mPa s미만이거나 또 다른 실시형태에서 70mPa s미만이거나 또 다른 실시형태에서 25mPa s미만이거나 심지어 10mPa s미만일 수 있다.

[0177] **B 5.3. 생성 효율**

[0178] 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포에서 효율적으로 발현되는 DVD-Ig의 생성은 하나의 실시형태에서, 이들 자체가 포유동물 세포에서 효율적으로 발현되는 2개의 모 모노클로날 항체를 요구한다. 안정한 세포주(즉, CHO)로부터 생성 효율은 약 0.5g/L 이상, 하나의 실시형태에서 약 1 g/L 이상, 및 또 다른 실시형태에서 약 2 내지 약 5 g/L 이상이어야만 한다(Kipriyanov and Little (1999) *Mol. Biotechnol.* 12:173-201; Carroll and Al-Rubeai (2004) *Expert Opin. Biol Ther.* 4:1821-9).

[0179] 포유동물 세포에서 항체 및 Ig 융합 단백질의 제조는 여러 인자에 의해 영향받는다. 강한 프로모터, 인핸서 및 선별 마커의 혼입을 통한 발현 벡터는 통합된 벡터 카피로부터 목적하는 유전자의 전사를 최대화시킬 수 있다. 고수준의 유전자 전사를 허용하는 벡터 통합 부위의 동정은 벡터 기원의 단백질 발현을 증강시킬 수 있다(Wurm et al. (2004) *Nature Biotech.* 22(11):1393-1398). 추가로, 생성 수준은 항체 중쇄 및 경쇄의 비율 및 단백질 어셈블리 및 분비 공정에서 다양한 단계에 의해 영향받는다(Jiang et al. (2006) *Biotechnol. Progr.* 22(1):313-8).

[0180] **B 6. 면역원성**

[0181] 치료학적 mAb의 투여는 특정 빈도의 면역 반응(즉, 치료학적 mAb에 대한 내인성 항체의 형성)을 유도할 수 있다. 면역원성을 유도할 수 있는 잠재적인 요소는 모 모노클로날 항체의 분비동안에 분석되어야만 하고 당해 위험을 감소시키는 단계는 DVD-Ig 작제 전에 모 모노클로날 항체를 최대화하기 위해 수행될 수 있다. 마우스 유래된 항체는 환자에서 고도로 면역원성인 것으로 밝혀졌다. 마우스 가변 및 사람 불변 영역으로 이루어진 키메라 항체의 생성은 치료학적 항체의 면역원성을 감소시키기 위한 필연적인 다음 단계를 제공한다(문헌참조:

Morrison and Schlom (1990) *Import. Adv. Oncol.* 3-18). 또한, 치료학적 항체에 대해 문헌[Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327]에 의해 기재된 바와 같이 면역원성은 무린 CDR 서열을 사람 항체 골격(재형성/CDR 이식/사람화)으로 전달함에 의해 감소될 수 있다. 또 다른 방법은 설치류 가변 경쇄 및 중쇄 도메인으로 시작하는 "재표면화" 또는 "베니어링"으로 언급되고 단지 표면-접근 골격 아미노산이 사람의 것으로 변화되고 CDR 및 묻혀진 아미노산은 모 설치류 항체의 것으로 유지한다(문헌참조: Roguska et al. (1996) *Protein Engineer.* 9:895-904). 또 다른 유형의 사람화에서, 전체 CDR을 이식시키는 것 대신, 하나의 기술이 항체의 이의 표적과의 결합에 관여하는 CDR 잔기의 서브셋으로서 정의된 단지 "특이성-결정 영역"(SDR)을 이식시킨다(문헌참조: Kashmiri et al. (2005) *Methods* 36(1):25-34). 이것은 가용한 항체-표적 복합체의 가용한 3차원 구조의 분석 또는 표적과의 상호작용하는지를 결정하기 위한 항체 CDR 잔기의 돌연변이 분석을 통해 SDR의 동정을 가능하게 한다. 또한, 완전한 사람 항체는 무린, 키메라 또는 사람화된 항체와 비교하여 감소된 면역원성을 가질 수 있다.

[0182] 치료학적 항체의 면역원성을 감소시키기 위한 또 다른 방법은 면역원성인 것으로 예측되는 특정 특이적 서열의 제거이다. 하나의 방법에서, 제1 세대 생물작용은 사람에서 시험되었고 수용가능하지 않게 면역원성인 것으로 밝혀진 후, B-세포 에피토프는 맵핑되고 면역 검출을 피하기 위해 변화될 수 있다. 또 다른 방법은 잠재적인 T 세포 에피토프를 예측하고 제거하는 방법을 사용한다. 컴퓨터 방법은 MHC 단백질과 결합하는 잠재력을 갖는 생물학적 치료제의 펩타이드 서열을 스캐닝하고 동정하기 위해 개발되었다(Desmet et al. (2005) *Proteins* 58:53-69). 또한 사람 수지상 세포계 방법을 사용하여 잠재적인 단백질 알레르겐에서 CD4⁺ T-세포 에피토프를 동정할 수 있다(문헌참조: Stickler et al. (2000) *J. Immunother.* 23: 654-60; Morrison and Schlom (1990) *Important Adv. Oncol.* 3-18; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Roguska et al. (1996) *Protein Engineer.* 9:895-904; Kashmiri et al. (2005) *Methods* (San Diego Calif.) 36(1):25-34; Desmet-Johan et al. (2005) *Proteins* 58:53-69; Stickler et al. (2000) *J. Immunother.* 23:654-60.)

[0183] B 7. 생체내 효능

[0184] 목적하는 생체내 효능을 갖는 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 배합으로 주어지는 경우 유사하게 목적하는 생체내 효능을 갖는 mAb를 생성하고 선별하는 것이 중요하다. 그러나, 몇몇 경우에 DVD-Ig는 2개의 별도의 mAb를 배합하여 달성될 수 없는 생체내 효능을 나타낼 수 있다. 예를 들면, DVD-Ig는 2개의 표적을 근접하게 하여 2개의 별도의 mAb의 배합으로 달성될 수 없는 활성을 유도할 수 있다. 추가의 바람직할 수 있는 생물학적 기능은 섹션 B3에 본원에 기재되어 있다. DVD-Ig 분자에 바람직할 수 있는 성질을 갖는 모 항체는 약제동력학 t 1/2; 조직 분포; 가용성 대 세포 표면 표적 및 표적 농도-가용성/밀도-표면과 같은 인자를 기초로 선택될 수 있다.

[0185] B 8. 생체내 조직 분포

[0186] 목적하는 생체내 조직 분포를 갖는 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 하나의 실시형태에서, 유사한 목적하는 생체내 조직 분포 프로필을 갖는 모 mAb가 선택되어야만 한다. 또한, 이원 특이적 표적화 전략의 기작을 기준으로, 다른 시점에서 배합으로 주어지는 경우 유사하게 목적하는 생체내 조직 분포를 갖는 모 mAb를 선별하는 것이 요구되지 않을 수 있다. 예를 들면, 하나의 결합 성분이 DVD-Ig를 특이적 부위로 표적화하여 제2 결합 성분이 동일한 표적 부위에 오도록 유도하는 DVD-Ig의 경우이다. 예를 들면, DVD-Ig의 하나의 결합 특이성은 췌장(섬 세포)을 표적화할 수 있고 다른 특이성은 GLP1을 췌장으로 오게하여 인슐린을 유도할 수 있다.

[0187] B 9. 이소타입

[0188] 이소타입, 이펙터 기능 및 순환 반감기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 목적하는 성질을 갖는 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 하나의 실시형태에서, 치료학적 용도 및 목적하는 치료학적 엔드포인트에 따라 적당한 Fc 이펙터 기능을 갖는 모 mAb를 선택한다. 5개의 주요 중쇄 부류 또는 이소타입이 있고 이중 몇몇은 여러 서브타입을 갖고 이들은 항체 분자의 이펙터 기능을 결정한다. 이들 이펙터 기능은 항체 분자의 힌지 영역, CH2 및 CH3 도메인에 있다. 그러나, 항체 분자의 다른 부분에서의 잔기는 또한 이펙터 기능에 효과를 가질 수 있다. 힌지 영역 Fc-이펙터 기능은 다음을 포함한다: (i) 항체 의존성 세포독성, (ii) 보체(C1q) 결합, 활성화 및 보체 의존성 세포독성 (CDC), (iii) 항원-항체 복합체의 식세포작용/제거, 및 (iv) 몇몇 경우에 사이토카인 방출. 항체 분자의 이들 Fc-이펙터 기능은 Fc-영역과 한 세트의 부류 특이적 세포 표면 수용체의 상호작용을 통해 매개된다. IgG1 이소타입의 항체는 대부분 활성이지만 최소 또는 IgG2 및 IgG4는 최소로 또는 어떠한 이펙터 기능을 갖지 않는다. IgG 항체의 이펙터 기능은 3개의 구조적으로 유사한 세포 Fc 수용체 유형(및 서브타입)(FcγR1, FcγR2 및 FcγR3)의 상호작용을 통해 매개된다. IgG1의 이들 이펙터 기능은 FcγR 및 C1q 결합을 위해 요구되는 하부 힌지 영역(예를 들면, L234A, L235A)에서 특이적 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 제거될 수

있다. Fc 영역에서 아미노산 잔기, 특히, CH₂-CH₃ 도메인은 또한 항체 분자의 순화 반감기를 결정한다. 이러한 Fc 기능은 산성 리소좀으로부터 항체 분자의 일반적 순환으로 복귀시키는 재순환에 관여하는 신생 Fc 수용체 (FcRn)으로의 Fc-영역의 결합을 통해 매개된다.

- [0189] mAb가 활성 또는 불활성 이소타입을 가져야만 하는지의 여부는 항체에 대해 목적하는 치료학적 엔드포인트에 의존한다. 이소타입의 용도 및 목적하는 치료학적 결과에 대한 몇몇 예는 하기에 열거한다:
- [0190] a) 목적하는 엔드포인트가 가용성 사이토카인의 기능성 중화작용인 경우, 불활성 이소타입이 사용될 수 있고;
- [0191] b) 목적하는 결과가 병리학적 단백질의 제거인 경우 활성 이소타입이 사용될 수 있고;
- [0192] c) 목적하는 결과가 단백질 응집체의 제거인 경우 활성 이소타입이 사용될 수 있고;
- [0193] d) 목적하는 결과가 표면 수용체를 길항시키는 것인 경우, 불활성 이소타입이 사용되고(Tysabri, IgG4; OKT3, 돌연변이된 IgG1);
- [0194] e) 목적하는 결과가 표적 세포를 제거하는 것인 경우, 활성 이소타입이 사용되고(Herceptin, IgG1 (및 증진된 이펙터 기능과 함께));
- [0195] f) 목적하는 결과가 CNS에 진입하는 것 없이 순환으로부터 단백질을 제거하는 것인 경우 IgM 이소타입이 사용될 수 있다(예를 들면, 순환하는 Ab 펩타이드 중의 제거).
- [0196] 또 mAb의 Fc 이펙터 기능은 당업계에 널리 공지된 다양한 시험관내 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0197] 논의된 바와 같이, 이소타입의 선별 및 이에 의한 이펙터 기능은 목적하는 치료학적 엔드포인트에 의존한다. 순환 표적의 단순한 중화가 요구되는 경우, 예를 들면, 수용체-리간드 상호작용을 차단시키는 경우, 이펙터 기능은 요구되지 않을 수 있다. 당해 경우에 이펙터 기능을 제거하는 항체의 Fc-영역내 이소타입 또는 돌연변이가 바람직할 수 있다. 표적 세포의 제거가 치료학적 엔드포인트인 다른 경우에, 예를 들면, 종양 세포를 제거하는 경우, 이펙터 기능을 증진시키는 Fc 영역에서 이소타입 또는 돌연변이 또는 탈푸코실화가 바람직할 수 있다(문헌참조: Presta (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656; Satoh et al. (2006) Expert Opin. Biol. Ther. 6:1161-1173). 유사하게, 치료학적 용도에 의존하여 항체 분자의 순환 반감기는 Fc 영역에서 특이적 돌연변이를 도입함에 의해 항체-FcRn 상호작용을 조절함에 의해 감소되거나/지연될 수 있다(문헌참조: Dall'Acqua et al. (2006) J. Biol. Chem. 281:23514-23524; Petkova et al. (2006) Internat. Immunol. 18:1759-1769; Vaccaro et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:18709-18714).
- [0198] 정상의 치료학적 mAb의 상이한 이펙터 기능에 영향을 주는 다양한 잔기에 대한 공개된 정보는 DVD-Ig에 대해 확인될 필요가 있을 수 있다. DVD-Ig 포맷에서 모노클로날 항체 이펙터의 조절을 위해 동정된 것들 이외에 추가의 (상이한) Fc-영역 잔기가 중요할 수 있다.
- [0199] 전반적으로, Fc-이펙터 기능(이소타입)이 최종 DVD-Ig 포맷에서 중요한지에 관한 결정은 질환 증상, 치료학적 표적, 목적하는 치료학적 엔드포인트 및 안정성 고려에 따라 다양할 것이다.
- [0200] o IgG1 - 알로타입: G1mz
- [0201] o IgG1 돌연변이 - A234, A235
- [0202] o IgG2 - 알로타입: G2m(n-)
- [0203] o 카파 - Km3
- [0204] o Lambda를 포함하지만 이에 제한되지 않은 적당한 중쇄 및 경쇄 불변 영역이 예시된다.
- [0205] **Fc 수용체 및 C1q 연구:** 세포 막상에 임의의 과발현된 표적과 복합체를 형성하는 항체에 의한 원치않는 항체 의존적 매개된 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC)의 가능성은 (예를 들면, L234A, L235A) 힌지 영역 돌연변이에 의해 제거될 수 있다. mAb의 IgG1 힌지 영역에 존재하는 이들 치환된 아미노산은 FcγR 결합이 IgG1 힌지 영역상의 중첩 부위내에 존재하는 것으로 사료됨에 따라 mAb의 사람 Fc 수용체(FcRn이 아니라)의 결합을 감소시킬 것으로 예상된다. 이러한 mAb의 특징은 야생형 IgG를 포함하는 항체에 대해 개선된 안전성 프로필을 유도할 수 있다. 사람 Fc 수용체로의 mAb의 결합은 FcγRIIb (또는 기타 FcγRs)를 발현하는 세포주(예를 들면, THP-1, K562) 및 조작된 CHO 세포주를 사용하는 유동 세포 측정 실험에 의해 결정될 수 있다. IgG1 대조군 모노클로날 항체와 비교하는 mAb는 FcγRI 및 FcγRIIa로의 감소된 결합을 보여주는 반면 FcγRIIb로의 결합은 영향받지 않는다. 항원/IgG 면역 복합체에 의한 C1q의 결합 및 활성화는 결과적으로 발생하는 염증 및/또는 면역조절

반응과 함께 전형적인 보체 캐스케이드를 유발한다. IgG상의 C1q 결합 부위는 IgG 힌지 영역에 위치하는 것으로 밝혀졌다. 증가하는 농도의 mAb에 결합하는 C1q는 C1q ELISA에 의해 평가되었다. 당해 결과는 야생형 대조군 IgG1의 결합과 비교하는 경우 예상되는 바와 같이 mAb가 C1q에 결합할 수 없음을 입증한다. 전반적으로, L234A, L235A 힌지 영역 돌연변이는 mAb의 FcγRI, FcγRIIa 및 C1q로의 결합을 제거시키지만 mAb와 FcγRIIb의 상호작용에는 영향을 주지 않는다. 이들 데이터는 돌연변이 Fc를 갖는 생체내 mAb가 정상적으로 억제 FcγRIIb와 상호작용하지만 활성화 FcγRI 및 FcγRIIa 수용체 또는 C1q와는 상호작용하지 않을 가능성이 있음을 시사한다.

[0206] **사람 FcRn 결합:** 신생아 수용체(FcRn)는 태반을 거치는 IgG의 수송에 관여하고 IgG 분자의 이화작용 반감기를 조절한다. 효능을 개선시키거나, 용량 또는 투여 횟수를 감소시키거나 표적물로의 국소화를 개선시키기 위해 항체의 최종 반감기를 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 역으로 즉, 항체의 최종 반감기를 감소시켜 전신 노출을 감소시키거나 표적 대 비표적 결합 비율을 개선시키는 것이 유리할 수 있다. IgG와 이의 구체 수용체 FcRn간의 상호작용을 조작하는 것이 IgG의 최종 반감기를 증가시키거나 감소시키는 방법을 제공한다. 순환내 IgG를 포함하는 단백질은 혈관 내피세포와 같은 특정 세포에 의한 미세음세포작용을 통해 유체 상에 흡수된다. IgG는 약산성 조건 (pH 6.0-6.5)하에 엔도솜내 FcRn과 결합할 수 있고 세포 표면으로 재순환될 수 있으며, 이것은 거의 중성 조건(pH 7.0-7.4)하에 방출된다. FcRn80, 16, 17상의 Fc-영역 결합 부위의 맵핑은 종 His310 및 His435에 걸쳐 보존된 2개의 히스티딘 잔기가 당해 상호작용의 pH 의존성에 관여함을 보여주었다. 파지-디스플레이 기술을 사용하여, FcRn으로의 결합을 증가시키고 마우스 IgG의 반감기를 연장시키는 마우스 Fc-영역 돌연변이가 동정되었다(문헌참조: Victor et al. (1997) Nature Biotechnol. 15(7):637-640). pH 6.0에서 FcRn에 대한 사람 IgG의 결합 친화성을 증가시키지만 pH 7.4에서는 증가시키지 않는 Fc-영역 돌연변이가 또한 동정되었다(문헌참조: Dall'Acqua et al. (2002) J. Immunol. 169(9):5171-80). 더욱이, 한 경우에, 결합에서 유사한 pH 의존성 증가(27배 이하)는 또한 레서스 FcRn에 대해 관찰되었고, 이것은 모 IgG와 비교하여 레서스 원숭이에서 혈청 반감기를 2배 증가시켰다(문헌참조: Hinton et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216). 이들 발견은 Fc 영역과 FcRn의 상호작용을 조작함에 의해 항체 치료제의 혈장 반감기를 연장시킬 수 있음을 지적한다. 역으로, FcRn과의 상호작용을 감소시키는 Fc-영역 돌연변이는 항체 반감기를 감소시킬 수 있다.

[0207] B.10 약동력학(PK)

[0208] 목적하는 약동력학 프로필을 갖는 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 하나의 실시형태에서, 유사하게 목적하는 약동력학 프로필을 갖는 모 mAb가 선택된다. 하나의 고려는 모노클로날 항체에 대한 면역원성 반응(즉, HAHA, 사람 항-사람 항체 반응; HACA, 사람 항-키메라 항체 반응)은 추가로 이들 치료학적 제제의 약동력학을 복잡하게 한다는 것이다. 하나의 실시형태에서, 최소의 면역원성을 갖거나 어떠한 면역원성을 갖지 않는 모노클로날 항체는 수득한 DVD-Ig가 또한 최소의 면역원성을 갖거나 어떠한 면역원성을 갖지 않도록 DVD-Ig 분자를 작제하기 위해 사용된다. mAb의 PK를 결정하는 인자 몇몇은 mAb의 고유 성질(VH 아미노산 서열); 면역원성; FcRn 결합 및 Fc 기능을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0209] 선택된 모 모노클로날 항체의 PK 프로필은 설치류에서 PK 프로필이 시노몰거스 원숭이 및 사람에서 모노클로날 항체의 PK 프로필과 양호하게 관련됨(또는 근접하게)으로써 설치류에서 용이하게 결정될 수 있다. PK 프로필은 실시예 섹션 1.2.2.3.A에서 기재된 바와 같이 결정된다.

[0210] 목적하는 PK 성질(및 본원에서 논의된 바와 같은 기타 목적하는 기능성 성질)을 갖는 모 모노클로날 항체가 선택된 후, DVD-Ig가 작제된다. DVD-Ig 분자가 2개의 모 모노클로날 항체 기원의 2개의 항원 결합 도메인을 함유함으로써 DVD-Ig의 PK 성질이 또한 평가된다. 따라서, DVD-Ig의 PK 성질을 결정하면서, 2개의 모 모노클로날 항체 기원의 항원 결합 도메인 둘다의 기능성을 기준으로 PK 프로필을 결정하는 PK 분석이 사용될 수 있다. DVD-Ig의 PK 프로필은 실시예 1.2.2.3.A에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다. DVD-Ig의 프로필에 영향을 줄 수 있는 추가의 인자는 항원-결합 도메인(CDR) 배향; 링커 크기; 및 Fc/FcRn 상호작용을 포함한다. 모 상체의 PK 성질 분석은 하기의 파라미터를 평가함에 의해 평가될 수 있다: 흡수, 분배, 대사 및 분비.

[0211] **흡수:** 지금까지, 치료학적 모노클로날 항체의 투여는 비경구 경로(예를 들면, 정맥내[IV], 피하[SC], 또는 근육내[IM])를 통해서이다. 간질 공간으로부터 SC 또는 IM 투여 후 전신 순환으로의 mAb의 흡수는 주로 림프 경로를 통해서이다. 포화될 수 있는, 예비전신성 단백질 용해 분해는 혈관의 투여 후 다양한 절대적 생체이용률을 유도할 수 있다. 일반적으로, 모노클로날 항체의 용량 증가와 함께 절대적 생체이용률의 증가는 보다 높은 용량에서 포화된 단백질 용해 능력으로 인해 관찰될 수 있다. mAb에 대한 흡수 과정은 통상적으로 림프액이 서서히 혈관계로 누출됨에 따라서 매우 느리고 흡수의 지속시간은 수시간 내지 수일간에 걸쳐 일어날 수 있다. SC 투여 후 모노클로날 항체의 절대적 생체이용률은 50% 내지 100%이다. DVD-Ig 작제물에 의해 표적화된 혈뇌 장벽에서 수

송-매개 구조의 경우에, 혈장에서 순환 시간은 혈뇌 장벽(BBB)에서 CNS 격막으로의 증진된 세포통과 수송으로 인해 감소될 수 있고, 여기서, DVD-Ig는 이의 제2 항원 인지 부위를 통해 상호작용할 수 있도록 방출된다.

[0212] **분배:** IV 투여 후, 모노클로날 항체는 신속한 분배 상에 있어서 느린 제거 상으로 시작하여 통상적으로 2상 혈청(또는 혈장) 농도-시간 프로필에 따른다. 일반적으로, 이중지수적 약동력학 모델은 당해 종류의 약리동력학적 프로필을 최상으로 기재한다. mAb에 대한 중추 격막(Vc)내 분배 용적은 통상적으로 혈장 용적(2 내지 3 리터)과 동일하거나 약간 크다. 시간 프로필에 대한 혈청(혈장) 농도에서 구분되는 2상 패턴은 투여의 또 다른 비경구 경로(예를 들면, IM 또는 SC)와 함께 명백하지 않을 수 있는데 그 이유는 혈청(혈장) 농도-시간 곡선의 분배 상이 긴 흡수부에 의해 차폐되기 때문이다. 물리화학적 성질, 부위 특이적 및 표적 배향된 수용체 매개된 흡수, 조직의 결합 능력 및 mAb 용량을 포함하는 많은 인자는 mAb의 생분배에 영향을 줄 수 있다. 이들 요소중 일부는 mAb에 대한 생분배에 비선형성으로 기여할 수 있다.

[0213] **대사 및 분비:** 분자 크기로 인해, 온전한 모노클로날 항체는 신장을 통해 뇨로 분비되지 않는다. 이들은 주로 대사(예를 들면, 이화작용)에 의해 불활성화된다. IgG-기본 치료학적 모노클로날 항체에 대해 반감기는 전형적으로 수시간 내지 1 내지 2일에서 20일 이상의 범위이다. mAb의 제거는 FcRn 수용체에 대한 친화성, mAb의 면역원성, mAb의 당화정도, 단백질용해에 대한 mAb의 민감성 및 수용체 매개 제거를 포함하지만 이에 제한되지 않는 많은 인자에 의해 영향 받을 수 있다.

[0214] B.11 사람 및 tox 중 상의 조직 교차-반응성 패턴:

[0215] 동일한 염색 패턴은 잠재적인 사람 독성이 tox 중에서 평가될 수 있음을 시사한다. Tox 종은 관련되지 않은 독성이 연구되는 동물들이다.

[0216] 개별 항체는 2개의 기준을 충족하도록 선택된다. (1) 항체 표적의 공지된 발현을 위해 적당한 조직 염색; 및 (2) 동일한 기관으로부터 기원하는 사람과 tox 조직간의 유사한 염색 패턴.

[0217] 기준 1 : 면역화 및/또는 항체 선별은 전형적으로 재조합 또는 합성된 항원(단백질, 탄수화물 또는 기타 분자)을 사용한다. 관련되지 않은 항원에 대한 천연 대응물과 역스크리닝에 결합하는 것은 흔히 치료학적 항체를 위한 스크리닝 퍼널(funnel)이다. 그러나, 다수의 항원에 대한 스크리닝은 흔히 비현실적이다. 따라서, 모든 주요 기관 기원의 사람 조직을 갖는 조직 교차-반응성 연구는 임의의 관련되지 않은 항원으로서의 항체의 원치않는 결합을 배제하는 작용을 한다.

[0218] 기준 2: 사람과 tox 중 조직(시노물거스 원숭이, 개, 능히 설치류 및 기타, 동일한 36개 또는 37개 조직이 사람 연구에서와 같이 시험된다)은 tox 중의 선별을 입증하는 것을 도와준다. 동결된 조직 절편상의 전형적인 조직 교차 반응성 연구에서 치료학적 항체는 공지된 항원으로서의 예상된 결합 및/또는 보다 적은 정도로 낮은 수준의 상호작용(비특이적 결합, 유사한 항원으로서의 낮은 수준의 결합, 낮은 수준의 전하에 기초한 상호작용 등)을 기초로 하는 조직으로서의 결합을 입증할 수 있다. 임의의 경우, 대부분의 관련 독성학 동물 종은 사람 및 동물 조직에 동시에 고도로 결합하는 종이다.

[0219] 조직 교차 반응성 연구는 다음 지침서[EC CPMP Guideline 111/5271/94 "Production and quality control of mAbs" and the 1997 US FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use"]를 포함하는 적당한 조절 지침에 따른다. 부검 또는 생검에서 취득된 사람 조직의 동결절편(5 μ m)을 고정시키고 대물 유리상에서 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행하였다. FDA's 지침 "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use".

[0220] 조직 교차 반응성 연구는 흔히 2개의 단계로 수행되고 제1 단계는 사람 공여자 기원의 32개 조직(전형적으로: 부신, 위장관, 전립선, 방광, 심장, 골격근, 혈액 세포, 신장, 피부, 골수, 간, 척수, 유방, 폐, 비장, 소뇌, 림프절, 고환, 대뇌피질, 난소, 흉선, 결장, 췌장, 전립선, 갑상선, 내피, 부갑상선, 수뇨관, 눈, 뇌하수체, 자궁, 나팔관 및 태반)의 동결절편을 포함한다. 제2 단계에서, 완전한 교차 반응성 연구는 3명의 관련되지 않은 성인 기원의 38개 이하의 조직(부신, 혈액, 혈관, 골수, 소뇌, 대뇌, 자궁경관, 식도, 눈, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 유방 유선, 난소, 난관, 췌장, 부갑상선, 말초 신경, 뇌하수체, 태반, 전립선, 침선, 피부, 소장, 척수, 비장, 위, 횡문근, 고환, 흉선, 갑상선, 편도선, 수뇨관, 뇨 방광 및 자궁)을 사용하여 수행된다. 연구는 전형적으로 최소로 2개의 용량 수준에서 수행된다.

[0221] 치료학적 항체(즉, 시험 제품) 및 이소형 매치된 대조군 항체는 아비딘-비오틴 복합체(ABC) 검출을 위해 비오틴화될 수 있다. 기타 검출 방법은 FITC(또는 그 밖에) 표지된 시험 제품에 대한 3차 항체 검출 또는 비표지된

시험 제품에 대한 표지된 항-사람 IgG와의 예비 복합체 형성을 포함할 수 있다.

- [0222] 간략하게, 부검 또는 생검에서 수득된 사람 조직의 동결절편(약 5 μm)을 고정화하고 대물 글래스상에서 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행한다. 먼저(예비 복합체 형성 검출 시스템의 경우), 시험 제품은 2차 비오틴화 항-사람 IgG로 항온처리하고 면역 복합체가 되도록 한다. 시험 제품 2 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 최종 농도에서 면역 복합체는 대물 글래스상의 조직 절편상으로 첨가하고 조직 절편은 아비딘-비오틴-퍼옥시다제 키트와 30분동안 반응시킨다. 이어서, DAB (3,3'-디아미노벤지딘), 퍼옥시다제 반응을 위한 기질을 조직 염색을 위해 4분동안 적용한다. 항원-세파로스 비드는 양성 대조군 조직 절편으로서 사용한다.
- [0223] 임의의 특이적 염색은 미지의 표적 항원의 공지된 발현을 토대로 예상되거나(예를 들면, 항원 발현과 일치하여) 예상치 않은 반응성인 것으로 판단된다. 특이적인 것으로 판단된 임의의 염색은 강도 및 분포에 대해 스코어된다. 항원 또는 혈청 경쟁 또는 차단 연구는 관찰된 염색이 특이적 또는 비특이적인지를 결정하는데 도움을 줄 수 있다.
- [0224] 2개의 선택된 항체가 선택 기준(적당한 조직 염색, 사람과 독성 동물 조직 특이적간에 염색의 일치)을 충족하는 것으로 밝혀진 경우, 이들은 DVD-Ig 생성을 위해 선택될 수 있다.
- [0225] 조직 교차 반응성 연구는 최종 DVD-Ig 작제물을 사용하여 반복되어야만 하지만 이들 연구는 본원에 명시된 바와 동일한 프로토콜을 따르고 이들은 평가를 위해 보다 복잡한데 그 이유는 임의의 결합이 2개의 모 항체중 어느 하나에 기인할 수 있고 임의의 설명되지 않은 결합이 복합체 항원 경쟁 연구를 사용하여 확인될 필요가 있다.
- [0226] DVD-Ig와 같은 다특이적 분자를 사용한 복잡한 조직 교차반응성 연구의 착수는 2개의 모 항체가 (1) 예상되지 않은 조직 교차 반응성 발견의 부재 및 (2) 상응하는 사람과 독성 동물 중 조직간의 조직 교차 반응성의 적당한 유사성에 대해 선별되는 경우 크게 단순화된다는 것은 명백하다.
- [0227] **B.12 특이성 및 선택성:**
- [0228] 목적하는 특이성 및 선택성을 갖는 DVD-Ig 분자를 제조하기 위해, 목적하는 특이성 및 선택성 프로필이 유사한 모 mAb를 제조하고 선택할 필요가 있다.
- [0229] DVD-Ig를 사용하는 특이성 및 선택성에 대한 결합 연구는 4개 이상의 결합 부위(2개 각각은 2개 항원에 대한 것이다)로 인해 복잡할 수 있다. 간략하게, DVD-Ig와 함께 ELISA, BIAcore, KinExA 또는 기타 상호작용 연구는 DVD-Ig 분자에 대한 1개 또는 2개 이상의 항원 결합을 모니터할 필요가 있다. BIAcore 기술은 다중 항원의 연속적 독립적 결합을 해결할 수 있지만 KinExA와 같은 ELISA 또는 보다 근대의 기술을 포함하는 보다 통상적인 방법은 할 수 없다. 따라서 각각의 모 항체의 주의깊은 특징 분석은 중요하다. 각각의 개별 항체가 특이성에 대해 성질 분석된 후, DVD-Ig 분자에서 개별 결합 부위의 특이성 보유에 대한 확인은 크게 단순화된다.
- [0230] DID-Ig의 특이성을 결정하는 복잡한 연구 착수는 2개의 모 항체가 DVD-Ig로 배합되기 전에 특이성에 대해 선택되는 경우 크게 단순화된다는 것은 명백하다.
- [0231] 항원-항체 상호작용 연구는 많은 전형적인 단백질 단백질 상호작용 연구를 포함하는 임의의 형태를 취할 수 있고, 이는 ELISA (효소 결합된 면역흡착 분석), 질량 분광기, 화학적 교차 결합, 광 산란을 갖는 SEC, 평형 투석, 겔 침투, 한외여과, 겔 크로마토그래피, 대형-지대 분석 SEC, 미세정제용 한외원심분리 (침강 평형), 분광 방법, 적정 마이크로칼로리측정기, 침강 평형 (분석 한외원심분리기), 침강 속도(분석적 원심분리기에서), 표면 플라즈몬 공명(BIAcore를 포함)을 포함한다. 관련 문헌은 문헌["Current Protocols in Protein Science", Coligan et al. (eds.) Volume 3, chapters 19 and 20, published by John Wiley & Sons Inc., and references included therein and "Current Protocols in Immunology", Coligan et al. (eds.) published by John Wiley & Sons Inc 및 본원에 포함된 관련 문헌]을 포함한다.
- [0232] 전혈에서 사이토카인 방출: 사람 혈액 세포의 mAb의 상호작용은 사이토카인 방출 분석에 의해 조사될 수 있다 (문헌참조: Wing (1995) Therapeut. Immunol. 2(4):183-190; "Current Protocols in Pharmacology", et al. (eds.) published by John Wiley & Sons Inc; Madhusudan (2004) Clin. Canc. Res. 10(19):6528-6534; Cox (2006) J. Methods 38(4):274-282; Choi (2001) Eur. J. Immunol. 31(1):94-106)). 간략하게, 다양한 농도의 mAb는 24시간동안 사람 전혈과 함께 항온처리한다. 시험된 농도는 환자에서 전형적인 혈액 수준과 유사한(100 ng/ml - 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 포함하지만 이에 제한되지 않음) 최종 농도를 포함하는 광범위를 포괄해야만 한다. 항온처리 후, 상등액 및 세포 용해물은 IL-1R α , TNF- α , IL-1b, IL-6 및 IL-8의 존재에 대해 분석하였다. mAb에 대

해 생성된 사이토카인 농도 프로파일은 음성 사람 IgG 대조군과 양성 LPS 또는 PHA 대조군에 의해 생성된 프로파일과 비교하였다. 세포 상등액과 세포 용해물 둘다 기원의 mAb에 의해 나타난 사이토카인 프로파일은 대조군 사람 IgG와 비교할 수 있었다. 하나의 실시형태에서, 모노클로날 항체는 염증 사이토카인을 자발적으로 방출하기 위해 사람 혈액 세포와 상호작용하지 않는다.

[0233] DVD-Ig에 대한 사이토카인 방출 연구는 4개 이상의 결합 부위로 인해 복잡하고 2개 각각은 각각의 항원에 대한 것이다. 간략하게, 사이토카인 방출 연구는 본원에 기재된 바와 같이 전혈 또는 기타 세포 시스템에 대해 전체 DVD-Ig 분자의 효과를 측정하는 것이지만 분자의 어느 부분이 사이토카인 방출을 유발하는지를 해결할 수 있다. 일단 사이토카인 방출이 검출된 경우, 몇몇 보조 정제 세포 성분이 사이토카인 방출 자체를 유발할 수 있기 때문에 DVD-Ig 제제의 순도가 확인되어야만 한다. 순도가 문제가 아닌 경우, DVD-Ig(Fc 부분의 제거, 결합 부위의 분리 등을 포함하지만 이에 제한되지 않음)의 단편화, 결합 부위 돌연변이유발 또는 기타 방법은 임의의 관찰을 평활화하는데 사용될 필요가 있을 수 있다. 이러한 복잡한 과정은 2개의 모 항체가 DVD-Ig로 배합되기 전에 사이토카인 방출의 부재를 위해 선택되는 경우 크게 단순화된다는 것은 명백하다

[0234] B.13 독성학적 연구를 위한 다른 종에 대한 교차 반응성:

[0235] 하나의 실시형태에서, 선택되는 개별 항체는 적절한 tox 종, 예를 들면, 사이노몰거스 원숭이에 대해 충분한 교차-반응성을 갖는다. 모 항체는 이중상동성 종 표적(즉, 사이노몰거스 원숭이)에 결합하고 적당한 반응(조절, 중화, 활성화)을 유발할 필요가 있다. 하나의 실시형태에서, 이중상동성 종 표적에 대한 교차 반응성(친화성/효능)은 사람 표적의 10배 이내이어야만 한다. 실제로, 모 항체는 마우스, 래트, 개, 원숭이(및 기타 사람을 제외한 영장류) 및 질환 모델 종(즉, 천식 모델에 대한 양)을 포함하는 다양한 종양에 대해서 평가된다. 모 모노클로날 항체 기원의 tox 종에 대해 허용가능한 교차 반응성은 동일한 종에서 DVD-Ig-Ig의 향후 독성학 연구를 허용한다. 그 이유 때문에, 2개의 모 모노클로날 항체는 통상의 tox 종에 대해 허용가능한 교차 반응성을 가져 동일한 종에서 DVD-Ig의 독성학 연구를 가능하게 해야 한다.

[0236] 모 mAb는 특정 표적에 결합하는 다양한 모노클로날 항체로부터 선택될 수 있고, 당업계에 널리 공지되어 있다. 이들은 항-TNF 항체(미국 특허 제6,258,562호), 항-IL-12 및/또는 항-IL-12p40 항체(미국 특허 제6,914,128호); 항-IL-18 항체(미국 특허 공개 제20050147610호), 항-C5, 항-CBL, 항-CD147, 항-gp120, 항-VLA-4, 항-CD11a, 항-CD18, 항-VEGF, 항-CD40L, 항 CD-40(예를 들면, PCT 공보 제WO2007124299호 참조) 항-Id, 항-ICAM-1, 항-CXCL13, 항-CD2, 항-EGFR, 항-TGF-베타 2, 항-HGF, 항-cMet, 항 DLL-4, 항-NPR1, 항-PLGF, 항-ErbB3, 항-E-셀렉틴, 항-Fact VII, 항-Her2/neu, 항-F gp, 항-CD11/18, 항-CD14, 항-ICAM-3, 항-RON, 항 CD-19, 항-CD80(예를 들면, PCT 공보 제WO2003039486호 참조), 항-CD4, 항-CD3, 항-CD23, 항-베타2-인테그린, 항-알파4베타7, 항-CD52, 항-HLA DR, 항-CD22(예를 들면, 미국 특허 제5,789,554호 참조), 항-CD20, 항-MIF, 항-CD64(FcR), 항-TCR 알파 베타, 항-CD2, 항-Hep B, 항-CA 125, 항-EpCAM, 항-gp120, 항-CMV, 항-gpIIbIIIa, 항-IgE, 항-CD25, 항-CD33, 항-HLA, 항-IGF1,2, 항 IGF1R, 항-VNR인테그린, 항-IL-1알파, 항-IL-1베타, 항-IL-1 수용체, 항-IL-2 수용체, 항-IL-4, 항-IL-4 수용체, 항-IL5, 항-IL-5 수용체, 항-IL-6, 항- IL-6R, RANKL, NGF, DKK, 알파V베타3, IL-17A, 항-IL-8, 항-IL-9, 항-IL-13, 항-IL-13 수용체, 항-IL-17, 및 항-IL-23; IL-23p19를 포함하지만 이들에 제한되는 것은 아니다(Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731-6 및 <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html> 참조).

[0237] 모 mAb는 또한 임상적 시험용 또는 임상 사용 개발용으로 승인된 다양한 치료학적 항체로부터 선택될 수 있다. 당해 치료학적 항체로는 리투시마브(Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche)(예를 들면 미국 특허 제5,736,137호 참조), 비-호지킨 림프종을 치료하는 것으로 승인된 키메라 항-CD20 항체; HuMax-CD20, Genmab에 의해 현재 개발 중인 항-CD20, 미국 특허 제 5,500,362호에 기재되어 있는 항-CD20 항체, AME-133(Applied Molecular Evolution), hA20(Immunomedics, Inc.), HumaLYM(Intracel), 및 PR070769(PCT 공보 제PCT/US2003/040426호), 트라스주마브(Herceptin®, Genentech)(예를 들면, 미국 특허 제5,677,171호 참조), 유방암을 치료하는 것으로 승인된 사람화된 항-Her2/neu 항체; Genentech에 의해 현재 개발 중인 페르투주마브(rhuMab-2C4, Omnitarg®); 미국 특허 제4,753,894호에 기재되어 있는 항-Her2 항체; 세톡시마브(Erbitux®, Imclone)(미국 특허 제4,943,533; PCT 공보 제WO 96/40210호), 각종 암에 대해 임상 시험 중인 키메라 항-EGFR 항체; ABX-EGF(미국 특허 제6,235,883호), Abgenix-Immunex-Amgen에 의해 현재 개발 중; HuMax- EGFr(미국 특허 제7,247,301호), Genmab에 의해 현재 개발 중; 425, EMD55900, EMD62000, 및 EMD72000(Merck KGaA)(미국 특허 제5,558,864호; Murthy et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252(2):549-60; Rodeck et al. (1987) J. Cell. Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough et al. (1991) Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62(Institute of Cancer Research)(PCT 공보 제WO 95/20045호; Modjtahedi et al. (1993) J. Cell Biophys. 22(1-3):129-46;

Modjtahedi et al. (1993) Br. J. Cancer 67(2):247-53; Modjtahedi et al. (1996) Br. J. Cancer 73(2):228-35; Modjtahedi et al. (2003) Int. J. Cancer 105(2):273-80); TheraCIM hr3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba(미국 특허 제5,891,996호; 미국 특허 제6,506,883호; Mateo et al. (1997) Immunotechnol. 3(1):71-81); mAb-806(Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering)(Jungbluth et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(2):639-44); KSB-102(KS Biomedix); MR1-1(IVAX, National Cancer Institute)(PCT 공보 제WO 0162931호); 및 SC100(Scancell)(PCT WO 01/88138); 알렘투주마브(Campath®, Millenium), B-세포 만성 림프구성 백혈병의 치료용으로 현재 승인되어 있는 사람화된 mAb; 류로모나브-CD3(오르토클론 OKT3®), Ortho Biotech/Johnson & Johnson에 의해 개발된 항-CD3 항체, 이브리투모나브 티옥세탄(Zevalin®), IDEC/Schering AG에 의해 개발된 항-CD20 항체, 겐투주마브 오조가마이신(Mylotarg®), Celltech/Wyeth에 의해 개발된 항-CD33(p67 단백질) 항체, 알레파셋트(Amevive®), Biogen에 의해 개발된 항-LFA-3 Fc 융합체, 아브식시마브(ReoPro®), Centocor/Lilly에 의해 개발됨, 바실릭시마브(Simulect®), Novartis에 의해 개발됨, 팔리비주마브(Synagis®), Medimmune에 의해 개발됨, 인플릭시마브(Remicade®, Centocor에 의해 개발된 항-TNF알파 항체, 아달리우마브(Humira®), Abbott에 의해 개발된 항-TNF알파 항체, Humicade®, Celltech에 의해 개발된 항-TNF알파 항체, 골리우마브(CNTO-148), Centocor에 의해 개발된 완전한 사람 TNF 항체, 에타네르셉트(Enbrel®), Immunex/Amgen에 의해 개발된 p75 TNF 수용체 Fc 융합체, 레너르셉트, Roche에 의해 이전에 개발된 p55 TNF 수용체 Fc 융합체, ABX-CBL, Abgenix에 의해 개발되는 항-CD147 항체, ABX-IL8, Abgenix에 의해 개발되는 항-IL8 항체, ABX-MA1, Abgenix에 의해 개발되는 항-MUC18 항체, 겐투모나브(R1549, 90Y-muHMF1), Antisoma에 의해 개발된 항-MUC1, 테렉스(R1550), Antisoma에 의해 개발되는 항-MUC1 항체, AngioMab(AS1405), Antisoma에 의해 개발됨, HuBC-1, Antisoma에 의해 개발됨, Antisoma에 의해 개발되는 티오플라틴(AS1407), Antegren®(나탈리주마브), Biogen에 의해 개발되는 항-알파-4-베타-1(VLA-4) 및 알파-4-베타-7 항체, VLA-1 mAb, Biogen에 의해 개발되는 항-VLA-1 인테그린 항체, LTBR mAb, Biogen에 의해 개발되는 항-림포독소 베타 수용체(LTBR) 항체, CAT-152, Cambridge Antibody Technology에 의해 개발되는 항-TGF-β2 항체, ABT 874(J695), Abbott에 의해 개발되는 항-IL-12 p40 항체, CAT-192, Cambridge Antibody Technology 및 Genzyme에 의해 개발되는 항-TGFβ1 항체, CAT-213, Cambridge Antibody Technology에 의해 개발되는 항-에오타킨1 항체, 림포스타트-B®, Cambridge Antibody Technology 및 Human Genome Sciences Inc.에 의해 개발되는 항-Blys 항체, TRAIL-R1mAb, Cambridge Antibody Technology 및 Human Genome Sciences Inc.에 의해 개발되는 항-TRAIL-R1 항체, Avastin®(베바시주마브, rhuMab-VEGF), Genentech에 의해 개발되는 항-VEGF 항체, Genentech에 의해 개발되는 항-HER 수용체 계열 항체, 항-조직 인자(ATF), Genentech에 의해 개발되는 항-조직 인자 항체, Xolair®(오말리주마브), Genentech에 의해 개발되는 항-IgE 항체, Raptiva®(에팔리주마브), Genentech 및 Xoma에 의해 개발되는 항-CD11a 항체, MLN-02 항체(이전에 LDP-02), Genentech 및 Millenium Pharmaceuticals에 의해 개발됨, HuMax CD4, Genmab에 의해 개발되는 항-CD4 항체, HuMax-IL15, Genmab 및 Amgen에 의해 개발되는 항-IL15 항체, HuMax-Inflam, Genmab 및 Medarex에 의해 개발됨, HuMax-암, Genmab 및 Medarex 및 Oxford GcoSciences에 의해 개발되는 항-헤파라나제 I 항체, HuMax-림프종, Genmab 및 Amgen에 의해 개발됨, HuMax-TAC, Genmab에 의해 개발됨, IDEC-131, 및 IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발되는 항-CD40L 항체, IDEC-151(클레놀릭시마브), IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발되는 항-CD4 항체, IDEC-114, IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발되는 항-CD80 항체, IDEC-152, IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발되는 항-CD23, IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발되는 항-대식세포 이동 인자(MIF) 항체, BEC2, Imclone에 의해 개발되는 항-이디오타입 항체, IMC-1C11, Imclone에 의해 개발되는 항-KDR 항체, DC101, Imclone에 의해 개발되는 항-flk-1 항체, Imclone에 의해 개발되는 항-VE 카데린 항체, CEA-Cide®(라베투주마브), Immunomedics에 의해 개발되는 항-암배아성 항원(CEA) 항체, LymphoCide®(에프라투주마브), Immunomedics에 의해 개발되는 항-CD22 항체, AFP-Cide, Immunomedics에 의해 개발됨, MyelomaCide, Immunomedics에 의해 개발됨, LkoCide, Immunomedics에 의해 개발됨, ProstaCide, Immunomedics에 의해 개발됨, MDX-010, Medarex에 의해 개발되는 항-CTLA4 항체, MDX-060, Medarex에 의해 개발되는 항-CD30 항체, Medarex에 의해 개발되는 MDX-070, Medarex에 의해 개발되는 MDX-018, Oside®(IDM-1), 및 Medarex 및 Immuno-Designed Molecules에 의해 개발되는 항-Her2 항체, HuMax®-CD4, Medarex 및 Genmab에 의해 개발되는 항-CD4 항체, HuMax-IL15, Medarex 및 Genmab에 의해 개발되는 항-IL15 항체, CNTO 148, Medarex 및 Centocor/J&J에 의해 개발되는 항-TNF α 항체, CNTO 1275, Centocor/J&J에 의해 개발되는 항-사이토카인 항체, MOR101 및 MOR102, MorphoSys에 의해 개발되는 항-세포간 부착 분자-1(ICAM-1)(CD54) 항체, MOR201, MorphoSys에 의해 개발되는 항-섬유아세포 성장 인자 수용체 3(FGFR-3) 항체, Nuvion®(비실리주마브), Protein Design Labs에 의해 개발되는 항-CD3 항체, HuZAF®, Protein Design Labs에 의해 개발되는 항-감마 인터페론 항체, Protein Design Labs에 의해 개발되는 항-α5β1 인테그린, Protein Design Labs에 의해 개발되는 항-IL-12,

ING-1, Xoma에 의해 개발되는 항-Ep-CAM 항체, Xolair®(오말리주마브), Genentech 및 Novartis에 의해 개발되는 사람화된 항-IgE 항체, 및 MLN01, Xoma에 의해 개발되는 항-베타2 인테그린 항체가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 다른 실시형태에서, 치료제로는 KRN330(Kirin); huA33 항체(A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95(알파 V 인테그린, Centocor); MEDI-522(알파 Vβ3 인테그린, Medimmune); 볼로식시마브(알파 Vβ1 인테그린, Biogen/PDL); 사람 mAb 216(B 세포 당화된 에피토프, NCI); BiTE MT103(이특이적 CD19 x CD3, Medimmune); 4G7xH22(이특이적 B 세포 x Fc감마R1, Medarex/Merck KGa); rM28(이특이적 CD28 x MAPG, EP 특허 제EP1444268호); MDX447(EMD 82633)(이특이적 CD64 x EGFR, Medarex); 카투막소마브(removab)(이특이적 EpCAM x 항-CD3, Trion/Fres); 에르투막소마브(이특이적 HER2/CD3, Fresenius Biotech); 오레고보마브(OvaRex)(CA-125, ViRex); Rencarex®(WX G250)(탄산 무수화효소 IX, Willex); CNTO 888(CCL2, Centocor); TRC105(CD105 (endoglin), Tracon); BMS-663513(CD137 효능제, Bristol Myers Squibb); MDX-1342(CD19, Medarex); 시플리주마브(MEDI-507)(CD2, Medimmune); 오파투무마브(Humax-CD20)(CD20, Genmab); 리톡시마브(리톡산)(CD20, Genentech); 벨투주마브(hA20)(CD20, Immunomedics); 에프라투주마브(CD22, Amgen); 루밀릭시마브(IDEC 152)(CD23, Biogen); 류로모나브-CD3(CD3, Ortho); HuM291(CD3 fc 수용체, PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060(CD30, Medarex); MDX-1401(CD30, Medarex); SGN-30(CD30, Seattle Genentics); SGN-33(린투주마브)(CD33, Seattle Genentics); 자놀리무마브(HuMax-CD4)(CD4, Genmab); HCD122(CD40, Novartis); SGN-40(CD40, Seattle Genentics); Campath1h(알렘투주마브)(CD52, Genzyme); MDX-1411(CD70, Medarex); hLL1(EPB-1)(CD74.38, Immunomedics); 갈릭시마브(IDEC-144)(CD80, Biogen); MT293(TRC093/D93)(절단된 콜라겐, Tracon); HuLuc63(CS1, PDL Pharma); 이필리무마브(MDX-010)(CTLA4, Bristol Myers Squibb); 트레멜리무마브(Ticilimumab, CP-675,2)(CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1(마파투무마브)(DR4 TRAIL-R1 효능제, Human Genome Science /Glaxo Smith Kline); AMG-655(DR5, Amgen); 아포마브(DR5, Genentech); CS-1008(DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2(렉사투무마브)(DR5 TRAIL-R2 효능제, HGS); 세톡시마브(Erbix)(EGFR, Imclone); IMC-11F8, (EGFR, Imclone); 니모투주마브(EGFR, YM Bio); 파니투무마브(Vectabix)(EGFR, Amgen); 잘루투무마브(HuMaxEGFr)(EGFR, Genmab); CDX-110(EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); 아테카투무마브(MT201)(Epcam, Merck); 에드레콜로마브(Panorex, 17-1A)(Epcam, Glaxo/Centocor); MORAb-003(플레이트 수용체 a, Morphotech); KW-2871(강글리오시드 GD3, Kyowa); MORAb-009(GP-9, Morphotech); CDX-1307(MDX-1307)(hCGb, Celldex); 트라스투주마브(헤르셉틴)(HER2, Celldex); 페르투주마브(rhuMab 2C4)(HER2 (DI), Genentech); 아폴리주마브(HLA-DR 베타쇄, PDL Pharma); AMG-479(IGF-1R, Amgen); 항-IGF-1R R1507(IGF1-R, Roche); CP 751871(IGF1-R, Pfizer); IMC-A12(IGF1-R, Imclone); BIIB022(IGF-1R, Biogen); Mik-베타-1(IL-2Rb (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328(IL6, Centocor); 항-KIR(1-7F9)(살 세포 Ig-유사 수용체(KIR), Novo); Hu3S193(Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11(LTβR, Biogen); HuHMF1(MUC1, Antisoma/NCI); RAV12(N-결합된 탄수화물 에피토프, Raven); CAL(부갑상선 호르몬-관련된 단백질(PTH-rP), University of California); CT-011(PD1, CureTech); MDX-1106(ono-4538)(PD1, Medarex/Ono); MAb CT-011(PD1, Curetech); IMC-3G3(PDGFRα, Imclone); 바비톡시마브(포스파티딜세린, Peregrine); huJ591(PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591(PSMA, Cornell Research Foundation); GC1008(TGFβ (pan) 억제제(IgG4), Genzyme); 인플릭시마브(Remicade)(TNFα, Centocor); A27.15(트랜스페린 수용체, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3(트랜스페린 수용체, Salk Institute); 베바시주마브(아바스틴)(VEGF, Genentech); HuMV833(VEGF, Tsukuba Research Lab) PCT 공보 제WO/2000/034337호, University of Texas); IMC-18F1(VEGFR1, Imclone); IMC-1121(VEGFR2, Imclone)이 포함된다.

[0238] **B. DVD 분자의 작제:**

[0239] 이원 가변 도메인 면역글로불린 (DVD-Ig) 분자는 2개 상이한 모 mAb 기원의 2개의 상이한 경쇄 가변 도메인(VL)이 직접적으로 탠덤으로 연결되거나 재조합 DNA 기술에 의해 짧은 링커를 통해 연결되고, 이어서, 경쇄 불변 도메인, 및 임의로 Fc 영역이 연결되도록 디자인한다. 유사하게, 중쇄는 탠덤으로 연결된 2개의 상이한 중쇄 가변 도메인(VH)에 이어서 불변 도메인 CH1 및 Fc 영역을 포함한다(도 1a).

[0240] 가변 도메인은 상기된 방법중 어느 하나에 의해 생성된 모 항체로부터 재조합 DNA 기술을 사용하여 수득될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 가변 도메인은 무린 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인이다. 또 다른 실시형태에서, 가변 도메인은 CDR 이식되거나 사람화된 가변 중쇄 또는 경쇄 도메인이다. 하나의 실시형태에서, 가변 도메인은 사람 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인이다.

[0241] 하나의 실시형태에서, 제1 및 제2 가변 도메인은 재조합 DNA 기술을 사용하여 서로 직접적으로 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 가변 도메인은 링커 서열을 통해 연결된다. 하나의 실시형태에서, 2개의 가변 도메인들이

연결된다. 3개 이상의 가변 도메인은 또한 직접적으로 또는 링커 서열을 통해 연결될 수 있다. 가변 도메인은 동일한 항원에 결합할 수 있거나 상이한 항원에 결합할 수 있다. 본 발명의 DVD 분자는 수용체의 리간드 결합 도메인, 효소의 활성 도메인과 같은 하나의 면역글로불린 가변 도메인 및 하나의 비-면역글로불린 가변 도메인을 포함할 수 있다. DVD 분자는 또한 2개 이상의 비-Ig 도메인을 포함할 수 있다.

[0242] 링커 서열은 단일 아미노산 또는 폴리펩타이드 서열일 수 있다. 하나의 실시형태에서, 링커 서열은 AKTTPKLEEGEFSEAR(서열번호 1); AKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 2); AKTTPKLGG(서열번호 3); SAKTTPKLGG(서열번호 4); SAKTTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPTVS(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAA(G₄S)₄(서열번호 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSVFIFPP(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP(서열번호 16); AKTTPP(서열번호 17); AKTTPPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP(서열번호 22), GGGSGGGSGGGSGGS(서열번호 23); GENKVEYAPALMALS(서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS(서열번호 25); GHEAAAVMQVQYPAS(서열번호 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP(서열번호 27); 및 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP(서열번호 28)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 링커 서열의 선택은 여러 Fab 분자의 결정 구조 분석을 기초로 한다. Fab 또는 항체 분자 구조에서 가변 도메인과 CH1/CL 불변 도메인 간에는 천연 유연성 연결이 있다. 당해 천연 연결체는 약 10 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함하고, 이중 4 내지 6개의 잔기는 V 도메인의 C-말단으로부터 유래된 것이고 4 내지 6개의 잔기는 CL/CH1 도메인의 N-말단으로부터 유래된 것이다. 본 발명의 DVD Ig는 각각 DVD-Ig의 경쇄 및 중쇄에서 링커로서 CL 또는 CH1의 N-말단의 5 내지 6개의 아미노산 잔기 또는 11개 내지 12개의 아미노산 잔기를 사용하여 제조된다. CL 또는 CH1 도메인의 N-말단 잔기, 특히 처음 5개 내지 6개의 아미노산 잔기는 강한 2차 구조 없이 루프 형태를 취함에 따라서 2개의 가변 도메인간의 유연성 링커로서 작용할 수 있다. CL 또는 CH1 도메인의 N-말단 잔기, 특히 처음 5 내지 6개의 아미노산 잔기는 강한 2차 구조 없이 루프 형태를 취함에 따라서 2개의 가변 도메인간에 유연성 링커로서 작용할 수 있다. CL 또는 CH1 도메인의 N-말단 잔기는 천연 연장의 가변 도메인이고 이들은 Ig 서열의 일부임으로 링커 및 연결부로부터 잠재적으로 유발되는 면역원성을 크게 감소시킨다.

[0243] 또 다른 링커 서열은 임의의 길이의 CL/CH1 도메인의 임의의 서열, 예를 들면, CL/CH1 도메인의 처음 5 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있지만 CL/CH1 도메인의 모든 잔기를 포함하지는 않는다. 경쇄 링커는 C_κ 또는 C_λ로부터 비롯될 수 있고; 중쇄 링커는 C_γ1, C_γ2, C_γ3, C_γ4, C_α1, C_α2, C_δ, C_ε, 및 C_μ를 포함하는 임의의 이소형의 CH1으로부터 비롯될 수 있다. 링커 서열은 또한 Ig-형 단백질 (예를 들면, TCR, FcR, KIR)과 같은 기타 단백질; G/S 기본 서열 (예를 들면, G4S 반복체, 서열번호 29); 힌지 영역 유래 서열 및 기타 단백질 기원의 기타 천연 단백질로부터 유래할 수 있다.

[0244] 하나의 실시형태에서, 불변 도메인은 재조합 DNA 기술을 사용하여 2개의 연결된 가변 도메인에 연결한다. 하나의 실시형태에서, 연결된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 서열은 중쇄 불변 도메인에 연결하고 연결된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 서열은 경쇄 불변 도메인에 연결한다. 하나의 실시형태에서, 불변 도메인은 각각 사람 중쇄 불변 도메인 및 사람 경쇄 불변 도메인이다. 하나의 실시형태에서, DVD 중쇄는 추가로 Fc 영역에 연결한다. Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Fc 영역은 사람 Fc 영역이다. 또 다른 실시형태에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 또는 IgD기원의 Fc 영역을 포함한다.

[0245] 또 다른 실시형태에서, 2개의 중쇄 DVD 폴리펩타이드 및 2개의 경쇄 DVD 폴리펩타이드는 조합되어 DVD-Ig 분자를 형성한다. 표 2는 질환을 치료하기 위해, 예를 들면, 암을 치료하기 위해 유용한 표적에 대한 예시적인 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열을 열거한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은 임의의 배향으로 표 2에 열거된 VH 및/또는 VL 영역중 2개 이상을 포함하는 DVD를 제공한다.

표 2

DVD-Ig를 생성하기 위한 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열 목록

서열 번호	고유 ID	단백질 영역	서열 1234567890123456789012345678901234567890
30	E26.13VH	VH IL-β (서열 1)	EVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCSASGFIISRVDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLFL QMDSLRLPEDTGVYFCARGGVTKGYFDVWGQGTPTVTVSS
31	E26.13VL	VL IL-β (서열 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPE EDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTCLKQITR
32	E26.35VH	VH IL-β (서열 2)	EVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCSASGFIISRVDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLFL QMDSLRLAEDTAVYYCARGGVTKGYFDVWGQGTPTVTVSS
33	E26.35VL	VL IL-β (서열 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPE EDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTCLKQITR
34	1B12.1VH	VH IL-β (서열 3)	EVQLQESGPGFLVKPSETLSLTCTVSGFSLSDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRITISKDNKSKQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKQRTLWGVDLYGMDYWGQGTTLTV SS
35	1B12.1VL	VL IL-β (서열 3)	DTQVTQSPSSLSASVGDRTTITCITSTDIDVDMNHYQQKP GKPPKLLISQGNLRLPGVPSRFSSSGSGTDFTFTISLQPE EDFATYYCLQSDNLLPLTFGQGTCLKLEIKR
36	1B12.3VH	VH IL-β (서열 4)	EVQLQESGPGFLVKPSETLSLTCTVSGFSLSDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRITISKDNKSKQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKQRTLWGVDLYGMDYWGQGTTLTV SS
37	1B12.3VL	VL IL-β (서열 4)	DTVVTQSPAFLSVTPGEEKVTITCITSTDIDVDMNHYQQKP DQPPKLLISQGNLRLPGVPSRFSSSGSGTDFTFTISLEA EDAATYYCLQSDNLLPLTFGQGTCLKLEIKR
38	1B12.6VH	VH IL-β (서열 5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSDYGVSWIRQA PGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRITISKDNKSKTVYL QMNSLRAEDTAVYYCAKQRTLWGVDLYGMDYWGQGTTLTV SS
39	1B12.6VL	VL IL-β (서열 5)	ETTVTQSPSSLSASVGDRTTITCITSTDIDVDMNHYQQKP GKPPKLLISQGNLRLPGVPSRFSSSGSGTDFTFTISLQPE EDFATYYCLQSDNLLPLTFGQGTCLKLEIKR
40	3D12 10/15VH	VH IL-α (서열 3)	EVQLVQSGAEVKKPGVSVKVSCKASGYFTFTYGMHWVRQA PGQGLEWMGWINTYTGESTYADDFQGRVTFTLDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYFCARGIYYGSSYAMNYWGQGTITVTV SS
41	3D12 10/15VL	VL IL-α (서열 3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNMLNHYQQKP GKTPKLLIYYTSRLYPGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPE EDIATYFCQQGKTLTPYAFGQGTCLKLEIKR
42	3D12.16VH	VH IL-α (서열 2)	EQQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTYGMHWVRQA PGQDLERMAWINTYTGESTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYFCARGIYYGSSYAMDYWGQGTITVTV SS
43	3D12.16VL	VL IL-α (서열 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNMLNHYQQKP GKTPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPE EDIATYFCQQGKTLTPYAFGQGTCLKLEIKR
44	3D12.8VH	VH IL-α (서열 1)	EQQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYFTFTYGMHWVRQA PGQDLERMAWINTYTGESTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAY LQISSLRKAEDTAVYFCARGIYYGSSYAMDYWGQGTITVTV SS

[0246]

서열 번호	고유 ID	단백질 영역	서열 1234567890123456789012345678901234567890
45	3D12.8VL	VL IL-α (서열 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNMLNHYQQKP GKTPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPE EDIATYFCQQGKTLTPYAFGQGTCLKLEIKR
46	3D12r16VH	VH IL-α (서열 4)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFKYYGMHWVRQA PGQGLERMGWINTYTGQSTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYFCARDIYYGSDFAMDYWGQGTITVTV SS
47	3D12r16VL	VL IL-α (서열 4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNMLNHYQQKP GKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPE EDIATYFCQQGKTAPYTFGQGTCLKLEIKR

[0247]

[0248]

특정 표적에 결합하는 특이적 DVD-Ig 분자 및 이를 제조하는 방법의 상세한 설명은 하기의 실험부에서 제공된다.

[0249]

C. DVD 단백질의 제조

[0250]

본 발명의 결합 단백질은 당업계에 공지된 임의의 다수의 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 숙주 세포로부터 발현되고 여기서, DVD 중쇄 및 DVD 경쇄를 암호화하는 발현 벡터는 표준 기술에 의해 숙주 세포로 형질

감염된다. "형질감염"이란 용어의 다양한 형태는 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에 외인성 DNA를 도입시키는데 일반적으로 사용되는 다양한 기술, 예를 들면 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-텍스트란 형질감염 등을 포함하는 것으로 간주한다. 본 발명의 DVD 단백질은 원핵생물 숙주 세포 또는 진핵생물 숙주 세포에서 발현시킬 수 있지만, 진핵생물 예를 들면, 포유동물 숙주 세포에서의 DVD 단백질의 발현이 바람직한데, 그 이유는 이러한 진핵생물 세포(특히 포유동물 세포)가 적당한 폴딩을 이루어 면역학적 활성인 DVD 단백질을 회합(assembly)하여 분비하는데 원핵생물 세포보다 더 적합하기 때문이다.

[0251] 본 발명의 재조합 항체를 발현하기에 바람직한 포유동물 숙주 세포에는 중국 햄스터 난소(CHO 세포)(예를 들면, Kaufman and Sharp (1982) Mol.Biol. 159:601-621에 기술된 바와 같은 DHFR 선택성 마커와 함께 사용된, Urlaub and Chasin(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220에 기술된 dhfr-CHO 세포), NS0 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 및 PER.C6 세포가 있다. DVD 단백질을 암호화하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포에 도입되면, DVD 단백질은 숙주 세포에서 DVD 단백질이 발현되기에 또는 바람직하게는 숙주 세포가 증식되는 배양 배지로 DVD 단백질이 분비되기에 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양하여 생산한다. DVD 단백질은 표준 단백질 정제법을 사용하여 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

[0252] 본 발명의 DVD 단백질의 재조합 발현을 위해 바람직한 시스템에서, DVD 중쇄 및 DVD 경쇄 둘다를 암호화하는 재조합 발현 벡터는 인산칼슘 매개 형질감염에 의해 dhfr-CHO 세포로 도입된다. 재조합 발현 벡터내에서, DVD 중쇄 및 경쇄는 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 인자에 각각 작동적으로 결합되어 상기 유전자의 높은 전사율을 유도한다. 또한, 재조합 발현 벡터는 DHFR 유전자를 보유하며, 이 유전자는 메토타렉세이트 선별/증폭을 통해 상기 벡터로 형질감염된 CHO 세포를 선별할 수 있게 해준다. 선별된 형질전환 숙주 세포는 DVD 중쇄 및 경쇄를 발현할 수 있도록 배양하고, 이러한 배양 배지로부터 완전한 DVD를 회수한다. 재조합 발현 벡터 제조, 숙주 세포 형질감염, 형질전환체 선별, 숙주 세포 배양 및 배양 배지로부터 DVD의 회수에는 표준 분자 생물학 기술을 사용한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 숙주 세포를 본 발명의 DVD 단백질이 합성될 때까지 적당한 배양 배지에서 배양하여 본 발명의 DVD 단백질을 합성하는 방법을 제공한다. 이 방법은 추가로 배양 배지로부터 DVD 단백질을 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0253] DVD-Ig의 중요한 특징은 이것이 통상적인 항체와 유사한 방법으로 제조되고 정제될 수 있다는 것이다. DVD-Ig의 제조는 목적하는 이원-특이적 활성을 갖는 균질의 단일 주요 생성물을 유도하고 불변 영역의 임의의 서열의 변형 또는 임의의 종류의 화학적 변형이 필요 없다. "이특이적", "다특이적" 및 "다특이적 다가"의 완전한 길이의 결합 단백질을 제조하기 위해 이전에 기재된 방법은 단일의 주요 생성물을 유도하지 못하고 대신 어셈블리된 불활성, 단일 특이적, 다특이적, 다가, 완전한 길이의 결합 단백질 및 다가의 완전한 길이의 결합 단백질 및 상이한 결합 부위가 조합된 다가의 완전한 길이의 결합 단백질을 유도한다. 일례로서, 문헌[참조: PCT 공보 제 W02001/077342호]에 기재된 디자인을 기초로, 16개의 가능한 중쇄 및 경쇄의 조합이 있다. 결과적으로 단백질의 단지 6.25%만이 목적하는 활성 형태에 있을 가능성이 있으며, 다른 15개 조합과 비교하여 주요 생성물 또는 단일 1차 생성물이 아니다. 전형적으로 대규모 제조에 사용되는 표준 크로마토그래피 기술을 사용한 불활성 및 부분 활성 형태의 단백질로부터 완전한 활성 형태의 단백질의 분리는 아직 입증되어야만 한다.

