



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0033236
(43) 공개일자 2014년03월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7004072(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2007년08월03일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2009-7003349
원출원일자(국제) 2007년08월03일
심사청구일자 2012년07월30일
- (85) 번역문제출일자 2014년02월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2007/075215
- (87) 국제공개번호 WO 2008/019326
국제공개일자 2008년02월14일
- (30) 우선권주장
60/835,777 2006년08월04일 미국(US)

- (71) 출원인
노바르티스 아게
스위스 바젤 씨에이치-4056 리크트스트라세 35
조마 테크놀로지 리미티드
미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 씨/오
- (72) 발명자
후 제프
미국 캘리포니아주 94564 피놀 사라 코트 2160
마사트 린다
미국 캘리포니아주 94610 오클랜드 #310 마리포사
애버뉴 612
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김성기

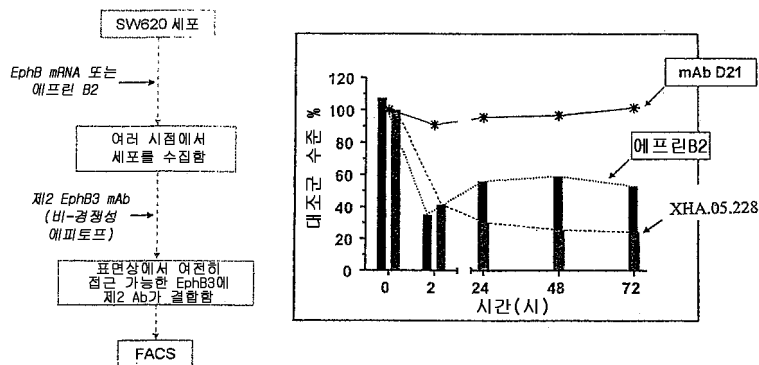
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 EPHB3-특이적 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 EphB3-특이적 항체와, 이 항체를 포함하는 약학 조성물, 이 약학 조성물을 함유하는 키트, 그리고 암을 예방 및 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

아브라함 주디

미국 캘리포니아주 94662-8097 에머리빌 노바르티스
스 아게 내

헨다 마사히사

미국 캘리포니아주 94707 버클리 소노마 애버뉴
1735

셰이어 시우

미국 캘리포니아주 94662-8097 에머리빌 노바르티스
스 아게 내

특허청구의 범위

청구항 1

10^{-6} M 이하의 친화도(K_D)로 EphB3의 세포외 도메인에 결합하고, 항체 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 또는 XHA.05.885 중 어느 하나와 EphB3에의 결합에 대해 75% 초과로 경쟁하는 항체.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 EphB3-특이적 항체를 투여하여 암을 예방 및 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암은 미국 내 주요 사망 원인 중 두 번째를 차지하고 있는 질병이다. 비록 "암"이란 용어는 다수의 상이한 유형의 암 즉, 유방암, 전립선암, 폐암, 결장암, 췌장암을 설명하는데 사용되고 있으나, 암의 유형은 각각 표현형적 측면과 유전적 측면에서 상이하다. 돌연 변이나 후생 유전적 변화(epigenetic change)로 인해 하나 이상의 유전자 발현의 조절에 문제가 생기게 될 때 암의 무제한 성장 특성이 나타나므로, 세포의 생장은 더 이상 제어될 수 없게 된다.

[0003] 성장 제어 유전자(growth control gene)는 종종 2가지 군, 즉, 발암 유전자(oncogene)와 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)로 분류된다. 발암 유전자는 보통, 오로지 특이적인 조건 하에서만 세포 성장을 촉진하는 기능을 가지는 유전자이다. 발암 유전자가 돌연 변이되어 이와 같은 특이성 제어 능력을 상실하게 될 때, 이 발암 유전자는 보다 광범위한 조건 하에서 성장을 촉진한다. 그러나, 암이 성공적으로 발생하기 위해서, 암 세포는 또한 종양 억제 유전자에 돌연 변이가 발생하여야 한다는 것을 알게 되었다. 종양 억제 유전자의 정상적인 기능은 세포의 성장을 멈추게 하는 것이다. 종양 억제 인자의 예로서는 p53, p16, p21 및 APC를 포함하며, 이것들이 모두 정상적으로 작동할 경우, 세포는 무제한적으로 분열 및 성장하는 것을 멈춘다. 종양 억제 인자가 돌연 변이되거나 상실될 경우, 세포 성장 억제 능도 또한 상실되며, 그로 인하여 세포는 정상적으로 억제되지 않고 계속해서 성장할 수 있게 된다.

[0004] EphB3은 에프린 수용체 티로신 키나제 군에 속하는 수용체이다. 현재, 인간에는 14개의 Eph 수용체와 9개의 에프린 리간드가 존재하는 것으로 알려져 있다. 에프린 수용체(Eph)와 이의 리간드인 에프린은 다양한 발생 과정(특히, 신경계와 혈관계에 있어서의 발생 과정)을 매개한다. 에프린은 또한 종양의 발생, 신생 혈관 형성, 전이성 성장 및 세포 생존에 있어서 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이것들의 구조와 서열의 관계를 바탕으로, 에프린은 글리코실포스파티딜이노시톨 결합에 의해서 막에 고정된 에프린-A(EFNA) 군과, 경막 단백질인 에프린-B(EFNB) 군으로 구분된다. 수용체의 Eph 군은 그것들의 세포외 도메인 서열의 유사성과, 에프린-A 리간드 및 에프린-B 리간드와의 결합 친화성을 바탕으로 하여, 2개의 군으로 구분된다. Eph 수용체는 수용체 티로신 키나제(RTK) 군의 가장 큰 하위 군을 구성한다.

[0005] Eph 수용체는 암과 관련되어 있다. EphA1으로 형질 감염된 후 누드 마우스에 이식된 NIH3T3 세포는 5~6주 경과 시 10mm³의 종양을 생성하는 반면에, 벡터 대조군은 동일한 기간 동안에 어떠한 종양도 생성하지 않았다[Maru의 다수, Oncogene. 1990 Mar; 5(3):445-7]. EphB2는 정상적인 조직과 비교하였을 때, 위암(12/16), 결장암(3/11), 식도암(3/6), 난소암(1/7), 신장암(1/2) 및 폐암(1/1)에서 보다 높은 수준으로 발현된다[Kiyokawa의 다수, Cancer Res 1994 Jul 15; 54(14):3645-50]. EphB6의 발현은 초기의 신경 아세포종과 상관되어 있다. EphB6의 키나제 도메인은 활동성을 띠지 않으므로, 이 수용체는 천연에서는 거의 작용하지 않는 것으로 생각된다[Tang의 다수, Clin Cancer Res 1999a Jun;5(6): 1491-6].

[0006] Eph와 에프린이 신생 혈관 형성 과정에 관여한다는 사실을 암시하는 증거가 다수 존재한다. 에프린 A1, 에프린 B1, 에프린 B2, EphB2, EphB3 및 EphB4는 혈관에서 발현되는 것으로 보고된 바 있다. 에프린 A1은 래트의 각막 모델에서 신생 혈관 형성을 유도할 수 있으며, 에프린 A1에 대한 항체는 상기 모델에서 TNF- α 유도성 신생 혈관 형성 과정을 억제할 수 있다[Pandey의 다수, Science 1995 Apr 28; 268(5210):567-9]. 에프린 B1의 클러스

터는 P19, 기형중-유래 척추 동물 세포주, 그리고 인간의 망막 미세 혈관 내피 세포(HRMEC)에서 세포와 모세관-유사 조립체를 부착시킨다[Stein의 다수, Genes Dev 1998 Mar 1; 12(5):667-78]. 에프린 B1 및 에프린 B2의 클러스터는 또한 부신피질 유래 미세 혈관 내피 세포(ACE)의 발생을 유도할 수도 있다[Adams의 다수, Genes Dev 1999 Feb 1; 13(3):295-306]. 거의 활동성을 가지지 않는 EphB4 수용체 RNA를 제노퍼스(Xenopus) 배에 주입하면, 체절 간(intersomitic) 정맥이 인접 체절에 비정상적으로 뻗어나가게 된다[Helbling의 다수, Development 2000 Jan; 127(2):269-78]. EphB2/EphB3 이중 녹-아웃 마우스와, EphB4 및 에프린 B2 녹-아웃 마우스는 모두 혈관 재구성에 결함이 있다[Adams의 다수, 1999; Wang의 다수, Cell 1998 May 29; 93(5):741-53; PCT WO 00/30673].

[0007] Eph는 또한 전이에 있어서도 작용을 한다. EphB3 또는 EphB2로 형질 감염된 293T 인간 상피 신장 세포는, 시험관 내에서 피브로넥틴 또는 콜라겐 코팅된 표면에 세포가 부착되는 성질이 약화된 세포이다. R-ras의 EphB2 인산화 이후 인테그린의 탈 활성화에 의해 293 세포는 부착에 실패하였다[Zou의 다수, Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Nov 23; 96(24):13813-8].

[0008] Eph는 활성화에 따른 신호 전달에 의해 작용을 하게 된다. 에프린 결합으로 인하여, Eph 수용체가 올리고머화되고, 이로써 Eph의 막 근접 잔기들이 인산화된다. 활성화된 Eph는 신호 전달 단백질(예를 들어, RasGAP, Src, LMW-PTP, PLCg, PI3-키나제, Grb2, 및 PDZ 함유 단백질)의 결합 위치(docking site)로서의 기능을 하는 다수 개의 인산화 티로신을 갖는다.

[0009] Eph 수용체(EphA1, EphA2, EphB2)가 과발현되면, 수용체가 과 인산화되지 않고도 형질 전환이 일어날 수 있게 된다. 인산화된 EphB 수용체는 Ras-MAP-키나제 경로와 FAK 신호 전달, 세포 성장 방해 현상을 음으로 조절한다.

[0010] EphB3(Hek2, Sek4, Mdk5, Tyro6, Cek10 및 Qek10으로도 알려져 있음)는 에프린 B 군의 일원(에프린 B1, 에프린 B2 및 에프린 B3)에 대한 수용체로서, 정상적인 조직과 임의의 종양 및 암 세포주 내에서 발견되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 현재 암에 있어서 EphB3의 기능은 명확히 밝혀진 바 없다. 그러므로, 이와 같이 암에 있어서 EphB3와 이의 기능을 조정하는 조성물과 이를 위한 방법을 밝혀낼 필요가 있는 것이다. 본 발명은 이와 같은 중요한 필요성과 기타 요구 사항에 부응하는 것이다.

발명의 내용

[0011] EphB3에 대한 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 1에 제시되어 있고, 아미노산 서열은 서열 번호 2에 제시되어 있다. 세포외 도메인(ECD)은 서열 번호 2의 1~559번 아미노산으로 이루어져 있다. 대안적으로, ECD는 서열 번호 2의 34~555번 아미노산으로 이루어져 있다[주의: 단백질 서열의 NCBI Entrez 데이터베이스 중 인간 EphB3에 상응하는 위치 번호는 2가지가 존재함]. 이 두 가지 경우에 있어서, (a) ATG 개시 코돈에서 종결 코돈에 이르는 암호화 부위에 의해 암호화된 아미노산의 번호; (b) 전구체 서열 내 아미노산의 어느 영역이 분비 신호 서열(이 서열은 성숙 과정 중 잘라져 성숙한 단백질을 생성함)을 나타내는지; 그리고 (c) 잔기의 어느 영역이 경막 부를 나타내는지를 말해주는 서열이, 이 서열을 제출한 연구자들에 의해 예측되었다. 성숙한 단백질의 "세포 외" 도메인은 신호 서열과 경막 도메인 사이에 존재하므로, ECD의 예측 범위는 신호 부위 및 TM 부위를 어디에 배치하는지에 따라서 달라진다. 제출된 두 가지 위치(NP_004434 및 P54753)를 통하여, 전구체는 길이가 998개 아미노산이며, 분비 신호는 1~33번 잔기에 해당함을 예측할 수 있다. 그러므로, 두 가지 경우 모두에 있어서 ECD가 시작되는 부분은 34번 잔기임을 알 수 있다. 그러나, TM 부위가 시작되는 부분은 상이하다: NP_004434가 시작되는 부위는 556번 잔기인 반면에(ECD가 끝나는 부분은 555번 아미노산), P54753의 TM이 시작되는 부분은 560번 잔기(ECD가 끝나는 부분은 559번 아미노산)인 것으로 예측된다. 본원의 실시예에 기술되어 있는 바와 같이, 37~558번 아미노산으로 이루어진 ECD는 항체 생성을 위한 면역화에 사용되었다.

[0012] 본 발명의 물질 및 방법은 전술한 요구 사항과 당 업계에서 요망되는 관련 사항을 만족시키는 것이다.

[0013] 하나의 구체예에서, EphB3의 세포외 도메인과 친화도(K_D) $10^{-6}M$ 이하로 결합하고, 항체 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 또는 XHA.05.885 중 임의의 것과, EphB3과의 결합에 대해 경쟁하는(75% 이상) 항체가 제공된다. "친화도(K_D)가 $10^{-6}M$ 이하"란 용어는, 친화도가 예를 들어, $10^{-6}M$, $10^{-7}M$, $10^{-8}M$, $10^{-9}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$ 또는 $10^{-12}M$ 임(즉, 수치가 $10^{-6}M$ 이하인 경우)을 의미하는 것이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 항체 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228,

XHA.05.030, XHA.05.964 또는 XHA.05.885 중 임의의 것에 대한 EphB3 에피토프와 동일한 EphB3 에피토프와 결합한다. 또 다른 구체예에서는, 항체 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 또는 XHA.05.885 중 임의의 것의 CDR을 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 포함하는 항체가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 전술한 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체, 휴먼 엔지니어링된 항체(human engineered antibody), 인간의 항체, 단일 사슬 항체 또는 항체의 단편이다.

[0014] 본 발명의 다른 구체예에서, 전술한 항체 즉, CDR 내 하나 이상의 아미노산이 다른 항-EphB3 항체의 상응하는 CDR의 상응하는 잔기에 의해 치환된 항체가 제공된다. 대표적인 구체예에서는, 전술한 항체 즉, XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 및 XHA.05.885로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체로부터 유래하는 CDR 내 하나 이상의 아미노산이, 다른 항-EphB3 항체의 상응하는 CDR의 상응하는 잔기에 의해 치환된 항체가 제공된다. 기타 대표적인 구체예에서, 전술한 항체 즉, XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 및 XHA.05.885로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체에서 유래하는 CDR 내 하나 이상의 아미노산이, XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 및 XHA.05.885로 이루어진 군으로부터 선택되는 기타 항체의 상응하는 CDR의 상응하는 잔기에 의해 치환된 항체가 제공된다. 다른 구체예에서, 전술한 항체 즉, CDR 내 1개 또는 2개의 아미노산이 변형된 항체가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 항체 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 또는 XHA.05.885의 가변 경쇄 또는 중쇄 부위에 비하여 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일하다. 또 다른 구체예에서, 전술한 항체는 인간 항체 서열의 불변 부와, 인간 항체 서열의 하나 이상의 중쇄 및 경쇄 가변 골격 부위를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 전술한 항체 즉, 인간 항체 서열이 개개의 인간 서열, 인간 공통 서열, 개개의 인간 생식세포 서열, 또는 인간 공통 생식세포 서열인 항체가 제공된다.

[0015] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 전술한 항체 즉, 중쇄 불변부가 변형 또는 비변형 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE 또는 이것들의 단편, 또는 이것들의 조합체인 항체를 제공한다. 다른 구체예에서, 항체는 EphB3와의 결합 친화도가 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} 또는 10^{-11} M 이하이다. 또 다른 구체예에서는, CDR 내에 보존적 치환이 발생한 전술한 항체가 제공된다. 또 다른 구체예에서는, 전술한 항체 즉, 저 위험도 잔기 및 중 위험도 잔기 내에 보존적 변이 또는 비보존적 변이가 일어난 항체가 제공된다. 다른 구체예에서, 전술한 항체 즉, 경쇄 불변부가 변형 또는 비변형 람다 경쇄 불변부, 카파 경쇄 불변부, 이것들의 단편 또는 이것들의 조합체인 항체가 제공된다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 전술한 항체 즉, EphB3 인산화, EphB3 올리고머화, EphB3 내재화, EphB3 분해, EphB3 신호 전달을 유도하고, 에프린B와 EphB3의 결합 및/또는 암 세포의 증식을 억제하는 항체가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 전술한 항체 즉, 폐암 세포, 난소암 세포, 식도암 세포, 결장암 세포 또는 유방암 세포의 증식을 억제하는 항체가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 전술한 항체 즉, 다른 진단제 또는 치료제와 접합된 항체가 제공된다.

[0017] 다양한 방법이 본 발명에 의하여 고려된다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 암 치료에 유용한 EphB3 단백질의 세포의 도메인에 대한 항체를 스크리닝하는 방법이 제공되는데, 이 방법은 다음과 같은 단계들을 포함한다: EphB3의 ECD를 포함하는 폴리펩티드와, 항체 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 또는 XHA.05.885의 CDR을 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상 함유하는 후보 항체를 접촉시키는 단계; 폴리펩티드에 대한 후보 항체의 결합 친화도를 측정하는 단계; 및 결합 친화도가 10^{-6} M 이상인 것으로 확인되면 상기 후보 항체는 암 치료에 유용한 항체인 것으로서 동정하는 단계. 또 다른 구체예에서는, 암 치료에 유용한 EphB3 단백질의 세포의 도메인에 대한 항체를 계통적으로(systemically) 변형시키고, 그 항체를 스크리닝하는 방법이 제공되며, 이 방법은 다음의 단계들을 포함한다: 항체 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 또는 XHA.05.885의 CDR 내 1개 또는 2개의 아미노산이 변형된 후보 항체를 제조하는 단계; EphB3의 ECD를 포함하는 폴리펩티드와 상기 후보 항체를 접촉시키는 단계; 상기 폴리펩티드에 대한 후보 항체의 결합 친화도를 측정하는 단계; 및 결합 친화도가 10^{-6} M 이상인 것으로 확인되면 상기 후보 항체는 암 치료에 유용한 항체인 것으로서 동정하는 단계.

[0018] 또 다른 구체예에서, 암 치료에 유용한 EphB3 단백질의 세포의 도메인에 대한 항체를 스크리닝하는 방법이 제공

되는데, 이 방법은 다음의 단계들을 포함한다: 항체 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 또는 XHA.05.885의 CDR을 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상 함유하는 후보 항체, 또는 하나 이상의 CDR 내 1개 또는 2개의 아미노산이 변형된 항체와, 폐 세포, 난소 세포, 식도 세포, 결장 세포 또는 유방 세포를 접촉시키는 단계; 상기 세포의 증식 또는 생존 여부를 측정하는 단계; 및 세포 증식능 또는 생존능이 감소하는 것이 확인되면 이 후보 항체는 암 치료에 유용한 항체인 것으로서 동정하는 단계.

[0019] 또 다른 구체예에서는, 전술한 항체를 치료학적 유효량만큼 투여하는 단계를 포함하는, 암이 발병한 피험체를 치료하는 방법이 제공된다. 관련 구체예에서, 상기 암은 폐암, 난소암, 식도암, 결장암 또는 유방암이다. 또 다른 구체예에서, 제2의 치료제가 투여된다. 또 다른 구체예에서, 피험체는 방사선 요법 또는 수술에 의해 추가 처치된다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 의료업계 예를 들어, 전술한 방법에 의해 암을 치료함에 있어서 사용되는 본 발명의 항체를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 암 치료용 의약품을 제조함에 있어서의 본 발명의 항체의 용도를 제공한다. 이 의약품은 제2의 치료제, 및/또는 방사선 요법과 함께 환자에게 투여될 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 방사성 핵종 또는 기타 독소에 접합된 전술한 항체를 투여하는 단계를 포함하는, EphB3을 발현하는 종양 세포를 표적화하는 방법이 제공된다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법 즉, 피험체가 포유동물인 방법이 제공된다. 또 다른 구체예에서, 상기 피험체는 인간이다.

[0021] 본 발명의 다른 구체예에서는, 전술한 항체의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자가 제공된다. 또 다른 구체예에서는, 조절 제어 서열에 작동 가능하도록 결합된 전술한 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 또 다른 구체예에서는, 전술한 벡터 또는 전술한 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 항체를 생산하기 위해 전술한 숙주 세포를 사용하는 방법이 제공되는데, 이 방법은 상기 숙주 세포를 적당한 조건 하에서 배양하는 단계 및 항체를 회수하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서는, 전술한 방법에 의해 생산된 항체가 제공된다.

[0022] 본 발명의 다른 구체예에서는, 전술한 항체 즉, 95 중량% 이상 균질하게 정제된 항체가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 전술한 항체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체를 치료학적 유효량만큼 포함하고, 상기 항체가 용기 안에 포장되어 포함되어 있는 키트가 제공되는데, 여기서, 상기 키트는 임의로 제2의 치료제를 함유하기도 하고, 또한 상기 용기에는 라벨이 부착되어 있거나 이 용기 내에 내용물이 포장되기도 하며, 상기 라벨에는 용기의 내용물이 기재되어 있고, 암 치료를 위하여 용기 내 내용물을 사용하는 방법에 관한 지시 및/또는 지침을 제공한다. 다른 구체예에서는, 전술한 키트 즉, 용기가 바이알(vial)이거나 병(bottle)이거나 프리필드 시린지(prefilled syringe)인 키트가 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 mAb-유도 EphB3 내재화/분해를 입증하는 FACS 분석 결과를 나타내는 것이다.
- 도 2는 항-EphB3 mAb이 SW620 세포 내 EphB3의 인산화를 촉진함을 나타내는 것이다.
- 도 3은 항-EphB3 항체가 낮은 항체 농도로 EphB3의 인산화를 유도함을 나타내는 것이다.
- 도 4는 항-EphB3 mAb이 EphB3의 내재화뿐만 아니라, 분해도 유도함을 나타내는 것이다.
- 도 5는 mAb의 하위 세트가 72시간 이상의 기간 동안에 EphB3 단백질의 수준을 감소시켰음을 나타내는 것이다.
- 도 6은 EphB3을 인산화함으로써, 다수의 세포주가 작동성 mAb에 반응하게 됨을 나타내는 것이다.
- 도 7은 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048 경쇄 및 중쇄에 대한 위험도 표시줄(H = 고 위험도, M = 중간 위험도, L = 저 위험도), XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048 경쇄 및 중쇄 가변 부 아미노산 서열(서열 번호 3~10), 그리고 아미노산 서열 내 CDR H1, H2 및 H3의 위치를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 EphB3-특이적 항체, 이 항체를 함유하는 약학 제형, 이와 같은 항체와 약학 제형을 제조하는 방법, 그리고 약학 제형과 화합물로 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의한 항체는 EphB3와 결합하는 특성, EphB3 인산화, EphB3 올리고머화, EphB3 내재화, EphB3 분해, EphB3 신호 전달을 유도하는 특성 및/또는, EphB3-매개성 세포-세포 부착을 조정하는 특성과 같은 바람직한 생물 활성을 나타낼 수 있다.

[0025] 하나의 구체예에서, 본 발명의 항체는 본 발명의 폴리펩티드의 작동제으로서 작용한다. 그러므로, 몇몇 구체예

에서, 본 발명의 항체는 그것이 결합하는 표적 항원의 기능(예를 들어, 표적의 기능 예를 들어, 인산화 활성화 또는 세포 내 신호 전달)을 활성화 또는 유도할 수 있다.

[0026] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 항체는 본원에 개시된 에피토프 또는 이의 일부와 결합한다. 몇몇 구체예에서, 수용체에 항체가 결합하면 수용체의 분해가 유도된다. 몇몇 구체예에서, 수용체에 항체가 결합하면 수용체의 올리고머화가 유도된다. 몇몇 구체예에서, 수용체에 항체가 결합하면 수용체의 인산화가 유도된다. 몇몇 구체예에서, 수용체에 항체가 결합하면 수용체의 활성화가 유도된다. 수용체의 활성화(즉, 신호 전달)는 당 업계에 공지된 기술에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 수용체의 활성화는, 면역 침전법 수행 후 웨스턴 블롯 분석법을 수행하여, 수용체 또는 이의 기질(예를 들어, 티로신 또는 세린/트레오닌)의 인산화를 검출함으로써 확인될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같이 리간드 활성화 또는 수용체 활성을, 항체 부재시 활성의 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상 또는 50% 이상까지 조정하는 항체가 제공된다.

[0027] 몇몇 구체예에서, EphB3 항체는 세포 내 어댑터 단백질과 EphB3의 결합을 촉진한다. 몇몇 구체예에서, EphB3 항체는 FAK, Erk/MAPK 경로, Cdc42/Rac 경로를 억제 및/또는 불활성화하고, RasGAP을 활성화하며, Abl/Arg, Fyn, Src, LMW-PTP, 인터섹틴(Intersectin), Cdc42 경로, 칼리린(Kalirin) 또는 Rac 경로를 억제 및/또는 불활성화한다. 몇몇 구체예에서, 상기 EphB3 항체는 R-ras를 불활성화하고, 신데칸(Syndecan)을 활성화한다. 몇몇 구체예에서, 상기 EphB3 항체는 R-Ras의 인산화를 주도한다.

[0028] 본원에 사용된 바와 같은 "세포 내 어댑터 단백질(intracellular adaptor protein)"이란 용어는, 신호 전달 복합체의 상이한 분절들을 연결하는 단백질을 의미한다. 상기 어댑터는 효소 활성을 가질 수 있거나 가질 수 없다. 어댑터 단백질의 예에 관하여는 당 업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, Grb2는 본래 효소 활성을 가지지 않는 어댑터 단백질인 반면에, RasGAP은 효소 활성을 가지는 어댑터 단백질이다.

[0029] 본 발명에 의한 항체는 임의로(또는 부가적으로) 암 세포 상에 발현되는 EphB3와의 결합 활성과 같은 바람직한 생물 활성을 가질 수 있으므로, 암 세포에 대한 표적 세포 독성 치료제로서 사용될 수 있다.

[0030] 시험관 내 검정법에 의해 측정되는 친화성과 효능이 큰, 몇몇 바람직한 쥐과 동물 항체 또는 키메라 항체는, 스투드니카(Studnicka와 다수)의 휴먼 엔지니어링(Human Engineering)TM 방법을 바탕으로 하여, 인간에 있어서의 면역원성이 약화되도록 변형된다. 간단히 말해서, 중쇄 및 경쇄 가변 부의 표면 노출 아미노산 잔기들은, 항원 결합 또는 단백질 폴딩(folding)에 악영향을 미치지 않을 것 같은 위치 내에 존재하는 인간 잔기들로 변형됨과 동시에, 인간 환경에서의 면역원성은 감소한다. 변형된 중쇄 및/또는 경쇄 가변 부를 암호화하는 합성 유전자를 구성하여, 이를 인간 감마 중쇄 및/또는 감마 경쇄 불변 부에 대한 암호화 서열에 결합시킨다. 임의의 인간 중쇄 및 경쇄 불변 부는 휴먼 엔지니어링된(Human Engineered)TM 항체 가변 부와 함께 사용될 수 있다. 인간의 중쇄 및 경쇄 유전자는 포유동물 세포에 도입되고, 그 결과 재조합 면역 글로불린 생성물이 생산 및 특성 규명된다.

[0031] 본 발명에 의한 예시적인 항체로서는 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048, XHA.05.337, XHA.05.200, XHA.05.111, XHA.05.005, XHA.05.228, XHA.05.030, XHA.05.964 및 XHA.05.885를 포함한다. 다음과 같은 항체-분비 하이브리도마는, 부다페스트 조약에 따라서, 미국 버지니아주 20110-2209, 매너사, 10801 유니버시티 블레바드에 소재하는 미국 모식균 배양 수집소(American Type Culture Collection; ATCC)에 2006년 8월 4일자로 기탁하였다:

| 하이브리도마 명칭 | ATCC 기탁 번호 |
|------------|------------|
| XHA.05.337 | PTA-7779 |
| XHA.05.200 | PTA-7786 |
| XHA.05.111 | PTA-7785 |
| XHA.05.005 | PTA-7782 |
| XHA.05.228 | PTA-7781 |
| XHA.05.030 | PTA-7780 |
| XHA.05.964 | PTA-7784 |
| XHA.05.885 | PTA-7783 |

[0032] 이하 정의들은 본 발명을 더욱 완벽하게 이해하는 것을 돕기 위하여 제공된 것이다.

[0034] **일반적 정의**

[0035] 본원에 사용된 표적 항원 인간 "EphB3"란, 서열 번호 2와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 가지는 인간의 폴리펩티드 및 이의 천연 생성 대립 형질 변이체를 의미하는 것이다. 본원에 사용된 "EphB3의 ECD"란, 서열 번호

2의 37~558번 아미노산에 의해 표시되는 EphB3의 세포 외 부분을 의미하는 것이다(ECD의 공표된 분류법에 관하여 전문적인 바를 참조하시오).

[0036] 본원에 사용된 "종양"이란, 모든(악성 및 양성인 경우 포함) 신생물 세포 성장 및 증식과, 모든 전암 및 암 세포 및 조직을 의미하는 것이다.

[0037] "암" 및 "암성(cancerous)"이라는 용어는, 통상적으로 조절이 안되는 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물 내 생리적 환경을 의미하거나 나타내는 것이다. 암의 예로서는 편평 세포 암종 및 소 세포 폐 암종, 식도 편평 세포 암종, 난소 투명 세포 암종, 결장 선암종, 그리고 침습성 유방 도관 암종을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] "치료"란 질환의 발생을 예방하거나 질환의 병상을 바꾸고자 수행되는 개입을 의미한다. 그러므로, "치료"란, 치료적 차원의 치료와, 예방적 차원 또는 보호적 차원의 치료 두 가지 경우를 모두 포함하는 의미이다. 치료를 필요로 하는 피험체로서는, 이미 질환이 발병한 피험체와 질환의 발생을 예방할 피험체를 포함한다. 종양(예를 들어, 암) 치료에 있어서, 치료제는 종양 세포의 병상을 직접적으로 악화시키거나, 또는 종양 세포가 기타 치료제에 의한 치료법 예를 들어, 방사선 요법 및/또는 화학 요법에 더욱 민감하도록 만들 수 있다. 질병의 임상학적, 생화학적, 방사선학적 또는 인과적 증상이 나타나는 환자를 치료하는 방법은, 이와 같은 증상들 중 일부 또는 전부를 완화하는 것, 또는 이 질병에 대한 소질을 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 암의 "병상"으로서의 환자의 건강을 악화시키는 모든 현상들을 포함한다. 그 예로서는 비정상적 또는 무제한 세포 성장, 전이, 인접 세포의 정상적인 기능의 방해, 시토킨 또는 기타 분비 생성물이 비정상적 수준으로 방출되는 것, 염증 반응 또는 면역학적 반응의 억제 또는 악화를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 종양 크기의 감소, 종양 성장률의 하강, 현존하는 종양 세포와 전이 세포의 파괴, 및/또는 전이 세포의 크기 및 수의 감소를 통하여, 치료 후 증상이 개선되었는지 여부를 파악할 수 있다.

[0039] 치료용 "포유동물"이란, 포유동물로서 분류되는 임의의 동물 예를 들어, 인간, 가축 및 농경용 가축, 그리고 동물원의 동물, 스포츠용 동물 또는 애완 동물 예를 들어, 개, 말, 고양이 및 소 등을 의미한다. 바람직하게, 포유동물은 인간이다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같이, "치료학적 유효량"이란 어구는, 본 발명의 구체예에 적당한 치료용 항체 또는 예방용 항체의 양으로서, 바람직한 치료 방식에 따라서 투여될 때, 원하는 치료 또는 예방 효과 또는 반응을 나타낼 양 예를 들어, 질병의 일부 증상 또는 모든 증상을 완화하거나 이 질병에 대한 소질을 감소시키는 양을 의미한다.

[0041] **항체**

[0042] "면역 특이적" 또는 "특이적으로 결합함"이라는 용어는, 항체가, K_a 약 $10^4 M^{-1}$ 이상, 바람직하게는 K_a 약 $10^5 M^{-1}$ 이상, 더욱 바람직하게는 K_a 약 $10^6 M^{-1}$ 이상으로, EphB3 또는 이의 ECD와 결합함을 의미한다. 항체의 표적 항원에 대한 친화도는, 기타 관련이 없는 분자들의 표적 항원에 대한 친화도에 비하여, 실질적으로 클 수 있다. 항체의 표적 항원에 대한 친화도는 또한, 동등체(ortholog) 또는 상동체의 표적 항원에 대한 친화도에 비하여, 실질적으로 클 수 있다[예를 들어, 표적 항원에 대한 상대적 친화도는 1.5배, 2배, 5배, 10배, 100배, 10^3 배, 10^4 배, 10^5 배, 10^6 배 이상일 수 있다]. 대안적으로, 항체는 공지의 상동체 또는 동등체와 교차 반응하는 것이 유용할 수 있다.