[0254] 놀랍게도, 본 발명의 "이원 특이적 다가 완전한 길이의 결합 단백질"의 디자인은 주로 목적하는 "이원-특이적 다가의 완전한 길이의 단백질"로 어셈블리하는 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 유도한다.

[0255] 어셈블리되고 발현된 이원 가변 도메인 면역글로불린 분자중 50% 이상, 바람직하게는 75% 이상 및 보다 바람직하게는 90% 이상은 목적하는 이원-특이적 4가 단백질이다. 본 발명의 당해 양상은 특히, 본 발명의 상업적 용도를 증진시킨다. 따라서, 본 발명은 "이원-특이적 4가 완전한 길이의 결합 단백질"의 단일 주요 생성물을 유도하는 단일 세포에서 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시키기 위한 방법을 포함한다.

[0256] 본 발명은 단일 세포에서 "이원 특이적 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 "주요 생성물"을 유도하는, 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시키기 위한 바람직한 방법을 제공하고 여기서, "주요 생성물"은 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 포함하는 50% 초과와 모든 어셈블리된 단백질이다.

[0257] 본 발명은 단일 세포에서 "이원 특이적 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 "주요 생성물"을 유도하는, 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시키기 위한 바람직한 방법을 제공하고 여기서, "주요 생성물"은 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 포함하는 75% 초과와 모든 어셈블리된 단백질이다.

[0258] 본 발명은 단일 세포에서 "이원 특이적 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 "주요 생성물"을 유도하는, 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시키기 위한 바람직한 방법을 제공하고 여기서, "주요 생성

물"은 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 포함하는 90% 초과와 모든 어셈블리된 단백질이다.

[0259] **II. 유도체화된 DVD 결합 단백질**

[0260] 일 실시형태는 본 발명의 결합 단백질이 유도체화되거나 또는 다른 기능성 분자(예를 들면, 다른 펩타이드 또는 단백질)에 결합된 표지된 결합 단백질을 제공한다. 예를 들면, 본 발명의 표지된 결합 단백질은 본 발명의 결합 단백질(화학적 커플링, 유전자 융합, 비공유 연합 등에 의해)을 하나 이상의 다른 분자 실체, 예를 들면 다른 항체(예, 이특이적 항체 또는 디아바디), 검출성 제제, 세포독성제, 약제 및/또는 다른 분자와 결합 단백질의 연합을 매개할 수 있는 단백질이나 펩타이드(예를 들면, 스트렙타비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그) 등에 기능적으로 연결시켜 수득할 수 있다.

[0261] 본 발명의 결합 단백질이 유도체화될 수 있는 유용한 검출성 제제에는 형광 화합물이 포함된다. 검출성 형광 제제의 예에는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 피코에리트린 등이 있다. 또한, 결합 단백질은 검출성 효소, 예를 들면 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 글루코스 옥시다제 등에 의해 유도체화될 수 있다. 결합 단백질이 검출성 효소로 유도체화된 경우에는, 효소가 검출성 반응 산물을 생산하기 위해 사용하는 추가 시약을 첨가하여 검출한다. 예를 들면, 검출성 제제 서양고추냉이 퍼옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘의 첨가는 검출가능한 발색 반응 생성물을 유도한다. 결합 단백질은 또한 비오틴으로 유도체화될 수 있고, 이 경우 아비딘이나 스트렙타비딘 결합의 간접 측정을 통해 검출한다.

[0262] 본 발명의 다른 실시형태는 결정화된 결합 단백질, 및 이러한 결정을 포함하는 제형 및 조성물을 제공한다. 일 실시형태에서, 결정화된 결합 단백질은 이에 대응하는 가용성 결합 단백질보다 생체내 반감기가 더 길다. 또 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 결정화 후 생물학적 활성을 보유한다.

[0263] 본 발명의 결정화된 결합 단백질은 당업계에 공지되어 있고 PCT 공개 제WO 02072636에 개시된 바와 같이 생산할 수 있다.

[0264] 본 발명의 다른 실시형태는 항체 또는 이의 항원 결합부가 하나 이상의 탄수화물 잔기를 포함하는 당화된 결합 단백질을 제공한다. 생체내 생산된 초기 단백질은 해독후 변형으로 알려진 추가 프로세싱으로 처리될 수 있다. 구체적으로, 당(글리코실) 잔기는 당화로 알려진 방법에 의해 효소적으로 첨가될 수 있다. 그 결과 수득되는 공유 결합된 올리고사카라이드 측쇄를 보유한 단백질은 당화된 단백질 또는 당단백질로서 공지되어 있다. 항체는 가변성 도메인 뿐만 아니라 Fc 도메인에 하나 이상의 탄수화물 잔기를 갖는 당단백질이다. Fc 도메인내 탄수화물 잔기는 Fc 도메인의 이펙터 기능에 중요한 효과를 나타내고 항체의 항원 결합 또는 반감기에 최소의 효과를 나타낸다(Jefferis (2005) Biotechnol. Prog. 21:11-16). 대조적으로, 가변성 도메인의 당화는 항체의 항원 결합 활성에 효과를 가질 수 있다. 가변성 도메인내 당화는 항체 결합 친화성에 대해 음성 효과를 나타낼 수 있고 이는 입체 장애 때문이거나(Co et al. (1993) Mol. Immunol. 30: 1361-1367), 항원에 대한 친화성을 증가시키기 때문이다(Wallick et al. (1988) Exp. Med. 168:1099-1109; Wright et al. (1991) EMBO J. 10: 2717-2723).

[0265] 본 발명의 한 양상은 결합 단백질의 O- 또는 N- 결합된 당화 부위가 돌연변이된 당화 부위 돌연변이체를 제조하는 것에 관한 것이다. 당업자는 널리 공지된 표준 기술을 사용하여 당해 돌연변이체를 제조할 수 있다. 생물학적 활성을 보유하지만 결합 활성이 증가되거나 감소된 당화 부위 돌연변이체는 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0266] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합부의 당화는 변형된다. 예를 들면, 당화되지 않은 항체가 제조될 수 있다(즉, 항체는 당화되어 있지 않다). 항원에 대한 항체의 특이성을 증가시키기 위해 당화가 변형될 수 있다. 당해 당화 변형은 예를 들면, 항체 서열내 하나 이상의 당화 부위를 변형시킴에 의해 달성될 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 아미노산이 치환되어 하나 이상의 가변 영역 당화 부위가 제거됨으로써 그 부위에서의 당화가 제거된다. 당해 당화 제거는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 당해 방법은 문헌[PCT 공개 제WO2003016466, 및 미국 특허 제5,714,350 및 6,350,861]에 상세하게 추가로 기재되어 있다.

[0267] 또한, 본 발명의 변형된 결합 단백질은 푸코실 잔기의 양이 감소된 저푸코실화된 항체(문헌참조: Kanda et al. (2007) J. Biotechnol. 130(3):300-310.) 또는 GlcNAc 구조의 2등분이 증가된 항체와 같은 변형된 유형의 당화를 가질 수 있다. 당해 변형된 당화 패턴은 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 것으로 입증되었다. 당해 탄수화물 변형은 예를 들면, 변형된 당화 기구를 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현시켜 달성될 수 있다. 변형된 당화 기구를 갖는 세포는 당업계에 보고되어 있고 본 발명의 재조합 항체를 발현시켜 변형된 당화를 갖는 항체를 제조하기 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다[Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana

et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, 및 유럽 특허 제EP 1,176,195호; PCT 공보 제WO 03/035835호 및 제WO 99/5434280호].

[0268] 단백질 당화는 당해 단백질의 아미노산 서열, 및 단백질이 발현되는 숙주 세포에 따라 달라진다. 다른 유기체는 다른 당화 효소(예를 들면, 글리코실트랜스퍼라제 및 글리코시다제)를 생산하고, 이용할 수 있는 기질(뉴클레오타이드 당)이 다를 수 있다. 이러한 요인으로 인해, 단백질 당화 패턴 및 글리코실 잔기의 조성은 특정 단백질이 발현되는 숙주계에 따라 다를 수 있다. 본 발명에 유용한 글리코실 잔기는 글루코스, 갈락토스, 만노스, 푸코스, n-아세틸글루코사민 및 시알산 등을 이에 국한됨이 없이 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 이러한 당화된 결합 단백질은 당화 패턴이 사람이도록 글리코실 잔기를 포함하는 것이 바람직하다.

[0269] 당업자에게 공지된 바와 같이, 상이한 단백질 당화는 상이한 단백질 특징을 제공할 수 있다. 예를 들면, 효모와 같은 미생물 숙주에서 생산되고 효모 내인성 경로를 이용하여 당화된 치료 단백질의 효능은 CHO 세포주와 같은 포유동물 세포에서 발현된 동일 단백질 효능에 비해 저하될 수 있다. 이러한 당단백질은 또한 사람 중에서 면역원성일 수 있고 투여 후 생체내 반감기가 감소될 수 있다. 사람 및 다른 동물에 존재하는 특정 수용체는 특정 당화 잔기를 인식하고 혈류로부터 그 단백질의 신속 제거를 촉진할 수 있다. 다른 부작용으로, 단백질 폴딩, 용해성, 프로테아제에 대한 민감성, 트래픽킹(trafficking), 수송, 구획화, 분비, 다른 단백질이나 인자에 의해 인식, 항원성 또는 알레르기원성 등의 변화를 포함할 수 있다. 따라서, 당업자는 특정 조성과 당화 패턴을 가진 치료 단백질, 예를 들면 사람 세포 또는 의도된 피검체 동물의 중 특이적 세포에서 생산되는 것과 동일하거나 적어도 유사한 당화 조성 및 패턴을 가진 치료 단백질을 선호할 수 있다.

[0270] 숙주 세포와 상이한 당화된 단백질의 발현은 숙주 세포의 유전자 변형을 통해 이중 당화 효소를 발현하도록 함으로서 수득될 수 있다. 사람 단백질 당화를 나타내는 항체 또는 항원 결합부는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 당업자라면 제조할 수 있다. 예를 들면, 효모 균주는 비자연발생의 당화 효소를 발현하도록 유전자 변형되어, 이 효모 균주에서 생산된 당화된 단백질(당단백질)이 동물 세포, 특히 사람 세포에서 생산된 것과 동일한 단백질 당화가 수득된 바 있다(미국 특허 제7,449,308호 및 제7,029,872호 및 PCT 공보 제WO2005100584호).

[0271] 결합 단백질 외에도, 본 발명은 또한 본 발명의 당해 결합 단백질에 특이적인 항-이디오타입(항-Id) 항체에 관한 것이다. 항-Id 항체는 일반적으로 또 다른 항체의 항원 결합 영역과 연합된 유일한 결정인자를 인지하는 항체이다. 항-Id는 결합 단백질 또는 CDR 함유 영역으로 동물을 면역화시켜 제조될 수 있다. 면역화된 동물은 면역화 항체의 이디오타입 결정인자를 인지하고 이에 응답하여 항-Id 항체를 생산한다. 이는 DVD-Ig 분자로 2개 이상의 모 항체를 혼입하여 항-이디오타입 항체를 제조하기가 수월하고 당업계에 널리 공지된 방법(예를 들면, BIAcore, ELISA)에 의해 결합 연구를 확인하여 각각의 모 항체의 이디오타입에 대해 특이적인 항-이디오타입 항체가 또한 DVD-Ig와 관련하여 당해 이디오타입(예를 들면, 항원 결합 부위)을 인지함을 입증하기가 수월해짐은 명백하다. DVD-Ig의 2개 이상의 항원 결합부 각각에 대해 특이적인 항-이디오타입 항체는 환자 혈청에서 사람 DVD-Ig의 DVD-Ig 농도를 측정하기 위해 이상적인 시약을 제공한다. DVD-Ig 농도 분석은 "샌드위치 분석 ELISA 포맷"을 사용하여 확립될 수 있고 여기에 사용되는 제1 항원 결합 영역에 대한 항체는 고품상(예를 들면, BIAcore 칩, ELISA 플레이트 등)상에 피복되고 세정 완충액으로 세정되고, 혈청 샘플로 항온처리하고 또 다른 세정 단계를 수행하고 궁극적으로 또 다른 항원 결합 부위에 대한 또 다른 항-이디오타입 항체와 항온처리하고 그 자체를 결합 반응의 정량을 위해 효소로 표지시킨다. 하나의 실시형태에서, 2개 이상의 상이한 결합 부위를 갖는 DVD-Ig에 대해, 최외곽 부위(불변 영역으로부터 가장 원거리 및 근거리)에 대한 항-이디오타입 항체는 사람 혈청에서 DVD-Ig 농도를 결정하는 것을 도와줄 뿐만 아니라 생체내 분자의 통합성을 입증한다. 각각의 항-Id 항체는 또한 또 다른 동물에서 면역 반응을 유도하기 위한, 소위 항-항-Id 항체를 제조하는 "면역원"으로서 사용될 수 있다.

[0272] 또한, 목적하는 단백질은 다양한 당화 효소를 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포의 라이브러리를 사용하여 발현시킬 수 있음을 당업자라면 잘 알고 있을 것이며, 이에 따라 상기 라이브러리의 구성 숙주 세포는 변형된 당화 패턴을 가진 당해의 단백질을 생산한다. 그 다음, 당업자는 새로운 특정 당화 패턴을 가진 당해의 단백질을 선별하여 분리할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 특별하게 선별된 신규 당화 패턴을 가진 단백질은 생물학적 성질이 개선되거나 변경된 단백질인 것이 바람직하다.

[0273] III. DVD-Ig의 용도

[0274] 2개 이상의 항원에 결합하는 성질이 있다면, 본 발명의 결합 단백질은 통상의 면역분석법, 예를 들면 효소 결합된 면역흡착분석법(ELISA), 방사선면역분석법(RIA) 또는 조직 면역조직화학법을 통해 항원(예를 들면 혈청이나

혈장과 같은 생물학적 샘플에서)을 검출하는데 사용할 수 있다. DVD-Ig는 결합 또는 미결합된 항체의 검출을 촉진시키기 위해 직간접적으로 검출성 물질로 표지화된다. 적당한 검출성 물질에는 각종 효소, 보결분자족, 형광 물질, 발광 물질 및 방사능 물질이 있다. 적당한 효소의 예에는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스터라제가 있고; 적당한 보결분자족 복합체의 예에는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 있으며; 적당한 형광 물질의 예에는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린이 있고; 발광 물질의 예에는 루미놀이 있으며; 적당한 방사능 물질의 예에는 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho 또는 ^{153}Sm 이 있다.

- [0275] 본 발명의 결합 단백질은 시험관내 및 생체내 모두에서 항원의 활성을 중화시킨다. 따라서, 당해 DVD-Ig를 사용하여, 예를 들면, 항원을 함유하는 세포 배양물에서, 사람 피검체 또는 본 발명의 결합 단백질이 교차 반응하는 항원을 갖는 기타 포유동물 피검체에서 항원 활성을 억제할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 항원 활성이 유해한 질환 또는 장애를 앓는 피검체에서 항원 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 결합 단백질은 치료 목적을 위해 사람 피검체에 투여될 수 있다.
- [0276] 용어 "항원 활성이 유해한 장애"는 장애를 앓는 피검체에서 항원의 존재가 장애의 병리에 관여하거나 장애의 악화에 기여하는 인자이거나 의심되는 것으로 나타나는 질환 및 기타 장애를 포함한다. 따라서, 항원 활성이 유해한 장애는 항원 활성의 감소가 장애의 증상 및/또는 진행을 완화시킬 것으로 예상되는 장애이다. 당해 장애는 예를 들면, 장애를 앓는 피검체의 생물학적 유체중에 항원 농도를 증가시켜(예를 들면, 피검체의 혈청, 혈장, 윤활액중의 항원 농도의 증가) 입증될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질로 치료될 수 있는 장애의 비제한적인 예는 하기에서 및 본 발명의 항체의 억제학적 조성물에 관한 부분에서 논의되는 장애를 포함한다.
- [0277] 본 발명의 DVD-Ig는 하나의 항원 또는 다중 항원에 결합할 수 있다. 당해 항원은 본원에 참조로서 인용되는 하기의 데이터베이스에 열거된 표적물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들 표적 데이터베이스는 하기와 같은 목록을 포함한다:
- [0278] 치료학적 표적 (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp>);
- [0279] 사이토카인 및 사이토카인 수용체 (<http://www.cytokinewebfacts.com/>, <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, and
- [0280] http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html);
- [0281] 케모카인 (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>);
- [0282] 케모카인 수용체 및 GPCRs (<http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html>, <http://www.gpcr.org/7tm/>);
- [0283] 올팩터리 수용체 (<http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp>);
- [0284] 수용체 (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm>);
- [0285] 암 표적 (<http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi>);
- [0286] 잠재적 항체 표적으로서 분비된 단백질 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>);
- [0287] 단백질 키나제 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>), 및
- [0288] 사람 CD 마커 (http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf) 및 (Zola (2005) Blood 106:3123-6).
- [0289] DVD-Ig는 효능/안정성을 증진시키고/시키거나 환자의 적용 범위를 증가시키기 위해 2개의 상이한 표적을 동시에 차단시키는 치료제로서 유용하다. 당해 표적은 가용성 표적(예를 들면, TNF) 및 세포 표면 수용체 표적(예를 들면, VEGFR 및 EGFR)을 포함할 수 있다. 이것은 또한 암 치료를 위해 종양 세포와 T세포(예를 들면, Her2 및 CD3)간에, 또는 자가면역/이식을 위해 자가반응성 세포와 이펙터 세포간에 또는 임의의 특정 질환에서 발병 세포를 제거하기 위한 임의의 표적 세포와 이펙터 세포간에 제지시킨 세포독성을 유도하는데 사용될 수 있다.
- [0290] 또한, 동일한 수용체 상의 2개의 상이한 에피토프들을 표적으로 하도록 지시되는 경우, DVD-Ig는 수용체 클러스터링 및 활성화를 유도하는데 사용될 수 있다. 이는 효능제 및 길항제 항-GPCR 치료제를 제조하는데 이점을 가

질 수 있다. 이러한 경우, 클러스터링/신호전달(2개의 세포 표면 분자) 또는 신호전달(1개의 분자)을 위해, DVD-Ig를 사용하여 하나의 세포 상의 2개의 상이한 에피토프들(루프 영역 및 세포의 도메인 둘 다에 대한 에피토프 포함)을 표적으로 할 수 있다. 유사하게, DVD-Ig 분자는 CTLA-4 라이게이션, 및 CTLA-4 세포의 도메인의 2개의 상이한 에피토프들(또는 동일한 에피토프의 2개의 카피)을 표적으로 함으로써 음성 신호를 유발하도록 지시되어 면역 반응이 하향조절될 수 있다. CTLA-4는 다수의 면역학적 장애의 치료학적 처치를 위한 임상학적으로 적합한 표적이다. CTLA-4/B7 상호작용은 세포 주기 진행, IL-2 생산, 및 활성화에 따른 T 세포 증식을 약화시킴으로써 T 세포 활성화를 음성 조절하고, CTLA-4(CD152) 관여는 T-세포 활성화를 하향-조절하고 면역 내성의 유도를 촉진할 수 있다. 그러나, CTLA-4의 효능제 항체 관여에 의해 T 세포 활성화를 약화시키는 전략은 CTLA-4 활성화가 라이게이션을 요구하므로 성공적이지 않았다. CTLA-4/B7의 분자 상호작용은 결정 구조 분석(Stamper (2001) Nature 410:608)에 의해 입증된 바와 같이 "스큐드 지퍼(skewed zipper)"로 존재한다. 그러나, 항-CTLA-4 mAb를 포함하여 라이게이션 성질을 갖는 현재 이용가능한 CTLA-4 결합 시약은 없다. 이러한 문제점을 해결하고자 하는 몇몇 시도는 존재하였다. 한 경우에서, 세포 구성원-결합 단일쇄 항체가 생성되었고, 이는 마우스에서의 동종이식 거부를 현저하게 억제하였다(Hwang (2002) J. Immunol. 169:633). 별도의 경우에서, CTLA-4에 대한 인공 APC 표면-결합된 단일-쇄 항체가 생성되었고, T 세포 반응을 약화시키는 것으로 입증되었다(Griffin (2000) J. Immunol. 164:4433). 두 경우 모두에서, 인공 시스템에서 밀접하게 국소화된 구성원-결합된 항체에 의해 CTLA-4 라이게이션이 달성되었다. 이들 실험은 CTLA-4 음성 신호전달을 유발함으로써 면역 하향-조절을 위한 개념 증명을 제공하지만, 이들 보고에서 사용된 시약은 치료 용도에 적합하지 않다. 이 때문에, CTLA-4 라이게이션은 CTLA-4 세포의 도메인의 2개의 상이한 에피토프들(또는 동일한 에피토프의 2개의 카피)을 표적화하는 DVD-Ig 분자를 사용함으로써 달성될 수 있다. 그 이유는 IgG의 2개의 결합 부위에 걸친 거리인 150 내지 170Å이 CTLA-4의 활성 라이게이션(2개의 CTLA-4 동종이량체 사이에서 30 내지 50Å)에 과도하게 크기 때문이다. 그러나, DVD-Ig(1개의 아암) 상의 2개의 결합 부위 사이의 거리는 훨씬 더 짧고, 또한 CTLA-4의 적절한 라이게이션을 허용하는 30 내지 50Å의 범위 내이다.

[0291] 유사하게, DVD-Ig는 세포 표면 수용체 복합체의 2개의 상이한 구성원(예를 들면, IL-12R 알파 및 베타)을 표적으로 할 수 있다. 또한, DVD-Ig는 CR1 및 가용성 단백질/병원체를 표적으로 하여 표적 가용성 단백질/병원체의 신속한 제거를 행할 수 있다.

[0292] 또한, 본 발명의 DVD-Ig는 세포내 전달(내재화 수용체 및 세포내 분자를 표적화하는), 및 뇌 내부로의 전달(예를 들면, 혈뇌 장벽을 통과하기 위해 트랜스페린 수용체 및 CNS 질환 매개체를 표적화)을 포함하는, 조직-특이적 전달(국소 PK가 증진됨에 따라 효능을 보다 증진시키고/시키거나 독성을 저하시키기 위한 조직 마커 및 질환 매개체를 표적화함)을 위해 사용될 수 있다. DVD-Ig는 또한 항원의 비중화 에피토프에 결합함으로써 특정 위치로 항원을 전달하고 또한 항원의 반감기를 증가시키는 캐리어 단백질로서 작용할 수 있다. 또한, DVD-Ig는 환자에게 이식된 의료 장치에 물리적으로 연결되거나 이들 의료 장치를 표적화하도록 디자인될 수 있다(문헌참조: Burke et al. (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58(3):437-446; Surface coating for biological activation and functionalization of medical devices(Hidebrand et al. (2006) Surface coatings Technol. 200(22-23):6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis(Wu et al. (2006) Biomaterials 27(11):2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices(Marques et al. Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2005), pp. 377-397). 간략하게, 적당한 유형의 세포를 의학적 이식체 부위에 지시함으로써 정상적인 조직 기능을 치유하고 회복시킬 수 있다. 또한, 매개체(사이토카인을 포함하지만 이에 제한되지 않음)의 억제제는 커플링된 DVD에 의한 장치 이식 즉시 또는 장치에 표적화되는 즉시 제공된다. 예를 들면, 스텐트는 차단된 동맥을 청소하고 심근으로의 혈류를 개선시키기 위해 개재 심장학에서 수년동안 사용되어 왔다. 그러나, 통상적인 노출된 금속 스텐트는 몇몇 환자에서 재발협착증(처리된 영역에서 동맥의 재협착)을 일으켜 혈액 응고를 유발할 수 있는 것으로 공지되어 있다. 최근에, 항-CD34 항체 피복된 스텐트가 보고되었고 이는 혈액 전반에 걸쳐 순환하는 내피 전조 세포(EPC)를 포획함으로써 인해 발생하는 혈액 응고를 방지하고 재발협착증을 감소시킨다. 내피 세포는 혈관을 따라 존재하여 혈류를 원활하게 하는 세포이다. EPC는 스텐트의 경표면에 부착하여 연한 층을 형성하고 치유를 촉진시킬 뿐만 아니라 이전에 스텐트의 사용과 연관된 합병증인 재발협착증 및 혈액 응고를 방지한다(Aoji et al. (2005) J. Am. Coll. Cardiol. 45(10):1574-9). 스텐트를 필요로 하는 환자에 대한 성과를 개선시킬 뿐만 아니라 심혈관 우회 수술을 필요로 하는 환자라도 관련이 있다. 예를 들면, 항-EPC 항체로 피복된 보죽 혈관(인공 동맥)은 우회 수술 이식을 위해 환자 다리 또는 팔로부터 동맥을 사용할 필요가 없다. 이것은 수술 및 마취 시간을 감소시키고 이어서 관상 수술 사망을 감소시킬 것이다. DVD-Ig는 세포 보강을 촉진시키는 이식된 장치상에 피복된 단백질(또는 지질 및 폴리사카라이드를 포함하지만 이에 제한되지 않

는 임의의 종류의 에피토프) 뿐만 아니라 세포 표면 마커(CD34와 같은)에 결합되도록 하는 방식으로 디자인된다. 당해 방법은 또한 일반적으로 기타 의학적 이식체에 적용될 수 있다. 또한, DVD-Ig는 의료 장치에 피복될 수 있고 이식 및 장치로부터 모든 DVD가 방출되는 즉시(또는 이미 로딩된 DVD-Ig의 노화 및 변성을 포함하는 추가의 신선한 DVD-Ig를 필요로 할 수 있는 임의의 기타 요구시), 당해 장치는 신선한 DVD-Ig를 환자에게 전신 투여하여 재로딩될 수 있고 이때, DVD-Ig는 목적하는 표적(사이토카인, 세포 표면 마커(예를 들면, CD34)등)에 결합하도록 디자인되고 이는 장치상에 피복된 표적(지질, 폴리사카라이드 및 중합체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 종류의 단백질, 에피토프를 포함함)에 대한 한 세트의 결합 부위와 다른 결합 부위를 갖는다. 당해 기술은 피복된 이식체의 유용성을 연장시키는 이점을 갖는다.

[0293] **A. 다양한 질환에서 DVD-Ig의 용도**

[0294] 본 발명의 DVD-Ig 분자는 또한 다양한 질환을 치료하기 위한 치료학적 분자로서 유용하다. 당해 DVD 분자는 특정 질환에 관련된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다. 다양한 질환에서 당해 표적의 예는 하기된 바와 같다.

[0295] **1. 사람 자가면역 및 염증 반응**

[0296] C5, CCL1 (I-309), CCL11(에오타신), CCL13(mcp-4), CCL15(MIP-1d), CCL16(HCC-4), CCL17(TARC), CCL18(PARC), CCL19, CCL2(mcp-1), CCL20(MIP-3a), CCL21(MIP-2), CCL23(MPIF-1), CCL24(MPIF-2 / 에오타신-2), CCL25(TECK), CCL26, CCL3(MIP-1a), CCL4(MIP-1b), CCL5(RANTES), CCL7(mcp-3), CCL8(mcp-2), CXCL1, CXCL10(IP-10), CXCL11(I-TAC / IP-9), CXCL12(SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5(ENA-78 / LIX), CXCL6(GCP-2), CXCL9, IL13, IL8, CCL13(mcp-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CCXCR1), IFNA2, IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1(내피 단핵구-활성화 사이토카인), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9, IL9R, ABCF1, BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, ICEBERG, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R, TOLLIP, FADD, IRAK1, IRAK2, MYD88, NCK2, TNFAIP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, CD28, CD3E, CD3G, CD3Z, CD69, CD80, CD86, CNR1, CTLA4, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, FCGR3A, GPR44, HAVCR2, OPRD1, P2RX7, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, BLR1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR4, GPR2, SCYE1, SDF2, XCL1, XCL2, XCR1, AMH, AMHR2, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, C19orf10 (IL27w), CER1, CSF1, CSF2, CSF3, DKFZp451J0118, FGF2, GF11, IFNA1, IFNB1, IFNG, IGF1, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17R, IL18, IL18R1, IL19, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR, MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TDGF1, TGFA, TGFB1, TGFB111, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB1R1, TGFB1R2, TGFB1R3, TH1L, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21, TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2, 및 RNF110(ZNF144)을 포함한 다수의 단백질이 일반적 자가면역 및 염증 반응에 연루되었다. 한 양상에서, 본원에 열거된 표적 중 하나 이상에 결합하는 DVD-Ig가 제공된다.

[0297] 염증 질환을 치료하기 위한 하기 표적 쌍에 결합하는 DVD-Ig가 고려된다: IL-1알파(서열 3)와 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 2)와 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 1)와 IL-1베타(서열 1); IL-1알파(서열 3)와 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4)와 IL-1베타(서열 2); IL-1알파(서열 4)와 IL-1베타(서열 3); IL-1알파(서열 4)와 IL-1베타(서열 4); IL-1알파(서열 4)와 IL-1베타(서열 5)(실시예 2.1 내지 2.8 참조).

[0298] **2. 천식**

[0299] 알레르기성 천식은 상승된 혈청 IgE 수준뿐만 아니라 호산구증가증, 배상 세포 화생, 상피 세포 변형, 기도 과민증(AHR), 및 Th2 및 Th1 사이토카인 발현의 존재를 특징으로 한다. 현재 기도 염증이, T세포, B 세포, 호산구, 비만 세포 및 대식세포와 같은 염증 세포와 사이토카인 및 케모카인을 포함한 이들의 분비된 매개체의 복합 상호작용을 포함하는, 천식 병리학의 주요 인자인 것으로 광범위하게 수궁되고 있다. 코르티코스테로이드는 현재 천식에 가장 중요한 소염 치료제이지만, 이의 작용 기작은 비특이적이고 특히 어린 환자 집단에서 안전성 문제가 존재한다. 따라서, 보다 특이적이고 표적화된 치료제의 개발이 요구된다. 마우스에서의 IL-13이, 호산성 염증과는 무관하게, AHR, 점액 과분비 및 기도 섬유증을 포함한 천식의 많은 특징을 모방한다는 증거가 증가하

고 있다(Finotto et al. (2005) Int. Immunol. 17(8):993-1007; Padilla et al. (2005) J. Immunol. 174(12), 8097-8105).

[0300] IL-13은 천식과 연관된 병리학적 반응을 유발하는데 주요 역할을 가짐으로서 관련되어 있다. 폐에서 IL-13의 효과를 감소시키는 항-IL-13 mAb 치료제 개발은 신규 천식 치료제로서 유망한 것으로 고려될 수 있는 흥미로운 신규 접근법이다. 그러나, 차등적 면역학적 경로의 기타 매개체가 또한 천식 병리에 연루되어 있고, IL-13뿐만 아니라 이들 매개체를 차단하는 것이 추가의 치료학적 이점을 제공할 수 있다. 이러한 표적 쌍은 IL-13, 및 종양 괴사 인자- α (TNF- α)와 같은 염증촉진 사이토카인을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. TNF- α 는 천식에서의 염증 반응을 증폭시킬 수 있고 질환 중증도와 관련될 수 있다(McDonnell et al. (2001) Progr. Respir. Res. 31(New Drugs for Asthma, Allergy and COPD):247-250.). 이것은 IL-13 및 TNF- α 둘 다의 차단이, 특히, 심각한 기도 질환에서 이로운 효과를 가질 수 있음을 시사한다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig는 표적 IL-13 및 TNF α 에 결합하고 천식을 치료하기 위해 사용된다.

[0301] 염증 및 AHR 둘 다가 평가될 수 있는 OVA-유도된 천식 마우스 모델과 같은 동물 모델은 당업계에 공지되어 있고 천식을 치료하는 다양한 DVD-Ig 분자의 능력을 측정하는데 사용될 수 있다. 천식을 연구하기 위한 동물 모델은 문헌[참조: Coffman et al. (2005) J. Exp. Med. 201(12):1875-1879; Lloyd et al. (2001) Adv. Immunol. 77:263-295; Boyce et al. (2005) J. Exp. Med. 201(12):1869-1873; 및 Snibson et al. (2005) J. Brit. Soc. Allergy Clin. Immunol. 35(2):146-52]에 기재되어 있다. 이들 표적 쌍의 통상적인 안전성 평가뿐만 아니라, 면역저해 정도에 대한 특이적 시험이 보장될 수 있고 최상의 표적 쌍을 선별하는데 도움이 된다(문헌참조: Luster et al. (2004) Toxicol. 92(1-3):229-43; Descotes et al. (1992) Dev. Biol. Standardiz. 77:99-102; Hart et al. (2001) J. Allergy and Clin. Immunol. 108(2):250-257).

[0302] 본원에 기재된 이유에 기초하고 효능 및 안전성에 대한 동일한 평가 모델을 사용하여, DVD-Ig 분자가 결합할 수 있고 천식을 치료하는데 유용한 기타 표적 쌍을 측정할 수 있다. 한 실시형태에서, 이러한 표적은 IL-13과 IL-1베타(IL-1베타는 또한 천식에서 염증 반응에 연루되어 있다); IL-13과 염증에 관여하는 사이토카인과 케모카인, 예를 들면, IL-13과 IL-9; IL-13과 IL-4; IL-13과 IL-5; IL-13과 IL-25; IL-13과 TARC; IL-13과 MDC; IL-13과 MIF; IL-13과 TGF- β ; IL-13과 LHR 효능제; IL-13과 CL25; IL-13과 SPRR2a; IL-13과 SPRR2b; 및 IL-13과 ADAM8을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 천식에 연루된 하나 이상의 표적에 결합하는 DVD-Ig를 제공한다: CSF1(MCSF), CSF2(GM-CSF), CSF3(GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, 히스타민 및 히스타민 수용체, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNF, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, 및 키티나제.

[0303] 3. 류마티스 관절염

[0304] 전신성 질환인 류마티스 관절염(RA)는 관절 활막에서의 만성 염증 반응을 특징으로 하고 연골의 퇴화 및 관절 인접 골의 부식과 연관되어 있다. TNF, 케모카인 및 성장 인자를 포함하는 많은 염증 촉진 사이토카인은 환부 관절에서 발현된다. RA의 마우스 모델에 항-TNF 항체 또는 sTNFR 융합 단백질 융합 단백질의 전신성 투여는 소염 및 관절 보호성 인것으로 나타났다. RA 환자에서 TNF의 활성이 정맥내 투여되는 인플릭시마브에 차단된 임상적 연구(Harriman et al. (1999) Ann. Rheum. Dis. 58 Suppl 1:161-4)에서, 키메라 항-TNF 모노클로날 항체(mAb)는 TNF가 IL-6, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 생산, 면역 및 염증 세포의 관절로의 보강, 혈관형성 및 매트릭스 메탈로프로테이나제-1 및 3의 혈액 수준의 감소를 조절한다는 증거를 제공했다. 류마티스 관절염에서 염증 경로의 보다 나은 이해를 통해 류마티스 관절염에 연루된 기타 치료학적 표적을 동정하게 되었다. 인터류킨-6 길항제, Chugai, Roche에 의해 개발된 IL-6 수용체 항체 MRA(문헌참조: Nishimoto et al. (2004) Arthritis Rheum. 50(6):1761-1769), CTLA4Ig(abatacept, Genovese et al. (2005) N. Engl. J. Med. 353:1114-23.), 및 항-B 세포 치료 (rituximab, Okamoto (2004) N. Engl. J. Med. 351:1909)와 같은 전망있는 치료제가 지난해에 걸쳐 무작위 조절된 시험에서 이미 시험되었다. 인터류킨-15(치료학적 항체 HuMax-IL15, AMG714, 문헌참조: Baslund et al. (2005) Arthrit. Rheum. 52(9):2686-2692), 인터류킨-17 및 인터류킨-18을 포함하는 기타 사이토카인이 동정되었고 동물 모델에서 이로운 것으로 나타났고 이들 체계의 임상적 시험이 진행중에 있다. 항-TNF와 또 다른 매개체를 병용하는 이원 특이적 항체 치료는 임상적 효능 및/또는 환자 보호에 큰 잠재력을 갖는다. 예를 들면, TNF 및 VEGF 둘 다를 차단함으로써 RA의 병생리학에 연루된 염증 및 혈관신생을 잠재적으로 막

멸시킬 수 있다. TNF와 IL-18; TNF와 IL-12; TNF와 IL-23; TNF와 IL-1베타; TNF와 MIF; TNF와 IL-17; 및 TNF와 IL-15를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 RA에 연루된 다른 표적 쌍을 특이적 DVD Ig를 이용하여 차단하는 것도 고려된다. 이들 표적 쌍에 대한 통상적인 안정성 평가뿐만 아니라 면역 억제 정도에 대한 특정 시험이 요구될 수 있고 표적 쌍을 선별하는데 도움이 된다(문헌참조: Luster et al. (2004) Toxicol. 92(1-3):229-43; Descotes et al. (1992) Dev. Biol. Standard. 77:99-102; Hart et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 108(2):250-257). DVD Ig 분자가 류마티스 관절염 치료를 위해 유용할 것인지의 여부는 콜라겐 유도된 관절염 마우스 모델과 같은 임상전 동물 RA 모델을 사용하여 평가할 수 있다. 기타 유용한 모델은 또한 당업계에 널리 공지되어 있다(문헌참조: Brand (2005) Comp. Med. 55(2):114-22). 사람 및 마우스 유사체에 대한 모 항체의 교차 반응성을 기준으로(예를 들면, 사람 및 마우스 TNF, 사람 및 마우스 IL-5 등에 대한 반응성), 마우스 CIA 모델에서 입증 연구는 "일치된 대응 항체" 유래된 DVD-Ig 분자로 수행될 수 있고; 간략하게 2개(또는 그 이상)의 마우스 표적 특이적 항체를 기초로 하는 DVD-Ig는 사람 DVD-Ig 작제에 대해 사용된 모 사람 또는 사람화된 항체의 성질(유사 친화성, 유사 중화 효능, 유사 반감기 등)에 가능한한 정도로 일치될 수 있다.

[0305] 4. SLE

[0306] SLE의 면역병리학적 특징은 폴리클로날 B 세포 활성화이고, 이는 과다글로불린혈증, 자가항체 생산 및 면역 복합체의 형성을 유도한다. 기본적인 비정상인 T 세포가, 일반화된 T 세포 이상조절로 인해 막아야될 B 세포 클론을 저해하는 것의 실패인 것으로 나타난다. 또한, B 및 T-세포 상호작용은, 제2 신호를 개시하는 CD40과 CD40L, B7과 CD28 및 CTLA-4와 같은 공동-자극 분자뿐만 아니라 몇몇 사이토카인(예를 들면, IL-10)에 의해 촉진된다. 이들 상호작용은, 면역 복합체 및 아포토시스 물질의 식세포 제거 손상과 함께 조직 손상이 유발되는 면역 반응을 존속시킨다. 하기의 표적은 SLE에 연루될 수 있고 치료학적 중재를 위한 DVD-Ig 접근법(B 세포 표적 치료요법)을 위해 잠재적으로 사용될 수 있다: CD-20, CD-22, CD-19, CD28, CD4, CD80, HLA-DRA, IL10, IL2, IL4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFSF5, TNFSF6, BLR1, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, ICOSL, IGBP1, MS4A1, RGS1, SLA2, CD81, IFNB1, IL10, TNFRSF5, TNFRSF7, TNFSF5, AICDA, BLNK, GALNAC4S-6ST, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, IL10, IL11, IL4, INHA, INHBA, KLF6, TNFRSF7, CD28, CD38, CD69, CD80, CD83, CD86, DPP4, FCER2, IL2RA, TNFRSF8, TNFSF7, CD24, CD37, CD40, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CR2, IL1R2, ITGA2, ITGA3, MS4A1, ST6GAL1, CD1C, CHST10, HLA-A, HLA-DRA, 및 NT5E.; 공동 자극 신호: CTLA4 또는 B7.1/B7.2; B 세포 생존 억제: BlyS, BAFF; 보체 불활성화: C5; 사이토카인 조정. 주요 원리는 임의의 조직에서 총 생물학적 반응이 염증 촉진 또는 소염 사이토카인의 국소적 수준간에 이의 균형에 따른 결과인 것이다(문헌참조: Sfrikakis et al. (2005) Curr. Opin. Rheumatol. 17:550-7). SLE는 혈청 중에서 IL-4, IL-6, IL-10이 상승하는 것으로 입증된 Th-2 유발 질환인 것으로 간주된다. IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , 및 TNF- α 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 표적에 결합하는 DVD Ig가 또한 고려된다. 본원에 논의된 표적의 조합은 SLE에 대한 치료학적 효능을 증진시킬 것이고, 이것은 다수의 낭창 임상전 모델에서 시험될 수 있다(문헌참조: Peng (2004) Methods Mol. Med. 102:227-72). 사람에게 대한 모 항체 및 마우스 유사체의 교차 반응성에 기초하여(예를 들면, 사람 및 마우스 CD20, 사람 및 마우스 인터페론 알파 등에 대한 반응성), 마우스 낭창 모델에서 "일치된 대응 항체" 유도된 DVD-Ig 분자를 사용하여 확인 연구를 수행할 수 있고; 간략하게 DVD-Ig 기반 2개(또는 이상)의 마우스 표적 특이적 항체는 사람 DVD-Ig 작제를 위해 사용되는 모 사람 또는 사람화된 항체의 특징(유사한 친화성, 유사한 중화 효능, 유사한 반감기 등)을 분석할 수 있을 정도로 일치할 수 있다.

[0307] 5. 다발성 경화증

[0308] 다발성 경화증 (MS)은 병인이 명백하게 미지인 복합 사람 자가면역형 질환이다. 신경계 전반에 걸친 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 면역학적 파괴는 다발성 경화증의 주요 병리이다. MS는 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 의한 침투를 포함하는 복합 병리 질환이고 중추 신경계내 반응 질환이다. 사이토카인, 반응성 질소 중 및 동시자극인자 분자의 CNS내 발현은 모두 MS에서 기재되었다. 주로 고려되는 것은 자가면역 발병에 기여하는 면역학적 기작이다. 특히, 항원 발현, 사이토카인 및 백혈구 상호작용 및 조절 T-세포는 Th1 및 Th2 세포와 같은 기타 T-세포의 균형/조절을 도와주고 치료학적 표적 동정을 위해 중요한 영역이다.

[0309] IL-12는 APC에 의해 생성되어 Th1 이펙터 세포의 분화를 촉진하는 염증 촉진성 사이토카인이다. IL-12는 MS를 지닌 환자 및 EAE에 걸린 동물의 발생 병변에서 생성된다. 이전에, IL-12 경로에서의 간섭은 설치류에서 EAE를 효과적으로 예방하고 항-IL-12 mAb를 사용한 IL-12p40의 생체내 중화는 통상의 마모셋에서 미엘린-유도된 EAE 모델에서 이로온 효과를 갖는다는 것이 밝혀졌다.

[0310] TWEAK는 TNF 계열의 구성원이고, 염증 촉진, 증식 또는 아포토시스 효과가 세포 유형에 의존하는 중추 신경계

(CNS)내에서 항상성으로 발현된다. 이의 수용체인 Fn14는 내피 세포, 반응성 성상세포 및 뉴런에 의해 CNS에서 발현된다. TWEAK 및 Fn14 mRNA 발현은 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE) 동안에 척수에서 증가된다. C57BL/6 마우스에서 미엘린 올리고수지상세포 당단백질(MOG) 유도된 EAE에서 항-TWEAK 항체 처리는 마우스가 적응(priming) 기간 후 처리되는 경우 질환 중증도 및 백혈구 침투를 감소시킨다.

[0311] 본 발명의 한 양상은, IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFN γ , GM-CSF, FGF, C5, CD52, 및 CCR2로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상 표적, 예를 들면, 2개의 표적에 결합하는 DVD-Ig 분자에 관한 것이다. 한 실시형태는 MS의 치료에 이로운 치료제로서 이원-특이적 항-IL12/TWEAK DVD Ig를 포함한다.

[0312] MS를 치료하기 위한 DVD 분자의 유용성을 평가하기 위한 여러 동물 모델은 당업계에 공지되어 있다(문헌참조: Steinman et al. (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin et al. (1985) Springer Semin Immunopathol. 8(3):197-208; Genain et al. (1997) J. Mol. Med. 75(3):187-97; Tuohy et al. (1999) J. Exp. Med. 189(7):1033-42; Owens et al. (1995) Neurol. Clin. 13(1):51-73; 및 Hart et al. (2005) J. Immunol. 175(7):4761-8). 사람 및 동물 중 유사체에 대한 모 항체의 교차 반응성(예를 들면, 사람 및 마우스 IL-12, 사람 및 마우스 TWEAK 등에 대한 반응성)을 기준으로 "일치된 대응 항체" 유래 DVD-Ig 분자를 사용하여 마우스 EAE 모델에서 확인 연구를 수행할 수 있고; 간략하게 2개(또는 이상)의 마우스 표적 특이적 항체에 기초한 DVD-Ig는 사람 DVD-Ig 작제를 위해 사용되는 모 사람 또는 사람화된 항체의 성질 (유사한 친화성, 유사한 중화 효능, 유사한 반감기 등)을 분석할 수 있는 정도 일치될 수 있다. 동일한 개념을 기타 비-설치류 종의 동물 모델에 적용하고, 여기서, "일치된 대응 항체" 유래 DVD-Ig는 예상된 약리학 및 가능한 안정성 연구를 위해 선별된다. 이들 표적 쌍의 통상적인 안전성 평가 뿐만 아니라 면역 억제 정도에 대한 특정 시험이 요구될 수 있고 최상의 표적 쌍을 선택하는데 도움이 된다(문헌참조: Luster et al. (1994) Toxicol. 92(1-3):229-43; Descotes et al. (1992) Devel. Biol. Standardiz. 77:99-102; Jones (2000) IDrugs 3(4):442-6).

[0313] 6. 패혈증

[0314] 패혈증의 병리학은 그람 음성 유기체의 외막 성분(리포폴리사카라이드[LPS], 지질 A, 내독소) 및 그람 양성 유기체의 외막 성분(리포테이코산, 펩티도글리칸)에 의해 개시된다. 이들 외막 성분은 단핵구의 표면상의 CD14 수용체와 결합할 수 있다. 이어서 최근에 보고된 톨(tol1)형 수용체에 의해, 신호는 세포로 전달되어 결국 염증 촉진 사이토카인 종양 괴사 인자-알파(TNF-알파) 및 인터류킨-1(IL-1)의 생성을 유발한다. 압도적인 염증 및 면역 반응은 패혈성 쇼크의 필수적 특징이고 조직 손상, 다발성 기관 부전증 및 패혈증 유도된 사멸의 병리에 중추 역할을 한다. 사이토카인, 특히, 종양 괴사 인자 (TNF) 및 인터류킨 (IL)-1은 패혈성 쇼크의 중요한 매개체인 것으로 밝혀졌다. 이들 사이토카인은 조직에 대한 직접적인 독성 효과를 갖고 이들은 또한 포스포리파제 A2를 활성화시킨다. 이들 및 기타 효과는 혈소판 활성화 인자의 농도를 증가시키고 산화질소 신타제 활성을 촉진시키고 호중구에 의한 조직 침투를 촉진시키고 호중구 활성을 촉진시킨다.

[0315] 패혈증 및 패혈성 쇼크의 치료는 임상적 난제로서 남아있고 염증 반응에 겨냥된 생물학적 반응 개질제(즉, 항-TNF 및 항-MIF)를 사용한 최근 기대되는 시험이 단지 약간의 임상적 이득을 나타내었다. 최근에, 관심이 면역 억제의 수반된 기간을 역전시키것을 목표로 하는 치료쪽으로 전환되었다. 실험 동물 및 중증 환자에 대한 연구는 림프성 기관 및 몇몇 유조직의 증가된 아포토시스가 당해 면역 억제, 아네르기 및 기관계 기능부전에 기여하는 것임을 입증하였다. 패혈증 중후군동안에, 림프구 아포토시스는 IL-12의 부재 또는 글루코코르티코이드, 그랜자임 또는 소위 '사멸' 사이토카인, 종양 괴사 인자 알파 또는 Fas 리간드의 방출에 의해 유발될 수 있다. 아포토시스는 시토졸 및/또는 미토콘드리아 카스파제의 자가 활성화를 통해 진행하고, 당해 카스파제는 Bcl-2 계열의 아포토시스 촉진 및 항-아포토시스 구성원에 의해 영향받을 수 있다. 실험적 동물에서, 아포토시스의 억제제를 사용한 치료로 림프구 세포 아포토시스를 방지할 수 있을 뿐만 아니라 이것은 또한 당해 결과를 개선시킬 수 있다. 항-아포토시스 제제를 사용한 임상적 시도는 대부분 이들의 투여 및 조직 표적화와 연관된 기술적 어려움으로 인해 아득하지만 림프구 아포토시스의 억제는 패혈성 환자에 대한 매력적인 치료학적 표적을 나타낸다. 또한, 염증 매개체 및 아포토시스 매개체를 표적화하는 이원 특이적 제제는 부가 이득을 가질 수 있다. 본 발명의 한 양상은, TNF, IL-1, MIF, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-23, FasL, LPS, 톨형 수용체, TLR-4, 조직 인자, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL-10, IL-1B, NFKB1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, CCR3, IL1RN, MIF, NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, 미드카인, IRAK1, NFKB2, SERPINA1, SERPINE1, 및 TREM1로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 패혈증에 연루된 하나 이상의 표적, 한 실시형태에서는 2개의 표적에 결합하는 DVD-Ig에 관한 것이다. 패혈증에 대한 당해 DVD Ig의 효능은 당업계에 공지된 임상전 동물 모델에서 평가될 수 있다(문헌참조: Buras et al. (2005) Nat. Rev. Drug Discov. 4(10):854-65 및 Calandra et al.

(2000) Nat. Med. 6(2):164-70).

[0316] **7. 신경학적 장애**

[0317] **7.1. 신경퇴행성 질환**

[0318] 신경퇴행성 질환은 일반적으로 연령에 의존하는 만성이거나 급성(예를 들면, 졸중, 외상후 뇌 손상, 척수 손상 등)이다. 이들은 신경 기능의 점진적인 상실(뉴런 세포사, 탈수초화), 운동성 상실 및 기억 상실을 특징으로 한다. 이들은 뉴런 기능의 점진적인 상실(뉴런 세포 사멸, 탈수초화), 운동성 상실 및 기억 상실을 특징으로 한다. 만성 신경퇴행성 질환(예를 들면, 알츠하이머 질환)을 뒷받침하는 기작에 대한 새로운 지식은 복합적 병인을 보여주고 다양한 인자, 예를 들면, 혈당 상태, 아밀로이드 생산 및 다량체화, 수용체 RAGE(AGE에 대한 수용체)에 결합하는 진전된 당화 최종 생성물(AGE)의 축적, 증가된 뇌 산화 스트레스, 감소된 뇌 혈류, 염증성 사이토카인 및 케모카인을 포함하는 신경염증, 뉴런 기능부전 및 소교 세포 활성화가 이들의 발병 및 진행에 기여하는 것으로 인지되었다. 따라서, 이들 만성 신경퇴행성 질환은 다발성 세포 유형 및 매개체간에 복잡한 상호작용을 나타낸다. 당해 질환에 대한 치료 전략은 제한되고 대부분 비특이적 소염제(예를 들면, 코르티코스테로이드, COX 억제제)로 염증 과정을 차단하거나 당해 제제로 뉴런 상실 및/또는 시냅스 기능을 차단하는 것으로 구성된다. 이들 치료는 질환 진행을 중지시키는데 실패한다. 최근 연구는 가용성 A- β 펩타이드(A- β 올리고머 형태를 포함함)에 대한 항체와 같은 보다 표적화된 치료가 질환 진행의 중지를 도와줄 수 있을 뿐만 아니라 기억의 유지를 도와줄 수 있음을 시사한다. 이들 예비 관찰은 하나 이상의 질환 매개체(예를 들면, A- β , 및 TNF와 같은 염증 촉진 사이토카인)를 표적화하는 특정 치료가 단일 질환 기작(예를 들면, 가용성 A- β 단독)을 표적화하여 관찰되는 것보다 만성 신경퇴행성 질환에 대해 보다 우수한 치료학적 효능을 제공할 수 있음을 시사한다. MS를 치료하기 위한 DVD-Ig 분자의 유용성을 평가하기 위한 몇몇의 동물 모델이 당업계에 공지되어 있다(문헌 [Steinman et al. (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin et al. (1985) Springer Semin. Immunopathol. 8(3):197-208; Genain et al. (1997) J. Mol. Med. 75(3):187-97; Tuohy et al. (1999) J. Exp. Med. 189(7):1033-42; Owens et al. (1995) Neurol. Clin. 13(1):51-73; 및 Hart et al. (2005) J. Immunol. 175(7):4761-8] 참조). 사람 및 동물 중 유사체에 대한 모 항체의 교차-반응성(예를 들면, 사람 및 마우스 IL-12, 사람 및 마우스 TWEAK 등에 대한 반응성)에 기초하여, "일치된 대응 항체"를 이용하여 마우스 EAE 모델에서의 확인 연구를 행할 수 있다. 간략하게, 2개(또는 이상)의 마우스 표적 특이적 항체에 기초한 DVD-Ig는 사람 DVD-Ig 작제를 위해 사용되는 모 사람 또는 사람화된 항체의 특징(예를 들면, 유사한 친화성, 유사한 중화 효능, 유사한 반감기 등)을 분석할 수 있는 정도 일치될 수 있다. 동일한 개념을 기타 비-설치류 중의 동물 모델에 적용하고, 여기서, "일치된 대응 항체" 유래 DVD-Ig는 예상된 약리학 및 가능한 안정성 연구를 위해 선별된다. 이들 표적 쌍의 통상적인 안전성 평가뿐만 아니라 면역저해 정도에 대한 특정 시험이 요구될 수 있고 최상의 표적 쌍을 선택하는데 도움이 된다(문헌참조: Luster et al. (1994) Toxicol. 92(1-3):229-43; Descotes et al. (1992) Devel. Biol. Stand. 77:99-102; Jones (2000) IDrugs 3(4):442-6).

[0319] 본 발명의 DVD-Ig 분자는 알츠하이머와 같은 만성 신경퇴행성 질환에 연루된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다. 당해 표적은 AD 병리학에 연루된 임의의 매개체, 가용성 또는 세포 표면, 예를 들면, AGE(S100A, 암포테린), 염증 촉진 사이토카인(예를 들면, IL-1), 케모카인(예를 들면, MCP 1), 신경 재생을 억제하는 분자(예를 들면, Nogo, RGM A), 신경 성장을 증진시키는 분자(뉴로트로핀) 및 혈뇌장벽에서 수송을 매개할 수 있는 분자(예를 들면, 트랜스페린 수용체, 인슐린 수용체 또는 RAGE)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. DVD-Ig 분자의 효능은 아밀로이드 전구체 단백질 또는 RAGE를 과발현하고 알츠하이머 질환 유사 증상을 나타내는 유전자 전이 마우스와 같은 임상전 동물 모델에서 유효할 수 있다. 또한, DVD-Ig 분자는 작제되고 동물 모델에서 효능에 대해 시험될 수 있고 사람 환자에서 시험하기 위한 최상의 치료학적 DVD-Ig 가 선택될 수 있다. DVD-Ig 분자는 또한 파킨슨 질환과 같은 기타 신경퇴행성 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다. 알파-시누클레인은 파킨슨 병리학에 관여한다. 알파-시누클레인 및 염증 매개체(예를 들면, TNF, IL-1, MCP-1)를 표적화할 수 있는 DVD-Ig는 파킨슨 질환에 대해 효과적인 치료임을 입증할 수 있고 본 발명에 고려된다.

[0320] **7.2 신경 소생 및 척수 손상**

[0321] 병리학적 기작의 지식이 증가했음에도 불구하고 척수 손상(SCI)은 여전히 황무지인 상태이고 고도의 의학적 요구를 특징으로 하는 의학적 징후를 나타낸다. 대부분의 척수는 타박상이거나 압박 손상이고 1차 손상은 일반적으로 2차 손상 기작(염증 매개체, 예를 들면, 사이토카인 및 케모카인)에 따른 것이고 이것은 초기 손상을 악화시키고 환부를, 때때로 10배 이상으로 증대시킨다. SCI에서 이들 1차 및 2차 기작은 기타 수단에 의해 유발되는 뇌 손상, 예를 들면, 뇌졸중의 기작과 매우 유사하다. 어떠한 만족할만한 치료가 존재하지 않고 메틸프레드

니슬론(MP)의 고 용량의 일시 주사가 손상 후 8시간의 좁은 시간 범위에서만 사용되는 치료이다. 그러나, 당해 치료는 단지 임의의 상당한 기능적 회복 없이 2차 손상을 예방하기 위해 의도된다. 명백한 효능의 부재 및 후속 감염 및 중증 조직학적 근육 변형을 갖는 면역억제와 같이 중증 역효과 때문에 가혹하게 비판받고 있다. 내인성 소행 잠재력을 자극하는 어떠한 다른 약물, 생물학적 또는 소분자도 승인되지 않았지만 최근해에 SCI의 동물모델에서 전망있는 치료 원리 및 약물 후보가 효능을 나타내었다. 사람 SCI에서 기능적 회복의 부재는 대부분, 환부, 상처 조직, 미엘린에서 및 손상 관련 세포상에서 신경돌기 성장을 억제하는 인자에 의해 유발된다. 당해 인자는 미엘린 연관 단백질 NogoA, OMgp 및 MAG, RGM A, 상처 연관 CSPG(콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸) 및 반응성 성상세포에 대한 억제 인자(몇몇 세마포린 및 에프린)이다. 그러나, 환부에는 성장 억제 인자뿐만 아니라 뉴로트로핀, 라미닌, L1 및 기타와 같은 신경돌기 성장 자극 인자가 존재한다. 신경돌기 성장 억제 및 성장 촉진 분자의 전체적 효과는 NogoA 또는 RGM A와 같은 단일 인자의 차단이, 억제 영향의 감소가 성장 억제로부터 성장 촉진으로의 균형을 전환시킬 수 있기 때문에, 설치류 SCI 모델에서 기능적으로 상당히 회복시킴을 설명할 수 있다. 그러나, 단일 신경돌기 과증식 억제 분자를 차단함으로써 관찰되는 회복은 완전하지 않다. 보다 신속하고 보다 명백한 회복을 달성하기 위해, Nogo 및 RGM A와 같은 2개의 신경돌기 과증식 억제 분자를 차단하거나 신경돌기 과증식 억제 분자를 차단하고 신경돌기 과증식 촉진 분자(예를 들면, Nogo 및 뉴로트로핀)의 기능을 증진시키거나 신경돌기 과증식 억제 분자(Nogo 및 염증 촉진 분자, 예를 들면, TNF)를 차단하는 것이 바람직할 수 있다 (문헌참조: McGee et al. (2003) Trends Neurosci. 26:193; Domeniconi et al. (2005) J. Neurol. Sci. 233:43; Makwana et al. (2005) FEBS J. 272:2628; Dickson (2002) Science 298:1959; Teng, et al. (2005) J. Neurosci. Res. 79:273; Karnezis et al. (2004) Nature Neurosci. 7:736; Xu et al. (2004) J. Neurochem. 91:1018).

[0322] 한 양상에서, NgR과 RGM A; NogoA와 RGM A; MAG과 RGM A; OMgp와 RGM A; RGM A와 RGM B; CSPG와 RGM A; 아그레칸, 미드킨, 뉴로칸, 베르시칸, 포스파칸, Te38 및 TNF- α ; A β 원형체 특이적 항체와 같은 표적 쌍에 결합하는 DVD-Ig가 수지상세포 & 액손 발아를 촉진하는 항체와 배합되어 제공된다. 수지상세포 병리는 AD에 대한 매우 초기 징후이고 Nogo A가 수지상세포 성장을 제한시키는 것으로 공지되어 있다. 당업자는 당해 유형의 ab를 SCI-후보물(미엘린-단백질) Ab와 배합할 수 있다. 기타 DVD-Ig 표적은 NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG 또는 OMgp의 조합체를 포함할 수 있다. 추가로, 표적은 또한 신경돌기의 억제에 연루된 임의의 매개체, 가용성 또는 세포 표면, 예를 들면, Nogo, Ompg, MAG, RGM A, 세마포린, 에프린, 가용성 A-b, 염증 촉진 사이토카인(예를 들면, IL-1), 케모카인(예를 들면, MIP 1a), 신경 소행을 억제하는 분자를 포함할 수 있다. 항-Nogo/항-RGM A 또는 유사한 DVD-Ig 분자의 효능은 척수 손상의 임상전 동물 모델에서 유효할 수 있다. 또한, 이들 DVD-Ig 분자가 작제될 수 있고 동물 모델에서 효능에 대해 시험될 수 있고 최상의 치료학적 DVD-Ig가 사람 환자에서 시험하기 위해 선택될 수 있다. 또한, 단일 수용체, 예를 들면, 3개의 리간드 Nogo, Ompg 및 MAG와 결합하는 Nogo 수용체 및 A-b 및 S100 A와 결합하는 RAGE상에 2개의 별도의 결합 부위를 표적화하는 DVD-Ig 분자가 작제될 수 있다. 추가로, 신경돌기 과증식 억제제, 예를 들면, nogo 및 nogo 수용체는 또한 다발성 경화증과 같은 면역학적 질환에서 신경 소생을 방지하는 역할을 한다. nogo-nogo 수용체 상호작용의 억제는 다발성 경화증의 동물 모델에서 회복을 증진시키는 것으로 나타났다. 따라서, 하나의 면역 매개체, 예를 들면, IL-12와 같은 사이토카인의 기능 및 신경돌기 과증식 억제제 분자, 예를 들면, nogo 또는 RGM의 기능을 차단할 수 있는 DVD-Ig 분자는 면역 또는 신경돌기 억제제 분자만을 차단하는 것 보다 신속하고 보다 큰 효능을 제공할 수 있다.

[0323] 일반적으로, 항체는 효율적이고 적절한 방식으로 혈액 장벽(BBB)을 통과하지 못한다. 그러나, 특정 신경학적 질환에서, 예를 들면, 졸중, 외상 뇌 손상, 다발성 경화증 등에서 BBB는 손상될 수 있고 DVD-Ig 및 항체의 뇌로의 침투를 증가시킬 수 있다. 예를 들면 BBB 누출이 발생하지 않은 다른 신경학적 병태에서는 예를 들면, BBB의 혈관 내피에서 글루코스 및 아미노산 캐리어 및 수용체 매개된 트랜스사이토시스 매개 세포 구조물/수용체를 포함하는 캐리어 매개된 수송체의 표적화를 사용함에 따라 DVD-Ig의 BBB를 통과하는 수송을 가능하게 할 수 있다. 당해 수송을 가능하게 하는 BBB에서의 구조물은 인슬린 수용체, 트랜스페린 수용체, LRP 및 RAGE를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 전략은 저분자량의 약물, 나노입자 및 핵산을 포함하는 효능있는 약물을 CNS로 수송하기 위한 서로서로 DVD-Ig를 사용할 수 있게 한다(문헌참조: Coloma et al. (2000) Pharm Res. 17(3):266-74; Boado et al. (2007) Bioconj. Chem. 18(2):447-55).

[0324] 8. 중앙학적 장애

[0325] 모노클로날 항체 치료는 암에 대한 중요한 치료학적 방식으로 나타났다 (von Mehren et al. (2003) Annu. Rev. Med. 54:343-69). 항체는 아포토시스, 재지시된 세포독성, 리간드-수용체 상호작용의 간섭을 유도하거나

신생물 표현형에 중요한 단백질의 발현을 차단함에 의해 항종양 효과를 발휘할 수 있다. 또한, 항체는 종양 미세환경의 성분을 표적화하여 종양 연관 혈관형성과 같은 중요한 구조물을 교란시킬 수 있다. 항체는 또한 리간드가 성장 인자인 수용체, 예를 들면, 상피 성장 인자 수용체를 표적화할 수 있다. 따라서, 당해 항체는 표적화된 종양 세포에 결합하여 세포 성장을 자극하는 중성 리간드를 억제한다. 또한, 항체는 항-이디오타입 네트워크, 보체 매개 세포독성 또는 항체 의존성 세포성 세포 독성(ADCC)을 유도할 수 있다. 2개의 별도의 종양 매개체를 표적화하는 이원-특이적 항체의 사용은 단일 특이적 치료에 비하여 추가의 이득을 제공한다.