[0043] 본 발명의 항체는 또한 친화도(K_D)가 $10^{-4} M$ 이상, 바람직하게는 약 10^{-4} ~약 $10^{-12} M$ 이상, 더욱 바람직하게는 약 $10^{-5} M$, $10^{-6} M$, $10^{-7} M$ 또는 $10^{-8} M$, $10^{-9} M$, $10^{-10} M$ 또는 $10^{-11} M$ 이상인 것을 특징으로 할 수 있다. 항체에 관한 적당한 친화도는 치료 방법에 따라서 달라질 수 있다. 예를 들어, 친화도가 상당히 높은 항체는 혈액 암 치료제로서 가장 바람직할 수 있지만, 상기 친화도가 상당히 높은 항체는 고형 종양을 투과하기 어려울 수 있다. 그러므로, 친화도가 약 10^{-6} ~ $10^{-10} M$ 인 항체는 고형 종양 치료제로서 더욱 적합할 수 있다. 이러한 친화도는 종래의 기술을 예를 들어, 평형 투석 기술; 바이어코어(BIAcore) 2000 장치를 사용하는 기술(제조사에 의해 개략적으로 설명된 일반적인 방법 이용); 방사성 표지화된 표적 항원을 이용하는 방사성 면역 검정법; 또는 당 업자에게 공지된 기타 방법에 의해 용이하게 측정될 수 있다. 친화도에 관한 데이터는 예를 들어, 문헌[Scatchard와 다수, Ann N. Y. Acad. Sci., 51:660 (1949)]에 개시된 방법에 의해 분석될 수 있다.

[0044] "작용성 항체(agonist antibody)"란, 그것과 결합하는 표적 항원의 기능을 활성화 또는 유도할 수 있는 항체 분

자를 의미한다. 그러므로, "작동" 항-표적 항체는 표적의 기능 예를 들어, 인산화 활성화 또는 세포 내 신호 전달을 증가시킬 수 있는 것이다.

[0045] "항체"란 용어는, 가장 광범위한 의미로 사용되는 것으로서, 완전히 조립된 항체, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체), 항원에 결합할 수 있는 항체 단편(예를 들어, Fab', F'(ab)₂, Fv, 단일 사슬 항체, 다이아바디(diabody)), 그리고 원하는 생물 활성을 나타내는 한, 상기와 같은 것들을 포함하는 재조합 펩티드를 포함한다. 항체 단편은 재조합 DNA 기술 또는 비변형 항체의 효소적 절단법 또는 화학적 절단법에 의해 제조될 수 있으며, 이에 관하여는 이하에 자세히 기술되어 있다. 모노클로날 항체의 비 제한적인 예로서는 쥐와 동물 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 및 휴먼 엔지니어링™된 면역 글로불린, 항체, 면역 글로불린으로부터 유래하는 서열을 가지는 키메라 융합 단백질, 또는 뮤테인(mutain)이나 이의 유도체(이들 각각에 관하여는 이하에 기술되어 있음)를 포함한다. 화학적으로 유도체화된 항체를 포함하는 비변형 분자 및/또는 단편의 다량체 또는 응집체가 고려된다. 본 발명에 의한 임의의 이소타입 군 또는 하위 군에 속하는 항체가 고려된다.

[0046] 본원에 사용된 "모노클로날 항체"란 용어는, 실질적으로 상동성인 항체 군집으로부터 얻어진 항체를 의미하는 것으로서, 다시 말해서, 발생 가능한 천연 발생 돌연 변이 또는 발생 가능성이 작을 수 있는 대안적 번역 후 변형이 일어난 경우를 제외하고는 동일한, 상기 항체 군집을 비롯한 개별 항체를 의미한다. 모노클로날 항체는 매우 특이적이며; 통상적으로 상이한 결정기(에피토프)에 대해 유도되는 상이한 항체를 포함하는 종래의 (폴리클로날) 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상에 존재하는 단일의 결정기에 대해 유도된다. 이 항체의 특이성에 더하여, 모노클로날 항체는 균질한 배양액 즉, 상이한 특이성과 특성을 갖는 기타 면역 글로불린이 혼입되지 않은 배양액에 의해 합성된다는 점에서 유리하다.

[0047] 변형어인 "모노클로날(monoclonal)"이란 용어는, 실질적으로 균질한 항체 군집으로부터 얻어지는 항체의 특성을 나타내는 것으로서, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산에 요구되는 특성인 것으로 해석되지는 않는다. 예를 들어, 본 발명에 의하여 사용될 모노클로날 항체는 1975년에 최초로 콜러(Kohler) 외 다수에 의해 기술된 (Nature, 256:495) 하이브리도마 방법에 의해 생산될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 생산될 수 있다 [예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조]. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어, 재조합 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 휴먼 엔지니어링™된 항체 또는 항체의 단편일 수도 있다.

[0048] "분리된" 항체란, 그것이 존재하는 천연 환경의 구성 성분으로부터 동정 및 분리 및 회수된 항체를 의미한다. 이 항체가 존재하는 천연 환경의 오염 성분이란, 항체가 진단학적 또는 치료학적으로 사용되는 것을 방해할 물질로서, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비 단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 항체는, (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정되는 바에 의하면 항체의 95 중량% 이상, 그리고 가장 바람직하게는 99 중량% 이상으로, (2) 회전 컵 형 서열 분석기(spinning cup sequenator)을 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기들을 얻는데 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는 바람직하게는 은 염색법을 이용하여 환원 조건 또는 비 환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 확인되는 정도로, 정제될 것이다. 분리된 항체가 존재하던 천연 환경을 이루는 하나 이상의 성분은 존재하지 않을 것이므로, 상기 분리된 항체는 재조합 세포 내에 존재하는 항체를 포함한다. 그러나, 일반적으로, 분리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 생산될 것이다.

[0049] "면역 글로불린" 또는 "원래의(native) 항체"는 4량체 당 단백질이다. 천연-생성 면역 글로불린에 있어서, 각각의 4량체는 2개의 동일한 폴리펩티드 사슬 쌍으로 구성되는데, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25kDa) 및 하나의 "중쇄"(약 50~70kDa)를 갖는다. 각각의 사슬을 이루는 아미노-말단부는 약 100~110개 이상의 아미노산으로 이루어진 "가변 부"(V)(주로 항원 인지에 관여함)를 포함한다. 각 사슬의 카복시-말단부는 주로 효과기 기능에 관여하는 불변 부를 한정한다. 면역 글로불린은 이것의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서 상이한 군들로 구분될 수 있다. 중쇄는 뮤(μ), 델타(Δ), 감마(γ), 알파(α) 및 엡실론(ϵ)으로 구분되며, 항체의 이소타입을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 규정한다. 이것들 중 몇몇은 하위군 또는 이소타입 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 구분될 수 있다. 상이한 이소타입은 상이한 효과기 기능을 가지는데; 예를 들어, IgG1과 IgG3 이소타입은 항체-의존성 세포 독성(ADCC) 활성을 갖는다. 인간의 경쇄는 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄로 구분된다. 경쇄 및 중쇄 내부에 있어서, 가변 부 및 불변 부는 약 12개 이상의 아미노산으로 이루어진 "J" 부위에 의해 연결되며, 이 경우, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산으로 이루어진 "D" 부위를 포함한다. 일반적으로, 문헌[Fundamental Immunology, Ch. 7; Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)]을 참조하시오.

- [0050] 항체의 구조와 생성에 관한 보다 상세한 설명에 관하여는, 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌 [Roth, D.B., and Craig, N.L., Cell, 94:411-414 (1998)]을 참조하십시오. 간단히 말해서, 중쇄 및 경쇄 면역 글로불린 서열을 암호화하는 DNA를 생산하는 과정은 주로 발생중인 B-세포에서 진행된다. 다양한 면역 글로불린 유전자 분절들의 재배열 및 연결에 앞서서, V, D, J 분절 및 불변(C) 유전자 분절은 일반적으로 하나의 염색체 상의 비교적 인접한 위치에서 발견된다. B-세포가 분화하는 동안, V, D, J 유전자 분절(경쇄 유전자의 경우에는 V 및 J 유전자 분절에 한함)의 적절한 군의 일원들 각각 중 하나는 재조합되어, 기능상 재배열된 중쇄 및 경쇄 면역 글로불린 유전자의 가변 부를 형성한다. 이와 같은 유전자 분절 재배열 과정은 연속적으로 발생하는 것으로 파악된다. 우선, 중쇄 D-대-J 접합부가 형성된 다음, 중쇄 V-대-DJ 접합부 및 경쇄 V-대-J 접합부가 형성된다. V, D 및 J 분절의 재배열 이외에도, 경쇄 내 V 및 J 분절이 접합하는 위치와, 중쇄 내 D 및 J 분절이 접합하는 위치에서 일어나는 다양한 재조합에 의해, 면역 글로불린 중쇄 및 경쇄의 1차 레퍼토리에 추가의 변이가 발생할 수 있다. 이와 같은 경쇄 내 변이는 통상적으로 V 유전자 분절의 마지막 코돈과 J 분절의 첫 번째 코돈 내에서 발생한다. D 및 J_H 분절 사이의 중쇄 염색체가 접합할 때에도 유사한 모호성(imprecision)이 발생하는데, 이는 10개의 뉴클레오티드에 걸친 영역에까지 발생할 수 있다. 뿐만 아니라, 일부 뉴클레오티드는 계놈 DNA에 의해 암호화되지 않는, V_H 및 D 유전자 분절 사이와 D 및 J_H 유전자 분절 사이에 삽입될 수도 있다. 이와 같이 뉴클레오티드가 부가되는 것은 N-부위 다양성(N-region diversity)이라고도 알려져 있다. 가변 부 유전자 분절 내 이와 같은 재배열 현상과 이와 같은 접합시 발생할 수 있는 가변 재조합 현상의 결과로서 1차 항체 레퍼토리가 생산된다.
- [0051] "항체 단편"은 비변형 전장 항체(예를 들어, 인간 항체 포함)의 일부, 바람직하게는 비변형 항체의 항원 결합부 또는 가변 부를 포함하며, 항체 단편으로 형성된 다중 특이적 항체도 포함한다. 항체가 원하는 생물 활성을 보유하는 한, 항체 단편의 비 제한적인 예로서는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 도메인 항체(dAb), 상보성 결정 부위(CDR) 단편, 단일 사슬 항체(scFv), 단일 사슬 항체 단편, 다이아바디, 트리아바디(triobody), 테트라바디(tetrapody), 미니바디(minibody), 선형 항체(Zapata의 다수, Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995)); 킬레이트화 재조합 항체, 트리바디(tribody) 또는 바이바디(bibody), 인트라바디(intrabody), 나노바디(nanobody), 소형 모듈 면역 약품(small modular immunopharmaceutical; SMIP), 항원-결합-도메인 면역 글로불린 융합 단백질, 카멜화 항체(camelized antibody), V_H 함유 항체 또는 뮤테인 또는 이의 유도체, 그리고 폴리펩티드와 특이 항원이 결합할 수 있도록 만들기 위해 충분한 면역 글로불린의 적어도 일부분을 함유하는 폴리펩티드 예를 들어, CDR 서열을 포함한다.
- [0052] 항체를 파편인으로 분해하면, 2개의 동일한 항원-결합 단편, 즉, 각각 하나의 항원-결합 위치를 가지는 "Fab" 단편과, 나머지 "Fc" 단편(이 명칭은 35를 용이하게 결정화할 수 있는 능력을 가진 것에서 비롯됨)이 생성된다. 펩신 처리하면, 2개의 "Fv" 단편을 가지는 F(ab')₂가 생성된다. "Fv" 단편은 완전한 항원 인지 위치와 항원 결합 위치를 함유하는 최소한의 항체 단편이다. 이 부위는 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인이 비 공유 결합으로 단단하게 결합된 이량체로 이루어져 있다. 이와 같은 형태로써 각각의 가변 도메인을 이루는 3개의 CDR이 상호 작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면상 항원 결합 위치를 한정한다. 종합해서 말하면, 6개의 CDR이 항체에 항원-결합 특이성을 부여하는 것이다. 그러나, 하나의 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)조차도 항원을 인지하여 이에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0053] "단일-사슬 Fv" 또는 "sFv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는데, 여기서, 이들 도메인은 하나의 폴리펩티드 사슬내에 존재한다. 바람직하게, Fv 폴리펩티드는, V_H와 V_L 도메인 사이에, Fv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 만들어주는 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv에 관하여는 문헌[Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조하십시오.
- [0054] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 제1 불변 도메인(C_{H1})을 함유한다. Fab 단편은 항체 힌지 부(hinge region)로부터 유래하는 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 C_{H1} 도메인의 카복시 말단에 소수의 잔기들이 부가되었다는 점에서 Fab' 단편과는 상이하다. 본원에서, Fab'-SH는, 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 보유하는 Fab'를 의미한다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 Fab' 단편들 사이에 힌지 시스테인을 가지는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다.
- [0055] "초 변이(hypervariable)" 부위란 용어는, 항원-결합에 관여하는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 상기 초 변

이 부위는 "상보성 결정 부위" 또는 CDR로부터 유래하는 아미노산 잔기[즉, 경쇄 가변 도메인의 24~34번 잔기(L1), 50~56번 잔기(L2) 및 89~97번 잔기(L3)와, 중쇄 가변 도메인의 31~35번 잔기(H1), 50~65번 잔기(H2) 및 95~102번 잔기(H3)(Kabat의 다수, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))] 및/또는 초 변이 루프로부터 유래하는 잔기[즉, 경쇄 가변 도메인의 26~32번 잔기(L1), 50~52번 잔기(L2) 및 91~96번 잔기(L3)와, 중쇄 가변 도메인의 26~32번 잔기(H1), 53~55번 잔기(H2) 및 96~101번 잔기(H3)(Chothia의 다수, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))]를 포함한다.

- [0056] "골격(framework)" 잔기 또는 FR 잔기는 초 변이 부위 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.
- [0057] "불변 부"라는 어구는 효과기 기능을 부여하는 항체 분자의 일부를 의미한다.
- [0058] 본원에 사용된 "키메라 항체"라는 어구는, 통상적으로 상이한 종으로부터 유래하는 2개의 상이한 항체들로부터 유래하는 서열을 함유하는 항체를 의미한다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조). 가장 통상적으로, 키메라 항체는 인간 및 쥐와 동물의 항체 단편, 일반적으로는 인간의 불변 부와 마우스의 가변 부를 포함한다.
- [0059] "뮤테인"이란 용어는, 가변 부 또는 가변 부와 동등한 부분에 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된 항체의 폴리펩티드 서열을 의미하는데, 다만, 상기 뮤테인은 원하는 결합 친화성 또는 생물 활성을 보유한다. 뮤테인은 모 항체와 실질적으로 상동성이거나 실질적으로 동일하다.
- [0060] 본 발명의 항체와 관련하여 사용된 "유도체"란 용어는, 유비퀴틴화(ubiquitination), 치료제 또는 진단제와의 접합, 표지화(예를 들어, 방사성 핵종 또는 다양한 효소를 사용하는 표지화), 공유 중합체 부착 과정 예를 들어, 페그화(pegylation)(폴리에틸렌글리콜을 사용하는 유도체화), 및 비 천연 아미노산의 화학 합성에 의한 삽입 또는 치환과 같은 기술에 의해 공유적으로 변형된 항체를 의미한다. 본 발명의 유도체는 본 발명의 유도체화되지 않은 분자의 결합 특성을 보유할 것이다.
- [0061] 본원에 사용되는 "항체"란 용어는, 구체적으로, EphB3의 세포 외 부분에 결합하는 능력을 보유하는 다음과 같은 것들 중 어느 하나를 포함하는 의미이다:
- [0062] 1) 도 7에 제시된 아미노산 서열을 가지는 모 항체의 아미노산 뮤테인 예를 들어, 모 아미노산 서열과 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 상동성인 가변 부 중쇄 아미노산 서열을 포함하고/포함하거나, 모 아미노산 서열과 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 상동성인 가변 부 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 뮤테인[상동성 결정에 있어서 유사한 아미노산을 고려함];
- [0063] 2) 도 7에 제시된 아미노산을 가지는 모 항체의 하나 이상의 상보성 결정 부위(CDR), 바람직하게는 중쇄의 적어도 CDR3를 포함하는, 그리고 바람직하게는 2개 이상, 또는 3개 이상, 또는 4개 이상, 또는 5개 이상, 또는 6개의 CDR 전부를 포함하는 EphB3-결합 폴리펩티드;
- [0064] 3) 문헌[Studnicka의 다수, 미국 특허 제5,766,886호] 및 본원의 실시예 8에 개시된 방법에 의하여 모 서열을 변형함으로써 생산된 휴먼 엔지니어링™된 항체(저 위험도, 중 위험도 및 고 위험도 잔기를 동정하기 위하여 캐벗(Kabat)의 번호 메깅 방식에 따름)로서; 이와 같은 항체들은 다음과 같은 중쇄 중 하나 이상과, 다음과 같은 경쇄 중 하나 이상을 포함하는 것인 항체: (a) 인간의 참고 면역 글로불린 서열 내 상응하는 잔기와 상이한 저 위험도 설치류 잔기 전부가 인간 참고 면역 글로불린 서열 내 인간 잔기와 동일하도록 변형된 중쇄, 또는 (b) 저 위험도 및 중 위험도 설치류 잔기 전부가 필요에 따라서는, 인간 참고 면역 글로불린 서열 내 동일 잔기와 동일하도록 변형된 중쇄, 또는 (c) 저 위험도 잔기 전부가 필요에 따라서는, 인간 참고 면역 글로불린 서열 내 동일 잔기와 동일하도록 변형된 경쇄, 또는 (d) 저 위험도 및 중 위험도 잔기 전부가 필요에 따라서는, 인간 참고 면역 글로불린 서열 내 동일 잔기와 동일하도록 변형된 경쇄;
- [0065] 4) 원래의 설치류 경쇄와의 아미노산 서열 동일성이 60% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 그리고 가장 바람직하게는 95% 이상, 예를 들어, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100% 인 중쇄 또는 경쇄 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 부를 포함하는, 전술한 항목 3)의 항체의 뮤테인;
- [0066] 5) 설치류 항체의 하나 이상의 CDR의 고 위험도 잔기를 포함하고, 바람직하게는 2개 이상, 또는 3개 이상, 또는 4개 이상, 또는 5개 이상, 또는 6개의 CDR 전부의 고 위험도 잔기를 포함하며, 임의로는 저 위험도 또는 중 위험도 잔기에 하나 이상의 변이가 일어난 EphB3-결합 폴리펩티드로서;

- [0067] 예를 들어, 저 위험도 잔기에 하나 이상의 변이가 일어났으며, 중 위험도 잔기에는 보존적 치환이 일어난 EphB3-결합 폴리펩티드, 또는
- [0068] 예를 들어, 중 위험도 및 고 위험도 아미노산 잔기를 보유하고, 저 위험도 잔기에 하나 이상의 변이가 일어난 EphB3-결합 폴리펩티드로서,
- [0069] 여기서, 상기 변이로서는 삽입, 결실 또는 치환을 포함하고, 보존적 치환일 수 있거나, 또는 인간의 경쇄 또는 중쇄 서열, 인간의 생식 계열 경쇄 또는 중쇄 서열, 인간의 공통 경쇄 또는 중쇄 서열, 또는 인간의 공통 생식 계열 경쇄 또는 중쇄 서열과 서열이 매우 유사하도록 조작된 항체를 생산할 수 있다. 이와 같이 고려되는 변이는 또한 다음과 같은 연속적 방식으로 디스플레이될 수도 있다. AKKLVHTPYSFKEDF의 가정 서열에 있어서, 문헌 [Studnicka의 다수, 미국 특허 제5,766,886호]에 따라 각각의 잔기에 할당된 각각의 위험도가 HMLHMLHMLHMLHML(H = 고, M = 중, L = 저)일 경우, 가정 서열의 저 위험도 잔기에 대한 예시적인 변이는 AKXLVXTPXSFEXDX[여기서, X는 임의의 아미노산이거나, 또는 X는 상기 위치에서의 원래 잔기의 보존적 치환임]와 같이 표시될 수 있으며: 저 위험도 잔기 및 중 위험도 잔기에 대한 예시적인 변이도 유사하게, 예를 들어, AYLXYTYXSYXEYX[여기서, X는 임의의 아미노산이며, Y는 상기 위치에서의 원래 잔기의 보존적 치환임]와 같이 표시될 수 있다.
- [0070] "경쟁 항체(competing antibody)"라는 용어로서는 다음의 것들을 포함한다:
- [0071] 1) 예를 들어, X-선 결정 분석법을 통하여 측정하였을 때, 쥐과 동물 항체 XHA.05.465, XHA.05.783, XHA.05.031, XHA.05.942, XHA.05.751, XHA.05.599, XPA.04.031, XPA.04.030, XPA.04.040, XHA.05.119, XHA.05.228, XHA.05.337, XHA.05.440, XPA.04.022, XHA.05.964, XHA.05.653, XHA.05.885, XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.036, XPA.04.046, XPA.04.048, XHA.05.660, XHA.05.552, XHA.05.949, XHA.05.151, XPA.04.019, XHA.05.676, XHA.05.030, XHA.05.200, XHA.05.005, XHA.05.001, XHA.05.888 또는 XHA.05.111에 대한 EphB3 에피토프와 동일한 EphB3의 에피토프와 결합하는 비-쥐과 동물 또는 비-설치류 모노클로날 항체; 및
- [0072] 2) 쥐과 동물 항체 XHA.05.465, XHA.05.783, XHA.05.031, XHA.05.942, XHA.05.751, XHA.05.599, XPA.04.031, XPA.04.030, XPA.04.040, XHA.05.119, XHA.05.228, XHA.05.337, XHA.05.440, XPA.04.022, XHA.05.964, XHA.05.653, XHA.05.885, XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.036, XPA.04.046, XPA.04.048, XHA.05.660, XHA.05.552, XHA.05.949, XHA.05.151, XPA.04.019, XHA.05.676, XHA.05.030, XHA.05.200, XHA.05.005, XHA.05.001, XHA.05.888 또는 XHA.05.111과, 75% 이상, 80% 이상, 또는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95% 이상으로 경쟁하는 비-쥐과 동물 또는 비-설치류 모노클로날 항체.
- [0073] 본 발명의 항체는 바람직하게 친화도 K_D 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M 이상, 또는 10^{-11} M 이하로 EphB3의 ECD와 결합하며, 바람직하게는 수용체 인산화, 올리고머화, 내재화, 분해, 신호 전달 및/또는 EphB3-매개 세포-세포 부착 과정을 유도한다.
- [0074] 또는, 본원의 출원일 이전에 공중에 공개되었거나 본원의 출원일 이전에 출원된 출원에 개시된 임의의 키메라 항체, 인간 항체 또는 인간화된 항체는 본 발명의 범위로 부터 배제된다.
- [0075] "비-설치류" 모노클로날 항체는 본원에서 광범위하게 정의하였을 때, 설치류 하이브리도마에 의해 생산된 완전한 비변형 설치류 모노클로날 항체가 아닌 임의의 항체이다. 그러므로, 비-설치류 항체는 특히, 설치류 항체의 뮤테인, 설치류 항체 단편, 선형 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 휴먼 엔지니어링™된 항체 및 인간 항체 예를 들어, 유전자 이식 동물로부터 생산되거나 파지 디스플레이 기술(phage display technology)을 통하여 생산된 인간 항체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이와 유사하게, 비-쥐과 동물 항체로서는 쥐과 동물 항체, 쥐과 동물 항체 단편, 선형 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 휴먼 엔지니어링™된 항체 및 인간 항체의 뮤테인을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] **표적 항원**
- [0077] 항체의 생산에 사용될 표적 항원은 예를 들어, 원하는 에피토프를 보유하고, 임의로는 에피토프가 그것의 원래 형태대로 디스플레이될 수 있도록 만들어주는 다른 폴리펩티드에 융합된, EphB3의 세포 외 부분, 또는 이의 단편일 수 있다. 대안적으로, 세포 표면에 발현된 비변형 EphB3도 항체를 생산하는데 사용될 수 있다. 이와 같은 세포들은 EphB3을 발현하도록 형질 전환될 수 있거나 또는 EphB3을 발현하는 기타 천연 생성 세포일 수 있다.

항체를 생산하는데 유용한 EphB3 폴리펩티드의 기타 형태는 당 업자에게 명백할 것이다.

[0078] 하나의 구체예에서, 본 발명의 항체는 EphB3의 에피토프와 결합하는데, 여기서, 상기 에피토프는 표 1에 제시된 서열 번호 11~421로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 구체예에서, 상기 도메인은 리간드 결합 도메인(서열 번호 2의 39~212번 아미노산 잔기), TNFR 도메인(서열 번호 2의 256~331번 아미노산 잔기), 제1 피브로넥틴 도메인(서열 번호 2의 340~435번 아미노산 잔기), 그리고 제2 피브로넥틴 도메인(서열 번호 2의 453~535번 아미노산 잔기)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 항체는 EphB3의 리간드 결합 도메인의 에피토프 즉, 서열 번호 11~145로 이루어진 군으로부터 선택된 에피토프에 결합한다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 항체는 EphB3의 TNFR 도메인의 에피토프 즉, 서열 번호 161~259로 이루어진 군으로부터 선택되는 에피토프에 결합한다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 항체는 EphB3의 제1 피브로넥틴 도메인의 에피토프 즉, 서열 번호 259~301로 이루어진 군으로부터 선택되는 에피토프에 결합한다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 항체는 EphB3의 제2 피브로넥틴 도메인의 에피토프 즉, 서열 번호 380~421로 이루어진 군으로부터 선택되는 에피토프에 결합한다.

[0079] 이하 표 1은 항 EphB3 항체에 의해 인지되기에 적합한 선형 에피토프인 것으로 확인된 EphB3의 부위들(서열 번호 2)을 제공한다.

[0080] [표 1a]

| 맵핑된부위 (aa) | 에피토프 길이 | 에피토프 | aa 서열상 위치 | 에피토프 # | 서열 번호 |
|------------|---------|------------|-----------|--------|-------|
| 98-115 | 8 | WRRDVQRV | 98-105 | 1 | 11 |
| 98-115 | 8 | RRDVQRVY | 99-106 | 2 | 12 |
| 98-115 | 8 | RDVQRVYV | 100-107 | 3 | 13 |
| 98-115 | 8 | DVQRVYVE | 101-108 | 4 | 14 |
| 98-115 | 8 | VQRVYVEL | 102-109 | 5 | 15 |
| 98-115 | 8 | QRVYVELK | 103-110 | 6 | 16 |
| 98-115 | 8 | RVYVELKF | 104-111 | 7 | 17 |
| 98-115 | 8 | VYVELKFT | 105-112 | 8 | 18 |
| 98-115 | 8 | YVELKFTV | 106-113 | 9 | 19 |
| 98-115 | 8 | VELKFTVR | 107-114 | 10 | 20 |
| 98-115 | 8 | ELKFTVRD | 108-115 | 11 | 21 |
| 98-115 | 9 | WRRDVQRVY | 98-106 | 12 | 22 |
| 98-115 | 9 | RRDVQRVYV | 99-107 | 13 | 23 |
| 98-115 | 9 | RDVQRVYVE | 100-108 | 14 | 24 |
| 98-115 | 9 | DVQRVYVEL | 101-109 | 15 | 25 |
| 98-115 | 9 | VQRVYVELK | 102-110 | 16 | 26 |
| 98-115 | 9 | QRVYVELKF | 103-111 | 17 | 27 |
| 98-115 | 9 | RVYVELKFT | 104-112 | 18 | 28 |
| 98-115 | 9 | VYVELKFTV | 105-113 | 19 | 29 |
| 98-115 | 9 | YVELKFTVR | 106-114 | 20 | 30 |
| 98-115 | 9 | VELKFTVRD | 107-115 | 21 | 31 |
| 98-115 | 10 | WRRDVQRVYV | 98-107 | 22 | 32 |
| 98-115 | 10 | RRDVQRVYVE | 99-108 | 23 | 33 |
| 98-115 | 10 | RDVQRVYVEL | 100-109 | 24 | 34 |
| 98-115 | 10 | DVQRVYVELK | 101-110 | 25 | 35 |
| 98-115 | 10 | VQRVYVELKF | 102-111 | 26 | 36 |
| 98-115 | 10 | QRVYVELKFT | 103-112 | 27 | 37 |
| 98-115 | 10 | RVYVELKFTV | 104-113 | 28 | 38 |
| 98-115 | 10 | VYVELKFTVR | 105-114 | 29 | 39 |
| 98-115 | 10 | YVELKFTVRD | 106-115 | 30 | 40 |
| 152-194 | 8 | NPYVKVDT | 152-159 | 1 | 41 |
| 152-194 | 8 | PYVKVDTI | 153-160 | 2 | 42 |
| 152-194 | 8 | YVKVDTIA | 154-161 | 3 | 43 |
| 152-194 | 8 | VKVDTIAP | 155-162 | 4 | 44 |
| 152-194 | 8 | KVDTIAPD | 156-163 | 5 | 45 |
| 152-194 | 8 | VDTIAPDE | 157-164 | 6 | 46 |
| 152-194 | 8 | DTIAPDES | 158-165 | 7 | 47 |
| 152-194 | 8 | TIAPDESF | 159-166 | 8 | 48 |
| 152-194 | 8 | IAPDESFS | 160-167 | 9 | 49 |
| 152-194 | 8 | APDESFSR | 161-168 | 10 | 50 |
| 152-194 | 8 | PDESFSRL | 162-169 | 11 | 51 |
| 152-194 | 8 | DESFSRLD | 163-170 | 12 | 52 |
| 152-194 | 8 | SFSRLDA | 164-171 | 13 | 53 |
| 152-194 | 8 | SFSRLDAG | 165-172 | 14 | 54 |
| 152-194 | 8 | FSRLDAGR | 166-173 | 15 | 55 |
| 152-194 | 8 | SRLDAGR | 167-174 | 16 | 56 |
| 152-194 | 8 | RLDAGR | 168-175 | 17 | 57 |
| 152-194 | 8 | LDAGR | 169-176 | 18 | 58 |
| 152-194 | 8 | DAGR | 170-177 | 19 | 59 |

[0081]

[0082]

[표 1b]

| 맵핑된부위 (aa) | 에피토프 길이 | 에피토프 | aa 서열상 위치 | 에피토프 # | 서열 번호 |
|---------------|------------|-----------|-----------|--------|-------|
| 152-194 | 8 량체 | AGRVNTKV | 171-178 | 20 | 60 |
| 152-194 | 8 량체 | GRVNTKVR | 172-179 | 21 | 61 |
| 152-194 | 8 량체 | RVNTKVRS | 173-180 | 22 | 62 |
| 152-194 | 8 량체 | VNTKVRSF | 174-181 | 23 | 63 |
| 152-194 | 8 량체 | NTKVRSPG | 175-182 | 24 | 64 |
| 152-194 | 8 량체 | TKVRSPGP | 176-183 | 25 | 65 |
| 152-194 | 8 량체 | KVRSPGPL | 177-184 | 26 | 66 |
| 152-194 | 8 량체 | VRSFGPLS | 178-185 | 27 | 67 |
| 152-194 | 8 량체 | RSFGPLSK | 179-186 | 28 | 68 |
| 152-194 | 8 량체 | SFGPLSKA | 180-187 | 29 | 69 |
| 152-194 | 8 량체 | FGPLSKAG | 181-188 | 30 | 70 |
| 152-194 | 8 량체 | GPLSKAGF | 182-189 | 31 | 71 |
| 152-194 | 8 량체 | PLSKAGFY | 183-190 | 32 | 72 |
| 152-194 | 8 량체 | LSKAGFYL | 184-191 | 33 | 73 |
| 152-194 | 8 량체 | SKAGFYLA | 185-192 | 34 | 74 |
| 152-194 | 8 량체 | KAGFYLAF | 186-193 | 35 | 75 |
| 152-194 | 8 량체 | AGFYLAFO | 187-194 | 36 | 76 |
| 152-194 | 9 량체 | NPYVKVDTI | 152-160 | 37 | 77 |
| 152-194 | 9 량체 | PYVKVDTIA | 153-161 | 38 | 78 |
| 152-194 | 9 량체 | YVKVDTIAP | 154-162 | 39 | 79 |
| 152-194 | 9 량체 | VKVDTIAPD | 155-163 | 40 | 80 |
| 152-194 | 9 량체 | KVDTIAPDE | 156-164 | 41 | 81 |
| 152-194 | 9 량체 | VDTIAPDES | 157-165 | 42 | 82 |
| 152-194 | 9 량체 | DTIAPDESF | 158-166 | 43 | 83 |
| 152-194 | 9 량체 | TIAPDESFS | 159-167 | 44 | 84 |
| 152-194 | 9 량체 | IAPDESFSR | 160-168 | 45 | 85 |
| 152-194 | 9 량체 | APDESFSRL | 161-169 | 46 | 86 |
| 152-194 | 9 량체 | PDESFSRLD | 162-170 | 47 | 87 |
| 152-194 | 9 량체 | DESFSRLDA | 163-171 | 48 | 88 |
| 152-194 | 9 량체 | ESFSRLDAG | 164-172 | 49 | 89 |
| 152-194 | 9 량체 | SFSRLDAGR | 165-173 | 50 | 90 |
| 152-194 | 9 량체 | FSRLDAGRV | 166-174 | 51 | 91 |
| 152-194 | 9 량체 | SRLDAGRNV | 167-175 | 52 | 92 |
| 152-194 | 9 량체 | RLDAGRNVN | 168-176 | 53 | 93 |
| 152-194 | 9 량체 | LDAGRNVTK | 169-177 | 54 | 94 |
| 152-194 | 9 량체 | DAGRNVTKV | 170-178 | 55 | 95 |
| 152-194 | 9 량체 | AGRVNTKVR | 171-179 | 56 | 96 |
| 152-194 | 9 량체 | GRVNTKVRS | 172-180 | 57 | 97 |
| 152-194 | 9 량체 | RVNTKVRSF | 173-181 | 58 | 98 |
| 152-194 | 9 량체 | VNTKVRSPG | 174-182 | 59 | 99 |
| 152-194 | 9 량체 | NTKVRSPGP | 175-183 | 60 | 100 |
| 152-194 | 9 량체 | TKVRSPGPL | 176-184 | 61 | 101 |
| 152-194 | 9 량체 | KVRSPGPLS | 177-185 | 62 | 102 |
| 152-194 | 9 량체 | VRSFGPLSK | 178-186 | 63 | 103 |
| 152-194 | 9 량체 | RSFGPLSKA | 179-187 | 64 | 104 |
| 152-194 | 9 량체 | SFGPLSKAG | 180-188 | 65 | 105 |
| 152-194 | 9 량체 | FGPLSKAGF | 181-189 | 66 | 106 |
| 152-194 | 9 량체 | GPLSKAGFY | 182-190 | 67 | 107 |
| 152-194 | 9 량체 | PLSKAGFYL | 183-191 | 68 | 108 |
| 152-194 | 9 량체 | LSKAGFYLA | 184-192 | 69 | 109 |

[0083]

[0084]

[표 1c]

| 맵핑된부위 (aa) | 에피토프 길이 | 에피토프 | aa 서열상 위치 | 에피토프 # | 서열 번호 |
|------------|---------|-------------|-----------|--------|-------|
| 152-194 | 9 량체 | SKAGFYLAF | 185-193 | 70 | 110 |
| 152-194 | 9 량체 | KAGFYLAFQ | 186-194 | 71 | 111 |
| 152-194 | 10 량체 | NPYVKVDTIA | 152-161 | 72 | 112 |
| 152-194 | 10 량체 | PYVKVDTIAP | 153-162 | 73 | 113 |
| 152-194 | 10 량체 | YVKVDTIAPD | 154-163 | 74 | 114 |
| 152-194 | 10 량체 | VKVDTIAPDE | 155-164 | 75 | 115 |
| 152-194 | 10 량체 | KVDTIAPDES | 156-165 | 76 | 116 |
| 152-194 | 10 량체 | VDTIAPDESF | 157-166 | 77 | 117 |
| 152-194 | 10 량체 | DTIAPDESFS | 158-167 | 78 | 118 |
| 152-194 | 10 량체 | TIAPDESFSR | 159-168 | 79 | 119 |
| 152-194 | 10 량체 | IAPDESFSRL | 160-169 | 80 | 120 |
| 152-194 | 10 량체 | APDESFSRLD | 161-170 | 81 | 121 |
| 152-194 | 10 량체 | PDESFSRLDA | 162-171 | 82 | 122 |
| 152-194 | 10 량체 | DESFSRLDAG | 163-172 | 83 | 123 |
| 152-194 | 10 량체 | ESFSRLDAGR | 164-173 | 84 | 124 |
| 152-194 | 10 량체 | SFSRLDAGRV | 165-174 | 85 | 125 |
| 152-194 | 10 량체 | FSRLDAGRNV | 166-175 | 86 | 126 |
| 152-194 | 10 량체 | SRLDAGRNVNT | 167-176 | 87 | 127 |
| 152-194 | 10 량체 | RLDAGRNVNTK | 168-177 | 88 | 128 |
| 152-194 | 10 량체 | LDAGRNVNTKV | 169-178 | 89 | 129 |
| 152-194 | 10 량체 | DAGRNVNTKVR | 170-179 | 90 | 130 |
| 152-194 | 10 량체 | AGRNVNTKVR | 171-180 | 91 | 131 |
| 152-194 | 10 량체 | GRNVNTKVRSF | 172-181 | 92 | 132 |
| 152-194 | 10 량체 | RNVNTKVRSF | 173-182 | 93 | 133 |
| 152-194 | 10 량체 | VNTKVRSF | 174-183 | 94 | 134 |
| 152-194 | 10 량체 | NTKVRSF | 175-184 | 95 | 135 |
| 152-194 | 10 량체 | TKVRSF | 176-185 | 96 | 136 |
| 152-194 | 10 량체 | KVRSF | 177-186 | 97 | 137 |
| 152-194 | 10 량체 | VRSF | 178-187 | 98 | 138 |
| 152-194 | 10 량체 | RSF | 179-188 | 99 | 139 |
| 152-194 | 10 량체 | SF | 180-189 | 100 | 140 |
| 152-194 | 10 량체 | FGPLSKAGFY | 181-190 | 101 | 141 |
| 152-194 | 10 량체 | GPLSKAGFY | 182-191 | 102 | 142 |
| 152-194 | 10 량체 | PLSKAGFYLA | 183-192 | 103 | 143 |
| 152-194 | 10 량체 | LSKAGFYLAF | 184-193 | 104 | 144 |
| 152-194 | 10 량체 | SKAGFYLAFQ | 185-194 | 105 | 145 |
| 244-256 | 8 량체 | NAVEVSVPL | 244-251 | 1 | 146 |
| 244-256 | 8 량체 | AVEVSVPL | 245-252 | 2 | 147 |
| 244-256 | 8 량체 | VEVSVPLK | 246-253 | 3 | 148 |
| 244-256 | 8 량체 | EVSVPLKL | 247-254 | 4 | 149 |
| 244-256 | 8 량체 | VSVPLKLY | 248-255 | 5 | 150 |
| 244-256 | 8 량체 | SVPLKLYC | 249-256 | 6 | 151 |
| 244-256 | 9 량체 | NAVEVSVPL | 244-252 | 7 | 152 |
| 244-256 | 9 량체 | AVEVSVPLK | 245-253 | 8 | 153 |
| 244-256 | 9 량체 | VEVSVPLKL | 246-254 | 9 | 154 |
| 244-256 | 9 량체 | EVSVPLKLY | 247-255 | 10 | 155 |
| 244-256 | 9 량체 | VSVPLKLYC | 248-256 | 11 | 156 |
| 244-256 | 10 량체 | NAVEVSVPLK | 244-253 | 12 | 157 |
| 244-256 | 10 량체 | AVEVSVPLKL | 245-254 | 13 | 158 |
| 244-256 | 10 량체 | VEVSVPLKLY | 246-255 | 14 | 159 |

[0085]

[0086] [표 1d]

| 맵핑된부위 (aa) | 에피토프 길이 | 에피토프 | aa 서열상 위치 | 에피토프 # | 서열 번호 |
|---------------|------------|------------|-----------|--------|-------|
| 244-256 | 10 량체 | EVSVPLKLYC | 247-256 | 15 | 160 |
| 274-298 | 8 량체 | GHEPAAKE | 274-281 | 1 | 161 |
| 274-298 | 8 량체 | HEPAAKES | 275-282 | 2 | 162 |
| 274-298 | 8 량체 | EPAAKESQ | 276-283 | 3 | 163 |
| 274-298 | 8 량체 | PAAKESQC | 277-284 | 4 | 164 |
| 274-298 | 8 량체 | AAKESQCR | 278-285 | 5 | 165 |
| 274-298 | 8 량체 | AKESQCRP | 279-286 | 6 | 166 |
| 274-298 | 8 량체 | KESQCRPC | 280-287 | 7 | 167 |
| 274-298 | 8 량체 | ESQCRPCP | 281-288 | 8 | 168 |
| 274-298 | 8 량체 | SQCRPCPP | 282-289 | 9 | 169 |
| 274-298 | 8 량체 | QCRPCPPG | 283-290 | 10 | 170 |
| 274-298 | 8 량체 | CRPCPPGS | 284-291 | 11 | 171 |
| 274-298 | 8 량체 | RPCPPGSY | 285-292 | 12 | 172 |
| 274-298 | 8 량체 | PCPPGSYK | 286-293 | 13 | 173 |
| 274-298 | 8 량체 | CPPGSYKA | 287-294 | 14 | 174 |
| 274-298 | 8 량체 | PPGSYKAK | 288-295 | 15 | 175 |
| 274-298 | 8 량체 | PGSYKAKQ | 289-296 | 16 | 176 |
| 274-298 | 8 량체 | GSYKAKQG | 290-297 | 17 | 177 |
| 274-298 | 8 량체 | SYKAKQGE | 291-298 | 18 | 178 |
| 274-298 | 9 량체 | GHEPAAKES | 274-282 | 19 | 179 |
| 274-298 | 9 량체 | HEPAAKESQ | 275-283 | 20 | 180 |
| 274-298 | 9 량체 | EPAAKESQC | 276-284 | 21 | 181 |
| 274-298 | 9 량체 | PAAKESQCR | 277-285 | 22 | 182 |
| 274-298 | 9 량체 | AAKESQCRP | 278-286 | 23 | 183 |
| 274-298 | 9 량체 | AKESQCRPC | 279-287 | 24 | 184 |
| 274-298 | 9 량체 | KESQCRPCP | 280-288 | 25 | 185 |
| 274-298 | 9 량체 | ESQCRPCPP | 281-289 | 26 | 186 |
| 274-298 | 9 량체 | SQCRPCPPG | 282-290 | 27 | 187 |
| 274-298 | 9 량체 | QCRPCPPGS | 283-291 | 28 | 188 |
| 274-298 | 9 량체 | CRPCPPGSY | 284-292 | 29 | 189 |
| 274-298 | 9 량체 | RPCPPGSYK | 285-293 | 30 | 190 |
| 274-298 | 9 량체 | PCPPGSYKA | 286-294 | 31 | 191 |
| 274-298 | 9 량체 | CPPGSYKAK | 287-295 | 32 | 192 |
| 274-298 | 9 량체 | PPGSYKAKQ | 288-296 | 33 | 193 |
| 274-298 | 9 량체 | PGSYKAKQG | 289-297 | 34 | 194 |
| 274-298 | 9 량체 | GSYKAKQGE | 290-298 | 35 | 195 |
| 274-298 | 10 량체 | GHEPAAKESQ | 274-283 | 36 | 196 |
| 274-298 | 10 량체 | HEPAAKESQC | 275-284 | 37 | 197 |
| 274-298 | 10 량체 | EPAAKESQCR | 276-285 | 38 | 198 |
| 274-298 | 10 량체 | PAAKESQCRP | 277-286 | 39 | 199 |
| 274-298 | 10 량체 | AAKESQCRPC | 278-287 | 40 | 200 |
| 274-298 | 10 량체 | AKESQCRPCP | 279-288 | 41 | 201 |
| 274-298 | 10 량체 | KESQCRPCPP | 280-289 | 42 | 202 |
| 274-298 | 10 량체 | ESQCRPCPPG | 281-290 | 43 | 203 |
| 274-298 | 10 량체 | SQCRPCPPGS | 282-291 | 44 | 204 |
| 274-298 | 10 량체 | QCRPCPPGSY | 283-292 | 45 | 205 |
| 274-298 | 10 량체 | CRPCPPGSYK | 284-293 | 46 | 206 |
| 274-298 | 10 량체 | RPCPPGSYKA | 285-294 | 47 | 207 |
| 274-298 | 10 량체 | PCPPGSYKAK | 286-295 | 48 | 208 |
| 274-298 | 10 량체 | CPPGSYKAKQ | 287-296 | 49 | 209 |

[0087]

[0088]

[표 1e]

| 맵핑된부위 (aa) | 에피토프 길이 | 에피토프 | aa 서열상 위치 | 에피토프 # | 서열 번호 |
|---------------|------------|------------|-----------|--------|-------|
| 274-298 | 10 량체 | PPGSYKAKQG | 288-297 | 50 | 210 |
| 274-298 | 10 량체 | PGSYKAKQGE | 289-298 | 51 | 211 |
| 313-336 | 8 량체 | PAASICTC | 313-320 | 1 | 212 |
| 313-336 | 8 량체 | AASICTCH | 314-321 | 2 | 213 |
| 313-336 | 8 량체 | ASICTCHN | 315-322 | 3 | 214 |
| 313-336 | 8 량체 | SICTCHNN | 316-323 | 4 | 215 |
| 313-336 | 8 량체 | ICTCHNNF | 317-324 | 5 | 216 |
| 313-336 | 8 량체 | CTCHNNFY | 318-325 | 6 | 217 |
| 313-336 | 8 량체 | TCHNNFYR | 319-326 | 7 | 218 |
| 313-336 | 8 량체 | CHNNFYRA | 320-327 | 8 | 219 |
| 313-336 | 8 량체 | HNNFYRAD | 321-328 | 9 | 220 |
| 313-336 | 8 량체 | NNFYRADS | 322-329 | 10 | 221 |
| 313-336 | 8 량체 | NFYRADSD | 323-330 | 11 | 222 |
| 313-336 | 8 량체 | FYRADSDS | 324-331 | 12 | 223 |
| 313-336 | 8 량체 | YRADSDSA | 325-332 | 13 | 224 |
| 313-336 | 8 량체 | RADSDSAD | 326-333 | 14 | 225 |
| 313-336 | 8 량체 | ADSDSADS | 327-334 | 15 | 226 |
| 313-336 | 8 량체 | DSDSADSA | 328-335 | 16 | 227 |
| 313-336 | 8 량체 | SDSADSAC | 329-336 | 17 | 228 |
| 313-336 | 9 량체 | PAASICTCH | 313-321 | 18 | 229 |
| 313-336 | 9 량체 | AASICTCHN | 314-322 | 19 | 230 |
| 313-336 | 9 량체 | ASICTCHNN | 315-323 | 20 | 231 |
| 313-336 | 9 량체 | SICTCHNNF | 316-324 | 21 | 232 |
| 313-336 | 9 량체 | ICTCHNNFY | 317-325 | 22 | 233 |
| 313-336 | 9 량체 | CTCHNNFYR | 318-326 | 23 | 234 |
| 313-336 | 9 량체 | TCHNNFYRA | 319-327 | 24 | 235 |
| 313-336 | 9 량체 | CHNNFYRAD | 320-328 | 25 | 236 |
| 313-336 | 9 량체 | HNNFYRADS | 321-329 | 26 | 237 |
| 313-336 | 9 량체 | NNFYRADSD | 322-330 | 27 | 238 |
| 313-336 | 9 량체 | NFYRADSDS | 323-331 | 28 | 239 |
| 313-336 | 9 량체 | FYRADSDSA | 324-332 | 29 | 240 |
| 313-336 | 9 량체 | YRADSDSAD | 325-333 | 30 | 241 |
| 313-336 | 9 량체 | RADSDSADS | 326-334 | 31 | 242 |
| 313-336 | 9 량체 | ADSDSADSA | 327-335 | 32 | 243 |
| 313-336 | 9 량체 | DSDSADSAC | 328-336 | 33 | 244 |
| 313-336 | 10 량체 | PAASICTCHN | 313-322 | 34 | 245 |
| 313-336 | 10 량체 | AASICTCHNN | 314-323 | 35 | 246 |
| 313-336 | 10 량체 | ASICTCHNNF | 315-324 | 36 | 247 |
| 313-336 | 10 량체 | SICTCHNNFY | 316-325 | 37 | 248 |
| 313-336 | 10 량체 | ICTCHNNFYR | 317-326 | 38 | 249 |
| 313-336 | 10 량체 | CTCHNNFYRA | 318-327 | 39 | 250 |
| 313-336 | 10 량체 | TCHNNFYRAD | 319-328 | 40 | 251 |
| 313-336 | 10 량체 | CHNNFYRADS | 320-329 | 41 | 252 |
| 313-336 | 10 량체 | HNNFYRADSD | 321-330 | 42 | 253 |
| 313-336 | 10 량체 | NNFYRADSDS | 322-331 | 43 | 254 |
| 313-336 | 10 량체 | NFYRADSDSA | 323-332 | 44 | 255 |
| 313-336 | 10 량체 | FYRADSDSAD | 324-333 | 45 | 256 |
| 313-336 | 10 량체 | YRADSDSADS | 325-334 | 46 | 257 |
| 313-336 | 10 량체 | RADSDSADSA | 326-335 | 47 | 258 |
| 313-336 | 10 량체 | ADSDSADSAC | 327-336 | 48 | 259 |

[0089]

[0090] [표 1f]

| 맵핑된부위 (aa) | 에피토프 길이 | 에피토프 | aa 서열상 위치 | 에피토프 # | 서열 번호 |
|---------------|------------|------------|-----------|--------|-------|
| 362-383 | 8 량체 | PRDLGGRD | 362-369 | 1 | 260 |
| 362-383 | 8 량체 | RDLGGRDD | 363-370 | 2 | 261 |
| 362-383 | 8 량체 | DLGGRDDL | 364-371 | 3 | 262 |
| 362-383 | 8 량체 | LGGRDDLL | 365-372 | 4 | 263 |
| 362-383 | 8 량체 | GGRDDLLY | 366-373 | 5 | 264 |
| 362-383 | 8 량체 | GRDDLLYN | 367-374 | 6 | 265 |
| 362-383 | 8 량체 | RDDLLYNV | 368-375 | 7 | 266 |
| 362-383 | 8 량체 | DDLLYNVI | 369-376 | 8 | 267 |
| 362-383 | 8 량체 | DLLYNVIC | 370-377 | 9 | 268 |
| 362-383 | 8 량체 | LLYNVICK | 371-378 | 10 | 269 |
| 362-383 | 8 량체 | LYNVICKK | 372-379 | 11 | 270 |
| 362-383 | 8 량체 | YNVICKKC | 373-380 | 12 | 271 |
| 362-383 | 8 량체 | NVICKKCH | 374-381 | 13 | 272 |
| 362-383 | 8 량체 | VICKKCHG | 375-382 | 14 | 273 |
| 362-383 | 8 량체 | ICKKCHGA | 376-383 | 15 | 274 |
| 362-383 | 9 량체 | PRDLGGRDD | 362-370 | 16 | 275 |
| 362-383 | 9 량체 | RDLGGRDDL | 363-371 | 17 | 276 |
| 362-383 | 9 량체 | DLGGRDDLL | 364-372 | 18 | 277 |
| 362-383 | 9 량체 | LGGRDDLLY | 365-373 | 19 | 278 |
| 362-383 | 9 량체 | GGRDDLLYN | 366-374 | 20 | 279 |
| 362-383 | 9 량체 | GRDDLLYNV | 367-375 | 21 | 280 |
| 362-383 | 9 량체 | RDDLLYNVI | 368-376 | 22 | 281 |
| 362-383 | 9 량체 | DDLLYNVIC | 369-377 | 23 | 282 |
| 362-383 | 9 량체 | DLLYNVICK | 370-378 | 24 | 283 |
| 362-383 | 9 량체 | LLYNVICKK | 371-379 | 25 | 284 |
| 362-383 | 9 량체 | LYNVICKKC | 372-380 | 26 | 285 |
| 362-383 | 9 량체 | YNVICKKCH | 373-381 | 27 | 286 |
| 362-383 | 9 량체 | NVICKKCHG | 374-382 | 28 | 287 |
| 362-383 | 9 량체 | VICKKCHGA | 375-383 | 29 | 288 |
| 362-383 | 10 량체 | PRDLGGRDDL | 362-371 | 30 | 289 |
| 362-383 | 10 량체 | RDLGGRDDLL | 363-372 | 31 | 290 |
| 362-383 | 10 량체 | DLGGRDDLLY | 364-373 | 32 | 291 |
| 362-383 | 10 량체 | LGGRDDLLYN | 365-374 | 33 | 292 |
| 362-383 | 10 량체 | GGRDDLLYNV | 366-375 | 34 | 293 |
| 362-383 | 10 량체 | GRDDLLYNVI | 367-376 | 35 | 294 |
| 362-383 | 10 량체 | RDDLLYNVIC | 368-377 | 36 | 295 |
| 362-383 | 10 량체 | DDLLYNVICK | 369-378 | 37 | 296 |
| 362-383 | 10 량체 | DLLYNVICKK | 370-379 | 38 | 297 |
| 362-383 | 10 량체 | LLYNVICKKC | 371-380 | 39 | 298 |
| 362-383 | 10 량체 | LYNVICKKCH | 372-381 | 40 | 299 |
| 362-383 | 10 량체 | YNVICKKCHG | 373-382 | 41 | 300 |
| 362-383 | 10 량체 | NVICKKCHGA | 374-383 | 42 | 301 |
| 436-469 | 8 량체 | PLPPRYAA | 436-443 | 1 | 302 |
| 436-469 | 8 량체 | LPPRYAAV | 437-444 | 2 | 303 |
| 436-469 | 8 량체 | PPRYAAVN | 438-445 | 3 | 304 |
| 436-469 | 8 량체 | PRYAAVNI | 439-446 | 4 | 305 |
| 436-469 | 8 량체 | RYAAVNIT | 440-447 | 5 | 306 |
| 436-469 | 8 량체 | YAAVNITT | 441-448 | 6 | 307 |
| 436-469 | 8 량체 | AAVNITTN | 442-449 | 7 | 308 |
| 436-469 | 8 량체 | AVNITTNQ | 443-450 | 8 | 309 |

[0091]

[0092]

[표 1g]

| 패핑 단부위 (aa) | 에피토프 길이 | 에피토프 | aa 서열상 위치 | 에피토프 # | 서열 번호 |
|-------------|---------|------------|-----------|--------|-------|
| 436-469 | 8 량체 | VNITTNQA | 444-451 | 9 | 310 |
| 436-469 | 8 량체 | NITTNQAA | 445-452 | 10 | 311 |
| 436-469 | 8 량체 | ITTNQAAP | 446-453 | 11 | 312 |
| 436-469 | 8 량체 | TTNQAAP | 447-454 | 12 | 313 |
| 436-469 | 8 량체 | TNQAAPSE | 448-455 | 13 | 314 |
| 436-469 | 8 량체 | NQAAPSEV | 449-456 | 14 | 315 |
| 436-469 | 8 량체 | QAAPSEVP | 450-457 | 15 | 316 |
| 436-469 | 8 량체 | AAPSEVPT | 451-458 | 16 | 317 |
| 436-469 | 8 량체 | APSEVPTL | 452-459 | 17 | 318 |
| 436-469 | 8 량체 | PSEVPTLR | 453-460 | 18 | 319 |
| 436-469 | 8 량체 | SEVPTLRL | 454-461 | 19 | 320 |
| 436-469 | 8 량체 | EVPTLRLH | 455-462 | 20 | 321 |
| 436-469 | 8 량체 | VTPLRLHS | 456-463 | 21 | 322 |
| 436-469 | 8 량체 | PTLRLHSS | 457-464 | 22 | 323 |
| 436-469 | 8 량체 | TLRLHSSS | 458-465 | 23 | 324 |
| 436-469 | 8 량체 | LRHLSSSG | 459-466 | 24 | 325 |
| 436-469 | 8 량체 | RLHSSSGS | 460-467 | 25 | 326 |
| 436-469 | 8 량체 | LHSSSGSS | 461-468 | 26 | 327 |
| 436-469 | 8 량체 | HSSSGSSL | 462-469 | 27 | 328 |
| 436-469 | 9 량체 | PLPPRYAAV | 436-444 | 28 | 329 |
| 436-469 | 9 량체 | LPPRYAAVN | 437-445 | 29 | 330 |
| 436-469 | 9 량체 | PPRYAAVNI | 438-446 | 30 | 331 |
| 436-469 | 9 량체 | PRYAAVNIT | 439-447 | 31 | 332 |
| 436-469 | 9 량체 | RYAAVNITT | 440-448 | 32 | 333 |
| 436-469 | 9 량체 | YAAVNITTN | 441-449 | 33 | 334 |
| 436-469 | 9 량체 | AAVNITTNQ | 442-450 | 34 | 335 |
| 436-469 | 9 량체 | AVNITTNQA | 443-451 | 35 | 336 |
| 436-469 | 9 량체 | VNITTNQAA | 444-452 | 36 | 337 |
| 436-469 | 9 량체 | NITTNQAAP | 445-453 | 37 | 338 |
| 436-469 | 9 량체 | ITTNQAAPS | 446-454 | 38 | 339 |
| 436-469 | 9 량체 | TTNQAAPSE | 447-455 | 39 | 340 |
| 436-469 | 9 량체 | TNQAAPSEV | 448-456 | 40 | 341 |
| 436-469 | 9 량체 | NQAAPSEVP | 449-457 | 41 | 342 |
| 436-469 | 9 량체 | QAAPSEVPT | 450-458 | 42 | 343 |
| 436-469 | 9 량체 | AAPSEVPTL | 451-459 | 43 | 344 |
| 436-469 | 9 량체 | APSEVPTLR | 452-460 | 44 | 345 |
| 436-469 | 9 량체 | PSEVPTLRL | 453-461 | 45 | 346 |
| 436-469 | 9 량체 | SEVPTLRLH | 454-462 | 46 | 347 |
| 436-469 | 9 량체 | EVPTLRLHS | 455-463 | 47 | 348 |
| 436-469 | 9 량체 | VTPLRLHSS | 456-464 | 48 | 349 |
| 436-469 | 9 량체 | PTLRLHSSS | 457-465 | 49 | 350 |
| 436-469 | 9 량체 | TLRLHSSSG | 458-466 | 50 | 351 |
| 436-469 | 9 량체 | LRHLSSSGS | 459-467 | 51 | 352 |
| 436-469 | 9 량체 | RLHSSSGSS | 460-468 | 52 | 353 |
| 436-469 | 9 량체 | LHSSSGSSL | 461-469 | 53 | 354 |
| 436-469 | 10 량체 | PLPPRYAAVN | 436-445 | 54 | 355 |
| 436-469 | 10 량체 | LPPRYAAVNI | 437-446 | 55 | 356 |
| 436-469 | 10 량체 | PPRYAAVNIT | 438-447 | 56 | 357 |
| 436-469 | 10 량체 | PRYAAVNITT | 439-448 | 57 | 358 |
| 436-469 | 10 량체 | RYAAVNITTN | 440-449 | 58 | 359 |

[0093]

[0094] [표 1h]

| 패핑된부위 (aa) | 에피토프 길이 | 에피토프 | aa 서열상 위치 | 에피토프 # | 서열 번호 |
|------------|---------|------------|-----------|--------|-------|
| 436-469 | 10 량체 | YAAVNITTNQ | 441-450 | 59 | 360 |
| 436-469 | 10 량체 | AAVNITTNQA | 442-451 | 60 | 361 |
| 436-469 | 10 량체 | AVNITTNQAA | 443-452 | 61 | 362 |
| 436-469 | 10 량체 | VNITTNQAAP | 444-453 | 62 | 363 |
| 436-469 | 10 량체 | NITTNQAAPS | 445-454 | 63 | 364 |
| 436-469 | 10 량체 | ITTNQAAPSE | 446-455 | 64 | 365 |
| 436-469 | 10 량체 | ITNQAAPSEV | 447-456 | 65 | 366 |
| 436-469 | 10 량체 | TNQAAPSEVP | 448-457 | 66 | 367 |
| 436-469 | 10 량체 | NQAAPSEVPT | 449-458 | 67 | 368 |
| 436-469 | 10 량체 | QAAPSEVPTL | 450-459 | 68 | 369 |
| 436-469 | 10 량체 | AAPSEVPTLR | 451-460 | 69 | 370 |
| 436-469 | 10 량체 | APSEVPTLRL | 452-461 | 70 | 371 |
| 436-469 | 10 량체 | PSEVPTLRLH | 453-462 | 71 | 372 |
| 436-469 | 10 량체 | SEVPTLRLHS | 454-463 | 72 | 373 |
| 436-469 | 10 량체 | EVPTLRLHSS | 455-464 | 73 | 374 |
| 436-469 | 10 량체 | VPTLRLHSSS | 456-465 | 74 | 375 |
| 436-469 | 10 량체 | PTLRLHSSSG | 457-466 | 75 | 376 |
| 436-469 | 10 량체 | TLRLHSSSGS | 458-467 | 76 | 377 |
| 436-469 | 10 량체 | LRLHSSSGSS | 459-468 | 77 | 378 |
| 436-469 | 10 량체 | RLHSSSGSSL | 460-469 | 78 | 379 |
| 509-530 | 8 량체 | QLDGLRPD | 509-516 | 1 | 380 |
| 509-530 | 8 량체 | LDGLRPDA | 510-517 | 2 | 381 |
| 509-530 | 8 량체 | DGLRPDAR | 511-518 | 3 | 382 |
| 509-530 | 8 량체 | GLRPDARY | 512-519 | 4 | 383 |
| 509-530 | 8 량체 | LRPDARYV | 513-520 | 5 | 384 |
| 509-530 | 8 량체 | RPDARYVV | 514-521 | 6 | 385 |
| 509-530 | 8 량체 | PDARYVVQ | 515-522 | 7 | 386 |
| 509-530 | 8 량체 | DARYVVQV | 516-523 | 8 | 387 |
| 509-530 | 8 량체 | ARYVVQVR | 517-524 | 9 | 388 |
| 509-530 | 8 량체 | RYVVQVRA | 518-525 | 10 | 389 |
| 509-530 | 8 량체 | YVVQVRAR | 519-526 | 11 | 390 |
| 509-530 | 8 량체 | VVQVRART | 520-527 | 12 | 391 |
| 509-530 | 8 량체 | VQVRARTV | 521-528 | 13 | 392 |
| 509-530 | 8 량체 | QVRARTVA | 522-529 | 14 | 393 |
| 509-530 | 8 량체 | VRARTVAG | 523-530 | 15 | 394 |
| 509-530 | 9 량체 | LDGLRPDA | 509-517 | 16 | 395 |
| 509-530 | 9 량체 | LDGLRPDAR | 510-518 | 17 | 396 |
| 509-530 | 9 량체 | DGLRPDARY | 511-519 | 18 | 397 |
| 509-530 | 9 량체 | GLRPDARYV | 512-520 | 19 | 398 |
| 509-530 | 9 량체 | LRPDARYVV | 513-521 | 20 | 399 |
| 509-530 | 9 량체 | RPDARYVVQ | 514-522 | 21 | 400 |
| 509-530 | 9 량체 | PDARYVVQV | 515-523 | 22 | 401 |
| 509-530 | 9 량체 | DARYVVQVR | 516-524 | 23 | 402 |
| 509-530 | 9 량체 | ARYVVQVRA | 517-525 | 24 | 403 |
| 509-530 | 9 량체 | RYVVQVRAR | 518-526 | 25 | 404 |
| 509-530 | 9 량체 | YVVQVRART | 519-527 | 26 | 405 |
| 509-530 | 9 량체 | VVQVRARTV | 520-528 | 27 | 406 |
| 509-530 | 9 량체 | VQVRARTVA | 521-529 | 28 | 407 |
| 509-530 | 9 량체 | QVRARTVAG | 522-530 | 29 | 408 |
| 509-530 | 10 량체 | QLDGLRPDAR | 509-518 | 30 | 409 |

[0095]

[0096] [표 1i]

| 패핑된부위 (aa) | 에피토프 길이 | 에피토프 | aa 서열상 위치 | 에피토프 # | 서열 번호 |
|------------|---------|------------|-----------|--------|-------|
| 509-530 | 10 량체 | LDGLRPDARY | 510-519 | 31 | 410 |
| 509-530 | 10 량체 | DGLRPDARYV | 511-520 | 32 | 411 |
| 509-530 | 10 량체 | GLRPDARYVV | 512-521 | 33 | 412 |
| 509-530 | 10 량체 | LRPDARYVVQ | 513-522 | 34 | 413 |
| 509-530 | 10 량체 | RPDARYVVQV | 514-523 | 35 | 414 |
| 509-530 | 10 량체 | PDARYVVQVR | 515-524 | 36 | 415 |
| 509-530 | 10 량체 | DARYVVQVRA | 516-525 | 37 | 416 |
| 509-530 | 10 량체 | ARYVVQVRAR | 517-526 | 38 | 417 |
| 509-530 | 10 량체 | RYVVQVRART | 518-527 | 39 | 418 |
| 509-530 | 10 량체 | YVVQVRARTV | 519-528 | 40 | 419 |
| 509-530 | 10 량체 | VVQVRARTVA | 520-529 | 41 | 420 |
| 509-530 | 10 량체 | VQVRARTVAG | 521-530 | 42 | 421 |

[0097]

[0098] 폴리클로날 항체

[0099] 폴리클로날 항체는 바람직하게는, 관련 항원과 애주반트를 다수 회 피하(sc) 주사하거나 복막 내(ip) 주사함으로써 동물의 체내에서 생성된다. 이 작용성 제제 또는 유도체화 제제 예를 들어, 말레이미도벤조일 설포숙신이미드 에스테르(시스테인 잔기에 의한 접합), N-하이드록시숙신이미드(리신 잔기에 의한 접합), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물 또는 기타 당 업계에 공지된 제제를 사용하여, 면역화될 중 내에서 면역원성인 단백질 예를 들어, 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제 인자에 관련 항원을 접합하여 항체 반응성을 개선할 수 있다.