[0326]

또 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig는 VEGF 및 포스포티딜세린; VEGF 및 ErbB3; VEGF 및 PLGF; VEGF 및 ROBO4; VEGF 및 BSG2; VEGF 및 CDCP1; VEGF 및 ANPEP; VEGF 및 c-MET; HER-2 및 ERB3; HER-2 및 BSG2; HER-2 및 CDCP1; HER-2 및 ANPEP; EGFR 및 CD64; EGFR 및 BSG2; EGFR 및 CDCP1; EGFR 및 ANPEP; IGF1R 및 PDGFR; IGF1R 및 VEGF; IGF1R 및 CD20; CD20 및 CD74; CD20 및 CD30; CD20 및 DR4; CD20 및 VEGFR2; CD20 및 CD52; CD20 및 CD4; HGF 및 c-MET; HGF 및 NRP1; HGF 및 포스포티딜세린; ErbB3 및 IGF1R; ErbB3 및 IGF1,2; c-Met 및 Her-2; c-Met 및 NRP1; c-Met 및 IGF1R; IGF1,2 및 PDGFR; IGF1,2 및 CD20; IGF1,2 및 IGF1R; IGF2 및 EGFR; IGF2 및 HER2; IGF2 및 CD20; IGF2 및 VEGF; IGF2 및 IGF1R; IGF1 및 IGF2; PDGFRa 및 VEGFR2; PDGFRa 및 PLGF; PDGFRa 및 VEGF; PDGFRa 및 c-Met; PDGFRa 및 EGFR; PDGFRb 및 VEGFR2; PDGFRb 및 c-Met; PDGFRb 및 EGFR; RON 및 c-Met; RON 및 MTSP1; RON 및 MSP; RON 및 CDCP1; VGFR1 및 PLGF; VGFR1 및 RON; VGFR1 및 EGFR; VEGFR2 및 PLGF; VEGFR2 및 NRP1; VEGFR2 및 RON; VEGFR2 및 DLL4; VEGFR2 및 EGFR; VEGFR2 및 ROBO4; VEGFR2 및 CD55; LPA 및 S1P; EPHB2 및 RON; CTLA4 및 VEGF; CD3 및 EPCAM; CD40 및 IL6; CD40 및 IGF; CD40 및 CD56; CD40 및 CD70; CD40 및 VEGFR1; CD40 및 DR5; CD40 및 DR4; CD40 및 APRIL; CD40 및 BCMA; CD40 및 RANKL; CD28 및 MAPG; CD80 및 CD40; CD80 및 CD30; CD80 및 CD33; CD80 및 CD74; CD80 및 CD2; CD80 및 CD3; CD80 및 CD19; CD80 및 CD4; CD80 및 CD52; CD80 및 VEGF; CD80 및 DR5; CD80 및 VEGFR2; CD22 및 CD20; CD22 및 CD80; CD22 및 CD40; CD22 및 CD23; CD22 및 CD33; CD22 및 CD74; CD22 및 CD19; CD22 및 DR5; CD22 및 DR4; CD22 및 VEGF; CD22 및 CD52; CD30 및 CD20; CD30 및 CD22; CD30 및 CD23; CD30 및 CD40; CD30 및 VEGF; CD30 및 CD74; CD30 및 CD19; CD30 및 DR5; CD30 및 DR4; CD30 및 VEGFR2; CD30 및 CD52; CD30 및 CD4; CD138 및 RANKL; CD33 및 FTL3; CD33 및 VEGF; CD33 및 VEGFR2; CD33 및 CD44; CD33 및 DR4; CD33 및 DR5; DR4 및 CD137; DR4 및 IGF1,2; DR4 및 IGF1R; DR4 및 DR5; DR5 및 CD40; DR5 및 CD137; DR5 및 CD20; DR5 및 EGFR; DR5 및 IGF1,2; DR5 및 IGFR, DR5 및 HER-2, 및 EGFR 및 DLL4에 결합한다. 기타 표적 조합은 EGF/erb-2/erb-3 계열의 하나 이상의 구성원을 포함한다. DVD-Ig가 결합할 수 있는 종양약적 질환에 관여하는 기타 표적(하나 이상)은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것들을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다: CD52, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, BMP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, TNF, TNFSF10, BMP6, EGF, FGF1, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GRP, IGF1, IGF2, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, INHA, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGF, CDK2, FGF10, FGF18, FGF2, FGF4, FGF7, IGF1R, IL2, BCL2, CD164, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, GNRH1, IGFBP6, IL1A, IL1B, ODZ1, PAWR, PLG, TGFB1I1, AR, BRCA1, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, E2F1, EGFR, ENO1, ERBB2, ESR1, ESR2, IGFBP3, IGFBP6, IL2, INSL4, MYC, NOX5, NR6A1, PAP, PCNA, PRKCQ, PRKD1, PRL, TP53, FGF22, FGF23, FGF9, IGFBP3, IL2, INHA, KLK6, TP53, CHGB, GNRH1, IGF1, IGF2, INHA, INSL3, INSL4, PRL, KLK6, SHBG, NR1D1, NR1H3, NR1I3, NR2F6, NR4A3, ESR1, ESR2, NROB1, NROB2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR1I2, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6A1, PGR, RARB, FGF1, FGF2, FGF6, KLK3, KRT1, APOC1, BRCA1, CHGA, CHGB, CLU, COL1A1, COL6A1, EGF, ERBB2, ERK8, FGF1, FGF10, FGF11, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GNRH1, IGF1, IGF2, IGFBP3, IGFBP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, INSL3, INSL4, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, MMP2, MMP9, MSMB, NTN4, ODZ1, PAP, PLAUI, PRL, PSAP, SERPINA3, SHBG, TGFA, TIMP3, CD44, CDH1, CDH10, CDH19, CDH20, CDH7, CDH9, CDH1, CDH10, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH7, CDH8, CDH9, ROBO2, CD44, ILK, ITGA1, APC, CD164, COL6A1, MTSS1, PAP, TGFB1I1, AGR2, AIG1, AKAP1, AKAP2, CANT1, CAV1, CDH12, CLDN3, CLN3, CYB5, CYC1, DAB2IP, DES, DNCL1, ELAC2, ENO2, ENO3, FASN, FLJ12584, FLJ25530, GAGEB1, GAGEC1, GGT1, GSTP1, HIP1, HUMCYT2A, IL29, K6HF, KAI1, KRT2A, MIB1, PART1, PATE, PCA3, PIAS2, PIK3CG, PPID, PR1, PSCA, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, STEAP, STEAP2, TPM1, TPM2, TRPC6, ANGPT1, ANGPT2, ANPEP, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, FIGF, FLT1, JAG1, KDR, LAMA5, NRP1, NRP2, PGF, PLXDC1, STAB1, VEGF, VEGFC, ANGPTL3, BAI1, COL4A3, IL8, LAMA5, NRP1, NRP2, STAB1, ANGPTL4, PECAM1, PF4, PROK2, SERPINF1, TNFAIP2, CCL11, CCL2, CXCL1, CXCL10, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IFNA1, IFNB1,

IFNG, IL1B, IL6, MDK, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFN2, EGF, EPHB4, FGFR3, HGF, IGF1, ITGB3, PDGFA, TEK, TGFA, TGFBI, TGFBI2, TGFBR1, CCL2, CDH5, COL18A1, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1(E-카데린), CDKN1B(p27Kip1), CDKN2A (p16INK4a), COL6A1, CTNNA1(b-카데린), CTSB(카텝신 B), ERBB2(Her-2), ESR1, ESR2, F3(TF), FOSL1(FRA-1), GATA3, GSN(겔솔린), IGFBP2, IL2RA, IL6, IL6R, IL6ST(당단백질 130), ITGA6 (a6 인테그린), JUN, KLK5, KRT19, MAP2K7 (c-Jun), MKI67 (Ki-67), NGFB (NGF), NGFR, NME1 (NM23A), PGR, PLAU (uPA), PTEN, SERPINB5(마스핀), SERPINE1 (PAI-1), TGFA, THBS1(트롬보스폰딘-1), TIE (Tie-1), TNFRSF6 (Fas), TNFSF6 (FasL), TOP2A (토포이소머라제 Iia), TP53, AZGP1 (아연-a-당단백질), BPAG1(플렉틴), CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CLDN7 (클라우딘-7), CLU (클루스테린), ERBB2 (Her-2), FGF1, FLRT1 (피브로넥틴), GABRP (GABAa), GNAS1, ID2, ITGA6 (a6 인테그린), ITGB4 (b4 인테그린), KLF5 (GC Box BP), KRT19 (케라틴 19), KRTHB6 (모발양-특이적 유형 II 케라틴), MACMARCKS, MT3 (메탈로티오넥틴-III), MUC1 (뮤신), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2 (리포필린 B), SCGB2A1 (맘마글로빈 2), SCGB2A2 (맘마글로빈 1), SPRR1B (Spr1), THBS1, THBS2, THBS4, and TNFAIP2 (B94), RON, c-Met, CD64, DLL4, PLGF, CTLA4, 포스파티딜세린, ROBO4, CD80, CD22, CD40, CD23, CD28, CD80, CD55, CD38, CD70, CD74, CD30, CD138, CD56, CD33, CD2, CD137, DR4, DR5, RANKL, VEGFR2, PDGFR, VEGFR1, MTSP1, MSP, EPHB2, EPHA1, EPHA2, EpCAM, PGE2, NKG2D, LPA, SIP, APRIL, BCMA, MAPG, FLT3, PDGFR 알파, PDGFR 베타, ROR1, PSMA, PSCA, SCD1, 및 CD59.

IV. 약제학적 조성물

또한, 본 발명은 본 발명의 결합 단백질과 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 장애를 진단, 검출 또는 모니터링하거나 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방(예를 들면, 질환, 장애 또는 기타 병태의 개시를 억제 또는 지연), 치료, 처리 또는 완화시키고/시키거나 연구에 사용하기 위한 것이다. 특정 실시형태에서, 조성물은 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질, 및 본 발명의 결합 단백질 이외에 장애를 치료하기 위한 하나 이상의 예방제 또는 치료제를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 예방제 또는 치료제는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 처리 또는 완화시키는데 유용하거나 이에 사용되었거나 현재 사용중이다. 이들 실시형태에 따라, 당해 조성물은 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 결합 단백질은 피검체에 투여하기에 적합한 약제학적 조성물에 혼입될 수 있다. 일반적으로, 약제학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질과 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"에는 생리학적으로 혼화성인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 피복, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예에는 물, 식염수, 인산염완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 중의 하나 이상 또는 이의 배합물이 포함된다. 몇몇 실시형태에서, 조성물에 당과 같은 등장제, 만니톨, 소르비톨과 같은 폴리알콜 또는 염화나트륨이 포함되는 것이 바람직하다. 약제학적으로 허용되는 담체는 추가로 항체 또는 항체 일부의 유효 수명이나 효과를 증강시키는 습윤화제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 보조 물질을 소량 포함할 수도 있다.

다양한 전달 시스템이 공지되어 있고 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방하거나 처리하거나 치료하거나 완화시키는데 유용한 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 본 발명의 조합된 하나 이상의 항체 및 예방제 또는 치료제를 투여하는데 사용될 수 있고, 리포솜내 캡셀화제, 미세입자, 미세캡셀제, 항체 또는 항체 단편을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개된 세포내이입[Wu and Wu (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432], 레트로바이러스 또는 기타 벡터 등의 일부로서 핵산의 작제를 예로 들 수 있다. 본 발명의 예방제 또는 치료제를 투여하는 방법은 비경구 투여(예를 들면, 피부내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 뇌척수 경막외 투여, 종양내 투여 및 점막 투여(예를 들면, 비내 및 경구 경로)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 흡입기 또는 분무기 및 분무제를 갖는 제형을 사용하는 폐 투여가 사용될 수 있다[미국 특허 제6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, and 4,880,078; and PCT Publication Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, and WO 99/66903]. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질, 병용 치료제 또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR® 폐 약물 전달 기술(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)을 사용하여 투여된다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 예방 또는 치료제는 근육내, 정맥내, 종양내, 경구적으로, 비내, 폐 또는 피하로 투여된다. 예방제 또는 치료제는 임의의 간편한 경로, 예를 들면, 주입 또는 일시 주사, 상피 또는 점막 내층(예를 들면, 경구 점막, 직장 및 장내 점막등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고 기타 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신성 또는 국소적일 수 있다.

- [0331] 하나의 실시형태에서, 시험관내 종양 세포로의 항체 커플링된 탄소 나노튜브(CNT)의 특이적 결합에 이어서 근적외선(NIR) 광을 사용한 이들의 고도로 특이적인 절제는 종양 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 비오틴이코닐화된 극성 지질은 1개 또는 2개의 상이한 하나 이상의 종양 항원(예를 들면, CD22)에 대해 지시된 뉴트럴라이트 아비딘-유도체화된 DVD-Ig에 부착된 안정한, 생적합성, 비세포독성 CNT 분산제를 제조하기 위해 사용될 수 있다(문헌참조: Chakravarty, P. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 8697-8702).
- [0332] 특정 실시형태에서, 치료를 필요로 하는 영역에 본 발명의 예방제 또는 치료제를 국소적으로 투여하는 것이 요구될 수 있다. 이것은 예를 들면, 비제한적으로, 국소 주입, 주사 또는 임플란트에 의해 달성될 수 있고 당해 임플란트는 막 및 매트릭스, 예를 들면, 시알라스틱 막, 중합체, 섬유성 매트릭스(예를 들면, Tissuel®) 또는 콜라겐 매트릭스를 포함하는 다공성 또는 비-다공성 물질로 이루어진다. 한 실시형태에서, 본 발명의 길항제인 유효량의 하나 이상의 항체는 장애 또는 이의 증상을 예방, 치료, 처리 및/또는 완화시키기 위해 피검체의 환부에 국소적으로 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 유효량의 하나 이상의 항체는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 처리 및/또는 완화시키기 위해 본 발명의 피검체 외에도 유효량의 하나 이상의 치료제(예를 들면, 하나 이상의 예방제 또는 치료제)와 병용하여 피검체의 환부에 국소적으로 투여된다.
- [0333] 또 다른 실시형태에서, 예방제 또는 치료제는 제어 방출 또는 지연 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 실시형태에서, 펌프를 사용하여 조절된 또는 지연된 방출을 달성할 수 있다(see Langer, supra; Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al. (1980) Surgery 88: 507; Saudek et al. (1989) N. Engl. J. Med. 321:574). 또 다른 실시형태에서, 중합체를 사용하여 본 발명의 치료제의 조절되거나 지연된 방출을 달성할 수 있다[Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, FLA. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, NY (1984); Ranger and Peppas (1983) J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; 또한 Levy et al. (1985) Science 228: 190; During et al. (1989) Ann. Neurol. 25: 351; Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71: 105]; 미국 특허 제5,679,377; 5,916,597; 5,912,015; 5,989,463; 및 5,128,326; PCT 공개 제WO 99/15154 및 WO 99/20253 참조]. 지연된 방출 제형에 사용되는 중합체의 예는 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 폴리엔하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLGA) 및 폴리오르토에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 실시형태에서, 지연된 방출 제형에 사용되는 중합체는 불활성이고, 누출되는 불순물이 없고, 저장시 안정하고 생분해성이다. 또 다른 실시형태에서, 조절되거나 지연된 방출 시스템은 예방제 또는 치료제와 근접하게 위치됨에 따라서 전신 용량의 일부만을 필요로 한다(Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).
- [0334] 조절된 방출 시스템은 문헌[Langer (1990) Science 249: 1527-1533]에서 논의되었다. 당업자에게 공지된 임의의 기술을 사용하여 본 발명의 하나 이상의 치료제를 포함하는 지연된 방출 제형을 제조할 수 있다[참조예: 미국 특허 제4,526,938, PCT 공개 제WO 91/05548; 및 WO 96/20698, Ning et al. (1996) Radiotherapy & Oncology 39: 179-189, Song et al. (1995) PDA J. Pharmaceut. Sci. & Technol. 50: 372-397; Cleek et al. (1997) Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854; 및 Lam et al. (1997) Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760].
- [0335] 본 발명의 조성물이 예방제 또는 치료제를 암호화하는 핵산인 특정 실시형태에서, 핵산은 생체내 투여되어 암호화된 예방제 또는 치료제의 발현을 촉진시킬 수 있고 당해 핵산은 적당한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구성되고 이것이 세포내로 투여되도록 하며, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터(미국 특허 제4,980,286) 또는 직접 주사 또는 미세입자 충격(예를 들면, 유전자 총; 바이올리스틱, 듀폰트) 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염제로의 피복을 투여에 사용하거나 핵으로 진입하는 것으로 공지된 호메오박스형 펩타이드에 연결시켜 투여한다(참조예: Joliot et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). 또한, 핵산은 세포내로 도입되고 발현을 위해 상동성 재조합에 의해 숙주 세포 DNA 내로 통합된다.
- [0336] 본 발명의 약제학적 조성물은 이의 의도된 투여 경로와 양립할 수 있도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들면, 정맥내, 피내, 피하, 경구, 비내(예를 들면, 흡입), 경피(예를 들면, 국소), 경점막 및 직장 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 당해 조성물은 사람에게 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비내 또는 경구 투여용으로 채택된 약제학적 조성물로서 통상적인 과정에 따라 제형화된다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균 등장 수성 완충액중의 용액이다. 필요한 경우, 당해 조성물은 또한 가용화제 및

주사 부위에서 통증을 완화하기 위한 리그노캠과 같은 국소 마취제를 함유할 수 있다.

[0337] 본 발명의 조성물이 국소적으로 투여되어야만 하는 경우, 당해 조성물은 연고, 크림, 경피 패취, 로션, 젤, 샴프, 분무제, 에어로졸 또는 당업자에게 널리 공지된 기타 형태로 제형화될 수 있다[Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)]. 하나의 실시형태에서, 분무 불가능한 국소 투여 형태를 위해, 통상적으로 국소 적용과 양립할 수 있는 담체 또는 하나 이상의 부형제를 포함하고 바람직하게 물 보다 큰 역학 점도를 갖는 조성물이 사용될 수 있다. 적합한 제형은 제한없이 용제, 현탁제, 유제, 크림, 연고, 산제, 도찰제, 고약등을 포함하고 경우에 따라 이들은 예를 들면, 삼투압과 같은 다양한 성질에 영향을 미치기 위해 보조제(예를 들어, 방부제, 안정화제, 습윤화제, 완충제 또는 염)과 함께 멸균되거나 혼합된다. 기타 적합한 국소 투여 형태는 바람직하게 고체 또는 액체 불활성 담체와 배합된 활성 성분이 가압된 휘발성 물질(예를 들면, 가스 추진제, 예를 들면, 프레온)과의 혼합물 또는 압착병에 패키징된 분무 가능한 에어로졸 제제를 포함한다. 수분화제 또는 보습제가 또한 경우에 따라 약제학적 조성물 및 투여 형태에 첨가될 수 있다. 당해 추가의 성분의 예는 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0338] 본 발명의 방법이 조성물의 비내 투여를 포함하는 경우, 당해 조성물은 에어로졸 형태, 분무, 연무 또는 적가 형태로 제형화될 수 있다. 특히, 본 발명에 따라 사용하기 위한 예방제 또는 치료제는 간편하게 가압된 펌프 또는 분무기로부터 에어로졸 분무 제공 형태로 적합한 추진제(예를 들면, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적합한 가스)의 사용과 함께 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우에, 용량 단위는 계량된 양이 전달되도록 밸브를 설치하여 측정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 캡셀제 및 카트릿지(예를 들면, 젤라틴으로 구성된)는 화합물 및 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화될 수 있다.

[0339] 본 발명의 방법이 경구 투여를 포함하는 경우, 당해 조성물은 정제, 캡셀제, 카세트, 젤캡, 용제, 현탁제의 형태로 경구적으로 제형화될 수 있다. 정제 또는 캡셀제는 결합제(예를 들면, 예비젤화된 옥수수 전분, 폴리비닐 피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들면, 락토스, 미세결정 셀룰로스 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들면, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 또는 실리카); 봉해제(예를 들면, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트) 또는 습윤화제(예를 들면, 나트륨 라우릴 설페이트)와 같은 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 통상적인 수단으로 제조될 수 있다. 정제는 당업자에게 널리 공지된 방법으로 피복될 수 있다. 경구 투여용 액상 제제는 제한 없이 용제, 시럽 또는 현탁제 형태를 취할 수 있거나 이들은 사용전에 물 또는 기타 적합한 비히클과의 구성을 위해 무수 생성물로서 제공될 수 있다. 당해 액상 제제는 현탁화제(예를 들면, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예를 들면, 렉시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클(예를 들면, 아몬드유, 오일 에스테르, 에틸 알콜 또는 분획화된 식물성 오일) 및 방부제(예를 들면, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)와 같은 약제학적으로 허용되는 첨가제를 사용한 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 당해 제제는 또한 적절하게 완충염, 향제, 착색제 및 감미제를 함유할 수 있다. 경구 투여용 제제는 적합하게 예방제 또는 치료제의 느린 방출, 조절된 방출 또는 지연된 방출용으로 제형화될 수 있다.

[0340] 본 발명의 방법은 예를 들면, 흡입기 또는 분무기를 사용함에 의해 분무화제로 제형화된 조성물을 폐 투여함을 포함할 수 있다[미국 특허 제6,019,968호, 제5,985,320호, 제5,985,309호, 제5,934,272호, 제5,874,064호, 제5,855,913호, 제5,290,540호, 및 제4,880,078호; 및 PCT Publication Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, 및 WO 99/66903]. 특정 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질, 병용 치료제 및/또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR® 폐 약물 전달 기술(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)을 사용하여 투여된다.

[0341] 본 발명의 방법은 주사(예를 들면, 일시 주사 또는 연속 주입)에 의해 비경구 투여용으로 제형화된 조성물을 투여함을 포함할 수 있다. 주사용 제형은 방부제 첨가와 함께 단위 용량 형태(예를 들면, 앰пу울 또는 다용량 컨테이너)로 제공될 수 있다. 당해 조성물은 현탁제, 용제 또는 유제와 같은 형태를 취할 수 있고 현탁화제, 가용화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 또는, 활성 성분은 사용전에 적합한 비히클(예를 들면, 멸균 발연원 부재 물)과의 구성을 위해 분말 형태일 수 있다.

[0342] 본 발명의 방법은 추가로 데포우 제제로서 제형화된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 당해 오래 지속적인 제제는 이식(예를 들면, 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 당해 조성물은 적합한 중합제 또는 소수성 물질(예를 들면, 허용되는 오일중 유제로서) 또는 이온 교환

수지, 또는 불량한 가용성 유도체 (예를 들면, 불량한 가용성 염으로서)로 제형화될 수 있다.

[0343] 본 발명의 방법은 중성 또는 염 형태로서 제형화된 조성물의 투여를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산등으로부터 유래된 것들과 같은 음이온과 함께 형성된 것들 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 제2 수산화철, 이소프로필아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 것들과 같은 양이온과 함께 형성된 것들을 포함한다.

[0344] 일반적으로, 조성물의 성분은 별도로 함께 혼합하여, 예를 들면, 앰пу울 또는 사췌트(활성제의 양을 나타냄)와 같은 밀폐된 컨테이너에서 무수 동결건조된 분말 또는 물 부재 농축물로서 단위 용량 형태로 공급된다. 투여 방식이 주입인 경우, 조성물은 멸균 약제학적 등급의 물 또는 식염수를 함유하는 주입 병으로 분배될 수 있다. 투여 방식이 주사에 의한 것인 경우, 멸균 주사용수 또는 식염수의 앰пу울을 제공하여 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있다.

[0345] 특히, 본 발명은 또한 예방제 또는 치료제, 또는 본 발명의 약제학적 조성물이 제제의 양을 나타내는 앰пу울 또는 사췌트와 같은 밀폐된 컨테이너에 팩키징된 것을 제공한다. 한 실시형태에서, 하나 이상의 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물은 밀폐된 컨테이너에서 무수 멸균된 동결건조된 분말 또는 물 부재 농축물로서 공급되고 피검체 투여용으로 적당한 농도로 재구성(예를 들면, 물 또는 식염수와 함께)될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 하나 이상의 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물은 밀폐된 컨테이너에 무수 멸균 동결건조된 분말로서 제공되고 단위 용량은 5 mg 이상, 보다 바람직하게는 10 mg 이상, 15 mg 이상, 25 mg 이상, 35 mg 이상, 45 mg 이상, 50 mg 이상, 75 mg 이상 또는 100 mg 이상이다. 동결건조된 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물은 이의 본래의 컨테이너에 2℃ 내지 8℃에서 저장되어야만 하고 본 발명의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물은 재구성된 후 1주 이내, 바람직하게는 5일 이내, 72시간 이내, 48시간 이내, 24시간 이내, 12시간 이내, 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내, 1시간 이내에 투여되어야만 한다. 선택적인 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물은 제제의 양 및 농도를 나타내는 밀폐된 컨테이너에서 액체 형태로 공급된다. 한 실시형태에서, 투여된 조성물의 액체 형태는 밀폐된 컨테이너에 0.25 mg/ml 이상, 보다 바람직하게는 0.5 mg/ml 이상, 1 mg/ml 이상, 2.5 mg/ml 이상, 5 mg/ml 이상, 8 mg/ml 이상, 10 mg/ml 이상, 15 mg/ml 이상, 25 mg/ml 이상, 50 mg/ml 이상, 75 mg/ml 이상 또는 100 mg/ml 이상으로 공급된다. 액체 형태는 이의 본래의 컨테이너에 2℃ 내지 8℃에서 저장되어야만 한다.

[0346] 본 발명의 결합 단백질은 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물에 혼입될 수 있다. 한 실시형태에서, 항체 또는 항체 일부는 항체 0.1 내지 250mg/ml를 포함하는 주사 용액으로 제조하는 것이 바람직하다. 주사 용액은 플린트 또는 호박색 바이엘, 앰플 또는 사전충진 주사기 중의 액체 또는 동결건조 투여 형태로 구성될 수 있다. 완충액은 pH 5.0 내지 7.0(최적으로는 pH 6.0)의 L-히스티딘(1-50mM), 최적으로는 5-10mM일 수 있다. 다른 적당한 완충액으로는 석신산나트륨, 구연산나트륨, 인산나트륨 또는 인산칼륨이 있으나, 이에 국한되지 않는다. 염화나트륨은 0 내지 300mM(액체 투여 형태인 경우 최적으로는 150mM)의 농도로 용액의 독성을 개질하는데 사용될 수 있다. 동결건조 투여 형태에는 동결방지제, 주로 0 내지 10% 슈크로스(최적으로는 0.5 내지 1.0%)가 첨가될 수 있다. 다른 적당한 동결방지제에는 트레할로스 및 락토스가 있다. 동결건조 투여 형태에는 벌크 제제(Bulking agent), 주로 1 내지 10% 만니톨(최적으로는 2 내지 4%)이 첨가될 수 있다. 액체 및 동결건조 투여 형태에는 안정화제, 주로 1 내지 50mM L-메티오닌(최적으로는 5 내지 10mM)이 첨가될 수 있다. 다른 적당한 벌크 제제(Bulking agent)에는 글리신, 아르기닌이 있으며, 이는 0 내지 0.05% 폴리소르베이트-80(최적으로는 0.005 내지 0.01%)으로서 포함될 수 있다. 또 다른 계면활성제에는 폴리소르베이트 20 및 BRIJ 계면활성제가 있으나, 이에 국한되지 않는다. 비경구 투여용의 주사가 가능한 용액으로 제조된 본 발명의 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 보조제로서 유용한 제제, 예를 들면, 치료학적 단백질(예를 들면, 항체)의 흡수 또는 분산을 증가시키는데 사용되는 것들을 추가로 포함할 수 있다. 특히 유용한 보조제는 Hylenex®과 같은 하이알루로니다제(제조함 사람 하이알루로니다제)이다. 주사가 가능한 용액중에 하이알루로니다제의 첨가는 비경구 투여 후, 특히 피하 투여 후 사람 생체이용률을 개선시킨다. 이는 또한 보다 큰 주사 부위 용적(즉 1ml 초과)을 가능하게 하고 통증 및 불쾌감이 덜하고 주사 부위 반응이 최소로 발생한다(WO2004078140, US2006104968).

[0347] 본 발명의 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이러한 형태에는 예를 들면 액체, 반고체 및 고체 투여 형태, 예를 들면 액체 용액(예, 주사 용액 및 주입 용액), 분산액 또는 현탁액, 정제, 환제, 산제, 리포솜 및 좌약 등이 포함된다. 바람직한 형태는 의도하는 투여 방식 및 치료 용도마다 다르다. 일반적으로 바람직한 조성물은 주사 용액 또는 주입 용액 형태, 예를 들면 다른 항체로 사람을 수동 면역화하는데 사용되는 조성물과 유사한 조성물이다. 선택한 투여 방식은 비경구(예를 들면, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내) 방식이다. 한 실시형태에서, 항체는

정맥내 주입 또는 주사로 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 근육내 또는 피하 주사로 투여된다.

- [0348] 치료학적 조성물은 일반적으로 멸균될 수 있고 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 한다. 이러한 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 분산액, 리포솜 또는 높은 약물 농도에 적당한 다른 주문 구조로 조제될 수 있다. 멸균 주사 용액은 필요량의 활성 화합물(즉, 항체 또는 항체 일부)을, 필요에 따라 앞에서 열거한 성분 중 하나 또는 성분의 조합과 함께 적당한 용매에서 혼합한 다음, 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질과 필요에 따라 전술한 다른 성분을 포함하는 멸균 매개체에 활성 화합물을 첨가하여 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조에 유용한 멸균 동결건조 분말의 경우에, 바람직한 제조방법은 전술한 멸균 여과 용액으로부터 활성 성분과 임의의 바람직한 추가 성분의 분말을 제공하는 진공 건조 및 분무 건조이다. 용액의 적당한 유체성은 예를 들면 레시틴과 같은 피복의 사용, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용을 통해 유지될 수 있다. 주사 조성물의 지속적 흡수는 조성물에 흡수 지연제, 예를 들면 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 첨가하여 제공할 수 있다.
- [0349] 본 발명의 결합 단백질은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 투여할 수 있지만, 다양한 치료학적 용도에서 바람직한 투여 경로/방식은 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입이다. 당업자라면 잘 알고 있듯이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라진다. 특정 실시형태에서, 활성 화합물은 이 화합물이 신속 방출되지 않게 하는 담체와 함께 조제될 수 있으며, 그 예에는 임플란트, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 비롯한 제어 방출 제형이 있다. 여기에는 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토포스테르 및 폴리락트산과 같은 생체분해성, 생체화합성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 다수의 방법은 특허되어 있거나 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다[참조예: J.R. Robinson, (ed.), Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., NY (1978)].
- [0350] 특정 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 예를 들면 불활성 희석제 또는 동화성 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 이러한 화합물(및 필요한 경우 다른 성분)은 또한 경질 또는 연질 외피의 젤라틴 캡슐에 충전되거나, 정제로 압착되거나 또는 피검체 식이에 직접 첨가될 수도 있다. 경구 치료 투여용인 경우, 상기 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취성 정제, 협착 정제, 트로키, 캡슐; 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여의 다른 방식으로 본 발명의 화합물을 투여하기 위해서는 화합물을 불활성화 방지용 물질로 피복하거나 또는 상기 방지용 물질과 함께 공동 투여할 필요가 있을 수 있다.
- [0351] 또한, 보충적 활성 화합물이 상기 조성물에 첨가될 수도 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 본 발명의 결합 단백질과 함께 장애를 치료하기에 유용한 하나 이상의 추가 치료제와 공동제형화되고/되거나 동시 투여된다. 예를 들면, 본 발명의 결합 단백질은 다른 표적(예를 들면, 다른 사이토카인에 결합하거나 세포 표면 분자에 결합하는 항체)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체와 공동조제 및/또는 공동투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 하나 이상의 항체는 전술한 치료제 2종 이상과 함께 사용될 수 있다. 이러한 병용 치료는 투여되는 치료제를 보다 낮은 용량으로 사용할 수 있게 하여 각종 단독치료법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있으므로 바람직하다.
- [0352] 특정 실시형태에서, 결합 단백질은 당업계에 공지된 반감기 연장 비히클에 연결되기도 한다. 이러한 비히클에는 Fc 도메인, 폴리에틸렌 글리콜 및 텍스트란이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 비히클은 미국 특허 제6,660,843 및 공개된 PCT 출원 WO 99/25044에 기술되어 있다.
- [0353] 특정 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질을 암호화하는 핵산 서열 또는 또 다른 예방제 또는 치료제는 유전자 치료에 의해 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 치료, 예방, 처리하거나 완화시키기 위해 투여된다. 유전자 치료법은 피검체에게 발현되거나 발현 가능한 핵산을 투여함에 의해 수행되는 치료법을 언급한다. 본 발명의 당해 실시형태에서, 핵산은 예방 또는 치료 효과를 매개하는 이의 암호화된 본 발명의 항체 또는 예방제 또는 치료제를 생산한다.
- [0354] 당업계에서 유용한 임의의 유전자 치료법이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 유전자 치료법의 일반적인 검토를 위해 문헌[Goldspiel et al. (1993) Clin. Pharm. 12: 488-505; Wu and Wu (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan (1993) Science 260: 926-932; 및 Morgan and Anderson (1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; May (1993) TIBTECH 11(5): 155-215]을 참조한다. 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술에 관해 당업계에 일반적으로 공지된 방법은 문헌[Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); and Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]에 기재되어 있다. 다양한 유전자 치료법에 대한 상세한 설명은 문헌[US20050042664 A1]에 기재되어 있다.

[0355]

본 발명의 결합 단백질은 결합 단백질에 의해 인식되는 표적이 유해한 각종 질환을 치료하는데 유용하다. 이러한 질병에는 류마티스성 관절염, 골관절염, 소아만성관절염, 폐혈성 관절염, 라임 관절염, 건선 관절염, 반응관절염, 척추관절염, 전신홍반루푸스, 크론병, 켈양성 결장염, 염증성 장 질환, 인슐린 의존 당뇨병, 갑상샘염, 천식, 알레르기병, 건선, 피부경화증, 이식대수증, 기관 이식거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역병, 사르코이드증, 죽상경화증, 파종 혈관내 응고, 가와사키병, 그레이브스병, 신장증후군, 만성피로증후군, 베게너 육아종증, 헨녹-셴라인 자반증(Henoch-Schonlein purpura), 신장의 현미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 폐혈 쇼크, 독소 쇼크 증후군, 폐혈증 증후군, 악액질, 감염성 질병, 기생충병, 후천성 면역결핍 증후군, 급성 횡단 척수염, 헌팅턴씨 무도병, 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 졸증, 원발성 담관성간경화증, 용혈빈혈, 악성암, 심장부전, 심근경색, 애디슨씨병, 산발성, 다선성 결핍 I형 및 다선성 결핍 II형, 슈미트씨 증후군, 성인(급성) 호르몬관증후군, 탈모증, 원형탈모증, 흡혈형관절증, 관절증, 라이터씨병, 건선관절증, 켈양성결장염관절증, 창자병 윤활막염, 클라미디아증, 예르시니아 및 살모넬라 관련 관절증, 척추관절증, 죽상병/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역수포병, 보통천포창, 낙엽천포창, 유사천포창, 선형 IgA 병, 자가면역 용혈빈혈, 콕스 양성 용혈빈혈, 후천성 악성빈혈, 소아악성빈혈, 근육통성 뇌염/로알 프리병(Royal Free Disease), 만성 점막피부칸디다증, 거대세포 동맥염, 원발성 경화증 간염, 잠복성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍증후군, 후천성 면역결핍 관련병, B형 간염, C형 간염, 공통가변성면역결핍(공통가변성 저감마글로불린혈증), 확장성 심근증, 여성 불임, 난소부전증, 조숙 난소부전, 섬유소성 폐질환, 잠복성 섬유화 폐포염, 염증후 간질성 폐질환, 간질성 폐렴, 결합조직병 관련 간질성 폐병, 복합 결합조직병 관련 폐병, 전신 경화증 관련 간질성 폐병, 류마티스성 관절염 관련 간질성 폐병, 전신홍반루푸스 관련 폐병, 피부근육염/다발근육염 관련 폐병, 쇼그렌병 관련 폐병, 강직척추염 관련 폐병, 혈관염성 광범위 폐병, 혈철소증 관련 폐병, 약물 유도 간질성 폐병, 섬유증, 방사선 섬유증, 폐쇄세기관지염, 만성 호산구성 폐렴, 림프구성 침윤 폐병, 감염후 간질성 폐병, 통풍 관절염, 자가면역 간염, 1형 자가면역 간염(고전적 자가면역 또는 루푸스 간염), 2형 자가면역 간염(항LKM 항체 간염), 자가면역 매개 저혈당증, 흑색가시세포증 관련 B형 인슐린 내성, 부갑상샘항진증, 기관 이식 관련 급성 면역 질환, 기관 이식 관련 만성 면역 질환, 골관절염, 원발성 경화담관염, 1형 건선, 2형 건선, 특발 백혈구감소증, 자가면역 호중구 감소증, 신장병 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 혈관염, 라임병, 원반형 홍반루푸스, 특발성 또는 NOS 남성 불임, 정자 자가면역성, 다발성 경화증(모든 아형), 교감성 안염, 결합조직 질환에 부차적인 폐 고혈압, 굿파스처 증후군, 결절다발동맥염의 폐동맥 징후, 급성 류마티스열, 류마티스성 척추염, 스틸스병, 전신 경화증, 쇼그렌 증후군, 다카야스씨병/동맥염, 자가면역 저혈소판증, 특발 저혈소판증, 자가면역 갑상샘 질환, 갑상샘항진증, 갑상샘증 자가면역 갑상샘항진증(하시모토씨병), 위축 자가면역 갑상샘항진증, 원발성 점액부종, 수정체성 포도막염, 원발성 혈관염, 백반증, 급성 간질환, 만성 간질환, 알콜간경화증, 알콜 유도 간손상, 담즙정체, 특이 간질환, 약물 유도 간염, 비알콜성 지방간염, 알레르기 및 천식, 그룹 B 스트렙토코커스(GBS) 감염, 정신 질환(예, 우울증 및 정신분열병), Th2 타입 및 Th1 타입 매개 병, 급성 및 만성 통증 및 암, 예를 들면 폐, 유방, 위, 방광, 결장, 췌장, 난소, 전립선 및 직장의 암 및 조혈계 암(백혈병 및 림프종), A베타지방단백질혈증, 말초척색증, 급성 및 만성 기생충성 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프성모구성 백혈병(ALL), 급성 골수 백혈병(AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신부전증, 선암증, 공기 이소성 심방박동, AIDS 치매 합병증, 알콜 유도 간염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 접촉 피부염, 알레르기성 비염, 동종이식 거부, 알파-1-안티트립신 결핍, 근위축성 측삭 경화증, 빈혈, 협심증, 전각 세포 퇴화, 항 cd3 치료, 항 인지질 증후군, 항-수용체 과민성 반응, 대동맥 및 말초 결찰증, 대동맥 해부, 동맥 고혈압, 동맥경화증, 동정맥 누공, 운동실조증, 심방세동 (지연 또는 발작성), 심방조동, 동정맥 막힘, B 세포 림프종, 골 이식 거부, 골수 이식(BMT) 거부, 좌각차단, 버키트 림프종, 화상, 심장성 부정맥, 심장성 기절 증후군, 심장 종양, 심근증, 심폐 우회 염증 반응, 연골 이식 거부, 소뇌피질 퇴화, 소뇌 장애, 혼란 또는 다초점 심방 빈맥, 화학 치료 관련 장애, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 알콜증, 만성 염증 병리, 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 폐쇄 폐 질환(COPD), 만성 살리실레이트 중독, 결장직장 암증, 율혈성 심부전, 결막염, 접촉성 피부염, 폐 심장, 관상 동맥 질환, 크루츠펠트-자콕(Creutzfeldt-Jakob) 질환, 배양 음성 폐혈증, 낭성유증, 사이토카인 치료 관련 장애, 권투선수치매(Dementia pugilistica), 탈수초성질환, 땀기 출혈열, 피부염, 피부학적 증상, 당뇨병, 진성 당뇨병, 당뇨병성 동맥경화 질환(diabetic atherosclerotic disease), 광범위 루이체 질환, 확장성 율혈성 심근증, 기저핵 장애, 중년 다운 증후군, CNS 도파민 수용체 차단 약물에 의해 유도된 약물 유도 운동 장애, 약물 과민증, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비질환, 후두개염, 엡스타인-바르 바이러스 감염, 피부홍통증, 추체외로 및 소뇌 장애, 가족성 적혈구잠식성 림프조직구증, 태아 흡선 이식 거부, 프리드리히 운동실조증, 기능성 말초 동맥 장애, 진균류 폐혈증, 가스괴저, 위궤양, 사구체신염, 임의의 기관 또는 조직 이식 거부, 그람 음성 폐혈증, 그람 양성 폐혈증, 세포내 기관으로 인한 육아종, 모발 세포 백혈병, 할레르르덴-스파츠 질환(Hallerrorden-Spatz disease), 하시모토 갑상선염, 고초열, 심장 이식 거부, 혈색소증, 혈액투석, 용혈성 요독

증후군/혈전성 혈소판감소성 자반증, 출혈, 간염(A), 히스 다발 부정맥, HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨 질환, 과운동성 장애, 과민성 반응, 과민성 폐렴, 고혈압, 운동 부족 장애, 시상하부-뇌하수체-부신피질계 평가, 특발성 애디슨 질환, 특발성 폐 섬유증, 항체 매개 세포독성, 무력증, 유아 척추 근육 위축증, 대동맥 염증, 인플루엔자 A, 이온화 방사선 노출, 홍채섬모체염/자궁염/광학적 신경근염, 허혈 관류 손상, 허혈 뇌졸중, 연소성 류마티스 관절염, 연소성 척추 근육 위축증, 카포시 육종, 신장 이식 거부, 레지오넬라, 리슈마니아증, 나병, 피질척수계 병변, 지방부종, 간 이식 거부, 림프피부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구종, 악성 흑색종, 뇌막염, 수막염 균혈증, 대사/특발성, 편두통, 미토콘드리아 다중 시스템 장애, 복합 연결 조직 질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 다발성 골수종, 다발성 시스템 퇴화(벤셀 데제린-토마스 쉬-드라거 및 마차도-조셉), 중증 근무력증, 세포내 마이코박테리움 감염증, 마이코박테리움 결핵, 골수이형성증후군, 심근 경색, 심근 허혈 장애, 비인두 암종, 신생아 만성 폐 질환, 신염, 신증, 신경퇴행성 질환, 신경성 I 근육 위축증, 호중구감소성 발열, 비-호지킨 림프종, 복부 대동맥 및 이의 지류 폐색, 폐색성 동맥 질환, okt3 치료, 고환염/부고환염, 고환염/절관절제술 반전 과정, 기비대, 골다공증, 췌장 이식 거부, 췌장 암종, 부수종양성 증후군/악성 고갈습혈증, 부갑상선 이식 거부, 골반 염증 질환, 다년성 비염, 심막 질환, 말초 동맥경화 질환, 말초 혈관 장애, 복막염, 악성빈혈, 폐포자충 폐렴, 폐렴, POEMS 증후군 (다발신경병증, 장기비대, 내분비질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 및 피부 변화 증후군), 관류후 증후군, 펌프후 증후군, MI 후 심장절개 증후군, 자간전증, 전진적 상핵 마비, 원발성 폐 고혈압, 방사선 치료, 레이노드 현상 및 질환, 레이노드 질환, 레프섬 질환, 일반 협소 QRS 심근증, 신혈관성고혈압, 재관류 손상, 제한성 심근병증, 육종, 피부경화증, 노인 무도병, 루이체형 노인성 치매, 혈청음성 관절병증, 쇼크, 겸상적혈구 빈혈증, 피부 동종이식 거부, 피부 변화 증후군, 소장 이식 거부, 고형 종양, 특이적 부정맥, 척추운동실조, 척수손괴 퇴화, 스트렙토코커스 근염, 소뇌 구조적 병변, 아급성 경화성 범뇌염, 실신, 심혈관계 매독, 전신 아나팔락시스, 전신 염증 반응 증후군, 전신 개시 연소성 류마티스 관절염, T-세포 또는 FAB ALL, 말초혈관 확장증, 폐색성 혈전 혈관염, 혈소판감소증, 독성, 이식, 외상/출혈, III형 과민성 반응, IV형 과민성, 불안정 협심증, 요독증, 요로폐혈증, 두드러기, 승모관 심장 질환, 하지 정맥, 혈관염, 정맥동 질환, 정맥동 혈전증, 심실 세동, 바이러스 및 진균류 감염, 바이탈 뇌염/무균성 수막염, 바이탈-연관 적혈구식작용 증후군, 베르니케-코르사코프 증후군, 윌슨 질환, 임의의 기관 또는 조직의 이종이식 거부를 포함하지만 이에 제한되지 않는다(참조예: PCT 공개 제W02002097048호; 제W09524918호; 및 제W000/56772A1호).

[0356] 본 발명의 DVD-Ig는 또한 하기의 질환 중 하나 이상을 치료할 수 있다: 급성 관상 증후군, 급성 특발성 다발신경근염, 급성 염증 탈수소성 다발성 신경염, 급성 허혈, 성인 스틸스 질환, 원형탈모증, 아나필락시스증(anaphylaxis), 항-인지질 항체 증후군, 재생불량성빈혈, 동맥경화증, 아토피성 습진, 아토피성 피부염, 자가면역 피부염, 스트렙토코커스 감염과 관련된 자가면역 장애, 자가면역 난청, 자가면역 림프구증식성 증후군(ALPS), 자가면역 심근염, 자가면역 혈소판감소증(AITP), 안건염, 기관지확장증, 수포성 유전포창, 심혈관 질환, 악성 항인지질 증후군, 셀리악 질환(celiac disease), 경추 척추증, 만성 허혈, 반흔성 유전포창, 다발성 경화에 대한 위험을 갖는 임상적으로 분리된 증후군(CIS), 결막염, 유년기 개시 정신성 장애, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 누낭염, 피부근염, 당뇨 망막증, 진성 당뇨병, 요추간반탈출증, 추간관내장증, 약물 유도 면역 용혈성 빈혈, 심내막염, 자궁내막증, 내안구염, 상공막염, 다형홍반, 중증 다형홍반, 임신성 유전포창, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome) (GBS), 건초열, 휴즈 증후군(Hughes syndrome), 특발성 파킨슨 질환, 특발성 간질 폐렴, IgE 매개된 알레르기, 면역 용혈성 빈혈, 봉입체 근염, 감염성 안구 염증 질환, 염증 탈수초 질환, 염증 심장 질환, 염증 신장 질환, IPF/UIP, 홍채염, 각막염, 건성각결막염, 쿠스마울 질환 또는 쿠스마울-마이어 질환, 란드리 마비, 랑게르한스 세포 조직구종, 열성홍반(livedo reticularis), 황반변성, 악성 종양, 현미경적 혈관염, 베체트병, 운동 뉴런 장애, 점막 유전포창, 다발성 기관 부전증, 중증 근무력증, 골수이형성 증후군, 심근염, 신경근 장애, 신경병증, 비-A 비-B 간염, 시신경염, 골용해, 난소암,

[0357] 소수관절 JRA, 말초 동맥 폐색성 질환 (PAOD), 말초 혈관 질환 (PVD), 말초 동맥 질환 (PAD), 정맥염, 결절성 다발 동맥염 (또는 결절성 동맥주위염), 다발연골염, 류마티스성 다발성 근육통, 백모증, 다발성 관절 JRA, 다발성 내분비 결핍 증후군, 다발성근염, 류마티스성 다발성 근육통 (PMR), 펌프 후 증후군, 1차 파킨슨병, 전립선 및 직장암 및 조혈 악성 종양(백혈병 및 림프종),

[0358] 전립선염, 순수적혈구 저형성증, 1차 부신 부전증, 재발성 시속신경근염, 협착증, 류마티스 심장 질환, 사포(활막염, 여드름, 농포증, 및 골염), 피부경화증, 2차 아밀로이드증, 폐 쇼크, 상공막염, 좌골신경통, 2차 부신 부전증, 실리콘 관련 연결 조직 질환, 스넬돈-윌킨슨(sneddon-wilkinson) 피부증, 강직성 척추염, 스티븐-존슨 증후군 (SJS), 전신 염증 반응 증후군, 일시적 동맥염, 특소플라스믹 망막증, 독성 표피 괴사, 횡단척수염, TRAPS (종양 괴사 인자 수용체, 1형 알레르기 반응, II형 당뇨병, 두드러기, 통상의 간질 폐렴 (UIP), 혈관염,

준계각결막염, 바이러스 망막염, 보그트-고야나기-하라다 증후군 (VKH 증후군), 습윤 황반 변성 및 상처 치료.

- [0359] 본 발명의 결합 단백질은 자가면역 질환, 특히, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 알레르기, 자가면역 당뇨병 및 자가면역 포도막염을 포함하는, 염증과 관련된 자가면역 질환을 앓는 사람을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부를 사용하여 류마티스 관절염, 크론 질환, 다발성 경화증, 인슐린 의존성 진성 당뇨병 및 건선을 치료하기 위해 사용된다.
- [0360] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 조성물과 방법으로 치료되거나 진단될 수 있는 질환은 유방암, 결장암, 직장암, 폐암, 구인두암, 두경부암, 식도암, 위암, 췌장암, 간암, 방광암 및 담관암, 소장암, 노관암(신장암, 방광암 및 요상피암을 포함), 여성 생식관암 (경부암, 자궁암 및 난소암, 및 용모막상피종 및 생식 용모상피성 질환), 남성 생식관암 (전립선암, 저정낭암, 고환암 및 생식 세포 종양을 포함), 내분비선암 (갑상선암, 부신암 및 뇌하수체암을 포함), 및 피부암, 및 혈관종, 흑색종, 육종 (골 기원 암 및 연조직 기원의 암 및 카포시 육종을 포함), 뇌암, 신경암, 안구암, 및 수막암 (성상세포종, 신경아교종, 아교모세포종, 망막아세포종, 신경종, 신경아세포종, 양성종양, 및 수막종을 포함), 조혈 악성 종양으로 유래되는 고형 종양, 예를 들면, 백혈병 및 림프종(호지킨 및 비호지킨 림프종 둘다)을 포함하는, 원발성 및 전이성 암을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0361] 한 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 단독으로 또는 방사선치료요법 및/또는 다른 화학치료제와 병용하여 사용되는 경우 암을 치료하거나 본원에 기재된 종양으로부터의 전이를 예방 또는 억제하기 위해 사용된다.
- [0362] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig는 예방제 또는 치료제 및 세포 단백질에 결합하여 특정 표적 기관, 조직 또는 세포, 또는 조직 또는 세포의 부류에 국소화된 약물 전달을 제공한다. 한 실시형태에서, DVD-Ig는 세포 표면 항원 및 예방제 또는 치료제에 결합한다. 예방제 또는 치료제는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방하거나, 관리하거나, 치료하거나, 완화시키는데 유용하고, 예를 들면, 리포솜내 입자, 미세입자, 미세캡슐, 항체 또는 항체 단편을 발현할 수 있는 재조합 세포, 줄기 세포, 수용체-매개된 세포내이입(예를 들면, Wu and Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432 참조), 펩타이드, 핵산(예를 들면, 안티센스 DND 또는 RNA 또는 다른 유전자 치료), 펩타이드 핵산(PNA), 나노입자, 방사선치료제, 레트로바이러스 또는 기타 벡터, 항균제, 항바이러스제, 항기생충제, 또는 항진균제, 항-신생물제, 화학치료제, 예를 들면 DNA 알킬화제, 시스플라틴, 카보플라틴, 항-튜블린제, 파클리탁셀, 도세탁셀, 탁솔, 독소루비신, 겐시타빈, 겐자르, 안트라사이클린, 아드리아마이신, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 5-플루오로우라실(5-FU), 류코보린, 이리노테칸, 수용체 티로신 키나제 억제제(예를 들어, 에를로티니브, 게피티니브), COX-2 억제제(예를 들어, 셀렉코시브), 키나제 억제제 및 siRNA, 사이토카인 억제성 소염 약물(들)(CSAID)이 있다.
- [0363] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig는 메토크세이트, 6-MP, 아자티오프린, 설파살라진, 메살라진, 올살라진, 클로로퀸/하이드록시클로로퀸, 펜실라민, 오로티오말레이트, 아자티오프린, 콜히친, 코르티코스테로이드, 베타-2 아드레날린수용체 효능제(살부타몰, 터부탈린, 살메테랄), 크산틴(테오필린, 아미노필린), 크로모글리케이트, 네도크로밀, 케토티펜, 이프라트로핀 및 옥시트로핀, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, NSAID, 예를 들면, 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예를 들면, 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, 전염증성 사이토카인, 예를 들면 TNF α 또는 IL-1에 의한 신호 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 β 전환 효소 억제제, TNF α 전환 효소(TACE) 억제제, T-세포 신호 전달 억제제(예: 키나제 억제제), 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이의 유도체(예, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체 및 유도체 p75TNFRIgG(Enbrel™ 및 p55TNFRIgG(Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), 성장 인자, 사이토카인, 세포독성 단백질(예를 들면, TNF), 소염성 사이토카인(예, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β), 셀렉코시브, 엽산, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 로페콕시브, 항체 또는 이의 유도체 또는 접합체(예, 인플릭시마브 또는 리툭시마브), 나프록센, 발데콕시브, 설파살라진, 메틸프레드니솔론, 멜록시감, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 골드 나트륨 티오말레이트, 아스피린, 트리암시놀론 아세토나이드, 프로폭시펜 나프실레이트/apap, 플레이트, 나부메톤, 디클로페낙, 피록시감, 에토돌락, 디클로페낙 나트륨, 옥사프로진, 옥시코돈 hcl, 하이드로코돈 비타르트레이트/apap, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 펜타닐, 아나킨라, 사람 재조합체, 트라마돌 hcl, 살살레이트, 설린달, 시아노코발라민/fa/피리독신, 아세트아미노펜, 알렌드로네이트 나트륨, 프레드니솔론, 몰핀 설페이트, 리도카인 하이드로클로라이드, 인도메타신, 글루코사민 설프/콘드로이틴, 아미트립틸린 hcl, 설파디아진, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 올로파타딘 hcl, 미소프로스톨, 나프록센 나트륨, 오메프라졸, 시클로포스파미드, 리툭시마브, IL-1

TRAP, MRA, CTLA4-Ig, IL-18BP, 항-IL-18, 항-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, 로플루밀라스트, IC-485, CDC-801 및 메소프람에 결합한다.

[0364]

다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID)(들); 사이토카인 억제성 소염 약물(CASID)(들); 항체 또는 이의 유도체 또는 접합체[예를 들면, CDP571/BAY-10-3356(사람화된 항-TNF α 항체; Celltech/Bayer); cA2/인플릭시마브(키메라 항-TNF α 항체; Centocor); 75 kDTNFR-IgG/에타너셉트(75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; Immunex); 55 kDTNF-IgG(55 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396(비-고갈성 영장류화된 항-CD4 항체; IDEC/SmithKline; DAB 486-IL-2 및/또는 DAB 389-IL-2(IL-2 융합 단백질; Seragen); Anti-Tac(사람화된 항-IL-2Ra; Protein Design Labs/Roche)]; IL-4(소염성 사이토카인; DNAX/Schering); IL-10(SCH 52000; 재조합 IL-10, 소염성 사이토카인; DNAX/Schering); IL-4; IL-10 및/또는 IL-4 효능제(예를 들면, 효능제 항체); IL-1RA(IL-1 재조합 길항제; Synergen/Amgen); 아나킨라(Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF(가용성 TNF 결합 단백질); R973401(포스포디에스테라제 유형 IV 억제제); MK-966(COX-2 억제제); 일프로스트; 메토티렉세이트; 탈리도미드 및 탈리도미드-관련 약물(예를 들면, Celgen); 레플루노미드(소염성 및 사이토카인 억제제); 트렉삼산(플라스미노겐 활성화의 억제제); T-614(사이토카인 억제제); 프로스타글란딘 E1; 테니덱(비-스테로이드성 소염 약물); 나프록센(비-스테로이드성 소염 약물); 멜록시캄(비-스테로이드성 소염 약물); 이부프로펜(비-스테로이드성 소염 약물); 피록시캄(비-스테로이드성 소염 약물); 디클로페낙(비-스테로이드성 소염 약물); 인도메타신(비-스테로이드성 소염 약물); 설파살라진; 아자티오프린; ICE 억제제(효소 인터류킨-1b 전환 효소의 억제제); zap-70 및/또는 lck 억제제(티로신 키나제 zap-70 또는 lck의 억제제); VEGF 억제제 및/또는 VEGF-R 억제제(혈관 내피 세포 성장 인자 또는 혈관 내피 세포 성장 인자 수용체의 억제제; 혈관신생의 억제제); 코르티코스테로이드 소염 약물(예를 들면, SB203580); TNF-전환효소 억제제; 항-IL-12 또는 항-IL-18 항체 또는 이의 유도체 또는 접합체; 인터류킨-11; 인터류킨-13; 인터류킨-17 억제제; 금; 페니실라민; 클로로퀸; 클로람부실; 하이드록시클로로퀸; 사이클로스포린; 사이클로포스파미드; 충 림프계 조사; 항-홍선 글로불린; 항-CD4 항체 또는 이의 유도체 또는 접합체; CD5-독소; 경구 투여된 쥬베타이드 및 콜라겐; 로벤자리트 이나트륨; 사이토카인 조절제(CRA) HP228 및 HP466(Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 안티센스 포스포로티오에이트 올리고-데옥시뉴클레오타이드(ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); 가용성 보체 수용체 1(TP10; T Cell Sciences, Inc.); 프레드니손; 오르코테인; 글리코사미노글리칸 폴리설페이트; 미노사이클린; 항-IL2R 항체 또는 이의 유도체 또는 접합체; 해양 및 식물 지질(어류 및 식물 종자 지방산; 예를 들면, DeLuca et al. (1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21:759-777 참조); 아우라노핀; 페닐부타존; 메클로페남산; 플루페남산; 정맥내 면역글로불린; 질레우톤; 아자리빈; 마이코페놀산(RS-61443); 타크롤리무스(FK-506); 시롤리무스(라파마이신); 아미프릴로스(테라펙틴); 클라드리빈(2-클로로데옥시아데노신); 메토티렉세이트; bcl-2 억제제(참조: Bruncko et al. (2007) J. Med. Chem. 50(4):641-662); 항바이러스제 및 면역 조절제에 결합한다.

[0365]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 류마티스성 관절염의 치료를 위한 하기 제제 중 하나에 결합하고, 예를 들면 KDR의 소분자 억제제, Tie-2의 소분자 억제제; 메토티렉세이트; 프레드니손; 셀레콕시브; 엽산; 하이드록시클로로퀸 설페이트; 로페콕시브; 에타너셉트 또는 인플릭시마브 또는 이의 유도체 또는 접합체; 레플루노미드; 나프록센; 발데콕시브; 설파살라진; 메틸프레드니솔론; 이부프로펜; 멜록시캄; 메틸프레드니솔론 아세테이트; 골드 나트륨 티오말레이트; 아스피린; 아자티오프린; 트리암시놀론 아세토나이드; 프로폭시펜; 나프실레이트/apap; 폴레이트; 나부메톤; 디클로페낙; 피록시캄; 에토돌락; 디클로페낙 나트륨; 옥사프로진; 옥시코돈 hcl; 하이드로코돈 비타르테이트/apap; 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨; 펜타닐; 아나킨라, 사람 재조합체; 트라마돌 hcl; 살살레이트; 설린닥; 시아노코발라민/fa/피리독신; 아세트아미노펜; 알렌드로네이트 나트륨; 프레드니솔론; 몰핀 설페이트; 리도카인 하이드로클로라이드; 인도메타신; 글루코사민 설페이트/콘드로이틴; 사이클로스포린; 아미트립틸린 hcl; 설파디아진; 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜; 올로파타딘 hcl; 미소프로스톨; 나프록센 나트륨; 오메프라졸; 마이코페놀레이트 모페틸; 사이클로포스파미드; 리툭시마브 또는 이의 유도체 또는 접합체; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-Ig 또는 이의 유도체 또는 접합체; IL-18 BP; IL-12/23; 항-IL 18 또는 이의 유도체 또는 접합체; 항-IL 15 또는 이의 유도체 또는 접합체; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; 로플루밀라스트; IC-485; CDC-801; 및 메소프람이 있다.

[0366]

다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 염증성 장 질환 치료제, 예를 들면, 부데노시드; 표피 성장 인자; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린; 설파살라진; 아미노살리실레이트; 6-머캅토폴린; 아자티오프린; 메트로니다졸; 리폭시게나제 억제제; 메살라민; 올살라진; 발살라지드; 항산화제; 트롬복산 억제제; IL-1 수용체 길항제; 항-IL-1 β mAb 또는 이의 유도체 또는 접합체; 항-IL-6 mAb 또는 이의 유도체 또는 접합체; 성장 인자; 엘라스타제 억제제; 피리디닐-이미다졸 화합물; 다른 사람 사이토카인 또는 성장 인자, 예를 들면 TNF, LT,

IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF 등에 대한 항체 또는 길항제, 또는 이들의 유도체 또는 접합체에 결합한다.

[0367] 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 세포 표면 분자, 예를 들면 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69에, 메토크세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 예를 들면, 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예를 들면 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, TNF α 또는 IL-1과 같은 전염증성 사이토카인에 의한 신호 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 β 전환 효소 억제제, TNF α 전환 효소 억제제, T-세포 신호 전달 억제제, 예를 들면 키나제 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 설과살라진, 아자티오프린 6-머캅토피린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이들의 유도체(예, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) 및 소염성 사이토카인(예, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β) 및 bcl-2 억제제로서 결합한다.

[0368] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 크론 질환 치료제, 예를 들면, TNF 길항제, 예를 들면, 항-TNF 항체, 아달리무마브(PCT 공개 제 WO 97/29131호 Humira), CA2(Remicade), CDP 571, TNFR-Ig 작제물, (p75TNFRIGG (Enbrel) 및 p55TNFRIGG (Lenercept)) 억제제 또는 이의 유도체 또는 접합체 및 PDE4 억제제에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 코르티코스테로이드, 예를 들면, 부테노시드 및 텍사메타손에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 설과살라진, 5-아미노살리실산 및 올살라진, 및 IL-1과 같은 전염증성 사이토카인의 합성 또는 작용을 방해하는 제제, 예를 들면 IL-1b 전환 효소 억제제 및 IL-1ra에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 T 세포 신호링 억제제, 예를 들면, 티로신 키나제 억제제 6-머캅토피린에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 IL-11에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 메살라민, 프레드니손, 아자티오프린, 머캅토피린, 인플릭시마브 또는 이의 유도체 또는 접합체, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 디페녹실레이트/아트로프 설페이트, 로페라미드 하이드로클로라이드, 메토크세이트, 오메프라졸, 폴레이트, 시프로플록사신/텍스트로스-물, 하이드로코돈 비타르테이트/apap, 테트라사이클린 하이드로클로라이드, 플루오신노니드, 메트로니다졸, 티메로살/붕산, 콜레스티라민/슈크로스, 시프로플록사신 하이드로클로라이드, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 프로메타진 하이드로클로라이드, 나트륨 포스페이트, 설과메톡사졸/트리메토프림, 셀레콕시브, 폴리카르보필, 프로폭시펜 나프실레이트, 하이드로코르티손, 멀티비타민, 발살라지드 이나트륨, 코데인 포스페이트/apap, 콜레세벨람 hcl, 시아노코발라민, 엽산, 레보플록사신, 메틸프레드니솔론, 나탈리주마브 또는 이의 유도체 또는 접합체 및 인터페론-알파, 인터페론-베타, 및 인터페론-감마에 결합한다.

[0369] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 다발성 경화증 치료제, 예를 들면, 코르티코스테로이드; 프레드니솔론; 메틸프레드니솔론; 아자티오프린; 사이클로포스파미드; 사이클로스포린; 메토크세이트; 4-아미노피리딘; 티자니딘; 인터페론- β 1a(AVONEX; Biogen); 인터페론- β 1b(BETASERON; Chiron/Berlex); 인터페론 α -n3(Interferon Sciences/Fujimoto), 인터페론- α (Alfa Wassermann/J&J), 인터페론 β 1A-IF(Serono/Inhale Therapeutics), 페그인터페론 α 2b(Enzon/Schering-Plough), 코폴리머 1(Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); 고압 산소; 정맥내 면역글로불린; 클라브리빈; 다른 사람 사이토카인 또는 성장인자 및 이의 수용체, 예컨대 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF에 대한 항체 또는 길항제 또는 이들의 유도체 또는 접합체에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90과 같은 세포 표면 분자 또는 이의 리간드에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 메토크세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, NSAID, 예를 들면, 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예를 들면, 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린 제제, TNF α 또는 IL-1에 의한 신호 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 β 전환효소 억제제, TACE 억제제, T-세포 신호 전달 억제제(예: 키나제 억제제), 메탈로프로테이나제 억제제, 설과살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이의 유도체(예, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), 소염성 사이토카인(예, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β) 및 bcl-2 억제제에 결합한다.

[0370] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 다발성 경화증 치료제의 예로는, 예를 들면, 인터페론- β , 예를 들면, IFN β 1a 및 IFN β 1b; 코팩손; 코르티코스테로이드, 카스파제 억제제, 예를 들면 카스파제-1의 억제제, IL-1 억제제, TNF 억제제, 및 CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체가 포함된다.

[0371] 본 발명의 결합 단백질은 하기 제제 또는 이의 유도체 또는 접합체에 결합한다: 알렘투주마브, 드로나비롤, 유

니메드, 다칼리주마브, 미토크산트론, 크살리프로텐 하이드로클로라이드, 팜프리딘, 글라티라머 아세테이트, 나탈리주마브, 신나비돌, a-임퓨노킨 NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, 케모카인 수용체 길항제, BBR-2778, 칼라구알린, CPI-1189, LEM(리포좀 캡슐화된 미토크산트론), THC.CBD(칸나비노이드 효능제) MBP-8798, 메소프람(PDE4 억제제), MNA-715, 항-IL-6 수용체 항체, 뉴로박스, 피르페니돈, 알로트랩 1258(RDP-1258), sTNF-R1, 탈람파넬, 테리플루노마이드, TGF-베타2, 티플리모타이드, VLA-4 길항제(예를 들면, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), 인터페론 감마 길항제, IL-4 효능제에 결합한다.

[0372] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 협심증 치료제, 예를 들면, 니트로글리세린, 이소소르비드 모노니트레이트, 메토프롤롤 석시네이트, 아테놀로, 메토프롤롤 타르테이트, 암로디핀 베실레이트, 딜티아젠프 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 클로피도그렐 비셀레이트, 니페디핀, 아토바스타틴 칼슘, 염화 칼륨, 푸로세미드, 심바스타틴, 베라파밀 hcl, 디곡신, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 카베딜롤, 리시노프릴, 스피로놀락톤, 하이드로클로로티아지드, 에나라프릴 말레이트, 나돌로, 라미프릴, 에녹사파린 나트륨, 헤라핀 나트륨, 발사르탄, 소탈로 하이드로클로라이드, 페노피브레이트, 에제티미브, 부메타니드, 로사탄 칼륨, 리시노프릴/하이드로클로로티아지드, 펠로디핀, 캅토프릴, 비소프롤롤 푸마레이트에 결합한다.

[0373] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 강직성 척추염 치료제, 예를 들면, 이부프로펜, 디클로페낙 및 미소프로스톨, 나프록센, 펠록시캄, 인도메타신, 디클로페낙, 셀레코시브, 로페코시브, 설파살라진, 메토평렉세이트, 아자티오프린, 미노사이클린, 프레드니손, 에타너셉트, 인플릭시마브, 및 이들의 유도체 또는 접합체에 결합한다.

[0374] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 천식 치료제, 예를 들면, 알부테롤, 살메테롤/플루티카손, 몬테루카스트 나트륨, 플루티카손 프로피오네이트, 부데소나이드, 프레드니손, 살메테롤 크시나포에이트, 레발부테롤 hcl, 알부테롤 설페이트/이프라트로프, 프레드니솔론 나트륨 포스페이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 베클로메타손 디프로피오네이트, 이프라트로프 브로마이드, 아지트로마이신, 피르부테롤 아세테이트, 프레드니솔론, 무수 테오필린, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 클라리트로마이신, 자피르루카스트, 포르모테롤 푸마레이트, 인플루엔자 바이러스 백신, 메틸프레드니솔론, 아목시실린 트리하이드레이트, 플루니솔리드, 알레르기 주사, 크로몰린 나트륨, 펙소페나딘 하이드로클로라이드, 플루니솔리드/멘톨, 아목시실린/클라불라네이트, 레보플록사신, 흡입기 보조 장치, 구아이페네신, 텍사메타손 나트륨 포스페이트, 목시플록사신 hcl, 독시사이클린 하이드레이트, 구아이페네신/d-메토르판, p-에페드린/cod/클로르페니르, 가티플록사신, 세티리진 하이드로클로라이드, 모메타손 푸로에이트, 살메테롤 신나포에이트, 벤조나테이트, 세팔렉신, pe/하이드로코돈/클로르페니르, 세티리진 hcl/슈도에페드, 페닐에프린/cod/프로메타진, 코데인/프로메타진, 세프프로질, 텍사메타손, 구아이페네신/슈도에페드린, 클로페니라민/하이드로코돈, 네도크로밀 나트륨, 테르부탈린 설페이트, 에피네프린, 메틸프레드니솔론, 메타프로테레놀 설페이트에 결합한다.

[0375] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 COPD 치료제, 예를 들면, 알부테롤 설페이트/이프라트로프, 이프라트로프 브로마이드, 살메테롤/플루티카손, 알부테롤, 살메테롤 신나포에이트, 플루티카손 프로피오네이트, 프레드니손, 무수 테오필린, 메틸프레드니솔론, 나트륨 석시네이트, 몬테루카스트 나트륨, 부데소나이드, 포르모테롤 푸마레이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 레보플록사신, 구아이페네신, 아지트로마이신, 베클로메타손 디프로피오네이트, 레발부테롤 hcl, 플루니솔리드, 세프트리악손 나트륨, 아목시실린 트리하이드레이트, 가티플록사신, 자피르루카스트, 아목시실린/클라불라네이트, 플루니솔리드/멘톨, 클로르페니라민/하이드로코돈, 메타프로테레놀 설페이트, 메틸프레드니솔론, 모메타손 푸로에이트, p-에페드린/cod/클로르페니르, 피르부테롤 아세테이트, p-에페드린/로라타딘, 테르부탈린 설페이트, 티오트로프 브로마이드, (R,R)-포르모테롤, TgAAT, 실로밀라스트, 로플루밀라스트에 결합한다.

[0376] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 HCV 치료제, 예를 들면, 인터페론-알파-2a, 인터페론-알파-2b, 인터페론-알파 con1, 인터페론-알파-n1, 폐결화된 인터페론-알파-2a, 폐결화된 인터페론-알파-2b, 리바비린, 페그인터페론 알파-2b + 리바비린, 우르소데옥시콜린산, 글리시리진산, 티말파신, 막사민, VX-497 및 하기 표적: HCV 폴리머라제, HCV 프로테아제, HCV 헬리카제, HCV IRES(내부 리보솜 진입 부위)의 간섭을 통해 HCV를 치료하는데 사용되는 임의의 화합물에 결합한다.

[0377] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 특별 폐 섬유증 치료제, 예를 들면, 프레드니손, 아자티오프린, 알부테롤, 콜히친, 알부테롤 설페이트, 디곡신, 감마 인터페론, 메틸프레드니솔론 sod succ, 로라제팜, 후로세미드, 리시노프릴, 니트로글리세린, 스피로놀락톤, 시클로포스파미드, 이프라트로프 브로마이드, 악티노마이신 d, 알테플라스, 플루티카손 프로피오네이트, 레보플록사신, 메타프로테레놀 설페이트, 몰핀 설페이트, 옥시코돈 hcl,

염화칼륨, 트리암시놀론 아세토나이드, 무수 테크로리무스, 칼슘, 인터페론-알파, 메토크세이트, 마이코페놀레이트 모페틸, 인터페론-감마-1 β 에 결합한다.

[0378] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 심근경색 치료제, 예를 들면, 아스피린, 니트로글리세린, 메토프롤롤 타르테이트, 에녹사파린 나트륨, 헤파린 나트륨, 클로피도그렐 비설페이트, 카베딜롤, 아테놀롤, 몰핀 설페이트, 메토프롤롤 석시네이트, 워파린 나트륨, 리시노프릴, 이소소르비드 모노니트레이트, 디곡신, 후로세미드, 심바스타틴, 라미프릴, 테베크플라스, 에나라프릴 말레이트, 토르세미드, 레타바스, 로사탄 칼륨, 퀴나프릴 hcl/mag carb, 부메타니드, 알테플라스, 에날라프릴라트, 아미오다론 하이드로클로라이드, 티로피반 hcl m-하이드레이트, 딜티아젠프 하이드로클로라이드, 캅토프릴, 이르베사탄, 발사탄, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 호시노프릴 나트륨, 리도카인 하이드로클로라이드, 엡티피바타이드, 세파졸린 나트륨, 아트로핀 설페이트, 아미노카프린산, 스피로노락톤, 인터페론, 소탈롤 하이드로클로라이드, 염화칼륨, 도큐세이트 나트륨, 도부타민 hcl, 알프라졸람, 프라바스타틴 나트륨, 아토바스타틴 칼슘, 미다졸람 염산염, 메페리딘 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 에피네프린, 도파민 하이드로클로라이드, 비파리루딘, 로수바스타틴, 에제티미브/심바스타틴, 아바시미브, 카리포라이드, 심장 줄기 세포, 및 성장 인자에 결합한다.

[0379] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 건선 치료제, 예를 들면, KDR의 소분자 억제제, Tie-2의 소분자 억제제, 칼시포트리엔, 클로베타솔 프로피오네이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 할로베타솔 프로피오네이트, 타자로텐, 메토크세이트, 플루오시노나이드, 베타메타손 diprop 보강형, 플루오시놀론 아세토나이드, 아시트레틴, 타르 샴푸, 베타메타손 발레레이트, 모메타손 후로에이트, 케토코나졸, 프라록신/플루오시놀론, 하이드로코르티손 발레레이트, 플루안드레놀라이드, 우레아, 베타메타손, 클로베타솔 프로피오네이트/에몰, 플루티카손 프로피오네이트, 아지트로마이신, 하이드로코르티손, 보습 포몰라, 엽산, 데소니드, 피메크로리무스, 콜타르, 디플로라손 디아세테이트, 에타너셉트 폴레이트, 젯산, 메톡살렌, hc/비스무스 subgal/znox/resor, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 프레드니손, 섰스크린, 할시노나이드, 살리실산, 안트랄린, 클로코르톨론 피발레이트, 석탄 추출물, 콜타르/살리실산, 콜타르/살리실산/황, 테속시메타손, 디아제팜, 피부연화제, 플루오시노나이드/피부연화제, 광유/피마자유/na lact, 광유/땅콩유, 석유/이소프로필 미리스테이트, 프소랄렌, 살리실산, 비누/트리브롬살란, 티메로살/붕산, 셀레코시브, 인플릭시마브, 사이클로스포린, 알레파셉트, 에팔리주마브, 테크로리무스, 피메크로리무스, PUVA, UVB, 설파살라진에 결합한다.

[0380] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 건선 관절염 치료제, 예를 들면, 메토크세이트, 에타너셉트, 로페콕시브, 셀레콕시브, 엽산, 설파살라진, 나프록센, 레플루노미드, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 인도메타신, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 프레드니손, 설린락, 베타메타손 diprop 보강형, 인플릭시마브, 메토크세이트, 폴레이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 디클로페낙, 디메틸섰폭사이드, 피록시감, 디클로페낙 나트륨, 케토프로펜, 멜록시감, 메틸프레드니솔론, 나부메톤, 톨메틴 나트륨, 칼시포트리엔, 사이클로스포린, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 플루오시노나이드, 글루코사민 설페이트, 골드 나트륨 티오말레이트, 하이드로코돈 비타르테이트/apap, 이부프로펜, 리세드로네이트 나트륨, 설파디아진, 티오구아닌, 발데콕시브, 알레파셉트, 에팔리주마브 및 bcl-2 억제제, 또는 이들의 유도체 또는 접합체에 결합한다.

[0381] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 재협착증 치료제, 예를 들면, 시롤리무스, 파클리탁셀, 에베롤리무스, 타크롤리무스, 조타롤리무스, 아세타미노펜에 결합한다.

[0382] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 좌골신경통 치료제, 예를 들면, 하이드로코돈 비타르테이트/apap, 로페콕시브, 시클로벤자프린 hcl, 메틸프레드니솔론, 나프록센, 이부프로펜, 옥시코돈 hcl/아세타미노펜, 셀렉코시브, 발데콕시브, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 프레드니손, 코데인 포스페이트/apap, 트라마돌 hcl/아세타미노펜, 메타사론, 멜록시감, 메토카르바몰, 리도카인 하이드로클로라, 디플로페낙 나트륨, 가바펜틴, 텍사메타손, 카리소프로돌, 케톨락 트로메타민, 인도메타신, 아세타미노펜, 디아제팜, 나부메톤, 옥시코돈 hcl, 티자니딘 hcl, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 프로폭시펜 냐설레이트/apap, asa/oxyod/옥시코돈 ter, 이부프로펜/하이드로코돈 bit, 트라마돌 hcl, 에토돌락, 프로폭시펜 hcl, 아미트립틸린 hcl, 카리소프로돌/코데인 phos/asa, 몰핀 설페이트, 멀티비타민, 나프록센 나트륨, 오르페나드린 시트레이트, 테마제팜에 결합한다.

[0383] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 DVD-Ig은 SLE(루푸스)를 위한 제제, 예를 들면, NSAID, 예를 들면, 디클로페낙, 나프록센, 이부프로펜, 피록시감, 인도메타신; COX2 억제제, 예를 들면, 셀레콕시브, 로페콕시브, 발데콕시브; 항말라리아제, 예를 들면, 하이드록시클로로퀸; 스테로이드, 예를 들면, 프레드니손, 프레드니솔론, 부테노사이드, 텍사메타손; 세포독성제, 예를 들면, 아자티오프린, 시클로포스파미드, 마이코페놀레이트 모페틸, 메토크세이트; PDE4 억제제 또는 퓨린 합성 억제제, 예를 들면, 셀레셉트에 결합한다. 하

나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 설파살라진, 5-아미노살리실산, 올살라진, 이뮤란 및 IL-1과 같은 전염 증성 사이토카인의 합성, 생산 또는 작용을 방해하는 제제, 예를 들면, IL-1 β 전환효소 억제제 및 IL-1ra와 같은 카스파제 억제제에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 T 세포 신호 전달 억제제, 예를 들면, 티로신 키나제 억제제; 또는 T 세포 활성화 분자를 표적으로 하는 분자, 예를 들면, CTLA-4-Ig 또는 B7계 항체 또는 PD-1계 항체에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 IL-11 또는 항-사이토카인 항체, 예를 들면, 포노토리주마브(항-IFN γ 항체), 또는 항-수용체 수용체 항체, 예를 들면, 항-IL-6 수용체 항체 및 B-세포 표면 분자에 대한 항체에 결합한다. 하나의 실시형태에서, DVD-결합 단백질은 LJP 394(아베티무스), B-세포를 불활성화시키거나 고갈시키는 제제, 예를 들면, 항-CD20 항체, 항-BlyS 항체, TNF 및 bcl-2 억제제에 결합하고, 그 이유는 유전자전이 마우스에서 bcl-2 과발현이 루푸스 유사 표현형을 유발하는 것으로 입증되었고(문헌참조: Marquina et al. (2004) J. Immunol. 172(11):7177-7185), 따라서 이의 억제가 치료학적 효과를 가질 것으로 예상되기 때문이다.

[0384] 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합부는 항신생물제, 방사선치료 및 화학치료제, 예를 들어, DNA 알킬화제, 시스플라틴, 카보플라틴, 항-튜불린제, 파클리탁셀, 도세탁셀, 탁술, 독소루비신, 겐티타민, 겐자르, 안트라사이클린, 아드리아마이신, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 5-플루오로우라실(5-FU), 류코보린, 이리노테칸, 수용체 티로신 키나제 억제제(예를 들어, 에를로티니브, 게피티니브), COX-2 억제제(예를 들어, 셀렉코시브), 키나제 억제제 및 siRNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는 제제와 배합될 수 있다.

[0385] 또한, 본 발명의 결합 단백질은 각종 질환의 치료에 유용한 하나 이상의 추가 치료제와 함께 투여될 수 있다.

[0386] 본 발명의 결합 단백질은 상기 질환의 치료에 단독으로 또는 배합물로서 사용될 수 있다. 당해 결합 단백질은 단독으로 사용되거나 또는 의도한 목적에 따라 당업자에 의해 선택된 추가 제제, 예컨대 치료제와 함께 사용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 추가 제제는 결합 단백질에 의해 치료되는 질병이나 증상의 치료에 유용한 것으로 인식된 치료제 분야일 수 있다. 또한, 추가 제제는 치료 조성물에 유익한 성질을 부여하는 제제, 예컨대 조성물의 점도에 유효한 제제일 수 있다.

[0387] 본 발명에 포함되는 배합물은 의도한 목적에 유용한 배합물인 것으로 이해되어야 한다. 이하에 설명되는 제제는 목적에 유용한 예시적 제제로서, 한정하기 위한 것이 아니다. 배합물은 본원에 개시된 결합 단백질 및 이하에 기술되는 목록으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 제제일 수 있다. 이러한 배합물은 또한 하나 이상의 추가 제제를 포함할 수 있으며, 예를 들어 형성된 조성물이 의도한 기능을 수행할 수 있을 정도의 배합이라면 2개 또는 3개의 추가 제제가 첨가될 수도 있다.

[0388] 자가면역 및 염증 질환을 치료하기 위한 바람직한 배합물은 이부프로펜과 같은 약물을 포함하는 NSAID로 언급되기도 하는 비스테로이드 소염 약물이다. 다른 바람직한 배합물은 프레드니솔론을 비롯한 코르티코스테로이드류이며; DVD 결합 단백질과 함께 환자를 치료하는 경우, 필요한 스테로이드 용량이 점감되어 스테로이드 사용 시의 공지된 부작용이 저하되거나 심지어 제거될 수 있다. 본원에서 제공되는 결합 단백질과 조합될 수 있는 류마티스성 관절염용 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 사이토카인 억제성 소염제(CSAID); 다른 사람 사이토카인 또는 성장인자(예컨대, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-23, 인터페론, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF)에 대한 항체 또는 길항제. 본원에서 제공되는 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80(B7.1), CD86(B7.2), CD90, CTLA와 같은 세포 표면 분자 또는 이들의 리간드, 예컨대 CD154(gp39 또는 CD40L)에 대한 항체와 조합될 수 있다.

[0389] 치료제의 배합물은 자가면역 및 후속 염증 캐스케이드의 여러 지점에서 방해할 수 있다; 바람직한 예에는 TNF 길항제, 예를 들어, 키메라, 사람화된 또는 사람 TNF 항체, 아달리무마브, (PCT 공개 번호 제WO 97/29131), CA2(RemicadeTM) CDP571, 및 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, 이의 유도체, (p75TNFR1gG (EnbrelTM) 또는 p55TNFR1gG (Lenercept)), 및 또한 TNF α 전환 효소(TACE) 억제제가 있고, 유사하게 IL-1 억제제(인터류킨-1-전환 효소 억제제, IL-1RA등)는 동일 이유때문에 유효하다. 다른 바람직한 배합물에는 인터류킨 11이 있다. 또 다른 바람직한 배합물은 IL-12 기능과 병행하거나, IL-12 기능에 의존적이거나 IL-12 기능과 협동적인 작용을 할 수 있는 자가면역 반응의 다른 주요 작용인자를 포함하고, 특히 IL-18 항체 또는 가용성 IL-18 수용체를 포함하는 IL-18 길항제 또는 IL-18 결합 단백질이다. 확인된 바에 따르면, IL-12와 IL-18이 중복되지만 독특한 기능을 보유하여, 이 둘에 대한 길항제의 배합물이 가장 효과적이었다. 또 다른 바람직한 배합물은 비고갈성 항-CD4 억제제이다. 또 다른 바람직한 배합물에는 공동자극 경로의 길항제 CD80(B7.1) 또는 CD86(B7.2), 예컨대 항체, 가용성 수용체 또는 길항제성 리간드 등이 포함된다.

[0390] 본 발명의 결합 단백질은 또한 메토크렉세이트, 6-MP, 아자티오프린 설파살라진, 메살라진, 올살라진 클로로퀴닌/하이드록시클로로퀸, 펜실라민, 오로티오말레이트(근육내 및 경구), 아자티오프린, 콜히친, 코르티코스테로이드(경구, 흡입 및 국소 주사), 베타-2 아드레날린수용체 효능제(살부타몰, 터부탈린, 살메테랄), 크산틴(테오필린, 아미노필린), 크로모글리케이트, 네도크로밀, 케토티펜, 이프라트로프 및 옥시트로프, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, NSAID, 예컨대 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예컨대 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, 전염증성 사이토카인, 예컨대 TNF α 또는 IL-1에 의한 신호 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 β 전환효소 억제제, TNF α 전환효소(TACE) 억제제, T-세포 신호 전달 억제제(예: 키나제 억제제), 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이의 유도체(예, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체 및 유도체 p75TNFRIGG(Enbrel™ 및 p55TNFRIGG(Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), 소염성 사이토카인(예, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β), 셀레콕시브, 엽산, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 로페콕시브, 에타너셉트, 인플릭시마브, 나프록센, 발데콕시브, 설파살라진, 메틸프레드니솔론, 멜록시캄, 메틸프레드니솔론 아세트이트, 골드 나트륨 티오말레이트, 아스피린, 트리암시놀론 아세트나이드, 프로콕시펜 나프실레이트/apap, 폴레이트, 나부메톤, 디클로페낙, 피록시캄, 에토돌락, 디클로페낙 나트륨, 옥사프로진, 옥시코돈 hcl, 하이드로코돈 비타르트레이트/apap, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 펜타닐, 아나킨라, 사람 재조합체, 트라마돌 hcl, 살살레이트, 설린락, 시아노코발라민/fa/피리독신, 아세트아미노펜, 알렌드로네이트 나트륨, 프레드니솔론, 몰핀 설페이트, 리도카인 하이드로클로라이드, 인도메타신, 글루코사민 설프/콘드로이틴, 아미트립틸린 hcl, 설파디아진, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 올로파타딘 hcl, 미소프로스톨, 나프록센 나트륨, 오메프라졸, 시클로포스파미드, 리툭시마브, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18BP, 항-IL-18, 항-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, 로플루밀라스트, IC-485, CDC-801 및 메소프람 등의 제제와도 배합될 수 있다. 바람직한 배합물에는 메토크렉세이트 또는 레플루노미드가 있으며, 보통 또는 중증 류마티스성 관절염 증례에는 사이클로스포린이 있다.

[0391] 류마티스성 관절염을 치료하기 위해 결합 단백질과 배합하여 사용될 수 있는 비제한적인 추가의 제제는 하기의 제제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 비-스테로이드 소염 약물(NSAID); 사이토카인 억제 소염 약물(CSAID); CDP-571/BAY-10-3356 (사람화된 항-TNF α 항체; Celltech/Bayer); cA2/인플릭시마브 (키메라 항-TNF α 항체; Centocor); 75 kDTNFR-IgG/에타너셉트 (75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; Immunex; (1994) Arthritis & Rheumatism 37:S295; (1996) J. Invest. Med. 44:235A); 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (비-고갈 영양류화된 항-CD4 항체; IDEC/SmithKline; (1995) Arthrit. Rheum. 38:S185); DAB 486-IL-2 및/또는 DAB 389-IL-2 (IL-2 융합 단백질; Seragen; (1993) Arthrit. Rheum. 36:1223); 항-Tac (사람화된 항-IL-2Ra; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (소염 사이토카인; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; 재조합 IL-10, 소염 사이토카인; DNAX/Schering); IL-4; IL-10 및/또는 IL-4 효능제 (예를 들어, 효능제 항체); IL-1RA (IL-1 수용체 길항제; Synergen/Amgen); 아나킨라 (Kineret® Amgen); TNF- β p/s-TNF (가용성 TNF 결합 단백질; (1996) Arthrit. Rheum. 39(9:supplement):S284; (1995) Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology 268:37-42); R973401 (포스포디에스테라제 IV형 억제제; (1996) Arthrit. Rheum. 39(9:supplement):S282); MK-966 (COX-2 억제제; (1996) Arthrit. Rheum. 39(9:supplement):S81); 일로프로스트((1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S82); 메토크렉세이트; 탈리도미드 ((1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S282) 및 탈리도미드-관련 약물(예를 들어, 셀겐); 레플루노미드 (소염 및 사이토카인 억제제; (1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S131; (1996) Inflammation Research 45:103-107); 트라넥삼산(플라스미노겐 활성화 억제제; (1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S284); T-614 (사이토카인 억제제; (1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S282); 프로스타글란딘 E1 ((1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S282); 테니덱 (비스테로이드 소염 약물; (1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S280); 나프록센(비스테로이드 소염 약물; (1996) Neuro Report 7:1209-1213); 멜록시캄(비스테로이드 소염 약물); 이부프로펜(비스테로이드 소염 약물); 피록시캄(비스테로이드 소염 약물); 디클로페낙 (비스테로이드 소염 약물); 인도메타신(비스테로이드 소염 약물); 설파살라진((1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S281); 아자티오프린((1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S281); ICE 억제제(효소 인터류킨-1 β 전환 효소의 억제제); zap-70 및/또는 lck 억제제 (타이로신 키나제 zap-70 또는 lck의 억제제); VEGF 억제제 및/또는 VEGF-R 억제제 (혈관 내피 세포 성장 인자 또는 혈관 내피 세포 성장 인자 수용체의 억제제; 혈관형성의 억제제); 코르티코스테로이드 소염 약물(예를 들어, SB203580); TNF-전환효소 억제제; 항-IL-12 항체; 항-IL-18 항체; 인터류킨-11 ((1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S296); 인터류

킨-13 ((1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S308); 인터류킨-17 억제제(예를 들면, (1996) Arthrit. Rheum. 39(9: supplement):S120 참조); 금; 페니실라민; 클로로퀸; 클로람부실; 하이드록시클로로퀸; 사이클로스포린; 사이클로포스파미드; 총 림프계 조사; 항-흉선 글로불린; 항-CD4 항체; CD5-독소; 경구 투여된 펩타이드 및 콜라겐; 로벤자리트 이나트륨; 사이토카인 조절제(CRA) HP228 및 HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 안티센스 포스포로티오에이트 올리고-데옥시뉴클레오타이드(ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); 가용성 보체 수용체 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); 프레드니손; 오르코테인; 글리코사미노글리칸 폴리설페이트; 미노사이클린; 항-IL2R 항체; 해양 및 식물 지질(어류 및 식물 종자 씨드 지방산; DeLuca *et al.* (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); 아우라노핀; 페닐부타존; 메클로페남산; 플루페남산; 정맥 내 면역글로불린; 질레우톤; 아자리빈; 마이코페놀산(RS-61443); 타크롤리무스(FK-506); 시롤리무스 (라파마이신); 아미프릴로스(테라펙틴); 클라드리빈(2-클로로데옥시아데노신); 메토티렉세이트; bcl-2 억제제(Bruncko *et al.* (2007) *J. Med. Chem.* 50(4):641-662); 항바이러스제 및 면역 조절제.

[0392] 한 실시형태에서, 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 류마티스 관절염 치료를 위해 하기의 제제중 하나와 배합하여 투여된다: KDR의 소분자 억제제, Tie-2의 소분자 억제제; 메토티렉세이트; 프레드니손; 셀레코시브; 폴산; 하이드록시클로로퀸 설페이트; 로페록시브; 에타너셉트; 인플릭시마브; 레플루노미드; 나프록센; 발데코시브; 설파살라진; 메틸프레드니솔론; 이부프로펜; 멜록시캠; 메틸프레드니솔론 아세테이트; 금 나트륨 티오말레이트; 아스피린; 아자티오프린; 트리암시놀론 아세토니드; 프로프시펜 나프실레이트/apap; 폴레이트; 나부메톤; 디클로페낙; 피록시캠; 에토돌락; 디클로페낙 나트륨; 옥사프로진; 옥시코돈 hcl; 하이드로코돈 비타르트레이트/apap; 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨; 펜타닐; 아나킨라, 사람 재조합 트라마돌 hcl; 살살레이트; 설린락; 시아노코발라민/fa/피리독신; 아세트아미노펜; 알렌드로네이트 나트륨; 프레드니솔론; 모르핀 설페이트; 리도카인 하이드로클로라이드; 인도메타신; 글루코사민 설페이트/콘드로이틴; 사이클로스포린; 아미트립틸린 hcl; 설파디아진; 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜; 울로파타딘 hcl; 미소프로스톨; 나프록센 나트륨; 오프레라졸; 마이코페놀레이트 모페틸; 사이클로포스파미드; 리톡시마브; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; 항-IL 18; 항-IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; 로플루밀라스트; IC-485; CDC-801; 및 메소프람.

[0393] 본 발명의 결합 단백질이 배합될 수 있는 염증성 장 질환에 유용한 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 부데노사이드; 표피 성장 인자; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린, 설파살라진; 아미노살리실레이트; 6-머캅토피린; 아자티오프린; 메트로니다졸; 리폭시게나제 억제제; 메살라민; 올살라진; 발살라지드; 항산화제; 트롬복산 억제제; IL-1 수용체 길항제; 항-IL-1 β 모노클로날 항체; 항-IL-6 모노클로날 항체; 성장 인자; 엘라스타제 억제제; 피리딘-이미다졸 화합물; 다른 사람 사이토카인 또는 성장 인자, 예를 들면 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF 등에 대한 항체 또는 길항제. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 세포 표면 분자, 예를 들면 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 또는 이들의 리간드에 대한 항체와 조합될 수도 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 또한 제제, 예를 들면 메토티렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 예를 들면 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예를 들면 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, TNF α 또는 IL-1과 같은 전염증성 사이토카인에 의한 신호 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 β 전환효소 억제제, TNF α 전환효소 억제제, T-세포 신호 전달 억제제, 예를 들면 키나제 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이의 유도체(예, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) 및 소염성 사이토카인(예, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β) 및 bcl-2 억제제와 배합될 수 있다.

[0394] 결합 단백질이 배합될 수 있는 크론병 치료제의 바람직한 예에는 다음과 같은 것이 있다: TNF 길항제, 예를 들면 항-TNF 항체, 아달리무마브(PCT 공개 WO 97/29131; HUMIRA), CA2(REMICADE), CDP 571, TNFR-Ig 작제물, (p75TNFR1gG(ENBREL) 또는 p55TNFR1gG(LENERCEPT)) 억제제 및 PDE4 억제제. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 코르티코스테로이드, 예를 들면 부데노사이드 및 텍사메타손과 배합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 또한 설파살라진, 5-아미노살리실산 및 올살라진과 같은 제제, 및 전염증성 사이토카인, 예를 들면 IL-1, 예를 들면 IL-1 β 전환효소 억제제 및 IL-1ra의 합성 또는 작용을 방해하는 제제와 배합될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 또한 T 세포 신호 전달 억제제, 예를 들면 타이로신 키나제 억제제 6-머캅토피린과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 IL-11과 배합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 메살라민, 프레드니손, 아자티오프린, 머캅토피린, 인플릭시마브, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 디페녹실레이트/아트로프 설페이트, 로퍼아미

드 하이드로클로라이드, 메토티렉세이트, 오메프라졸, 플레이트, 시프로플록사신/텍스트로스-물, 하이드로코돈 비타르테이트/apap, 테트라사이클린 하이드로클로라이드, 플루오시노나이드, 메트로니다졸, 티메로살/붕산, 콜레스티라민/슈크로스, 시프로플록사신 하이드로클로라이드, 하이오시아민 설페이트, 메페리딘 하이드로클로라이드, 미다졸람 하이드로클로라이드, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 프로메타진 하이드로클로라이드, 인산나트륨, 실과페톡사졸/트리메토프림, 셀레콕시브, 폴리카르보필, 프로폭시펜 나프실레이트, 하이드로코르티손, 멀티비타민, 발살라지드 이나트륨, 코데인 포스페이트/apap, 콜레세벨람 hcl, 시아노코발라민, 염산, 레보플록사신, 메틸프레드니솔론, 나탈리주마브 및 인터페론-감마와 배합될 수 있다.

[0395] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 다발성 경화증 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 코르티코스테로이드; 프레드니솔론; 메틸프레드니솔론; 아자티오프린; 사이클로포스파미드; 사이클로스포린; 메토티렉세이트; 4-아미노피리딘; 티자니딘; 인터페론-β 1a(AVONEX; Biogen); 인터페론-β 1b(BETASERON; Chiron/Berlex); 인터페론 α-n3(Interferon Sciences/Fujimoto), 인터페론-α (Alfa Wassermann/J&J), 인터페론 β 1A-IF(Serono/Inhale Therapeutics), 페그인터페론 α 2b(Enzon/Schering-Plough), 코폴리머 1(Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); 고압 산소; 정맥내 면역글로불린; 클라브리빈; 다른 사람 사이토카인 또는 성장인자 및 이의 수용체, 예를 들면 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF에 대한 항체 또는 길항제. 본 발명의 결합 단백질은 CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90과 같은 세포 표면 분자 또는 이의 리간드에 대한 항체와 조합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 또한 제제, 예를 들면 메토티렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 예를 들면 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예를 들면 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, TNF α 또는 IL-1과 같은 전염증성 사이토카인에 의한 신호 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1β 전환효소 억제제, TACE 억제제, T-세포 신호 전달 억제제, 예를 들면 키나제 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이의 유도체(예, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) 및 소염성 사이토카인(예, IL-4, IL-10, IL-13 및 TGFβ) 및 bcl-2 억제제와 배합될 수 있다.

[0396] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 다발성 경화증 치료제의 바람직한 예에는 인터페론 β, 예를 들면 IFN β 1a 및 IFN β 1b; 코파손, 코르티코스테로이드, 카스파제 억제제, 예를 들면 카스파제-1 억제제, IL-1 억제제, TNF 억제제 및 CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체가 포함된다.

[0397] 본 발명의 결합 단백질은 또한 제제, 예를 들면 알렘투주마브, 드로나비롤, 유니메드, 다클리주마브, 미톡산트론, 크살리 프로덴 하이드로클로라이드, 팜프리딘, 글라티라머 아세테이트, 나탈리주마브, 신나비롤, α-임류노킨 NNS03, ABR-215062, Anergix.MS, 케모카인 수용체 길항제, BBR-2778, 칼라구알린, CPI-1189, LEM(리포좀 캡슐화된 미톡산트론), THC.CBD(칸나비노이드 효능제) MBP-8798, 메소프람(PDE4 억제제), MNA-715, 항-IL-6 수용체 항체, 뉴로박스, 피르페니돈, 알로트랩 1258(RDP-1258), sTNF-R1, 탈라파넬, 테리플루노마이드, TGF-베타2, 티플리모타이드, VLA-4 길항제(예를 들면, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), 인터페론 감마 길항제, 및 IL-4 효능제와 배합될 수 있다.

[0398] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 협심증 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 아스피린, 니트로글리세린, 이소소르비드 모노니트레이트, 메토프롤롤 석시네이트, 아테놀로, 메토프롤롤 타르테이트, 암로디핀 베실레이트, 딜티아젠프 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 클로피도그렐 비설페이트, 니페디핀, 이토바스타틴 칼슘, 염화칼륨, 후로세미드, 심바스타틴, 베라파밀 hcl, 디곡신, 프로프라놀롤, 하이드로클로라이드, 카베딜롤, 리시노프릴, 스피로노락톤, 하이드로클로로티아지드, 에나라프릴 말레이트, 나돌로, 라미프릴, 에녹사파린 나트륨, 헤라핀 나트륨, 발사르탄, 소탈로 하이드로클로라이드, 페노피브레이트, 에제티미브, 부메타니드, 로사탄 포타슘, 리시노프릴/하이드로클로로티아지드, 펠로디핀, 캅토프릴, 및 비소프롤롤 푸마레이트.

[0399] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 강직 척추염 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 이브푸로펜, 디클로페낙 및 미소프로스톨, 나프록센, 멜록시캄, 인도메타신, 디클로페낙, 셀레콕시브, 로페콕시브, 실과살라진, 메토티렉세이트, 아자티오프린, 미노시클린, 프레드니손, 에타너셉트, 및 인플릭시마브.

[0400] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 천식 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 알부테롤, 살메테롤/플루티카손, 몬테루카스트 나트륨, 플루티카손 프로피오네이트, 부테소니드, 프레드니손, 살메테롤 크시나포에이트, 레발부테롤 hcl, 알부테롤 설페이트/이프라트로프, 프레드니솔론 나트륨 포스페이트, 트리암시놀론

아세트나이드, 베클로메타손 디프로피오네이트, 이프라트로퓴 브로마이드, 아지트로마이신, 피르부테롤 아세테이트, 프레드니솔론, 무수 테오필린, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 클라리트로마이신, 자피르루카스트, 포르모테롤 푸마레이트, 인플루엔자 바이러스 백신, 메틸프레드니솔론, 아목시실린 트리하이드레이트, 플루니솔라이드, 알레르기 주사, 크로몰린 나트륨, 펙소페나딘 하이드로클로라이드, 플루니솔라이드/멘톨, 아목시실린/클라불라네이트, 레보플록사신, 흡입기 보조 장치, 구아이페네신, 텍사메타손 나트륨 포스페이트, 목시플록사신 hcl, 독시사이클린 하이드레이트, 구아이페네신/d-메토판, p-에페드린/cod/클로페니르, 가티플록사신, 세테리진 하이드로클로라이드, 모메타손 푸로에이트, 살메테롤 신나포에이트, 벤조나테이트, 세팔렉신, pe/하이드로코돈/클로르페니르, 세티리진 hcl/슈도에페드, 페닐에프린/cod/프로메타진, 코데인/프로메타진, 세프프로질, 텍사메타손, 구아이페네신/슈도에페드린, 클로페니라민/하이드로코돈, 네도크로밀 나트륨, 테르부탈린 설페이트, 에피네프린, 메틸프레드니솔론, 메타프로테레놀 설페이트.

[0401] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 COPD 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 알부테롤 설페이트/이프라트로퓴, 이프라트로퓴 브로마이드, 살메테롤/플루티카손, 알부테롤, 살메테롤 크시나포에이트, 플루티카손 프로피오네이트, 프레드니손, 무수 테오필린, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 몬테루카스트 나트륨, 부테소나이드, 포르모테롤 푸마레이트, 트리암시놀론 아세트나이드, 레보플록사신, 구아이페네신, 아지트로마이신, 베클로메타손 디프로피오네이트, 레발부테롤 hcl, 플루니솔라이드, 세프트리악손 나트륨, 아목시실린 트리하이드레이트, 가티플록사신, 자피르루카스트, 아목시실린/클라불라네이트, 플루니솔라이드/멘톨, 클로르페니라민/하이드로코돈, 메타프로테레놀 설페이트, p-에페드린/로라타딘, 테르부탈린 설페이트, 티오토로퓴 브로마이드, (R,R)-포르모테롤, TgAAT, 실로밀라스트, 및 로플루밀라스트.

[0402] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 HCV 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 인터페론-알파-2a, 인터페론-알파-2b, 인터페론-알파 con1, 인터페론-알파-n1, 폐결핵화된 인터페론-알파-2a, 폐결핵화된 인터페론-알파-2b, 리바비린, 페그인터페론 알파-2b + 리바비린, 우르소데옥시콜린산, 글리시리진산, 티말파신, 막사민, VX-497 및 표적, 즉 HCV 폴리머라제, HCV 프로테아제, HCV 헬리카제, HCV IRES(내부 리보솜 진입 부위)의 간섭을 통해 HCV를 치료하는데 사용되는 임의의 화합물.

[0403] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 특발폐섬유증 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 프레드니손, 아자티오프린, 알부테롤, 콜히친, 알부테롤 설페이트, 디곡신, 감마 인터페론, 메틸프레드니솔론 sod succ. 로라제팜, 후로세미드, 리시노프릴, 니트로글리세린, 스피로놀락톤, 시클로포스파미드, 이프라트로퓴 브로마이드, 악티노마이신 d, 알테플라스, 플루티카손 프로피오네이트, 레보플록사신, 메타프로테레놀 설페이트, 몰핀 설페이트, 옥시코돈 hcl, 염화칼륨, 트리암시놀론 아세트나이드, 무수 테크로리무스, 칼슘, 인터페론-α, 메토크세이트, 마이코페놀레이트 모페틸, 인터페론-감마-1β.

[0404] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 심근경색 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 아스피린, 니트로글리세린, 메토프롤롤 타르트레이트, 에녹사파린 나트륨, 헤파린 나트륨, 클로피도그렐 비설페이트, 카베딜롤, 아테놀롤, 몰핀 설페이트, 메토프롤롤 석시네이트, 워파린 나트륨, 리시노프릴, 이소소르비드 모노니트레이트, 디곡신, 후로세미드, 심바스타틴, 라미프릴, 테넥테플라스, 에나라프릴 말레이트, 토르세미드, 레타바스, 로사탄 포타슘, 퀴나프릴 hcl/mag carb, 부메타니드, 알테플라스, 아날라프릴라트, 아미오다론 하이드로클로라이드, 티로피반 hcl m-하이드레이트, 딜티아젠프 하이드로클로라이드, 캅토프릴, 이르베사탄, 발사탄, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 호시노프릴 나트륨, 리도카인 하이드로클로라이드, 엠티피바타이드, 세파졸린 나트륨, 아트로핀 설페이트, 아미노카프린산, 스피로놀락톤, 인터페론, 소탈롤 하이드로클로라이드, 염화칼륨, 도큐세이트 나트륨, 도부타민 hcl, 알프라졸람, 프라바스타틴 나트륨, 아토바스타틴 칼슘, 미다졸람 염산염, 메페리딘 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 에피네프린, 도파민 하이드로클로라이드, 비파리루딘, 로수바스타틴, 액제티미브/심바스타틴, 아바시미브, 및 카리포라이드.

[0405] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 건선 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: KDR의 소분자 억제제, Tie-2의 소분자 억제제, 칼시포트리엔, 클로베타솔 프로피오네이트, 트리암시놀론 아세트나이드, 할로베타솔 프로피오네이트, 타자로텐, 메토크세이트, 플루오시노나이드, 베타메타손 diprop 보강형, 플루오시놀론 아세트나이드, 아시트레틴, 타르 샴푸, 베타메타손 발레레이트, 모메타손 후로에이트, 케토코나졸, 프라모신/플루오시놀론, 하이드로코르티손 발레레이트, 플루안드레놀라이드, 우레아, 베타메타손, 클로베타솔 프로피오네이트/에몰, 플루티카손 프로피오네이트, 아지트로마이신, 하이드로코르티손, 보습 포몰라, 염산, 데소나이드, 피메크로리무스, 콜타르, 디플로라손 디아세테이트, 에타너셉트 플레이트, 젯산, 메톡살렌, hc/비스무스 subgal/znox/resor, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 프레드니손, 섰스크린, 할시노나이드, 살리실산, 안트랄린, 클로코르톨론 피발레이트, 석탄 추출물, 콜타르/살리실산, 콜타르/살리실산/황, 데속시메타손, 디아제팜, 피부

연화제, 플루오시노나이드/피부연화제, 광유/피마자유/na lact, 광유/땅콩유, 석유/이소프로필 미리스테이트, 프소칼렌, 살리실산, 비누/트리브롬살란, 티메로살/붕산, 셀레코시브, 인플릭시마브, 사이클로스포린, 알레파셉트, 에팔리주마브, 테크로리무스, 피메크로리무스, PUVA, UVB, 및 설파살라진.

[0406] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 건선 관절염 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 메토틱렉세이트, 에타너셉트, 로페콕시브, 셀레코시브, 엽산, 설파살라진, 나프록센, 레플루노미드, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 인도메타신, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 프레드니손, 설린당, 베타메타손 diprop 보강형, 인플릭시마브, 메토틱렉세이트, 폴레이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 디클로페낙, 디메틸설포사이드, 피록시캄, 디클로페낙 나트륨, 케토프로펜, 멜록시캄, 메틸프레드니솔론, 나부메톤, 톨메틴 나트륨, 칼시포트리엔, 사이클로스포린, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 플루오시노나이드, 글루코사민 설페이트, 골드 나트륨 티오말레이트, 하이드로코돈 비타르트레이트/apap, 이부프로펜, 리세드로네이트 나트륨, 설파디아진, 티오구아닌, 발데콕시브, 알레파셉트, 에팔리주마브 및 bc1-2 억제제.

[0407] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 재협착증 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 시로리무스, 파클리탁셀, 에버로리무스, 타크로리무스, 조타롤리무스, 아세타미노펜.

[0408] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 좌골신경통 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 하이드로코돈 비타르트레이트/apap, 로페콕시브, 시클로벤자프린 hcl, 메틸프레드니솔론, 나프록센, 이부프로펜, 옥시코돈 hcl/아세타미노펜, 셀렉코시브, 발데콕시브, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 프레드니손, 코데인 포스페이트/apap, 트라마돌 hcl/아세타미노펜, 메타사론, 멜록시캄, 메토카르바몰, 리도카인 하이드로클로라, 디플로페낙 나트륨, 가바펜틴, 텍사메타손, 카리소프로돌, 케톨락 트로메타민, 인도메타신, 아세타미노펜, 디아제팜, 나부메톤, 옥시코돈 hcl, 티자니딘 hcl, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 프로폭시펜 냐실레이트/apap, asa/oxyod/옥시코돈 ter, 이부프로펜/하이드로코돈 bit, 트라마돌 hcl, 에토돌락, 프로폭시펜 hcl, 아미트립틸린 hcl, 카리소프로돌/코데인 phos/asa, 몰핀 설페이트, 멀티비타민, 나프록센 나트륨, 오르페나드린 시트레이트, 및 테마제팜.

[0409] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 SLE(루푸스) 치료제의 바람직한 예에는 다음과 같은 것이 있다: NSAID, 예를 들면 디클로페낙, 나프록센, 이부프로펜, 피록시캄, 인도메타신; COX2 억제제, 예를 들면 셀레콕시브, 로페콕시브, 발데콕시브; 항말라리아제, 예를 들면 하이드록시클로로퀸; 스테로이드, 예를 들면 프레드니손, 프레드니솔론, 부데노사이드, 텍사메타손; 세포독성제, 예를 들면 아자티오프린, 시클로포스파미드, 마이코페놀레이트 모페틸, 메토틱렉세이트; PDE4 억제제 또는 퓨린 합성 억제제, 예를 들면 셀레셉트. 본 발명의 결합 단백질은 또한 설파살라진, 5-아미노살리실산, 울살라진, 이뮤란 및 IL-1과 같은 전염증성 사이토카인의 합성, 생산 또는 작용을 방해하는 제제, 예를 들면 IL-1 β 전환효소 억제제 및 IL-1ra와 같은 카스파제 억제제와 배합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 또한 T 세포 신호 전달 억제제, 예를 들면 티로신 키나제 억제제; 또는 T 세포 활성화 분자를 표적으로 하는 분자, 예를 들면 CTLA-4-IgG 또는 항-B7계 항체, 항-PD-1계 항체 등과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 IL-11 또는 항사이토카인 항체, 예를 들면 포노토리주마브(항-IFN γ 항체) 또는 항수용체 항체, 예를 들면 항-IL-6 수용체 항체 및 B-세포 표면 분자에 대한 항체와 조합될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 LJP 394(아베티무스), B-세포를 불활성화시키거나 고갈시키는 제제, 예를 들면 리툭시마브(항-CD20 항체), 림포스테트-B(항-BlyS 항체), TNF 길항제, 예를 들면 항-TNF 항체, D2E7(PCT 공개 WO 97/29131; HUMIRA), CA2(REMICADE), CDP571, TNFR-Ig 작제물(P75TNFRlgG(ENBREL) 및 p55TNFRlgG(LENERCEPT)) 및 bc1-2 억제제와 함께 사용될 수 있는데 그 이유는 유전자전이 마우스에서 bc1-2 과발현이 낭창과 같은 표현형을 유발하는 것으로 입증되었고(문헌참조: Marquina et al. (2004) J. Immunol. 172(11): 7177-7185), 따라서 이의 억제제가 치료학적 효과를 가질 것으로 예상되기 때문이다.

[0410] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질의 "치료학적 유효량" 또는 "예방학적 유효량"을 포함할 수 있다. "치료학적 유효량"이란 용어는 원하는 치료 결과를 획득하기 위한 용량과 필요 기간 동안의 유효한 양을 의미한다. 상기 항체 또는 항체 일부의 치료학적 유효량은 당업자라면 결정할 수 있는 것으로서, 질병 상태, 연령, 성별 및 개체의 체중과 개체 내에서 원하는 반응을 유도해내는 항체 또는 항체 일부의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료학적 유효량은 치료학적 유익 효과가 항체 또는 항체 일부의 임의의 독성 또는 유해 효과를 능가하는 양이다. "예방학적 유효량"은 원하는 예방학적 결과를 획득하기 위한 용량 및 필요 기간 동안의 유효한 양을 의미한다. 일반적으로, 예방학적 용량은 질병의 초기 단계전이나 초기 단계에 피검체에 사용되기 때문에 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 적은 양일 것이다.

- [0411] 투여 계획은 원하는 최적 반응(예를 들면, 치료학적 또는 예방학적 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들면, 1회의 일시주사를 투여할 수도 있고, 여러 분할 용량을 경시적으로 투여할 수도 있으며 또는 치료 상황의 위급성에 따라 비례하여 감소 또는 증가된 용량을 투여할 수도 있다. 특히, 투여 용이성과 용량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 용량 단위 형태로 조제하는 것이 유리하다. 용어 "용량 단위 형태"는 치료하는 포유동물 피검체에 대하여 단일 용량으로서 적당한 물리적으로 분리된 단위를 의미한다. 따라서, 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 제공하도록 계산된 소정 양의 활성 화합물을 포함한다. 본 발명의 용량 단위 형태에 대한 세부사항은 (a) 활성 화합물의 독특한 특징 및 수득하고자 하는 특정 치료 또는 예방학적 효과, 및 (b) 개체의 민감도 치료에 있어서 상기 활성 화합물을 배합하는 기술 고유의 제한에 따라 결정되고 직접 좌우된다.
- [0412] 본 발명의 결합 단백질의 치료학적 또는 예방학적 유효량에 대한 비제한의 예시적 범위는 0.1 내지 20mg/kg, 더 바람직하게는 1 내지 10mg/kg 이다. 용량 값이 완화될 병태의 유형 및 중증도에 따라 다양할 수 있음을 주지해야 한다. 또한, 용량 값은 개체의 필요 및 조성물 투여를 관리하거나 감독하는 자의 전문가적 판단에 따라 경시적으로 조정되어야 하며, 본 명세서에 제시된 용량 범위는 예시적일 뿐이며 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하고자 하는 것이 아님을 명심해야 한다.
- [0413] 본원에 기재된 발명의 방법이 기타 적합하게 변형되고 적용될 수 있고 본 발명의 범위 또는 본원에 기재된 실시 형태로부터 벗어나지 않고서도 적합한 등가물을 사용하여 변형되고 적용될 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다. 현재 본 발명을 상세하게 설명했고 이와 동일하게 하기의 실시예를 참조로 보다 명백하게 이해될 수 있을 것이고 당해 실시예는 설명을 목적으로 포함된 것이지 본 발명을 제한하고자 한 것은 아니다.
- [0414] V. 진단
- [0415] 본원에 기재된 내용은 또한 진단 적용을 제공한다. 이것은 하기에서 추가로 설명된다.
- [0416] I. 분석 방법
- [0417] 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 DVD-Ig를 사용하여 시험 샘플에서 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법을 제공한다. 당업계에 공지된 바와 같은 임의의 적합한 분석이 당해 방법에 사용될 수 있다. 이의 예는 면역분석, 예를 들면, 샌드위치 면역분석(예를 들면, 모노클로날, 폴리클로날 및/또는 DVD-Ig 샌드위치 면역분석 또는 이의 임의의 변형(예를 들면, 모노클로날/DVD-Ig, DVD-Ig/폴리클로날 등)을 포함하지만 이에 제한되지 않고 방사성동위원소 검출(방사성면역분석(RIA)) 및 효소 검출(효소 면역분석(EIA) 또는 효소 결합된 면역흡착 분석(ELISA)(예를 들면, Quantikine ELISA 분석, R&D Systems, Minneapolis, MN))), 경쟁 억제 면역분석(예를 들면, 정배향 및 역배향), 형광 편광 면역분석(FPIA), 효소 다중 면역분석 기술(EMIT), 생발광 공명 에너지 전달(BRET), 및 균일한 화학발광 분석 등을 포함한다. SELDI 기본 면역분석에서, 목적하는 분석물(이의 단편)에 특이적으로 결합하는 포획 시약은 질량 분광측정 프로브, 예를 들면, 예비활성화된 단백질 칩 어레이에 부착된다. 당해 분석물(또는 이의 단편)은 이어서 바이오칩상에 특이적으로 포획되고 포획된 분석물(또는 이의 단편)은 질량 분광측정에 의해 검출된다. 또는 분석물(또는 이의 단편)은 포획 시약으로부터 용출되고 통상의 MALDI (매트릭스 원소 레이저 탈착/이온화 또는 SELDI에 의해 검출된다. 화학발광 나노입자 면역분석, 특히, ARCHITECT® 자동화 분석기(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)를 사용하는 면역분석은 바람직한 면역분석의 한 예이다.
- [0418] 뇨, 혈액, 혈청 및 혈장 및 기타 체액을 수거하고, 취급하고 프로세싱하기 위해 당업계에 널리 공지된 방법이 본 발명의 수행을 위해 사용되고, 예를 들면, 본원에 기재된 바와 같은 DVD-Ig가 면역진단 시약으로서 및/또는 분석물 면역분석 키트에서 사용되는 경우이다. 시험 샘플은 목적하는 분석물에 추가로 항체, 항원, 합텐, 호르몬, 약물, 효소, 수용체, 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 같은 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들면, 당해 샘플은 피험체로부터 수득되는 전혈 샘플일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 면역 분석 전에 시험 샘플, 특히, 전혈을 전처리 시약으로 처리될 필요가 있거나 요망될 수 있다. 전처리가 필요하지 않은 경우라도(예를 들면, 대부분 뇨 샘플), 전처리가 임의로 수행될 수 있다(예를 들면, 상업적 플랫폼상의 계획의 일부로서).
- [0419] 전처리 시약은 본 발명의 면역분석 및 키트와 함께 사용하기에 적당한 임의의 시약일 수 있다. 전처리는 임의로 다음을 포함한다: (a) 하나 이상의 용매(예를 들면, 메탄올 및 에틸렌 글리콜) 및 임의로 염, (b) 하나 이상의 용매 및 염, 및 임의로 세제, (c) 세제, 또는 (d) 세제 및 염. 전처리 시약은 당업계에 공지되어 있고 이러한 전처리는 예를 들면, 문헌[Yatscoff et al. (1990) Clin. Chem. 36:1969-1973, 및 Wallemacq et al. (1999)

Clin. Chem. 45:432-435]에 기재된 바와 같은 Abbott TDx, AxSYM®, 및 ARCHITECT® 분석기(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), 및/또는 상업적으로 시판되는 것으로서 사용될 수 있다. 추가로 전처리하는 문헌[참조: 미국 특허 제5,135,875호; 유럽 특허 공개 제0471293호, 미국 특허 제6,660,843호; 및 미국 특허 출원 제20080020401호]에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 전처리 시약은 이중성 제제 또는 동종성 제제일 수 있다.

[0420] 이중성 전처리 시약의 사용으로, 전처리 시약은 샘플에 존재하는 분석물 결합 단백질(예를 들면, 분석물 또는 이의 단편)에 결합할 수 있는 단백질)을 침전시킨다. 당해 전처리 단계는 샘플에 전처리 제제의 첨가로 형성된 혼합물의 상등액을 침전된 분석물 결합 단백질로부터 분리함에 의해 임의의 분석물 결합 단백질을 제거함을 포함한다. 당해 분석에서, 임의의 결합 단백질이 부재인 혼합물의 상등액이 당해 분석에 사용되고 직접 항체 포획 단계로 진행된다.

[0421] 동종의 전처리 시약의 사용시에는 당해 분리 단계가 없다. 시험 샘플 및 전처리 시약의 전체 혼합물을 표지된 항-분석물 항체(또는 항원적으로 반응성인 이의 단편)와 같은 분석물(또는 이의 단편)에 대해 표지된 특이적 결합 파트너와 접촉시킨다. 당해 분석을 위해 사용되는 전처리 시약은 제1 특이적 결합 파트너에 의한 포획 전 또는 포획 동안에 전처리된 시험 샘플 혼합물중에 희석시킨다. 당해 희석에도 불구하고, 특정 양의 전처리 시약은 포획동안에 시험 샘플 혼합물중에 존재(또는 잔류)한다. 본 발명에 따라, 표지된 특이적 결합 파트너는 DVD-Ig (또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)일 수 있다.

[0422] 이중성 포맷에서, 시험 샘플이 피험체로부터 수득된 후 제1 혼합물을 제조한다. 당해 혼합물은 분석물(또는 이의 단편)에 대해 평가된 시험 샘플 및 제1 특이적 결합 파트너를 포함하고, 여기서, 제1 특이적 결합 파트너 및 시험 샘플중에 함유된 임의의 샘플은 제1 특이적 결합 파트너-분석물 복합체를 형성한다. 바람직하게, 제1 특이적 결합 파트너는 항-분석물 항체 또는 이의 단편이다. 제1 특이적 결합 파트너는 본원에 기재된 바와 같은 DVD-Ig (또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편). 혼합물을 형성하기 위해 시험 샘플 및 기타 특이적 결합 파트너가 첨가되는 순서는 중요하지 않다. 바람직하게, 제1 특이적 결합 파트너는 고정상에 고정화된다. 면역분석(제1 특이적 결합 파트너 및 임의로 제2 특이적 결합 파트너에 대해)에 사용되는 고정상은 자기 입자, 비드, 시험 튜브, 미세적정 플레이트, 큐벳, 막, 스캐폴딩 분자, 필름, 여과지, 디스크 및 칩(이에 제한되지 않음)과 같은 당업계에 공지된 임의의 고정상일 수 있다.

[0423] 제1 특이적 결합 파트너-분석물 복합체를 함유하는 혼합물이 형성된 후, 임의의 결합되지 않은 분석물이 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여 복합체로부터 제거된다. 예를 들면, 비결합된 분석물은 세척에 의해 제거될 수 있다. 바람직하게, 그러나, 제1 특이적 결합 파트너는 시험 샘플중에 존재하는 임의의 분석물을 초과하여 존재하여 시험 샘플중에 존재하는 모든 분석물은 제1 특이적 결합 파트너에 의해 결합되어 있다.

[0424] 임의의 비결합된 분석물이 제거된 후, 제1 특이적 결합 파트너는 제1 특이적 결합 파트너-분석물-제2 특이적 결합 파트너 복합체를 형성하기 위해 혼합물에 첨가된다. 제2 특이적 결합 파트너는 바람직하게 제1 특이적 결합 파트너에 의해 결합된 분석물상의 에피토프와는 상이한 분석물상의 에피토프에 결합하는 항-분석물 항체이다. 더욱이, 또는 바람직하게, 제2 특이적 결합 파트너는 상기된 바와 같은 검출가능한 표지로 표지되거나 이를 포함한다. 제2 특이적 결합 파트너는 본원에 기재된 바와 같은 DVD-Ig (또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)일 수 있다.

[0425] 당업계에 공지된 바와 같은 임의의 적합한 검출가능한 표지가 사용될 수 있다. 예를 들면, 검출가능한 표지는 방사성활성 표지(예를 들면, 3H, 125I, 35S, 14C, 32P, 및 33P), 효소적 표지(예를 들면, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼린 퍼옥시다제, 글루코스 6-포스페이트 데하이드로게나제 등), 화학발광 표지(예를 들면, 아크리디늄 에스테르, 티오에스테르, 또는 설포아미드; 루미놀, 이소루미놀, 펜안트리디늄 에스테르 등), 형광 표지(예를 들면, 플루오레세인(예를 들면, 5-플루오레세인, 6-카복시플루오레세인, 3'6-카복시플루오레세인, 5(6)-카복시플루오레세인, 6-헥사클로로-플루오레세인, 6-테트라클로로플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트 등)), 로다민, 물리화학적 단백질, R-피치코에리트린, 쿠안탐 도트(예를 들면, 황화아연-캡핑된 셀렌화카드뮴), 온도측정 표지, 또는 면역-폴리머라제 연쇄 반응 표지일 수 있다. 표지로서의 도입, 표지 과정 및 표지 검출은 문헌[참조: Polak and Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), and in Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996)(조함된 핸드북 및 문헌(참조: Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon에 의해 공개된 카탈로그)]에서 밝혀졌다. 형광 표지는 FPIA(미국 특허 제5,593,896호; 제5,573,904호; 제5,496,925호; 제5,359,093호; 및 제5,352,803호)에 사용될 수 있다. 아크리디늄 화합물은 동종 또는 이중 화학발광 분석중에 검출가능한 표지로서 사용될 수 있다.

(Adamczyk et al. (2006) Bioorg. Med. Chem. Lett. 16:1324-1328; Adamczyk et al. (2004) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4: 2313-2317; Adamczyk et al. (2004) Bioorg. Med. Chem. Lett. 14: 3917-3921; 및 Adamczyk et al. (2003) Org. Lett. 5:3779-3782).

- [0426] 바람직한 아크리디늄 화합물은 아크리디늄-9-카복사미드이다. 아크리디늄 9-카복사미드를 제조하는 방법은 문헌[참조: Mattingly (1991) J. Biolumin. Chemilumin. 6:107-114; Adamczyk et al. (1998) J. Org. Chem. 63:5636-5639; Adamczyk et al. (1999) Tetrahedron 55:10899-10914; Adamczyk et al. (1999) Org. Lett. 1:779-781; Adamczyk et al. (2000) Bioconjug. Chem. 11:714-724; Mattingly et al., In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications; Dyke, Ed. (2002) CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105; Adamczyk et al. (2003) Org. Lett. 5:3779-3782; 및 미국 특허 제5,468,646호; 제5,543,524호; 및 제 5,783,699호]에 기재되어 있다. 또 다른 바람직한 아크리디늄 화합물은 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르이다. 아크리디늄-9-카복실레이트 에스테르의 예는 10-메틸-9-(페녹시카보닐)아크리디늄 플루오로로설포네이트 (제조원(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)으로부터 시판됨)이다. 아크리디늄 9-카복실레이트 아릴 에스테르를 제조하는 방법은 문헌[참조: McCapra et al. (1965) Photochem. Photobiol. 4: 1111-21; Razavi et al. (2000) Luminescence 15:245-249; Razavi et al. (2000) Luminescence 15:239-244; 및 미국 특허 제5,241,070호]에 기재되어 있다. 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르 및 이의 용도에 관한 추가의 세부사항은 미국 특허 공개 제20080248493호에 기재되어 있다.
- [0427] 화학발광 분석(상기된 바와 같은 아크리디늄 또는 다른 화학발광제를 사용하는)은 문헌[참조: Adamczyk et al. (2006) Anal. Chim. Acta 579(1):61-67]에 기재된 방법에 따라 수행할 수 있다. 임의의 적합한 분석 포맷이 사용될 수 있지만, 미세플레이트 화학발광측정기(Mithras LB-940, Berthold Technologies USA, LLC, Oak Ridge, TN)로 신속하게 소량의 다발성 샘플 분석을 수행할 수 있다.
- [0428] 시험 샘플 및 특이적 결합 파트너가 화학발광 분석용 혼합물을 형성하기 위해 첨가되는 순서는 중요하지 않다. 제1 특이적 결합 파트너가 화학발광제(예를 들면, 아크리디늄 화합물)로 표지되는 경우, 검출가능하게 표지된 제1 특이적 결합 파트너-분석물 복합체가 형성된다. 또한, 제2 특이적 결합 파트너가 사용되고 제2 특이적 결합 파트너가 아크리디늄 화합물과 같은 화학발광제로 검출가능하게 표지되는 경우, 검출가능하게 표지된 제1 특이적 결합 분석물 제2 비특이적 결합 파트너 복합체가 형성된다. 임의의 비결합된 특이적 결합 파트너는 표지된 또는 비표지된 것에 상관없이 세척과 같은 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여 혼합물로부터 제거될 수 있다.
- [0429] 과산화수소는 혼합물중에서 동일계에서 생성될 수 있거나 상기된 아크리디늄 화합물 첨가 전, 이와 동시에 또는 이후에 혼합물에 제공되거나 공급될 수 있다(예를 들면, 과산화수소의 공급원은 과산화수소를 함유하는 것으로 공지된 하나 이상의 완충액 또는 기타 용액이다). 과산화수소는 당업자에게 자명한 바와 같은 다수의 방식으로 동일계에서 생성될 수 있다.
- [0430] 샘플에 하나 이상의 염기성 용액의 동시 또는 후속적 첨가시, 검출가능한 신호, 즉, 화학발광 신호(분석물의 존재를 지적함)이 생성된다. 염기성 용액은 10 이상, 바람직하게는 12 이상의 pH를 갖는다. 염기성 용액의 예는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화칼슘, 수산화암모늄, 수산화마그네슘, 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 수산화칼슘, 탄산칼슘, 및 중탄산칼슘을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 샘플에 첨가된 염기성 용액의 양은 염기성 용액의 농도에 의존한다. 사용되는 염기성 용액의 농도를 기준으로, 당업자는 샘플에 첨가하기 위한 염기성 용액의 양을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0431] 생성된 화학발광 신호는 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 검출될 수 있다. 생성된 신호 강도를 기준으로, 샘플중의 분석물의 양은 정량될 수 있다. 구체적으로, 샘플중의 분석물의 양은 생성된 신호의 강도에 비례한다. 존재하는 분석물의 양은 분석물에 대한 표준 곡선에 대해 생성된 빛의 양을 비교하거나 참조 표준 물질과 비교하여 정량할 수 있다. 표준 곡선은 질량 분광측정, 중력측정 방법 및 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 공지된 농도의 분석물의 연속 희석액 또는 용액을 사용하여 생성될 수 있다. 화학발광제로서 아크리디늄 화합물의 사용에 대한 강조와 함께 기재되지만 당업자는 기타 화학발광제의 사용을 위해 당해 기재내용을 용이하게 적용할 수 있다.
- [0432] 분석물 면역분석은 일반적으로 샌드위치 포맷(이에 제한되지 않음)과 같은 당업계에 공지된 임의의 포맷을 사용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 하나의 면역분석 포맷에서, 2개 이상의 항체를 사용하여 샘플중의 사람 분석물 또는 이의 단편과 같은 분석물을 분리하고 정량한다. 보다 구체적으로, 2개 이상의 항체는 "샌드위치"로서 언급되는 면역 복합체를 형성하는 분석물(또는 이의 단편)상에 상이한 에피토프들에 결합한다. 일반적으로, 면

역분석에서, 하나 이상의 항체(이들 항체는 "포획" 항체 또는 "포획" 항체들로서 흔히 언급된다)를 사용하여 시험 샘플중에 분석물(또는 이의 단편)을 포획하고 하나 이상의 항체를 사용하여 샌드위치에 검출가능한(즉, 정량 가능한) 표지를 결합시킬 수 있다(이들 항체는 흔히 "검출 항체", "검출 항체들", "접합체" 또는 "접합체들"로서 언급된다). 따라서, 샌드위치 면역분석 포맷과 관련하여, 본원에 기재된 바와 같은 결합 단백질 또는 DVD-Ig (또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)를 포획 항체, 검출 항체 또는 둘다로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 분석물(또는 이의 단편)상에 제1 에피토프에 결합할 수 있는 도메인을 갖는 하나의 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 포획 항체로서 사용될 수 있고/있거나 분석물(또는 이의 단편)상에 제2 에피토프와 결합할 수 있는 도메인을 갖는 또 다른 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 검출 항체로서 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 분석물(이의 단편)상에 제1 에피토프와 결합할 수 있는 제1 도메인 및 분석물(또는 이의 단편)상에 제2 에피토프와 결합할 수 있는 제2 도메인을 갖는 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 포획 항체 및/또는 검출 항체로서 사용될 수 있다. 또한, 제1 분석물(또는 이의 단편)상에 에피토프를 결합할 수 있는 제1 도메인 및 제2 분석물(또는 이의 단편)상에 에피토프와 결합할 수 있는 제2 도메인을 갖는 하나의 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 2개 이상의 분석물을 검출하고 임의로 정량하기 위해 포획 항체 및/또는 검출 항체로서 사용될 수 있다. 분석물이 동중성 또는 이종성 일 수 있는 단량체 형태 및 이량체/다량체 형태와 같은 1개 이상의 형태로 샘플중에 존재할 수 있는 경우에, 단량체 형태상에서만 노출된 에피토프에 결합할 수 있는 도메인을 갖는 하나의 결합 단백질 또는 DVD-Ig 및 이량체/다량체 형태의 상이한 부분상의 에피토프와 결합할 수 있는 도메인을 갖는 또 다른 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 포획 항체 및/또는 검출 항체로서 사용되어 검출을 가능하게 하고 상이한 형태의 소정의 분석물을 정량할 수 있게 한다. 추가로, 단일 결합 단백질 또는 DVD-Ig내 및/또는 결합 단백질 또는 DVD-Ig 사이에 차등적 친화성을 갖는 결합 단백질 또는 DVD-Ig를 사용하여 결합가 이점을 제공할 수 있다. 본원에 기재된 면역분석과 관련하여, 이것은 일반적으로 결합 단백질 또는 DVD-Ig의 구조물내 하나 이상의 링커를 혼입시키기 위해 도움을 줄 수 있거나 요망될 수 있다. 존재하는 경우, 최적으로 링커는 외곽 도메인에 의한 또 다른 에피토프의 결합 뿐만 아니라 내부 도메인에 의한 에피토프의 결합을 가능하게 하기 위해 충분한 길이 및 구조적 실행가능성을 가져야만 한다. 이와 관련하여, 결합 단백질 또는 DVD-Ig가 2개의 상이한 분석물과 결합할 수 있고 하나의 분석물이 또 다른 분석물보다 큰 경우, 바람직하게 대형 분석물은 외곽 도메인에 의해 결합된다.