- [0100] 예를 들어, 100 μ g 또는 5 μ g의 단백질 또는 접합체(각각 토끼와 마우스용 단백질 또는 접합체임)와 3 부피의 프룬트(Freund) 완전 애주반트를 합하고, 이것들의 용액을 다수의 위치에 피 내 주사함으로써, 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대하여 동물들을 면역화한다. 한 달 후, 프룬트 완전 애주반트 중 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5~1/10 비율로 다수의 위치에 피하 주사함으로써, 동물을 면역 증강시킨다. 면역 증강 주사 후 7~14일 경과시, 상기 동물로부터 채혈을 한 다음, 혈청을 항체 역가에 대해 검정한다. 역가가 일정해 질 때까지 동물을 면역 증강시킨다. 바람직하게, 상기 동물은 항원은 동일하되, 상이한 단백질에 접합시킨 접합체 및/또는 상이한 가교 시약을 사용하여 면역 증강된다. 접합체는 또한 제조할 세포 배양액 중에서 단백질 용합체로서 제조될 수도 있다. 뿐만 아니라, 적당하게는 응집제 예를 들어, 알루미늄이 면역 반응을 증강시키는데 사용된다.
- [0101] **모노클로날 항체**
- [0102] 문헌[Kohler의 다수, Nature, 256:495 (1975)]에 처음으로 소개된 하이브리도마 방법을 이용하여 모노클로날 항체를 생산할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의하여 생산할 수 있다.
- [0103] 하이브리도마 방법에 있어서는, 마우스 또는 기타 적당한 숙주 동물 예를 들어, 햄스터나 짧은 꼬리 원숭이를, 면역화에 사용된 단백질과 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도하도록 본원에 기술된 바와 같이 면역화한다. 대안적으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 이후 림프구는 적당한 용합제 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 골수종 세포와 용합하여, 하이브리도마 세포를 형성하게 된다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)].
- [0104] 이와 같이 제조된 하이브리도마 세포는 바람직하게, 용합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적당한 배양 배지 중에 집중되어 성장하게 된다. 예를 들어, 만일 모 골수종 세포가 효소인 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)를 함유하지 않으면, 하이브리도마용 배양 배지는 통상적으로 HGPRT-결핍 세포의 성장을 막아주는 물질인 하이포잔틴, 아미노프테린과 티미딘(HAT 배지)를 포함할 것이다.
- [0105] 바람직한 골수종 세포는 효과적으로 용합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의해 항체를 높은 수준으로 안정하게 생산하며, 배지에 감수성인 세포이다. 인간의 골수종 세포주 및 마우스-인간 이종 골수종 세포주는 또한 인간의 모노클로날 항체를 생산하는 것으로서 개시된바 있다[Kozbor, J. Immunol, 133: 3001(1984);Brodeur의 다수, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]. 대표적인 쥐와 동물 골수종 세포주로서는 MOP-21 및 M.C.-11 마우스 종양(셀크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center); 미국 캘리포니아 샌디에이고 소재) 및 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포(미국 미들랜드 록빌 소재, 미국 모식균 배양 수집소)로부터 유래하는 세포주들을 포함한다.
- [0106] 하이브리도마 세포가 성장하고 있는 배양 배지를 검정하여 항원에 대해 모노클로날 항체가 유도 생산되는지 여부에 대해 분석한다. 바람직하게, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역 침전법 또는 시험관 내 결합 검정법 예를 들어, 방사성 면역 검정법(RIA) 또는 효소-결합 면역 흡착 검정법(ELISA)에 의해 측정된다. 모노클로날 항체의 결합 친화성은 예를 들어, 스캐차드 분석법(Scatchard analysis)에 의해 측정될 수 있다[Munson의 다수, Anal. Biochem., 107:220 (1980)].
- [0107] 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성을 가지는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 동정한 후, 희석 과정을 제한함으로써 클론을 서브 클로닝할 수 있고, 또한 표준적인 방법에 의해 클론을 생육할 수 있다[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]. 이와 같은 목적에 사용하기 적당한 배양 배지로서는 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 뿐만 아니라, 하이브리도마 세포는 동물의 체내 복수 종양(ascites tumor)으로서 생체 내 생육될 수 있다. 서브 클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는, 종래의 면역 글로불린 정제 방법 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기 영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의하여 배양 배지, 복수액, 또는 혈청으로부터 적당히 분리된다.
- [0108] 모노클로날 항체를 암호화하는 DNA는 종래의 방법(예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 방법)을 이용하여, 하이브리도마 세포로부터 분리되어 서열 결정될 수 있다. 서열 결정은 일반적으로 목적 유전자 또는 목적 cDNA의 적어도 일부분을 분리하여야 할 것이다. 일반적으로 이러한 과정에서는 모노클로날 항체를 암호화하는 DNA, 또는 바람직하게는 mRNA(즉, cDNA)를 클로닝하여야 한다. 클로닝은 표준적인 기술을 이용하여 수행된다[예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌(Sambrook의 다수 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold

Spring Harbor Press) 참조]. 예를 들어, cDNA 라이브러리는 폴리A+ mRNA, 바람직하게는 막-결합 mRNA, 그리고 인간 면역 글로불린 폴리펩티드 유전자 서열에 대해 특이적인 프로브를 사용하여 스크리닝된 라이브러리를 역전 사시켜 구성될 수 있다. 그러나, 바람직한 구체예에서는, 목적으로 하는 면역 글로불린 유전자 분절(예를 들어, 경쇄 가변 분절)을 암호화하는 cDNA(또는 전장 cDNA의 일부분)를 증폭하는데에 중합 효소 연쇄 반응(PCR)이 사용된다. 증폭된 서열은 임의의 적당한 벡터 예를 들어, 발현 벡터, 미니 유전자 벡터 또는 파지 디스플레이 벡터에 용이하게 클로닝될 수 있다. 목적으로 하는 면역 글로불린 폴리펩티드의 일부 서열을 결정할 수 있는 한, 사용된 구체적인 클로닝 방법은 중요하지 않음을 알 수 있을 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, "분리된" 핵산 분자 또는 "분리된" 핵산 서열은, (1) 보통, 핵산의 천연 공급원과 결합되어 있는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 동정 및 분리되거나, 또는 (2) 백그라운드 핵산으로부터 클로닝, 증폭, 태깅되거나, 백그라운드 핵산과 구별되어, 목적으로 하는 핵산의 서열이 결정될 수 있으므로, 분리된 것으로 간주되는 핵산이다. 분리된 핵산 분자는 천연의 환경에서 발견되는 형태의 것 또는 이러한 환경에서 발견되는 상태의 것 이외의 것이다. 그러므로, 분리된 핵산 분자는 천연의 세포 내에 존재하는 핵산 분자와는 구별된다. 그러나, 분리된 핵산 분자는 보통, 예를 들어, 천연 세포의 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치 내에 핵산 분자가 존재하는 경우, 항체를 발현하는 세포 내에 포함되어 있는 핵산 분자를 포함한다.

[0109] 클로닝과 서열 결정에 사용되는 RNA에 대한 하나의 공급원로서는, 유전자 이식 마우스로부터 B 세포를 얻어, 이 B 세포를 무한 증식성 세포에 융합함으로써 생산된 하이브리도마가 있다. 하이브리도마를 사용함에 있어서 한 가지 이점은, 이 하이브리도마가 용이하게 스크리닝된다는 점과, 목적으로 하는 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마가 선별된다는 점이다. 대안적으로, RNA는 면역화된 동물의 B 세포(또는 전체 비장)로부터 분리될 수 있다. 하이브리도마 이외의 공급원이 사용될 때, 특이적인 결합 특성을 갖는 면역 글로불린 또는 면역 글로불린 폴리펩티드를 암호화하는 서열에 대해 스크리닝하는 것이 바람직할 수 있다. 이와 같이 스크리닝하는 한 가지 방법으로서 파지 디스플레이 기술을 사용하는 방법이 있다. 파지 디스플레이법에 관하여는 예를 들어, 문헌[Dower의 다수, WO 91/17271, McCafferty의 다수, WO 92/01047, 및 Caton and Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990); 상기 문헌들은 각각 본원에 참고용으로 인용되어 있음]에 개시되어 있다. 파지 디스플레이 기술을 이용하는 하나의 구체예에서, 면역화된 유전자 이식 마우스로부터 cDNA(예를 들어, 전체 비장 cDNA)가 분리되며, 면역 글로불린 폴리펩티드의 일부분 예를 들어, CDR 부위를 암호화하는 cDNA 서열을 증폭시키는데에는 중합 효소 연쇄 반응법이 사용되고, 증폭된 서열은 파지 벡터에 삽입된다. 목적으로 하는 펩티드 예를 들어, 원하는 결합 특성을 갖는 가변 부 펩티드를 암호화하는 cDNA는 표준적인 기술을 예를 들어, 패닝(panning)에 의해 동정된다.

[0110] 이후, 증폭 또는 클로닝된 핵산의 서열이 결정된다. 통상적으로, 면역 글로불린 폴리펩티드의 전체 가변 부를 암호화하는 서열이 결정되지만, 때로는 가변 부의 일부분 예를 들어, CDR-암호화 부분만을 적당히 서열 결정하기도 할 것이다. 통상적으로, 상기 서열 결정된 부분은 길이가 30개 이상의 염기일 것이며, 가변 부 전체 길이의 약 3분의 1 이상 또는 약 2분의 1 이상을 암호화하는 염기가 서열 결정될 것이다.

[0111] 서열 결정은, cDNA 라이브러리로부터 분리된 클론을 대상으로 하여 수행될 수 있거나, PCR을 이용할 경우에는, 증폭된 서열을 서브 클로닝한 후 또는 증폭된 분절을 직접 PCR 서열 결정함으로써 수행될 수 있다. 서열 결정은 표준적인 기술을 이용하여 수행된다[예를 들어, Sambrook의 다수 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, 및 Sanger, F.의 다수 (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467; 상기 문헌은 본원에 참고용으로 인용됨]. 클로닝된 핵산의 서열과 인간 면역 글로불린 유전자와 cDNA의 공개된 서열을 비교함으로써, 당 업자는, 서열 결정된 부위에 따라서, 다음의 사항들을 용이하게 측정할 수 있을 것이다: (i) 하이브리도마 면역 글로불린 폴리펩티드(중쇄의 이소타입형 포함)의 생식 계열 분절의 사용, 및 (ii) N-부위 부가 과정과 체성 돌연 변이 과정으로부터 생성된 서열을 포함하는, 중쇄 및 경쇄 가변 부 서열. 면역 글로불린 유전자 서열 정보에 관한 한 가지 소스로서는 미국 국립 생물 정보 센터, 미국 국립 의학 도서관, 미국 국립 보건원(미들랜드 주 베데스다 소재)이 있다.

[0112] **항체 단편**

[0113] 진술한 바와 같이, 항체 단편은 비변형 전장 항체의 일부, 바람직하게는 비변형 항체의 항원 결합부 또는 가변 부를 포함하며, 항체 단편으로 형성된 선형 항체 및 다중 특이적 항체를 포함한다. 항체 단편의 비 제한적인 예로서는, 항체가 원하는 생물 활성을 보유하는 한, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, 도메인 항체(dAb), 상보성 결정 부위(CDR) 단편, 단일 사슬 항체(scFv), 단일 사슬 항체 단편, 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 선형 항체; 킬레이트화 재조합 항체, 트리아바디 또는 바이바디, 인트라바디, 나노바디, 소형 모듈 면역 약품

(SMIP), 항원-결합-도메인 면역 글로불린 융합 단백질, 카멜화 항체, $V_{H\text{H}}$ 함유 항체, 또는 뮤테인 또는 이의 유도체, 그리고 폴리펩티드와 항원이 특이적으로 결합할 수 있도록 만들기에 충분한 면역 글로불린의 적어도 일부분을 함유하는 폴리펩티드 예를 들어, CDR 서열을 포함한다. 이러한 항원 단편은 재조합 DNA 기술 또는 펩티드 합성법을 이용하여, 전체 항체를 변형시키거나 새로이 합성하여 생성될 수 있다.

- [0114] "다이아바디"란 용어는, 2개의 항원-결합 위치를 가지는 소형 항체 단편을 의미하는 것으로서, 여기서, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬(V_H V_L) 내에 중쇄 가변 도메인(V_H)이 경쇄 가변 도메인(V_L)과 연결되어 있다. 동일한 사슬 상에 있는 2개의 도메인들 사이에 짝을 형성하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인들은 다른 사슬의 상보성 도메인과 짝을 형성하게 되며, 그 결과 2개의 항원-결합 위치가 생성되는 것이다. 다이아바디에 관하여는 예를 들어, 문헌[EP 404,097; WO 93/11161 ; 및 30 Hollinger의 다수, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 자세히 기술되어 있다.
- [0115] "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는데, 여기서, 이와 같은 도메인들은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재하며, 임의로는 Fv가 항원 결합에 적합한 구조를 형성할 수 있도록 만들어주는 V_H 및 V_L 도메인들 사이에 폴리펩티드 링커를 포함한다[Bird의 다수, Science 242:423-426, 1988, 및 Huston의 다수, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988]. Fd 단편은 V_H 도메인과 C_{H1} 도메인으로 이루어져 있다.
- [0116] 부가의 항체 단편은 V_H 도메인들로 이루어진 도메인 항체(dAb) 단편을 포함한다[Ward의 다수, Nature 341 :544-546, 1989].
- [0117] "선형 항체"는, 한 쌍의 항원 결합부를 형성하며, 직렬로 존재하는, 한 쌍의 Fd 분절들(V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1})을 포함한다. 선형 항체는 이중 특이적이거나 단일 특이적일 수 있다[Zapata의 다수 Protein Eng. 8:1057-62 (1995)].
- [0118] 펩티드 링커(힌지 부재) 또는 IgG 힌지를 통하여 C_{H3} 에 융합된 scFv로 이루어진 "미니바디"에 관하여는 문헌 [Olafsen, 외 다수, Protein Eng Des Sel. 2004 Apr; 17(4) :315-23]에 기술되어 있다.
- [0119] 경쇄가 결여된 기능성 중쇄 항체는, 너스 상어(nurse sharks; Greenberg의 다수, Nature 374:168-73, 1995), 워베공 상어(wobegong sharks; Nuttall의 다수, Mol. Immunol. 38:313-26, 2001) 및 낙타과 동물(Camelidae; Hamers-Casterman의 다수, Nature 363: 446-8, 1993; Nguyen의 다수, J. Mol. Biol. 275: 413, 1998) 예를 들어, 낙타, 단봉 낙타, 알파카 및 리마에서 천연 생성되는 항체이다. 상기 동물에서 항원-결합 위치는 하나의 도메인, 즉, $V_{H\text{H}}$ 도메인으로 감소한다. 이러한 항체는 중쇄 가변 부만을 사용하여 항원-결합부를 형성하는데, 즉, 이와 같은 기능성 항체들은 오로지 구조 H_2L_2 만을 가지는 중쇄의 동종 이량체이다(그리하여, 이를 "중쇄 항체" 또는 "HCAB"라고도 부름). 카멜화된 $V_{H\text{H}}$ 는, 힌지, C_{H2} 및 C_{H3} 도메인을 함유하고, C_{H1} 도메인은 결여된 IgG2 및 IgG3 불변 부들을 재조합한다[Hamers-Casterman의 다수, 상동]. 예를 들어, 라마의 IgG1은 통상적인(H_2L_2) 항체 이소타입형으로서, 이것의 V_H 는 힌지, C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 도메인들을 함유하는 불변 부와 재조합되는 반면에, 라마의 IgG2 및 IgG3는 C_{H1} 도메인이 결여되어 있으며, 경쇄를 함유하지 않는, 중쇄만으로 이루어진 이소타입형이다. V_H 만으로 된 통상의 단편은 가용성 형태로 만들기는 어렵지만, 골격 잔기가 보다 $V_{H\text{H}}$ 와 유사하게 변형될 때 가용성과 특이적 결합성을 개선할 수 있다[예를 들어, Reichman의 다수, J Immunol Methods 1999, 231 :25-38 참조]. 카멜화된 $V_{H\text{H}}$ 도메인들은 높은 친화성으로 항원과 결합하는 것으로 파악된바 있으며 [Desmyter의 다수, J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001], 용액 중 가용성도 크다[Ewert의 다수, Biochemistry 41 :3628-36, 2002]. 카멜화된 중쇄를 가지는 항체를 생산하는 방법에 관하여는 예를 들어, 미국 특허 공보 제 20050136049호 및 동 제20050037421호에 기술되어 있다.
- [0120] 중쇄 항체의 가변 도메인은, 분자량이 15kDa에 불과하며, 완전한 기능을 가지는, 최소의 항원-결합 단편으로서, 나노바디라고도 부른다[Cortez-Retamozo의 다수, Cancer Research 64:2853-57, 2004]. 나노바디 라이브리리는 문헌[Conrath의 다수, Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001]에 개시된 바와 같이 면역화된 단봉 낙타로부터 생산될 수 있거나, 또는 문헌[]에 개시된 바와 같은 재조합 방법에 의해서 생산될 수 있다.
- [0121] 인트라바디는, 세포 내 발현되며, 세포 내에서의 단백질 기능을 조작할 수 있는 단일 사슬의 항체이다[Biocca, 외 다수, EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby의 다수, Proc Natl Acad Sci. USA. 101 :17616-21, 2004]. 세포 내

특정 부위에 항체 구조물을 보유하고 있는 세포 신호 서열을 포함하는 인트라바디는 문헌[Mhashilkar의 다수, EMBO J 14:1542-51, 1995 및 Wheeler의 다수, FASEB J. 17:1733-5. 2003]에 개시된 바와 같이 생산될 수 있다. 트랜스바디(transbody)는 단백질 형질 도입 도메인(PTD)이 단일 사슬 가변 단편(scFv) 항체와 융합되어 있는, 세포-투과성 항체이다[Heng의 다수, Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005].

[0122] 표적 단백질에 특이적인 SMIP 또는 결합 도메인 면역 글로불린 융합 단백질인 항체도 고려된다. 이와 같은 구조물은 항체 효과기 기능을 수행하는데 필수적인 면역 글로불린 도메인에 융합된 항원 결합 도메인을 포함하는 단일 사슬 폴리펩티드이다. 예를 들어, WO 03/041600, 미국 특허 공보 제20030133939호 및 동 제20030118592호를 참조하십시오.

[0123] **다가 항체**

[0124] 몇몇 구체예에서, 다가 또는 심지어 다중 특이적(예를 들어, 이중 특이적, 삼중 특이적 등) 모노클로날 항체를 생산하는 것이 바람직할 수 있다. 이와 같은 항체는 표적 항원의 2개 이상의 상이한 에피토프에 대하여 결합 특이성을 가질 수 있거나, 또는 2개의 상이한 분자 예를 들어, 표적 항원과 세포 표면 단백질 또는 수용체에 결합할 수도 있다. 예를 들어, 이중 특이적 항체는 표적과 결합하는 팔(arm)과, 백혈구 상의 촉발 분자(triggering molecule) 예를 들어, T-세포 수용체 분자(예를 들어, CD2 또는 CD3), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체(FcγR) 예를 들어, FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) 및 FcγRIII(CD16)와 결합하여, 표적-발현 세포에 세포성 방어 기작을 집중적으로 진행시키는 다른 팔을 포함할 수 있다. 다른 예로서, 표적 항원을 발현하는 세포에 세포 독성 제제를 국소화 시키는데 이중 특이적 항체가 사용될 수 있다. 이와 같은 항체는 표적-결합 팔과, 세포 독성 제제(예를 들어, 사포린, 항-인터페론-60, 빈카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토티렉세이트 또는 방사성 동위 원소 핵탄)와 결합하는 팔을 보유한다. 다중 특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0125] 이중 특이적 항체로서는 가교 또는 "이중 접합" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중 접합체를 구성하는 항체 중 하나는 아비딘과 커플링될 수 있고, 다른 하나는 바이오틴과 커플링될 수 있다. 이중 접합 항체는 임의의 편리한 가교법을 이용하여 제조될 수 있다. 적당한 가교제에 관하여는 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 이에 관하여는, 다수의 가교 기술과 함께, 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0126] 이중 특이적 항체의 생산에 대한 다른 연구 결과에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 계면은 재조합 세포 배양액으로부터 회수되는 이중 이량체의 백분율이 최대화되도록 조작될 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부분을 포함한다. 이 방법에 있어서, 제1 항체 분자의 계면으로부터 유래하는 하나 이상의 소형 아미노산 측쇄는 더욱 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 치환된다. 대형 아미노산 사슬과 소형 아미노산 사슬(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)을 치환하면, 제2 항체 분자의 계면 상에 대형 측쇄와 동일하거나 유사한 크기를 가지는 보상형 "공동(cavity)"이 형성된다. 이는, 기타 원치 않던 최종 산물 예를 들어, 동중 이량체의 수율에 비하여 이중 이량체의 수율이 증가하는 기작이 된다. 1996년 9월 6일자 공개된 WO 96/27011을 참조하십시오.

[0127] 항체 단편으로부터 이중 특이적 항체를 생산하는 기술에 관하여도 문헌에 개시된 바 있다. 예를 들어, 이중 특이적 항체는 화학 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌[Brennan의 다수, Science 229:81 (1985)]에는, 비변형 항체를 단백질 분해 방식으로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생산하는 방법에 관하여 기술되어 있다. 이와 같은 단편들은 디티올 착제인 아비산나트륨의 존재 하에 환원되어, 인접한 디티올을 안정화시키고, 또한 분자 간에 이황화물이 형성되는 것을 막아준다. 이후, 생산된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환된다. 그 다음, Fab'-TNB 유도체 중 하나는 머캡토에틸아민에 의해 환원됨으로써 다시 Fab'-티올로 전환되고, 동량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어 이중 특이적 항체를 형성하게 된다. 생산된 이중 특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로서 사용될 수 있다. 문헌[Better의 다수, Science 240: 1041-1043 (1988)]에는, 박테리아로부터 기능성 항체 단편을 분비하는 방법에 관하여 개시되어 있다[예를 들어, 문헌(Better의 다수, Skerra의 다수 Science 240: 1038-1041 (1988)) 참조]. 예를 들어, Fab'-SH 단편은 이.콜라이(E.Coli)로부터 직접 회수된 후, 화학적으로 커플링되어 이중 특이적 항체를 형성할 수 있다[Carter의 다수, Bio/Technology 10:163-167 (1992); Shalaby의 다수, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)].

[0128] 문헌[Shalaby의 다수, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)]에는, 완전히 인간화된 이중 특이적 항체인 F(ab')₂ 분자에 대하여 기술되어 있다. 각각의 Fab' 단편을 이.콜라이로부터 개별적으로 분비시킨 후, 이를 시험관 내에서 유도적 방식으로 화학 커플링시켜, 이중 특이적 항체를 형성하는 것이다. 이와 같이 형성된 이중 특이적 항체는 HER2 수용체를 과발현하는 세포와 정상 인간 T 세포에 결합할 수 있었을 뿐만 아니라, 인간 세포 독성 림프구의

인간 유방 종양 표적에 대한 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

- [0129] 재조합 세포 배양액으로부터 이중 특이적 항체 단편을 직접 제조 및 분리하는 다양한 기술에 관하여도 개시되어 있다. 예를 들어, 루신 지퍼(leucine zipper) 예를 들어, GCN4를 사용하여 이중 특이적 항체를 생산한 바 있다. [일반적으로 문헌(Kostelny와 다수, J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992))을 참조하시오]. Fos와 Jun 단백질로부터 유래하는 루신 지퍼 펩티드를 유전자 융합에 의하여 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 결합시켰다. 항체의 동종 이량체는 힌지 부에서 환원되어 단량체를 형성하고, 이후, 다시 산화되어 항체 이중 이량체를 형성하였다. 이 방법은 또한 항체의 동종 이량체를 생산하는데에도 활용될 수 있다.
- [0130] "다이아바디"란 용어는, 2개의 항원-결합 위치를 가지는 소형 항체 단편을 의미하는 것으로서, 여기서, 상기 단편에는 동일한 폴리펩티드 사슬(V_H-V_L) 내 경쇄 가변 도메인(V_L)에 중쇄 가변 도메인(V_H)이 연결되어 있다. 동일한 사슬 상에 존재하는 2개의 도메인들 사이에 짝을 형성할 수 있기에는 너무 짧은 링커를 사용하여, 도메인을 다른 사슬의 상보성 도메인과 짝을 형성시킬 수 있으며, 그 결과 2개의 항원-결합 위치가 생성된다. 예를 들어, 문헌[Hollinger와 다수, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]을 참조하시오.
- [0131] 단일 사슬 Fv(scFv) 이량체를 사용하여 이중 특이적 항체 단편을 생산하는 다른 기술에 관하여도 보고된 바 있다. 문헌[Gruber와 다수, J. Immunol. 152: 5368 (1994)]을 참조하시오.
- [0132] 대안적으로, 이중 특이적 항체는 문헌[Zapata와 다수 Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]에 개시된 바와 같이 생산된 "선형 항체"일 수 있다. 요약하면, 상기 항체들은, 한 쌍의 항원 결합부를 형성하는 한 쌍의 직렬 Fd 분절($V_H-C_H1-V_H-C_H1$)을 포함한다. 선형 항체는 이중 특이적 또는 단일 특이적일 수 있다.
- [0133] 2 이상의 가수를 가지는 항체도 고려된다. 예를 들어, 삼중 특이적 항체가 제조될 수 있다[Tutt와 다수, J. Immunol. 147:60 (1991)].
- [0134] "킬레이트화 재조합 항체"는 표적 항원의 인접하여 존재하면서도 중첩되지 않는 에피토프들을 인지하는 이중 특이적 항체로서, 두 에피토프와 동시에 결합하기에 충분한 정도로 가요성이다[Neri와 다수, J Mol. Biol. 246:367-73, 1995].
- [0135] 이중 특이적 Fab-scFv("바이바디") 및 삼중 특이적 Fab-(scFv)(2)("트리바디")를 생산하는 방법에 관하여는 문헌[Schoonjans와 다수, J Immunol. 165:7050-57, 2000 및 Willems와 다수, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003]에 개시되어 있다. 바이바디 또는 트리바디에 있어서, scFv 분자는 $V_L-C_L(L)$ 사슬 및 $V_H-C_H1(Fd)$ 사슬 중 어느 하나 또는 둘 다에 융합되어 예를 들어, 트리바디를 형성하게 되고, 2개의 scFv는 Fab의 C-말단에 융합되는 반면에, 바이바디에 있어서 하나의 scFv는 Fab의 C-말단에 융합된다.
- [0136] **항체의 재조합 생산**
- [0137] 당 업계에 널리 공지된 항체 발현 시스템 중 하나를 이용하는 재조합 DNA 방법에 의하여 항체를 생산할 수 있다 [예를 들어, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 참조].
- [0138] 본 발명의 항체를 암호화하는 DNA는 발현 벡터에 배치될 수 있는데, 이후, 이 발현 벡터는 숙주 세포 예를 들어, 이.콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 인간 배 신장 293 세포(예를 들어, 293E 세포), 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 면역 글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포에 형질 감염되며, 그 결과, 재조합 숙주 세포 내에서는 모노클로날 항체가 합성된다. 항체의 재조합 생산 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다. 항체 단편은 비변형 항체를 단백 분해하면 얻어진다[예를 들어, 문헌(Morimoto와 다수, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107- 117 (1992) 및 Brennan와 다수, Science 229:81 (1985)) 참조]. 그러나, 이와 같은 단편들은 현재 재조합 숙주 세포에 의하여 직접 생산될 수 있다. 항체 단편을 생산하기 위한 기타 기술 예를 들어, 펩티드 합성법 및 공유 결합법에 관하여는 당 업자가 잘 알 것이다.
- [0139] 발현 제어 서열이란, 특정 숙주 유기체 내에서 작동 가능하도록 결합된 암호화 서열을 발현시키는데 필요한 DNA 서열을 의미한다. 예를 들어, 원핵 생물에 적당한 제어 서열로서는, 프로모터, 임의로는 작동 인자 서열, 그리고 리보솜 결합 위치를 포함한다. 진핵 생물 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0140] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능상 관련을 가지도록 배치될 때, 작동 가능하도록 결합되어 있는 것이라 할 수 있다. 예를 들어, 전 서열(presequence) 또는 분비 리더 DNA는, 그것이 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전 단백질

(preprotein)로서 발현되면 폴리펩티드 DNA에 작동 가능하도록 결합되어 있는 것이며; 프로모터 또는 인핸서는, 그것이 서열의 전사에 영향을 미치면 암호화 서열에 작동 가능하도록 결합되어 있는 것이고; 또한 리보솜 결합 위치는, 그것이 번역을 촉진하도록 배치되어 있으면 암호화 서열에 작동 가능하도록 결합되어 있는 것이다, 일반적으로, 작동 가능하도록 결합되었다는 의미는, 결합된 DNA 서열이 인접하여 존재하는 경우를 의미하는 것으로서, 분비 리더의 경우에는 인접하면서 해독 단계에 있는 경우를 의미하는 것이다. 그러나, 인핸서는 인접하여 존재할 필요가 없다. 결합은 편리한 제한 위치들에서 결합 시킴으로써 이루어질 수 있다. 만일 이러한 위치들이 존재하지 않으면, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커는 통상의 방식에 따라서 사용된다.

[0141] 세포, 세포주 그리고 세포 배양액은 종종 호환되어 사용되며, 본원에서는 이와 같은 명칭에 그것들의 자손도 포함시킨다. 형질 전환체와 형질 전환된 세포는 1차 대상 세포와, 전이의 횡수와는 상관없이 그로부터 유래된 배양액을 포함한다. 또한, 모든 자손은, 의도적 돌연 변이 또는 의도하지 않은 돌연 변이로 인하여, DNA 함량이 정확하게 일치할 수 없다. 원래 형질 전환된 세포 내에서 스크리닝된 바와 동일한 기능 또는 생물 활성을 가지는 돌연 변이 자손이 포함된다. 분명한 명칭이 사용되는 경우, 그 명칭에 담긴 뜻으로부터 의미를 알 수 있을 것이다.

[0142] 대안적인 구체예에서, 목적 번역 글로불린의 아미노산 서열은 직접적인 단백질 서열 결정에 의하여 결정될 수 있다. 적당한 암호화 뉴클레오티드 서열은 보편적인 코돈 표에 따라서 명명될 수 있다.

[0143] 원하는 항체의 아미노산 서열 뮤테인은, 암호화 DNA에 적당한 뉴클레오티드 변이를 도입하거나, 또는 펩티드 합성에 의하여 생산될 수 있다. 이와 같은 뮤테인으로서는 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 이 서열로의 잔기의 삽입 및/또는 이 서열 내 잔기의 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환을 임의로 조합하면, 최종 구조물을 생산할 수 있으며, 이 경우, 상기 최종 구조물은 원하는 특징을 보유하게 된다. 아미노산 변이는 또한 모노클로날 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 휴먼 엔지니어링™된 항체 또는 뮤테인 항체의 번역 후 과정을 변경할 수 있는데, 예를 들어, 당화 부위의 위치와 수를 변경할 수 있다.

[0144] 항체의 아미노산 서열 뮤테인을 암호화하는 핵산 분자는 당 업계에 공지된 다양한 방법에 의해 생산된다. 이와 같은 방법으로서, 천연 공급원으로부터의 분리 방법(천연 생성 아미노산 서열 뮤테인의 경우), 또는 올리고뉴클레오티드-매개(또는 위치-유래) 돌연 변이 유발법, PCR 돌연 변이 유발법, 그리고 이른 시기에 생산된 항체의 뮤테인 또는 비 뮤테인의 카세트 돌연 변이 유발법에 의해 생산하는 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0145] 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 암호화하며, 임의로는 숙주 세포에 의해 인지된 제어 서열과 작동 가능하도록 결합되어 있는 분리된 핵산, 이 핵산을 포함하는 벡터와 숙주 세포, 그리고 상기 핵산을 발현시키기 위하여 숙주 세포를 배양하는 단계와, 임의로는, 이 숙주 세포 배양액 또는 배양 배지로부터 항체를 회수하는 단계를 포함할 수 있는, 상기 항체를 생산하는 제조법 기술을 제공한다.

[0146] 항체를 생산하는 제조법 방법에 있어서, 이 항체를 암호화하는 핵산은 분리된 후, 복제 가능한 벡터에 삽입되어 추가로 클로닝(상기 DNA의 증폭) 또는 발현된다. 모노클로날 항체를 암호화하는 DNA는 통상의 방법(예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 방법)을 이용하여 용이하게 분리 및 서열 결정된다. 다수의 벡터가 사용될 수 있다. 벡터의 구성 요소로서는 일반적으로, 다음의 요소들 중 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다: 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 선별 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열.

[0147] (1) 신호 서열 구성 요소

[0148] 본 발명의 항체는 직접적인 방식에 의해서뿐만 아니라, 바람직하게는 성숙한 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 위치를 보유하는 기타 폴리펩티드 또는 신호 서열과 같은 이중 폴리펩티드와의 융합 단백질로서도 생산될 수 있다. 바람직하게 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인지되고 가공되는(즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 서열이다. 만일 원핵 생물 숙주 세포가 원래 항체 신호 서열을 인지하여 가공하지 않으면, 신호 서열은 예를 들어, 펩타이드 분해 효소(예를 들어, pelB) 알칼리성 인산화 효소, 페니실리나제, lpp, 또는 열-안정 장독소 II 리더의 군으로부터 선택된 신호 서열에 의해 치환될 수 있다. 효모의 분비를 위하여, 원래 신호 서열은, 예를 들어, 효모 인버타제 리더, α-인자 리더(사카로마이세스(*Saccharomyces*) 및 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) α-인자 리더 포함), 또는 산성 인산화 효소 리더, 씨.알비칸스(*C.albicans*) 글루코아미라제 리더 또는 W0 90/13646에 개시된 신호 서열로 치환될 수 있다. 포유동물 세포의 발현에 있어서, 포유동물의 신호 서열과 바이러스 분비 리더 예를 들어, 헤르페스 심플렉스 gD 신호를 사용할 수 있다.

- [0149] 이와 같은 전구체 부위에 대한 DNA는 항체를 암호화하는 DNA에 대한 해독 골격 내에 걸찰된다.
- [0150] (2) 복제 기원 구성 요소
- [0151] 발현 벡터와 클로닝 벡터는 둘 다, 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제할 수 있도록 만들어주는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에 있어서, 이 핵산 서열은 벡터가 숙주 염색체 DNA를 독립적으로 복제시킬 수 있도록 만들어주는 서열로서, 복제 기원 또는 자발적으로 복제하는 서열을 포함한다. 이와 같은 서열들은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스용인 것으로 널리 알려져 있다. 플라스미드 pBR322로부터 유래하는 복제 기원은 대부분이 그램-네거티브 박테리아에 적당하고, 2 μ 플라스미드의 기원은 효모용으로서 적당하며, 다양한 바이러스 기원은 포유동물 세포 내 클로닝 벡터용으로서 유용하다. 일반적으로, 복제 기원 구성 요소는 포유동물 발현 벡터에서는 필요하지 않다(SV40 기원은 초기 프로모터를 함유하므로, 통상적으로는 이 SV40 기원만이 사용될 수 있음).
- [0152] (3) 선별 마커 구성 요소
- [0153] 발현 벡터 및 클로닝 벡터는 선별 유전자(선별 마커라고도 함)를 함유할 수 있다. 통상적인 선별 유전자 예를 들어, D-알라닌 라세마제를 암호화하는 유전자(*Bacillus*용)는 (a) 항생제나 기타 독소 예를 들어, 암피실린, 네오마이신, 메토틱렉세이트, 테트라사이클린, G418, 제네티신, 히스티디놀 또는 마이코페놀산에 대한 내성을 부여하거나, (b) 자가 영양 결핍성을 보완해주거나, 또는 (c) 복합 배지로부터는 얻을 수 없는 중요한 영양분을 공급해주는 단백질을 암호화한다.
- [0154] 선별 과정에 관한 일례는, 숙주 세포의 성장을 멈추게 하는 약품을 사용한다. 이중 유전자로 성공적으로 형질 전환된 세포들은 약품 내성을 부여하는 단백질을 생산하므로, 선별을 위한 생육에서 생존한다. 이러한 지배적 선별(dominant selection)에서는 예를 들어, 메토틱렉세이트, 네오마이신, 히스티디놀, 퓨로마이신, 마이코페놀산 및 하이그로마이신과 같은 약품을 사용한다.
- [0155] 포유동물 세포용으로서 적당한 선별 마커의 다른 예로서는, 항체-암호화 핵산을 흡수할 수 있는 세포를 동정할 수 있도록 만들어주는 마커 예를 들어, DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 메탈로티오네인-II, 바람직하게는 영양류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 탈 아민 효소, 오르니틴 탈탄소 효소 등이 있다.
- [0156] 예를 들어, DHFR 선별 유전자로 형질 전환된 세포는 처음에, DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱렉세이트(Mtx)를 함유하는 배양 배지 중에서 형질 전환체 전부를 배양함으로써 동정된다. 야생형 DHFR이 사용될 때 적당한 숙주 세포로서는, DHFR 활성이 결여된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주가 있다.
- [0157] 대안적으로, 본 발명의 항체, 야생형 DHFR 단백질, 그리고 기타 선별 마커 예를 들어, 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제(APH)를 암호화하는 DNA 서열로 형질 전환 또는 공동 형질 전환된 숙주 세포(특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는, 선별 마커에 대한 선별 제제 예를 들어, 아미노글리코시딘산 항생제 예를 들어, 카나마이신, 네오마이신 또는 G418을 함유하는 배지 중에 세포를 성장시킴으로써 선별될 수 있다. 미국 특허 제4,965,199호를 참조하시오.
- [0158] 효모에서 사용하기에 적당한 선별 유전자로서는 효모 플라스미드인 YRp7 내에 존재하는 *trp1* 유전자가 있다 [Stinchcomb의 다수, *Nature*, 282: 39 (1979)]. 상기 *trp1* 유전자는 트립토판 내에서 생육하는 능력이 없는 효모의 돌연 변이 균주(예를 들어, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1)용 선별 마커를 제공한다 [Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977)]. 효모 숙주 세포 계통에 *trp1* 구역이 존재하면, 트립토판 부재 하에서의 성장 여부으로써 형질 전환이 되었는지를 검출하는데 효과적인 환경을 제공한다. 이와 유사하게, *Leu2*-결핍 효모 균주(ATCC 20,622 또는 ATCC 38,626)는 *Leu2* 유전자를 보유하는 공지의 플라스미드에 의해 보완된다. *Ura3*-결여 효모 균주는 *ura3* 유전자를 보유하는 플라스미드에 의해 보완된다.
- [0159] 뿐만 아니라, 1.6 μ m 환형 플라스미드 pKD1으로부터 유래하는 벡터는 *클루이베로마이세스* 효모의 형질 전환에 사용될 수 있다. 대안적으로, 재조합 소 키모신을 대규모로 생산하기 위한 발현 시스템은 *케이.락티스(K. lactis)* 용인 것으로 보고되었다 [Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990)]. 성숙한 재조합 인간 혈청 알부민 분 비용이며, *클루이베로마이세스*의 산업용 균주에 의해 생산되는, 안정형 다중-복사 발현 벡터에 관하여도 개시된 바 있다 [Fleer의 다수, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)].
- [0160] (4) 프로모터 구성 요소
- [0161] 발현 벡터 및 클로닝 벡터는 일반적으로, 숙주 유기체에 의하여 인지되며, 항체-암호화 핵산에 작동 가능하도록 결합되어 있는 프로모터를 함유한다. 원핵 생물 숙주와 함께 사용하기에 적당한 프로모터로서는, 아라비노스(예

를 들어, araB) 프로모터 phoA 프로모터, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 인산화 효소, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 그리고 하이브리드 프로모터 예를 들어, tac 프로모터를 포함한다. 그러나, 기타 공지된 박테리아 프로모터도 적당하다. 박테리아 시스템 내에서 사용되는 프로모터는 또한, 본 발명의 항체를 암호화하는 DNA에 작동 가능하도록 결합된 샤인-달가노(Shine-Dalgarno)(S.D.) 서열을 함유할 것이다.

[0162] 진핵 생물용 프로모터 서열에 관하여도 공지되어 있다. 실제로, 모든 진핵 생물 유전자는 전사가 개시되는 위치로부터 약 25~30 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 부위를 갖는다. 다수의 유전자의 전사를 개시하는 곳으로부터 70~80 염기 상류에서 발견되는 기타 서열로서는 CNCAAT 부위가 있는데, 여기서, 상기 N은 임의의 뉴클레오티드 일 수 있다. 대부분의 진핵 생물 유전자의 3' 말단부에는, 암호화 서열의 3' 말단부에 폴리 A 미부(poly A tail)를 추가하기 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 있다. 이와 같은 서열들은 전부 진핵 생물 발현 벡터에 적당히 삽입된다.

[0163] 효모 숙주에 사용하기 적당한 프로모터 서열의 예로서는, 3-포스포글리세레이트 키나제용 프로모터 또는 기타 해당 효소 예를 들어, 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소 효소, 헥소키나제, 피루베이트 탈탄소 효소, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이성화 효소, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이성화 효소, 포스포글루코스 이성화 효소, 그리고 글루코키나제용 프로모터를 포함한다.

[0164] 성장 조건에 의해서 제어되는 전사 상의 부가적인 이점을 가지는 유도성 프로모터인 기타 효모 프로모터로서는, 알콜 탈수소 효소 2, 이소시토크롬 C, 산성 인산화 효소, 질소 대사와 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소 효소, 그리고 말토스와 갈락토스 이용에 관여하는 효소용 프로모터 부위가 있다. 효모 발현에 사용하기 적당한 벡터와 프로모터에 관하여는 EP 73,657에 더욱 상세히 기술되어 있다. 유리하게, 효모 인헨서는 또한 효모 프로모터와 함께 사용된다.

[0165] 포유동물 숙주 세포 내에서 벡터로부터 항체를 전사하는 과정은 예를 들어, 바이러스 예를 들어, 아벨손(Abelson) 백혈병 바이러스, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 가장 바람직하게는 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 유인원 바이러스 40(SV40)의 계놈, 이종 포유동물 프로모터 예를 들어, 액틴 프로모터 또는 면역 글로불린 프로모터, 열-충격 프로모터로부터 얻어진 프로모터에 의해 제어되는데, 단, 이와 같은 프로모터들은 숙주 세포 시스템과 혼화 가능하다.

[0166] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 편리하게, SV40 바이러스의 복제 기원도 함유하는 SV40 제한 단편으로서 얻어진다. 인간 사이토메갈로바이러스의 즉시 초기 프로모터(immediate early promoter)는 편리하게, HindIII E 제한 단편으로서 얻어진다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주 내에서 DNA를 발현하는 시스템에 관하여는 미국 특허 제4,419,446호에 개시되어 있다. 이 시스템의 변형법에 관하여는 미국 특허 제4,601,978호에 개시되어 있다. 또한, 문헌[Reyes외 다수, Nature 297: 598-601 (1982)]에는, 마우스 세포 내에서 헤르페스 심플렉스 바이러스로부터 유래한 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 인간 β -인터페론 cDNA를 발현하는 것에 관하여 개시되어 있다. 대안적으로, 루 육종 바이러스의 장 말단 반복부(long terminal repeat)는 프로모터로 사용될 수 있다.

[0167] (5) 인헨서 요소 구성 요소

[0168] 고등 진핵 생물에 의하여 본 발명의 항체를 암호화하는 DNA를 전사시키는 것은 종종 인헨서 서열을 벡터에 삽입함으로써 강화된다. 다수의 인헨서 서열이 현재 포유동물 유전자(글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-태아 단백질 및 인슐린)로부터 유래하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 통상적으로는, 진핵 생물 세포 바이러스로부터 유래하는 인헨서가 사용될 것이다. 그 예로서는, 복제 기원의 후부에 위치하는 SV40 인헨서(bp 100~270), 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기원의 후부에 위치하는 폴리오마 인헨서, 그리고 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 또한, 문헌[Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982)]에는 진핵 생물 프로모터의 활성화를 위한 강화 요소에 관하여 개시되어 있다. 인헨서는 항체-암호화 서열에 대하여 벡터의 5' 또는 3' 위치에 스플라이싱될 수 있으나, 바람직하게는 상기 프로모터로부터 5' 위치에 존재한다.

[0169] (6) 전사 종결 구성 요소

[0170] 진핵 생물 숙주 세포(효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 기타 다세포 유기체로부터 유래하는 유핵 세포(nucleated cell)) 내에서 사용되는 발현 벡터는 또한 전사 종결에 필수적인 서열과 mRNA 안정화에 필수적인 서열을 함유할 것이다. 이와 같은 서열들은 일반적으로 진핵 생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 말단(때때로

는 3' 말단), 비번역 부위로부터 얻어진다. 이와 같은 부위들은 mRNA 암호화 항체의 비번역 부분 내 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 분절을 함유한다. 하나의 유용한 전사 종결 구성 요소로서는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 부위가 있다. WO 94/11026 및 본원에 개시된 발현 벡터를 참조하시오. 다른 예로서는 마우스 면역 글로불린 경쇄 전사 종결 인자가 있다.

[0171] (7) 숙주 세포의 선별 및 형질 전환

[0172] 본원의 벡터 내에서 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적당한 숙주 세포로서는 진술한 원핵 생물 세포, 효모 또는 고등 진핵 생물 세포가 있다. 이러한 목적으로서 적당한 원핵 생물로서는 진정 박테리아 예를 들어, 그람-네거티브 또는 그람-포지티브 유기체 예를 들어, 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*) 예를 들어, 에스케리치아(*Escherichia*) 예를 들어, 이.콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 어위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*) 예를 들어, 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*) 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 그리고 쉬겔라(*Shigella*), 그리고 바실리(*Bacilli*) 예를 들어, 비.서브틸리스(*B.subtilis*) 및 비.리케니포르미스(*B.licheniformis*)(예를 들어, 비.리케니포르미스 41P(DD 266,710, 1989년 4월 12일)), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 예를 들어, 피.아에루기노사(*P.aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 하나의 바람직한 이.콜라이 클로닝 숙주로서는 이.콜라이 294(ATCC 31,446)가 있으며, 다른 균주 예를 들어, 이.콜라이 B, 이.콜라이 X1776(ATCC 31,537), 그리고 이.콜라이 W3110(ATCC 27,325)도 적당하다. 이와 같은 예들은 제한적인 것이라기보다는 예시적인 것이다.

[0173] 원핵 생물에 더하여, 진핵 생물 미생물 예를 들어, 사상 진균 또는 효모도 항체-암호화 벡터용으로서 적당한 클로닝 숙주 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지아에, 또는 일반적인 제빵용 효모가 하등 진핵 생물 숙주 미생물 중에서 가장 많이 사용된다. 그러나, 다수의 기타 속, 종 그리고 균주들 예를 들어, 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스 숙주 예를 들어, 케이.락티스(*K.lactis*), 케이.프라질리스(*K.fragilis*)(ATCC 12,424), 케이.불가리쿠스(*K.bulgaricus*)(ATCC 16,045), 케이.위커라미(*K.wickeramii*)(ATCC 24,178), 케이.왈티(*K.waltii*)(ATCC 56,500), 케이.드로소필라룸(*K.drosophilum*)(ATCC 36,906), 케이.서모톨러란스(*K.thermotolerans*), 및 케이.마르시아누스(*K.marxianus*); 야로위아(*yarrowia*)(EP 402,226); 피치아 파스토르스(*Pichia pastors*)(EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 리시아(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈와니오마이세스(*Schwanniomyces*) 예를 들어, 슈와니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 그리고 사상 진균 예를 들어, 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 그리고 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 숙주 예를 들어, 에이.니둘란스(*A.nidulans*) 및 에이.나이저(*A.niger*)도 일반적으로 사용 가능하고, 본원에서 유용하게 이용된다.

[0174] 당화 항체의 발현용으로 적당한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래한다. 무척추 동물 세포의 예로서는 식물 세포 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 바클로바이러스 균주와 변이체, 그리고 숙주 예를 들어, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(췌기 벌레), 아에테스 아에집티(*Aedes aegypti*)(모기), 아에테스 알보픽투스(*Aedes albopictus*)(모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)(초파리), 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)로부터 유래하는 상용 허용 곤충 숙주 세포가 동정되었다. 다양한 형질 감염용 바이러스 균주 예를 들어, 오토그라파 캘리포니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*) NPV의 Bm-5 균주도 공중이 이용 가능하며, 이러한 바이러스는 본 발명에 의하여 본원에서, 특히, 스포도프테라 프루기페르다 세포를 형질 감염할 때 바이러스로서 사용될 수 있다.

[0175] 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토, 담배, 개구리밥과 기타 식물 세포의 식물 세포 배양액도 숙주로서 사용될 수 있다.

[0176] 그러나, 척추 동물이 가장 흥미를 끌고 있으며, 배양액(조직 배양액) 중 척추 동물 세포를 증식시키는 방법은 통상의 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예로서는, 중국 햄스터 난소 세포 예를 들어, CHOK1 세포(ATCC CCL61), DXB-11, DG-44 및 중국 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub외 다수, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); SV40에 의해 형질 전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배 신장 세포주(293 또는 현탁 배양액 중 생육시키기 위하여 서브 클로닝한 293 세포[Graham외 다수, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)]; 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리(Sertoli) 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 긴 꼬리 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁 경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL

34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather 외 다수, Annals N. Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 그리고 인간 간암 세포주(Hep G2)가 있다.

[0177] 숙주 세포는 전술한 항체 생산용 발현 벡터 또는 클로닝 벡터로 형질 전환 또는 형질 감염되어, 프로모터를 유도하거나, 형질 전환체를 선별하거나, 또는 원하는 서열을 암호화하는 유전자를 증폭시키는데 적당하도록 개질된 종래의 영양 배지 중에서 배양된다. 뿐만 아니라, 선별 마커로 구분된 다수의 전사 단위들을 포함하는 신규의 벡터와 이러한 벡터로 형질 감염된 세포주가 항체를 발현시키는데 특히 유용하고 바람직하다.

[0178] (8) 숙주 세포의 배양

[0179] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지 중에서 배양될 수 있다. 시판중인 배지 예를 들어, 햄(Ham) F10(Sigma), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium; MEM)(Sigma), RPMI-1640(Sigma), 그리고 돌베코 개질 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM)(Sigma)는 숙주 세포를 배양하는데 적당하다. 뿐만 아니라, 문헌[Ham 외 다수, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes 외 다수, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), 미국 특허 제4,767,704호; 동 제4,657,866호; 동 제4,927,762호; 동 제4,560,655호; 또는 동 제5,122,469호; WO 90103430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 제30,985호]에 개시된 배지 중 임의의 것을 숙주 세포용 배양 배지로서 사용할 수 있다. 이와 같은 배지 중 임의의 것은 필요에 따라서, 호르몬 및/또는 기타 성장 인자(예를 들어, 인슐린, 트랜스페린 또는 상피 성장 인자), 염(예를 들어, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충액(예를 들어, HEPES), 뉴클레오티드(예를 들어, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예를 들어, 겐타마이신™ 약품), 미량 원소(일반적으로 최종 농도가 마이크로몰 범위에 존재하는 무기 화합물에 한정), 그리고 글루코스나 균등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 기타 임의의 필수 보충물도 당 업자에게 적당한 것으로 알려진 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건 예를 들어, 온도 및 pH 등은 발현용으로 선택된 숙주 세포에 대해 예전부터 적용되어 오는 조건을 적용하고, 당 업자들은 이에 관하여 잘 알고 있을 것이다.

[0180] (9) 항체의 정제

[0181] 제조할 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내 즉, 세포질 주위 공간 내에서 생산될 수 있거나, 아니면 예를 들어, 미생물 배양액으로부터 유래하는 배지에 직접 분비될 수 있다. 만일 항체가 세포 내에서 생산되면, 첫 번째 행하여질 단계는, 예를 들어, 원심 분리 또는 한외 여과에 의해서 입자형 조각, 숙주 세포 또는 용해된 단편을 제거하는 것이다. 문헌[Better 외 다수 Science 240: 1041-1043 (1988); ICSU Short Reports 10: 105 (1990); 및 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 457-461 (1993)]에는, 이.콜라이의 세포질 주위 공간에 분비된 항체를 분리하는 방법에 관하여 개시되어 있다. [Carter 외 다수, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) 참조].

[0182] 미생물 세포 또는 포유동물 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들어, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 양이온 또는 음이온 교환 크로마토그래피와, 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있는데, 이때, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 단백질 A의 친화성 리간드로서의 적절성은, 항체에 존재하는 임의의 면역 글로불린 Fc 도메인의 종류와 이소타입형에 따라서 달라진다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 주성분으로 하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다[Lindmark 외 다수, J Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)]. 단백질 G는 모든 마우스 이소타입형과 인간 $\gamma 3$ 용으로서 추천되고 있다[Guss 외 다수, EMBO J. 5: 15671575 (1986)]. 친화성 리간드가 부착되어 있는 매트릭스로서는 아가로스가 가장 흔히 사용되지만, 다른 매트릭스도 사용할 수 있다. 물리적으로 안정한 매트릭스 예를 들어, 제어 공극(controlled pore) 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠을 사용할 경우, 아가르스를 사용할 경우보다 유속이 빠르고, 처리 시간이 단축될 수 있다. 항체가 C₃ 도메인을 포함할 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)가 정제용으로 유용하다. 기타 단백질 정제 기술 예를 들어, 이온-교환 컬럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전법, 역상 HPLC, 실리카 상 크로마토그래피, 헤파린 상 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 상 세포파로스™ 크로마토그래피(예를 들어, 폴리아스파르트산 컬럼), 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 그리고 황산 암모늄 침전법도, 회수될 항체에 따라서 사용될 수 있다.

[0183] **키메라 항체**

[0184] 사람의 체 내 설치류 항체를 단독으로 또는 접합체로서 반복 투여할 경우, 수용체에서는 설치류 항체에 대한 면역 반응을 일으킬 것이다[이를 소위 HAMA(Human Anti Mouse Antibody) 반응이라고 부름]. 상기 HAMA 반응은 반복 투여를 필요로 할 경우에는 약품의 효능을 제한할 수 있다. 친수성 중합체 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜로 항체를 화학 변형시키거나, 또는 항체 구조를 보다 인간과 유사한 구조(예를 들어, 키메라 항체, 인간화된

항체, 인간 항체 또는 휴먼 엔지니어링™된 항체)로 만드는 유전자 공학적 방법을 이용하면, 항체의 면역원성을 감소시킬 수 있다. 이와 같이 조작된 항체는, 마우스의 모노클로날 모 항체보다, 인간의 체 내에서의 면역원성이 약하므로, 상기 항체를 인간을 치료하는데 사용하면 과민증을 일으킬 위험성을 훨씬 낮출 수 있다. 그러므로, 이와 같은 항체들은 인간으로의 생체 내 투여에 관여하는 치료적 용도로서 바람직할 수 있다.

[0185] 마우스 모노클로날 항체의 가변 Ig 도메인이 인간의 불변 Ig 도메인과 융합되어 있는 키메라 모노클로날 항체는, 당 업계에 공지된 표준적인 방법을 이용하여 생산할 수 있다[Morrison, S. L., 외 다수 (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; 및 Boulianne, G. L., 외 다수, Nature 312, 643-646(1984)]. 예를 들어, CEA와 결합하는 설치류 항체의 가변 도메인에 대한 유전자 서열은 인간 골수종 단백질의 가변 도메인에 대한 유전자 서열과 치환될 수 있으므로, 재조합 키메라 항체가 생산될 수 있다. 이와 같은 방법에 관하여는 EP 194276, EP 0120694, EP 0125023, EP 0171496, EP 0173494 및 WO 86/01533에 개시되어 있다. 일부 키메라 모노클로날 항체는 인간의 체 내에서 면역원성이 약화되는 것으로 입증되었지만, 마우스 가변 Ig 도메인은 여전히 상당한 수준의 인간 항-마우스 반응을 유도할 수 있다.

[0186] **인간화된 항체**

[0187] 인간화된 항체는 다양한 방법 예를 들어, (1) 비인간 상보성 결정 부위(CDR)를 인간의 골격과 불변 부에 이식하는 방법(당 업계에서는 이를 "CDR 이식"을 통한 인간화라 부름), 또는 (2) 전체 비인간 가변 도메인을 이식하되, 표면 잔기를 치환함으로써 인간과 유사한 표면으로 이 도메인을 "은폐(cloaking)"시키는 방법(당 업계에서는 이를 "비니어링(veneering)"이라 부름)에 의하여 생산될 수 있다. 본 발명에 있어서, 인간화된 항체는 "인간화된" 항체와 "비니어링된" 항체 둘다를 포함할 것이다. 이러한 방법들에 관하여는 예를 들어, 각각 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Jones 외 다수, Nature 321:522 525 (1986); Morrison 외 다수, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851 6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65 92 (1988); Verhoeyer 외 다수, Science 239:1534 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169 217 (1994); 및 Kettleborough, CA. 외 다수, Protein Eng. 4(7):773 83 (1991)]에 개시되어 있다.

[0188] 예를 들어, 설치류 항체의 CDR 유전자 서열은 분리 또는 합성되어, 상동성 인간 항체 유전자의 상응하는 서열 부위에 대해 치환될 수 있으며, 그 결과, 기원 설치류 항체의 특이성을 가지는 인간 항체가 생산될 수 있다. 이와 같은 방법들에 관하여는 EP 023940, WO 90/07861 및 WO 91/09967에 개시되어 있다.

[0189] CDR 이식법은, 마우스 중쇄 및 경쇄 가변 Ig 도메인으로부터 유래하는 CDR 6개 중 하나 이상을, 인간 가변 Ig 도메인의 적당한 골격 부위 4개에 도입시키는 과정을 포함하는데, 이러한 과정을 CDR 이식이라고 부른다. 이 기술(Riechmann, L., 외 다수, Nature 332, 323 (1988))에서는, 항원과 1차적으로 접촉하는 CDR 루프를 지지하는 스캐폴드(scaffold)로서, 보존된 골격 부위(FR1~FR4)를 이용한다. 그러나, CDR 이식법의 단점은, 골격 부위의 아미노산이 항원 결합에 기여할 수 있으며, CDR 루프의 아미노산은 2개의 가변 Ig 도메인의 결합에 영향을 미침으로 말미암아, 기원 마우스 항체보다 결합 친화성이 훨씬 떨어지는 인간화된 항체가 생산될 수 있다는 점이다. 인간화된 모노클로날 항체의 친화성을 유지하기 위해서, 기원 마우스 항체의 골격 부위와 가장 유사한 인간 골격 부위를 선택하고, 항원 결합 위치를 컴퓨터 모델링의 도움을 받아서 골격 또는 CDR 내 하나의 아미노산을 위치-배향 돌연 변이 유발시킴으로써, CDR 이식 기술을 개선할 수 있다[예를 들어, Co, M. S., 외 다수 (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976].

[0190] 항체를 인간화시키는 한 가지 방법은, 비인간 중쇄 및 경쇄 서열을 인간의 중쇄 및 경쇄 서열에 대하여 정렬하는 단계, 이와 같은 정렬을 바탕으로 하여 비인간 골격을 선별하고 이 비인간 골격을 인간 골격과 치환하는 단계, 인간화된 서열의 형태를 예측하기 위해 분자 모델링을 수행하는 단계, 그리고 모 항체의 형태를 비교하는 단계를 포함한다. 이러한 단계들을 수행한 이후에는, 인간화된 서열 모델의 예측된 형태가 비인간 모 항체의 비인간 CDR의 형태와 매우 유사해질 때까지, CDR의 구조를 교란시키는 CDR 부위 내 잔기들을 반복적으로 역 돌연 변이시키는 단계를 수행한다. 이와 같이 인간화된 항체는 예를 들어, 애쉬웰(Ashwell) 수용체를 통하여, 흡수 및 소멸이 촉진되도록 추가로 유도체화될 수도 있다[예를 들어, 본원에 참고용으로 인용된 미국 특허 제 5,530,101호 및 동 제 5,585,089호 참조].

[0191] 합리적으로 고안된, 마우스 모노클로날 항체를 인간화시키는 다수의 방법에 관하여 보고된바 있다[예를 들어, 2002년 7월 11일자 출원된 20020091240, WO 92/11018 및 미국 특허 제 5,693,762호 및 동 제 5,766,866호 참조].

[0192] **휴먼 엔지니어링™된 항체**

- [0193] "휴먼 엔지니어링™된 항체(Human Engineered™ antibody)"란 어구는, 비인간 항체, 통상적으로 마우스 모노클로날 항체로부터 유래하는 항체를 의미한다. 대안적으로, 휴먼 엔지니어링™된 항체는 비인간 모 항체의 항원 결합 특성을 보유하거나 또는 실질적으로 보유하되, 인간에 투여시 모 항체에 비하여 면역원성은 떨어지는 키메라 항체로부터 유래할 수 있다.
- [0194] 항체 가변 도메인의 휴먼 엔지니어링™에 관하여는 스투드니카(Studnicka)의 문헌[Studnicka와 다수, 미국 특허 제5,766,886호; Studnicka와 다수 Protein Engineering 7: 805-814 (1994)]에, 항체 분자의 결합 활성은 유지하면서 면역원성을 감소시키는 방법이라고 개시되어 있다. 상기 방법에 의하면, 각각의 가변 부 아미노산에는 치환의 위험도가 할당된다. 아미노산 치환은 다음과 같은 3개의 위험도 카테고리 중 하나에 의해 구별된다: (1) 항원 결합을 최소한으로 방해하면서 면역원성을 감소시키는 잠재성은 최대인 저 위험도 변이; (2) 면역원성은 더욱 감소하지만, 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 영향을 미칠 가능성은 더욱 증가하는 중 위험도 변이; (3) 결합 또는 항체 구조 유지에 중요하며, 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 영향을 미칠 위험도는 최고인 고 위험도 잔기. 프롤린의 3차원 구조상 역할로 인하여 프롤린을 변형시킬 경우, 변형시킨 위치가 통상적으로 저 위험도 위치일 지라도, 일반적으로는 적어도 중 위험도 변이가 될 것으로 생각된다.
- [0195] 설치류 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 부는 다음과 같이 휴먼 엔지니어링™되어, 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 악영향을 미칠 것 같지는 않지만, 인간 체내에서의 면역원성은 감소할 것 같은 것으로 판단되는 위치에 있는 인간 아미노산을 치환한다. "저 위험도" 위치에 존재하며, 본 방법에 따라서 변형될 후보가 되는 아미노산 잔기는, 설치류 가변 부의 아미노산 서열과 인간의 가변 부 서열을 정렬함으로써 동정된다. 임의의 인간 가변 부 예를 들어, 개개의 V_H 또는 V_L 서열, 또는 인간의 공통 V_H 또는 V_L 서열, 또는 개개의 또는 공통된 인간 생식세포 서열이 사용될 수 있다. 임의의 수의 저 위험도 위치, 또는 저 위험도 위치 전부에 존재하는 아미노산 잔기는 변이될 수 있다. 예를 들어, 정렬된 쥐과 동물 및 인간 아미노산 잔기가 상이한 각각의 저 위험도 위치에, 설치류 잔기를 인간의 잔기로 치환하는 아미노산 변형이 도입된다. 대안적으로, 저 위험도 위치 모두와 임의의 수의 중 위험도 위치에 존재하는 아미노산 잔기가 변이될 수 있다. 이상적으로, 면역원성을 최소한으로 만들기 위해서, 저 위험도 위치와 중 위험도 위치 모두는 설치류 서열에서 인간 서열로 변이된다.
- [0196] 변형된 중쇄 및/또는 경쇄 가변 부를 함유하는 합성 유전자가 구성되어, 인간 γ 중쇄 및/또는 카파 경쇄 불변 부에 결합된다. 임의의 인간 중쇄 및 경쇄 불변 부는 휴먼 엔지니어링™된 항체 가변 부 예를 들어, IgA(임의의 하위 군에 속하는 것, 예를 들어, IgA1 또는 IgA2), IgD, IgE, IgG(임의의 하위 군에 속하는 것, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), 또는 IgM과 함께 사용될 수 있다. 인간 중쇄 및 경쇄 유전자는 숙주 세포 예를 들어, 포유동물 세포에 도입되며, 그 결과, 재조합 면역 글로불린 생산물이 생성되어 특성 규명된다.
- [0197] **유전자 이식 동물로부터 유래하는 인간 항체**
- [0198] 내부적으로 면역 글로불린이 생산되지 않고, 인간의 면역 글로불린 위치들을 함유하도록 조작된 유전자 이식 동물을 사용하여, 표적 항원에 대한 인간 항체를 생산할 수도 있다. 예를 들어, WO 98/24893에는, 인간 Ig 위치를 가지는 유전자 이식 동물에 관하여 개시되어 있는데, 여기서, 상기 동물은 내인성 중쇄 및 경쇄 위치의 불활성화로 말미암아 기능성 면역 글로불린을 내부적으로 생산하지 않는다. WO 91/10741에는 또한 면역원에 대한 면역 반응을 측정할 수 있는 유전자 이식 비영장류 포유동물 숙주에 관하여 개시되어 있는데, 여기서, 상기 항체는 영장류의 불변 부 및/또는 가변 부를 보유하고, 또한 내인성 면역 글로불린 암호화 위치는 치환되거나 불활성화된다. WO 96/30498에는, 포유동물 내 면역 글로불린 위치를 변형시키기 위하여(예를 들어, 변형된 항체 분자를 생산하기 위해서 불변 부 또는 가변 부의 일부 또는 전부를 치환하기 위하여) Cre/Lox 시스템을 사용하는 것에 대해 개시되어 있다. WO 94/02602에는, 불활성화된 내인성 Ig 위치와 기능성 인간 Ig 위치를 가지는 비인간 포유동물 숙주에 관하여 개시되어 있다. 미국 특허 제5,939,598호에는, 마우스가 내인성 중쇄를 가지지 아니하고, 하나 이상의 이중 발생 불변 부를 포함하는 외인성 면역 글로불린 위치를 발현하는 유전자 이식 마우스를 생산하는 방법에 관하여 개시되어 있다.
- [0199] 전술한 유전자 이식 동물을 사용함으로써, 선별된 항원 분자에 대한 면역 반응을 일으킬 수 있으며, 항체 생산 세포는 동물로부터 분리되어, 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생산하는데 사용될 수 있다. 면역화 과정 및 애뉴만트 등에 관하여는 당 업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, WO 96/33735에 개시된 바와 같이 유전자 이식 마우스의 면역화에 사용될 수 있다. 이 문헌에는 다양한 항원 분자 예를 들어, IL-6, IL-8, TNF- α , 인간 CD4, L 셀렉틴, gp39 및 과산화 독소에 대한 모노클로날 항체에 관하여 개시되어 있다. 모노클로날 항체는 상응하는 단백질의 생물 활성 또는 생리적 효과를 억제 또는 중화하는 능력에 대해 테스트될 수 있다. WO 96/33735에는, IL-8, 차단된 IL-8로 면역화된 유전자 이식 마우스의 면역 세포로부터 유래하는, IL-

8에 대한 모노클로날 항체가 호중구의 작동을 유도한다고 개시되어 있다. 유전자 이식 동물을 면역화하는데 사용된 항원에 대해 특이성을 가지는 인간의 모노클로날 항체에 관하여는 WO 96/34096과 미국 특허 출원 제 20030194404호; 및 미국 특허 출원 제20030031667호에 개시되어 있다. 예를 들어, 문헌[Jakobovits의 다수, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits의 다수, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann 외 다수, Year in Immuno., 7:33 (1993); 및 미국 특허 제5,591,669호, 동 제5,589,369호, 동 제5,545,807호; 및 미국 특허 출원 제20020199213호, WO 96/34096 및 미국 특허 출원 제20030194404호; 및 미국 특허 출원 제 20030031667호]을 참조하십시오.