[0433] 일반적으로 말해서, 분석물(또는 이의 단편)에 대해(함유된 것으로 의심되는) 시험된 샘플은 동시에 또는 후속적으로 및 임의의 순서로 하나 이상의 포획 항체(또는 항체들) 및 하나 이상의 검출 항체(이것은 제2 검출 항체 또는 제2 검출 항체일 수 있거나 심지어 연속적으로 번호를 매긴 항체, 예를 들면, 경우에 따라 포획 및/또는 검출 항체가 다중 항체를 포함한다)와 접촉시킬 수 있다. 예를 들면, 시험 샘플은 먼저 하나 이상의 포획 항체와 접촉시킴에 이어서 연속적으로 하나 이상의 검출 항체와 접촉시킬 수 있다. 또한 시험 샘플은 먼저 하나 이상의 검출 항체와 접촉시키고 이어서 (연속적으로) 하나 이상의 포획 항체와 접촉시킬 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 시험 샘플은 포획 항체 및 검출 항체와 동시에 접촉시킬 수 있다.

[0434] 샌드위치 분석 포맷에서, 분석물(또는 이의 단편)을 함유하는 의심되는 샘플은 먼저 제1 항체/분석물 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 하나 이상의 제1 포획 항체와 접촉시킨다. 하나 이상의 포획 항체가 사용되는 경우, 2개 이상의 포획 항체를 포함하는 제1 포획 항체/분석물 복합체가 형성된다. 샌드위치 분석에서, 당해 항체, 즉, 바람직하게 하나 이상의 포획 항체가 시험 샘플에서 예상되는 몰 과량의 최대량의 분석물(또는 이의 단편)에 사용된다. 예를 들면, 완충액(예를 들면, 미세입자 피복 완충액) ml당 약 5 μ g 내지 약 1 mg의 항체가 사용될 수 있다.

[0435] 단지 하나의 항체에 의한 결합이 요구되기 때문에 작은 분석물을 측정하기 위해 흔히 사용되는 경쟁 억제 면역분석은 연속적 및 통상적 포맷을 포함한다. 연속적 경쟁 억제 면역분석에서, 목적하는 분석물에 대한 포획 항체를 미세적정 플레이트 또는 기타 고체 지지체의 웰상으로 피복시킨다. 목적하는 분석물을 함유하는 샘플이 웰에 첨가되는 경우, 목적하는 분석물은 포획 항체에 결합한다. 세척 후, 공지된 양의 표지된(예를 들면, 비오틴 또는 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)) 분석물을 당해 웰에 첨가한다. 효소적 표지에 대한 기질은 신호를 생성할 필요가 있다. HRP를 위해 적합한 기질의 예는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)이다. 세척 후, 표지된 분석물에 의해 생성된 신호는 측정하고 샘플중의 분석물의 양과 반비례한다. 통상적인 경쟁 억제 면역분석에서, 목적하는 분석물에 대한 항체는 고정상 지지체(예를 들면, 미세여가 플레이트의 웰)상으로 피복시킨다. 그러나, 연속적인 경쟁 억제 면역분석 같지 않게 당해 샘플 및 표지된 분석물은 동시에 웰에 첨가한다. 샘플 중의 임의의 분석물은 포획 항체에 결합하는 것에 대해 표지된 분석물과 경쟁한다. 세척 후, 표지된 분석물에 의해 생성된 신호를 측정하고 샘플중의 분석물의 양에 반비례한다.

[0436] 임의로, 시험 샘플을 하나 이상의 포획 항체(예를 들면, 제1 포획 항체)와 접촉시키기 전에, 하나 이상의 포획

항체를, 시험 샘플로부터 제1 항체/분석물(또는 이의 단편) 복합체의 분리를 촉진시키는 고휘형 지지체상에 결합시킬 수 있다. 포획 항체가 결합된 기질은 샘플로부터 포획 항체-분석물 복합체의 분리를 촉진시키는 임의의 적합한 고휘형 지지체 또는 고휘형상일 수 있다.

[0437] 이의 예는 미세적정 플레이트와 같은 플레이트의 웰, 시험 튜브, 다공성 겔(예를 들면, 실리카 겔, 아가로스, 텍스트란, 또는 젤라틴), 중합체 필름(예를 들면, 폴리아크릴아미드), 비드(예를 들면, 폴리스티렌 비드 또는 자기 비드), 여과기/막(예를 들면, 니트로셀룰로스 또는 나일론) 스트립, 미세입자(예를 들면, 라텍스 입자, 자기화될 수 있는 미세입자(예를 들면, 산화철 또는 산화크로뮴 및 동종 또는 이종 중합체 피복물을 갖고 반경이 약 1 내지 10 μ m)를 포함한다. 당해 기질은 항원과 결합하기에 적합한 표면 친화성 및 검출 항체에 의한 접근을 허용하기에 충분한 다공성을 갖는 적합한 다공성 물질을 포함할 수 있다. 수화된 상태의 젤라틴성 물질이 사용될 수 있지만 미세다공성 물질이 일반적으로 바람직하다. 당해 다공성 기질은 바람직하게 두께가 약 0.01 내지 약 0.5mm, 바람직하게는 약 0.1mm인 시트 형태이다. 공극 크기는 상당히 다양할 수 있지만 바람직하게 공극 크기는 약 0.025에서 약 15 μ m이고 보다 바람직하게는 약 0.15에서 약 15 μ m이다. 당해 기질의 표면은 항체의 기질로의 공유 결합을 유발하는 화학적 공정에 의해 활성화될 수 있다. 일반적으로 항원 또는 항체의 기질로의 소수성 힘을 통한 흡착에 의한 비가역적 결합이 생성된다. 또한, 화학적 커플링 제제 또는 기타 다른 수단을 사용하여 항체를 기질로 공유결합시킬 수 있고 단, 당해 결합은 분석물에 결합하는 항체의 능력을 방해하지 않는다. 또는, 당해 항체는 사전에 스트렙타비딘 (예를 들면, DYNAL® Magnetic Beads, Invitrogen, Carlsbad, CA) 또는 비오틴으로 피복된 미세입자(예를 들면, Power-Bind™-SA-MP 스트렙타비딘 피복된 미세입자(Seradyn, Indianapolis, IN)) 또는 항-중-특이적 모노클로날 항체와 결합될 수 있다. 필요하다면, 당해 기질은 다양한 기능성 그룹과의 반응을 허용하기 위해 유도체화될 수 있다. 당해 유도체화는 특정 커플링제의 사용을 요구하고 이의 예는 말레산 무수물, N-하이드록시숙신이미드, 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 경우에 따라, 하나 이상의 포획 시약, 예를 들면, 항체(또는 이의 단편)를 포함하지만 이에 제한되지 않고 분석물에 특이적인 이의 각각은 상이한 물리적 또는 허용가능한 위치[예를 들면, 바이오칩 배열(문헌참조: 예를 들면, 미국 특허 제6,225,047호; 6,329,209호; 및 5,242,828호; 및 PCT 공개 제WO 99/51773호 및 WO 00/56934호)]에서 고휘형상에 부착될 수 있다. 포획 시약이 고휘형 지지체로서 질량 분광측정 프로브에 부착되는 경우, 당해 프로브에 결합된 분석물의 양은 레이저 탈착 이온화 질량 분광측정에 의해 검출될 수 있다. 또는, 단일 칼럼은 상이한 비드로 팩킹될 수 있고 당해 비드는 하나 이상의 포획 시약으로 유도체화되어 단일 위치에서 분석물을 포획한다(참조: 항체 유도체화된 비드 기본 기술, 예를 들면, 루미넥스 xMAP 기술(Austin, TX)).

[0438] 분석물(또는 이의 단편)에 대해 분석된 시험 샘플을 하나 이상의 포획 항체(예를 들면, 제1 포획 항체)와 접촉시킨 후, 당해 혼합물을, 제1 항체(또는 다중 항체)-분석물(이의 단편) 복합체가 형성되도록 항온처리한다. 항온처리하는 약 2°C 내지 약 45°C의 온도에서 약 4.5 내지 약 10.0의 pH에서 적어도 약 1분 내지 약 18시간, 바람직하게는 약 1 내지 약 24분, 가장 바람직하게는 약 4 내지 약 18분동안 수행될 수 있다. 본원에 기재된 면역분석은 1단계(샘플, 하나 이상의 포획 항체 및 하나 이상의 검출 항체가 모두 연속적으로 또는 동시에 반응 용기에 첨가됨을 의미하는) 또는 1개 이상의 단계, 예를 들면, 1단계 이상, 예를 들면, 2단계, 3단계 등으로 수행할 수 있다.

[0439] (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편) 복합체의 형성 후, 당해 복합체를 이어서 (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편)/제2 검출 항체 복합체)의 형성을 허용하는 조건하에서 하나 이상의 검출 항체와 접촉시킨다. 명백하기 위해 "제2" 항체로서(예를 들면, 제2 검출 항체) 포획되지만, 사실 다중 항체가 포획 및/또는 검출을 위해 사용되는 경우, 하나 이상의 검출 항체가 면역분석에서 사용되는 제2, 제3, 제4 항체 등일 수 있다. 포획 항체/분석물(또는 이의 단편) 복합체가 하나 이상의 검출 항체와 접촉되는 경우, (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편)/(다중) 검출 항체 복합체가 형성된다. 포획 항체(예를 들면, 제1 포획 항체)에 대하여, 하나 이상의 (예를 들면, 제2 및 임의의 연속) 검출 항체가 포획 항체/분석물(또는 이의 단편) 복합체와 접촉되는 경우 상기된 것들과 유사한 조건하에서 항온 처리가 (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편)/(제2 또는 다중) 검출 항체 복합체의 형성을 위해 요구된다. 바람직하게, 하나 이상의 검출 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 검출가능한 표지는 (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편)(제2 또는 다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편)/(제2 또는 다중) 검출 항체 복합체의 형성 전, 이와 동시에 이후에 하나 이상의 검출 항체(예를 들면, 제2 검출 항체)에 결합될 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 검출 가능한 표지가 사용될 수 있다(상기 논의를 참조:the Polak and Van Noorden (1997) and Haugland (1996)).

[0440] 검출가능한 표지는 항체에 직접적으로 또는 커플링제를 통해 결합될 수 있다. 사용될 수 있는 커플링제의 예는

EDAC(1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드, 하이드로클로라이드)(제조원: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)이다. 사용될 수 있는 다른 커플링 제제는 당업계에 공지되어 있다. 항체에 검출가능한 표지를 결합시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 추가로, 많은 검출가능한 표지는 구입될 수 있거나 합성될 수 있고 당해 표지는 항체로의 검출 가능한 표지의 커플링을 촉진시키는 목적 그룹을 이미 함유하고 있고 예를 들면, CPSP-아크리디늄 에스테르(즉, 9-[N-토실-N-(3-카복시프로필)]-10-(3-설포프로필)아크리디늄 카복사아미드) 또는 SPSP-아크리디늄 에스테르(즉, N10-(3-설포프로필)-N-(3-설포프로필)-아크리디늄-9-카복사아미드)가 있다.

[0441] (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물/(제2 또는 다중) 검출 항체 복합체는 표지의 정량 전에 시험 샘플의 나머지에서부터 분리될 수 있거나 분리될 필요가 없다. 예를 들면, 하나 이상의 포획 항체(예를 들면, 제1 포획 항체)가 웰 또는 비드와 같은 고정 지지체에 결합되는 경우, 분리는 고정 지지체와의 접촉으로부터 유체(시험 샘플의 유체)를 제거함에 의해 달성될 수 있다. 또는, 적어도 제1 포획 항체가 고정 지지체에 결합되는 경우, 이것은 분석물-함유 샘플 및 하나 이상의 제2 검출 항체와 동시에 접촉시켜 제1(다중) 항체/분석물/제2 (다중) 항체 복합체를 형성할 수 있고 이어서 당해 고정 지지체와의 접촉으로부터 유체(시험 샘플)를 제거한다. 적어도 제1 포획 항체가 고정 지지체에 결합되지 않은 경우(제1 또는 다중) 포획 항체/분석물/(제2 또는 다중) 항체 복합체는 표지 양의 정량을 위해 시험 샘플로부터 제거될 필요는 없다.

[0442] 표지된 포획 항체/분석물/검출 항체 복합체(예를 들면, 제1 포획 항체/분석물/제2 검출 항체 복합체)의 형성 후, 복합체내 표지의 양은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 정량한다. 예를 들면, 효소적 표지가 사용되는 경우, 표지된 복합체는 발색과 같이 반응이 정량가능할 수 있는 표지에 대한 기질과 반응시킨다. 표지가 방사성화성 표지인 경우, 당해 표지는 섬광 계수기와 같은 적당한 수단을 사용하여 정량한다. 표지가 형광 표지인 경우, 당해 표지는 한 색상의 빛("여기 파장"으로서 공지됨)으로 표지를 자극시키고 자극에 반응하여 표지에 의해 방출되는 또 다른 색상("방출 파장"으로서 공지됨)을 검출함에 의해 정량한다. 표지가 화학발광 표지인 경우, 당해 표지는 가시적으로 또는 발광측정기, X-선 필름, 고속 사진 필름, CCD 필름 등을 사용함에 의해 방출되는 빛을 검출함에 의해 정량된다. 일단 복합체내 표지의 양이 정량된 경우 시험 샘플중의 분석물 또는 이의 단편의 농도는 적당한 수단, 예를 들면, 공지된 농도의 분석물 또는 이의 단편의 연속 희석을 사용하여 생성된 표준 곡선을 사용함에 의해 결정한다. 분석물 또는 이의 단편의 연속 희석을 사용하는 것 외에 표준 곡선은 질량 분광 측정 및 다른 당업계에 공지된 기술에 의한 중력측정으로 생성될 수 있다.

[0443] ARCHITECT® 분석기를 사용하는 화학발광 미세입자 분석에서, 접합체 희석 pH는 약 6.0 +/- 0.2이어야만 하고, 미세입자 피복 완충액은 약 실온(즉, 약 17 내지 약 27°C에서)에서 유지되어야만 하고, 미세입자 피복 완충액 pH는 약 6.5 +/- 0.2이어야만 하고, 미세입자 희석 pH는 약 7.8 +/- 0.2이어야만 한다. 고체는 바람직하게 약 0.2% 미만, 예를 들면, 0.15% 미만, 약 0.14% 미만, 약 0.13% 미만, 약 0.12% 미만, 또는 약 0.11% 미만, 예를 들면, 약 0.10%이다.

[0444] FPIA는 경쟁 결합 면역분석 원리를 기초로 한다. 형광 표지된 화합물이 선형 편광 빛에 의해 여기되는 경우 이의 회전율에 역비례하는 편광 정도를 갖는 형광을 방출한다. 형광 표지된 추적-항체 복합체가 서형 편광된 빛에 의해 여기되는 경우, 방출된 빛은 형광단위, 빛이 흡수되고 방출되는 시간 사이에 회전하는 것으로 제약을 받기 때문에 고도로 편광된 상태로 있다. "자유" 추적 화합물(즉, 항체에 결합되지 않은 화합물)이 선형 편광 빛에 의해 여기되는 경우, 이의 회전은 경쟁 결합 면역분석에서 생성되는 상응하는 추적-항체 접합체(또는 추적 결합 단백질 및/또는 추적 DVD-Ig)보다 훨씬 신속하다. FPIA는 특별한 취급 및 처리를 요하는 방사성화성 물질이 없기 때문에 RIA 보다 이점을 갖는다. 또한, FPIA는 용이하게 및 신속하게 수행될 수 있는 균일한 분석이다.

[0445] 상기 관점에서, 시험 샘플중에 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법을 제공한다. 당해 방법은 (i) (i') 분석물에 결합할 수 있는 항체 또는 항체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체의 단편(또는 추적 결합 단백질 및/또는 추적 DVD-Ig) 및 분석물에 결합할 수 있는 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 이의 변이체의 단편) 및 (ii') 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고 (ii) 대조군 또는 캘리브레이터내 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직간접적인 징후로서 생성된 신호와, 시험 샘플중의 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직간접적인 징후로서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호를 비교함을 포함하는 분석에 의해 분석물(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석함을 포함한다. 캘리브레이터는 임의로 일련의 캘리브레이터의 일부이고 여기서, 캘리브레이터 각각은 분석물의 농도에 의해 다른 캘리브레이터로부터 상이하다.

[0446] 당해 방법은 (i) 분석물에 결합할 수 있는 항체, 항체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체의 단편, 및 분석물에 결합할 수 있는 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 이의 변

이체의 단편)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제1 특이적 결합 파트너를 시험 샘플과 접촉시켜 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편)을 형성하는 단계, (ii) 분석물에 결합할 수 있는 검출가능하게 표지된 항-분석물 항체 또는 검출가능하게 표지된 항-분석물 항체의 단편, 분석물과 결합할 수 있는 항-분석물 항체의 검출가능하게 표지된 변이체, 분석물과 결합할 수 있는 항-분석물 항체의 변이체의 검출가능하게 표지된 단편, 및 검출가능하게 표지된 DVD-Ig(또는 단편, 변이체, 이의 변이체의 단편)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제2 특이적 결합 파트너와 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편) 복합체를 접촉시켜 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편)/제2 특이적 결합 파트너 복합체를 형성하는 단계 및 (iii) (ii)에서 형성된 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편)/제2 특이적 결합 파트너 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호를 검출하거나 측정함에 의해 시험 샘플내 분석물의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포함한다. 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제1 특이적 결합 파트너 및/또는 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제2 특이적 결합 파트너가 본원에 기재된 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)인 방법이 바람직할 수 있다.

[0447] 또는, 당해 방법은 분석물에 결합할 수 있는 항체, 항체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체의 단편, 및 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제1 특이적 결합 파트너와 시험 샘플을 접촉시키는 단계 및 동시에 또는 연속으로 어느 한 순서로 하나 이상의 제1 특이적 결합 파트너에 결합하는 것에 대해 분석물(또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있고, 제1 특이적 결합 파트너에 결합할 수 있는 검출가능하게 표지된 분석물, 검출가능하게 표지된 분석물의 단편, 제1 특이적 결합 파트너와 결합할 수 있는 분석물의 검출가능하게 표지된 변이체, 및 제1 특이적 결합 파트너와 결합할 수 있는 분석물의 변이체의 검출가능하게 표지된 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 제2 특이적 결합 파트너와 시험 샘플을 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 시험 샘플에 존재하는 임의의 분석물(또는 이의 단편) 및 하나 이상의 제2 특이적 결합 파트너는 서로 경쟁하여 각각 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편) 복합체 및 제1 특이적 결합 파트너/제2 특이적 결합 파트너 복합체를 형성한다. 당해 방법은 추가로 (ii)에서 형성된 제1 특이적 결합 파트너/제2 특이적 결합 파트너 복합체중에서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호를 검출하거나 측정함에 의해 시험 샘플내 분석물의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포함하고, 이때, 제1 특이적 결합 파트너/제2 특이적 결합 파트너 복합체내 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호는 시험 샘플중에 분석물의 양 또는 농도에 반비례한다.

[0448] 상기 방법은 추가로 시험 샘플이 수득된 환자의 치료학적/예방학적 치료의 효능을 진단하거나, 예후하거나 평가함을 포함할 수 있다. 당해 방법이 추가로 시험 샘플이 수득된 환자의 치료학적/예방학적 치료의 효능을 평가하는 단계를 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 효능을 개선시킬 필요가 있는 환자의 치료학적/예방학적 치료를 변형시키는 단계를 추가로 포함한다. 당해 방법은 자동화 시스템 또는 반자동화 시스템에서 사용하기 위해 조정될 수 있다.

[0449] 보다 구체적으로, 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 방법이 제공된다. 당해 방법은 면역분석에 의해 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하는 것을 포함한다. 면역분석은 (i) 하나 이상의 결합 단백질 및 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 대조군 또는 캘리브레이터 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접 또는 간접 지표로서 생성된 신호에 대해 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호를 비교하는 것을 포함한다. 캘리브레이터는 일련의 캘리브레이터들의 임의의 일부이고, 여기서 각각의 캘리브레이터는 상기 항원(또는 이의 단편)의 농도가 일련의 캘리브레이터들 중 다른 캘리브레이터와 상이하다. 하나 이상의 결합 단백질 중 하나는 (i') $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C 는 중쇄 불변 도메인이고, $(X1)_n$ 은 임의로 존재하는 링커이고, 존재하는 경우 $CH1$ 이 아니고, $(X2)_n$ 은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, (ii') 항원의 쌍에 결합할 수 있다. 당해 방법은 (i) 시험 샘플을 하나 이상의 포획제와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 포획제는 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 형성한다); (ii) 상기 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 하나 이상의 검출제와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 검출제는 검출가능한 표지를 포함하고, 포획제에 의해 결합되지 않은 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편)/검출제 복합체를 형성한다); 및 (iii) 상기 (ii)에서 형성된 포획제/항원(또는 이의 단편)/검출제 복합체에서 상기 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호에 기초하여 상기 시험 샘플 중의 상기 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제는 하나 이상의 결합 단백질이다)를 포함할 수 있다. 대안으로, 당해 방법은 (i) 시험 샘플을 하나 이상의 포획제와 접촉시키고(여기서, 상기 포획제는

항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 형성한다), 동시에 또는 연속적으로, 어느 한 순서로, 시험 샘플을, 하나 이상의 포획제에 결합하기 위해 시험 샘플 중의 임의의 항원(또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편)과 접촉시키는 단계(여기서, 상기 시험 샘플 중의 임의의 항원(또는 이의 단편) 및 검출가능하게 표지된 항원은 서로 경쟁하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체를 각각 형성한다); 및 ii) 상기 (ii)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호에 기초하여 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 결합 단백질이고, 여기서 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체 중의 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호는 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 양 또는 농도에 반비례한다)를 포함할 수 있다. 시험 샘플은 환자 유래일 수 있고, 이러한 경우 당해 방법은 추가로 환자의 치료학적/예방학적 처치의 효능을 진단, 예측, 또는 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 당해 방법이 환자의 치료학적/예방학적 처치의 효능을 평가하는 단계를 추가로 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 필요에 따라 환자의 치료학적/예방학적 처치를 변경하여 효능을 개선시키는 단계를 추가로 포함한다. 당해 방법은 자동화 시스템 또는 반자동화 시스템에서 사용하기 위해 조정될 수 있다.

[0450]

시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 다른 방법이 제공된다. 당해 방법은 면역분석에 의해 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하는 것을 포함한다. 면역분석은 (i) 하나 이상의 결합 단백질 및 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 대조군 또는 캘리브레이터 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접 또는 간접 지표로서 생성된 신호에 대해 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접 또는 간접 지표로서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호를 비교하는 것을 포함한다. 캘리브레이터는 일련의 캘리브레이터들의 임의의 일부이고, 여기서 각각의 캘리브레이터는 상기 항원(또는 이의 단편)의 농도가 일련의 캘리브레이터들 중 다른 캘리브레이터와 상이하다. 하나 이상의 결합 단백질 중 하나는 (i') $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고, $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고, C 는 경쇄 불변 도메인이고, $(X1)_n$ 은 임의로 존재하는 링커이고, 존재하는 경우 CL 이 아니고, $(X2)_n$ 은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, (ii') 항원의 쌍에 결합할 수 있다. 당해 방법은 (i) 시험 샘플을 하나 이상의 포획제와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 포획제는 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 형성한다); (ii) 상기 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 하나 이상의 검출제와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 검출제는 검출가능한 표지를 포함하고, 포획제에 의해 결합되지 않은 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편)/검출제 복합체를 형성한다); 및 (iii) 상기 (ii)에서 형성된 포획제/항원(또는 이의 단편)/검출제 복합체에서 상기 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호에 기초하여 상기 시험 샘플 중의 상기 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제는 하나 이상의 결합 단백질이다)를 포함할 수 있다. 대안으로, 당해 방법은 (i) 시험 샘플을 하나 이상의 포획제와 접촉시키고(여기서, 상기 포획제는 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 형성한다), 동시에 또는 연속적으로, 어느 한 순서로, 시험 샘플을, 하나 이상의 포획제에 결합하기 위해 시험 샘플 중의 임의의 항원(또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편)과 접촉시키는 단계(여기서, 상기 시험 샘플 중의 임의의 항원(또는 이의 단편) 및 검출가능하게 표지된 항원은 서로 경쟁하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체를 각각 형성한다); 및 ii) 상기 (ii)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호에 기초하여 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 결합 단백질이고, 여기서 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체 중의 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호는 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 양 또는 농도에 반비례한다)를 포함할 수 있다. 시험 샘플은 환자 유래일 수 있고, 당해 방법은 추가로 환자의 치료학적/예방학적 처치의 효능을 진단, 예측, 또는 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 당해 방법이 환자의 치료학적/예방학적 처치의 효능을 평가하는 단계를 추가로 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 필요에 따라 환자의 치료학적/예방학적 처치를 변경하여 효능을 개선시키는 단계를 추가로 포함한다. 당해 방법은 자동화 시스템 또는 반자동화 시스템에서 사용하기 위해 조정될 수 있다.

[0451]

시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 또 다른 방법이 제공된다. 당해 방법은 면역분석에 의해 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하는 것을 포함한다. 면역분석은 (i) 하나

이상의 결합 단백질 및 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 대조군 또는 캘리브레이터 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접 또는 간접 지표로서 생성된 신호에 대해 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접 또는 간접 지표로서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호를 비교하는 것을 포함한다. 캘리브레이터는 일련의 캘리브레이터들의 임의의 일부이고, 여기서 각각의 캘리브레이터는 상기 항원(또는 이의 단편)의 농도가 일련의 캘리브레이터들 중 다른 캘리브레이터와 상이하다. 하나 이상의 결합 단백질 중 하나는 (i') 제1 폴리펩타이드쇄 및 제2 폴리펩타이드쇄를 포함하고, 여기서 상기 제1 폴리펩타이드쇄는 제1 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C 는 중쇄 불변 도메인이고, $(X1)_n$ 은 임의로 존재하는 제1 링커이고, $(X2)_n$ 은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하고, 여기서 상기 제2 폴리펩타이드쇄는 제2 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고, $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고, C 는 경쇄 불변 도메인이고, $(X1)_n$ 은 임의로 존재하는 링커이고, $(X2)_n$ 은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하고, (ii') 항원의 쌍에 결합할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상기 제1 및 제2 $X1$ 링커들은 동일하다. 다른 실시형태에서, 제1 및 제2 $X1$ 링커들은 상이하다. 하나의 실시형태에서, 제1 $X1$ 링커는 $CH1$ 도메인이 아니다. 하나의 실시형태에서, 제2 $X1$ 링커는 CL 도메인이 아니다. 당해 방법은 (i) 시험 샘플을 하나 이상의 포획제와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 포획제는 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 형성한다); (ii) 상기 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 하나 이상의 검출제와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 검출제는 검출가능한 표지를 포함하고, 포획제에 의해 결합되지 않은 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편)/검출제 복합체를 형성한다); 및 (iii) 상기 (ii)에서 형성된 포획제/항원(또는 이의 단편)/검출제 복합체에서 상기 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호에 기초하여 상기 시험 샘플 중의 상기 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제는 하나 이상의 결합 단백질이다)를 포함할 수 있다. 대안으로, 당해 방법은 (i) 시험 샘플을 하나 이상의 포획제와 접촉시키고(여기서, 상기 포획제는 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 형성한다), 동시에 또는 연속적으로, 어느 한 순서로, 시험 샘플을, 하나 이상의 포획제에 결합하기 위해 시험 샘플 중의 임의의 항원(또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편)과 접촉시키는 단계(여기서, 상기 시험 샘플 중에 존재하는 임의의 항원(또는 이의 단편) 및 검출가능하게 표지된 항원은 서로 경쟁하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체를 각각 형성한다); 및 ii) 상기 (ii)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호에 기초하여 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 결합 단백질이고, 여기서 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체 중의 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호는 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 양 또는 농도에 반비례한다)를 포함할 수 있다. 시험 샘플은 환자 유래일 수 있고, 당해 방법은 추가로 환자의 치료학적/예방학적 처치의 효능을 진단, 예측, 또는 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 당해 방법이 환자의 치료학적/예방학적 처치의 효능을 평가하는 단계를 추가로 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 필요에 따라 환자의 치료학적/예방학적 처치를 변경하여 효능을 개선시키는 단계를 추가로 포함한다. 당해 방법은 자동화 시스템 또는 반자동화 시스템에서 사용하기 위해 조정될 수 있다.

[0452]

시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 또 다른 방법이 제공된다. 당해 방법은 면역분석에 의해 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하는 것을 포함한다. 면역분석은 (i) 2개의 항원에 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 단백질 및 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 대조군 또는 캘리브레이터 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접 또는 간접 지표로서 생성된 신호에 대해 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접 또는 간접 지표로서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호를 비교하는 것을 포함한다. 캘리브레이터는 일련의 캘리브레이터들의 임의의 일부이고, 여기서 각각의 캘리브레이터는 상기 항원(또는 이의 단편)의 농도가 일련의 캘리브레이터들 중 다른 캘리브레이터와 상이하다. 하나 이상의 결합 단백질 중 하나는 (i') 4개의 폴리펩타이드쇄를 포함하고, 여기서 제1 폴리펩타이드쇄 및 제3 폴리펩타이드쇄는 제1 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C 는 중쇄 불변 도메인이고, $(X1)_n$ 은 임의로 존재하는 제1 링커이고, $(X2)_n$ 은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하고, 여기서 제2 폴리펩타이드쇄

및 제4 폴리펩타이드쇄는 제2 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서, VD1은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고, C는 경쇄 불변 도메인이고, (X1)_n은 임의로 존재하는 제2 링커이고, (X2)_n은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하고, (ii') 항원의 쌍에 결합할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상기 제1 및 제2 X1 링커들은 동일하다. 다른 실시형태에서, 제1 및 제2 X1 링커들은 상이하다. 하나의 실시형태에서, 제1 X1 링커는 CH1 도메인이 아니다. 하나의 실시형태에서, 제2 X1 링커는 CL 도메인이 아니다. 당해 방법은 (i) 시험 샘플을 하나 이상의 포획제와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 포획제는 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 형성한다); (ii) 상기 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 하나 이상의 검출제와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 검출제는 검출가능한 표지를 포함하고, 포획제에 의해 결합되지 않은 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편)/검출제 복합체를 형성한다); 및 (iii) 상기 (ii)에서 형성된 포획제/항원(또는 이의 단편)/검출제 복합체에서 상기 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호에 기초하여 상기 시험 샘플 중의 상기 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제는 하나 이상의 DVD-결합 단백질이다)를 포함할 수 있다. 대안으로, 당해 방법은 (i) 시험 샘플을 하나 이상의 포획제와 접촉시키고(여기서, 상기 포획제는 항원(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체를 형성한다), 동시에 또는 연속적으로, 어느 한 순서로, 시험 샘플을, 하나 이상의 포획제에 결합하기 위해 시험 샘플 중의 임의의 항원(또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편)과 접촉시키는 단계(여기서, 상기 시험 샘플 중에 존재하는 임의의 항원(또는 이의 단편) 및 검출가능하게 표지된 항원은 서로 경쟁하여 포획제/항원(또는 이의 단편) 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체를 각각 형성한다); 및 ii) 상기 (ii)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호에 기초하여 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 DVD-결합 단백질이고, 여기서 포획제/검출가능하게 표지된 항원(또는 이의 단편) 복합체 중의 검출가능한 표지에 의해 생성된 신호는 시험 샘플 중의 항원(또는 이의 단편)의 양 또는 농도에 반비례한다)를 포함할 수 있다. 시험 샘플은 환자 유래인 경우, 당해 방법은 추가로 환자의 치료학적/예방학적 처치의 효능을 진단, 예측, 또는 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 당해 방법이 환자의 치료학적/예방학적 처치의 효능을 평가하는 단계를 추가로 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 필요에 따라 환자의 치료학적/예방학적 처치를 변경하여 효능을 개선시키는 단계를 추가로 포함한다. 당해 방법은 자동화 시스템 또는 반자동화 시스템에서 사용하기 위해 조정될 수 있다.

[0453] 분석 방법(및 이에 대한 키트)과 관련하여 상업적으로 시판되는 항-분석물 항체 또는 문헌에 기재된 바와 같은 항 분석물의 제조 방법을 사용할 수 있다. 다양한 항체의 공급원은 다음을 포함한다: Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), Gen Way Biotech, Inc. (San Diego, CA), 및 R&D Systems (RDS; Minneapolis, MN).

[0454] 일반적으로, 미리 결정된 수준은 분석물 또는 이의 단편에 대한 시험 샘플을 분석시, 예를 들면, 질환 또는 질환의 위험을 검출하기 위해 수득된 결과를 평가하기 위한 벤치마크로서 사용될 수 있다. 일반적으로, 비교를 하는데 있어서, 미리 결정된 수준은 질환, 장애 또는 병태의 특정 단계 및 중점 또는 특정 임상적 지적과 관련하여 분석물 존재, 양 또는 농도의 연계 또는 연합이 만들어 질수 있도록 충분한 횟수 및 적당한 조건하에서 특정 분석을 수행함에 의해 수득된다. 전형적으로 미리 결정된 수준은 참조 피험체(또는 피험체 집단)의 분석과 함께 수득된다. 측정된 분석물은 이의 단편, 이의 분해 생성물 및/또는 이의 효소적 절단 생성물을 포함할 수 있다.

[0455] 특히, 질환 진행 및/또는 치료를 모니터링하기 위해 사용되는 바와 같은 미리 결정된 수준과 관련하여, 분석물 또는 이의 단편의 양 또는 농도는 "비변화", "선호적으로" (또는 "선호적으로 변형된") 또는 "비선호적으로"(또는 "비선호적으로 변형된")일 수 있다. "상승된" 또는 "증가된"은 전형적인 또는 정상의 수준 또는 범위(예를 들면, 미리 결정된 수준) 보다 높은 또는 또 다른 참조 수준 또는 범위(예를 들면, 보다 조기에 또는 기본 샘플) 보다 높은 시험 샘플내 양 또는 농도를 언급한다. 용어 "저하된" 또는 "감소된"은 전형적이거나 정상의 수준 또는 범위(예를 들면, 미리결정된 수준)보다 낮거나 또 다른 참조 수준 또는 범위(예를 들면, 초기 또는 기본 샘플) 보다 낮은, 시험 샘플내 양 또는 농도를 언급한다. 용어 "변화된"은 전형적이거나 정상의 수준 또는 범위 (예를 들면, 미리 결정된 수준) 또는 또 다른 표준 수준 또는 범위(예를 들면, 초기 또는 기본 샘플)에 비해 변화된 샘플내 양 또는 농도를 언급한다.

[0456] 분석물에 대해 전형적이거나 정상의 수준 또는 범위는 표준 관행에 따라 정의된다. 몇몇 경우에 분석물 수준은 매우 낮기 때문에, 소위 변화된 수준 또는 변화는 실험적 오차 또는 샘플 변화에 의해 설명될 수 없는 전형적이

거나 정상적인 수준 또는 범위 또는 표준 수준 또는 범위와 비교하여 임의의 총 변화가 있는 경우 발생한 것으로 고려될 수 있다. 따라서, 특정 샘플에서 측정된 수준은 소위 정상의 피험체로부터 유사한 샘플내에서 결정된 수준 또는 수준 범위와 비교한다. 이와 관련하여, "정상의 피험체"는 예를 들면, 어떠한 감지할만한 질환이 없는 개체이고 "정상"(때때로, "대조군"으로서 언급됨) 환자 또는 집단은 예를 들면, 각각 검출가능한 질환을 나타내지 않는 환자 또는 집단이다. 추가로, 분석물이 대부분의 사람 집단에서 고준에서 통상적으로 발견되지 않는 경우, "정상의 피험체"는 어떠한 실질적인 검출가능한 증가되거나 상승된 양 또는 농도의 분석물이 없는 피험체로서 고려될 수 있고 "정상" (때때로 "대조군"으로서 언급됨) 환자 또는 집단은 어떠한 실질적으로 검출가능한 증가되거나 상승된 양 또는 농도의 분석물을 나타내지 않는 환자 또는 집단이다. "명백하게 정상인 피험체"는 분석물이 아직 존재하지 않거나 현재 존재하지 않는 것으로 평가된 피험체이다. 분석물 수준은 분석물이 정상적으로는 검출될 수 없지만(예를 들면, 정상 수준은 제로이거나 정상 집단의 약 25 내지 약 75%의 범위내에 있다) 시험 샘플에서는 검출되는 경우 및 분석물이 정상 수준 보다 높은 수준으로 시험 샘플에 존재하는 경우인 경우 "상승된" 것으로 말한다. 따라서, 특히, 당해 기재내용은 특정 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 가질 위험에 처한 환자를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 당해 분석 방법은 또한 다른 마커 등의 분석을 포함할 수 있다.

[0457] 따라서, 본원에 기재된 방법은 또한 피험체가 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 가질 위험에 처해 있는지를 결정하는데 사용될 수 있다. 구체적으로 당해 방법은:

[0458] (a) 분석물(또는 이의 단편)의 피험체로부터 시험 샘플내 농도 또는 양을 결정하는 단계(본원에 기재된 방법 또는 당업계에 공지된 방법을 사용하여); 및

[0459] (b) 단계(a)에서 결정된 분석물(또는 이의 단편)의 양을, 미리 결정된 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있고, 이때, 단계(a)에서 결정된 분석물의 농도 또는 양이 미리결정된 수준과 관련하여 선호되는 경우 피험체는 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖지 않거나 위험에 처하지 않는 것으로 결정된다. 그러나, 단계 (a)에서 결정된 분석물의 농도 또는 양이 미리 결정된 수준과 비선호되는 경우 피험체는 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 이의 위험에 처한 것으로 결정된다.

[0460] 추가로, 피험체에서 질환의 진행을 모니터링하는 방법이 제공된다. 최적으로 당해 방법은:

[0461] (a) 분석물 피험체로부터 시험 샘플내 농도 또는 양을 측정하는 단계;

[0462] (b) 분석물의 피험체로부터 후반 시험 샘플내 농도 또는 양을 측정하는 단계; 및

[0463] (c) 단계(a)에서 결정된 분석물의 농도 또는 양과 단계 (b)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양을 비교하는 단계를 포함하고 단계 (b)에서 결정된 농도 또는 양이 단계(a)에서 결정된 분석물의 농도 또는 양과 비교하는 경우 변화되지 않거나 비선호성인 경우, 피험체내 질환은 계속되는 진행성 또는 악화된 것으로 결정된다. 비교에 의해, 단계(b)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양이 단계(a)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양과 비교하여 선호성인 경우, 피험체내 질환은 중단되거나 퇴행성이거나 개선된 것으로 결정된다.

[0464] 임의로, 당해 방법은 추가로 예를 들면, 미리 결정된 수준과 단계 (b)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양을 비교함을 추가로 포함한다. 추가로, 임의로 당해 방법은 비교시 단계(b)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양이 예를 들면, 미리 결정된 수준과 비교하여 비선호성으로 변화됨을 보여주는 경우 일정 시간동안 피험체를 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료함을 포함한다.

[0465] 여전히 추가로, 당해 방법은 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료받은 환자에서 치료를 모니터링하는데 사용될 수 있다. 구체적으로, 당해 방법은 피험체에 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여하기 전에 피험체로부터 제1 시험 샘플을 제공함을 포함한다. 다음에 분석물의 피험체로부터 제1 시험 샘플에서의 농도 또는 양을 결정한다(예를 들면, 본원에 기재된 방법 또는 당업계에 공지된 방법을 사용한다). 분석물의 농도 또는 양을 결정한 후, 임의로 분석물의 농도 또는 양을 이어서 미리 결정된 수준과 비교한다. 제1 시험 샘플에 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양이 미리 결정된 수준 보다 낮은 경우, 피험체는 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료되지 않는다. 그러나, 분석물의 농도 또는 양이 미리 결정된 수준 보다 높은 경우, 피험체는 일정 시간동안 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료된다. 피험체가 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료되는 시간은 당업자에 의해 결정될 수 있다(예를 들면, 시간은 약 7일 내지 약 2년일 수 있고 능히 약 14일 내지 약 1년일 수 있다).

[0466] 하나 이상의 약제학적 조성물을 사용한 치료 과정 동안에, 제2 및 후속 시험 샘플을 이어서 피험체로부터 수득한다. 시험 샘플의 수 및 시험 샘플이 피험체로부터 수득되는 시간은 중요하지 않다. 예를 들면, 제2 시험 샘플

은 피험체에 먼저 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여한지 7일 후 제2 시험 샘플이 투여될 수 있고 제3 시험 샘플은 피험체에 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여한지 2주 후 수득될 수 있고, 제4 시험 샘플은 피험체에 먼저 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여한지 3주 후 수득될 수 있고 제5 시험 샘플은 피험체에 먼저 하나 이상의 약제학적 조성물 등을 투여한지 4주 후에 수득될 수 있다.

[0467] 각각 제2 또는 후속 시험 샘플이 피험체로부터 수득된 후, 분석물의 농도 또는 양을 제2 또는 후속 시험 샘플에서 결정된다(예를 들어, 본원에 기재되거나 당업계에 공지된 방법을 사용한다). 제2 및 후속 샘플 각각에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양은 이어서 제1 시험 샘플(예를 들면, 본래에 임의로 미리 결정된 수준과 비교된 시험 샘플)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양과 비교한다. 단계 (c)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양이 단계(a)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양과 비교하여 선호적인 경우 피험체 내 질환은 중단되거나 퇴행적이거나 개선된 것으로 결정되고 피험체에는 단계 (b)의 하나 이상의 약제학적 조성물이 계속 투여되어야만 한다. 그러나, 단계 (c)에서 결정된 농도 또는 양이 단계 (a)에 결정된 분석물의 농도 또는 양과 비교하여 변화되지 않은 경우 피험체 내 질환은 계속되거나 진행적이거나 악화된 것으로 결정되고 피험체는 단계 (b)에서 피험체에 보다 높은 농도의 약제학적 조성물이 투여되어 치료되어야만 하거나 피험체는 단계 (b)에서 피험체에 투여되는 하나 이상의 약제학적 조성물과는 상이한 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료되어야만 한다. 구체적으로, 당해 피험체가 피험체의 분석물 수준을 감소시키거나 저하시키기 위해 사전에 투여받은 하나 이상의 약제학적 조성물과는 상이한 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료될 수 있다.

[0468] 일반적으로, 반복 시험이 수행될 수 있는 분석을 위해(예를 들면, 치료에 대한 질환 진행 및/또는 반응을 모니터링하기 위한), 제2 또는 후속 시험 샘플은 제1 시험 샘플이 피험체로부터 수득된 후 시점에 수득된다. 구체적으로 피험체로부터 제2 시험 샘플은 제1 시험 샘플이 피험체로부터 수득된지 수분, 수시간, 수일 또는 수년 후 수득될 수 있다. 예를 들면, 제2 시험 샘플은 피험체로부터 제1 시험 샘플이 수득된지 약 1분, 약 5 분, 약 10 분, 약 15분, 약 30분, 약 45 분, 약 60 분, 약 2 시간, 약 3 시간, 약 4시간, 약 5 시간, 약 6 시간, 약 7 시간, 약 8시간, 약 9 시간, 약 10 시간, 약 11 시간, 약 12 시간, 약 13 시간, 약 14 시간, 약 15 시간, 약 16 시간, 약 17 시간, 약 18 시간, 약 19 시간, 약 20 시간, 약 21 시간, 약 22 시간, 약 23 시간, 약 24 시간, 약 2일, 약 3일, 약 4 일, 약 5일, 약 6 일, 약 7 일, 약 2 주, 약 3 주, 약 4 주, 약 5 주, 약 6 주, 약 7 주, 약 8 주, 약 9 주, 약 10 주, 약 11 주, 약 12 주, 약 13 주, 약 14 주, 약 15 주, 약 16 주, 약 17 주, 약 18 주, 약 19 주, 약 20 주, 약 21 주, 약 22 주, 약 23 주, 약 24 주, 약 25 주, 약 26 주, 약 27 주, 약 28 주, 약 29 주, 약 30 주, 약 31 주, 약 32 주, 약 33 주, 약 34 주, 약 35 주, 약 36 주, 약 37 주, 약 38 주, 약 39 주, 약 40 주, 약 41 주, 약 42 주, 약 43 주, 약 44 주, 약 45 주, 약 46 주, 약 47 주, 약 48 주, 약 49 주, 약 50 주, 약 51 주, 약 52 주, 약 1.5 년, 약 2 년, 약 2.5 년, 약 3.0 년, 약 3.5 년, 약 4.0 년, 약 4.5 년, 약 5.0 년, 약 5.5. 년, 약 6.0 년, 약 6.5 년, 약 7.0 년, 약 7.5 년, 약 8.0 년, 약 8.5 년, 약 9.0 년, 약 9.5 년 또는 약 10.0 년 후 시점에 피험체로부터 수득될 수 있다.

[0469] 질환 진행을 모니터링하기 위해 사용되는 경우, 상기 분석을 사용하여 급성 병태를 앓는 피험체에서 질환의 진행을 모니터링할 수 있다. 또한 임상적 치료 병태로서 공지된 급성 병태는 예를 들면, 심혈관계 또는 분비계가 관여하는 급성, 생명 위협 질환 또는 기타 위독한 의학적 병태를 언급한다. 전형적으로, 중요한 치료 병태는 병원 기반 세팅(응급실, 중환자실, 외상후 센터 또는 기타 응급 치료 세팅을 포함하지만 이에 제한되지 않는다)에서 급성 의학적 간섭 또는 위생 또는 기타 분야별 의료진에 의한 투여를 요하는 병태를 언급한다. 위독한 치료 병태에 대해 반복 투여는 일반적으로 보다 짧은 시간 프레임내에, 즉, 수분, 수시간 또는 일(예를 들면, 약 1 분, 약 5 분, 약 10 분, 약 15 분, 약 30 분, 약 45 분, 약 60 분, 약 2 시간, 약 3 시간, 약 4 시간, 약 5 시간, 약 6 시간, 약 7 시간, 약 8 시간, 약 9 시간, 약 10 시간, 약 11 시간, 약 12 시간, 약 13 시간, 약 14 시간, 약 15 시간, 약 16 시간, 약 17 시간, 약 18 시간, 약 19 시간, 약 20 시간, 약 21 시간, 약 22 시간, 약 23 시간, 약 24 시간, 약 2 일, 약 3 일, 약 4 일, 약 5 일, 약 6 일 또는 약 7일)에 투여되고 초기 분석은 또한 일반적으로 보다 짧은 시간 프레임내에, 예를 들면, 질환 또는 병태의 발병 약 수분, 수시간 또는 수일에 수행된다.

[0470] 또한 당해 분석을 사용하여 만성 또는 비-급성 병태를 앓는 피험체에서 질환의 진행을 모니터링할 수 있다. 비-위독성 치료 또는 비-급성 병태는 예를 들면, 심혈관계 및/또는 분비계가 관여하는 급성 생명 위협 질환 또는 기타 위독한 의학적 병태 이외의 병태를 언급한다. 전형적으로, 비-급성 병태는 장기 또는 만성적 지속적 병태를 포함한다. 비-급성 병태에 대해, 반복 모니터링은 보다 긴 시간 프레임내에, 예를 들면, 수시간, 수일, 수주, 수개월 또는 수년 (예를 들면, 약 1 시간, 약 2 시간, 약 3 시간, 약 4 시간, 약 5 시간, 약 6 시간, 약 7 시간, 약 8 시간, 약 9 시간, 약 10 시간, 약 11 시간, 약 12 시간, 약 13 시간, 약 14 시간, 약 15 시간, 약

16 시간, 약 17 시간, 약 18 시간, 약 19 시간, 약 20 시간, 약 21 시간, 약 22 시간, 약 23 시간, 약 24 시간, 약 2 일, 약 3 일, 약 4 일, 약 5 일, 약 6 일, 약 7 일, 약 2 주, 약 3 주, 약 4 주, 약 5 주, 약 6 주, 약 7 주, 약 8 주, 약 9 주, 약 10 주, 약 11 주, 약 12 주, 약 13 주, 약 14 주, 약 15 주, 약 16 주, 약 17 주, 약 18 주, 약 19 주, 약 20 주, 약 21 주, 약 22 주, 약 23 주, 약 24 주, 약 25 주, 약 26 주, 약 27 주, 약 28 주, 약 29 주, 약 30 주, 약 31 주, 약 32 주, 약 33 주, 약 34 주, 약 35 주, 약 36 주, 약 37 주, 약 38 주, 약 39 주, 약 40 주, 약 41 주, 약 42 주, 약 43 주, 약 44 주, 약 45 주, 약 46 주, 약 47 주, 약 48 주, 약 49 주, 약 50 주, 약 51 주, 약 52 주, 약 1.5 년, 약 2 년, 약 2.5 년, 약 3.0 년, 약 3.5 년, 약 4.0 년, 약 4.5 년, 약 5.0 년, 약 5.5 년, 약 6.0 년, 약 6.5 년, 약 7.0 년, 약 7.5 년, 약 8.0 년, 약 8.5 년, 약 9.0 년, 약 9.5 년 또는 약 10.0 년)에 수행되고, 초기 분석은 또한 일반적으로 장시간 프레임내에 질환 또는 병태의 발병 약 시간, 수일, 수개월 또는 수년에 수행된다.

[0471] 추가로, 상기 분석은 제1 시험 샘플이 하나의 공급원, 예를 들면, 뇨, 혈청 또는 혈장으로부터 수득되는 피험체로부터 수득된 제1 시험 샘플을 사용하여 수행될 수 있다. 임의로, 상기 분석은 이어서 제2 시험 샘플이 또 다른 공급원으로부터 수득된 피험체로부터 수득된 제2 시험 샘플을 사용하여 반복될 수 있다. 예를 들면, 제1 시험 샘플이 뇨로부터 수득된 경우, 제2 시험 샘플은 혈청 또는 혈장으로부터 수득될 수 있다. 제1 시험 샘플 및 제2 시험 샘플을 사용한 분석으로부터 수득된 결과를 비교할 수 있다. 당해 비교를 사용하여 피험체내 질환 또는 병태의 상태를 평가할 수 있다.

[0472] 더욱이, 본원의 기재는 또한 소정의 질환, 장애 또는 병태를 앓거나 예비 진단된 피험체가 치료로부터 이득을 얻을 것인지를 결정하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본원의 기재는 분석물 기반 진단 방법 및 제품에 관한 것이다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 "피험체내 질환 치료를 모니터링"하는 방법은 또한 추가로 최적으로 치료를 위한 후보물을 선별하거나 동정하는 것을 포함할 수 있다.

[0473] 따라서, 특정 실시형태에서, 본원의 기재는 또한 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 이의 위험에 처한 피험체가 치료를 위한 후보물인지를 결정하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 피험체는 소정의 질환, 장애 또는 병태의 몇몇 증상을 경험하거나 실제로 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 이의 위험에 처한 것으로 진단되고/되거나 본원에 기재된 바와 같은 분석물 또는 이의 단편의 비선호성 농도 또는 양을 입증하는 피험체이다.

[0474] 당해 방법은 임의로 본원에 기재된 바와 같은 분석을 포함하고 여기서 분석물은 하나 이상의 약제학적 조성물(예를 들면, 특히 분석물이 관련된 작용 기작과 관련된 약제), 면역억제 치료 또는 면역촉착 치료에 의한 피험체의 치료 전 및 후에 평가되거나 여기서, 분석물은 당해 치료 후 평가되고 분석물의 농도 또는 양은 미리 결정된 수준과 비교한다. 치료 후 관찰되는 분석물의 양의 비선호성 농도는 피험체가 추가로 또는 계속되는 치료를 받는 것으로부터 이득을 받지 못하는 것으로 확인되는 반면, 치료 후 관찰되는 분석물의 선호성 농도 또는 양은 피험체가 추가로 또는 계속되는 치료로부터 이득을 받을 것으로 확인된다. 이러한 확증은 임상적 연구의 관리 및 개선된 환자 치료를 원조한다.

[0475] 본원의 특정 실시형태는 본원에 논의된 바와 같은 소정의 질환, 장애 또는 병태를 평가하기 위해 사용되는데 유리하지만 당해 분석 및 키트는 기타 질환, 장애 및 병태에서 분석물을 평가하기 위해 사용될 수 있는 것은 말할 필요도 없다. 분석 방법은 또한 기타 마커 등의 분석을 포함할 수 있다.

[0476] 또한 분석 방법을 사용하여 소정의 질환, 장애 또는 병태를 완화시키는 화합물을 동정할 수 있다. 예를 들면, 분석물을 발현하는 세포는 후보 화합물과 접촉시킬 수 있다. 당해 화합물과 접촉된 세포에서 분석물의 발현 수준은 본원에 기재된 분석 방법을 사용하는 대조군 세포의 수준과 비교할 수 있다.

[0477] II. 키트

[0478] 시험 샘플내 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 키트가 또한 제공된다. 당해 키트는 분석물(또는 이의 단편)에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 하나 이상의 성분 및 분석물(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 평가하기 위한 지침서를 포함한다. 분석물(또는 이의 단편)에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 하나 이상의 성분은 임의로 고정화된 항-분석물 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)를 포함하는 조성물을 포함할 수 있다.

[0479] 당해 키트는 면역분석, 예를 들면, 화학발광 미세입자 면역분석에 의한 분석물에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 하나 이상의 성분 및 면역분석, 예를 들면, 화학발광 나노입자 면역분석에 의한 분석물에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 지침서를 포함할 수 있다. 예를 들면, 당해 키트는 분석물에 대한 하나 이상의 특이적 결합 파트너, 예를 들면, 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 분석물에 결합할 수 있는 이의 단편, 분석물에 결

합할 수 있는 이의 변이체 또는 분석물에 결합할 수 있는 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)을 포함할 수 있고 이중 어느 하나는 검출가능하게 표지될 수 있다. 또한 추가로, 당해 키트는 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 분석물과 결합할 수 있는 단편, 분석물과 결합할 수 있는 변이체 또는 분석물과 결합할 수 있는 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)(이중 하나는 고정 지지체상에 고정화될 수 있다)에 결합하는 것에 대해 시험 샘플내 임의의 분석물과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 분석물 (또는 항분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체 또는 항분석물 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편))를 포함할 수 있다. 당해 키트는 캘리브레이터 또는 대조군, 예를 들면, 분리된 또는 정제된 분석물을 포함할 수 있다. 당해 키트는 분석 및/또는 완충액, 예를 들면, 분석 완충 또는 세척 완충(이중 어느 하나는 농축 용액, 검출가능한 표지(예를 들면, 효소적 표지)용 기질 용액 또는 종료 용액으로서 제공될 수 있다)을 수행하기 위해 하나 이상의 컨테이너(예를 들면, 제1 특이적 결합 파트너로 이미 피복될 수 있는 튜브, 미세적정 플레이트 또는 스트립)를 포함할 수 있다. 바람직하게는 당해 키트는 분석을 수행하기 위해 필요한 모든 성분, 즉, 시약, 표준물, 완충액, 희석제 등을 포함한다. 지침서는 종이 형태 또는 디스크, CD, DVD 등과 같은 컴퓨터 판독할 수 있는 형태일 수 있다.

[0480] 보다 구체적으로, 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 키트가 제공된다. 상기 키트는 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 하나 이상의 성분 및 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 지침서를 포함하고, 여기서, 상기 하나 이상의 성분은 결합 단백질을 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 (i') $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C 는 중쇄 불변 도메인이고, $(X1)_n$ 은 임의로 존재하는 링커이고, 존재하는 경우 $CH1$ 이 아니고, $(X2)_n$ 은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함하고, (ii') 항원의 쌍에 결합할 수 있고, 여기서 상기 결합 단백질은 임의로 검출가능하게 표지된다.

[0481] 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 다른 키트가 추가로 제공된다. 상기 키트는 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 하나 이상의 성분 및 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 지침서를 포함하고, 여기서, 상기 하나 이상의 성분은 결합 단백질을 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 (i') $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고, $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고, C 는 경쇄 불변 도메인이고, $(X1)_n$ 은 임의로 존재하는 링커이고, 존재하는 경우 $CH1$ 이 아니고, $(X2)_n$ 은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함하고, (ii') 항원의 쌍에 결합할 수 있고, 여기서 상기 결합 단백질은 임의로 검출가능하게 표지된다.

[0482] 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 다른 키트가 또한 추가로 제공된다. 상기 키트는 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 하나 이상의 성분 및 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 지침서를 포함하고, 여기서, 상기 하나 이상의 성분은 결합 단백질을 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함하고, 여기서 상기 결합 단백질은 (i') 제1 폴리펩타이드쇄 및 제2 폴리펩타이드쇄를 포함하고, 여기서 상기 제1 폴리펩타이드쇄는 제1 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C 는 중쇄 불변 도메인이고, $(X1)_n$ 은 임의로 존재하는 제1 링커이고, $(X2)_n$ 은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하고, 여기서 상기 제2 폴리펩타이드쇄는 제2 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고, $VD2$ 는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고, C 는 경쇄 불변 도메인이고, $(X1)_n$ 은 임의로 존재하는 제2 링커이고, $(X2)_n$ 은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하고, (ii') 항원의 쌍에 결합할 수 있고, 여기서 상기 결합 단백질은 임의로 검출가능하게 표지된다.

[0483] 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 다른 키트가 또한 추가로 제공된다. 상기 키트는 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 하나 이상의 성분 및 항원(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석하기 위한 지침서를 포함하고, 여기서, 상기 하나 이상의 성분은 DVD-결합 단백질을 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함하고, 여기서 상기 DVD-결합 단백질은 (i') 4개의 폴리펩타이드쇄를 포함하고, 여기서 제1 폴리펩타이드쇄 및 제3 폴리펩타이드쇄는 제1 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ [여기서, $VD1$ 은 제1 모 항체(또는 이의

항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, (X1)_n은 임의로 존재하는 제1 링커이고, (X2)_n은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하고, 여기서 제2 폴리펩타이드 쇄 및 제4 폴리펩타이드 쇄는 제2 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n[여기서, VD1은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 상기 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고, C는 경쇄 불변 도메인이고, (X1)_n은 임의로 존재하는 제2 링커이고, (X2)_n은 임의로 존재하는 Fc 영역이다]를 포함하고, (ii') 2개의 항원(또는 이의 단편)에 결합할 수 있고, 여기서 DVD-결합 단백질은 임의로 검출가능하게 표지된다.

[0484] 항-분석물 항체 또는 항 분석물 DVD-Ig와 같은 임의의 항체 또는 추적자는 검출가능한 표지, 예를 들면, 형광단, 방사성활성 잔기, 효소, 비오틴/아비딘 표지, 발색단, 화학발광 표지 등을 혼입시킬 수 있거나 당해 키트는 검출가능한 표지화를 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 항체, 캘리브레이터 및/또는 대조군은 별도의 컨테이너에 제공될 수 있거나 적당한 분석 포맷으로, 예를 들면, 미세적정 플레이트내로 제공될 수 있다.

[0485] 임의로, 당해 키트는 품질 대조군 성분(예를 들면, 민감성 패널, 캘리브레이터 및 양성 대조군)을 포함한다. 품질 대조군 시약의 제법은 당업계에서 널리 공지되어 있고 다양한 면역진단 제품에 대한 삽입 시트상에 기재된다. 민감성 패널 구성원은 임의로 분석 수행능 성질을 확립하기 위해 사용되고 임의로 추가로 면역분석 키트 시약의 통합성 및 분석의 표준화에 대해 유용한 지표이다.

[0486] 당해 키트는 또한 임의로 진단 분석을 수행하거나 품질 대조군 평가를 촉진시키기 위해 요구되는 기타 시약, 예를 들면, 완충제, 염, 효소, 효소 조인자, 효소 기질, 검출 시약등을 포함한다. 완충제 및 시험 샘플의 분리 및/또는 치료용 용액(예를 들면 전처리 시약)과 같은 기타 성분들이 또한 키트에 포함될 수 있다. 당해 키트는 하나 이상의 기타 대조군을 포함할 수 있다. 키트의 하나 이상의 성분은 동결건조될 수 있고 이 경우에 당해 키트는 추가로 동결건조된 성분의 재구성을 위해 적합한 시약을 포함할 수 있다.

[0487] 키트의 다양한 성분은 임의로 필요한 만큼 적합한 컨테이너, 예를 들면, 미세적정 플레이트로 제공된다. 당해 키트는 추가로 샘플을 유지하거나 저장하기 위한 컨테이너(예를 들면, 뇨 샘플용 컨테이너 또는 카트릿지)를 포함할 수 있다. 경우에 따라, 당해 키트는 임의로 또한 반응 용기, 혼합 용기 및 시약 또는 시험 샘플의 제조를 촉진시키는 기타 성분을 포함할 수 있다. 당해 키트는 또한 시험 샘플을 수득하기 위한 하나 이상의 장비, 예를 들면, 시린지, 피펫, 포스트셋, 측정 스폰 등을 포함할 수 있다.

[0488] 검출가능한 표지가 하나 이상의 아크리디늄 화합물인 경우, 키트는 하나 이상의 아크리디늄-9-카복사아미드, 하나 이상의 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르, 또는 이의 임의의 배합물을 포함할 수 있다. 검출가능한 표지가 하나 이상의 아크리디늄 화합물인 경우, 당해 키트는 또한 과산화수소 공급원, 예를 들면, 완충액, 용액 및/또는 하나 이상의 염기성 용액을 포함할 수 있다. 경우에 따라, 당해 키트는 고형상, 예를 들면, 자기 입자, 비드, 시험 튜브, 미세적정 플레이트, 큐벳, 막, 스캐폴딩 분자, 필름, 여과지, 디스크 또는 칩을 함유할 수 있다.

[0489] C. 키트 및 방법의 변형

[0490] 면역분석과 같은 분석에 의한 시험 샘플중에 분석물의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법 뿐만 아니라 키트(또는 이의 성분들)은 예를 들면, 미국 특허 제5,089,424호 및 제5,006,309호에 기재된 바와 같이 및 제조원 [Abbott Laboratories (Abbott Park, IL)]에서 ARCHITECT®로서 시판되는 바와 같이 다양한 자동화된 반-자동화된 시스템(고형상이 미세입자를 포함하는 것들을 포함)에 사용하기 위해 변형될 수 있다.

[0491] 비자동화된 시스템(예를 들면, ELISA)과 비교하여 자동화되거나 반자동화된 시스템간의 몇몇 차이는 제1 특이적 결합 파트너(예를 들면, 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 이의 단편, 이의 변이체 또는 이의 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 이의 변이체 또는 변이체의 단편)이 부착되는 기질(어느 방식으로든지 샌드위치 형성 및 분석물 반응이 영향받을 수 있다) 및 포획 길이 및 시간, 검출 및/또는 임의의 선택적 세척 단계들을 포함한다. 비자동화된 포맷, 예를 들면, ELISA는 샘플 및 포획 시약과 비교적 긴 항온처리 시간(예를 들면 약 2시간)을 필요할 수 있는 반면 자동화 또는 반자동화된 포맷(예를 들면, ARCHITECT®, Abbott Laboratories)은 비교적 짧은 항온처리 시간(예를 들면, 대략 (예를 들면, ARCHITECT®에 대해 18분)을 가질 수 있다. 유사하게, 비자동화된 포맷, 예를 들면, ELISA는 비교적 긴 항온처리 시간(예를 들면, 약 2시간) 동안 접합체 시약과 같은 검출 항체를 항온처리할 수 있는 반면 자동화 또는 반자동화 포맷(예를 들면, ARCHITECT®)은 비교적 짧은 항온처리 시간(예를 들면, ARCHITECT®에 대해 약 4분)을 가질 수 있다.

- [0492] 제조원[Abbott Laboratories]으로부터 시판되는 다른 플랫폼은 AxSYM®, IMx® (미국 특허 제5,294,404호), PRISM®, EIA (비드), 및 Quantum™ II, 및 기타 플랫폼을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 추가로, 당해 분석, 키트 및 키트 성분들을 다른 포맷, 예를 들면, 전기화학적 또는 기타 수동 또는 포인트 오브 케어 분석 시스템에 사용될 수 있다. 본 발명은 예를 들면, 샌드위치 면역분석을 수행하는 시판되는 제품[Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories)] 전기화학적 면역분석 시스템에 적용될 수 있다. 단일 용도 시험 장치에서 면역센서 및 이들의 제조 및 작동 방법은 예를 들면, 미국 특허 제5,063,081호; 제7,419,821호; 및 7,682,833호; 및 미국 특허 공개 제20040018577호 및 제20060160164호에 기재되어 있다.
- [0493] 특히, I-STAT® 시스템에 대한 분석물 분석 적용과 관련하여, 하기의 배열이 바람직하다. 마이크로 조립된 규소 칩은 한쌍의 골드 전류측정 작동 전극 및 실버-실버 클로라이드 표준 전극과 함께 제조된다. 작동 전극중 하나에 대해, 고정화된 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편)이 고정화된 폴리스티렌 비드(0.2mm 직경)을 전극에 대해 패터닝된 폴리비닐 알콜의 중합체 피복물에 부착시킨다. 이러한 칩은 면역분석에 적합한 유체공학적 포맷을 갖는 I-STAT® 카트릿지로 어셈블리된다. 카트릿지 샘플 유지 챔버 벽 부분상에 분석물에 대한 특이적 결합 파트너, 예를 들면, 항-분석물인 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 분석물에 결합할 수 있는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 분석물에 결합할 수 있는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)(이중 어느 하나는 검출 가능하게 표지될 수 있다)를 포함하는 층이 있다. 카트릿지의 유체 파우치내에는 p-아미노페놀 포스페이트를 포함하는 수성 시약이 있다.
- [0494] 작업에서, 분석물을 함유하는 것으로 의심되는 샘플은 시험 카트릿지의 보유 챔버에 첨가되고 당해 카트릿지는 I-STAT® 판독기로 삽입된다. 분석물에 대한 특이적 결합 파트너가 샘플에 용해된 후, 카트릿지내 펌프 요소는 샘플을, 칩을 함유하는 회로로 강제 이동시킨다. 여기서, 이것은 샌드위치의 형성을 촉진시키기 위해 진동시킨다. 분석의 끝에서 두번째 단계에서, 유체를 파우치로부터 당해 회로로 강제 배출시켜 칩으로부터 샘플을 세척하고 폐기 챔버내로 보낸다. 분석의 두번째 단계에서, 알칼린 포스파타제 표지를 p-아미노페놀 포스페이트와 반응시켜 포스페이트 그룹을 절단하고 유리된 p-아미노페놀이 작동 전극에서 전기화학적으로 산화되도록 한다. 측정된 전류를 기준으로 판독기는 내장된 알고리즘 및 공장-결정된 계산 곡선을 수단으로 샘플내 분석물의 양을 계산할 수 있다.
- [0495] 또한 본원에 기재된 바와 같은 방법 및 키트는 필수적으로 면역분석을 수행하기 위한 다른 시약 및 방법을 포함한다. 예를 들면, 당업계에 공지되고/되거나 용이하게 제조되거나, 예를 들면, 접합체 희석제로서, 미세입자 희석제로서 및/또는 계산기 희석제로서 세척을 위해 사용되도록 최적화된 다양한 완충제가 포함된다. 예시적인 접합체 희석제는 특정 키트 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)에 사용되는 ARCHITECT® 접합체 희석제이고 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산(MES), 염, 단백질 차단제, 항미생물 제제 및 세제를 함유한다. 예시적인 계산기 희석제는 특정 키트(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)에 사용되는 ARCHITECT® 사람 계산기 희석제이고 이는 MES, 기타 염, 단백질 차단제 및 항미생물제를 함유하는 완충액을 포함한다. 추가로 2008년 12월 31일자로 출원된 미국 특허원 제61/142,048호에 기재된 바와 같이 예를 들면, 신호 증폭기로서 신호 항체에 연결된 핵산 서열을 사용하여 I-Stat 카트릿지 포맷에서 개선된 신호 생성이 수득될 수 있다.
- [0496] **실시예**
- [0497] **실시예 1: DVD-IgTM 분자의 설계, 작제 및 분석**
- [0498] **실시예 1.1: 모 항체 및 DVD-Ig 분자를 동정하고 성질 분석하기 위해 사용되는 분석**
- [0499] 하기의 분석은 달리 언급되지 않는 경우 실시예 전반에 걸쳐 사용되어 모 항체 및 DVD-Ig 분자를 동정하고 성질 분석하였다.
- [0500] **실시예 1.1.1: 이들의 표적 항원에 대한 모 항체 및 DVD-Ig 분자의 결합 및 친화성을 결정하기 위해 사용되는 분석**
- [0501] **실시예 1.1.1A: 직접적인 결합 ELISA**
- [0502] 목적하는 표적 항원에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위한 효소 연결된 면역흡착 분석을 다음과 같이 수행한다. 고 결합 ELISA 플레이트(Corning Costar # 3369, Acton, MA)를 포스페이트 완충 식염수(10X PBS, Abbott Bioresearch Center, Media Prep# MPS-073, Worcester, MA)중에서 4℃에서 밤새 100 μL/웰의 10 μg/ml의 목적하는 표적 항원(R&D Systems, Minneapolis, MN) 또는 목적하는 표적 항원 세포외 도메인/FC 융합 단백질(R&D

Systems, Minneapolis, MN) 또는 모노클로날 마우스 항-폴리히스티딘 항체(R&D Systems # MAB050, Minneapolis, MN)로 피복시킨다. 플레이트를 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척한다. 플레이트를 실온에서 1/2 시간동안 300 μ L/웰 차단 용액 (PBS중에서 2%로 희석된 비 지방 무수 밀크 분말, 다양한 소매 공급업체)을 첨가하여 차단시킨다. 플레이트를, 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 차단시킨 후 4회 세척한다.