[0200] 모노클로날 항체를 생산하는데 유용한 부가의 유전자 이식 동물로서는, 인간 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하고, 재배열되지 않은 인간 항체 유전자로부터 유래하는 유전자 서열을 함유하는, 메다텍스(Medarex) HuMAB-마우스(MOUSE)®[미국 특허 제5,770,429호 및 문헌(Fishwild, 외 다수, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996)]를 포함한다. HuMAB-마우스®를 면역화함으로써, 표적 단백질에 대한 모노클로날 항체를 생산할 수 있다.

[0201] 또한, 이시다(Ishida)외 다수(Cloning Stem Cells. 4:91-102, 2002)에는, 인간 DNA의 메가베이스 크기의 분절을 포함하고, 전체 인간 면역 글로불린(hIg) 위치가 통합된 트랜스크로모 마우스(TransChromo Mouse; TCMOUSE™)에 관하여 개시되어 있다. 상기 TCMOUSE는 IgG의 하위 군(IgG1~G4) 모두를 포함하는, 전체적으로 다양한 hIg의 레퍼토리를 가진다. TCMouse를 다양한 인간 항원으로 면역화시키면, 인간 항체가 관여하는 항체 반응을 나타낸다.

[0202] 미국 특허 출원 제20030092125호에는, 원하는 에피토프에 대한 동물의 면역 반응을 편향(biasing)시키는 방법에 관하여 개시되어 있다. 인간 항체는 또한 시험관 내 활성화 B 세포에 의해 생산될 수도 있다[미국 특허 제 5,567,610호 및 동 제 5,229,275호 참조].

[0203] **파지 디스플레이 기술로부터 생산된 항체**

[0204] 재조합 인간 항체 유전자의 레퍼토리를 제조하는 기술의 개발과, 암호화된 항체 단편을 사상 박테리오파지 표면 상에 디스플레이시키는 것은, 인간 항체를 직접 생산하여 선별하기 위한 재조합 수단을 제공하는 것으로서, 이는 또한 인간화된 항체, 키메라 항체, 쥐과 동물 항체 또는 뮤테인 항체에도 적용할 수 있다. 파지 기술에 의해 생산된 항체는 항원 결합 단편(일반적으로는 Fv 또는 Fab 단편)으로서, 박테리아 내에서 생산되므로, 효과기 기능이 결여되어 있다. 효과기 기능은 다음과 같은 2가지 기법 중 어느 하나에 의해서 도입될 수 있는데: 즉, 단편은 포유동물 세포 내 발현용인 완전 항체에 조각되어 도입될 수 있거나, 또는 효과기 기능을 촉발시킬 수 있는 제2의 결합 위치를 가지는 이중 특이적 항체 단편에 조각되어 도입될 수 있다.

[0205] 통상적으로, 항체의 Fd 단편(V_H-C_H1)과 경쇄(V_L-C_L)는 PCR에 의해 별도로 크로닝된 후, 조합형 파지 디스플레이 라이브러리 내에서 무작위로 재조합되고, 그 다음, 특정 항원에 결합하는지 여부를 통해 선별될 수 있다. Fab 단편은 파지 표면상에서 발현되는데, 다시 말해서, 이 단편을 암호화하는 유전자에 물리적으로 결합된다. 그러므로, 항원 결합에 의해 Fab을 선별하면, Fab 암호화 서열도 함께 선별되는 것이며, 추후 상기 Fab 암호화 서열이 증폭될 수 있는 것이다. 항원 결합과 재증폭 과정, 즉, 패닝(panning)이라고 불리는 과정을 수 회 거침으로써, 항원에 특이적인 Fab은 증폭되어 궁극적으로는 분리된다.

[0206] 1994년, 항체의 인간화에 대한 연구(소위 "유도 선별(guided selection)"이라고 칭하여짐)에 관하여 기술된 바 있다. 상기 유도 선별 과정에서는, 마우스 모노클로날 항체의 인간화를 위한 파지 디스플레이 기술의 위력을 이용한다[Jespers, L. S., 외 다수, Bio/Technology 12, 899-903 (1994) 참조]. 이 과정에 있어서, 마우스 모노클로날 항체의 Fd 단편은 인간 경쇄 라이브러리와 함께 디스플레이될 수 있으며, 이후 상기 결과로 생성된 하이브리드 Fab 라이브러리를 항원을 이용하여 선별할 수 있다. 그러므로, 마우스 Fd 단편이, 선별 과정을 유도하기 위한 주형이 되는 것이다. 이후, 선별된 인간의 경쇄를 인간의 Fd 단편 라이브러리와 조합한다. 결과로 생성된 라이브러리의 선별을 통하여 완전히 인간의 것인 Fab가 생성된다.

[0207] 파지-디스플레이 라이브러리로부터 인간 항체를 유도하는 다수의 방법에 관하여 개시된바 있다[예를 들어, Hoogenboom외 다수, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks외 다수, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); 미국 특허 제 5,565,332호 및 동 제5,573,905호; Clackson, T., and Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994) 참조]. 특히, 파지 디스플레이 라이브러리로부터 유래하는 항체의 시험관 내 선별 및 진화 방법은 강력한 도구가 되고 있다[Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); 및, Winter, G., 외 다수, Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); 미국 특허 출원 제20020004215호 및 WO 92/01047; 미국 특허 출원 제20030190317호(2003년 10월 9일) 및 미국 특허 제6,054,287호; 미국 특허 제5,877,293호].

- [0208] 문헌[Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187-193, 그리고 미국 특허 출원 제 200120030044772호(2003년 3월 6일)]에는, 캡처 리프트(capture lift)에 의하여 파지-발현 항체 라이브러리 또는 기타 결합 분자를 스크리닝하는 방법에 관하여 개시되어 있는데, 이 방법은 고형 지지체 상에 존재하는 후보 결합 분자를 고정화시키는 단계를 포함한다.
- [0209] 항체 생성물은, 본원의 "스크리닝 방법"이라는 표제의 섹션에 기술되어 있는 검정법 또는 당 업계에 공지된 적당한 검정법을 이용하여, 본 발명의 치료 방법에 있어서의 활성과 적합성에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0210] **아미노산 서열 뮤테인**
- [0211] 본 발명의 항체로서는 모 항체의 뮤테인을 포함하는데, 여기서, 모 항체의 폴리펩티드 서열은 가변 부 또는 가변 부와 동등한 부분 예를 들어, CDR 내에서의 1회 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입에 의해 변형되며, 이때, 상기 뮤테인은 원하는 결합 친화성 또는 생물 활성을 보유한다. 뮤테인은 모 항체와 실질적으로 상동성이거나 또는 실질적으로 동일할 수 있는데, 예를 들어, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 동일하거나 상동성일 수 있다. 본원에서, 서열에 관한 동일성 또는 상동성은, 필요에 따라서, 최대의 서열 동일성%를 이루도록 서열을 정렬하고 갭(gap)을 삽입한 후(서열 동일성의 일환으로서 임의의 보존적 치환은 고려하지 않음)의, 모 서열 내 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내 아미노산 잔기의 %로서 정의된다. 항체 서열의 N-말단, C-말단 또는 내부 연장부, 결실부 또는 삽입부 중 어느 것도 서열 동일성 또는 상동성에 영향을 미치는 것으로 해석되어서는 안 될 것이다. 그러므로, 서열 동일성은 2개의 폴리펩티드의 아미노산들 위치 내 유사성을 비교하는데 일반적으로 사용되는 표준적인 방법에 의하여 측정될 수 있다. 컴퓨터 프로그램 예를 들어, BLAST 또는 FASTA를 사용할 경우, 2개의 폴리펩티드는 각각의 아미노산들이 최적으로 매칭되도록 (하나의 서열 또는 양 서열의 전체 길이를 따르거나, 또는 하나의 서열 또는 양 서열의 소정 부분을 따라서) 정렬된다. 상기 프로그램은 디폴트 개방 패널티(default opening penalty) 또는 디폴트 갭 패널티(default gap penalty)를 제공하며, 스코어링 매트릭스(scoring matrix) 예를 들어, PAM 250[표준적인 스코어링 매트릭스; Dayhoff의 다수, Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 (1978)]은 컴퓨터 프로그램과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 동일성%는 이후 다음과 같이 계산될 수 있다: (동일한 매칭부의 총 수 × 100) ÷ (매칭된 확장 범위 내 더욱 긴 서열의 길이 + 2개의 서열을 정렬하기 위해 더욱 긴 서열에 도입된 갭의 수).
- [0212] 본 발명의 항체는 또한 불변 부의 폴리펩티드 서열 내에 변형을 포함할 수도 있는데, 여기서, 상기 변형은 결합 친화성에는 영향을 미치지 않을 것이지만, 효과기 기능 예를 들어, 항체-의존성 세포 독성(ADCC), 보체 의존성 세포 독성(CDC) 또는 소멸 및 흡수 능(그리고 이것이 반감기에 미치는 영향력)을 변경할 수 있다.
- [0213] **삽입**
- [0214] 아미노산 서열의 삽입으로서, 그 길이가 하나의 잔기로부터 수백 개의 잔기들을 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노-말단 및/또는 카복실-말단 융합과, 하나의 아미노산 잔기 또는 다수 개 예를 들어, 2개, 3개 또는 그 이상의 아미노산 잔기들로 이루어진 서열 내에 발생하는 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로서는, N-말단 메티오닐 잔기를 보유하는 항체, 또는 에피토프 태그 또는 구원 수용체 에피토프(salvage receptor epitope)에 융합된 항체(항체 단편 포함)를 포함한다. 기타 항체 분자의 삽입형 뮤테인으로서, 예를 들어, N-말단 또는 C-말단에, 당화 위치가 부가된 것, 분자 내 결합 또는 분자 간 결합을 위하여 시스테인이 부가된 것, 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드와 융합된 것을 포함한다. 예를 들어, 시스테인 결합(들)은, 특히, 항체가 항체 단편 예를 들어, Fv 단편인 경우, 항체의 안정성을 개선하기 위하여 항체에 부가될 수 있다
- [0215] 항체의 당화는 통상적으로 N-결합 또는 O-결합된다. N-결합되었다는 의미는, 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 부가 부착되었음을 의미한다. 트리펩티드 서열 즉, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 부를 아스파라긴 측쇄에 효소에 의해 부착시키기 위한 인지 서열이다. 폴리펩티드 내에 이러한 트리펩티드 서열들 중 어느 하나가 존재하면, 잠재적인 당화 위치가 형성된다. 그러므로, 아미노산 서열을 변형시켜, 이 아미노산 서열이 상기 트리펩티드 서열 중 하나 이상을 함유하도록 만듦으로써, N-결합된 당화 위치를 항체에 부가할 수 있다. O-결합 당화란, 당인 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스, 또는 자일로스 중 어느 하나가 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착된 것을 의미하는데, 다만, 이 때, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신도 사용될 수 있다. O-결합 당화 위치는, 기원 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 삽입 또는 치환함으로써, 항체에 부가될 수 있

다.

- [0216] "에피토프 태깅된(epitope tagged)"이란 용어는, 항체가 에피토프 태그에 융합된 경우를 의미한다. 에피토프 태그 폴리펩티드는 항체가 생산되도록 할 수 있는 에피토프를 제공하기에 충분한 잔기를 가지지만, 그 길이가 짧아서 항체의 활성을 방해하지는 않는다. 에피토프 태그는 충분히 유일해서, 이에 대한 항체가 다른 에피토프와 실질적으로 교차 반응하지 않는 것이 바람직하다. 적당한 태그 폴리펩티드는 일반적으로, 6개 이상의 아미노산 잔기를 가지며, 보통은 약 8~50개의 아미노산 잔기(바람직하게는 약 9~30개의 잔기)를 가진다. 그 예로서는, 플루 HA 태그 폴리펩티드 및 이의 항체 12CA5[Field외 다수, Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)]; c-myc 태그 및 그에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체[Evan외 다수, Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610-3616 (1985)]; 그리고 헤르페스 심플렉스 바이러스 당단백질 D(gD) 태그 및 이의 항체[Paborsky외 다수, Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)]를 포함한다. 대표적인 기타 태그로서는 니켈 킬레이트화에 의해 표지화된 화합물을 분리할 수 있도록 만들어주는 폴리-히스티딘 서열(일반적으로 약 6개의 히스티딘 잔기들로 이루어진 서열)이 있다. 기타 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 당 업계에서 통상적으로 사용되는 표지 및 태그 예를 들어, FLAG® 태그(Eastman Kodak, Rochester, NY)도 본 발명에 포함된다.
- [0217] 본원에 사용된 "구원 수용체 결합 에피토프(salvage receptor binding epitope)"라는 용어는, IgG 분자의 생체 내 혈청 반감기를 증가시키는데 관여하는 IgG 분자(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 Fc 부위의 에피토프를 의미한다.
- [0218] **결실**
- [0219] 아미노산 서열의 결실로서는, 그 길이가 하나의 잔기로부터 수백 개의 잔기에 이르는 아미노-말단 및/또는 카복실-말단 결실과, 이로 인하여 형성된 단편(표적 항원에 대한 결합 친화성을 보유하는 단편), 그리고 하나의 아미노산 잔기 또는 다수 개 예를 들어, 2개, 3개 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 서열 내에 발생한 결실을 포함한다. 예를 들어, 당화 위치는 당화를 위한 트리펩티드 또는 기타 인지서열 중 일부 또는 전부를 결실시킴으로써, 결실될 수 있거나 또는 상이한 위치로 이동할 수 있다.
- [0220] **치환**
- [0221] 뮤테인의 다른 유형으로는 아미노산 치환 뮤테인이 있다. 이와 같은 뮤테인은 항체 분자 내 하나 이상의 아미노산 잔기가 분리되었으며, 그 아미노산이 있던 위치에 상이한 잔기가 삽입되어 있다. 초 변이 부위 또는 CDR 부위 또는 골격 부위 중 임의의 부위에서 발생하는 치환 돌연 변이가 고려된다. 보존적 치환에 관하여는 표 2에 제시하였다. 가장 보존적인 치환은 "바람직한 치환"이라는 표제 하에 제시하였다. 만일 이와 같은 치환이 생물 활성을 변이시키지 않으면, 보다 실질적인 변이(표 1에 "대표적인 치환"이라 명명함), 또는 이하에 아미노산 군에 관하여 더욱 상세히 기술한 바와 같은 변이를 도입할 수 있으며, 이에 따른 생성물을 스크리닝할 수 있다.

[0222] [표 2]

| 기 원 | 예 시 | 바람직한 치환 잔기 |
|---------|-----------------------------------|-------------|
| Ala (A) | val; leu; ile | val |
| Arg (R) | lys; gln; asn | lys |
| Asn (N) | gln; his; asp, lys; gln | arg |
| Asp (D) | glu; asn | glu |
| Cys (C) | ser; ala | ser |
| Gln (Q) | asn; glu | asn |
| Glu (E) | asp; gln | asp |
| Gly (G) | ala | |
| His (H) | asn; gln; lys; arg | |
| Ile (I) | leu; val; met; ala; phe; | leu 노르루신 |
| Leu (L) | 노르루신 ; ile; val; met; ala; phe | ile |
| Lys (K) | arg; gln; asn | arg |
| Met (M) | leu; phe; ile | leu |
| Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr | |
| Pro (P) | ala | |
| Ser (S) | thr | |
| Thr (T) | ser | ser |
| Trp (W) | tyr; phe | tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser | phe |
| Val (V) | ile; leu; met; phe; ala; 노르루신 | leu |

[0223]

[0224] 항체의 생물 특성은, 치환이 (a) 치환 영역 내 폴리펩티드 주쇄의 구조를 예를 들어, 시트 또는 나선 형과 같은 형태로 유지시키거나, (b) 표적 위치에서 상기 분자의 전하 또는 소수성을 유지시키거나, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지시키는 효과가 상당히 상이한 치환을 선별함으로써 실질적으로 변이된다. 천연 생성 잔기는 일반적인 측쇄의 특성에 따라서 다음과 같은 군들로 분류된다:

- [0225] (1) 소수성: 노르루신, met, ala, val, leu, ile;
- [0226] (2) 중성 및 친수성: cys, ser, thr;
- [0227] (3) 산성: asp, glu;
- [0228] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;
- [0229] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 그리고
- [0230] (6) 방향성: trp, tyr, phe.
- [0231] 보존적 치환은, 아미노산을 그것이 속하는 군의 다른 일원과 치환하는 것을 포함한다. 비보존적 치환은, 상기

군들 중 어느 하나에 속하는 일원과 다른 군에 속하는 일원을 치환하는 것을 포함한다.

- [0232] 항체의 적당한 형태를 유지시키는데 관여하지 않는 임의의 시스템인 잔기는 또한 일반적으로, 세린과 치환되어, 분자의 산화 안정성을 개선하고, 비정상적인 가교가 형성되는 것을 막아줄 수 있다.
- [0233] 친화성 성숙법은 일반적으로, 모 항체의 CDR 내 치환이 발생한 항체 뮤테인을 제조 및 스크리닝한 후, 생물 특성 예를 들어, 모 항체에 대한 결합 친화성이 개선된 뮤테인을 선별하는 과정을 포함한다. 이와 같은 치환 뮤테인을 생산함에 있어서 편리한 방법으로서, 파지 디스플레이법을 이용하는 친화성 성숙법이 있다. 간단히 말해서, 몇몇 초 변이 부위 위치(예를 들어, 6~7개의 위치)는 돌연 변이되어, 일어날 수 있는 모든 아미노산 치환을 각각의 위치에 포함하게 된다. 이와 같이 생성된 항체 뮤테인은 사상 파지 입자로부터 1가 형태(각각의 입자로 패키징된 M13의 유전자 III 생산물에 대한 융합체)로 디스플레이된다. 이후, 파지-디스플레이된 뮤테인은 이것들의 생물 활성(예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝된다. 예를 들어, 문헌[WO 92/01047, WO 93/112366, WO 95/15388 및 WO 93/19172]을 참조하시오.
- [0234] 현재 실시되고 있는 항체 친화성 성숙법은 2개의 돌연 변이 유발법 카테고리[확률적 방법과 비확률적 방법]에 속한다. 오류 유발 PCR, 돌연 변이 유발 유전자 박테리아 균주(Low와 다수, J. Mol. Biol. 260, 359-68, 1996), 및 포화 돌연 변이 유발법(Nishimiya와 다수, J Biol. Chem. 275:12813-20, 2000; Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85, 2002)은 확률적 돌연 변이 유발법의 전형적인 예이다[Rajpal와 다수, Proc Natl Acad Sci USA. 102:8466-71, 2005]. 비확률적 기술에서는 종종 특이적인 뮤테인의 한정된 수집체를 얻어 내기 위하여 알라닌-스캐닝 또는 위치-배향 돌연 변이 유발법을 이용한다. 이하, 몇몇 방법들에 관하여 더욱 상세히 기술하였다.
- [0235] 패닝법을 통한 친화성 성숙법 - 재조합 항체의 친화성 성숙법은 일반적으로 항원이 소량으로 존재할 때, 후보 항체의 패닝 과정을 수 회 거침으로써 수행된다. 패닝 과정마다 항원의 양을 줄이면, 항원에 대한 친화성이 가장 큰 항체가 선별되며, 이로써, 출발 물질을 포함하는 다량의 풀로부터 고 친화성 항체를 얻을 수 있게 된다. 패닝을 통한 친화성 성숙법에 관하여는 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 이에 관하여는 예를 들어, 문헌[Huls와 다수, Cancer Immunol Immunother. 50:163-71, 2001]에 개시되어 있다. 파지 디스플레이 기술을 이용하는 친화성 성숙법에 관하여는 본원의 또 다른 부분에 기술되어 있으며, 당 업계에도 공지되어 있다[예를 들어, Daugherty와 다수, Proc Natl Acad Sci USA. 97:2029-34, 2000 참조].
- [0236] 간과 돌연 변이 유발법(*look-through mutagenesis*) - 간과 돌연 변이 유발법(LTM)(Rajpal와 다수, Proc Natl Acad Sci USA. 102:8466-71, 2005)은 항체-결합 위치를 신속하게 맵핑(mapping)하는 방법을 제공한다. LTM에 있어서는, 항체의 6개 CDR 전부에 존재하는 모든 위치에 결합할 수 있도록 만드는 기능성 측쇄를 분해하는, 9개의 아미노산(20개의 천연 아미노산에 의해 제공되는 측쇄의 주요 화학적 성질을 나타냄)을 선별한다. 각각의 "야생형" 잔기가 9개의 선별된 아미노산 중 하나에 의하여 계통적으로 치환될 경우, LTM을 통하여 CDR 내 일련의 위치별 단일 돌연 변이가 발생한다. 돌연 변이된 CDR이 조합되면, 모든 뮤테인의 정량적 디스플레이를 방해하지 않고, 복잡도(complexity)와 크기가 큰 조합형 단일 사슬 가변 단편(scFv) 라이브러리가 생성된다. 포지티브 선별 후, 결합성이 개선된 클론들이 서열 결정되면, 유익한 돌연 변이가 맵핑된다.
- [0237] 오류-유발 PCR - 오류-유발 PCR은, 상이한 선별 단계들이 진행되는 사이에 핵산을 무작위화(randomization)시키는 단계를 포함한다. 상기 무작위화는, 사용된 중합 효소의 본질적인 오류 유발 비율로 인하여 낮은 비율로 발생하지만, 전사시 본질적인 오류 유발 비율이 높은 중합 효소를 사용하는 오류-유발 PCR(Zaccolo와 다수, J. Mol. Biol. 285:775-783, 1999)에 의해 개선될 수 있다[Hawkins와 다수, J Mol. Biol. 226:889-96, 1992]. 돌연 변이 주기를 거친 후, 항원에 대한 친화성이 개선된 클론들을 당 업계에서 통상적으로 실시되는 방법을 이용하여 선별한다.
- [0238] DNA 서플링 - 핵산 서플링은 더욱 짧거나 더욱 작은 폴리뉴클레오티드 풀을 시험관 내 또는 생체 내에서 상동성 재조합시켜, 변이체 폴리뉴클레오티드를 생산하는 방법이다. DNA 서플링에 관하여는 미국 특허 제6,605,449호 및 미국 특허 제6,489,145호, WO 02/092780 및 문헌[Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 :10747-51 (1994)]에 개시되어 있다. 일반적으로, DNA 서플링은 다음과 같이 3개의 단계로 이루어져 있다: 서플링될 유전자를 DNaseI으로 단편화시키는 단계, 단편을 무작위로 혼성화하여 재조합하는 단계, 또는 DNA 중합 효소의 존재 하에서, 단편화된 유전자를 PCR에 의해 채우는 단계(유성 PCR; sexual PCR), 그리고 재조합된 생산물을 종래의 PCR에 의해서 증폭시키는 단계.
- [0239] DNA 서플링은, 역 연쇄 반응이라는 점에서, 오류-유발 PCR과는 상이하다. 오류-유발 PCR에 있어서, 중합 효소

개시 위치의 수와 분자의 수는 지수적으로 증가한다. 이와는 반대로, 핵산 제조법 또는 무작위적인 폴리뉴클레오티드의 서플링에 있어서, 개시 위치의 수와 무작위적인 폴리뉴클레오티드의 수(크기가 아님)는 시간이 경과함에 따라서 감소한다.

[0240] 항체의 경우, DNA 서플링을 통하여 예를 들어, CDR1 전부와 CDR2 전부를 CDR3 전부와 함께 자유롭게 조합하여 결합시킬 수 있다. 다수의 서열 군은 동일한 반응에서 서플링될 수 있음을 알 수 있다. 뿐만 아니라, 서플링시에는 일반적으로 상대적인 순서가 보존되는데, 예를 들어, CDR1은 CDR2의 위치에서 발견되지 않을 것이다. 희귀한 서플링 대상은 최선인(예를 들어, 친화성이 가장 큰) CDR을 다수 함유할 것이며, 이와 같이 희귀한 서플링 대상은 그것의 우수한 친화성을 바탕으로 하여 선별될 수 있다.

[0241] DNA 서플링에서 사용될 수 있는 주형 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 재조합 또는 제조법될 폴리뉴클레오티드의 길이가 더욱 짧은지 아니면 더욱 작은지 여부에 따라서, 또는 유전자의 크기에 따라서, 주형 폴리뉴클레오티드의 길이는 다양할 수 있다. 바람직하게, 주형 폴리뉴는 50bp~50kb이다. 주형 폴리뉴클레오티드는 종종 이중 사슬일 수 있다.

[0242] 주형 폴리뉴클레오티드와 동일한 부위 및 주형 폴리뉴클레오티드와 이질적인 부위를 가지는 단일 사슬 또는 이중 사슬 핵산 폴리뉴클레오티드는, 유전자 선별 과정의 초기 단계에 주형 폴리뉴클레오티드에 부가될 수 있다. 또한, 상이하되 관련되어 있는 2개의 폴리뉴클레오티드 주형은 이와 같은 초기 단계에서 혼합될 수 있는 것으로 생각된다.

[0243] 알라닌 스캐닝 - 항원과의 결합에 지대한 기여를 하는 초 변이 부위 잔기를 동정하기 위해 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발법을 수행할 수 있다[Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085, 1989]. 표적 잔기 또는 표적 잔기 군은 동정되어(예를 들어, 하전 잔기 예를 들어, arg, asp, his, lys 및 glu) 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 치환되며, 그 결과, 아미노산과 항원 간의 상호 작용에 영향을 미친다. 이후, 이와 같이 치환에 대하여 기능상 감수성을 나타내는 아미노산의 위치는, 치환 위치에 또는 이 치환 위치에 대하여 추가의 돌연 변이 또는 기타 돌연 변이를 도입함으로써 재정비된다. 그러므로, 아미노산 서열 변이를 도입시키는 위치는 예정되어 있는 반면에, 돌연 변이 자체의 특성은 예정되어 있을 필요가 없다. 예를 들어, 소정의 위치에서의 돌연 변이 수행 결과를 분석하기 위해, 표적 코돈 또는 부위에서 ala 스캐닝 또는 무작위 돌연 변이 유발법이 수행되며, 발현된 항체 뮤테인은 원하는 활성에 대해 스크리닝된다.

[0244] 컴퓨터-보조 디자인 - 대안적으로, 또는 부가적으로, 항체와 항원 사이의 접촉 지점을 동정하기 위하여 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하거나, 또는 이와 같은 접촉 지점을 모델링하는 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 이와 같은 접촉 잔기와, 인접하여 존재하는 잔기는, 본원에 개시된 기술에 의한 치환에 있어서 후보 잔기이다. 일단 이와 같은 뮤테인이 생성되면, 뮤테인 패널은 본원에 개시된 바와 같이 스크리닝되며, 하나 이상의 관련 검정법에 있어서 우수한 특성을 갖는 것으로 확인된 항체는 추가의 개발을 위해 선별될 수 있다.

[0245] 친화성 성숙법은, 모 항체의 CDR 내에 치환이 발생한 항체 뮤테인을 제조 및 스크리닝하는 단계와, 생물학적 특성 예를 들어, 결합 친화성이 모 항체의 결합 친화성에 비하여 개선된 뮤테인을 선별하는 단계를 포함한다. 이와 같은 치환형 뮤테인을 생산하기 편리한 방법으로서, 파지 디스플레이법을 이용한 친화성 성숙법이 있다. 간단히 말해서, 몇몇 초 변이 부위 위치(예를 들어, 6~7개의 위치)가 돌연 변이되면, 각각의 위치에서 일어날 수 있는 모든 아미노산 치환이 발생하게 된다. 그러므로, 생산된 항체 뮤테인은 사상 파지 입자로부터, 각 입자에 패키징된 M13의 유전자 III 생산물과의 융합체로서, 1가 형태로 디스플레이된다. 이후, 파지-디스플레이된 뮤테인은 이것의 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝된다.

[0246] 항원 결합에 상당한 기여를 하는 초 변이 부위 잔기를 동정하기 위하여 알라닌 스캐닝 돌연 변이 유발법을 수행할 수 있다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 항원 사이의 접촉 지점을 동정하는 것이 유리할 수 있다. 이와 같은 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본원에 개시된 기술에 의한 치환에 있어서 후보 잔기가 된다. 일단, 이러한 뮤테인이 생산되면, 뮤테인 패널은 본원에 개시된 바와 같이 스크리닝되며, 하나 이상의 관련 검정법에서 우수한 특성을 갖는 것으로 확인된 항체들은 추가의 개발을 위해 선별될 수 있다.

[0247] **변이된 효과기 기능**

[0248] 항체의 기타 변형법도 고려된다. 예를 들어, 암을 치료함에 있어서 항체의 효능을 강화하기 위해, 효과기 기능과 관련하여 본 발명의 항체를 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 시스템인 잔기(들)는 Fc 부위에 도

입될 수 있는데, 이로써, 이 부위에 사슬 간 이황화 결합이 형성될 수 있다. 이와 같이 제조된 동종 이량체 항체는 내재화 기능이 개선될 수 있으며/있거나, 보체-매개 세포 사멸능 및 항체-의존성 세포 독성(ADCC)이 증가할 수 있다. 문헌[Caron의 다수, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) 및 Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)]을 참조하시오. 활성이 강화된 상동 이량체 항체는 또한 문헌[Wolff의 다수, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)]에 개시된 바와 같이, 이중 이 작용성 가교제를 사용하여 제조될 수도 있다. 대안적으로, Fc 부위를 2개 가지도록 항체를 조작할 수 있으며, 이로써 보체 용해 능 및 ADCC 능이 강화될 수 있다. 문헌[Stevenson의 다수, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)]을 참조하시오. 뿐만 아니라, CDR 내 서열은, 항체와 제II군 MHC를 결합시키고, 원치 않는 조력 T-세포 반응이 촉발되도록 만들 수 있다. 보존적 치환을 통하여, 항체가 결합 활성은 보유하되, 원치 않는 T-세포 반응은 촉발하지 못하도록 만들 수 있다. 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Steplewski의 다수, Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(13):4852-6]에는, 쥐과 동물 가변 부가 인간의 감마 1, 감마 2, 감마 3, 그리고 감마 4 불변 부와 결합되어 있는 키메라 항체에 관하여 개시되어 있다.

[0249] 본 발명의 임의의 구체예에서, 예를 들어, 중앙 투과성을 증가시키기 위해서는 비변형 항체보다 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우, 항체 단편의 혈청 반감기를 증가시키기 위해서 항체 단편을 변형시키는 것 예를 들어, 분자 예를 들어, PEG 또는 기타 수용성 중합체 예를 들어, 다당류 중합체를 항체 단편에 부가하여, 반감기를 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는 또한, (예를 들어, 항체 단편에 존재하는 적당한 부위를 돌연 변이시키거나, 또는 예를 들어, DNA 또는 펩티드 합성을 통하여 말단부 또는 중간부에서 항체 단편과 융합된 펩티드에 태그를 통합하여), 예를 들어, 구원 수용체 결합 에피토프를 항체 단편에 통합시킴으로써 이루어질 수 있다[예를 들어, WO 96/32478 참조].