[0503] 또한, 히스티딘(His) 태그된 목적하는 표적 항원(R&D Systems, Minneapolis, MN)의 10 μ g/ml의 웰당 100 μ L를 상기된 바와 같이 모노클로날 마우스 항-폴리히스티딘 항체로 피복된 ELISA 플레이트에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리한다. 웰을 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척한다.

[0504] 상기된 바와 같은 차단 용액중에 희석된 항체 또는 DVD-Ig 제제의 100 μ L를 상기된 바와 같이 제조된 목적하는 표적 항원 플레이트 또는 목적하는 표적 항원/FC 융합 플레이트 또는 항-폴리히스티딘 항체/히스티딘 태그된 목적하는 표적 항원 플레이트에 첨가하고 실온에서 1시간동안 항온처리한다. 웰을 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척한다.

[0505] 10ng/mL 염소 항-사람 IgG-FC 특이적 HRP 접합된 항체(Southern Biotech # 2040-05, Birmingham, AL)의 100 μ L를 목적하는 표적 항원 플레이트 또는 항-폴리히스티딘 항체/히스티딘 태그된 목적하는 표적 항원 플레이트의 각각의 웰에 첨가한다. 또한, 10ng/mL 염소 항-사람 IgG-카과 경쇄 특이적 HRP 접합된 항체(Southern Biotech # 2060-05 Birmingham, AL) 100 μ L를 목적하는 표적 항원/FC 융합 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고 실온에서 1 시간동안 항온처리한다. 플레이트를 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척한다.

[0506] 증진된 TMB 용액(Neogen Corp. #308177, K Blue, Lexington, KY) 100 μ L를 각각의 웰에 첨가하고 실온에서 10분 동안 항온처리한다. 당해 반응은 50 μ L 1N 황산을 첨가하여 종료시켰다. 플레이트를 450nm 파장에서 분광측정으로 판독한다.

[0507] 직접적인 결합 ELISA에서, 결합은 때때로 관찰되지 않는데 이는 아마도 표적 항원상의 항체 결합 부위가 플라스틱 표면으로 피복되는 경우 "마스크"되거나 항원이 "비틀어져" 있기 때문이다. DVD-Ig 분자가 이의 표적에 결합하지 못하는 무능력은 또한 직접 결합 ELISA 포맷에 의해 DVD-Ig 분자 상에 부과된 입체 장애 때문일 수 있다. 다른 ELISA 포맷, 예를 들어, FACS, 바이아코어 또는 생분석에서 모 항체 및 DVD-Ig 분자는 표적 항원에 결합된 직접 결합 ELISA 포맷에서 결합하지 않았다. DVD-Ig 분자의 비결합은 또한 이전에 보여준 바와 같이 DVD-Ig 단백질의 2개 가변 도메인 사이에 링커 길이를 조정함에 의해 복구되었다.

[0508] 실시예 1.1.1.B: 포획 ELISA

[0509] 포획 ELISA에 의해 IL-1 α 또는 IL-1 β 에 대한 모 및 DVD-Ig 단백질의 결합을 측정하기 위해서, ELISA 플레이트(Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY)는 Pierce Coat 완충액 중에 2 μ g/ml로 희석된 항-사람 Fc 항체(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)와 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 항온처리하였다. 플레이트를 세척 완충액(0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS)중에서 5회 세척하였고, 슈퍼블록 차단 완충액(Thermo scientific, #37515) 웰당 200 μ L로 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 차단시켰다. 차단 완충액을 제거하고, 10% 슈퍼블록, 0.5% Tween-20을 함유한 PBS 중의 각각의 항체 또는 DVD-Ig 분자의 2 μ g/ml을 웰당 100 μ L로 웰에 첨가하고, 1시간 동안 25 $^{\circ}$ C에서 항온처리하였다. 웰을 1XPBST로 5회 세척하였고, 1 μ g/ml의 비오틴화된 항원을 1:6 연속 희석으로 적정하였다(10% 슈퍼블록, 0.05% tween 20을 함유하는 PBS 중의 μ g 내지 pg 범위). 이어서, 각각의 항원 희석액을 플레이트에 첨가하고, 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 당해 웰을 5회 세척하고 폴리HRP 스트렙타비딘-HRP(KPL #474-3000, Gaithersburg, MD)로 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 당해 웰을 1XPBST에서 3회 세척하고, 100 μ L의 ULTRA-TMB ELISA(Pierce, Rockford, IL)를 웰 마다 첨가하였다. 색 변화 후 반응을 1N HCL로 종료시키고 450nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표 3은 IL-1 α 및 IL-1 β 를 표적으로 하는 DVD-Ig 작제물에 대한 포획 ELISA 데이터를 나타내고, 수직 값은 사람 항-IL-1 α , 항-IL-1 β 항체, 또는 사람 항-IL-1 α 및/또는 항-IL-1 β 에 대한 항-IL-1 α / β DVD-Ig 단백질의 결합을 나타낸다.

표 3

모 항체 및 IL-1 α 및 IL-1 β DVD-Ig 작제물의 포획 ELISA

모 항체 또는 DVD-Ig ID	N-말단 가변 도메인	C-말단 가변 도메인	포획 ELISA N-말단 VD EC50 (pM)	포획 ELISA C-말단 VD EC50 (pM)
E26.13	IL-1 β		7.7	
3D12.8	IL-1 α		28	
3D12.16	IL-1 α		10	
3D12-362-10/372-15	IL-1 α		7.0	
3D12r16	IL-1 α		72.0	
E26.35	IL-1 β		10.4	
E26.35-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	6.3	10.6
1B12.1	IL-1 β		39.9	
1B12.1-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	40.9	8.7
1B12.3	IL-1 β		43.8	
1B12.3-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	35.2	20.8
1B12.6	IL-1 β		45.9	
1B12.6-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	65.1	9.9

[0510]

[0511]

실시예 1.1.1.C: 바이아코어 기술을 사용한 친화성 측정

표 4

Biacore 분석에 사용된 시약

항원	공급업체 제품명	공급업체	카탈로그 #
IL-1 α	제조업체 사람 IL-1 α	R&D systems	200-LA/CF
IL-1 β	제조업체 사람 IL-1 β	R&D systems	201-LB

[0512]

[0513]

바이아코어 방법:

[0514]

바이아코어 분석(Biacore, Inc, Piscataway, NJ)으로 결합속도 및 해리속도 상수의 역학적 측정으로 항체 또는 DVD-Ig 분자의 친화성을 측정한다. 표적 항원(예를 들면, 정제된 제조업체 표적 항원)에 대한 항체 또는 DVD-Ig 분자의 결합은 25°C에서 Biacore® 1000 또는 3000 장치(Biacore® AB, Uppsala, Sweden)(작동 HBS-EP (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 및 0.005% 계면활성제 P20을 사용함)으로 표면 플라스몬 공명 기반 측정으로 측정한다. 모든 화학물질은 Biacore® AB(Uppsala, Sweden)로 부터 구입하거나 텍스트에 기재된 바와 같은 다른 공급원으로부터 구입한다. 예를 들면, 10mM 나트륨 아세테이트(pH 4.5)에 희석된 대략 5000 RU의 염소 항-마우스 IgG, (Fc γ), 단편 특이적 폴리클로날 항체(Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL)는 25 μ g/ml 에서 제조업체의 지침 및 과정에 따라 표준 아민 커플링 키트를 사용하는 CM5 연구 등급 바이오센서 칩 전반에 걸쳐 직접 고정화시킨다. 바이오센서 표면에 미반응된 잔기는 에탄올아민으로 차단시킨다. 플로우셀 2 및 4에서 변형된 카복시메틸 텍스트란 표면은 반응 표면으로서 사용한다. 플로우 셀 1 및 3에서 염소 항-마우스 IgG 없이 비변형된 카복시메틸 텍스트란 표면은 표준 표면으로서 사용한다. 역학적 분석을 위해, 1:1 랑뮤르 결합 모델로부터 유래된 속도 방정식은 Biaevaluation 4.0.1 소프트웨어를 사용한 모든 8개 주사(범용 적용 분석)의 연합 및 해리 단계에 동시에 적용한다. 정제된 항체 또는 DVD-Ig 분자는 염소 항-마우스 IgG 특이적 반응 표면에 걸친 포획을 위해 HEPES 완충 식염수에 희석한다. 리간드(25 μ g/ml)로서 포획된 항체 또는 DVD-Ig 분자는 50 μ l/분의 유속에서 반응 매트릭스상에 주사한다. 결합 및 해리 속도 상수, k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) 및 k_{off} (s^{-1})는 25 μ l/분의 연속적인 유속하에 측정한다. 속도 상수는 10 내지 200nM 범위의 상이한 항원 농도에서 역학적 결합 측정을 수행함에 의해 유도된다.

[0515]

항체 또는 DVD-Ig 분자와 표적 항원간의 반응의 평형 결합 상수(M)는 이어서 하기 식에 의해 역학적 속도 상수

로부터 계산한다: $K_D = k_{off}/k_{on}$. 결합은 시간의 함수로서 기록하고 역학적 속도 상수를 계산한다. 본 분석에서, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 로 신속한 결합 속도 및 10^{-6} s^{-1} 로 느린 해리 속도가 측정될 수 있다.

표 5

모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 BIACORE 분석

모 항체 또는 DVD-Ig ID	N-말단 가변 도메인 (VD)	C-말단 가변 도메인 (VD)	k_{on}	k_{off}	K_D
			(M-1s-1)	(s-1)	(M)
E26.13	IL-1β		$9.5 \times 10^{+5}$	4.23×10^{-5}	4.45×10^{-11}
E26.35	IL-1β		$1.02 \times 10^{+6}$	2.50×10^{-5}	2.39×10^{-11}
1B12.1	IL-1β		$5.55 \times 10^{+6}$	1.03×10^{-3}	1.86×10^{-10}
1B12.3	IL-1β		$5.73 \times 10^{+6}$	1.18×10^{-3}	2.06×10^{-10}
1B12.6	IL-1β		$6.20 \times 10^{+6}$	1.25×10^{-3}	2.02×10^{-10}
3D12.8	IL-1α		$2.04 \times 10^{+6}$	2.74×10^{-3}	1.35×10^{-9}
3D12.16	IL-1α		$1.21 \times 10^{+6}$	2.53×10^{-3}	2.09×10^{-9}
3D12r16	IL-1α		$9 \times 10^{+5}$	2.77×10^{-5}	3.1×10^{-11}
3D12.10/15	IL-1α		$3.55 \times 10^{+5}$	4.10×10^{-5}	1.15×10^{-10}
E26.13-SS- 3D12.10/15	IL-1α		$5.69 \times 10^{+4}$	3.25×10^{-5}	5.69×10^{-10}
E26.13-SS- 3D12.10/15		IL-1β	$1.66 \times 10^{+6}$	2.65×10^{-5}	1.61×10^{-11}
E26.35-SS- 3D12.10/15	IL-1α		$5.81 \times 10^{+4}$	2.34×10^{-5}	4.03×10^{-10}
E26.35-SS- 3D12.10/15		IL-1β	$1.28 \times 10^{+6}$	7.85×10^{-6}	6.11×10^{-12}
E26.35-SS- 3D12r16	IL-1α		$9.36 \times 10^{+4}$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1 \times 10^{-11}$
E26.35-SS- 3D12r16		IL-1β	$1.17 \times 10^{+6}$	4.11×10^{-6}	3.52×10^{-12}
1B12.1-SS- 3D12r16	IL-1α		$1.11 \times 10^{+5}$	1.33×10^{-5}	1.2×10^{-10}
1B12.1-SS- 3D12r16		IL-1β	$3.08 \times 10^{+6}$	1.10×10^{-3}	3.55×10^{-10}
1B12.3-SS- 3D12r16	IL-1α		$4.39 \times 10^{+4}$	$<1 \times 10^{-6}$	$<2.30 \times 10^{-11}$
1B12.3-SS- 3D12r16		IL-1β	$3.70 \times 10^{+6}$	1.17×10^{-3}	3.15×10^{-10}
1B12.6-SS- 3D12r16	IL-1α		$5.62 \times 10^{+4}$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1.78 \times 10^{-11}$
1B12.6-SS- 3D12r16		IL-1β	$2.93 \times 10^{+6}$	1.84×10^{-3}	6.26×10^{-10}

[0516]

[0517] 바이아코어 기술에 의해 성질 분석된 모든 DVD-Ig 작제물의 결합은 유지되고 모 항체의 결합에 필적할 수 있다. N-말단 가변 도메인은 모 항체와 유사한 고친화성으로 결합한다.

표 6

사이노물거스 IL-1α 및 IL-1β에 대한 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 BIACORE 분석

모 항체 또는 DVD-Ig ID	N-말단 가변 도메인 (VD)	C-말단 가변 도메인 (VD)	k_{on}	k_{off}	K_D
			(M-1s-1)	(s-1)	(M)
E26.13	IL-1β		$1.23 \times 10^{+6}$	1.79×10^{-5}	1.46×10^{-11}
E26.35	IL-1β		$9.21 \times 10^{+5}$	1.29×10^{-5}	1.4×10^{-11}
3D12.10/15	IL-1α		$3.89 \times 10^{+5}$	2.25×10^{-5}	5.78×10^{-11}
E26.35-SS- 3D12r16	IL-1α		$1.01 \times 10^{+5}$	8.23×10^{-6}	8.11×10^{-11}
E26.35-SS- 3D12r16		IL-1β	$3.95 \times 10^{+5}$	7.91×10^{-6}	2.0×10^{-11}

[0518]

[0519] 바이아코어 기술에 의해 성질 분석된 모든 DVD-Ig 작제물의 결합은 유지되고 모 항체의 결합에 필적할 수 있었다. N-말단 가변 도메인은 모 항체와 유사한 고친화성으로 결합하였다.

[0520] 실시예 1.1.2: 모 항체 및 DVD-Ig 분자의 기능적 활성을 결정하기 위해 사용되는 분석

[0521] 실시예 1.1.2.A: 사이토카인 생분석

[0522] 항-사이토카인 또는 항-성장 인자 모 항체 또는 항-사이토카인 또는 항-성장 인자 서열을 함유하는 DVD-Ig 분자가 표적 사이토카인 또는 성장 인자 생화성을 억제하거나 중화시키는 능력은 항체 또는 DVD-Ig 분자의 억제 능력을 결정함에 의해 분석한다. 예를 들면, IL-4 매개된 IgE 생성을 억제하는 항-IL-4 항체의 능력을 사용할 수 있다. 예를 들면, 사람 순수 B 세포는 피콜-플라크 밀도 원심분리에 이어서 사람 sIgD FITC 표지된 염소 F(ab)₂ 항체에 대해 특이적인 MACS 비드(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)에 이어서 항-FITC MACS 비드를 사용한 자기적 분리에 의해 각각 말초 혈액, 연막으로부터 분리한다. 자기적으로 분류된 순수 B 세포는 XV15에서 ml당 3×10^5 세포로 조정하고 5% CO₂의 존재하에 37°C에서 배양 10일동안에 PBS 채워진 웰에 의해 둘러싸여진 플레이트의 중앙에 6 x 6 배열로 96웰 플레이트 웰당 100 μ l로 분주하였다. 각각의 하나의 플레이트는 시험될 항체당 제조하고 각각 비유도된 및 유도된 대조군, 및 7 μ g/ml에서 시작하여 항체 적정의 4회 반복체 및 50 μ l 4회 농축된 예비 희석에 첨가된 29ng/ml 최종 농도로 하향된 3배 희석으로의 작동의 각각의 3개의 웰로 이루어진다. IgE 생산을 유도하기 위해, 20ng/ml에서 rhIL-4 및 50 μ l 중의 0.5ug/ml 최종 농도에서 항-CD40 모노클로날 항체(Novartis, Basel, Switzerland) 각각을 각각의 웰에 첨가하고 IgE 농도는 표준 샌드위치 ELISA 방법에 의한 배양 시기의 말기에 측정한다.

[0523] 실시예 1.1.2.B: 사이토카인 방출 분석

[0524] 사이토카인 방출을 유발하는 모 항체 또는 DVD-Ig 분자의 능력을 분석한다. 말초 혈액을 혈관구멍에 의해 채워진 처리된 혈관 튜브내로 3명의 건강한 공여자로부터 인출한다. 전혈을 RPMI-1640 배지로 1:5로 희석하고 웰당 0.5ml에서 24웰 조직 배양 플레이트에 첨가한다. 항-사이토카인 항체(예를들어, 항-IL-4)를 RPMI-1640상으로 희석하고 200, 100, 50, 10, 및 1 μ g/ml의 최종 농도가 되도록 0.5ml/웰로 플레이트에 첨가한다. 배양 플레이트 내 전혈의 최종 희석은 1:10이다. LPS 및 PHA를 사이토카인 방출을 위한 양성 대조군으로서 별도의 웰에 2 μ g/ml 및 5 μ g/ml의 최종 농도로 가한다. 폴리클로날 사람 IgG를 네가티브 대조군 항체로서 사용한다. 당해 실험을 2회 수행한다. 플레이트를 5% CO₂에서 37°C에서 배양한다. 24시간 후 웰의 내용물을 시험관으로 옮기고 1200rpm에서 5분동안 회전시킨다. 무세포 상등액을 수거하고 사이토카인 분석을 위해 동결시킨다. 플레이트상 및 튜브내에 잔류하는 세포를 0.5 ml의 용해 용액으로 용해시키고 -20°C에 놓고 해동시킨다. 0.5 ml의 배지를 첨가하고(용량이 무세포 상등액 샘플과 동일한 수준이 되도록 하면서) 세포 체제를 수거하고 사이토카인 분석을 위해 동결시킨다. 세포 부재 상등액 및 세포 용해물을 ELISA에 의해 사이토카인 수준, 예를 들면, IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-1RA, 또는 TNF- α 수준에 대해 분석한다.

[0525] 실시예 1.1.2.C: 사이토카인 교차-반응성 연구

[0526] 목적하는 사이토카인에 대해 지시된 항-사이토카인 모 항체 또는 DVD-Ig 분자가 기타 사이토카인과 교차 반응하는 능력을 분석한다. 모 항체 또는 DVD-Ig 분자를 바이아코어 바이오센서 매트릭스상에 고정화시킨다. 항-사람 Fc mAb를 유리 아민 그룹을 통해 100mM N-하이드록시수산화이미드(NHS) 및 400mM N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)와 함께 매트릭스 상에 제1 활성화 카복실 그룹에 의해 텍스트란 매트릭스로 공유 결합시킨다. 나트륨 아세테이트(pH 4.5)에서 희석된 25 μ g/ml의 농도에서 각각의 항체 또는 DVD-Ig 제제 각각의 대략 50 μ l를 활성화된 바이오센서를 거쳐 주사하고 단백질상의 유리 아민을 활성화된 카복실 그룹으로 직접 결합시킨다. 전형적으로, 5000 공명 유니트(RU' s)를 고정화시킨다. 미반응된 매트릭스 EDC-에스테르를 1M 에탄올아민의 주사에 의해 불활성화시킨다. 1초 유속 세포를 표준 아민 커플링 키트를 사용하여 사람 IgG1/K를 고정화시킴에 의해 표준 물질로서 제조한다. SPR 측정은 CM 바이오센서 칩을 사용하여 수행한다. 바이오센서 표면에 분석될 모든 항원은 0.01% P20을 함유하는 HBS-EP 작동 완충액중에 희석시킨다.

[0527] 사이토카인 특이성을 조사하기 위해, 목적하는 과량의 사이토카인(100nM, 예를들어, 가용성 재조합 사람)을 항-사이토카인 모 항체 또는 DVD-Ig 분자 고정화된 바이오센서 표면(5분 접촉 시간)에 걸쳐 주사한다. 목적하는 사이토카인의 주사 전 및 이후 즉시, HBS-EP 완충액 단독을 각각의 유동 셀을 통해 유동시킨다. 사이토카인 주입 완료 후 대략 30초에 상응하는 시점 및 기준선간의 총 차이는 최종 결합 값을 나타내도록 취한다.

[0528] 다시, 당해 반응은 공명 유니트로 측정한다. 바이오센서 매트릭스는 결합 반응이 관찰되는 다음 샘플의 주사 전에 10mM HCl을 사용하여 소행시키거나 작동 완충액을 매트릭스상에 주사하였다. 사람 사이토카인(예를 들면, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-

16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23, IL-27, TNF- α , TNF- β , 및 IFN- γ)은 또한 동시에 고정화된 마우스 IgG1/K 표준 표면상에 주사하여 임의의 비특이적 결합 배경을 기록한다. 표준 및 반응 표면을 제조함에 의해, 바이아코어는 굴절 지수 변화 및 주사 노이즈의 대부분을 제거하기 위해 반응 표면으로부터 참조 표면 데이터를 자동적으로 공제할 수 있다. 따라서, 항-사이토카인 항체 또는 DVD-Ig 분자 결합 반응으로 인한 튜브 결합 반응을 확인할 수 있다.

[0529] 목적하는 사이토카인이 고정화된 항-사이토카인 항체를 거쳐 주사되는 경우, 상당한 결합이 관찰된다. 10mM HCl 소생은 완전히 모든 비-공유 결합된 단백질을 제거한다. 센서그램의 조사는 가용성 사이토카인에 결합하는 고정화된 항-사이토카인 항체 또는 DVD-Ig 분자가 강함을 보여준다. 목적하는 사이토카인과 예상된 결과를 확인 한 후 재조합 사람 사이토카인을 잔류하는 패널을 각각의 항체 또는 DVD-Ig 분자에 대해 별도로 시험한다. 각각의 주사 사이클에 대해 항-사이토카인 항체 또는 DVD-Ig 분자 결합되거나 미결합된 사이토카인의 양을 기록한다. 3 개의 독립적인 실험으로부터의 결과를 사용하여 각각의 항체 또는 DVD-Ig 분자의 특이성 프로필을 결정한다. 목적하는 사이토카인에 대한 예상되는 결합을 갖고 임의의 다른 사이토카인에는 결합하지 하지 않는 항체 또는 DVD-Ig 분자를 선별한다.

[0530] **실시예 1.1.2.D: 조직 교차 반응성**

[0531] 조직 교차 반응성 연구는 3단계로 수행하고 제1 단계는 32개 조직의 냉동절편을 포함하고, 제2 단계는 38개 이하의 조직을 포함하고 제3 단계는 하기에 기재된 바와 같은 관련없는 3명의 성인으로부터의 추가의 조직을 포함한다. 연구는 통상 2개의 용량 수준에서 수행된다.

[0532] **단계 1:** 사람 조직(부검 또는 생검으로부터 수득된 하나의 사람 공여자 기원의 32개 조직(전형적으로, 부신, 위장관, 전립선, 방광, 심장, 골격근, 혈액 세포, 신장, 피부, 골수, 간, 척수, 유방, 폐, 비장, 소뇌, 림프절, 고환, 대뇌피질, 난소, 흉선, 결장, 췌장, 갑상선, 내피, 부갑상선, 수뇨관, 안구, 뇌하수체, 나팔관 및 태반))의 냉동절편(약 5 μ m)을 대물 글래스상에 고정시키고 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행한다.

[0533] **단계 2:** 부검 또는 생검에서 수득된 3명의 비관련 성인 기원의 38개 조직(부신, 혈액, 혈관, 골수, 소뇌, 대뇌, 자궁경관, 식도, 안구, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 유방 유선, 난소, 난관, 췌장, 부갑상선, 말초 신경, 뇌하수체, 태반, 전립선, 침샘, 피부, 소장, 척수, 비장, 위, 횡문근, 고환, 흉선, 갑상선, 편도선, 수뇨관, 뇨 방광 및 자궁을 포함함) 기원의 사람 조직의 냉동절편(약 5 μ m)을 대물 글래스상에 고정시키고 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행한다.

[0534] **단계 3:** 부검 또는 생검에서 수득된 3명의 비관련 성숙한 원숭이 기원의 38개 조직(부신, 혈액, 혈관, 골수, 소뇌, 대뇌, 자궁경관, 식도, 안구, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 유방 유선, 난소, 난관, 췌장, 부갑상선, 말초 신경, 뇌하수체, 태반, 전립선, 침샘, 피부, 소장, 척수, 비장, 위, 횡문근, 고환, 흉선, 갑상선, 편도선, 수뇨관, 뇨 방광 및 자궁을 포함함) 기원의 사이노물거스 원숭이 조직의 냉동절편(약 5 μ m)을 대물 글래스상에 고정시키고 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행한다.

[0535] 항체 또는 DVD-Ig 분자는 제2 비오틴화된 항-사람 IgG로 항온처리하고 면역 복합체가 되도록 한다. 항체 또는 DVD-Ig 분자의 최종 농도 2 및 10 μ g/mL에서 면역 복합체를 대물 글래스상의 조직 절편상으로 첨가함에 이어서 조직 절편을 아비딘-비오틴 퍼옥시다제 키트를 사용하여 30분동안 반응시킨다. 후속적으로, 퍼옥시다제 반응을 위한 기질인 DAB (3,3'-디아미노벤지딘)은 조직 염색을 위해 4분동안 적용한다. 항원-세포파로스 비드를 양성 대조군 조직 절편으로서 사용한다. 표적 항원 및 사람 혈청 차단 연구는 추가의 대조군으로서 작용한다. 항체 또는 DVD-Ig 분자의 최종 농도 2 및 10 μ g/mL에서의 면역 복합체는 표적 항원(최종 농도 100 μ g/ml) 또는 사람 혈청(최종 농도 10%)과 미리 30분동안 항온처리함에 이어서 대물 글래스상의 조직 절편상으로 첨가함에 이어서 조직 절편을 30분동안 아비딘-비오틴-퍼옥시다제 키트와 반응시킨다. 후속적으로, 퍼옥시다제 반응을 위한 기질인 DAB (3,3'-디아미노벤지딘)을 조직 염색을 위해 4분동안 적용한다.

[0536] 임의의 특이적 염색은 미지의 표적 항원의 공지된 발현시 예상치 않은 반응성 또는 예상된(예를 들면, 항원 발현과 일치) 것으로 판단된다. 특정 판단된 염색은 강도 및 횡수에 대해 스코어한다. 단계 2(사람 조직)와 단계 3(사이노물거스 원숭이 조직) 사이의 조직 염색은 유사하거나 상이한 것으로 판단된다.

[0537] **실시예 1.1.2.E: IL-1 α / β 생물검정 및 중화 분석**

[0538] **실시예 1.1.2.E.1: 모노클로날 항체에 대한 사람 IL-1 α 및 IL-1 β 생물 검정**

[0539]

본 발명의 항-사람 IL-1 알파 및 항-사람 IL-1 베타 항체의 기능 활성을 조사하기 위해, 항체를 MRC-5 생물 검정으로 스크리닝한다. MRC-5 세포주는 사람 IL-1알파 또는 베타에 반응하여 용량-의존적 방식으로 사람 IL-8을 생산하는 사람 폐 섬유아세포 세포주이다. 또한, MRC-5 세포주는 사이노몰거스 IL-1 알파 및 IL-1베타와 교차-반응한다. 항체 효능은 IL-1알파 또는 베타 유도된 hIL-8 사이토카인을 억제하는 항체의 능력에 기초한다. 37℃, 5% CO₂ 항온처리기에서 10% FBS를 함유하는 완전 MEM에서 MRC-5 세포(최초로 ATCC로부터 획득됨)를 성장 및 배양한다. 분석 전날, MRC5 세포를 96웰 평저 플레이트(Costar# 3599)에 100mL 용적으로 1×10^4 으로 평판하고, 이어서, 37℃, 5% CO₂에서 밤새 항온처리한다. 분석 당일에, 작용 4x 항체 및 사람 IL-1α 또는 사람 IL-1β, 또는 사이노 IL-1α 또는 사이노 IL-1β 항원 스톱을 완전 MEM 배지에서 제조한다. 블록 검정 플레이트의 완전 MEM 에서 8 포인트 일련의 항체 희석(10 내지 0.0001nM 범위)을 행한다. 65mL의 희석된 항체는 96 웰 v-저면 플레이트(Costar# 3894)에 4중으로 이동시키고, 이어서 65mL의 적절한 항원(200pg/mL)의 4x 스톱을 항체를 함유하는 웰에 첨가한다. 65mL의 항원(200pg/mL)을 65mL의 MEM 배지를 갖는 항원 대조군 웰에 넣는다. 배지 대조군 웰에 130mL의 MEM 배지를 첨가한다. 1시간 항온처리한 후, 100mL의 Ab/Ag 혼합물을 MRC-5 세포에 첨가한다. 웰 용적은 200mL/웰로 동일하였고, 모든 시약은 1x 최종 농도이다. 밤새 항온처리(16 내지 24시간) 후, 150mL의 상청을 96-웰 환저 플레이트(Costar# 3799)에 이동시키고, 플레이트를 -20℃ 냉동기에 넣는다. 상청을 사람 IL-8 ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN) 또는 MSD hIL-8(화학발광 키트)를 이용하여 hIL-8 수준에 대해 시험한다. 항원 단독 대조군 값에 대한 억제 백분율을 계산함으로써 항체 중화 효능을 측정한다.

[0540]

실시예 1.1.2.E.2: 항-IL-1 α/β DVD-Ig 단백질에 대한 IL-1 α/β 생물 검정

[0541]

본 발명의 항-사람 IL-1 알파 및 베타 DVD-Ig 단백질의 기능 활성을 조사하기 위해, DVD-Ig 단백질을 MRC-5 생물 검정으로 스크리닝하였다. MRC-5 세포주는 사람 IL-1알파 및 베타, 및 사이노 IL-1 알파 및 베타에 반응하여 용량-의존적 방식으로 사람 IL-8을 생산하는 사람 폐 섬유아세포 세포주이다. DVD-Ig 분자 효능은 IL-1 유도된 hIL-8 사이토카인을 억제하는 DVD-Ig 분자의 능력에 기초한다. 37℃, 5% CO₂ 항온처리기에서 10% FBS를 함유하는 완전 MEM에서 MRC-5 세포(최초로 ATCC로부터 획득됨)를 성장 및 배양시켰다. 분석 전날, MRC5 세포를 96웰 평저 플레이트(Costar# 3599)에 100mL 용적으로 1×10^4 으로 평판하고, 이어서, 37℃, 5% CO₂에서 밤새 항온처리하였다. 분석 당일에, DVD-Ig 분자, hIL-1α 및 hIL-1β, 또는 사이노 IL-1α alc 사이노 IL-1β 항원 스톱의 4x 작용 스톱을 완전 MEM 배지에서 제조하였다. 분석 당일에, 블록 검정 플레이트의 완전 MEM에서 8 포인트 DVD-Ig 분자가 일련의 희석(100 내지 0.0001nM 범위)을 행하였다. 65mL의 희석된 DVD-Ig 분자는 96웰 v-저면 플레이트(Costar# 3894)에 4중으로 이동시키고, 이어서 IL-1α 또는 IL-1β의 4x 스톱(200pg/mL)의 65mL를 DVD-Ig 분자를 함유하는 웰에 첨가하였다. 65mL의 IL-1α (200pg/mL) 또는 65mL의 IL-1β (200pg/mL)를 65mL의 MEM 배지를 갖는 항원 대조군 웰에 넣었다. 배지 대조군 웰에 130mL의 MEM 배지를 첨가하였다. 1시간 항온처리한 후, 100mL의 DVD-Ig/Ag 혼합물을 MRC-5 세포에 첨가하였다. 웰 용적은 200mL/웰로 동일하였고, 모든 시약은 1x 최종 농도였다. 밤새 항온처리(16 내지 24시간) 후, 150mL의 상청을 96-웰 환저 플레이트(Costar# 3799)에 이동시키고, 플레이트를 -20℃ 냉동기에 넣었다. 상청을 사람 IL-8 ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN) 또는 MSD hIL-8(화학발광 키트)를 이용하여 hIL-8 수준에 대해 시험하였다. IL-1α 또는 IL-1β 단독 대조군 값에 대한 억제 백분율을 계산함으로써 DVD-Ig 분자 중화 효능을 측정하였다. 표 7은 IL-1α 모 항체 및 IL-1α 및 IL-1β DVD-Ig 단백질에 의한 사람 IL-1α의 중화를 입증한다. 표 8은 IL-1α 모 항체 및 IL-1α 및 IL-1β DVD-Ig 단백질에 의한 사람 IL-1β의 중화를 입증한다. 표 9는 IL-1α 모 항체 및 IL-1α 및 IL-1β DVD-Ig 단백질에 의한 사이노몰거스 IL-1α의 중화를 입증한다. 표 10은 IL-1β 모 항체 및 IL-1α 및 IL-1β DVD-Ig 단백질에 의한 사이노몰거스 IL-1β의 중화를 입증한다.

표 7

IL-1 α 모 항체 및 DVD-Ig 작제물을 이용한 사람 IL-1 α 중화 분석

모 항체 또는 DVD-Ig ID	N-말단 가변 도메인 (VD)	C-말단 가변 도메인 (VD)	N-말단 VD 사람 IL-1 α 중화 분석 EC50 nM	C-말단 VD 사람 IL-1 α 중화 분석 EC50 nM
3D12.10/15	IL-1 α		0.0057	
3D12r16	IL-1 α		0.00056	
E26.35-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	NA	0.0355
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	NA	0.0538
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	NA	0.0479
1B12.1-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	NA	0.0307
1B12.3-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	NA	0.0687
1B12.6-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	NA	0.0648

NA: 적용가능하지 않음.

[0542]

[0543] 모든 DVD-Ig 분자는 MRC5 IL-1 α / β 중화 분석에서 중화를 나타내었다.

표 8

IL-1 β 모 항체 및 DVD-Ig 작제물을 이용한 사람 IL-1 β 중화 분석

모 항체 또는 DVD-Ig ID	N-말단 가변 도메인 (VD)	C-말단 가변 도메인 (VD)	N-말단 VD 사람 IL-1 β 중화 분석 EC50 nM	C-말단 VD 사람 IL-1 β 중화 분석 EC50 nM
E26.13	IL-1 β		0.0157	
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	0.0099	NA
E26.35	IL-1 β		0.0072	
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	0.002	NA
E26.35-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	0.0029	NA
1B12.1	IL-1 β		0.15	
1B12.1-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	2.05	NA
1B12.3	IL-1 β		0.30	
1B12.3-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	1.74	NA
1B12.6	IL-1 β		0.38	
1B12.6-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	2.58	NA

NA: 적용가능하지 않음.

[0544]

[0545] 모든 DVD-Ig 분자는 MRC5 IL-1 α / β 중화 분석에서 중화를 나타내었다.

표 9

IL-1 α 모 항체 및 DVD-Ig 작제물을 이용한 사이노몰거스 IL-1 α 중화 분석

모 항체 또는 DVD-Ig ID	N-말단 가변 도메인 (VD)	C-말단 가변 도메인 (VD)	N-말단 VD 사이노몰거스 IL-1 α 중화 분석 EC50 nM	C-말단 VD 사이노몰거스 IL-1 α 중화 분석 EC50 nM
3D12.10/15	IL-1 α		0.0126	
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	NA	0.0626
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	NA	0.081
3D12r16	IL-1 α		0.0008	
E26.35-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	NA	0.1011

NA: 적용가능하지 않음.

[0546]

[0547]

모든 DVD-Ig 분자는 MRC5 IL-1 α / β 중화 분석에서 중화를 나타내었다.

표 10

IL-1 β 모 항체 및 DVD-Ig 작제물을 이용한 사이노몰거스 IL-1 β 중화 분석

모 항체 또는 DVD-Ig ID	N-말단 가변 도메인 (VD)	C-말단 가변 도메인 (VD)	N-말단 VD 사이노몰거스 IL-1 β 중화 분석 EC50 nM	C-말단 VD 사이노몰거스 IL-1 β 중화 분석 EC50 nM
E26.13	IL-1 β		0.0084	
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	0.0056	NA
E26.35	IL-1 β		0.0034	
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	0.0121	NA
E26.35-SS-3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	0.004	NA

NA: 적용가능하지 않음.

[0548]

[0549]

모든 DVD-Ig 분자는 MRC5 IL-1 α / β 중화 분석에서 중화를 나타내었다.

[0550]

실시예 1.1.2.F: 시험관내 종양 수용체 모노클로날 항체 또는 DVD-Ig 분자의 성장 억제 효과

[0551]

D-PBS-BSA(0.1% BSA를 갖는 둘베코 포스페이트 완충 염수) 20 μ L 중의 종양 수용체 모노클로날 항체 또는 DVD-Ig 분자를 사람 종양 세포에 180 μ L 중의 0.01 μ g/mL 내지 100 μ g/mL의 최종 농도로 첨가한다. 플레이트를 습윤 5% CO₂ 대기의 37 $^{\circ}$ C에서 3일 동안 항온처리하였다. 제조업자의 지침에 따라 MTS 시약(Promega, Madison, WI)을 이용하여 각각의 웰의 생세포의 수를 정량하여 종양 성장 억제 백분율을 측정한다. 항체 처리하지 않은 웰을 0% 억제 대조군으로서 사용하고, 한편 세포를 포함하지 않는 웰을 100% 억제를 나타내는 것으로 고려한다.

[0552]

실시예 1.1.2.G: 시험관내 모 항체 또는 DVD-Ig 분자의 살종양 효과

[0553]

종양 세포 상의 표적 항원에 결합하는 모 항체 또는 DVD-Ig 분자는 살종양 활성에 대해 분석될 수 있다. 간략하게, 모 항체 또는 DVD-Ig 분자는 D-PBS-BSA(0.1% BSA를 갖는 둘베코 포스페이트 완충 염수)에 희석시키고 200 μ L 중의 최종 농도 0.01 μ g/mL 내지 100 μ g/mL로 사람 종양 세포에 첨가한다. 플레이트를 습윤 5% CO₂ 대기의 37 $^{\circ}$ C에서 3일 동안 항온처리한다. 각각의 웰에서 생세포의 수를 제조업자의 지침에 따라 MTS 시약(Promega, Madison, WI)을 사용하여 정량하여 종양 성장 억제 백분율을 측정한다. 항체 처리되지 않은 세포를 0% 억제 대조군으로서 사용하고, 한편 세포를 포함하지 않는 세포를 100% 억제를 나타내는 것으로 고려한다.

[0554]

아포토시스 평가를 위해, 카스파제-3 활성화는 하기의 프로토콜을 사용하여 측정한다: 96웰 플레이트에서 항체 처리된 세포는 120 μ L의 1 x 용해 완충액(1.67mM Hepes, pH 7.4, 7mM KCl, 0.83mM MgCl₂, 0.11mM EDTA, 0.11mM EGTA, 0.57% CHAPS, 1mM DTT, 1 x 프로테아제 억제제 각테일 정제; EDTA-부재; Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ)중에서 실온에서 20분동안 진탕시키면서 용해시킨다. 세포 용해 후, 80 μ L의 카스파제-3 반응 완충

액(48mM Hepes, pH 7.5, 252mM 슈크로스, 0.1 % CHAPS, 4mM DTT, 및 20 μ M Ac-DEVD-AMC 기질; Biomol Research Labs, Inc., Plymouth Meeting, PA)을 첨가하고 플레이트를 37°C에서 2시간동안 항온처리한다. 당해 플레이트를 하기의 셋팅을 사용하여 1420 VICTOR 다중 표지 계수기(Perkin Elmer Life Sciences, Downers Grove, IL)상에서 판독한다: 여기= 360/40, 방출= 460/40. 이소타입 항체 대조군 처리된 세포와 비교하여 항체 처리된 세포 기원의 형광 단위의 증가는 아포토시스를 지적한다.

[0555] **실시예 1.1.2.H: 모 항체 및 DVD-Ig 작제물에 의한 세포 증식의 억제**

[0556] U87-MG 사람 신경교종 종양 세포를 5% 소 태아 혈청이 보충된 RPMI 배지의 96-웰 디쉬에 100 μ l 중의 2,000 세포/웰로 플레이트하고, 37°C, 5% CO₂에서 밤새 항온처리한다. 다음 날, 항체 또는 DVD-Ig 분자(0.013nM 내지 133nM 용량 범위)의 일련의 희석액으로 세포를 처리하고, 습윤 5% CO₂ 대기의 37°C에서 5일 동안 항온처리한다. 제조업자의 지침에 따라 APTlite 키트(Perkin Elmer, Waltham, MA)를 이용하여 ATP 수준을 평가함으로써 세포 생존/증식을 간접적으로 측정한다.

[0557] **실시예 1.1.2.I: 시험관내 모 항체 또는 DVD-Ig 작제물에 의한 수용체 인산화의 억제**

[0558] 사람 암종 세포를 96-웰 플레이트에 180 μ l 혈청-무포함 배지(DMEM+0.1% BSA) 중의 40,000세포/웰로 플레이트하고, 37°C, 5% CO₂에서 밤새 항온처리한다. Costar EIA 플레이트(Lowell, MA)를 100 μ l/웰의 수용체 포획 Ab(4 μ g/ml 최종 농도)로 피복하고, 진탕하면서 실온에서 밤새 항온처리한다. 다음 날, 수용체 항체-피복된 ELISA 플레이트를 세척하고(PBST = PBS 중의 0.05% Tween 20으로 3회), 200 μ l의 차단 용액(PBS 중의 1% BSA, 0.05% NaN₃, pH 7.2 내지 7.4)을 첨가하여 실온에서 로커 상에서 2시간 동안 차단한다. 사람 종양 세포를 항체 또는 DVD-Ig 분자 및 리간드와 공동-배양한다. D-PBS-BSA(0.1% BSA를 갖는 돌베코 포스페이트 완충 염수)에 희석된 모노클로날 항체 또는 DVD-Ig 분자를 사람 암종 세포에 0.01 μ g/ml 내지 100 μ g/ml의 최종 농도로 첨가한다. 성장 인자는 1 내지 100ng/ml(200 μ L)의 농도로 세포에 동시에 첨가하고, 세포를 습윤 5% CO₂ 대기의 37°C에서 1시간 동안 항온처리한다. 120 μ l/웰의 차가운 세포 추출 완충액(10mM Tris, pH 7.4, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM NaF, 1mM 나트륨 오르토타나테이트, 1% Triton X-100, 10% 글리세롤, 0.1% SDS, 및 프로테아제 억제제 콕테일)에 용해시키고, 4°C에서 진탕하면서 20분 동안 항온처리한다. 세포 용해물(100 μ l)을 ELISA 플레이트에 첨가하고, 약하게 진탕하면서 4°C에서 밤새 항온처리한다. 다음 날, ELISA 플레이트를 세척하고, 100 μ l/웰의 pTyr-HRP 검출 Ab를 첨가하고(p-IGF1R ELISA 키트, R&D System # DYC 1770, Minneapolis, MN), 플레이트를 어두운 곳에서 25°C에서 2시간 동안 항온처리한다. 제조업자의 지침에 따라 인산화를 측정하기 위해 플레이트를 전개한다.

[0559] **실시예 1.1.2.J: 사람 암종 피하 옆구리 이종이식체에 대한 DVD-Ig 분자의 효능**

[0560] A-431 사람 유피낭 암종 세포를 조직 배양 플라스크 내 99% 생존율, 85% 컨플루언스로 시험관내 성장시킨다. 연구 0일째에, 19 내지 25 그램의 SCID 암컷 마우스(Charles Rivers Labs, Wilmington, MA)에 1 x 10⁶ 사람 종양 세포(1:1 마트릭젤)를 우측 옆구리에 피하 주사한다. 사람 IgG 대조군 또는 DVD-Ig 분자의 투여(IP, QD, 3x/주)는, 마우스를 대략 200 내지 320mm³의 평균 종양 용적을 갖는 마우스의 그룹과 크기를 일치시킨 후에 개시하였다. 종양 세포 주사 후 약 10일째에 시작하여 종양을 1주일에 2번 측정한다.

[0561] **실시예 1.2: 목적하는 사람 항원에 대한 모 모노클로날 항체의 생성**

[0562] 목적하는 사람 항원에 결합하여 이를 중화시키는 모 마우스 mAb 및 이의 변이체를 다음과 같이 획득하였다:

[0563] **실시예 1.2.A: 목적하는 사람 항원을 사용한 마우스의 면역화**

[0564] 완전 프로인트 보조제 또는 면역분석 보조제(Qiagen, Valencia, CA)와 혼합된 20 μ g의 재조합 정제된 사람 항원(예를 들면, IL-1 α 또는 IL-1 β)을 1일째에 5마리의 6-8 주령 Balb/C, 5마리의 C57B/6 마우스, 및 5마리의 AJ 마우스로 피하 주사하였다. 24일, 38일 및 49일째에, 불완전 프로인트 보조제 또는 면역분석 보조제와 혼합된 20 μ g의 재조합 정제된 사람 항원 변이체를 동일한 마우스에 피하 주사한다. 84일째 또는 112일째 또는 144일째에, 마우스를 목적하는 1 μ g의 재조합 정제된 사람 항원으로 정맥내 주사한다.

[0565] **실시예 1.2.B: 하이브리도마의 생성**

[0566] 실시예 1.2.A에 기재된 면역화된 마우스로부터 획득된 비장세포는 문헌[참조: Kohler, G. and Milstein (1975) Nature, 256: 495]에 기재된 확립된 방법에 따라 5:1의 비율로 SP2/O-Ag-14 세포와 융합시켜 하이브리도마를 생

성한다. 웰당 2.5×10^6 비장 세포의 밀도로 96 웰 플레이트에서 아자세린 및 하이포산틴을 함유하는 선택 배지에 플레이팅하였다. 융합한지 7일 내지 10일 후, 거시적 하이브리도마 콜로니를 관찰한다. 하이브리도마 콜로니를 함유하는 각각의 웰 기원의 상등액은 목적하는 항원에 대한 항체의 존재에 대해 ELISA로 시험한다(예를 들면, 실시예 1.1.1.A에 기재된 바와 같음). 항원-특이적 활성을 나타내는 상등액을 이어서 활성(예를 들면, 실시예 1.1.2의 분석에 기재된 바와 같음), 예를 들면, 실시예 1.1.2.E에 기재된 바와 같이 생분석에서 목적하는 항원을 중화시키는 능력에 대해 시험한다.

[0567] **실시예 1.2.C: 목적하는 사람 표적 항원에 대한 모 모노클로날 항체의 동정 및 성질 분석**

[0568] **실시예 1.2.C.1: 모 모노클로날 항체 중화 활성의 분석**

[0569] 하이브리도마 상등액은 실시예 1.2.A 및 1.2.B에 따라 생성된 목적하는 항원에 결합하고 또한 목적하는 항원의 변이체("항원 변이체")에 결합할 수 있는 모 항체의 존재에 대해 분석한다. 2개 분석에서 양성인 항체를 갖는 상등액은 이어서 예를 들면, 실시예 1.1.2.E의 사이토카인 생분석에서 이들의 항원 중화 효능에 대해 시험한다. 생분석에서 1000pM 미만, 하나의 실시형태에서, 100pM 미만의 IC_{50} 값으로 항체를 생성하는 하이브리도마는 제한 회석에 의해 스케일 업하고 클로닝한다. 하이브리도마 세포를 10% 낮은 IgG 태아 소 혈청(Hyclone #SH30151, Logan, UT)을 함유하는 배지로 증식시킨다. 평균적으로, 250 mL의 각각의 하이브리도마 상등액(클론 집단으로부터 유래함)을 문헌[참조: Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*]에 기재된 바와 같이 수거하고 농축시키고 정제한다. 표적 항원의 활성을 억제하는 정제된 mAb의 능력은 예를 들면, 실시예 1.1.2.E에 기재된 바와 같은 사이토카인 생분석을 사용하여 측정한다.

[0570] **실시예 1.2.C.2: 목적하는 사이노물거스 표적 항원에 대한 모 모노클로날 항체 교차 반응성의 분석**

[0571] 본원에 기재된 선별된 mAb가 목적하는 사이노물거스 항원을 인지하는지의 여부를 측정하기 위해, 본원(실시예 1.1.1.C)에 기재된 바와 같이 재조합 사이노물거스 표적 항원을 사용하여 BIACORE 분석을 수행한다. 또한, 목적하는 재조합 사이노물거스 항원에 대한 mAb의 중화 효능은 또한 사이토카인 생분석(실시예 1.1.2.E)에서 측정할 수 있다. 양호한 cyno 교차 반응성(하나의 실시형태에서, 사람 항원의 반응성의 5배 이내)을 갖는 MAb는 항후 성질 분석을 위해 선별한다.

[0572] **실시예 1.2.D: 각각의 류린 항-사람 모노클로날 항체에 대한 가변 영역의 아미노산 서열의 측정**

[0573] cDNA의 분리, 재조합 항-사람 마우스 mAb의 발현 및 성질 분석은 다음과 같이 수행한다. 각각의 아미노산 서열 측정을 위해, 대략 1×10^6 하이브리도마 세포를 원심분리로 분리하고 프로세싱하여 제조업자의 지침에 따라 트리졸(Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 제조업자의 지침에 따라 Superscript 제1 채 합성 시스템(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제1 채 DNA 합성에 적용한다. 올리고(dT)를 사용하여 제1 채 합성을 프라이밍하여 폴리(A)+ RNA에 대해 선별한다. 제1 채 cDNA 생성물은 이어서 류린 면역글로불린 가변 영역(Ig-프라이머 세트, Novagen, Madison, WI)의 증폭을 위해 디자인된 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭시킨다. PCR 생성물을 아가로스 겔상에서 분리하고 절단하고 정제함에 이어서 TOPO 클로닝 키트를 사용하여 pCR2.1-TOPO 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)로 서브클로닝하고 TOP10 화학적 컴피턴트 이.콜라이(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 형질전환시킨다. 콜로니 PCR은 형질전환체상에서 수행하여 삽입체를 함유하는 클론을 동정한다. 플라스미드 DNA를 QIAprep 미니프렙 키트(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 삽입체를 함유하는 클론으로부터 분리한다. 플라스미드내 삽입체를 양 채에 대해 서열 분석하여 M13 정배향 및 M13 역배향 프라이머(Fermentas Life Sciences, Hanover MD)를 사용하여 가변 중쇄 또는 가변 경쇄 DNA 서열을 측정한다. mAb의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 동정한다. 하나의 실시형태에서, 다음 단계로의 전개(사람화)를 위해 선행 mAb의 판별에 대한 선별 기준은 다음을 포함한다:

[0574] ■ 항체는 CH2내 표준물을 제외하고는 임의의 N-연결된 당화 부위(NXS)를 함유하지 않는다.

[0575] ■ 항체는 항체 마다 정상적인 시스테인에 추가로 임의의 여분의 시스테인을 함유하지 않는다.

[0576] ■ 항체 서열은 VH 및 VL에 대한 가장 밀접한 사람 배선 서열과 정렬시키고 임의의 범상한 아미노산은 다른 천연 사람 항체에서의 존재에 대해 검사되어야만 한다.

[0577] ■ N-말단 글루타민(Q)은 이것이 항체의 활성에 영향을 주지 않는다면 글루탐산(E)로 대체시킨다. 이것은 Q의 폐환으로 인해 이종성을 감소시킬 것이다

[0578] ■ 효율적인 신호 서열 절단은 질량 분광측정기로 확인한다. 이것은 COS 세포 또는 293 세포 물질로 수행할 수

있다

[0579] ■ 단백질 서열은 실험시킬 수 있는 Asn의 탈아미드화의 위험성에 대해 검사한다

[0580] ■ 항체는 저수준의 응집을 갖는다

[0581] ■ 항체는 >5-10 mg/ml 용해도(연구단계에서) ; >25 mg/ml의 용해도를 갖는다.

[0582] ■ 항체는 동력 광 산란(DLS)에 의한 표준 크기((5-6 nm)를 갖는다

[0583] ■ 항체는 낮은 전하 이중성을 갖는다.

[0584] ■ 항체는 사이토카인 분비가 없다(참조: 실시예 1.1.2.B)

[0585] ■ 항체는 의도된 사이토카인에 대해 특이성을 갖는다(참조: 실시예 1.1.2.C)

[0586] ■ 항체는 예상된 조직 교차 반응성이 없다(참조: 실시예 1.1.2.D)

[0587] ■ 항체는 사람과 사이노몰거스 조직 교차 반응성간에 유사성을 갖는다(참조: 실시예 1.1.2.D)

[0588] **실시예 1.2.2: 재조합 사람화된 모 항체**

[0589] **실시예 1.2.2.1: 재조합 키메라 항 사람 모 항체의 작제 및 발현**

[0590] 마우스 항-사람 모 mAb의 중쇄 불변 영역을 암호화하는 DNA는 세균에서 상동성 재조합에 의해 2 힌지-영역 아미노산 돌연변이를 함유하는 사람 IgG1 불변 영역을 암호화하는 cDNA 단편으로 대체한다. 이들 돌연변이는 234 위치(EU 넘버링)에서 류신의 알라닌으로의 대체이고 235위치에서 류신의 알라닌으로의 대체이다(문헌참조: Lund et al. (1991) J. Immunol. 147:2657). 3개 항체 각각의 경쇄 불변 영역은 사람 카파 불변 영역으로 대체한다. 전장 키메라 항체는 pBOS 발현 플라스미드 (Mizushima and Nagata (1990) Nucl. Acids Res. 18: 5322)로 연결된 키메라 중쇄 및 경쇄 cDNA의 동시 형질감염에 의해 COS 세포에서 일시적으로 발현된다. 재조합 키메라 항체를 함유하는 세포 상등액을 단백질 A 세파로스 크로마토그래피로 정제하고 결합된 항체를 산 완충액의 첨가로 용출시킨다. 항체를 중화시키고 PBS내로 투석시킨다.

[0591] 키메라 mAb를 암호화하는 중쇄 cDNA를 이의 키메라 경쇄 cDNA (이 둘다는 pBOS 벡터에서 연결된다)와 함께 COS 세포내로 동시 형질감염시킨다. 재조합 키메라 항체를 함유하는 세포 상등액은 단백질 A 세파로스 크로마토그래피에 의해 정제하고 결합된 항체를 산 완충액의 첨가로 용출시킨다. 항체를 중화시키고 PBS내로 투석시킨다.

[0592] 정제된 키메라 항-사람 환자 mAb를 이어서 결합하는 능력(바이아코어에 의해) 및 기능성 활성, 예를 들면, 실시예 1.1.1.C 및 1.1.2.B에 기재된 바와 같이 시험한다. 모 하이브리도마 mAb의 활성을 유지하는 키메라 mAb는 추가의 전개를 위해 선별한다.

[0593] **실시예 1.2.2.2: 사람화된 항 사람 모 항체의 작제 및 발현**

[0594] **실시예 1.2.2.2.A: 사람 항체 골격의 선별**

[0595] 각각의 뮤린 가변 중쇄 및 가변 경쇄 유전자 서열은 별도로 벡터 NTI 소프트웨어를 사용하여 44개 사람 면역글로불린 배선 가변 중쇄 또는 46개 배선 가변 경쇄 서열(NCBI Ig Blast 웹사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>로부터 유래됨)에 대해 정렬시킨다.

[0596] 사람화는 아미노산 서열 상동성, CDR 클러스터 분석, 발현된 사람 항체중에서 사용 횟수 및 사람 항체의 결정 구조에 대한 가용한 정보를 기초로 한다. 항체 결합, VH-VL 쌍형성 및 기타 인자에 대한 가능한 효과를 고려하여, 뮤린 잔기를 사람 잔기로 돌연변이시키고 여기서 뮤린 및 사람 골격 잔기는 몇가지를 제외하고는 상이하다. 추가의 사람화 전략은 뮤린 항체 가변 영역의 아미노산 서열과 고도의 상동성, 즉 서열 유사성을 갖는 사람 배선 항체 서열 또는 이의 서브그룹을 기초로 디자인한다.

[0597] 상동성 모델링을 사용하여 항체 결합 부위, CDR의 구조에 중요한 것으로 예상되는 뮤린 항체 서열에 독특한 잔기를 동정한다. 상동성 모델링은 컴퓨터 방법으로서 이에 의해 대략적인 3차원 배위가 단백질에 대해 생성된다. 이들의 배위의 출처 및 추가 채신을 위한 가이드는 제2 단백질인 참조 단백질이고 이에 대한 3차원 배위는 공지되어 있고 이의 서열은 제1 단백질의 서열과 관련된다. 2개 단백질의 서열간의 관계를 사용하여 참조 단백질 및 이에 대한 배위가 요망되는 단백질인 표준 단백질간에 상응성을 생성시킨다. 참조 및 표적 단백질의 1차 서열은 표준 단백질로부터 표적 단백질로 직접 전달된 2개 단백질의 동일한 부분의 배위로 정렬한다. 2개 단백질의 불일치 부분, 예를 들면, 잔기 돌연변이, 삽입 또는 결실로부터의 불일치 부분에 대한 배위는 일반적인 구조 주형

및 이미 전달된 모델 배위와의 일치성을 보장하기 위해 개량된 에너지로부터 작제한다. 이러한 컴퓨터 단백질 구조는 모델링 연구에서 추가로 개량되거나 직접적으로 사용될 수 있다. 모델 구조의 질은 표준 및 표적 단백질이 관련되는 내용의 정확성 및 서열 정렬이 작제되는 정밀성에 의해 결정된다.

[0598] 뮤린 mAb에 대해, BLAST 탐색 및 육안 조사의 조합을 사용하여 적합한 표준 구조를 동정한다. 표준 및 표적 아미노산 서열간의 25%의 서열 동일성은 상동성 모델링 관행을 시도하는데 필요한 최소값으로 고려된다. 서열정렬은 수동으로 작제하고 모델 배위는 프로그램 Jackal로 생성시킨다(문헌참조: Petrey et al. (2003) Proteins 53 (Suppl. 6): 430-435).

[0599] 선택된 항체의 뮤린 및 사람 골격 영역의 1차 서열은 상당한 동일성을 공유한다. 상이한 잔기 위치는 뮤린 항체의 관찰된 결합 효능을 보유하기 위해 사람화된 서열에서 뮤린 잔기 내포에 대한 후보이다. 사람과 뮤린 서열간에 상이한 골격 잔기의 목록은 수동으로 작제한다. 표 11은 당해 연구에 대해 선택된 골격 서열을 보여준다.

표 11

사람 IgG 중쇄 불변 도메인 및 경쇄 불변 도메인의 서열

단백질	서열번호	서열
		1234567890123456789012345678901234567890
야생형 hIgG1 불변 영역	48	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNNHYT QKSLSLSPGK
돌연변이 hIgG1 불변 영역	49	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNNHYT QKSLSLSPGK
Ig 카파 불변 영역	50	TVAAPSVERIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEYHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Ig 람다 불변 영역	51	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETSTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0600]

[0601] 주어진 골격 잔기가 항체의 결합 성질에 영향을 줄 가능성은 CDR 잔기로의 이의 접근성에 의존한다. 따라서, 모델 구조를 사용하여, 뮤린과 사람 서열간에 상이한 잔기는 CDR 내 임의의 원자로부터 이들의 거리에 따라 등급화된다. 임의의 CDR 원자의 4.5Å 내에 있는 잔기가 가장 중요한 것으로 동정되고 사람화된 항체(즉, 역돌연변이)내 뮤린 잔기의 보유에 대한 후보물로 추천된다.

[0602] 특히, 작제된 사람화된 항체는 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 작제된다. 각각의 가변 영역 cDNA에 대한, 60 내지 80개 뉴클레오타이드의 6개 올리고뉴클레오타이드 각각은 각각의 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 말단에서 20개 뉴클레오타이드까지 서로 중첩하도록 디자인한다. 어닐링 반응에서, 모든 6개 올리고뉴클레오타이드를 dNTP의 존재하에 조합하고, 비등시키고 어닐링시킨다. DNA 폴리머라제 I, 대형(Klenow) 단편(New England Biolabs #M0210, Beverley, MA.)을 중첩 올리고뉴클레오타이드 간에 대략 40bp의 겹을 채우도록 첨가한다. 변형된 pBOS 벡터에서 다중 클로닝 부위에 상보적인 오버행 서열을 함유하는 2개의 최외곽 프라이머를 사용하는 PCR을 수행하여 전체 가변 영역 유전자를 증폭시킨다(문헌참조: Mizushima and Nagata (1990) Nucl. Acids Res. 18: 17). 각각의 cDNA 어셈블리로부터 유래된 PCR 생성물을 아가로스 겔상에서 분리하고 예측된 가변 영역 cDNA 크기에 상응하는 밴드를 절개하고 정제한다. 가변 중쇄 영역을 세균에서 상동성 재조합에 의해 2개 힌지-영역 아미노산 돌연변이를 함유하는 사람 IgG1 불변 영역을 암호화하는 cDNA 단편상으로 프레임내 삽입한다. 이들 돌연변이는 234번 위치(EU 넘버링)에서 류신의 알라닌의 대체 및 235번 위치에서 류신의 알라닌으로의 대체이다(문헌참조: Lund et al. (1991) J. Immunol. 147:2657). 가변 경쇄 영역은 상동성 재조합에 의해 사람 카파 불변 영역과 함께 프레임내 삽입한다. 세균 콜로니를 분리하고 플라스미드 DNA를 추출한다. cDNA 삽입물은 이들의 전체를 서열 분석한다. 각각의 항체에 상응하는 올바른 사람화된 중쇄 및 경쇄를 COS 세포내로 동시 형질감염시켜 일시적으로 전장 사람화된 항-사람 항체를 제조한다. 재조합 키메라 항체를 함유하는 세포

상등액은 단백질 A 세파로스 크로마토그래피로 정제하고 결합된 항체를 산 완충액을 첨가하여 용출시킨다. 항체는 중화시키고 PBS내로 투과시킨다.

[0603] **실시예 1.2.2.3: 사람화된 항체의 성질 분석**

[0604] 기능적 활성을 억제하는 정제된 사람화된 항체의 능력은 예를 들면, 실시예 1.1.2.A에 기재된 바와 같은 사이토카인 생분석을 사용하여 측정한다. 제조합 사람 항원에 대한 사람화된 항체의 결합 친화성은 실시예 1.1.1.B에 기재된 바와 같은 표면 플라즈몬 공명 (Biacore®) 측정을 사용하여 결정한다. 사람화된 항체의 생분석 및 친화성으로부터의 IC₅₀ 값을 등급화한다. 모 하이브리도마 mAb의 활성을 완전히 유지하는 사람화된 mAb는 향후 전개를 위한 후보물로서 선택한다. 최상의 2 내지 3개의 가장 선호되는 사람화된 mAb는 추가로 특징 분석한다.

[0605] **실시예 1.2.2.3.A: 사람화된 항체의 약동학적 분석**

[0606] 약동학적 연구는 스프라그 돌리 래트 및 사이노물거스 원숭이에서 수행한다. 수컷 및 암컷 래트 및 사이노물거스 원숭이에게 단일 용량의 4mg/kg mAb를 정맥내 또는 피하 투여하고 샘플을 항원 포획 ELISA를 사용하여 분석하고 약동학적 파라미터를 비격막 분석에 의해 측정한다. 간략하게, ELISA 플레이트를 염소 항-비오틴 항체로 피복시키고(5 mg/ml, 4° C, 밤새), Superblock (Pierce)으로 차단시키고, 실온에서 2시간동안 10% Superblock TTBS에서 50ng/ml의 비오틴화된 사람 항원으로 항온처리한다. 혈청 샘플을 연속으로 희석하고(TTBS중의 0.5% 혈청, 10% Superblock) 실온에서 30분동안 플레이트상에서 항온처리한다. 검출은 HRP-표지된 염소 항 사람 항체로 수행하고 농도는 4개 파라미터 로그 피트를 사용하여 표준 곡서의 도움으로 결정한다. 약동학적 계수에 대한 값은 WinNonlin 소프트웨어(Pharsight Corporation, Mountain View, CA)를 사용한 비격막 모델에 의해 결정한다. 양호한 약동학적 프로파일(T1/2는 8 내지 13일 또는 그보다 양호하고 낮은 제거 및 우수한 생체이용률 50 내지 100%)을 갖는 사람화된 mAb를 선별한다.