[0250] 구원 수용체 결합 에피토프는 바람직하게, Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터 유래하는 임의의 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사한 위치로 옮겨진 부위를 포함한다. 더욱 바람직하게는, Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터 유래하는 3개 이상의 잔기가 옮겨진다. 더욱 바람직하게, 상기 에피토프는 Fc 부위(예를 들어, IgG의 Fc 부위)의 C_H2 도메인으로부터 유래되어, 항체의 C_H1, C_H3 또는 V_H 부위, 또는 이와 같은 부위들 중 하나 이상으로 옮겨진다. 대안적으로, 상기 에피토프는 Fc 부위의 C_H2 도메인으로부터 유래되어, 항체 단편의 C_L 부위 또는 V_L 부위, 또는 이들 부위 둘 다로 옮겨진다. 국제 특허 출원 WO 97/34631 및 WO 96/32478에는, Fc 변이체 및 이 Fc 변이체와 구원 수용체의 상호 작용에 관하여 개시되어 있다.

[0251] 그러므로, 본 발명의 항체는 인간의 Fc 부분, 인간의 공통 Fc 부분, 또는 Fc 구원 수용체와 상호 작용하는 능력을 보유하는 이것들의 뮤테인 예를 들어, 이황화 결합에 관여하는 시스테인이 변형 또는 제거되었으며/되었거나, met이 N-말단부에 부가되었으며/부가되었거나 N-말단에 존재하는 20개의 아미노산 중 하나 이상이 제거되었으며/제거되었거나, 보체와 상호 작용하는 부위 예를 들어, C1q 결합 위치가 제거되었으며/제거되었거나, ADCC 위치가 제거된 뮤테인을 포함할 수 있다[예를 들어, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) 참조]. IgG 군의 항체는 또한 상이한 불변 부를 포함할 수도 있는데, 예를 들어, IgG2 항체는 IgG1 또는 IgG4 불변 부를 디스플레이하도록 변형될 수 있다.

[0252] IgG1의 경우, 불변 부 특히, 힌지 부 또는 C_H2 부위를 변형시키면, 효과기 기능 예를 들어, ADCC 및/또는 CDC 활성이 증가 또는 감소할 수 있다. 다른 구체예에서, IgG2 불변 부는 항체-항원 응집체 형성이 감소하도록 변형된다. IgG4의 경우, 불변 부 특히, 힌지 부를 변형시키면, 절반 항체(half-antibody)가 형성되는 것을 감소시킬 수 있다. 대표적인 구체예에서는, IgG4 힌지 서열 Cys-Pro-Ser-Cys를 IgG1 힌지 서열 Cys-Pro-Pro-Cys로 돌연 변이시킨다.

[0253] 주로 IgG의 233~239번 잔기로 이루어진 짧은 힌지 부에 대하여 행해진 선행 연구를 통하여, FcR에 대한 인간 및 쥐과 동물의 IgG 상 결합 위치가 맵핑되었다. 기타 연구를 통해서, 부가의 광 분절 예를 들어, Gly316-Lys338(인간 Fc 수용체 I), Lys274-Arg301 및 Tyr407-Arg416(인간 Fc 수용체 III)이 제안되었으며, 또는 쥐과 동물 Fc 수용체 II와 상호 작용하는 쥐과 동물 IgG2b의 짧은 힌지 부 예를 들어, Asn297 및 Glu318의 외부에 소수의 특이적 잔기가 존재한다는 사실을 알아냈다. 인간 Fc 수용체 IIIA와 인간 IgG1 Fc 단편의 3.2Å 결정 구조에 관한 보고에 따르면, IgG1 잔기들 즉, Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299 및 Ala327-Ile332이 Fc 수용체 IIIA와의 결합에 관여한다고 하였다. 결정 구조를 바탕으로 하였을 때, 짧은 힌지 부(Leu234-Gly237) 이외에도, IgG C_H2 도메인 루프 FG 내 잔기들(326~330번 잔기) 및 BC 내 잔기들(265~271번 잔기)은 Fc 수용체 IIIA와의 결합에 관여할 수 있다. 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Shields의 다수, J. Biol.

Chem., 276(9):6591-6604 (2001)]을 참조하십시오. Fc 수용체 결합 위치 내에 존재하는 잔기들을 돌연 변이시키면, 효과기 기능이 변이될 수 있는데, 즉, ADCC 또는 CDC 활성 또는 반감기가 변이될 수 있다. 전술한 바와 같이, 잠재적인 돌연 변이로서는, 하나 이상의 잔기들의 삽입, 결실 또는 치환 예를 들어, 알라닌과의 치환, 보존적 치환, 비보존적 치환, 또는 상이한 IgG 하위 군의 동일한 위치에 상응하는 아미노산 잔기와의 치환 (예를 들어, IgG1 잔기와 상기와 같은 위치에 상응하는 IgG2의 잔기의 치환)을 포함한다.

[0254] 쉴즈(Shields)의 다수는, 모든 인간 Fc 수용체와의 결합에 관여하는 Igg1 잔기들이, 힌지와 인접한 C_H2 도메인 내에 위치하며, 다음과 같은 2개의 카테고리에 속한다고 보고하였다: 1) 모든 FcR과 직접적으로 상호 작용할 수 있으며, Leu234-Pro238, Ala327 및 Pro329(가능하게는, Asp265)를 포함하는 위치; 2) 탄수화물의 특성에 영향을 미치거나, Asp265 및 Asn297을 포함하는 위치. Fc 수용체 II와의 결합에 영향을 미치는 부가의 IgG1 잔기로서는 다음과 같은 것들이 있다: (최대의 효능을 나타내는 것) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298, 그리고 (효능이 떨어지는 것) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378, 및 Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A 및 D270A는 결합 특성이 감소하였다. 모든 FcR에 대해 상기 동정된 바와 같은 잔기들 이외에도, Fc 수용체 IIIA에 대한 결합 능이 40% 이상 감소한 부가의 IgG1 잔기들로서는 다음과 같은 것들이 있다: Ser239, Ser267(오로지 Gly), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338 및 Asp376. FcRIIIA와의 결합 능이 개선된 뮤테인은 T256A, K290A, S298A, E333A, K334A 및 A339T를 포함한다. Lys414는 FcRIIA 및 FcRIIB에 대한 결합 능이 40% 감소하였고, Arg416은 FcRIIA 및 FcRIIIA에 대한 결합 능이 30% 감소하였으며, Gln419는 FcRIIA에 대한 결합 능이 30% 감소하였고, FcRIIB에 대한 결합 능은 40% 감소하였으며, Lys360은 FcRIIIA에 대한 결합 능이 23% 개선되었다. 문헌[Presta의 다수, Biochem. Soc. Trans. (2001) 30, 487-490]을 참조하십시오.

[0255] 예를 들어, 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제6,194,551호에는, 인간 IgG Fc 부위의 329, 331 또는 332번 아미노산 위치(캐벗 번호 메깅 방식에 따름)가 돌연 변이되어 효과기 기능이 변이된(즉, 일부 뮤테인들의 C1q 결합 능 또는 CDC 활성이 감소된) 뮤테인에 관하여 개시되어 있다. 다른 예를 들면, 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제6,737,056호에는, 인간 IgG Fc 부위의 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439번 아미노산 위치(캐벗 번호 메깅 방식에 따름)가 돌연 변이되어 효과기 기능 또는 Fc-감마-수용체 결합 능이 변이된 뮤테인에 관하여 개시되어 있는데, 여기서, 일부 뮤테인들은 ADCC 또는 CDC 활성이 감소한 것과 관련된 수용체 결합 프로필을 나타낸다. 이것들 중, 238, 265, 269, 270, 327 또는 329번 아미노산 위치에 일어난 돌연 변이로 인해서는 FcRII와의 결합 능이 감소되었고, 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 또는 439번 아미노산 위치에 일어난 돌연 변이로 인해서는 FcRII와의 결합 능이 감소되었으며, 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 또는 437번 아미노산 위치에 일어난 돌연 변이로 인해서는 FcRIII와의 결합 능이 감소되었다.

[0256] 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제5,624,821호에는, 중쇄의 318, 320 또는 322번 아미노산 잔기를 돌연 변이시켜 쥐과 동물 항체의 C1q 결합 활성이 변이될 수 있으며, 297번 잔기(Asn)를 치환하면 용해 활성이 소멸된다고 개시되어 있다.

[0257] 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 공보 제20040132101호에는, 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328 또는 332번 아미노산 위치(캐벗 번호 메깅 방식에 따름) 또는 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 또는 332번 위치(캐벗 번호 메깅 방식에 따름)가 돌연 변이된 뮤테인에 관하여 개시되어 있는데, 여기서, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 또는 332번 위치에서 일어난 돌연 변이로 인하여 ADCC 활성이 감소할 수 있거나, 또는 Fc 감마 수용체와의 결합 능이 감소될 수 있다고 한다.

[0258] 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용된 문헌[Chappel의 다수, Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(20):9036-40]에는, IgG1의 세포 친화 활성은 IgG1의 중쇄 C_H2 도메인의 본질적인 특성이라고 개시되어 있다. IgG1의 234

~237번 아미노산 잔기들 중 임의의 잔기에 일어난 단일 지점 돌연 변이는 그것의 활성을 상당히 떨어뜨렸거나 또는 아예 없었다. 항체의 결합 활성을 완전히 회복시키기 위해서는, IgG1의 234~237번 잔기 전부(LLGG)를 IgG2와 IgG4에 치환을 통하여 도입시켜야 했다. 전체 ELLGGP 서열(233~238번 잔기)을 함유하는 IgG2 항체는 야생형 IgG1보다 활성이 더욱 큰 것으로 관찰되었다.

[0259] 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Isaacs의 다수, J Immunol. 1998;161(8):3862-9]에는, Fc 감마 R의 결합에 중요한 역할을 하는 모티프 내 돌연 변이[233번 글루타메이트 → 프롤린, 234번 루신/페닐알라닌 → 발린, 그리고 235번 루신 → 알라닌]는 표적 세포가 소모되는 것을 완전히 막아준다고 개시되어 있다. 318번 글루타메이트 → 알라닌으로의 돌연 변이에 의해, 마우스 IgG2b의 효과기 기능이 없어질 뿐만 아니라, 인간 IgG4의 효능도 감소한다.

[0260] 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Armour의 다수, Mol. Immunol. 2003;40(9):585-93]에는, 활성화 수용체인 Fc 감마 RIIa과 반응하는 IgG1 뮤테인의 효능이, 야생형 IgG1의 효능보다 10배 이상 떨어지지만, Fc 감마 RIIa과 반응하는 IgG1 뮤테인의 억제 수용체인 Fc 감마 RIIb와의 결합 능은 4배 정도 감소한다고 개시되어 있다. 233~236번 아미노산 부위 및/또는 327, 330 및 331번 아미노산 위치에 돌연 변이가 발생하였다. 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 WO 99/58572를 참조하십시오.

[0261] 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Xu의 다수, J Biol Chem. 1994;269(5):3469-74]에는, IgG1 Pro331 → Ser으로의 돌연 변이로 인하여, C1q 결합 능이 상당 수준 감소하였으며, 용해 활성은 실질적으로 사라졌다고 개시되어 있다. 이와는 반대로, IgG4에서 Ser331에 대한 Pro의 치환이 일어나면, IgG4 Pro331 뮤테인에 용해 활성이 부분적으로(40%) 나타났다.

[0262] 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Schuurman의 다수, Mol. Immunol. 2001;38(1):1-8]에는, 중쇄 간 결합 형성에 관여하는 힌지 시스테인들 중 하나(Cys226)를 세린으로 돌연 변이시키면, 더욱 안정한 중쇄 간 결합이 형성된다고 개시되어 있다. 또한, IgG4 힌지 서열 Cys-Pro-Ser-Cys이 IgG1 힌지 서열 Cys-Pro-Pro-Cys로 돌연 변이되면, 중쇄 간 공유 상호 작용이 눈에 띄게 안정화된다.

[0263] 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Angal의 다수, Mol. Immunol. 1993;30(1):105-8]에는, IgG4 내 241번 아미노산 위치의 세린을 프롤린으로 돌연 변이(IgG1 및 IgG2 내 상기 위치에서도 발생함)시키면, 상동성 항체가 생성되었고, 혈청 반감기도 연장되었으며, 또한 조직 분배 상태도 기원 키메라 IgG4에 비하여 개선되었다고 개시되어 있다.

[0264] 본 발명은 또한 탄수화물 구조가 변형됨에 따라서, 효과기 활성도 변이된 항체 분자 예를 들어, ADCC 활성을 개선하는 푸코실화가 일어나지 않았거나 발생률이 떨어진 항체 분자를 생산하는 방법도 고려된다. 이를 이루기 위한 다수의 방법이 당 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, ADCC 효과기 활성은 항체 분자가 FcγRIII 수용체에 결합하는 것에 의해 매개되는데, 이러한 과정은 C_{H2} 도메인의 Asn-297 위치에서 일어나는 N-결합 당화에 있어서 탄수화물 구조에 의존적인 것으로 파악된다. 푸코실화되지 않은 항체는 강한 친화성으로 상기 수용체와 결합하여, FcγRIII-매개 효과기 기능을 원래의 푸코실화된 항체보다 더욱 효과적으로 만들어준다. 예를 들어, 푸코실화되지 않은 항체를, 알파-1,6-푸코실 트랜스퍼라제 효소가 녹-아웃된 CHO 세포 내에서 재조합 생산하면, ADCC 활성이 100배 증가한 항체가 생성된다[Yamane-Ohnuki의 다수, Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5;87(5):614-22]. 푸코실화 경로에서 예를 들어, siRNA 또는 안티센스 RNA 처리를 통하여 상기 효소 또는 기타 효소의 활성을 낮추고, 세포주가 효소(들)를 생성하지 못하도록 조작하거나, 또는 선택적 당화 억제 인자와 함께 배양함으로써, 유사한 효과를 얻을 수 있다[Rothman의 다수, Mol. Immunol. 1989 Dec;26(12):1113-23]. 일부 숙주 세포 균주들 예를 들어, Lec13 또는 래트 하이브리도마 YB2/0 세포주는 원래, 낮은 수준으로 푸코실화가 일어난 항체를 생산한다[Shields의 다수, J Biol Chem. 2002 Jul. 26;277(30):26733-40; Shinkawa의 다수, J Biol Chem. 2003 Jan 31;278(5):3466-73]. 예를 들어, GnTIII 효소를 과발현하는 세포 내에서 항체를 재조합 방식으로 생산함으로써 이분화된 탄수화물의 수준을 증가시키면, ADCC 활성도 증가하는 것으로 확인되었다[Umana의 다수, Nat Biotechnol. 1999 Feb;17(2):176-80]. 2개의 푸코스 잔기들 중 하나만을 없애면, ADCC 활성을 증가시키는데 충분할 수 있는 것으로 예측된다[Ferrara의 다수, J Biol Chem. 2005 Dec 5].

[0265] **기타 공유 변형**

[0266] 항체의 공유 변형도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이와 같은 변형은 가능하다면, 항체를 화학적으로 합성하거나 효소나 화학적 방법으로 분해함으로써 이루어질 수 있다. 항체의 표적화된 아미노산 잔기와, 선택된 측쇄나 N-말단 잔기 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화 제제를 반응시킴으로써, 다른 유형의 항체 공유

변형이 분자에 도입된다.

- [0267] 시스테이닐 잔기들은 가장 일반적으로 α-할로아세테이트(및 상응하는 아민) 예를 들어, 클로로아세트산 또는 클로로아세타미드와 반응하여, 카복시메틸 또는 카복시아미도메틸 유도체를 생성한다. 시스테이닐 잔기들은 또한, 브로모트리플루오로아세톤, 알파-브로모-β-(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 디설파이드, 메틸 2-피리딜 디설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀, 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과의 반응에 의해 유도체화된다.
- [0268] 히스티딜 잔기들은 pH 5.5~7.0에서 디에틸피로카보네이트와의 반응에 의해 유도체화되는데, 그 이유는, 상기 제제가 비교적 히스티딜 측쇄에 대해 특이적이기 때문이다. 파라-브롬화브로모페나실도 유용한데; 이것을 사용할 때의 반응은 pH 6.0에서 0.1M의 소듐 카코딜레이트 중에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [0269] 리시닐 및 아미노-말단 잔기들은 숙신산 또는 기타 카복실산 무수물과 반응한다. 이러한 제제를 사용하는 유도체화는 리시닐 잔기들의 전하를 역전시키는 효과를 갖는다. 기타 알파-아미노-함유 잔기들을 유도체화하는데 적당한 시약으로서는 이미도에스테르 예를 들어, 메틸 피콜린이미데이트, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 클로로보로하이드라이드, 트리니트로벤젠설포산, O-메틸이소우레아, 2,4-펜탄디온 및 글리옥실레이트와의 트랜스아미나제-촉매화 반응에 관여하는 제제를 포함한다.
- [0270] 아르기닐 잔기들은 하나 또는 여러 개의 통상적인 시약 예를 들어, 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-시클로헥산디온 및 닐히드린과의 반응에 의해 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화에 있어서는, 그 반응이 알칼리 조건 하에서 수행되어야 하는데, 그 이유는, 구아니딘 작용기의 pK_a가 높기 때문이다. 뿐만 아니라, 이러한 시약들은 리신기 및 아르기닌 엠실론-아미노기와 반응할 수 있다.
- [0271] 티로실 잔기의 특이적인 변형이 이루어질 수 있는데, 여기서, 방향성 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄을 반응시켜 스펙트럼 표지를 티로실 잔기에 도입하는 것이 특히 관심이 가는 부분이다. 가장 일반적으로, O-아세틸 티로실 화학종과 3-니트로 유도체를 각각 형성하기 위해서는 N-아세틸이미디졸 및 테트라니트로메탄이 사용된다. 티로실 잔기들은 ¹²⁵I 또는 ¹³¹I를 사용하여 요드화되며, 그 결과, 방사성 면역 검정법에 사용되는 표지화된 단백질이 제조된다.
- [0272] 카복실 측기(아스파틸 또는 글루타밀)는 카보다이미드(R-N.dbd.C.dbd.N-R')[식 중, R 및 R'는 상이한 알킬기임] 예를 들어, 1-시클로헥실-3-(2-모폴리닐-4-에틸)카보다이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸)카보다이미드와의 반응에 의해 선택적으로 변형된다. 뿐만 아니라, 아스파틸 및 글루타밀 잔기들은 암모니아 이온과의 반응에 의해서 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.
- [0273] 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기들은 종종 상응하는 글루타밀 및 아스파틸 잔기들로 각각 탈아민화된다. 이러한 잔기들은 중성 또는 염기성 조건 하에서 탈아민화된다. 이러한 잔기들의 탈아민화된 형태는 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0274] 기타 변형으로서는, 프롤린과 리신의 하이드록실화, 세린 또는 트레오닐 잔기들의 하이드록실기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노기의 메틸화[T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], N-말단 아민의 아세틸화, 그리고 임의의 C-말단 카복실기의 아마이드화를 포함한다.
- [0275] 다른 유형의 공유 변형은, 항체에 글리코시드를 화학적 방법으로 또는 효소에 의한 방법으로 커플링시키는 것을 포함한다. 이러한 방법들은, N-결합 또는 O-결합 당화를 위한 당화 능력을 가지는 숙주 세포 내에서 항체를 생산할 필요가 없다는 점에서 유리하다. 사용된 커플링 방식에 따라서, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실기, (c) 유리 설프히드릴기 예를 들어, 시스테인의 유리 설프히드릴기, (d) 유리 하이드록실기 예를 들어, 세린, 트레오닌 또는 하이드록시프롤린의 유리 하이드록실기, (e) 방향성 잔기 예를 들어, 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 방향성 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아마이드기에 부착될 수 있다. 이와 같은 방법들에 관하여는 1987년 9월 11일 공표된 WO 87/05330 및 문헌[Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)]에 개시되어 있다.
- [0276] 항체 상에 존재하는 임의의 탄수화물 부는 화학적 방법 또는 효소에 의한 방법으로 제거될 수 있다. 화학적 탈당화의 경우, 항체를 화합물 즉, 트리플루오로메탄설포산 또는 이와 동등한 화합물에 노출시켜야 한다. 이와 같이 처리하면, 결합용 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분의 당 또는 모든 당이 절단되지만, 이때, 항체는 변형되지 않은 상태로 그대로 남게 된다. 화학적 탈당화에 관하여는 문헌

[Hakimuddin, 외 다수 Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987), 및 Edge 외 다수 Anal. Biochem., 118: 131 (1981)]에 개시되어 있다. 문헌[Thotakura 외 다수 Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)]에 개시된 바와 같이, 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제를 사용하여 항체 상에 존재하는 탄수화물 부를 효소적 방법으로 절단할 수 있다.

[0277] 항체의 다른 유형의 공유 변형으로서는, 항체를 비 단백질성 중합체 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸화된 폴리올, 폴리옥시에틸화된 솔비톨, 폴리옥시에틸화된 글루코스, 폴리옥시에틸화된 글리세롤, 폴리옥시알킬렌 또는 다당류 중합체 예를 들어, 텍스트란 중 어느 하나와 결합시키는 것을 포함한다. 이러한 방법에 관하여는 당 업계에 널리 공지되어 있다[예를 들어, 미국 특허 제4,640,835호; 동 제4,496,689호; 동 제4,301,144호; 동 제4,670,417호; 동 제4,791,192, 동 제4,179,337호, 동 제4,766,106호, 동 제4,179,337호, 동 제4,495,285호, 동 제4,609,546호 또는 EP 315 456].

[0278] 각각의 항체 분자는 하나 이상(즉, 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상)의 중합체 분자에 결합할 수 있다. 중합체 분자는 링커 분자에 의해 항체에 부착되는 것이 바람직하다. 일반적으로, 중합체는 합성 중합체 또는 천연 생성 중합체 예를 들어, 임의로 치환된 직쇄 또는 분지쇄 폴리알켄, 폴리알케닐렌 또는 폴리옥시알킬렌 중합체, 또는 분지형 또는 비 분지형 다당류 예를 들어, 단일 다당류 또는 복합 다당류일 수 있다. 바람직한 중합체로서는 폴리옥시에틸렌 폴리올과 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 있다. PEG는 실온에서 수용성이며, 일반식이 $R(O-C_2H_4-C_2H_4)_nO-R'$ [식 중, R은 수소 또는 보호기 예를 들어, 알킬기 또는 알카닐기일 수 있음]이다. 바람직하게, 보호기는 1~8개의 탄소를 가지며, 더욱 바람직하게는 메틸이다. 상기 식 중, n은 양의 정수로서, 바람직하게는 1~1,000, 더욱 바람직하게는 2~500이다. PEG의 평균 분자량은 바람직하게는 1,000~40,000이고, 더욱 바람직하게는 2,000~20,000이며, 가장 바람직하게는 3,000~12,000이다. 바람직하게, PEG는 하나 이상의 하이드록시기를 가지며, 더욱 바람직하게, 상기 하이드록시기는 말단 하이드록시기이다. 하이드록시기는 활성화되어, 억제 인자 상에 존재하는 유리 아미노기와 반응하는 것이 바람직하다. 그러나, 본 발명의 공유 접합된 PEG/항체를 생산하기 위한 반응기의 유형과 양은 다양할 수 있다. 바람직한 중합체와, 이 중합체를 펩티드에 부착시키는 방법에 관하여는 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제4,766,106호; 동 제4,179,337호; 동 제4,495,285호; 및 동 제4,609,546호에 개시되어 있다.

[0279] **유전자 요법**

[0280] 당 업계에 알려진 임의의 적당한 수단 예를 들어, 물리적 DNA 운반법(예를 들어, 리소솜 사용법 또는 화학적 처리법) 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 또는 레트로바이러스)를 사용하여, 생체 외, 현장 또는 생체 내 유전자 요법을 통해 적절한 세포에 치료용 항체를 전달할 수 있다. 예를 들어, 생체 내 요법에 있어서, 원하는 항체를 암호화하는 핵산을 단독으로, 또는 벡터, 리포솜, 또는 침전물과 함께, 피험체에 직접 주입할 수 있으며, 몇몇 구체예에서는, 항체 화합물이 발현되는 것이 바람직한 위치에 상기 핵산을 주입할 수 있다. 생체 외 치료법에 있어서, 피험체의 세포를 분리한 후, 핵산을 이 세포에 도입하고, 이후, 이와 같이 변형된 세포는 직접적으로, 또는 예를 들어, 환자에 이식된 다공성 막 내에 둘러싸여서, 피험체로 다시 들어오게 된다. 예를 들어, 미국 특허 제4,892,538호 및 동 제5,283,187호를 참조하시오. 핵산을 생존 세포에 도입시키는데 사용될 수 있는 기술이 다수 존재한다. 이러한 기술들은 핵산이 시험관 내, 또는 대상 숙주의 세포 내에서와 같이 생체 내 배양된 세포에 운반되는지 여부에 따라서 달라진다. 시험관 내에서 핵산을 포유동물 세포에 운반하기 적당한 기술로서는, 리포솜을 사용하는 방법, 전기 천공법, 미세 주입법, 세포 융합법, DEAE-텍스트란 사용법 및 인산칼슘 침전법을 포함한다. 핵산의 생체 외 전달용으로서 일반적으로 사용되는 벡터로는 레트로바이러스가 있다.

[0281] 기타 생체 내 핵산 운반 기술로서는, 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, 헤르페스 심플렉스 I 바이러스 또는 아데노-관련 바이러스) 및 지지체 시스템을 이용한 형질 감염법을 포함한다. 핵산과 형질 감염 체제는 미립자와 결합하기도 한다. 대표적인 형질 감염 체제로서는 인산칼슘 또는 염화칼슘 공침전제, DEAE-텍스트란-매개 형질 감염제, 4차 암모늄 양친매성 DOTMA(브롬화(디올레오일옥시프로필)트리메틸암모늄, 리포펙틴(Lipofectin)이라는 상표로 GIBCO-BRL에 의해 시판중)(Felgner 외 다수, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone 외 다수 (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86 6077-6081); 현수성 트리메틸아모늄 두부를 가지는 친지성 글루타메이트 디에스테르(Ito 외 다수 (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132); 대사 가능한 모 지지체 예를 들어, 양이온 지지체 디옥타데실아미도 글리실스퍼민(DOGS, 트랜스펙탐(Transfectam), Promega) 및 디팔미토일포스파티딜 에탄올아밀스퍼민(DPPES)(J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861-5864; J. P. Behr 외 다수 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986); 대사 가능한 4차 암모늄 염

(DOTB, N-(1-[2,3-디올레오일옥시]프로필)-N,N,N-트리메틸아모늄 메틸설페이트(DOTAP)(Boehringer Mannheim), 폴리에틸렌이민(PEI), 디올레오일 에스테르, ChoTB, ChoSC, DOSC(Leventis의 다수 (1990) Biochim. Inter. 22, 235-241); 3 베타[N-(N', N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC-Chol), 디올레오일포스파티딜 에탄올아민(DOPE)/3 베타[N-(N', N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 DC-Chol(1:1 혼합물 중)(Gao의 다수, (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065, 8-14), 스퍼민, 스퍼미딘, 리포폴리아민(Behr의 다수, Bioconjugate Chem, 1994, 5: 382-389), 친지성 폴리로신(LPLL)(Zhou의 다수, (1991) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18), 수산화[(1,1,3,3-테트라메틸부틸)크레-속시]에톡시]에틸]디메틸벤질암모늄(수산화 DEBDA)(과량의 포스파티딜콜린/콜레스테롤 함유)(Ballas의 다수(1988) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18), 브롬화세틸트리메틸암모늄(CTAB)/DOPE 혼합물(Pinnaduwage의 다수, (1989) Biochim. Biophys. Acta 985, 33-37), DOPE 함유 글루탐산의 친지성 디에스테르(TMAG), CTAB, DEBDA, 브롬화 디도데실암모늄(DDAB), 그리고 스테아릴아민과 포스파티딜에타올아민의 혼합물(Rose의 다수, (1991) Biotechnology 10, 520-525), DDAB/DOPE(트랜스펙트 ACE(TransfectACE), GIBCO BRL), 및 올리고갈락토스 보유 지질을 포함한다. 운반의 효율을 높여주는 대표적인 형질 감염 강화 제제로서는 예를 들어, DEAE-덱스트란, 폴리브렌, 리소솜-분해성 펩티드(Ohmori N I의 다수, Biochem Biophys Res Commun Jun. 27, 1997;235(3):726-9), 콘드로이탄계 프로테오글리칸, 황산화 프로테오글리칸, 폴리에틸렌이민, 폴리로신(Pollard H의 다수 J Biol Chem, 1998 273 (13):7507-11), 인테그린-결합 펩티드 CYGGRGDTP, 선형 덱스트란 9탄당, 글리세롤, 올리고뉴클레오티드의 3'-말단에 있는 뉴클레오시드 사이의 결합에 고정된 콜레스테릴기(Letsinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86: (17):6553-6), 리소포스파티드, 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민, 그리고 1-올레오일 리소포스파티딜콜린을 포함한다.

[0282] 몇몇 경우에 있어서는, 핵산-함유 벡터를 표적 세포로 유도하는 체제를 사용하여 핵산을 운반하는 것이 바람직할 수 있다. 이와 같은 "표적화" 분자로서는, 표적 세포 상에 존재하는 세포-표면 막 단백질에 특이적인 항체, 또는 표적 세포 상에 존재하는 수용체에 대한 리간드를 포함한다. 리포솜을 사용할 경우, 내포 작용과 관련된 세포-표면 막 단백질과 결합하는 단백질이 표적화에 사용될 수 있으며/있거나 흡수를 촉진할 수도 있다. 이와 같은 단백질의 예로서는, 구체적인 세포 유형에 따라 달라지는 캡시드 단백질 및 이의 단편, 내재화 주기를 수행하는 단백질에 대한 항체, 그리고 세포 내 국소화를 표적화하고 세포 내 반감기를 연장하는 단백질을 포함한다. 다른 구체예에서는, 수용체-매개 내포 작용을 이용할 수 있다. 이와 같은 방법에 관하여는 예를 들어, 문헌 [Wu의 다수, 1987 또는 Wagner의 다수, 1990]에 개시되어 있다. 현재 알려진 유전자 마킹 및 유전자 요법에 관한 프로토콜에 관한 상세한 설명은 문헌[Anderson 1992]에 개시되어 있다. 또한, WO 93/25673과 여기에 인용된 참고 문헌들을 참조하십시오. 유전자 요법 기술에 대한 부가적인 설명에 관하여는 문헌[Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Anderson, Nature, vol. 392의 증보판, no 6679, pp. 25-30 (1998); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); 및 Miller, Nature, 357: 455460 (1992)]을 참조하십시오.

[0283] **스크리닝 방법**

[0284] 본 발명의 다른 측면은, EphB3의 활성을 증가시키는 항체를 동정하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은, EphB3와 항체를 접촉시키는 단계와, 이 항체가 EphB3의 활성을 개선시키는지 여부를 측정하는 단계를 포함한다. 테스트 항체가 존재할 때의 활성을, 테스트 항체가 존재하지 않을 때의 활성과 비교한다. 테스트 항체를 함유하는 시료의 활성이, 테스트 항체를 함유하지 않는 시료의 항체보다 높을 경우, 그 항체는 활성화되거나 또는 활성이 증가한 것일 것이다. 효과적인 치료법은 독성이 거의 없는 유효 체제를 동정하는 것에 달려있다. 항체는 당 업계에 공지된 방법에 의해 결합 친화성에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 겔-이동 검정법, 웨스턴 블롯, 방사성 표지화 경쟁 검정법, 크로마토그래피에 의한 동시 분획법, 공침전법, 가교법, ELISA 등의 방법이 사용될 수 있으며, 이러한 방법들은 예를 들어, 그 자체로서 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY]에 개시되어 있다. 뿐만 아니라, 항체의 경쟁을 평가하기 위해서는 바이어코어(Biacore)®를 사용할 수도 있다(이하 실시예 5 참고).

[0285] 처음에, 표적 항원 상의 원하는 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위하여, 문헌[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 개시되어 있는 방법과 같은 통상의 교차-차단 검정법(cross-blocking assay)을 수행할 수 있다. 통상의 경쟁적 결합 검정법도 사용할 수 있는데, 이 방법에서는 미지의 항체가, 본 발명의 표적-특이적 항체와 표적의 결합을 억제하는 능력에 의해 특징지어진다. 비변형 항원, 이의 단편 예를 들어, 세포의 도메인, 또는 선형 에피토프를 사용할 수 있다. 에피토프 맵핑에 관하여는 문헌[Champe의 다수, J. Biol. Chem. 270: 1388-1394 (1995)]에 개시되어 있다.