[0607] **실시예 1.2.2.3.B: 사람화된 모노클로날 항체의 물리화학적 및 시험관내 안정성 분석**

[0608] **크기 배제 크로마토그래피**

[0609] 항체는 물을 사용하여 2.5mg/ml로 희석하고 20ml를 TSK 겔 G3000 SWXL 칼럼(Tosoh Bioscience, cat# k5539-05k)을 사용하여 시마즈 HPLC 시스템상에서 분석한다. 샘플은 211mM 황산나트륨, 92 mM 인산나트륨, pH 7.0, 유속 0.3ml/분을 사용하여 칼럼으로부터 용출시킨다. HPLC 시스템 작동 조건은 다음과 같다:

[0610] 이동상: 211 mM Na₂SO₄, 92 mM Na₂HPO₄*7H₂O, pH 7.0

[0611] 농도구배: 등용매

[0612] 유속: 0.3 mL/분

[0613] 검출 파장: 280 nm

[0614] 자동샘플채취기 냉각기 온도: 4° C

[0615] 칼럼 오븐 온도: 주위 온도

[0616] 수행 시간: 50분

[0617] 표 12는 상기 프로토콜에 의해 측정되는 바와 같이 % 단량체(예측된 분자량을 갖는 비응집된 단백질)로서 발현되는 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 순도 데이터를 포함한다.

표 12

크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정시 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 순도

모 항체 또는 DVD-Ig ID	N-말단 가변 도메인 (VD)	C-말단 가변 도메인 (VD)	% 단량체 (순도)
E26.13	IL-1 β		99.0
3D12.10/15	IL-1 α		81.4
E26.13-SS- 3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	95.1
E26.35	IL-1 β		88.1
3D12r16	IL-1 α		100
E26.35-SS- 3D12.10/15	IL-1 β	IL-1 α	97.4
E26.35-SS- 3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	100
1B12.1-SS- 3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	95.1
1B12.3-SS- 3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	94.6
1B12.6-SS- 3D12r16	IL-1 β	IL-1 α	95.9

[0618]

[0619]

DVD-Ig 분자는 대부분의 DVD-Ig 분자가 94% 초과인 단량체를 나타내는 우수한 SEC 프로파일을 나타냈다. 이러한 DVD-Ig 프로파일은 모 항체에 대해 관찰된 바와 유사하다.

[0620]

SDS-PAGE

[0621]

항체는 환원 및 비환원 조건 둘다에서 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분석한다. Adalimumab lot AFP04C를 대조군으로서 사용한다. 환원 조건을 위해, 샘플은 1:1로 2X 트리스 글라이신 SDS-PAGE 샘플 완충액(Invitrogen, cat# LC2676, lot# 1323208) 및 100 mM DTT와 함께 혼합하고, 30분동안 60°C에서 가열한다. 비환원 조건을 위해, 당해 샘플은 샘플 완충액과 1:1로 혼합하고 5분동안 100°C에서 가열한다. 환원된 샘플(레인당 10mg)을 12% 프리캐스트 트리스-글라이신 겔(Invitrogen, cat# EC6005box, lot# 6111021)상에 로딩하고, 비환원된 샘플(레인당 10 mg)을 8% 내지 16% 프리캐스트 트리스-글라이신 겔(Invitrogen, cat# EC6045box, lot# 6111021)상에 로딩한다. SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, cat#LC5925, lot# 1351542)를 분자량 마커로서 사용한다. 당해 겔을 XCell SureLock 소형 세포 겔 박스(Invitrogen, cat# EI0001)내에서 전개하고 단백질을 먼저 75 전압을 적용하여 샘플을 겔에 첨가하고 이어서 선행 염료가 겔의 바닥에 도달할 때까지 125의 정전압을 걸어 분리한다. 사용되는 전개 완충액은 10 x 트리스 글라이신 SDS 완충액(ABC, MPS-79-080106)으로부터 제조된 1 x 트리스 글라이신 SDS 완충액이다. 당해 겔은 콜로이드 블루 염색(Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016)을 사용하여 밤새 염색시키고 배경이 청명해질때까지 Milli-Q 물을 탈염색시킨다. 염색된 겔을 이어서 Epson Expression 스캐너(model 1680, S/N DASX003641)를 사용하여 스캐닝한다.

[0622]

침강 속도 분석

[0623]

항체는 3개의 표준 2-섹터 카본 에폰 센터피스의 샘플 챔버로 로딩한다. 이들 센터피스는 1.2cm 광학 경로 길이를 갖고 사파이어 윈도우로 구성된다. PBS는 표준 완충액의 위해 사용되고 각각의 챔버는 140 μ L를 함유한다. 모든 샘플은 Beckman ProteomeLab XL-I 분석 초원심분리(serial # PL106C01)에서 4-구멍(AN-60Ti)를 사용하여 동시에 조사한다.

[0624]

수행 조건은 프로그램화되어 있고 원심분리 조절은 ProteomeLab (v5.6)를 사용하여 수행한다. 샘플 및 로터는 분석전에 1시간동안 열이 균질해지도록 한다($20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$). 적당한 세포 로딩의 확인은 3000rpm에서 수행하고 단일 스캔은 각각의 세포에 대해 기록한다. 침강 속도 조건은 하기와 같다:

[0625]

샘플 세포 용적: 420 mL

[0626]

표준 셀 용적: 420 mL

[0627]

온도: 20°C

[0628]

로터 속도: 35,000 rpm

- [0629] 시간: 8:00 시간
- [0630] UV 파장: 280nm
- [0631] 방사상 단계 크기: 0.003cm
- [0632] 데이터 수집: 신호 평균화 없이 단계 마다 원 데이터 포인트
- [0633] 스캔 총 수: 100
- [0634] **온전한 항체의 LC-MS 분자량 측정**
- [0635] 온전한 항체의 분자량은 LC-MS에 의해 분석한다. 각각의 항체는 물을 사용하여 대략 1mg/ml로 희석시킨다. 단백질 마이크로트랩(Michrom Bioresources, Inc, cat# 004/25109/03)을 사용한 1100 HPLC (Agilent) 시스템을 사용하여 탈염시키고 5mg의 샘플을 API Qstar 펄서 i 질량 분광측정기 (Applied Biosystems)에 도입한다. 짧은 농도 구배를 사용하여 샘플을 용출시킨다. 농도 구배는 분당 50ml의 유속으로 이동상 A(HPLC 물중의 0.08% FA, 0.02% TFA) 및 이동상 B (아세트니트릴중의 0.08% FA 및 0.02% TFA)를 사용하여 수행한다. 질량 분광측정기는 질량 대 전하 비율이 2000 내지 3500인 스캔 범위로 4.5 k볼트 분무 전압으로 수행한다.
- [0636] **항체 경쇄 및 중쇄의 LC-MS 분자량 측정**
- [0637] 항체 경쇄(LC), 중쇄(HC) 및 탈당화된 HC의 분자량 측정은 LC-MS에 의해 분석한다. 항체는 물을 사용하여 1 mg/mL로 희석시키고 샘플은 37°C에서 30분동안 10mM DTT의 최종 농도로 LC 및 HC로 감소시킨다. 항체 탈당화시키기 위해, 100 mg의 항체를 37°C에서 총 용적 100ml중에서 밤새 2 mL의 PNGase F, 5 mL의 10% N-옥틸글루코사이드로 항온처리한다. 탈글루코실화 후 샘플은 37°C에서 30분동안 10mM DTT의 최종 농도로 감소한다. C4 칼럼 (Vydac, cat# 214TP5115, S/N 060206537204069)을 갖는 Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용하여 샘플(5mg)을 탈염시키고 API Qstar 펄서 i 질량 분광측정기(Applied Biosystems)에 도입한다. 짧은 농도 구배를 사용하여 샘플을 용출시킨다. 농도 구배는 분당 50ml의 유속으로 이동상 A(HPLC 물중의 0.08% FA, 0.02% TFA) 및 이동상 B (아세트니트릴중의 0.08% FA 및 0.02% TFA)를 사용하여 수행한다. 질량 분광측정기는 질량 대 전하 비율이 800 내지 3500인 스캔 범위로 4.5 k볼트 분무 전압으로 수행한다.
- [0638] **펩타이드 맵핑**
- [0639] 항체를 실온에서 15분동안 75mM의 중탄산암모늄중의 6M 구아니딘 하이드로클로라이드의 농도로 변성시킨다. 변성된 샘플을 60분동안 37°C에서 10mM DTT의 최종 농도로 감소시킴에 이어서 30분동안 37°C에서 암실에서 50mM 요오도아세트산(IAA)를 사용하여 알킬화시킨다. 알킬화 후, 샘플을 4°C에서 4리터의 10mM 중탄산암모늄에 대해 밤새 투석시킨다. 투석된 샘플을 10mM 중탄산암모늄, pH 7.8을 사용하여 1mg/ml로 희석시키고 100 mg의 항체를 4시간동안 37°C에서 트립신/Lys-C: 항체 1:20(w/w) 비율에서 트립신 (Promega, cat# V5111) 또는 Lys-C (Roche, cat# 11 047 825 001)로 분해시킨다. 분해물을 1 mL의 1 N HCl로 켄칭시킨다. 질량 분광측정기 검출을 사용한 펩타이드 맵핑을 위해 40ml의 분해물을, Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용한 C18 칼럼상의 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RPHPLC)에 의해 분리한다(Vydac, cat# 218TP51, S/N NE 9606 10.3.5). 펩타이드 분리는 분당 50ml의 유속으로 이동상 A(HPLC 물중의 0.02% TFA, 0.08% FA) 및 이동상 B (아세트니트릴중의 0.02% TFA 및 0.08% FA)를 사용하여 수행한다. API QSTAR 펄서 i 질량 분광측정기를 4.5k볼트 분무 전압 및 질량 대 하전비가 800 내지 2500인 스캔 범위에서 양성 모드로 작동시킨다.
- [0640] **디설파이드 결합 맵핑**
- [0641] 항체를 변성시키기 위해, 100 mL의 항체를 100mM의 중탄산암모늄 중의 300mL의 8M 구아니딘과 혼합한다. pH가 7 내지 8이 되도록 조사하고 샘플을 6M 구아니딘 HCl의 최종 농도에서 실온에서 15분동안 변성시킨다. 변성된 샘플의 일부(100mL)를 Milli-Q 물로 600ml로 희석시켜 최종 구아니딘-HCl 농도가 1M이 되게한다. 샘플(220 mg)을 대략 16시간동안 37°C에서 1:50 트립신 또는 1:50 Lys-C: 항체(w/w) 비율(4.4mg 효소: 220mg 샘플)에서 트립신 (Promega, cat # V5111, lot# 22265901) 또는 Lys-C (Roche, cat# 11047825001, lot# 12808000)를 사용하여 분해시킨다. 추가 5mg의 트립신 또는 Lys-C를 샘플에 첨가하고 37°C에서 추가로 2시간동안 분해가 진행되도록 한다. 분해는 1mg의 TFA를 각각의 샘플에 첨가함에 의해 종료시킨다. 분해된 샘플은 Agilent HPLC 시스템상에서 C18 칼럼을 사용하는 RPHPLC(Vydac, cat# 218TP51 S/N NE020630-4-1A)에 의해 분리한다. 당해 분리는 분당 50ml의 유속으로 이동상 A(HPLC 등급 물중의 0.02% TFA, 0.08% FA) 및 이동상 B (아세트니트릴중의 0.02% TFA 및 0.08% FA)를 사용하는 펩타이드 맵핑을 위해 사용되는 동일한 농도 구배로 수행한다. HPLC 작동 조건은 펩타이드 맵핑을 위해 사용되는 것들과 동일하다. API QSTAR 펄서 i 질량 분광측정기는 4.5k볼트 분무 전압 및 800

내지 2500 질량 대 하전 비율의 스캔 범위에서 양성 모드로 작동시킨다. 디설파이드 결합은 펩타이드의 관찰된 MW와 디설파이드 결합에 의해 결합된 트립신 또는 Lys-C 펩타이드의 예측된 MW를 일치시켜 할당한다.

[0642] **유리된 설프하이드릴 측정**

[0643] 항체에서 유리된 시스테인을 정량하기 위해 사용되는 방법은 특징적인 발색단 생성물, 5-티오-(2-니트로벤조산) (TNB)을 유발하는 설프하이드릴 그룹(SH)과 엘만 시약, 5,5'-디티오-비스(2-니트로벤조산) (DTNB)의 반응을 기초로 한다. 반응은 하기의 식에서 설명된다:

[0644] $DTNB + RSH \rightarrow RS-TNB + TNB^- + H^+$

[0645] TNB-의 흡광도는 Cary 50 분광측정기를 사용하여 412nm에서 측정한다. 흡광도 곡선은 유리된 SH 표준물질로서 2-머캅토에탄올(b-ME)의 희석물을 사용하여 플롯팅하고 단백질내 유리된 설프하이드릴 그룹의 농도는 샘플의 412nm에서의 흡광도로부터 측정한다.

[0646] b-ME 표준 스톡은 HPLC 등급의 물로 14.2M b-ME를 최종 농도 0.142mM로 연속 희석시켜 제조한다. 이어서 각각의 농도에 대해 3회 표준물을 제조한다. 항체는 아미콘 울트라 10,000 MWC0 원심분리 여과기(Millipore, cat# UFC801096, lot# L3KN5251)를 사용하여 10mg/ml로 농축시키고 완충액을 아달리무마브용 제제 완충액(5.57 mM 1염기성 인산나트륨, 8.69 mM 2염기성 인산나트륨, 106.69 mM NaCl, 1.07 mM 나트륨 시트레이트, 6.45 mM 시트르산, 66.68 mM 만니톨, pH 5.2, 0.1% (w/v) Tween)으로 대체시킨다. 당해 샘플을 20분동안 실온에서 진탕기상에서 혼합한다. 이어서 180 mL의 100 mM Tris 완충액, pH 8.1을 각각의 샘플 및 표준물에 첨가하고 이어서 10mM 인산 완충액(pH 8.1)중의 2mM DTNB의 300ml를 첨가한다. 완전히 혼합한 후, 샘플 및 표준물을 Cary 50 분광측정기상의 412nm에서의 흡광도에 대해 측정한다. 표준 곡선은 b-ME 표준물질의 유리된 SH의 양 및 OD₄₁₂을 플롯팅함에 의해 수득한다. 샘플의 유리된 SH 함량은 블랭크 공제 후 당해 곡선을 기준으로 계산한다.

[0647] **약 양이온 교환 크로마토그래피**

[0648] 항체는 10 mM 인산나트륨, pH 6.0을 사용하여 0.1mg/ml로 희석시킨다. 하전 이중성은 WCX-10 ProPac 분석 칼럼(Dionex, cat# 054993, S/N 02722)을 갖는 시마즈 HPLC 시스템을 사용하여 분석한다. 당해 샘플은 80% 이동상 A(10mM 인산나트륨, pH 6.0) 및 20% 이동상 B(10mM 인산나트륨, 500mM NaCl, pH 6.0)중에서 칼럼상으로 로딩하고 분당 1.0ml의 유속으로 용출시킨다.

[0649] **올리고사카라이드 프로파일링**

[0650] 항체의 PNGase F 처리 후 방출된 올리고사카라이드는 2-아미노벤즈아미드 (2-AB) 표지화 시약을 사용하여 유도 체화한다. 형광 표지된 올리고사카라이드를 정상의 고성능 액체 크로마토그래피(NPHPLC)로 분리하고 사이한 형태의 올리고사카라이드를 공지된 표준물질과의 체류시간 비교를 기초로 특징 분석한다.

[0651] 항체를 먼저 PNGaseF로 분해시켜 중쇄의 Fc 부분으로부터 N-연결된 올리고사카라이드를 절단한다. 당해 항체(200 mg)를 2 mL의 PNGase F 및 3 mL의 10% N-옥틸글루코시드와 함께 500mL의 에펜도르프 튜브에 첨가한다. 인산 완충식염수를 첨가하여 최종 용적이 60ml이 되게한다. 당해 샘플을 700RPM으로 설정된 에펜도르프 열혼합기중에서 37℃에서 밤새 항온처리한다. 아달리무마브 로트 AFP04C는 또한 대조군으로서 PNGase F로 분해시킨다.

[0652] PNGase F 처리 후, 샘플은 750RPM으로 설정된 에펜도르프 열혼합기에서 5분동안 95℃에서 항온처리하고 단백질을 침출시킴에 이어서 샘플을 2분동안 10,000 RPM에서 에펜도르프 원심분리기에 놓고 침전된 단백질을 침강시킨다. 올리고사카라이드를 함유하는 상등액을 500ml 에펜도르프 튜브로 옮기고 65℃에서 스피드-백에서 건조시킨다.

[0653] 올리고사카라이드를 제조원(Prozyme (cat# GKK-404, lot# 132026))으로부터 구입한 2AB 표지화 키트를 사용하여 2AB로 표지시킨다. 표지 시약은 제조업자의 지침에 따라 제조한다. 아세트산(150 mL, 키트로 제공됨)을 DMSO 바이알(키트로 제공됨)에 첨가하고 용액을 피펫팅으로 수회 상승 하강시켜 혼합한다. 아세트산/DMSO 혼합물(100 mL)을 사용 직전에 2-AB 염료 바이알에 옮기고 염료가 완전히 용해될때까지 혼합한다. 이어서 염료 용액을 환원제의 바이알(키트로 제공됨)에 첨가하고 잘 혼합한다(표지화 시약). 표지화 시약(5 mL)을 각각의 건조된 올리고사카라이드 샘플 바이알에 첨가하고 완전히 혼합한다. 당해 반응 바이알을 반응 2시간동안 65℃에서 및 700 내지 800 RPM으로 설정된 에펜도르프 열혼합기에 놓는다.

[0654] 표지화 반응 후, 과량의 형광 염료를 제조원(Prozyme (cat# GKI -4726))으로부터 글리코클린 에스 카트릿지를 사용하여 제거한다. 샘플을 첨가하기 전에, 카트릿지를 1 mL의 밀리-Q 물로 세척하고 이어서 1ml의 30% 아세트산

용액으로 5회 세척한다. 샘플 첨가하기 직전에, 1 mL의 아세토니트릴(Burdick and Jackson, cat# AH015-4)을 카트릿지에 첨가한다.

[0655] 모든 아세토니트릴이 카트릿지를 통과한 후, 샘플을 새로이 세척된 디스크의 중앙에 점적하고 10분동안 디스크 상으로 흡수되도록 한다. 디스크를 1mL의 아세토니트릴로 세척함에 이어서 96% 아세토니트릴 1mL로 5회 세척한다. 카트릿지를 1.5mL 에펜도르프 튜브상에 놓고 2-AB 표지된 올리고사카라이드를 밀리 Q 물로 3회 세척(각 세척당 400mL)으로 용출시킨다.

[0656] 올리고사카라이드를 시마즈(Shimadzu) HPLC 시스템에 연결된 Glycosep N HPLC (cat# GKI-4728) 칼럼을 사용하여 분리한다. 시마즈 HPLC 시스템은 시스템 조절자, 탈기 장치, 이원 펌프, 샘플 냉각기가 있는 자동샘플채취기 및 형광 검출기로 이루어진다.

[0657] **승온에서의 안정성**

[0658] 항체 완충액은 Amicon 초원심분리 여과기를 사용하는 5.57 mM 1염기성 인산나트륨, 8.69 mM 2염기성 인산나트륨, 106.69 mM NaCl, 1.07 mM 나트륨 시트레이트, 6.45 mM 시트르산, 66.68 mM 만니톨, 0.1% (w/v) Tween, pH 5.2; 또는 10 mM 히스티딘, 10 mM 메티오닌, 4% 만니톨, pH 5.9이다. 항체의 최종 농도는 적당한 완충액으로 2 mg/mL로 조정한다. 항체 용액은 이어서 여과 멸균하고 0.25 mL의 적정액을 멸균 조건하에 제조한다. 적정액을 1, 2 또는 3주동안 -80°C, 5°C, 25°C, 또는 40°C에서 방치한다. 항온처리 기간 말기에, 샘플은 크기 배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE로 분석한다.

[0659] 안정성 샘플은 환원 및 비환원 조건하에 SDS-PAGE로 분석한다. 사용되는 과정은 본원에 기재된 바와 동일하다. 당해 겔은 콜로이드성 블루 염색(Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016)으로 염색시키고 배경이 청명해질때까지 Milli-Q 물로 탈염색시킨다. 염색된 겔을 이어서 Epson Expression 스캐너(model 1680, S/N DASX003641)를 사용하여 스캔한다. 보다 높은 민감성을 획득하기 위해, 동일한 겔을 실버 염색 키트 (Owl Scientific)를 사용하여 염색하고 제조업자에 의해 추천된 과정을 사용한다.

[0660] **실시예 1.2.2.3.C: 사람화된 모노클로날 항체 그 자체 또는 화학치료요법과 조합된 사람 암종 이종이식체의 성장에 대한 효능**

[0661] 사람 암 세포는 조직 배양 플라스크에서 시험관내에서 99% 생존성, 85% 컨플루언스때까지 성장시킨다. 19 내지 25g의 SCID 암컷 또는 수컷 마우스의 귀에 태그하고 면도시킨다. 이어서 0일째에 마우스의 오른쪽 옆구리에 0.2mL의 2×10^6 사람 종양 세포 (1:1 매트릭셀)을 피하 접종하였다. 비히클(PBS), 사람화된 항체 및/또는 화학치료제의 투여(IP, Q3D/주)는 마우스를 평균 종양 용적이 대략 150 내지 200 mm³인 마우스의 별도의 케이지에 크기별로 일치시킨 후 개시하였다. 접종 후 대략 10일째에 개시하여 1주일에 2회 한쌍의 캘리퍼로 측정하고 종양 용적은 수학적 $V = L \times W^2/2$ (V: 용적, mm³; L: 길이, mm; W: 너비, mm)에 따라 계산하였다. 종양 용적의 감소는 비히클 또는 이소스타입 대조군 mAb만을 투여받은 동물에서의 종양과 비교하여 mAb 단독 또는 화학치료요법과 조합된 mAb로 처리된 동물에서 나타난다.

[0662] **실시예 1.2.2.3.D: FACS 기반 재지시된 세포독성(rCTL) 분석**

[0663] 음성 선택 농축 컬럼(R&D Systems, Minneapolis, MN; Cat.#HTCC-525)에 의해, 사전에 냉동 분리된 말초혈 단핵 세포(PBMC)로부터 사람 CD3+ T 세포를 분리한다. D-PBS(Invitrogen, Carlsbad, CA) 중의 10μg/mL 항-CD3(OKT-3, eBioscience, Inc., San Diego, CA) 및 2μg/mL 항-CD28(CD28.2, eBioscience, Inc. San Diego, CA)로 피복된 플라스크(벤트 캡, Corning, Acton, MA)에서 T 세포를 4일 동안 자극하고, L-글루타민, 55mM β-ME, Pen/Strep, 10% FBS)을 갖는 완전 RPMI 1640 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA) 중의 30U/mL IL-2(Roche)에서 배양한다. 이어서, T 분석에 사용하기 전에 세포를 30U/mL의 IL-2에서 밤새 저장한다. DoHH2 또는 Raji 표적 세포를 제조업자의 지침에 따라 PKH26(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 표지화한다. L-글루타민 및 10% FBS(Hyclone, Logan, UT)를 함유하는 RPMI 1640 배지(폐쇄 불포함, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 rCTL 분석에 걸쳐 사용한다. (Dreier et al. (2002) Int. J. Cancer 100:690 참조).

[0664] 이펙터 T 세포(E) 및 표적(T)을 96-웰 플레이트(Costar #3799, Acton, MA)에 각각 10^5 및 10^4 세포/웰의 최종 세포 농도로 플레이트링하여 10:1의 E:T 비를 제공한다. DVD-Ig 분자를 회식하여 농축-의존성 적정 곡선을 수득한다. 밤새 항온처리한 후, 세포를 펠렛화하고, D-PBS로 1회 세척한 후, D-PBS 중에 0.1% BSA, 0.1% 나트륨 아지드 및 0.5μg/ml 요오드화 프로피듐(BD)을 함유하는 FACS 완충액(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 재현탁시킨다.

FACS Canto II 기기(Becton Dickinson, San Jose, CA) 상에서 FACS 데이터를 수집하여 Flowjo(Treestar)에서 분석한다. 전체 표적 백분율(대조군, 처리하지 않음)로 나눈 DVD-Ig 분자 처리된 샘플의 생존 표적 백분율을 계산하여 특정 용해 백분율을 측정한다. Prism(Graphpad)에서 IC50을 계산한다.

[0665] 실시예 1.4: DVD-Ig 분자의 생성

[0666] 2개의 항원에 결합할 수 있는 DVD-Ig 분자는 2개의 모 모노클로날 항체, 즉, 본원에 기재된 바와 같이 선별된 사람 항원 A에 대한 항체 및 사람 항원 B에 대한 다른 항체를 사용하여 작제한다.

[0667] 실시예 1.4.1: 2개의 링커 길이를 갖는 DVD-Ig 분자의 생성

[0668] 234번, 및 235번에서 돌연변이를 갖는 1 μ l의 Fc를 포함하는 불변 영역은 ADCC/CDC 이펙터 기능을 제거하기 위해 사용한다. 4개의 상이한 항-A/B DVD-Ig 작제물을 생성한다: 2개는 짧은 링커를 갖고 2개는 긴 링커를 갖고, 각각은 2개의 상이한 도메인 배향: V_A-V_B-C 및 V_B-V_A-C으로 있다(표 13 참조). 사람 C1/Ck 또는 CH1 도메인의 N-말단 서열 유래의 링커 서열은 다음과 같다:

[0669] DVDAB 작제물에 대해:

[0670] 경쇄 (항-A가 λ 를 갖는 경우): 짧은 링커: QPKAAP (서열번호 15); 긴 링커: QPKAAPSVTLFPP (서열번호 16)

[0671] 경쇄 (항-A가 κ 를 갖는 경우): 짧은 링커: TVAAP (서열번호 13); 긴 링커: TVAAPSVFIFPP (서열번호 14)

[0672] 중쇄 (γ 1): 짧은 링커: ASTKGP (서열번호 21); 긴 링커: ASTGPSVFPLAP (서열번호 22)

[0673] DVDBA 작제물에 대해:

[0674] 경쇄 (항-B가 λ 를 갖는 경우): 짧은 링커: QPKAAP (서열번호 15); 긴 링커: QPKAAPSVTLFPP (서열번호 16)

[0675] 경쇄 (항-B가 κ 를 갖는 경우): 짧은 링커: TVAAP (서열번호 13); 긴 링커: TVAAPSVFIFPP (서열번호 14)

[0676] 중쇄 (γ 1): 짧은 링커: ASTKGP (서열번호 21); 긴 링커: ASTGPSVFPLAP (서열번호 22)

[0677] 중쇄 및 경쇄 작제물은 pBOS 발현 벡터에 서브클로닝하고 COS 세포에서 발현시킴에 이어서 단백질을 크로마토그래피로 정제한다. 정제된 물질은 SDS-PAGE 및 SEC 분석에 적용한다.

[0678] 표 13은 각각 항-A/B DVD-Ig 단백질을 발현하기 위해 사용되는 중쇄 및 경쇄를 기재한다.

표 13

항-A/B DVD-Ig 작제물

DVD-Ig 단백질	중쇄 작제물	경쇄 작제물
DVDABSL	DVDABHC-SL	DVDABLC-SL
DVDABLL	DVDABHC-LL	DVDABLC-LL
DVDBASL	DVDBAHC-SL	DVDBALC-SL
DVDBALL	DVDBAHC-LL	DVDBALC-LL

[0679] 실시예 1.4.2: DVDABSL 및 DVDABLL에 대한 DNA 작제물의 분자 클로닝

[0680] 중쇄 작제물 DVDABHC-LL 및 DVDABHC-SL를 제조하기 위해, A 항체의 VH 도메인을 특이적 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 PCR 증폭시키고; B 항체의 VH 도메인은 특이적 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다는 표준 PCR 기술 및 과정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물은 겔 정제하고 후속 중첩 PCR 반응에 대해 중첩 주형으로서 함께 사용한다. 중첩 PCR 생성물은 표준 상동성 재조합 방법을 사용함에 의해 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hC γ 1,2 비-a 포유동물 발현 벡터(Abbott)에 서브클로닝한다.

- [0682] 경쇄 작제물 DVDABLC-LL 및 DVDABLC-SL를 제조하기 위해, A 항체의 VL 도메인을 특이적 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 PCR 증폭시키고; B 항체의 VL 도메인은 특이적 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 서열을 포함한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다는 표준 PCR 기술 및 과정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물은 겔 정제하고 표준 PCR 조건하에서 후속 중첩 PCR 반응에 대해 중첩 주형으로서 함께 사용한다. 중첩 PCR 생성물은 표준 상동성 제조합 방법을 사용함에 의해 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hCk 포유동물 발현 벡터(Abbott)에 서브클로닝한다. 유사한 방법을 사용하여 하기에 기재된 바와 같은 DVDBASL 및 DVDBALL을 제조한다:
- [0683] **실시예 1.4.3: DVDBASL 및 DVDBALL에 대한 DNA 작제물의 분자 클로닝**
- [0684] 중쇄 작제물 DVDBAHC-LL 및 DVDBAHC-SL를 제조하기 위해, B 항체의 VH 도메인을 특이적 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 PCR 증폭시키고; A 항체의 VH 도메인은 특이적 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 서열을 포함한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다는 표준 PCR 기술 및 과정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물은 겔 정제하고 표준 PCR 조건을 사용하여 후속 중첩 PCR 반응에 대해 중첩 주형으로서 함께 사용한다. 중첩 PCR 생성물은 표준 상동성 제조합 방법을 사용함에 의해 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hC γ 1,z 비-a 포유동물 발현 벡터(Abbott)에 서브클로닝한다.
- [0685] 경쇄 작제물 DVDBALC-LL 및 DVDBALC-SL를 제조하기 위해, B 항체의 VL 도메인을 특이적 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 PCR 증폭시키고; A 항체의 VL 도메인은 특이적 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 서열을 포함한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다는 표준 PCR 기술 및 과정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물은 겔 정제하고 표준 PCR 조건을 사용하여 후속 중첩 PCR 반응에 대해 중첩 주형으로서 함께 사용한다. 중첩 PCR 생성물은 표준 상동성 제조합 방법을 사용함에 의해 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hCk 포유동물 발현 벡터(Abbott)에 서브클로닝한다.
- [0686] **실시예 1.4.4: 추가 DVD-Ig 분자의 작제 및 발현**
- [0687] **실시예 1.4.4.1: DVD-Ig 벡터 작제물의 제조**
- [0688] DVD-Ig 분자로의 혼입을 위한, 특이적 항원 또는 이의 에피토프를 인지하는 특이적 항체에 대한 모 항체 아미노산 서열은 상기된 바와 같이 하이브리도마를 제조함에 의해 획득될 수 있거나 공지된 항체 단백질 또는 핵산을 서열분석함에 의해 획득될 수 있다. 추가로 공지된 서열은 문헌으로부터 획득될 수 있다. 당해 서열은 세포에서의 발현을 위해 표준 DNA 합성 또는 증폭 기술을 사용하여 핵산을 합성하고 목적하는 항체 단편을 발현 벡터로 어셈블리하기 위해 사용될 수 있다.
- [0689] 예를 들면, 핵산 코돈은 아미노산 서열로부터 측정하고 올리고뉴클레오타이드 DNA는 제조원(Blue Heron Biotechnology, Inc. (www.blueheronbio.com) Bothell, WA USA)에 의해 합성하였다. 올리고뉴클레오타이드는 플라스미드 벡터에 클로닝되고 서열 입증된 300 내지 2,000 염기쌍 이본쇄 DNA 단편으로 어셈블리하였다. 클로닝된 단편은 효소 과정을 사용하여 어셈블리하여 완전한 유전자를 획득하고 발현 벡터에 서브클로닝한다(문헌참조: 미국 특허 제7,306,914; 7,297,541; 7,279,159; 7,150,969; 20080115243; 20080102475; 20080081379; 20080075690; 20080063780; 20080050506; 20080038777; 20080022422; 20070289033; 20070287170; 20070254338; 20070243194; 20070225227; 20070207171; 20070150976; 20070135620; 20070128190; 20070104722; 20070092484; 20070037196; 20070028321; 20060172404; 20060162026; 20060153791; 20030215458; 20030157643).
- [0690] pHybE 벡터 그룹(US 특허원 제61/021,282호)은 모 항체 및 DVD-Ig 분자 클로닝을 위해 사용하였다. pJP183로부터 유래된 V1; pHybE-hC γ 1,z,non-a V2는 야생형 불변 영역을 갖는 항체 및 DVD 중쇄의 클로닝을 위해 사용하였다. pJP191로부터 유래된 V2; pHybE-hCk V2는 카파 불변 영역을 갖는 항체 및 DVD 경쇄의 클로닝을 위해 사용하였다. pJP192로부터 유래된 V3; pHybE-hC1 V2는 람다 불변 영역을 갖는 항체 및 DVD 경쇄의 클로닝을 위해 사용하였다. 람다 신호 펩타이드 및 카파 불변 영역으로 구성된 V4는 람다-카파 하이브리드 V 도메인을 갖는 DVD 경쇄 클로닝을 위해 사용하였다. 카파 신호 펩타이드 및 람다 불변 영역으로 구성된 V5는 카파-람다 하이브리드 V 도메인을 갖는 DVD 경쇄의 클로닝을 위해 사용하였다. pJP183로부터 유래된 V7; pHybE-hC γ 1,z,non-a V2는 (234, 235 AA) 돌연변이 불변 영역을 갖는 항체 및 DVD 중쇄의 클로닝을 위해 사용하였다.
- [0691] 표 14에 따라, 다수의 벡터는 모 항체 및 DVD-Ig 분자 VH 및 VL 쇄의 클로닝에 사용하였다.

표 14

모 항체 및 DVD-Ig 분자를 클로닝하는데 사용된 벡터

ID	중쇄 벡터	경쇄 벡터
E26.13	V7	V2
E26.35	V7	V2
1B12.1	V7	V2
1B12.3	V7	V2
1B12.6	V7	V2
3D12.8	V7	V2
3D12.16	V7	V2
3D12.10/15	V7	V2
3D12r16	V7	V2
E26.13-LL-3D12.16	V7	V2
E26.13-LL-3D12.8	V7	V2
E26.13-SS-3D12.16	V7	V2
E26.13-SS-3D12.8	V7	V2
E26.13-SS-3D12.10/15	V7	V2
E26.35-SS-3D12.10/15	V7	V2
E26.35-SS-3D12r16	V7	V2
1B12.1-SS-3D12r16	V7	V2
1B12.3-SS-3D12r16	V7	V2
1B12.6-SS-3D12r16	V7	V2

[0692]

[0693]

실시예 1.4.4.2: 293 세포에서 형질감염 및 발현

[0694]

표준 항체 및 DVD-Ig 분자의 발현은 HEK293 (EBNA) 세포를 상응하는 경쇄 (LC) 및 중쇄(HC) 핵산을 함유하는 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켜 달성하였다. HEK293 (EBNA) 세포를 CO₂ 배양기(8% CO₂, 125 RPM, 37°C)에서 진탕시키면서 0.5L 스케일의 플라스크((2L Corning Cat# 431198)의 Freestyle 293 배지(Invitrogen, Carlsbad CA)에서 증식시켰다. 배양물이 1 x 10⁶ 세포/ml의 밀도에 도달하였을 때, 세포를 형질감염 복합체로 형질감시켰다. 형질감염 복합체는 Freestyle 배지 25ml 중에 150 µg LC-플라스미드 및 100 µg의 HC-플라스미드를 함께 혼합함에 이어서 500ul PEI 스톱 용액 [스톱 용액: 1 mg/ml (pH 7.0) Linear 25kDa PEI, Polysciences Cat# 23966]을 첨가하여 제조하였다. 형질감염 복합체는 뒤집으면서 혼합하고 세포 배양물에 첨가하기 전에 10 분동안 실온에서 항온처리되도록 방지한다. 형질감염 후, 배양물을 CO₂ 배양기 (8% CO₂, 125 RPM, 37°C)에서 계속 성장시켰다. 형질감염 24시간 후, 배양물에 25ml의 10% 트립톤 N1 용액(Organo Technie, La Courneuve France Cat# 19553)을 보충하였다. 형질감염 9일 후, 세포를 원심분리(16,000 g, 10 분)하여 배양물로부터 제거하고, 보유된 상층액을 여과(Millipore HV Durapore Stericup, 0.45um)시키고 정제 단계 개시때까지 4°C에 방치하였다.

[0695]

각각의 항체 또는 DVD-Ig 분자를 각각 MabSelect SuRe 수지(GE Healthcare)를 함유하는 1회용 1mL 팩킹 칼럼 (제조원(Orochem Technologies)에 의해 팩킹됨)을 사용하여 정제하였다. 칼럼을 PBS중에 사전에 균등화시키고 이어서 공급 컨테이너로 재순환시켜 1ml/분으로 수거된 0.55L 샘플을 밤새(15시간) 로딩하였다. 로딩 단계 후, 칼럼을 20ml PBS로 세척하고 단백질을, 용출 완충액[50mM 시트르산 pH 3.5]을 4 ml/분으로 공급하여 용출시키고 이미 0.2ml의 1.5M Tris pH 8.2 (최종 pH가 대략 6.0이 되게함)를 함유하는 튜브중에 분획물(1ml)을 수거한다. 항체를 함유하는 분획물을 크로마토그램을 기준으로 모으고 최종 저장 완충액[10mM 시트르산, 10mM Na₂HPO₄, pH 6.0]으로 투석하였다. 투석 후, 샘플을 0.22um Steriflip (Millipore)을 통해 여과시키고 단백질 농도는 흡광도 [Hewlett Packard 8453 다이오드 어레이 분광측정기]로 측정하였다. SDS-PAGE 분석은 분석 샘플(모두 환원되고 비환원됨)에 대해 수행하여 최종 순도를 평가하고 적당한 크기의 중쇄 및 경쇄 밴드의 존재를 입증하고 상당한

양의 유리된(예를 들면, 비복합체화된) 경쇄(비-환원된 샘플중에)의 존재를 확인한다.

[0696] 표 15는 293 세포에서 리터당 밀리그램으로서 나타난 모 항체 또는 DVD-Ig 작제물의 수율을 포함한다.

표 15

293 세포에서의 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 일시적 발현 수율

모 항체 또는 DVD-Ig ID	N-말단 가변 도메인 (VD)	C-말단 가변 도메인 (VD)	발현 수율 (mg/L)
3D12.8	IL-1 알파 (서열 1)		40
3D12.16	IL-1 알파 (서열 2)		40
3D12.10/15	IL-1 알파 (서열 3)		40
3D12r16	IL-1 알파 (서열 4)		9
E26.13	IL-1 베타 (서열 1)		72
E26.35	IL-1 베타 (서열 2)		40
E26.13-LL- 3D12.16	IL-1 베타 (서열 1)	IL-1 알파 (서열 2)	0
E26.13-LL- 3D12.8	IL-1 베타 (서열 1)	IL-1 알파 (서열 1)	0
E26.13-SS- 3D12.10/15	IL-1 베타 (서열 1)	IL-1 알파 (서열 3)	15
E26.13-SS- 3D12.16	IL-1 베타 (서열 1)	IL-1 알파 (서열 2)	0
E26.13-SS-3D12.8	IL-1 베타 (서열 1)	IL-1 알파 (서열 1)	0
E26.35-SS- 3D12.10/15	IL-1 베타 (서열 2)	IL-1 알파 (서열 3)	10
E26.35-SS- 3D12r16	IL-1 베타 (서열 2)	IL-1 알파 (서열 4)	50
1B12.1	IL-1 베타 (서열 3)		40.5
1B12.1-SS- 3D12r16	IL-1 베타 (서열 3)	IL-1 알파 (서열 4)	9.8
1B12.3	IL-1 베타 (서열 4)		56
1B12.3-SS- 3D12r16	IL-1 베타 (서열 4)	IL-1 알파 (서열 4)	22.2
1B12.6	IL-1 베타 (서열 5)		55.5
1B12.6-SS- 3D12r16	IL-1 베타 (서열 6)	IL-1 알파 (서열 4)	9.8

[0697]

[0698] 모든 DVD는 293 세포의 웰에서 발현되었다. DVD는 단백질 A 컬럼에 대해 용이하게 정제될 수 있었다. 대부분의 경우, 5mg/L 초과인 정제된 DVD-Ig 분자가 293 세포의 상청으로부터 용이하게 수득될 수 있었다.

[0699] 실시예 1.4.5: A/B DVD-Ig 분자의 성질 분석 및 선두 선별

[0700] 항-A/B DVD-Ig 분자의 결합 친화성은 단백질 A 및 단백질 B 둘 다에 대해 분석한다. DVD-Ig 분자의 4가 성질은 바이아코어상의 다중 결합 연구에 의해 조사한다. 한편, 단백질 A 및 단백질 B에 대한 DVD-Ig 분자의 중화성 효능은 각각 본원에 기재된 바와 같이 생분석에 의해 평가한다. 본래의 모 mAb의 친화성 및 효능을 최상으로 보유하는 DVD-Ig 분자는 각각 mAb에 대해 본원에 기재된 바와 같이 면밀한 물리화학적 및 생분석적(래트 PK) 성질 분석을 위해 선별한다. 일련의 분석을 기초로, 최종 선두 DVD-Ig 분자는 CHO 안정한 세포주 개발 단계로 진행시키고 CHO-유래 물질은 사이노물거스 원숭이 및 및 예비 제형 활성에서 안정성, 약동학적 및 효능 연구에 사용한다.

[0701] 실시예 2: 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig) 분자의 생성 및 특징 분석

[0702] 공지된 아미노산 서열을 갖는 모 항체를 사용하는 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig) 분자는 DVD-Ig 가변 중쇄 및 DVD-Ig 가변 경쇄 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 단편을 합성하고 당해 단편을 실시예 1.4.4.1에 따라 pHybC-D2 벡터로 클로닝하여 제조하였다. DVD-Ig 작제물을 실시예 1.4.4.2에 기재된 바와 같이 클로닝

시키고 293 세포에서 발현시켰다. DVD-Ig 단백질은 표준 방법에 따라 정제하였다. 기능적 성질 분석은 지적된 바와 같이 실시예 1.1.1 및 1.1.2에 기재된 방법에 따라 측정하였다. 본 발명의 DVD-Ig 분자에 대한 DVD-Ig VH 및 VL쇄는 하기에 제공된다.

실시예 2.1: 링커 세트 1을 이용한 IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 1) DVD-Ig 분자의 생성

표 16

서열 번호	DVD 가변 도메인 명칭	외부 가변 도메인 명칭	내부 가변 도메인 명칭	
52	E26.13- SS-3D12 10/15 VH	E26.13	3D12 10/15	12345 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIISRVDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPTVTVSSASTKGPEVQLVQSGAEVKKPG VSVKVSCKASGYTFTTYGMHWVRQAPGQGLEWMGW INTYTGESTYADDFQGRVTFITLDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMNYWGQGTITVT SS
53	E26.13- SS-3D12 10/15 VL	E26.13	3D12 10/15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YFTTISLQPEDIAITYYCYQHFWSIPYTFGQGTCLQ ITRTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNMLNWWYQQKPGKTPKLLIYYTSRLYPGVPSRF SGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYFCQQGKTLTPYA FGQGTCLLEIKR

실시예 2.2: 링커 세트 1 및 2를 이용한 IL-1알파(서열 2) 및 IL-1베타(서열 1) DVD-Ig 분자의 생성

표 17

서열 번호	DVD 가변 도메인 명칭	외부 가변 도메인 명칭	내부 가변 도메인 명칭	
54	E26.13- SS- 3D12.16 VH	E26.13	3D12.16	12345 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIISRVDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPTVTVSSASTKGPEIQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQDLERMAW INTYTGESTYADDFKGRFTITLDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWGQGTITVT SS
55	E26.13- SS- 3D12.16 VL	E26.13	3D12.16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YFTTISLQPEDIAITYYCYQHFWSIPYTFGQGTCLQ ITRTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNCLNWWYQQKPGKTPKLLIYYTSRLHSGVPSRF SGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYFCQQGKTLTPYA FGQGTCLLEIKR
56	E26.13- LL- 3D12.16 VH	E26.13	3D12.16	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIISRVDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPTVTVSSASTKGPSVFPLAPEIQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ DLERMAWINTYTGESTYADDFKGRFTITLDTSTST AYMELSSLRSEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWG QGTITVTSS
57	E26.13- LL- 3D12.16 VL	E26.13	3D12.16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YFTTISLQPEDIAITYYCYQHFWSIPYTFGQGTCLQ ITRTVAAPSVFIFPPDIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNCLNWWYQQKPGKTPKLLIYYTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYFCQQ GKTLTPYAFGQGTCLLEIKR

실시예 2.3: 링커 세트 1 및 2를 이용한 IL-1알파(서열 1) 및 IL-1베타(서열 1) DVD-Ig 분자의 생성

표 18

서열 번호	DVD 가변 도메인 명칭	외부 가변 도메인 명칭	내부 가변 도메인 명칭	
58	E26.13- SS- 3D12.8 VH	E26.13	3D12.8	12345 EVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCSASGFIISRVDMS WVRQAPGKGLWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPTVTSSASTKGPEIQLVQSGSELKKPG ASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQDLERMAW INTYTGESTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISS LKAEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWGQGTVTTV SS
59	E26.13- SS- 3D12.8 VL	E26.13	3D12.8	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASGNIHNYLTW YQQTTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITRTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ DISNCLNWWYQKPGKTPKLLIYTSRLHSGVPSRF SGSGSGTDYTFITISLPEDIATYFCQGGKTLTPYA FGQGTKEIKR
60	E26.13- LL- 3D12.8 VH	E26.13	3D12.8	EVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCSASGFIISRVDMS WVRQAPGKGLWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPTVTSSASTKGPSVFPLAPEIQLVQSG SELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWRQAPGQ DLERMAWINTYTGESTYADDFKGRFVFLDTSVST AYLQISSLKAEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWG QGTVTTVSS
61	E26.13- LL- 3D12.8 VL	E26.13	3D12.8	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASGNIHNYLTW YQQTTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITRTVAAPSVFIFPPDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TTCRASQDISNCLNWWYQKPGKTPKLLIYTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLPEDIATYFCQGG KTLTPYAFGQGTKEIKR

[0708]

[0709]

실시예 2.4: 링커 세트 1을 이용한 IL-1알파(서열 3) 및 IL-1베타(서열 2) DVD-Ig 분자의 생성

표 19

서열 번호	DVD 가변 도메인 명칭	외부 가변 도메인 명칭	내부 가변 도메인 명칭	
62	E26.35- SS-3D12 10/15 VH	E26.35	3D12 10/15	12345 EVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCSASGFIISRVDMS WVRQAPGKGLWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRAEDTAVYYCARGGVYKGY FDVWGQGTPTVTSSASTKGPEVQLVQSGAEVKKPG VSVKVSCKASGYTFTTYGMHWVRQAPGQGLEWMGW INTYTGESTYADDFQGRVTFTLDTSTAYMELSS LRSEDVAVYFCARGIYYYGSSYAMNYWGQGTVTTV SS
63	E26.35- SS-3D12 10/15 VL	E26.35	3D12 10/15	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASGNIHNYLTW YQQTTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITRTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ DISNMLNWWYQKPGKTPKLLIYTSRLYPGVPSRF SGSGSGTDYTFITISLPEDIATYFCQGGKTLTPYA FGQGTKEIKR

[0710]

[0711]

실시예 2.5: 링커 세트 1을 이용한 IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 2) DVD-Ig 분자의 생성

표 20

서열 번호	DVD 가변 도메인 명칭	외부 가변 도메인 명칭	내부 가변 도메인 명칭	12345
64	E26.35- SS- 3D12r16 VH	E26.35	3D12r16	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIIFSRYDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRAEDTAVYYCARGGVYKGY FDVWGQGTPTVTSSASTKGPEVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFKYYGMNWVRQAPGQGLERMGW INTYTGQSTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAYMELSS LRSEDVAVYYCARDIYYYSDFAMDYWGQGTTVTV SS
65	E26.35- SS- 3D12r16 VL	E26.35	3D12r16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASGNIHNYLTW YQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YFTTISLQPEDIAITYYQHFWISIPYTFGQGTKLQ ITRTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ DISNMLNWIYQQKPGKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRF SGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYFCQQGKTAPYT FGQGTKLEIKR

[0712]

[0713] 실시예 2.6: 링커 세트 1을 이용한 IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 3) DVD-Ig 분자의 생성

표 21

서열 번호	DVD 가변 도메인 명칭	외부 가변 도메인 명칭	내부 가변 도메인 명칭	12345
66	1B12.1- SS- 3D12r16 VH	1B12.1	3D12r16	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSDYGV WIRQPPGKGLEWLGWIWGGGDTYYNSPLKSRLTIS KDNSKSVSLKLSSTAAADTAVYYCAKQRTLWGYD LYGMDYWGQGTTLVTSSASTKGPEVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFKYYGMNWVRQAPGQGLER MGWINTYTGQSTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAYME LSSLRSEDVAVYYCARDIYYYSDFAMDYWGQGT TVTSS
67	1B12.1- SS- 3D12r16 VL	1B12.1	3D12r16	DTQVTQSPSSLSASVGDRTITCITSTIDVDMNW YQQKPGKPPKLLISQGNLTPGVPSRFSSSGSGTD FTFTISLQPEDFATYYCLQSDNLPFTFGQGTKLE IKRTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ DISNMLNWIYQQKPGKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRF SGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYFCQQGKTAPYT FGQGTKLEIKR

[0714]

[0715] 실시예 2.7: 링커 세트 1을 이용한 IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 4) DVD-Ig 분자의 생성

표 22

서열 번호	DVD 가변 도메인 명칭	외부 가변 도메인 명칭	내부 가변 도메인 명칭	12345
68	1B12.3- SS- 3D12r16 VH	1B12.3	3D12r16	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSDYGV WIRQPPGKGLEWLGWIWGGGDTYYNSPLKSRLTIS KDNSKSVSLKLSSTAAADTAVYYCAKQRTLWGYD LYGMDYWGQGTTLVTSSASTKGPEVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFKYYGMNWVRQAPGQGLER MGWINTYTGQSTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAYME LSSLRSEDVAVYYCARDIYYYSDFAMDYWGQGT TVTSS
69	1B12.3- SS- 3D12r16 VL	1B12.3	3D12r16	DTVVTQSPAFLSVTPGEKVTITCITSTIDVDMNW YQQKPDQPPKLLISQGNLTPGVPSRFSSSGSGTD FTFTISLQPEDAATYYCLQSDNLPFTFGQGTKLE IKRTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ DISNMLNWIYQQKPGKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRF SGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYFCQQGKTAPYT FGQGTKLEIKR

[0716]

[0717] 실시예 2.8: 링커 세트 1을 이용한 IL-1알파(서열 4) 및 IL-1베타(서열 5) DVD-Ig 분자의 생성

표 23

서열 번호	DVD 가변 도메인 명칭	외부 가변 도메인 명칭	내부 가변 도메인 명칭	
70	1B12.6- SS- 3D12r16 VH	1B12.6	3D12r16	12345 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSDYGVSWIRQAPGKGLWLGLIWGGDITYNSPLKSLRTISKDNSKSTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDYWGQGTLLTVVSSASTKGFEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFKYGMNWRQAPGQGLERMGWINTYTGQSTYADDFKGRVFTFLDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDIYYGSDFAMDYWGQGTITVTVSS
71	1B12.6- SS- 3D12r16 VL	1B12.6	3D12r16	ETTVTQSPSSLSASVGDRTITCITSTDDIDVDMNWYQKPKGKPKLLISQGNLRLPGVPSRFSSSGSGDFTFTISSLPEDFATYYCLQSDNPLPLTFQGQTKLEIKRIVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNMLNWIYQKPKKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYFCQQGKTAPYTFQGQTKLEIKR

[0718]

[0719]

실시예 2.9: 모 항체 및 DVD-Ig 서열을 클로닝하는데 사용된 클로닝 벡터 서열

표 24

서열번호	벡터 명칭	뉴클레오타이드 서열
72	V1	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 GCGTCGACCAAGGGCCATCGGCTCTTCCCTCGGCAACCTCTCCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTAGAGCCCAATCT TGTCACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTCGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGC GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCGAGCATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAAC AACTACAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTC TACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCGCTCGAGGCCGGCAAGCCGG ATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG CAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC CCGCCCCGAGCAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTCGGC GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACCTGGGC CCTGTTCACATGTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGGTCTCTGA CTGTAGTTGACATCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGT GCTTTCATCTGGAGCAGACTTTGAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTG CCTTTATGTGAACCTCTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT GTACCTCCAGGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCATC AGAGGGGCTGTGTAGTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGGCATTAGCA ATAGTGTTTATAAGGCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTC CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCTAATTCATATAGCATATGT TACCCAAAGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTA AGGAACAGCGATATCTCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTATTTTACATG GGGTCAGGATTCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGG

[0720]

서열번호	백터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		123456789012345678901234567890123456789012345678901 CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCT TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATA AAATTTGGACGGGGGTTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAA CCCTCACAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCT GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGT GCAATATGATACTGGGGTTATTAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACA GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTTAACACCCCCGAAAATTAAA CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCATAAAACAAGACAAGTGGCCACTCTTT TTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACAGCCGCGCTG CGGTTTTGGACTGTAAATAAGGGTGAATAACTTGGCTGATTGTAACCCC GCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCAAAAACCACTAATGGCACCCC GGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGC TGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCTGAGCGCCAAGCACAG GGTTGTTGGTCCCTCATATTACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGATCTCGGGTAGCATATG CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATGCTATCCTAATTTATATCTGGG TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA TGTCATGATAAATAGGTTCTTAGACGTGAGTGGCACTTTTCGGGGAAA TGTCGCGGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTA TCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTCTTTTTCG GGCATTTTGCTTCTGTTTTTGTCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCT CAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAAT GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGA CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT AAGAGAATTATGAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA CAACATGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGCAGCAATGGC AACAACGTTGCGCAAATATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG GCAACAATTAAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAGCATTGGTA ACTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCA TTTTAATTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTGATAATCTCATGAC CAAAATCCCTTAAAGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA AAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG CTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCGCGGTGGTTTGTGTTGCGGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGACAGCGCAGAT ACCAAACTACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA CTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCACTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATA GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGTGAACGGGGGTTTCGTGCACACA GCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGA GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC GGTAAGCGGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGAGCTTCCAGGGGG

[0721]

서열번호	백터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		123456789012345678901234567890123456789012345678901 AAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTCTGGCCTTTTGTCTCA CATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCGATTCTGTGGATAAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCC CGCGCTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATT GGCACCCCGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAGCTCTAGCTAGAGGTGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAATATGCAAA GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCA TCCCGCCCTAACTCCGCCCAGTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGAC TAATTTTTTTTATTTATGCAAGGCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTTGCAAAAAGC TTTGCAAGATGGATAAAGTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAAGTAAATG GCTTCTAGGCTCTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGGCGCTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGG CAATTGAACCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAACTGGGAAAGTGA TGTGTGTAAGTGGCTCCGCCCTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCGGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCCAG AACACAGTAAGTGCCTGTGTGGTTCCCGCGGCCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGGCTGCTCTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCCGAGCCCTTG CGCTTAAGGAGCCCTTCGCTCGTCTGAGTTGAGGCTTGGCCTGGGCG CTGGGGCCCGCGCTGCGAATCTGGTGGCACCCTCGCGCTGTCTCGCTGC TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTCCGGTTTTTGGGGCCCGGGCGCGACGGGGCCCGTGGCTCCAGCG CACATGTTTCGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGGCCACCGAGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGCTGCTCTGGTGGCTGGCCTCGCGCCGCC GTGTATCGCCCCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTGGCACCAAGTTGC GTGAGCGGAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAAGTCAACACACAAGGAA AAGGGCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCAATGTACTCCACGGAGTACCG GGCCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGAGTACGTCGTC TTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCAACATGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTTCTTTGGA ATTTGCCCTTTTGGATTGGATCTTGGTTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGT GGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAGGAATTTCTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGG CTGAGCTGGCTTTTCTTGTGCGGATTTTAAAGGTGTCAGTGC
73	V2	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGCAAGGCCGATCCCCGCA CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAATGCAATAGTGTGT GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCAT TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCGG ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTCCGGGGCAGTGC ATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAATTTGCCAAGTGGGCCCTGTTCA CATGTGACACGGGGGGGACCAACACAAGGGGTTCTTGACTGTAGTTG ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTTATC CTGGAGCAGACTTTGAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTTGCCTTTATGT GTAATCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCC AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGT ATAAGGCCCTTTGTTAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCGGGTAGT AGTATATACTATCCAGACTAACCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACG GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGTTAGTAAAGGGTCTAAGGAACAGC

[0722]

서열번호	백터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		123456789012345678901234567890123456789012345678901 GATATCTCCACCCCATGAGCTGTACGGTTTTATTACATGGGGTCAGGA TTCCACGAGGGTAGTGAACATTTTAGTCAACAGGGCAGTGGCTGAAGATC AAGGAGCGGGCAGTGAACCTCCTGAATCTTCGCTGCTTCTTCAATTCCTC TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGA CGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCCTCACAA ACCCCTTGGGCAATAAATACAGTGTAGGAATGAAACATTTCTGAATATCTT TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA TCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCA TGTTGTACACTCTATTTGTAAACAAGGGGAAGAGAGTGGACGCCGACAGC AGCGGACTCCACTGGTGTCTCTAACACCCCGGAAAATTAACGGGGCTCC ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTGAAA TTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGG ACTGTAAAATAAGGGTGTAACTTGGCTGATTGTAAACCCGCTAACAC TGCGGTCAAACCACTTGCCCAAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC CTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAGATAGGGGCGCGATTGTGTCGATCTG GAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCACAGCACAGGGTTGTGG TGCTCATATTACAGAGGTGCTGAGAGCAGGTGGGCTAATGTTGCCATGG TAGCATATACTACCAAAATATCTGGATAGCATATGCTATCTTAATCTATA TCTGGGTAGCATAGGCTATCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAATTTATATCTGGGTAGCAT AGGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCTTAATCTATATCT GGGTAGTATGCTATCTAATCTGTATCTGGGTAGCATATGCTATCTTAAT TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCTTAATTTATATCTGGGTAGCATATA CTACCAAAATATCTGGATAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGC ATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATAT TCTGGGTAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCT AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAATCTGTATCCG GGTAGCATATGCTATCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTG AAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCCATTTTATAGGTTAATGTATGAT AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGG AACCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCGCTCAT GAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTAT GAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATTTTG CCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGG TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCATATGATGAGCAC TTTTAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCA AGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA CTCACAGTCAAGAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT ATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAAGTTACTTCT GACACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAATGGG GGATCATGTAAGTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAACGACGAGCGTGACACCGATGCTGACGCAATGGCAACAACGTT GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGC CCTTCGCGCTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG GTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGAGA CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCATTTTAAATT TAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCC TTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC AAAAAAACACCGCTACACGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACC AACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATAC TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGC ACCCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAG TGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA TAAGGCGCAGCGTTCGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTT GGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGA

[0723]

서열번호	백터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTG GTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC GGCCTTTTACGGTTCTTGCCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTACATGTTCTT TCTTGCCTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG AGCTGATACCGCTCGCCGAGCGCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTG GCCGATTCTTAATGACGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA GGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG ATAACAATTTACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCGAGCGGAGAGTATGCAAGCATGCATC TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACCTCCGCCATCCCGCCCC TAACCTCGCCCCAGTTCCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTT TTATTTATGACAGAGGCGGAGGCCCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAG ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCGAGAGCG CAGATCGCCCAAGTCCCGGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAAC CGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGTGTCGTGTA CTGGCTCCGCCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCTGGCCTCTTACGGGTATGGGCC TTGCGTGCCCTGAAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG AGCCCCCTTCGCTCGTCTGAGTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGGCGG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTAAATTTTGTGATGACCTGTGCGACGCTTTTTCGTG GCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGT TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGTCCAGCGCACATGTTTC GGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTC TCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGGCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGC CCCCCTTGGCGCGCAAGGCTGGCCCGGTGGGACCAAGTTGCGTGAGCGGA AAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCGAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGTGAGTCACCCACACAAGGAAAGGGCCTT TCCGTCCTAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTG GGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCT TTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAGGAATCTCTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCCC AGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGC
74	V3	CAACCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGCGGGA GTGGAGACCAACACACCTCCAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGC TGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCATCA GAATGTTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGCAAGGCCGATCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAATTGCAATAGTGTGTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAAATCATTTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCCGCCCGGACG AATAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTCGCGGGGAGTGCATG TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACCTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTTCATCTG GAGCAGACTTTGCACTGTGTGACTGCAACACAAACATTGCCCTTATGTGTA ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGG GGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCCTAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGTTAGTAGT

[0724]

서열번호	백터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		123456789012345678901234567890123456789012345678901 ATATACTATCCAGACTAACCTTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCAACCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTACATGGGGTCAGGATTC CACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG GAGCGGGCAGTGAACCTCTCTGAATCTTCGCTGCTTCTTCATTCTCTCTC GTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGACGG GGGGTTCAAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCCTCACAAACC CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTTCTGAATATCTTTAA CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCTTAGTGCAATATGATAC TGGGTTTATTAAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT TGTGTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAATTAACCGGGCTCCACG CCAATGGGGCCATAAAACAAGACAAGTGGCCACTCTTTTGTGAAATTTG TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACT GTAAATAAGGGTGTAAATACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGC GGTCAAACCACTTGGCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG CATAGTAGGTGGCGGGGCAAGATAGGGGCGCGATTTGCTGCGATCTGGAG GACAAATTACACACACTTGGCGCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCC TCATATTACAGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCTTAATCTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCTTA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG CTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGG TAGTATATGCTATCTTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCTTAATAG AGATTAGGGTAGTATATGCTATCTTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA GCATAATATCTGGATAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATAT TGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAAT TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCT ATCTTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAATCTGTATCCGGGT AGCATATGCTATCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTCTTGAAAG ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTATAGGTTAATGTATGATAAT AATGGTTTCTTAGACGTGAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG ACAATAACCTGTATAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGATATGAG ATTTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTCGCGCATTTTGCCCT TCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGTGGAAGA TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAA GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGACGTTTCCAATGATGAGCACTTT TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGA GCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG CAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAATCTACTTCTGAC AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAAATGGGGGA TCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC AAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG CAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGGCAACAAATTAAT AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGAGCGCGGTGAGCGTGGGTC TCGCGGTATCATTGACGACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT AGTTATCTACAGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA GATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAGCATTTGGTAACGTGACAGCA AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCAATTTTAAATTTAA AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA ACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGCTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG ATCTTCTTGAGATCCTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAA AAAACACCGCTACAGCGGTGGTTTGTGTCGGGATCAAGAGCTACCAAC TCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGT TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA

[0725]

서열번호	백터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		123456789012345678901234567890123456789012345678901 GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCTTGGA GCGAACGACCTACACCGAAGTACGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCCTGGTA TCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGC CTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCC TGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC TGATACCGCTCGCCGACGCCAAGCAGCGGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCC GATTCATTAAATGCAGCTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAG TGAGCGCAACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCATTAGGCACCCAGGC TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA ACAATTTACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT AGAGTCGAGTCCCTCCCGAGCGGAGAGTATGCAAGCATGCACTCTCA ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA CTCCGCCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA TTTATGACAGAGGCGGAGGCGCCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAGATG GATAAAGTTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCACAGTCCCGGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGG TGCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTG GCTCCGCCCTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCCGCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCTTTCGCTTAAGGAGC CCCTTCGCTCGTCTGAGTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGGCGCGCG CGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAAATTTTGTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTT TGGGCGCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGC GAGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGTGCTGCTGCTGCGCCGCGCTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGGACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGAGGGAGCTCAAATGAGGAGACGCGCG CTCGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACCACACAAAGGAAAGGGCCTTTCC GTCTCAGCCGTGCTTCAATGAGTCTCCAGGAGTACCGGGCGCGCTCCAG GCACCTCGATTAGTCTCTGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTGGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCGACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCTTGAATTGCGCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATCTCTAGAGATCCCTCGACCT CGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGACTTGGACCCCACTCTCTCT CTCACCTCTCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG
75	V4	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACCTC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGCAAGGCCGATCCCCGA CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAATTGCAATAGTGTGT GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCGCCCCGG ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCCTCTCTCGCGGGCAGTGC ATGTAATCCCTTCAATTGGTTGGTACAACCTTGCCAACTGGGCCCTGTTC CATGTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGGTCTCTGACTGTAGTTG ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATC CTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGAGCTGCAACACAAACATGCTTTATGT GTAACCTCTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGTGGGGGACATGACTCTCC AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC

[0726]

서열번호	백터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTT ATAAGGCCCCCTTGTTAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGTAGT AGTATATACATATCCAGACTAACCTAATCAATAGCATATGTTACCAACG GGAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAGGGTCCTAAGGAACAGC GATATCTCCACCCCATGAGCTGTACGGTTTATTATCATGGGGTCAGGA TTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTAGTCACAGGGCAGTGGCTGAAGATC AAGGAGCGGGCAGTGAACCTCCTGAATCTTCGCTGCTTCTTCACTTCTCC TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAAGTGACGCCCCCAGAAATAAATTTGGA CGGGGGTTTCAAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCCTACAA ACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTTCTGAATATCTT TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGACAAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA TCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA TACTGGGGTTTATTAAGATGTGTCCAGGACAGGACCAAGACAGGTGAACCA TGTGTGTACACTCTATTTGTAAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCGGACAGC AGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCGGAAATTAACGGGGCTCC ACGCCAATGGGGCCATAAACAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAA TTGTGGAGTGGGGGCACGCTCAGCCCCACACGCGCCCTGCGGTTTGG ACTGTAAAAAAGGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAAACCCCGCTAACAC TCGGGTCAAACCACTTGGCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC CTGCATAAGTAGGTGGCGGGCCAAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTG GAGGACAAATTACACACACTTGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG TCTCATATATTCAGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGG GTAGCATATACTACCAAAATCTGATAGCATATGCTATCTCTAATCTATA TCTGGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAATTTATATCTGGGTAGCAT AGGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCTTAATCTATATCT GGGTAGTATATGCTATCTTAATCTGATCCGGGTAGCATATGCTATCTTA TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCTTAATTTATATCTGGGTAGCATATA CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGC ATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCT AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAATCTGTATCCG GGTAGCATATGCTATCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTCTTG AAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTATGAT AATAATGGTTTCTTAGACGTCAAGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGG AACCCTTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT GAGACATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAAGGAAGATAT GAGTATTTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTG CCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGA AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGG TAAGATCCTTGAGAGTTTTGCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCAC TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGATTATCCCGTGTGACGCGCGGCA AGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA CTCACCAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT ATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAATGGG GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTT GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCGCTCGGC CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG GTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAAGCATTTGGTAACGTGTGAGA CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTAATT TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGGATAATCTCATGACCAAAATCCC TTAACGTGAGTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC AAAAAACCAACCGCTACACGCGGTGGTTTGTGCGCGATCAAGAGCTACC AACTCTTTTTCCGAAGGTAACGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATAC TGTTCTTCTAGTGTAGCCGATTTAGGCCACCACCTCAAGAACCTCTGTAGC

[0727]

서열번호	백터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAACTCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAG TGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA TAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTT GGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACAGGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCTTG GTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC GGCCCTTTTACGGTTCTTGGCCCTTTTGTGCTGGCCCTTTTGCTCACATGTTCTT TCCTCGGTATATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG AGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGAGCGAGTCACTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACGCTCTCCCGCGCGTTG GCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTATTAGGACCCCCA GGCTTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG ATAACAATTTACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCGCCCATCCCGCCCC TAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTT TTATTTATGACAGAGGCGGAGGCGGCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAAG ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTCAGCTAATGGACCTTCTA GGCTTTGAAAGGAGTGGGAATTTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCACAGTCCCGGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAAC CGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTATGTCGTGTA CTGGCTCCGCCCTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTCGCCCGCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGTTTCCCGCGGGCTGGCCCTTTACGGGTATATGGCCC TTGCGTGCTTGAATTAATCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCTTTCGCTTAAGG AGCCCCCTTCGCTCGTGTGAGTTGAGGCTGGCCCTGGGCGCTGGGGCGG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTTAAATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTG GCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGT TTTTGGGGCCCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTC GGCGAGGCGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTC TCAAGCTGGCGGGCTGCTCTGGTGCTGGCCCTCGCGCGCGCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGCAAGGCTGGCCGGTGGGACCAAGTTGCGTGAGCGGA AAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTGCTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTG GGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCGACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCTTGGAATTGGCCCT TTTTGTGTTTGGATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTCTTCTCCATTTAGGTGTGCTGAGGAATCTCTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTGTGCCGGGCGCACCATGACTTGGACCCCACTCTCT TCCTCACCCCTCTCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG
76	V5	CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCTTGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA GTGGAGACCACACACCTCCAAACAAGCAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCAAGAAGCTACAGC TGCCAGGTACGCATGAAGGAGCACCCTGGAGAAGACAGTGGCCCTTACA GAATGTTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGATCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAATCATTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGGACG AACTAAACCTGACTACGACATCTTCCCCCTTCTTCGCGGGGCGAGTGCATG TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACAGGGGGGGACCAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCTG GAGCAGACTTTGCAGTCTGTGACTGCAACACAACTTGCCTTTATGTGTA

[0728]

서열번호	백터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCAGG GGCCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT ATATACCTATCCAGACTAACCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCAACCCATGAGCTGTACGGTTTATTTACATGGGGTCAGGATTC CACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG GAGCGGGCAGTGAACCTCTCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTC GTTTAGCTAATAGAAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAAACAAGGTTTCAAGTGACGCCCCAGAATAAAATTTGGACGG GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCTCACAAACC CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAA CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCATCT CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC TGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGACGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT TGTTCACTCTATTGTAAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCGAAAAATTAACGGGGCTCCACG CCATAGGGGCCATAAAACAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTGAAATTG TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCACACGCGCCCTGCGGTTTGGACT GTAAATAAGGGTGAATAACTTGGCTGATGTGAACCCGCTAACCACTGC GGTCAACCACTTGCCCAAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG CATAAGTAGGTGGCGGGCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG GACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCAGGGTTGTTGGTCC TCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCTCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG CTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGG TAGTATATGCTATCTTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCTTAATAG AGATTAGGGTAGTATATGCTATCTTAATTTATATCTGGGTAGCATATACCTA CCCAATATCTGGATAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATAT TGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAAT TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCTTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCT TATCTTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCTTAATCTGTATCCGGGT AGCATATGCTATCTCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAAATTTCTTGAAG ACGAAAGGGCTCGTGATACGCCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT AATGGTTTCTTAGACGTCAAGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC CCCTATTGTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGAG TATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTTCGCGCATTTTGCT TCCTGTTTTTGTCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA TCAGTTGGGTGACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAA GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTT TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCGGGCAAGA GCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAAAGTGGTTGAGTACTC ACAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGGCGGCAACTTACTTCTGAC AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACAAACATGGGGGA TCATGTAACCTGCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC AAACGACGAGCGTGACACACGATGCTGACGCAATGGCAACAACGTTGCG CAAATATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT TCCGGCTGGCTGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC TCGCGGTATCATTGACGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT AGTTATCTACAGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAGCATTGGTAACGTGACAGCA AGTTACTCATATATATCTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAA AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA ACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGG ATCTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAA AAAACCAACCGCTACAGCGGTGGTTTGTGTCGGATCAAGAGCTACCAAC

[0729]

서열번호	배터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 TCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAATCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA GGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGA GCGAACGACCTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG CGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAG GGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTTGGTA TCTTTATAGTCTCTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAACAAACGCGACACGCGGC CTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCAGATGTTCTTTCC TGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC TGATACCGCTCGCCGAGCGCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGA GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCC GATTCAATTAATGACGCTGGCAGCAGAGGTTTCCGACTGGAAAGCGGGCAG TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGCGACCCCGAGC TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA ACAATTTACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT AGAGGTGAGTCCCTCCCGCAGCGCAGAGTATGCAAAAGCATGCATCTCA ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAAGTCCGCGCATCCCGCCCTAA CTCCGCCCAGTTCCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA TTTATGCAAGGGCGAGGCGCCCTCGGCCCTTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAGATG GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTCAGCTAATGGAACCTCTAGGT CTTGAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCACTGGGCGAGCGCAC ATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGTCCGCAATTGAACCGG TGCTTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAACTGGGAAGTGATGTCGTGACTG GCTCCGCTTTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGAGTAGT CGCGGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTGCGCGCAGAACACAGGTAAG TGCGGTGTGTGTTCCCGCGGCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCTTGAATTAATCTCCACTGGCTGCGAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCTTGCGCTTAAGGAGC CCCTTCGCTCGTCTTGAAGTTGAGGCTTGCGCTGGGCGCTGGGGCGCGCG CGTGCAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGCTCGCTGCTTTGATAAGTC TCTAGCCATTAAATTTTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCGGCA AGATAGTCTTGAATGCGGGCCAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTT TGGGGCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGCTCCAGCGCACATGTTCCGC GAGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCGCGCTGCTCTGGTGCTGGCCTCGCGCCCGCTGATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCTGCTGCGAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAAGTCAACACACAAGGAAAGGGCTTTCC GTCTCAGCGCTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCCAG GCACCTCGATTAGTCTCTGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCTTGGAAATTGGCCCTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAGGAATTCTTAGAGATCCCTCGACCT CGAGATCCATTGTGCCCGGCGCCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCCAG CTGCTGGGCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCGGCTCGCGATGC
77	V7	GCGTCGACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCTCTCTCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGGCTGAGTCAAGGACTACTTCCC GAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCTGACCGAGCGGCTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGG GGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGTGAGC GTCTCACCCTGCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAA

[0730]

서열번호	백티 명칭	뉴클레오타이드 서열
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGC GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGGTCAAAGGCTTC TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGCAATGGGCAGCCGAGAAC AACTACAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGCAAGGCCGG ATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTACTCGGAAGGACATATGGGAGGG CAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC CCGCCCCGAGCAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCCTTCTCGCG GGGAGTGTCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACCTGGGC CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGGTTCTCTGA CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG GCTTTTCATCTCGAGCAGACTTTGAGTCTGTGGACTGCAACACACATTTG CCTTTATGTGTAACCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGTCTGGGGGACAT GTACTCCCGGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACCTCAATC AGAGGGGCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGGCATTAGCA ATAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTC CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCTAATTCAATAGCATATGT TACCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAGGGTCCCTA AGGAACAGCGATATCTCCACCCCATGAGCTGTCACGTTTATTATTACATG GGGTGAGGATTCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCAACAGGGCAGTGG CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCTGAATCTTCGCTGCTTCT TCATTTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATA AAATTTGGACGGGGGTTCACTGGTGGCATTTGTCTATGACACCAATATAA CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCT GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCGTAAAGACT GGATGTCCATCTCACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGT GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGCGGGGACCAAGACA GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTGTGAACAAGGGGAAGAGAGTGGAC GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTTAACACCCCCGAAATTA CGGGGCTCCACGCAATGGGGGCCATAAACAAGACAAGTGGCCACTCTTT TTTTTGAAATTTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCACACGCGCCCTG CGGTTTTGGACTGTAATAAAGGGTGAATAACTTGGCTGATGTAAACCCC GCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCACAAAACCACTAATGGCACCCC GGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCATGTC TGCATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAG GGTTGTTGGTCCCTCATATTACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA ATTTTCTGAAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCCATTTTTTATAGGTTAA TGTCATGATAAATAGGTTTCTTAGACGTACAGTGGCACTTTTCGGGGAAA TGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTA TCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCCCTTATCCCTTTTTTGC GGCATTTTGCTTCTGTTTGTCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAATCGGATCT CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCCGAAGAAGGTTTCCAAT GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGA CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATTTACGGATGCGATGACAGT

[0731]

서열번호	벡터 명칭	뉴클레오타이드 서열
		123456789012345678901234567890123456789012345678901 AAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA CTTACTTCTGACACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGAGCTGAA TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCTGCAGCAATGGC AACCAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCCG GCAACAATTAAAGAGATGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATGGTA ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATCTTTAGATTGATTTAAACTTCA TTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG CTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGAT CTTGAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA CTCTGTAGCACCGCTTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATA GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA GCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAAGATACCTACAGCGTGA GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCC GGTAAGCGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGACGAGGGAGCTTCCAGGGGG AAACGCTCGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA CGCTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAACAAACG CAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTCA CATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCC CGCTCGGATTGGCCGATTCAATTAATGACGCTGGCACGACAGGTTTCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA GGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAGCTCTAGCTAGAGGTGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAAGATATGCAAA GCATGCACTCAATTAAGTCAAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCA TCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGAC TAATTTTATTTATTTATGACAGGCGGAGCGCGCTCGGCCCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGC TTTGCAAAAGATGGATAAAGTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGACGCTAATG GACCTTCTAGGTCTTGAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAGTTGGGGGGAGGGGTCCG CAATTGAACCGGTGCTAGAGAAAGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAGTGA TGTCGTGACTAGGCTCCGCTTTTCCCGAGGTTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGAGTAGTGCCTGTAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAG AACACAGGTAAAGTGCCGTGTGTGTTCCCGCGGGCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTAATTCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGTTGGAAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCTTG CGCTTAAGGAGCCCTTCGCCCTCGTCTGAGTTGAGGCTGGCCTGGGCG CTGGGGCCGCGCGTGCAGATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGC TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAAATTTTGTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAAGATCTGCACACTGG TATTTGCTTTTGGGGCCGCGGCGGCGACGGGGCCGCTGCTGCCAGCG CACATGTTCCGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCTGGCCTCGCGCCGCC GTGTATCGCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCTGCTGCGAGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACCCACACAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG GGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTC TTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACTAGTGTG GGTGGAGAGTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGTATTAATTTCTCTTGGA ATTTCGCCCTTTTGTAGTTTGGATCTTGGTTTCTTCAAGCCTCAGACAGT GGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAGGAATTTCTTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCCATGTGCGCGGCGCCACCATGGAGTTTGGG CTGAGCTGGCTTTTCTTGTGCGGATTTAAAGGTGTCCAGTGC

[0732]

[0733]

본 발명은 분자생물학 및 약물 전달 분야에서 널리 공지된 전반적인 기술에 대한 참조문헌을 인용한다. 이들 기 술은 하기의 공개문헌에 기재된 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993);
 Ausubel, F.M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).
Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);
 Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);
 Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984);
 Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);
 Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);
 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);
 Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;

[0734]

Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).
 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);
 Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);
 Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).
 Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).
Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
 Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauf). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

[0735]

[0736]

참조문헌 인용

[0737]

모든 인용된 문헌(특정 분야의 문헌, 특허, 특허원 및 웹사이트를 포함)의 내용이 본원에 참조로서 인용될 수 있고 이에 의해 본원에 인용된 참조문헌으로서 임의의 목적에 대한 이들의 전문이 특별하게 인용된다. 본 발명의 수행은 달리 언급되지 않는 경우 당업계에 널리 공지된 바와 같은 면역학, 분자 생물학 및 세포 생물학을 사용한다.

[0738]

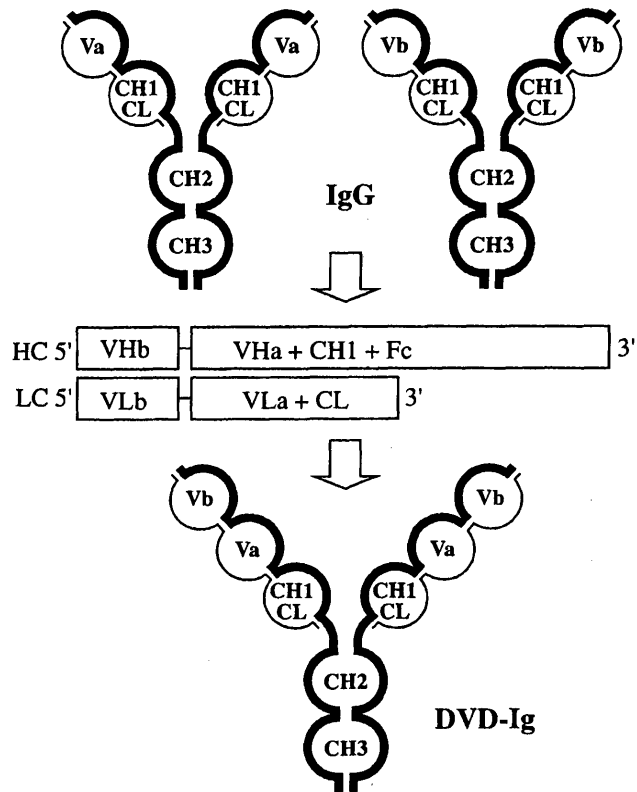
균등 범위

[0739]

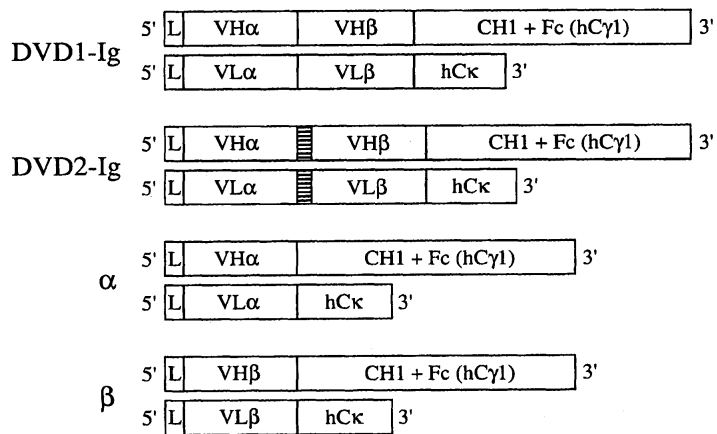
본 발명은 취지 또는 필수 성질을 벗어나지 않고 다른 특정 형태로 구현될 수 있다. 따라서 이전의 실시형태는 모든 양상에서 본원에 기재된 발명을 제한하기 보다는 설명하기 위해 제공된 것으로 간주되어야 한다. 발명의 범위는 따라서 이전에 기재된 것 보다는 첨부된 특허청구범위에 지적되어 있고 따라서 특허청구범위의 균등한 의미 및 범위내에서의 모든 변화는 본원에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1a



도면1b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ABBVIE INC.

<120> IL-1-ALPHA AND -BETA BISPECIFIC DUAL VARIABLE DOMAIN IMMUNOGLOBULINS AND THEIR USE

<130> 10718W001

<150> US 61/425,671

<151> 2010-12-21

<160> 78

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 1

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1 5 10 15

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 2

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1 5 10 15

Val

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 3

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 4

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5 10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 5

Ser Ala Lys Thr Thr Pro

1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 6

Arg Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 7
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 8
 Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
 1 5 10

<210> 9
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 9
 Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25
 <210> 10

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 10
 Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala
 1 5 10 15
 Arg Val

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 11
 Ala Asp Ala Ala Pro
 1 5

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 12
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13

Thr Val Ala Ala Pro

1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15

Gln Pro Lys Ala Ala Pro

1 5

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 16

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

Ala Lys Thr Thr Pro Pro

1 5

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Ala Lys Thr Thr Ala Pro

1 5

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 20

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 21

Ala Ser Thr Lys Gly Pro

1 5

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 22

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

1 5 10

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser

1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 25

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

1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 26

Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser

1 5 10 15

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 27

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Thr Val Ala Ala

1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

20

<210> 28

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 28

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

1 5 10 15

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

20 25

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 31

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 Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg

100 105

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 33

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 Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
100 105

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 34

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 35

Asp Thr Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105
<210> 36
<211
> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 36
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 37

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 37

Asp Thr Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 38

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Thr Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 39

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 39

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 40

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 40

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asn Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 41

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 41

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 Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Met

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 42

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

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

<210> 43

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 43

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

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

100 105

<210> 44

<211

> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 44

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 45

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 Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 47

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="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 Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Met
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 48

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100

105

110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115

120

125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130

135

140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145

150

155

160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165

170

175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180

185

190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 49

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

65					70					75					80				
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys				
85					90					95									
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys				
100					105					110									
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro				
115					120					125									
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				
130					135					140									
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp				
145					150					155					160				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu				
165					170					175									
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu				
180					185					190									
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn				
195					200					205									
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly				
210					215					220									
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu				
225					230					235					240				
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr				
245					250					255									
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn				
260					265					270									
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				
275					280					285									
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn				
290					295					300									
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr				
305					310					315					320				

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 50

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 51

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 52

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 52

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln
 115 120 125

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Val Ser Val Lys
130 135 140

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met His
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile
165 170 175

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Gln Gly Arg
180 185 190

Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
195 200 205

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
210 215 220

Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 53

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 53

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 Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr

20 25 30
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu

145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro

195 200 205

Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

210 215 220

<210> 54

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 54

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

1 5 10 15

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

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

85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Ile Gln
 115 120 125
 Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 130 135 140
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

145 150 155 160
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp Leu Glu Arg Met Ala Trp Ile
 165 170 175
 Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg
 180 185 190
 Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 195 200 205
 Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly

210 215 220
 Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 55

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 55

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 Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro
195 200 205

Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

210 215 220

<210> 56

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

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

130 135 140

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr

145 150 155 160

Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp

165 170 175

Leu Glu Arg Met Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr
180 185 190
Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr
195 200 205
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala
225 230 235 240
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 57

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="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 Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
115 120 125

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
130 135 140

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160

Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
180 185 190

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys
195 200 205

Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
210 215 220

Glu Ile Lys Arg
225

<210> 58

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 58

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe
65				70				75				80			
Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys
				85				90				95			
Ala	Arg	Gly	Gly	Val	Thr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly
100				105				110							
Thr	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Glu	Ile	Gln
115				120				125							
Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys
130				135				140							
Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn
145				150				155				160			
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Asp	Leu	Glu	Arg	Met	Ala	Trp	Ile
				165				170				175			
Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Arg
180				185				190							
Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile
195				200				205							
Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly
210				215				220							
Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
225				230				235				240			
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
				245											
<210> 59															
<211> 221															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220><221> source															
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"															
<400> 59															

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 Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro
195 200 205

Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 60

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

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

130 135 140

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr

145 150 155 160

Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp

165 170 175

Leu Glu Arg Met Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr

180 185 190

Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val

195 200 205

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala

210 215 220

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala

225 230 235 240

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

245 250

<210> 61

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 61

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 Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 145 150 155 160
 Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 165 170 175
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
 180 185 190
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys
 195 200 205

Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 210 215 220

Glu Ile Lys Arg

225

<210> 62

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr

 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln
 115 120 125
 Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Val Ser Val Lys
 130 135 140
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met His

145 150 155 160
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile
 165 170 175
 Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Gln Gly Arg
 180 185 190
 Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 195 200 205
 Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly

210 215 220
 Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 63

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 63

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 Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
 20 25 30

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
 130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 180 185 190
 Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro
 195 200 205

Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 210 215 220

<210> 64

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln
 115 120 125
 Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 130 135 140
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr Gly Met Asn
 145 150 155 160

 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met Gly Trp Ile
 165 170 175
 Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg
 180 185 190
 Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 195 200 205
 Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
 210 215 220

 Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 65

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 65

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 Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Lys Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

165 170 175

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

180 185 190
Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro
195 200 205
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

210 215 220
<210> 66
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 66
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45
Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp

100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
130 135 140
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr

145 150 155 160
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met

 165 170 175
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 180 185 190
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ala Arg Asp Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp

 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 245 250

 <210> 67
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 67
 Asp Thr Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Lys Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro

195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

210 215 220

<210> 68

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 68

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45
 Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp

 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 130 135 140
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met

 165 170 175
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 180 185 190
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ala Arg Asp Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp

 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 245 250

 <210> 69
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 69

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Lys Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro

195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

210 215 220

<210> 70

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Thr Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

180 185 190

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
195 200 205

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 71

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 71

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Lys Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro

195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

210 215 220

<210> 72

<211> 7185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 72

gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaaactcag gcgcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180

ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccc cgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360

ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag gtctctcacc gtctgcacc aggactggtt gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgcgaggag	720
atgaccaaga accaggctacg cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
ctggactccg acggctcctt cttctcttac agcaagctca ccgtggacaa gaggaggtgg	900
cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagcgcccg ctcgaggccg gcaaggccgg	1020
atccccgcac ctgcacctct ggctaataaa ggaaatttat tttcattgca atagtgtgtt	1080
ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat ttggtcgaga	1140
tccctcggag atctctagct agaggatcga tccccgccc ggacgaacta aacctgacta	1200
cgacatctct gcccttctt cgcggggcag tgcatgtaat ccttcagtt ggttggtaca	1260
acttgccaac tgggccctgt tccacatgtg acacgggggg ggaccaaaca caaagggtt	1320
ctctgactgt agttgacatc cttataaatg gatgtgcaca ttgccaaca ctgagtggct	1380
ttcatcctgg agcagacttt gcagtctgtg gactgcaaca caacattgcc ttatgtgta	1440
actcttggct gaagctctta caccaatgct gggggacatg tacctcccag gggcccagga	1500
agactacggg aggttacacc aacgtcaatc agaggggcct gtgtagctac cgataagcgg	1560
acctcaaga gggcattagc aatagtgttt ataaggcccc cttgttaacc ctaaacgggt	1620
agcatatgct tcccggttag tagtatatac tatccagact aaccttaatt caatagcata	1680
tgttaccaa cggaagcat atgctatcga attagggtta gtaaaagggt cctaaggaac	1740
agcgatatct cccaccccat gagctgtcac ggttttattt acatggggtc aggattccac	1800
gagggtagtg aaccatttta gtcacaaggg cagtggctga agatcaagga gcgggcagtg	1860
aactctctg aatcttcgcc tgcctcttca ttctcttcg tttagctaata agaataactg	1920
ctgagtgtg aacagtaagg tgtatgtgag gtgctcgaaa acaaggtttc aggtgacgcc	1980
cccagaataa aatttgacg gggggttcag tggtagcatt gtgctatgac accaatataa	2040
ccctcacaaa ccccttgggc aataaatact agttaggaa tgaaacattc tgaatatctt	2100
taacaataga aatccatggg gtggggacaa gccgtaaaga ctggatgtcc atctcacacg	2160
aatttatggc tatgggcaac acataatcct agtgcaatat gatactgggg ttattaagat	2220
gtgtcccagg cagggaccaa gacagtgaa ccatgttgtt acactctatt tgtaacaagg	2280
ggaaagagag tggacgccga cagcagcgga ctccactggt tgtctctaac acccccga	2340
attaaacggg gctccacgcc aatggggccc ataaacaaag acaagtggcc actctttttt	2400
ttgaaattgt ggagtggggg cagcgctcag cccccacacg ccgcctgcg gttttggact	2460
gtaaaataag ggtgtaataa cttggctgat tgtaaccccg ctaaccactg cgggtcaaacc	2520

acttgccac aaaaccacta atggcacccc ggggaatacc tgcataagta ggtgggcggg	2580
ccaagatagg ggcgcgattg ctgcgatctg gaggacaaat tacacacact tgcgcctgag	2640
cgccaagcac agggttgttg gtectcatat tcacgaggtc gctgagagca cggtaggcta	2700
atgttgccat gggtagcata tactacccaa atatctggat agcatatgct atcctaactct	2760
atatctgggt agcatagget atcctaactct atatctgggt agcatatgct atcctaactct	2820
atatctgggt agtatatgct atcctaattt atatctgggt agcatagget atcctaactct	2880
atatctgggt agcatatgct atcctaactct atatctgggt agtatatgct atcctaactct	2940
gtatccgggt agcatatgct atcctaatag agattagggt agtatatgct atcctaattt	3000
atatctgggt agcatatact acccaaatat ctggatagca tatgctatcc taatctatat	3060
ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagca taggctatcc taatctatat	3120
ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagta tatgctatcc taatttatat	3180
ctgggtagca taggctatcc taatctatat ctgggtagca tatgctatcc taatctatat	3240
ctgggtagta tatgctatcc taatctgtat ccgggtagca tatgctatcc tcatgataag	3300
ctgtcaaaca tgagaatttt ctgaagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata	3360
ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcagggt ggcacttttc ggggaaatgt	3420
gcgcggaacc cctatttgtt ttttttcta aataattca aatatgtatc cgctcatgag	3480
acaataacce tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca	3540
tttcctgtgc gcccttatcc cttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcaccc	3600
agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat	3660
cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc	3720
aatgatgagc acttttaag tttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg	3780
gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc	3840
agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat	3900
aacctgagt gataaactg cgccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga	3960
gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc	4020
ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc	4080
aacaacgttg cgcaaaacta taactggcga actacttact ctactttccc ggcaacaatt	4140
aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttcggc	4200
tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggtctcgcg gtatcattgc	4260
agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca	4320
ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca	4380

ttgtaactg tcagaccaag ttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt	4440
ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta	4500
acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg	4560
agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg ctgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc	4620
ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag	4680
cagagcgagc ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa	4740
gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatac ctgttaccag tggctgctgc	4800
cagtggcgat aagtcgtgic ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc	4860
gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta	4920
caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag	4980
aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct	5040
tccaggggga aacgccttgt atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tctgacttga	5100
gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc	5160
ggccttttta cggttccctgg ccttttctg gccttttct cacaatttct ttcctgcgtt	5220
atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg	5280
cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccataacg	5340
caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc	5400
cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcataggc	5460
accccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata	5520
acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctctagc tagaggtcga	5580
gtccctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcattgcatc caattagtca gcaaccatag	5640
tcccgcctt aactccgcc atcccgcct taactccgc cagttccgc cattctccgc	5700
cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc	5760
tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctttgca	5820
aagatggata aagtttttaa cagagaggaa tctttgcagc taatggacct tctaggtctt	5880
gaaaggagtg ggaattggct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgacat cggccacagt	5940
ccccgagaag ttggggggag gggctcgcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgagg	6000
ggtaaacctg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagg gtgggggaga	6060
accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag	6120

aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc 6180
 ttgcgtgcct tgaattactt ccacctggct gcagtacgtg attcttgatc ccgagcttcg 6240
 gggttgaagt ggggtggaga gttcaggcc ttgcgttaa ggagcccctt cgcctcgtgc 6300
 ttgagttgag gcctggcctg ggcgtcgggg ccgccgcgtg cgaatctggt ggcaccttcg 6360
 cgcctgtctc gctgctttcg ataagtctct agccatttaa aatttttgat gacctgctgc 6420
 gacgcttttt ttctggcaag atagtcttgt aaatgcgggc caagatctgc aacttggtat 6480
 ttcggttttt ggggcccgcg gcggcgacgg ggcccgtgcg tcccagcgca catgttcggc 6540

gaggcggggc ctgcgagcgc ggccaccgag aatcggacgg gggtagtctc aagctggccg 6600
 gcctgctctg gtgcctggcc tcgcgccgcc gtgtatcgcc ccgccctggg cggcaaggct 6660
 ggcccggctg gcaccagttg cgtgagcggg aagatggccg cttcccggcc ctgctgcagg 6720
 gagctcaaaa tggaggacgc ggcgctcggg agagcgggcg ggtgagtcac ccacacaaag 6780
 gaaaagggcc ttccgctcct cagccgtcgc ttcattgtac tccacggagt accgggcgcc 6840
 gtccaggcac ctcgattagt tctcgagctt ttggagtacg tcgtctttag gttgggggga 6900
 ggggttttat gcgatggagt tccccacac tgagtgggtg gagactgaag ttaggccagc 6960

ttggcacttg atgtaattct ccttgaatt tgcccttttt gagtttgat cttggttcat 7020
 tctcaagcct cagacagtgg ttcaaagttt tttcttcca ttccaggtgt cgtgaggaat 7080
 tctctagaga tcctcgacc tcgagatcca ttgtgcccg gcgccacat ggagtttggg 7140
 ctgagctggc tttttcttgt cgcgatttta aaagtggtcc agtgc 7185

<210> 73

<211> 6521

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 73

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60

actgcctctg ttgtgtgctt gctgaataac ttctatcca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgtga gcaaagcaga ctacagaaaa 240
 cacaagctct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccg cacaagagc 300
 ttcaacaggg gagagtgttg agcgcccgct cgaggccggc aaggccgat cccccgacct 360

cgacctctgg ctaataaagg aaatttattt tcattgcaat agtgtgttgg aatTTTTgt	420
gtctctcact cggaaggaca tatgggaggg caaatcattt ggtcgagatc cctcggagat	480
ctctagctag aggatecgtc cccgccccgg acgaactaaa cctgactacg acatctctgc	540
cccttcttcg cggggcagtg catgtaatcc cttcagttgg ttggtacaac ttgccaactg	600
ggccctgttc cacatgtgac acgggggggg accaaacaca aaggggttct ctgactgtag	660
ttgacatcct tataaatgga tgtgcacatt tgccaacact gagtggcttt catcctggag	720
cagactttgc agtctgtgga ctgcaacaca acattgcctt tatgtgtaac tcttggctga	780
agctcttaca ccaatgtcgg gggacatgta cctcccaggg gcccggaag actacgggag	840
gtacaccaa cgtcaatcag aggggcctgt gtagctaccg ataagcggac cctcaagagg	900
gcattagcaa tagtgtttat aaggccccct tgtaaccct aaacgggtag catatgcttc	960
ccgggtagta gtatatacta tccagactaa ccctaattca atagcatatg ttaccaacg	1020
ggaagcatat gctatcgaat tagggttagt aaaagggtcc taaggaaacag cgatatctcc	1080
caccccatga gctgtcacgg ttttatttac atggggtcag gattccacga gggtagtga	1140
ccattttagt cacaaggga gtggctgaag atcaaggagc gggcagtgaa ctctctgaa	1200
tcttcgctg ctcttcatt ctcttcgtt tagctaataa aataactgct gaggttgaa	1260
cagtaagggt tatgtgaggt gtcgaaaac aaggtttcag gtgacgccc cagaataaaa	1320
tttgacggg gggttcagtg gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcaaaacc	1380
ccttgggcaa taaatactag tgtaggaatg aaacattctg aatatctta acaatagaaa	1440
tccatgggt ggggacaagc cgtaaagact ggatgtccat ctcacacgaa tttatggcta	1500
tgggcaacac ataatcctag tgcaatatga tactggggtt attaagatgt gtcccaggca	1560
gggaccaaga caggtgaacc atgttggtac actctatttg taacaaggg aaagagagt	1620
gacgccgaca gcagcggact ccactggttg tctctaacac ccccgaaaat taaacggg	1680
tccacgcaa tggggcccat aaacaaagac aagtggccac tcttttttt gaaattgtg	1740
agtgggggca cgcgtcagcc cccacacgcc gcctgcggt tttggactgt aaaataagg	1800
tgtaataact tggctgattg taaccccgct aaccactgcg gtcaaaccac ttgccacaa	1860
aaccactaat ggcaccccg ggaatactg cataagtagg tgggcgggcc aagataggg	1920
cgcgattgct gcgacttgga ggacaaatta cacacattg cgctgagcg ccaagcacag	1980
ggttgttgtt cctcatattc acgaggtcgc tgagagcacg gtgggctaata gttgccatg	2040
gtagcatata ctacccaaat atctggatag catatgctat cctaacttat atctgggtg	2100

cataggctat cctaattctat atctgggtag catatgctat cctaattctat atctgggtag	2160
tatatgctat cctaatttat atctgggtag cataggctat cctaattctat atctgggtag	2220
catatgctat cctaattctat atctgggtag tatatgctat cctaattctgt atccgggtag	2280
catatgctat cctaataagag attagggttag tatatgctat cctaatttat atctgggtag	2340
catatactac ccaaatatct ggatagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata	2400
tgctatccta atctatatct gggtagcata ggctatccta atctatatct gggtagcata	2460
tgctatccta atctatatct gggtagtata tgctatccta atttatatct gggtagcata	2520
ggctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagtata	2580
tgctatccta atctgtatcc gggtagcata tgctatcctc atgataagct gtcaaactg	2640
agaattttct tgaagacgaa agggcctcgt gatagccta tttttatagg ttaatgtcat	2700
gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc	2760
tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg	2820
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc	2880
ccttatccccc ttttttgcgg cattttgcct tctgttttt gctcacccag aaacgtggt	2940
gaaagtataaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg gggtacatcg aactggatct	3000
caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac	3060
ttttaaggtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact	3120
cggtcgccgc atacactatt ctacagaatga ctgggtgag tactcaccag tcacagaaaa	3180
gcactttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga	3240
taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt	3300
tttgacaaac atgggggagc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga	3360
agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg	3420
caaaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat	3480
ggaggcggat aaagtgtcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat	3540
tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc	3600
agatggtaag ccttcccgtg tcgtagttaa ctacacgacg gggagtcagg caactatgga	3660
tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc	3720
agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcatTTTT aatttaaaag	3780
gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaaa atcccttaac gtgagttttc	3840

gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt	3900
tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt	3960
gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat	4020
accaaatact gtcttcttag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc	4080
accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa	4140
gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg	4200
ctgaacgggg gggtcgtgca cacagcccag cttaggagcga acgacctaca ccgaactgag	4260
atactacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag	4320
glatccgta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa	4380
cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt	4440
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg	4500
gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc	4560
tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccga gccgaacgac	4620
cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatagca aaccgcctct	4680
ccccgcgct tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc	4740
gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac ccagagcttt	4800
acactttatg ctccggctc gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac	4860
aggaaacagc tatgaccatg attacccaa gctctagcta gaggtcgagt cctccccag	4920
caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa	4980
ctccgccat ccgcccta actccgcca gtccgcca ttctccgcc catggetgac	5040
taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt	5100
agtgaggagg cttttttgga ggcctaggt tttgcaaaaa gctttgcaa gatggataaa	5160
gttttaaca gagaggaatc tttgcagcta atggaccttc taggtcttga aaggagtggg	5220
aattggtcc ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg ccacagtc ccgagaagtt	5280
ggggggagg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgagg taaactggga	5340
aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccgagggt gggggagaa cgtatataag	5400
tgcagtatgc gccgtgaacg ttctttttcg caaccggttt gccgccagaa cacagtaag	5460
tgccgtgtgt gggtcccgcg ggcctggcct ctttacgggt tatggccctt gcgtgccttg	5520
aattacttcc acctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg	5580
gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agcccttcg cctcgtgctt gaggttaggc	5640
ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc	5700

tgctttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgcttttttt 5760
ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatctgcac actggtatgtt cggtttttgg 5820
ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tgttcggcga ggcggggcct 5880
gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt 5940

gcctggcctc gcgccgccgt gtatcgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc 6000
accagttgag tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaatg 6060
gaggacgcgg cgctcgggag agcgggcggg tagtcaccc acacaaagga aaagggcctt 6120
tccgtcctca gccgtcgctt catgtgactc cacggagtac cgggcgccgt ccaggcacct 6180
cgattagtgc tcgagctttt ggagtacgtc gtcttttaggt tggggggagg ggttttatgc 6240
gatggagtgt cccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat 6300
gtaattctcc ttggaatttg ccttttttga gtttggatct tggttcattc tcaagcctca 6360

gacagtgggt caaagttttt ttcttcatt tcaggtgtcg tgaggaattc tctagagatc 6420
cctcgacctc gagatccatt gtgcccgggc gcaccatgga catgcgcgtg cccgcccagc 6480
tgctgggcct gctgctgctg tggttccccg gctcgcatg c 6521

<210> 74

<211> 6513

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 74

caaccaagg ctgccccctc ggtcactctg ttcccgcct cctctgagga gttcaagcc 60
aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt gactttacc cgggagccgt gacagtggcc 120

tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa 180
agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc 240
cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat gaaggagca cgtggagaa gacagtggcc 300
cctacagaat gtcatgagc ggccgctcga ggccggcaag gccgatccc ccgacctcga 360
cctctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttgaat tttttgtgtc 420
tctactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttggc cgagatccct cggagatctc 480
tagctagagg atcgatcccc gcccgggacg aactaaacct gactacgaca tctctgcccc 540

ttcttcgcgg ggcagtgcac gtaatccctt cagttgggtt gtacaacttg ccaactgggc	600
cctgttccac atgtgacacg gggggggacc aaacacaaag gggttctctg actgtagtgt	660
acatccctat aaatggatgt gcacatttgc caacactgag tggctttcat cctggagcag	720
actttgcagt ctgtggactg caacacaaca ttgcctttat gtgtaactct tggctgaagc	780
tcttacacca atgctggggg acatgtacct cccaggggcc caggaagact acgggaggct	840
acaccaacgt caatcagagg ggcctgtgta gctaccgata agcggaccct caagagggca	900
ttagcaatag tgittataag gcccccttgt taaccctaaa cgggtagcat atgcttcccg	960
ggtagtagta tatactatcc agactaacc taattcaata gcatatgtta cccaacggga	1020
agcatatgct atcgaattag ggtagtaaa agggctcctaa ggaacagcga tatctccac	1080
cccatgagct gtcacggttt tatttacctg gggtcaggat tccacgaggg tagtgaacca	1140
ttttagtac aagggcagt gctgaagatc aaggagcggg cagtgaactc tcctgaatct	1200
tcgcctgctt cticattctc ctctgtttag ctaatagaat aactgctgag ttgtgaacag	1260
taaggtgtat gtgagggtgt cgaaaacaag gtttcagggt acgccccag aataaaattt	1320
ggacgggggg ttcagtgggt gcattgtgct atgacaccaa tataaccctc acaaaccct	1380
tgggcaataa atactagtgt aggaatgaaa cattctgaat atctttaaca atagaaatcc	1440
atgggggtgg gacaagccgt aaagactgga tgcctatctc acacgaattt atggctatgg	1500
gcaacacata atcctagtgc aatatgatac tggggttatt aagatgtgtc ccaggcaggg	1560
accaagacag gtgaaccatg ttgttacact ctatttgtaa caaggggaaa gagagtggac	1620
gccgacagca gcggactcca ctggttgtct ctaacacccc cgaaaattaa acggggctcc	1680
acgccaatgg ggcccataaa caaagacaag tggccactct ttttttgaa attgtggagt	1740
gggggcacgc gtcagcccc acacgccgcc ctgcggtttt ggactgtaaa ataagggtgt	1800
aataacttgg ctgattgtaa ccccgctaac cactgcggtc aaaccacttg cccacaaaac	1860
cactaatggc accccgggga atacctgcat aagtaggtgg gcgggccaag ataggggcgc	1920
gattgtgcg atctggagga caaattacac acacttgcgc ctgagcgcca agcacagggt	1980
tgttggtcct catattcacg aggtcgctga gagcacgggt ggctaattgt gccatgggta	2040
gcataacta ccaaatatc tggatagcat atgctatcct aatctatc tgggtagcat	2100
aggctatcct aatctatc tgggtagcat atgctatcct aatctatc tgggtagtat	2160
atgctatcct aatttatc tgggtagcat aggctatcct aatctatc tgggtagcat	2220
atgctatcct aatctatc tgggtagtat atgctatcct aatctgtatc cgggtagcat	2280
atgctatcct aatagagatt agggtagtat atgctatcct aatttatc tgggtagcat	2340
atactacca aatatctgga tagcatatgc taccctaac tatactctgg tagcatatgc	2400

tatcctaate tatatctggg tagcataggc tatcctaate tatatctggg tagcatatgc	2460
tatcctaate tatatctggg tagtatatgc tatcctaatt tatatctggg tagcataggc	2520
tatcctaate tatatctggg tagcatatgc tatcctaate tatatctggg tagtatatgc	2580
tatcctaate tgiatccggg tagcatatgc tatcctcatg ataagctgtc aaacatgaga	2640
atcttcttga agacgaaagg gctcgtgat acgcctatct ttataggtta atgtcatgat	2700
aataatgggt tcttagacgt caggtggcac tttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat	2760
ttgtttatct ttctaaatac attcaaatat gtatccgtc atgagacaat aaccctgata	2820
aatgtctcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct	2880
tattcccttt tttcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa	2940
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa	3000
cagcggtgag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt	3060
taaagtcttg ctatgtggcg cggatattat ccgtgttgac gccgggcaag agcaactcgg	3120
tcgccgcata cactattctc agaattgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca	3180
tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtataa	3240
cactcgggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgtttttt	3300
gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc	3360
cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcttcagca atggcaacaa cgttcgcaa	3420
actattaact ggcaactac ttactctagc ttcccgcaa caattaatag actggatgga	3480
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccgccctt ccggttggtt ggtttattgc	3540
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga	3600
tggttaagccc tcccgatctg tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga	3660
acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctactgatt aagcatttgt aactgtcaga	3720
ccaagtctac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catctttaat ttaaaaggat	3780
ctaggtgaag atcctttttg ataattctat gacaaaaac ccttaacgtg agttttcgtt	3840
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct	3900
gcgcgtaate tgctgttgc aaacaaaaa accaccgcta ccagcgttg tttgtttgcc	3960
ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc	4020
aaatactgtt ctcttagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc	4080
gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagt gcgataagtc	4140
gtgtcttacc ggggttgact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg	4200
aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacacc aactgagata	4260

cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta	4320
tccggttaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc	4380
ctggtatctt tatagtcttg tcgggttttcg ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg	4440
atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt	4500
cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gtcttttct gcgttatccc ctgattctgt	4560
ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cggcgagcc gaacgaccga	4620
gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgcca atacgaaac cgcctctccc	4680
cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg	4740
cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca	4800
ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg	4860
aaacagctat gaccatgatt acgccaagct ctagctagag gtcgagtccc tccccagcag	4920
gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc	4980
cgcccatccc gccctaact ccgccagtt ccgccattc tccgccccat ggctgactaa	5040
ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt	5100
gaggaggctt ttttgaggcg ctaggctttt gcaaaaagct ttgcaaagat ggataaagtt	5160
ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatt gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat	5220
tggctccggt gcccgctcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtcctcg agaagtggg	5280
gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag	5340
tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc	5400
agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgaa cgggtttgcc gccagaacac aggttaagtgc	5460
cgtgtgtggt tcccgcggcg ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat	5520
tacttcacc tggtgcagt acgtgattct tgatcccgag cttcgggttg gaagtgggtg	5580
ggagagttcg aggccttgcg cttaaggagc cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg	5640
gcctggggcg tggggccgccc gcgtgcgaat ctggtggcac cttcgccct gtctcgtgc	5700
tttcgataag tccttagcca tttaaaattt ttgatgacct gctgcgacgc ttttttctg	5760
gcaagatagt cttgtaaatg cgggccaaga tctgcacact ggtatttcgg tttttggg	5820
cgcggggcg gacggggccc gtgcgtccca gcgcacatgt tcggcgagcg ggggcctgcg	5880
agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggtt gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc	5940
tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc ctgggcggca aggcctggccc ggtcggcacc	6000

agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc cggccctgct gcaggagct caaaatggag 6060
gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga gtcaccaca caaaggaaaa gggcctttcc 6120
gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga 6180
ttagttctcg agcttttga gtacgtcgtc tttagggttg ggggaggggt tttatgcgat 6240
ggagtttccc cacactgagt ggggtggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta 6300
attctccttg gaatttgccc tttttgagtt tggatcttgg ttcatctca agcctcagac 6360
agtgggtcaa agttttttc ttccatttca ggtgtcgtga ggaattctct agagatccct 6420

cgacctcgag atccattgtg cccgggcgcc accatgactt ggacccact cctcttcctc 6480
accctcctcc tcactgcac aggaagctta tcg 6513

<210> 75

<211> 6515

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 75

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
actgcctctg ttgtgtgct gctgaataac ttctatcca gagaggcaa agtacagtgg 120
aaggtggata acgcccctca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180

aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgtga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
caciaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccggt caciaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgttg agcggccgct cgaggccggc aaggccggat cccccgacct 360
cgacctctgg ctaataaagg aaatttatit tcatgtcaat agtgtgttgg aattttttgt 420
gtctctcact cggaaggaca tatgggaggg caaatcattt ggtcgagatc cctcggagat 480
ctctagctag aggatcgatc cccgccccgg acgaactaaa cctgactacg acatctctgc 540
cccttcttcg cggggcagtg catgtaatcc cttcagttgg ttggtacaac ttgccaactg 600

ggccctgttc cacatgtgac acgggggggg accaaacaca aagggttct ctgactgtag 660
ttgacatcct tataaatgga tgtgcacatt tgccaacact gagtggcttt catcctggag 720
cagactttgc agtctgtgga ctgcaacaca acattgcctt tatgtgtaac tcttggtgta 780
agctcttaca ccaatgtctg gggacatgta cctcccaggg gccaggaag actacgggag 840
gtacaccaa cgtcaatcag aggggcctgt gtagctaccg ataagcggac cctcaagagg 900

gcattagcaa tagtgtttat aaggccccct tgtaaccct aaacgggtag catatgcttc 960

ccgggtagta gtatatacta tccagactaa ccctaattca atagcatatg ttaccaacg 1020

ggaagcatat gctatcgaat tagggttagt aaaagggtcc taaggaacag cgatatctcc 1080

caccccatga gcgtcacgg ttttatTTac atggggtcag gattccacga gggtagtga 1140

ccattttagt cacaaggga gtggctgaag atcaaggagc gggcagtga ctctcctgaa 1200

tcttcgcctg cttcttcatt ctcttcgtt tagctaataag aataactgct gagttgtgaa 1260

cagtaagggt taigtgaggt gctcgaaaac aaggtttcag gtgacgcccc cagaataaaa 1320

tttgacggg gggttcagt gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcaaaacc 1380

ccttgggcaa taaatactag tgtaggaatg aaacattctg aatacttta acaatagaaa 1440

tccatggggt ggggacaagc cgtaaagact ggatgtccat ctacacagaa tttatggcta 1500

tgggcaaac ataatectag tgcaatatga tactggggtt attaagatgt gtcccaggca 1560

gggaccaaga caggatgaacc atgtgtttac actctatttg taacaagggg aaagagagt 1620

gacgccgaca gcagcggact ccactggttg tctctaacac ccccgaaaat taaacggggc 1680

tccacgcaa tggggcccat aaacaaagac aagtggccac tctttttttt gaaattgtgg 1740

agtgggggca cgcgtcagc cccacacgcc gccctgcggt tttggactgt aaaataagg 1800

tgtaataact tgctgattg taaccccgct aaccactgcg gtcaaaccac ttgccacaa 1860

aaccactaat ggcaccccg ggaatacctg cataagtagg tgggcgggcc aagatagggg 1920

cgcgattgct gcgatctgga ggacaaatta cacacattg cgcctgagcg ccaagcacag 1980

ggttgttggt cctcatattc acgaggtcgc tgagagcacg gtgggcta atgtgccatg 2040

gtagcatata ctacccaaat atctggatag catatgctat cctaattctat atctgggtag 2100

catagctat cctaattctat atctgggtag catatgctat cctaattctat atctgggtag 2160

tatatgctat cctaatttat atctgggtag catagctat cctaattctat atctgggtag 2220

catatgctat cctaattctat atctgggtag tatatgctat cctaattctgt atccgggtag 2280

catatgctat cctaataagag attagggtag tatatgctat cctaatttat atctgggtag 2340

catatactac ccaaatactt ggatagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata 2400

tgctatccta atctatatct gggtagcata ggctatccta atctatatct gggtagcata 2460

tgctatccta atctatatct gggtagtata tgctatccta atttatatct gggtagcata 2520

ggctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagtata 2580

tgctatccta atctgtatcc gggtagcata tgctatcctc atgataagct gtcaaacatg 2640

agaattttct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat	2700
gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc	2760
tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg	2820
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc	2880
ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag aaacgtggt	2940
gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct	3000
caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttcaa tgatgagcac	3060
ttttaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccggtt gacgccgggc aagagcaact	3120
cggtcggcg atacactatt ctcaaatga cttggttgag taccaccag tcacagaaaa	3180
gcatcttac gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga	3240
taacactcgc gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgttt	3300
tttgacaac atgggggac atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga	3360
agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg	3420
caaaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat	3480
ggaggcggat aaagttagcag gaccacttct gcgctcgcc cttccggctg gctggtttat	3540
tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcatgtcag cactggggcc	3600
agatggtaag cctcccgtg tctagtatt ctacacgacg gggagtcagg caactatgga	3660
tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc	3720
agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa ctcatTTTT aatttaaaag	3780
gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac gtgagttttc	3840
gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt	3900
tctgcgcgta atctgtgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt	3960
gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat	4020
accaaatact gttcttctag ttagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc	4080
accgcctaca tacctcgtc tgctaatacct gttaccagtg gctgtgccca gtggcgataa	4140
gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg	4200
ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag	4260
atactacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag	4320
glatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa	4380

cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 4440
 gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg 4500
 gtctctggcc ttttctggc cttttgtca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc 4560
 tgttgataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac 4620
 cgagcgcagc gaggcagtg gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatagca aaccgcctct 4680
 ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc 4740
 gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac cccaggcttt 4800

acactttatg cttccggctc gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac 4860
 aggaaacagc tatgaccatg attacgcaa gctctagcta gaggtcgagt ccctccccag 4920
 caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa 4980
 ctccgcccac ccgccccta actccgcca gtccgccc tttccgccc catggctgac 5040
 taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 5100
 agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct tttgcaaaa gctttgcaa gatggataaa 5160
 gttttaaaca gagaggaatc ttgacagta atggacctc taggtcttga aaggagtggg 5220

aattggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga ggcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt 5280
 ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgagg taaactggga 5340
 aagtgatgct gtgtactggc tccgcctttt tcccagggtt ggggggagaac cgtatataag 5400
 tgcagtagtc gccgtgaacg tttttttcgc caacgggttt gccgccagaa cacaggtlaag 5460
 tgccgtgtgt ggttcccgcg ggccctggcct ctttacgggt tatggccctt gcgtgccttg 5520
 aattacttcc acctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg 5580
 gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agccccctcg cctcgtgctt gaggttaggc 5640

ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc 5700
 tgctttcgaat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgcttttttt 5760
 ctggcaagat agtcttgtaa atcggggcca agatctgcac actggtatct cggttttttg 5820
 ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tgttcggcga ggcggggcct 5880
 gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt 5940
 gcctggcctc gcgcccgct gtatcgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc 6000
 accagttgct tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaatg 6060

gaggacgcgg cgctcgggag agcgggaggg tagtcaccc acacaaagga aaaggcctt 6120
 tccgtctca gccgtgctt catgtgactc cacggagtac cgggcgccgt ccaggcacct 6180
 cgattagtct tcgagctttt ggagtacgtc gtcttttaggt tggggggagg ggttttatgc 6240

gatggagttt cccacactg agtgggtgga gactgaagt aggccagctt ggcacttgat 6300
glaattctcc ttggaatttg ccttttttga gtttggatct tggttcattc tcaagcctca 6360
gacagtgggtt caaagttttt ttcttccatt tcaggtgtcg tgaggaattc tctagagatc 6420
cctcgacctc gagatccatt gtgcccgggc gcacatgac ttggacccca ctctcttcc 6480

tcacctctct cctccactgc acaggaagct tateg 6515

<210> 76

<211> 6519

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 76

caaccaagg ctgccccctc ggtcactctg ttcccgcct cctctgagga gcttcaagcc 60
aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc 120
tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa 180
agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc 240

cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc 300
cctacagaat gttcatgagc ggccgctcga ggccggcaag gccggatccc ccgacctcga 360
cctctggcta ataaaggaaa tttatittca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc 420
tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttggc cgagatccct cggagatctc 480
tagctagagg atcgatcccc gccccggacg aactaaacct gactacgaca tctctgcccc 540
ttcttcgcgg ggcagtgcgt gtaatccctt cagttggttg gtacaacttg ccaactgggc 600
cctgttccac atgtgacacg gggggggacc aaacacaaag gggttctctg actgtagtgtg 660

acatccttat aaatggatgt gcacatttgc caacactgag tggttttcat cctggagcag 720
actttgcagt ctgtggactg caacacaaca ttgcctttat gtgtaactct tggctgaagc 780
tcttacacca atgctggggg acatgtacct ccagggggcc caggaagact acgggaggct 840
acaccaacgt caatcagagg ggcctgtgta gctaccgata agcggaccct caagagggca 900
ttagcaatag tgittataag gcccccttgi taaccctaaa cgggttagcat atgcttcccg 960
ggtagtagta tatactatcc agactaaccc taattcaata gcatatgtta cccaacggga 1020
agcatatgct atcgaattag ggtagtaaaa agggctcctaa ggaacagcga tatctccac 1080

cccatgagct gtcacggttt tatttacctg gggtcaggat tccacgaggg tagtgaacca	1140
ttttagtac aagggcagtg gctgaagatc aaggagcggg cagtgaactc tcctgaatct	1200
tcgctgctt cttcattctc cttcgtttag ctaatagaat aactgctgag ttgtgaacag	1260
taagggtgat gtgagggtgt cgaaaacaag gtttcagggtg acgccccag aataaaattt	1320
ggacgggggg ttcagtggtg gcattgtgct atgacaccaa tataaccctc acaaaccctt	1380
tgggcaataa atactagtgt aggaatgaaa cattctgaat atctttaaca atagaaatcc	1440
atggggtggg gacaagccgt aaagactgga tgtccatctc acacgaattt atggctatgg	1500
gcaacacata atcctagtgc aatatgatac tggggttatt aagatgtgtc ccaggcaggg	1560
accaagacag gtgaaccatg ttgttacct ctatttgtaa caaggggaaa gagagtggac	1620
gccgacagca gcggactcca ctggttgtct ctaacacccc cgaaaattaa acggggctcc	1680
acgccaatgg ggcccataaa caaagacaag tggccactct tttttttgaa attgtggagt	1740
gggggcacgc gtcagcccc acacccgcc ctgcggtttt ggactgtaaa ataagggtgt	1800
aataacttgg ctgattgtaa ccccgctaac cactgcggtc aaaccacttg cccacaaaac	1860
cactaatggc accccgggga atacctgcat aagtaggtgg gcgggccaag ataggggcgc	1920
gattgtctgc atctggagga caaattacac acacttgccg ctgagcgcca agcacagggt	1980
tgttggtcct catattcacg aggtcgctga gagcacggtg ggctaattgt gccatgggta	2040
gcataacta cccaatatac tggatagcat atgctatcct aatctatac tgggtagcat	2100
aggctatcct aatctatac tgggtagcat atgctatcct aatctatac tgggtagcat	2160
atgctatcct aatttatac tgggtagcat aggctatcct aatctatac tgggtagcat	2220
atgctatcct aatctatac tgggtagcat atgctatcct aatctgtatc cgggtagcat	2280
atgctatcct aatagagatt agggtagtat atgctatcct aatttatac tgggtagcat	2340
atactaccca aatatctgga tagcatatgc tatectaate tataatctggg tagcatatgc	2400
tatectaate tataatctggg tagcataggc tatectaate tataatctggg tagcatatgc	2460
tatectaate tataatctggg tagtatatgc tatectaate tataatctggg tagcataggc	2520
tatectaate tataatctggg tagcatatgc tatectaate tataatctggg tagtatatgc	2580
tatectaate tgtatccggg tagcatatgc tatectcatg ataagctgtc aaacatgaga	2640
attttcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgctatctt ttataggtta atgtcatgat	2700
aataatggtt tcttagacgt cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat	2760
ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata	2820
aatgtctcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt	2880
tattcccttt ttgctggcat ttgctcttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa	2940

agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa	3000
cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt	3060
taaagtictg ctatgtggcg cggattatc cctgtttgac gccgggcaag agcaactcgg	3120
tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca	3180
tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgt gccataacca tgagtataa	3240
cactcgggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt	3300
gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc	3360
cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaacaa cgttgcgcaa	3420
actattaact ggcgaaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga	3480
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt cggctggct ggtttattgc	3540
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga	3600
tggtaaagccc tccgatatcg tagttatctc cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga	3660
acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga	3720
ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat	3780
ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacaaaaac ccttaacgtg agttttcgtt	3840
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct	3900
gcgctgaatc tgctgttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc	3960
ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc	4020
aaatactgtt cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc	4080
gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc	4140
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg	4200
aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata	4260
cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggta	4320
tccggtaaag ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc	4380
ctggtatctt tatagtctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg	4440
atgctcgtca gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcgcct ttttacggtt	4500
cctggccttt tgcctgctt ttgtcacat gttctttct gcgttatccc ctgattctgt	4560
ggataaccgt attaccgct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacaccga	4620
gcgcagcgag tcagttagcg aggaagcgga agagcgcca atacgaaac cgcctctccc	4680
cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttccgact ggaaagcggg	4740
cagttagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggttttaca	4800

ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 4860

aaacagctat gaccatgatt acgccaagct ctagctagag gtcgagtcce tccccagcag 4920

gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc 4980

cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccatt ggctgactaa 5040

ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcgccctc tgagctattc cagaagtagt 5100

gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt gcaaaaagct ttgcaaagat ggataaagtt 5160

ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatt gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat 5220

tggtccggt gcccgctcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtcccg agaagttggg 5280

gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccia gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag 5340

tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc 5400

agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgaa cgggtttgcc gccagaacac aggttaagtgc 5460

cgtgtgtgtt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat 5520

tacttccacc tggtgcagt acgtgattct tgatcccgag cttcgggttg gaagtgggtg 5580

ggagagttcg aggccttgcg cttaaggagc ccttcgcct cgtgcttgag ttgagccctg 5640

gcctgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgtgc 5700

tttcgataag tctctagcca tttaaaattt ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg 5760

gcaagatagt ctigttaatg cgggccaaga tctgcacact ggtatttcgg tttttgggc 5820

cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg 5880

agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc 5940

tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc 6000

agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc cggccctgct gcaggagact caaaatggag 6060

gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga gtcacccaca caaaggaaaa gggcctttcc 6120

gtcctcagcc gtcgttcat gtgactccac ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga 6180

ttagtctcgc agcttttga gtacgtcgtc tttaggttgg ggggaggggt tttatgcgat 6240

ggagtttccc cacactgagt ggggtggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta 6300

attctccttg gaatttgcgc tttttgagtt tggatcttgg ttcatctca agcctcagac 6360

agtgttcaa agttttttt ttccatttca ggtgtcgtga ggaattctct agagatccct 6420

cgacctcgag atccattgtg cccgggcgcc accatggaca tgcgcgtgcc cgcccagctg 6480

ctgggcctgc tgcgtcgtg gttccccggc tcgcgatgc 6519

<210> 77

<211> 7185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 77

gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgtct acagtctca	180
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc cgcgggggga	360
ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcttcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcctccatc ccgcgaggag	720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagcggccg ctcgaggccg gcaaggccgg	1020
atcccccgac ctcgacctct ggctaataaa ggaaatttat tttcattgca atagtgtgtt	1080
ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat ttggtcgaga	1140
tccctcgag atctctagct agaggatcga tccccgccc ggacgaacta aacctgacta	1200
cgacatctct gccccttctt cgcggggcag tgcattgaat cccttcagtt ggttggtaca	1260
acttgccaac tgggccctgt tccacatgtg acacgggggg ggaccaaaca caaaggggtt	1320
ctctgactgt agttgacatc cttataaatg gatgtgcaca tttgccaaca ctgagtggt	1380
ttcatcctgg agcagacttt gcagtcgtg gactgcaaca caacattgcc tttatgtgta	1440

actcttggct gaagctctta caccaatgct gggggacatg tacctcccag gggcccagga	1500
agactacggg aggtacacc aacgtcaatc agaggggcct gtgtagctac cgataagcgg	1560
accctcaaga gggcattagc aatagtgttt ataaggcccc cttgttaacc ctaaacgggt	1620
agcatatgct tcccgggtag tagtatatac tatccagact aaccctaatt caatagcata	1680
tgttacccaa cggaagcat atgctatcga attagggtta gtaaaagggt cctaaggaa	1740
agcgatatct cccaccccat gagctgtcac ggttttattt acatggggtc aggattccac	1800
gagggtagtg aaccatttta gtcacaaggg cagtggctga agatcaagga gcgggcagtg	1860
aactctctg aatcttcgcc tgcctcttca ttctcttcg tttagctaata agaataactg	1920
ctgagttgtg aacagtaagg tgtatgtgag gtgctcgaaa acaaggtttc aggtgacgcc	1980
cccagaataa aatttggacg gggggttcag tgggtggcatt gtgctatgac accaatataa	2040
ccctcacaaa ccccttgggc aataaatact agtgtaggaa tgaaacattc tgaatatctt	2100
taacaataga aatccatggg gtggggacaa gccgtaaaga ctggatgtcc atctcacacg	2160
aatttatggc tatgggcaac acataatcct agtgcaatat gatactgggg ttattaagat	2220
gtgtcccagg cagggaccaa gacaggtgaa ccatgttgtt acactctatt tgtaacaagg	2280
ggaaagagag tggacgccga cagcagcgga ctccactggg tgtctctaac acccccga	2340
attaaacggg gctccacgcc aatggggccc ataaacaaag acaagtggcc actctttttt	2400
ttgaaattgt ggagtggggg cacgcgtcag cccccacacg ccgcctgcg gttttggact	2460
gtaaaataag ggtgtaataa cttgctgat tgtaaccccg ctaaccactg cgggtcaaacc	2520
acttggccac aaaaccacta atggcacccc gggaataacc tgcataagta ggtgggcggg	2580
ccaagatagg ggcgcatg ctgcatctg gaggacaaat tacacacact tgcgcctgag	2640
cgccaagcac agggttgtg gtcctcatat tcacgagtc gctgagagca cgggtgggcta	2700
atgttgccat gggtagcata tactacccaa atatctggat agcatatgct atcctaactct	2760
atatctgggt agcataggct atcctaactct atatctgggt agcatatgct atcctaactct	2820
atatctgggt agtatatgct atcctaattt atatctgggt agcataggct atcctaactct	2880
atatctgggt agcatatgct atcctaactct atatctgggt agtatatgct atcctaactct	2940
glatccgggt agcatatgct atcctaataag agattagggt agtatatgct atcctaattt	3000
atatctgggt agcatatact acccaaatat ctggatagca tatgctatcc taatctatat	3060
ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagca taggctatcc taatctatat	3120
ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagta tatgctatcc taatttatat	3180

ctgggtagca taggctatcc taatctatat ctgggtagca tatgctatcc taatctatat	3240
ctgggtagta tatgctatcc taatctgtat cgggtagca tatgctatcc tcatgataag	3300
ctgtcaaaca tgagaatttt ctggaagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata	3360
ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt	3420
gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aataattca aatatgtatc cgctcatgag	3480
acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca	3540
tttccgtgtc gcccttattc ctttttttgc ggcatthttgc cttcctgttt ttgctcacc	3600
agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat	3660
cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc	3720
aatgatgagc acttttaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg	3780
gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc	3840
agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat	3900
aacctgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga	3960
gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc	4020
ggagctgaat gaagccatc caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc	4080
aacaacgttg cgaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt	4140
aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc	4200
tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctctcgc gtatcattgc	4260
agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca	4320
ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca	4380
ttggttaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt	4440
ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta	4500
acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg	4560
agatcctttt tttctgcgcg taatctgtg ctgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc	4620
ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag	4680
cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agttagccg tagttaggcc accacttcaa	4740
gaactctgta gcaccgcta catactcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgtgc	4800
cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc	4860
gcagcggtcg ggcgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta	4920

caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag	4980
aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca cgaggagct	5040
tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg ttctgccacc tctgacttga	5100
gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc	5160
ggccttttta cggttccctg ccttttgctg gccttttgc cacaatgttct ttctgcgtt	5220
atccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg	5280
cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg	5340
caaaccgct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc	5400
cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcataggc	5460
acccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata	5520
acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctctagc tagaggtcga	5580
gtccctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag	5640
tcccgccct aactccgcc atcccgccc taactccgc cagttccgc cattctccgc	5700
cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc	5760
tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctttgca	5820
aagatggata aagttttaaa cagagaggaa tctttgcagc taatggacct tctaggtctt	5880
gaaaggagtg ggaattggct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgacat cgcacacagt	5940
ccccgagaag ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcg	6000
ggtaaacctg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccgagg gtgggggaga	6060
accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttctttt cgcaaccggg ttgccgccag	6120
aacacaggta agtgcctgtg gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc	6180
ttgcgtgcct tgaattactt ccacctggct gcagtacgtg attcttgatc ccgagcttcg	6240
ggttggaagt gggtaggaga gttcaggcc ttgcgcttaa ggagcccctt cgcctcgtgc	6300
ttgagttgag gcctggcctg ggcgtgggg ccgccgctg cgaatctggt ggcaccttcg	6360
cgcctgtctc gctgctttcg ataagtctct agccatttaa aatttttgat gacctgtgc	6420
gacgcttttt ttctggcaag atagtctgtt aaatgcgggc caagatctgc aactggat	6480
ttcggttttt ggggccgagg gcggcgacgg gggcgtgctg tcccagcgca catgttcggc	6540
gaggcggggc ctgcgagcgc ggccaccgag aatcggacgg gggtagtctc aagctggccg	6600
gcctgtcttg gtgcctggcc tcgcgccgc gtgtatcgcc ccgcctggg cggcaaggct	6660
ggcccgtg gcaccagtgt cgtgagcgga aagatggccg cttcccgcc ctgctgcagg	6720
gagctcaaaa tggaggacgc ggcgctcggg agagcggcg ggtgagtcac ccacacaaag	6780

gaaaagggcc tticcgtcct cagccgtcgc ttcattgtgac tccacggagt accgggcgcc 6840
gtccaggcac ctcgattagt tctcgagcct ttggagtacg tcgtcttttag gttgggggga 6900
ggggttttat gcgatggagt ttccccacac tgagtgggtg gagactgaag ttaggccagc 6960
ttggcacttg atgtaattct ccttgggaatt tgcccttttt gagtttggat ctgggttcat 7020

tctcaagcct cagacagtgg ttcaaagttt ttttcttcca tttcaggtgt cgtgaggaat 7080
tctctagaga tccctcgacc tcgagateca ttgtgcccg gcgccaccat ggagtttggg 7140
ctgagctggc ttttcttgt cgcgatttta aaaggtgtcc agtgc 7185

<210> 78

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 78

Asp Glu Val Asp

1