[0286] 시험관 내 결합 검정법의 한 가지 변형에 있어서, 본 발명은, (a) 고정된 EphB3와 후보 항체를 접촉시키는 단계 및 (b) EphB3에 후보 항체가 결합하는지 여부를 확인하는 단계를 포함한다. 대안적인 구체예에서, 후보 항체는

고정되며, 이때, EphB3와 결합하는 것으로 측정된다. 고정은 당 업계에 널리 공지된 방법 중 임의의 방법 예를 들어, 지지체, 비드 또는 크로마토그래피 수지와 공유 결합, 그리고 항체 결합과 같은 비 공유의 고 친화성 상호 작용, 또는 스트렙타비딘/바이오틴 결합을 이용하는 방법(여기서, 고정된 화합물은 바이오틴 부를 포함 함)을 사용하여 이루어진다. 결합 여부는, (i) 고정되지 않은 화합물 상에서 방사성 표지를 사용하는 기술, (ii) 고정되지 않은 화합물 상에서 형광 표지를 사용하는 기술, (iii) 고정되지 않은 화합물에 대해 면역 특이 적인 항체를 사용하는 기술, (iv) 고정된 화합물이 부착된 형광 지지체를 여기시키는, 고정되지 않은 화합물 상에서 표지를 사용하는 기술, 그리고 당 업계에 널리 알려진 기타 기술과, 당 업계에서 통상적으로 실시되고 있는 기술에 의해 검출될 수 있다.

[0287] 표적 항원의 활성을 증가시키는 항체는, 후보 항체와 표적 항원(또는 표적 항원을 발현하는 세포)을 향한 처리 한 후, 표적 항원의 활성 또는 발현에 대한 후보 항체의 영향력을 측정함으로써 동정할 수 있다. 테스트 항체가 존재할 때의 활성을, 테스트 항체가 존재하지 않을 때의 활성과 비교한다. 테스트 항체를 함유하는 시료의 활성 이, 테스트 항체를 함유하지 않는 시료의 활성에 비하여 클 경우, 이 항체는 활성이 증가한 것일 것이다. 표적 항원 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 활성을 조정하는 항체의 선택성은, 이 항체가 표적 항원에 미치는 영 향력과 이 항체가 기타 관련 화합물에 미치는 영향력을 비교함으로써 평가될 수 있다.

[0288] 특정 구체예에서, 항체는, 그것이 수용체 인산화, 올리고머화, 내재화, 분해, 신호 전달 및/또는 EphB3-매개 세 포-세포 부착을 유도하는 능력을 가졌는지 여부를 측정하기 위하여, 배양된 세포 시스템 내에서의 영향력에 대 해 테스트된다. 뿐만 아니라, 특정 EphB3 항체를 평가하기 위하여, 본원에 기술된 바와 같은 증식 검정법, 연결 아가 검정법 및/또는 세포 독성 검정법을 포함하는 세포성 검정법을 사용할 수 있다.

[0289] 특정 항체 또는 항체의 조합체의 생물 활성은, 적당한 동물 모델을 사용하여 생체 내에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 인간 암 세포를 면역 억제 동물 예를 들어, 누드 마우스 또는 SCID 마우스에 도입한 이종 이식 암 모델을 사용할 수 있다. 효능은, 종양 형성, 종양 퇴화 또는 전이 등을 억제하는지 여부를 측정하는 검정법을 이용하여 예측할 수 있다.

[0290] 본 발명은 또한 표적 항원과 상호 작용하거나, 이 표적 항원의 생물 활성을 유도하는(즉, 내재화 또는 세포 내 신호 전달 등을 유도하는) 항체를 동정하기 위한 고 처리량 스크리닝(HTS) 검정법을 포함하기도 한다. HTS 검정 법을 통하여, 다수의 화합물들을 효과적인 방식으로 스크리닝할 수 있다. 표적 항원과 이것의 결합 파트너 사이 의 상호 작용을 관찰하기 위해서는 세포계 HTS 시스템을 사용하는 것이 고려된다. HTS 검정법은 원하는 특성을 가지는 "히트(hit)" 또는 "리드 화합물(lead compound)"을 동정하도록 고안된 것으로서, 이를 통하여 원하는 특 성을 개선할 수 있도록 변형 방식을 고안할 수 있다.

[0291] 본 발명의 다른 구체예에서는, 표적 항원 폴리펩티드에 대한 적당한 결합 친화성을 가지는 CDR 내 아미노산에 1, 2 또는 3개 이상의 변형이 일어난 CDR 또는 항체 단편에 대한 고 처리량 스크리닝법이 사용된다

[0292] **병행 요법**

[0293] 동물 모델에서 효과적인 하나 이상의 항체를 동정할 경우, 이러한 항체(즉, 동일하거나 상이한 표적 항원과 결 합하는 항체)를 2개 이상 혼합하여, 더욱 개선된 효능을 제공하는 것이 더욱 유리할 수 있다. 하나 이상의 항체 를 포함하는 조성물은 암이 발병하였거나, 또는 암이 발병할 소인을 가진 사람이나 포유동물에 투여될 수 있다. 2개의 치료제를 함께 사용할 경우에는, 이 제제들이 치료 효과를 나타내는 기간이 중첩되는 한, 각각의 제제들 을 동시에 투여하거나 또는 동일한 경로에 의해 투여할 필요는 없다. 동시에 투여하거나 또는 다른 날 또는 다 른 주에 투여하는 것과 같이, 연속으로 투여하는 방법도 생각해볼 수 있다.

[0294] 비록 항체 요법이 모든 단계에 있는 암에 유용할 수 있다고는 하지만, 항체 요법은 어느 정도 진행된 암 또는 전이된 암에 특히 적당할 수 있다. 항체 요법과 화학 요법 또는 방사선 요법을 함께 수행하는 방법은, 화학 요 법 치료를 받지 않은 환자에게 바람직할 수 있지만, 항체 요법 처치는 1회 이상 화학 요법 치료를 이미 받은 환 자에게 행하여질 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 항체 요법을 수행함으로써 특히, 화학 요법 제제의 독성을 견딜 수 없는 환자에 있어서, 부수적인 화학 요법 제제의 투여량을 줄일 수도 있다.

[0295] 본 발명의 방법은 항체를 단독으로 투여하거나, 또는 상이한 항체들의 배합물 즉, "칵테일(cocktail)"로서 투여 하는 것도 고려할 수 있다. 이와 같은 항체 칵테일은 이에 함유된 각각의 항체들이 상이한 효과가 기작을 진행 시키거나, 또는 면역 효과기의 기능을 나타내는 항체와 세포 독성 항체로 인한 효능들을 함께 얻을 수 있다는 점에서 유리하다고 할 수 있다. 병행 요법에 있어서, 이와 같은 항체들은 상승 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0296] 본 발명의 방법은 또한 치료될 특정 암(예를 들어, 폐암, 난소암, 식도암, 결장암 또는 유방암)에 대하여 의학

적으로 인정된 표준적인 방법을 수행함과 아울러, 단일 항체 또는 항체 카테일을 투여하는 것도 고려한다.

[0297] 세포 독성 제제란, 세포의 기능을 억제 또는 막고/막거나 세포의 파괴를 유발시키는 물질을 의미한다. 상기 용어는 방사성 동위 원소(예를 들어, I^{131} , I^{125} , Y^{90} 및 Re^{186}), 화학 요법 제제 및 독소 예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 합성 독소의, 또는 이의 단편을 포함한다. 비-세포 독성 제제란, 세포의 기능을 억제 또는 방해하지 않고/않거나 세포의 파괴를 유발시키지 않는 물질을 의미한다. 비-세포 독성 제제는 세포 독성으로 활성화될 수 있는 제제를 포함할 수 있다. 비-세포 독성 제제로서는, 비드, 리포솜, 매트릭스 또는 입자의 형태를 가지는 것들을 포함할 수 있다[예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 공보 2003/0028071 및 동 2003/0032995 참조]. 이와 같은 제제들은 본 발명에 의한 항체와 접합, 커플링, 결합 또는 화합될 수 있다.

[0298] 암의 화학 요법 제제로서는 알킬화제 예를 들어, 카보플라틴 및 시스플라틴; 질소 머스타드 알킬화제; 니트로소우레아 알킬화제 예를 들어, 카머스틴(BCNU); 대사 길항 물질 예를 들어, 메토틱렉세이트; 폴린산; 퓨린 유사체 대사 길항 물질, 머캡토포린; 피리미딘 유사체 대사 길항 물질 예를 들어, 플루오로우라실(5-FU) 및 겐시타빈(겐자(Gemzar)®); 호르몬 항 종양제 예를 들어, 고세렐린, 루프롤리드 및 타목시펜; 천연 항 종양제 예를 들어, 알테스루킨, 인터루킨-2, 도세탁셀, 에토포시드(VP-16), 인터페론 알파, 파클리탁셀(탁솔(Taxol)®) 및 트레티노인(ATRA); 항생 천연 항 종양제 예를 들어, 블레오마이신, 닥티노마이신, 도노루비신, 독소루비신, 도노마이신 및 미토마이신 예를 들어, 미토마이신 C; 및 빈카 알칼로이드 천연 항 종양제 예를 들어, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신; 하이드록시우레아; 아세글라톤, 아드리아마이신, 이포스파미드, 에노시타빈, 에피티오스타놀, 아클라루비신, 안시타빈, 니머스틴, 프로카바진 하이드로클로라이드, 카보쿠온, 카보플라틴, 카모폴, 크로모마이신 A3, 항종양 다당, 항종양 혈소판 인자, 사이클로포스파미드(사이톡신(Cytoxin)®), 쉬조필란, 시타라빈(시토신 아라비노시드), 다카바진, 티오이노신, 티오테파, 테가폴, 돌라스타틴, 돌라스타틴 유사체 예를 들어, 오리스타틴, CPT-11(이리노테칸), 미토잔트론, 비노렐빈, 테니포시드, 아미노프테린, 카미노마이신, 에스페라마이신(예를 들어, 미국 특허 제4,675,187호 참조), 네오카지노스타틴, OK-432, 블레오마이신, 푸톨론, 브록수리딘, 부셀판, 혼반, 페플로마이신, 베스타틴(유베니멕스(Ubenimex)®), 인터페론-β, 메피티오스탄, 미토브로니톨, 멜파란, 라미닌 켈티드, 렌티난, 코리올러스 베리시컬러 추출물, 테가폴/우라실, 에스트라머스틴(에스트로젠/메클로레타민)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0299] 또한, 암 환자 치료법에 사용되는 부가의 제제로서는 EPO, G-CSF, 갠시클로버; 항생제, 루프롤리드; 메페리딘; 지도부딘(AZT); 돌연 변이체 및 유사체를 포함하는 인터루킨 1~인터루킨 18; 인터페론 또는 시토킨 예를 들어, 인터페론 α, β 및 γ; 호르몬 예를 들어, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH) 및 유사체, 고나도트로핀 방출 호르몬(GnRH); 성장 인자 예를 들어, 변형성 성장 인자-β(TGF-β), 섬유 아세포 성장 인자(FGF), 신경 성장 인자(NGF), 성장 호르몬 방출 인자(GHRF), 상피 성장 인자(EGF), 섬유 아세포 성장 인자 상동성 인자(FGFHF), 간세포 성장 인자(HGF) 및 인슐린 성장 인자(IGF); 종양 괴사 인자-α 및 β(TNF-α 및 β); 침습 억제 인자-2(IIF-2); 골 형태 형성 단백질 1~7(BMP1~7); 소마토스타틴; 티모신-α-1; γ-글로불린; 수퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD); 보체 인자; 항-신생 혈관 형성 인자; 항원성 물질; 및 전구 약물을 포함한다.

[0300] 전구 약물이란, 모 약물에 비하여, 종양 세포에 대한 세포 독성이 덜하거나 아예 없으며, 효소에 의해서 활성인 형태로 되거나, 또는 활성 또는 더욱 활성인 모 형태로 전환될 수 있는, 약학적 활성 물질의 전구체 또는 유도체를 의미하는 것이다. 예를 들어, 문헌[Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 및 Stella와 다수, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt와 다수, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조하시오. 전구 약물로서는 더욱 활성인 세포 독성 유리 약물로 전환될 수 있는, 인산염-함유 전구 약물, 티오포스페이트-함유 전구 약물, 황산염-함유 전구 약물, 펩티드-함유 전구 약물, D-아미노산-변형 전구 약물, 당화된 전구 약물, β-락탐-함유 전구 약물, 임의 치환된 페녹시아세타미드-함유 전구 약물 또는 임의 치환된 페닐아세타미드-함유 전구 약물, 5-플루오로시토신 및 기타 5-플루오로우리딘 전구 약물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본원에 사용되는 전구 약물의 형태로 유도체화될 수 있는 세포 독성 약물의 예로서는 전술한 화학 요법 제제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0301] **투여 및 제조**

[0302] 본 발명의 항체는 원하는 전달 방법에 적당한 담체를 포함하는 약학 조성물로서 제형화될 수 있다. 적당한 담체로서는, 본 발명의 항체와 함께 사용될 때, 이 항체의 원하는 활성을 보유하고, 피험체의 면역 시스템과의 반응성이 없는 임의의 물질을 포함한다. 그 예로서는 다수의 표준적 약학 담체 예를 들어, 멸균 인산염 완충 염 용

액 및 정균수 등 중 임의의 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 수성 담체 예를 들어, 물, 완충수, 0.4% 염수 및 0.3% 글리신 등이 사용될 수 있으며, 안정성 증강을 위하여, 화학적으로 약간 변형된 기타 단백질 예를 들어, 알부민, 지단백 및 글로불린 등을 포함할 수도 있다.

- [0303] 항체의 치료 제형은, 원하는 정도의 순도를 가지는 항체와 생리적으로 허용 가능한 임의의 담체, 부형제 또는 안정화제를 혼합함으로써, 동결 건조 제형 또는 수용액의 형태를 가지도록 제조 및 보관된다[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]. 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량과 농도에서 수용체에게 무독성이며, 그 예로서는 완충액 예를 들어, 인산염, 시트르산염 및 기타 유기산; 항산화제 예를 들어, 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 예를 들어, 염화 옥타데실디메틸벤질 암모늄; 염화 헥사메토늄; 염화 벤잘코늄, 염화 벤제토늄; 페놀, 부틸 알콜 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예를 들어, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레솔); 저 분자량(약 10개 미만의 잔기로 이루어진) 폴리펩티드; 단백질 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역 글로불린; 친수성 중합체 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 당당류, 이당류 및 기타 탄수화물 예를 들어, 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제 예를 들어, EDTA; 당 예를 들어, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염-형성 짝 이온 예를 들어, 나트륨; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비 이온 계면 활성제 예를 들어, 트윈(TWEEN)TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다.
- [0304] 본원의 제형은 또한 필요에 따라서, 특정 증상을 치료하기 위한 하나 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 약영향을 미치지 않는 상보적 활성을 가지는 화합물을 함유할 수도 있다. 이와 같은 분자들은 사용 목적에 효과적인 양만큼 혼합되어 제공되는 것이 적당하다.
- [0305] 활성 성분은 또한 예를 들어, 코아세르베이트 기술 또는 계면 중합에 의해서 제조된 미세 캡슐 예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미세 캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미세 캡슐에, 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노 입자 및 나노 캡슐)에, 또는 매크로에멀전에 포집될 수도 있다. 이와 같은 기술에 관하여는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.
- [0306] 생체 내 투여에 사용될 제형은 멸균된 상태이어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 이루어질 수 있다.
- [0307] 본 발명의 항체는 임의의 적당한 수단에 의해 투여되는데, 예를 들어, 비 경구, 피하, 복막 내, 폐 내 및 비강 내 투여에 의해 투여되며, 국소 치료를 원하는 경우에는, 병변 내 투여될 수도 있다. 비 경구 주입법으로서는 정맥 내, 동맥 내, 복막 내, 근육 내, 진피 내 또는 피하 투여를 포함한다. 뿐만 아니라, 항체는 특히, 이 항체의 투여량을 점점 줄이는 맥동성 주입법에 의해 적당히 투여된다. 상기 투여는 주사에 의해 이루어지는 것이 바람직하며, 정맥 내 또는 피하 주사에 의해 이루어지는 것이 가장 바람직하다. 기타 투여 방법 예를 들어, 국소 투여, 구체적으로 경피 투여, 경 점막 투여, 직장, 경구 또는 국부 투여 예를 들어, 원하는 위치에 인접한 곳에 꽂은 카테터를 통한 국부 투여가 고려된다.
- [0308] 비강 내 투여에 있어서, 본 발명의 약학 제형 및 약품은 적당한 용매(들)와 임의로는 기타 화합물 예를 들어, 안정화제, 항 박테리아 제제, 항산화제, pH 조정제, 계면 활성제, 생체 이용률 개선제 및 이것들의 혼합물을 함유하는 에어로졸 또는 스프레이일 수 있다. 에어로졸 제형에 사용되는 추진제로서는 압축 공기, 질소, 이산화탄소 또는 탄화수소계 저 비등 용매를 포함할 수 있다.
- [0309] 주사용 투여형은 일반적으로, 적당한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 제조될 수 있는 수성 현탁액 또는 오일 현탁액을 포함한다. 주사용 투여형은 용매 또는 희석제와 함께 제조된, 용액 상태일 수 있거나 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 허용 가능한 용매 또는 비이클로서는 멸균수, 링거 용액 또는 등장성 수성 염 용액을 포함한다.
- [0310] 주사 투여에 있어서, 약학 제형 및/또는 약물은 전술한 바와 같은 적당한 용액과 재구성되는데 적당한 분말일 수 있다. 그 예로서는 동결 건조, 회전 건조 또는 스프레이 건조 분말, 비결정성 분말, 과립, 침전물 또는 미립자를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 주사 투여에 있어서, 제형은 안정화제, pH 개질제, 계면 활성제, 생체 이용률 개선제 및 이의 혼합물을 함유할 수도 있다.
- [0311] 지속-방출형 제제를 제조할 수 있다. 지속 방출형 제제의 적당한 예로서는, 항체를 함유하는 소수성 고형 중합체의 반 투과성 매트릭스 즉, 성형품 예를 들어, 필름이나 미세 캡슐의 형태를 갖는 매트릭스를 포함한다. 지속

방출형 매트릭스의 예로서는 폴리에스테르, 하이드로겔(예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락타이드(미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비 분해성 에틸렌-아세트산비닐, 분해성 젯산-글리콜산 공중합체 예를 들어, 루프론 데포(Lupron Depot)TM(젯산-글리콜산 공중합체와 아세트산 루프롤리드로 이루어진 주사 가능한 미소 구), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다. 중합체 예를 들어, 에틸렌-아세트산 비닐 및 젯산-글리콜산은 분자를 100일 이상의 기간 동안 방출시킬 수 있으며, 어떤 하이드로겔은 단백질을 단기간 동안 방출시킨다. 캡슐에 싸인 항체가 장기간 동안 체내에 잔류할 때, 이 항체는 37°C의 수분에 노출됨으로 인해서 변성 또는 응집되어, 생물 활성을 잃을 수 있으며, 면역원성에도 변화가 생길 수 있다. 관련 기작에 따라서, 안정화를 위한 합리적인 기법이 고안될 수 있다. 예를 들어, 단일 응집 기작이 티오-이황화물의 교대를 통하여 형성된 분자 간 S-S 결합으로 인한 것으로 파악된다면, 안정화는, 설피히드릴 잔기를 변형시키고, 산성 용액으로부터 동결 건조시키며, 수분 함량을 조절하고, 적당한 부가제를 사용하며, 특정 중합체 매트릭스 조성물을 개발함으로써 이루어질 수 있다.

[0312] 본 발명의 제형은 본원에 개시된 바와 같이, 단기 작용형, 신속 방출형, 장기 작용형 또는 지속 방출형으로서 디자인될 수 있다. 그러므로, 약학 제형은 또한 조절 방출형 또는 서방형으로서도 제형화될 수 있다.

[0313] 본 발명의 조성물은 또한 예를 들어, 미셀이나 리포솜, 또는 기타 캡슐에 싸인 형태일 수 있으며, 아니면 장기 보관을 가능하게 하고/가능하게 하거나 전달 효과를 제공하는 장기 방출형(extended release form)으로 투여될 수 있다. 그러므로, 약학 제형 및 약물은 펠릿이나 실린더 형태로 압착될 수 있으며, 또한 근육 내 또는 피하에 데포(depot) 주사 또는 임플란트 예를 들어, 스텐트의 형태로 이식될 수 있다. 이와 같은 임플란트는 공지의 비활성 물질 예를 들어, 실리콘 및 생분해성 중합체를 사용할 수 있다.

[0314] 이와 같이, 전술한 각각의 투여형 이외에도, 약학적으로 허용 가능한 부형제 및 담체에 관하여는 일반적으로 당업자에게 공지되어 있으므로, 이러한 약학적으로 허용 가능한 부형제 및 담체도 본 발명에 포함된다. 이와 같은 부형제 및 담체에 관하여는 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991)]에 개시되어 있다.

[0315] 구체적인 투여량은 질병의 병상, 피험체의 연령, 체중, 전체적인 건강 상태, 유전자형, 성별 및 섭취 음식, 투여 간격, 투여 경로, 배설률 및 함께 사용되는 약물에 따라서 조절될 수 있다. 전술한 투여형 중 임의의 것의 유효 투여량은 통상의 실험을 통해 용이하게 결정할 수 있으므로, 본 발명의 범위 내에 있다.

[0316] 본 발명의 항체는 종종 기타 천연 생성 면역 글로불린 또는 기타 생물 분자를 실질적으로 포함하지 않은 상태로 제조될 것이다. 바람직한 항체는 또한 암이 발병하였거나, 발병할 소질이 있는 포유동물에게 투여될 때 최소한의 독성을 나타낼 것이다.

[0317] 본 발명의 조성물은 종래의 널리 공지된 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 결과로 생성된 용액은 사용을 위해 포장될 수 있거나, 또는 무균 조건 하에서 여과되어 동결 건조될 수 있는데, 이때, 동결 건조된 제제는 투여 전 멸균 용액과 혼합된다. 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능하며, 생리적 조건을 적당히 맞추는데 필요한 보조 물질 예를 들어, pH 조정제 및 완충제, 강장 조정제 등 예를 들어, 아세트산나트륨, 젯산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 및 안정화제(예를 들어, 20% 말토스 등)를 함유할 수 있다.

[0318] 본 발명의 항체는 또한 다양한 유형의 지질 및/또는 인지질 및/또는 계면 활성제를 포함하며, 약물(예를 들어, 본원에 개시된 항체, 및 임의로는 화학 요법 제제) 전달에 유용한 소형 소포인 리포솜을 통해 투여될 수도 있다. 리포솜으로서의 예멸전, 소포, 미셀, 불용성 단일층 구조물, 인지질 분산액, 라멜라층 구조물 등을 포함하며, 이것들은 상기 항체를 특정 조직에 표적화하고, 조성물의 반감기를 증가시키는 비이클로서 사용될 수 있다. 리포솜을 제조하는 다양한 방법이 사용될 수 있다[예를 들어, 미국 특허 제4,837,028호 및 동 제5,019,369호 참조; 상기 두 특허는 본원에 참고용으로 인용된 것임].

[0319] 본 발명의 항체를 함유하는 리포솜은 당 업계에 공지된 방법 예를 들어, 문헌[Epstein의 다수, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang의 다수, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); 및 미국 특허 제4,485,045호 및 동 제4,544,545호]에 개시된 방법에 의해 제조된다. 순환 시간이 증가된 리포솜에 관하여는 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다. 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하는 역상 증발법에 의하여 특히 유용한 리포솜을 생산할 수 있다. 리포솜은 공극의 크기가 제한된 필터를 통해 배출되며, 그 결과, 원하는 지름을 가지는 리포솜을 얻을 수 있다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은, 문헌[Martin의 다수, J. Biol. Chem.257: 286-288 (1982)]에 개시된 바와 같이, 이황화물 교환 반응을 통해, 리포솜에 접합될 수 있다. 임의로, 화학 요법 제제(예를 들어, 독소루비신)

가 상기 리포솜 내에 포함되기도 한다[예를 들어, Gabizon의 다수, J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989) 참조].

- [0320] 이와 같은 조성물 중 항체의 농도는 약 10 중량% 미만, 일반적으로는 약 25 중량% 이상~75 중량% 또는 90 중량%로 매우 다양할 수 있으며, 이는 주로 선택된 특정 투여 방식에 따라서 유체 부피 및 점도 등에 의해 선택될 것이다. 경구 투여, 국소 투여 및 비 경구 투여될 수 있는 조성물을 제조하는 실제 방법은 당 업자에게 공지되거나 명백할 것이며, 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995)]에 더욱 자세히 기술되어 있다.
- [0321] 환자의 질병을 치료하기 위한 본 발명의 조성물의 유효량은 당 업계에 널리 공지된 표준적인 실험 방법을 통해 결정될 수 있다. 이러한 목적을 이루기 적당한 양을 "치료학적 유효량"이라 정의한다. 항체의 유효량은 질병의 중증도와 치료 받을 환자의 체중 및 전체적인 몸 상태에 따라서 달라질 것이지만, 일반적으로는 체중 1kg당 약 1.0 μ g~약 100mg이다. 예시적인 투여량 범위는, 투여 당 약 10 μ g/kg~약 30mg/kg, 또는 약 0.1~약 20mg/kg, 또는 약 1~약 10mg/kg일 수 있다. 항체의 투여량은 또한 체표면적에 의해 정하여질 수도 있다(예를 들어, 4.5g/m² 이하). 항체의 기타 예시적인 투여량으로서는, (체중 80kg이거나, 또는 체표면적 1.8m²인 것으로 가정하였을 때) 1회 투여시 총 8g 이하를 포함한다.
- [0322] 투여 방법은 당 업계에 공지된 임의의 수단에 의할 수 있다. 예를 들어, 항체는 개별적으로 1회 이상 볼루스(bolus) 투여될 수 있거나, 또는 예를 들어, 5, 10, 15, 30, 60, 90 또는 120분 이상과 같이 단기간 또는 장기간 주입하여 투여될 수 있다. 초기 치료기간 이후, 그리고 치료에 대한 환자의 반응과 내성에 따라서, 예를 들어, 1주 단위, 2주 단위, 3주 단위, 4주 단위, 1개월 단위, 2개월 단위, 3개월 단위 또는 6개월 단위로, 환자의 반응성을 유지하는데 필요한 만큼 투여량을 유지시킬 수 있다. 질병에 의한 증상이 원하는 정도로 억제될 때까지 더욱 자주 투여할 수 있으며, 이 경우 투여량은 필요에 따라서 조정할 수 있다. 이와 같은 치료의 진행 과정은 종래의 기술과 검정법에 의하여 용이하게 모니터링될 수 있다. 치료는 제한된 기간 동안 이루어질 수 있거나, 또는 장기간 즉, 질병이 진행되어 사망에 이르게 될 때까지 여러 해에 걸쳐서 계속될 수 있다.
- [0323] 치료에 참여하고 있는 전문의에 의해 선택된 투여 수준 및 패턴으로 본 발명의 조성물을 1회 투여하거나 다수 회 투여할 수 있다. 상기 질병을 예방 또는 치료함에 있어서, 항체의 적당한 투여량은 진술한 바와 같이, 치료될 질병의 유형과 질병의 중증도 및 경과, 본 발명의 항체가 예방의 목적으로 투여되는지 아니면 치료의 목적으로 투여되는지 여부, 치료 경험이 있는지 여부, 환자의 병력과 항체에 대한 반응성, 그리고 치료에 참여하는 전문의의 판단력에 따라서 달라질 것이다. 상기 항체는 환자에게 한번에 또는 연속 처리 방식으로 투여되는 것이 적당하다
- [0324] 임의의 경우, 본 발명의 제형은 일정 기간에 걸쳐서 원하는 생물 활성을 나타내는데(예를 들어, 암의 중증도를 최소화하거나 암을 예방하는데 충분한 양만큼의 치료용 항체를 제공하여야 한다. 본 발명의 조성물은 단독으로 투여될 수 있거나, 또는 이러한 질병들을 치료하기 위한 것으로서 기타 당 업계에 공지된 기타 치료제와의 병행 요법에서 부가적인 수단으로서 투여될 수 있다.
- [0325] 항체 조성물은 우수한 의료 행위와 합치하는 방식으로 제형화, 투약 및 투여될 것이다. 이때 고려될 인자로서는, 치료될 특정 질환, 치료될 특정 포유동물, 환자 개인의 임상 증상, 질환의 원인, 제제의 전달 위치, 투여 방법, 투여 스케줄, 그리고 의료업계 실무자들에게 공지된 기타 인자를 포함한다. 투여될 항체의 치료학적 유효량은 이와 같은 고려 사항들에 의해 좌우될 것이며, 그 양은 곧, 표적- 매개 질병, 병상 또는 질환을 예방, 완화 또는 치료하는데 필요한 최소량이다. 이와 같은 양은 숙주에 독성이거나 또는 숙주가 감염에 더욱 민감하도록 만드는 양보다 작은 것이 바람직하다.
- [0326] 본 발명의 항체는 미지의 질환을 예방 또는 치료하는데 현재 사용되고 있는 하나 이상의 제제와 함께 반드시 제형화할 필요는 없다. 이와 같은 기타 제제의 유효량은 제형 중에 존재하는 항체의 양, 질병, 병상 또는 질환의 종류 또는 치료법, 그리고 진술한 기타 인자에 따라서 달라진다. 이와 같은 제제는 본원에서 진술한 바와 동일한 투여량과 투여 경로를 통하여 사용되거나, 또는 상기 사용된 투여량의 약 1~99% 정도로 사용된다.
- [0327] 본 발명의 다른 구체예에서는, 대상 병상을 치료하는데 유용한 물질을 함유하는 공산품이 제공된다. 상기 공산품은 용기와 표지를 포함한다. 적당한 용기로서는 예를 들어, 병, 바이알, 시린지 및 시험관을 포함한다. 상기 용기는 다양한 재료 예를 들어, 유리나 플라스틱으로 제조될 수 있다. 상기 용기에는 병상을 치료하는데 효과적인 조성물이 담겨져 있으며, 또한 이 용기의 입구도 멸균되어 있을 수 있다[예를 들어, 상기 용기는 진피 하 주사 바늘에 의해 뚫어지는 마개를 갖는, 정맥 내 투여용 용액 주머니 또는 바이알일 수 있다]. 본 발명의 조성물

내에 포함된 활성 제제는 본 발명의 항체이다. 상기 용기에 부착된 표지 또는 이 용기와 합체된 표지에는, 조성물이 특정 병상을 치료하는데 사용된다고 표시되어 있다. 상기 공산품은 제2의 치료제(예를 들어, 본원에 기술된 질병을 치료하는 제2의 치료제 중 임의의 것 포함)를 담고 있는 제2의 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 공산품은 또한 동결 건조 항체 제형을 재구성하는데 사용되는, 약학적으로 허용 가능한 완충액 예를 들어, 인산염-완충 염수, 링거 용액 또는 텍스트로스 용액을 담고 있는 제2의 용기를 포함할 수도 있다. 상업적으로 바람직하고, 사용자의 입장에서 적당한 기타 물질 예를 들어, 기타 완충액, 희석제, 필터, 바늘이 없는 시린지 및 팩키지 삽입물(사용 방법에 관한 지시 사항 포함)을 추가로 포함할 수 있다.

[0328] **면역 요법**

[0329] 암 환자를 치료하는데 유용한 항체로서는, 종양에 대하여 강력한 면역 반응을 개시할 수 있는 항체와, 세포 독성을 유도할 수 있는 항체를 포함한다. 세포 독성 제제에 접합한 항체는 EphB3을 발현하는 종양 조직에 세포 독성 제제를 표적화하는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 항체는 보체-매개성 또는 항체-의존성 세포 독성(ADCC) 기작에 의해 종양 세포를 용해할 수 있으며, 상기 세포 독성은 둘 다 효과기 세포 Fc 수용체 위치 또는 보체 단백질과 상호 작용하는 면역 글로불린 분자의 비변형 Fc 부분을 필요로 한다. 뿐만 아니라, 종양 성장에 대해 직접적인 생물 효과를 나타내는 항체는 본 발명을 수행하는데 있어서 유용하다. 이와 같이 세포 독성 항체가 작용할 수 있는 잠재적인 기작으로는, 세포 생장의 억제, 세포 분화의 조정, 종양 신생 혈관 형성 인자 프로파일의 조정, 그리고 세포 괴사의 유도를 포함한다. 특정 항체가 항-종양 효과를 나타내는 기작은, 일반적으로 당 업계에 공지되어 있는 바와 같이, ADCC, ADMMC, 보체-매개 세포 분해 등을 촉진하도록 디자인된, 임의의 수의 시험관 내 검정법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0330] 항-EphB3 항체는 이것 "자체의(naked)" 형태나 접합하지 않은 형태로 투여될 수 있거나, 또는 기타 치료제나 진단제에 직접 접합할 수 있거나, 또는 이와 같은 기타 치료제 또는 진단제를 포함하는 담체 중합체에 간접적으로 접합할 수 있다.

[0331] 항체는 방사성 동위 원소, 친화성 표지(예를 들어, 바이오틴 및 아비딘 등), 효소 표지(예를 들어, 호오스래디쉬 퍼옥시다제 및 알칼리성 인산화 효소 등), 형광 또는 발광 또는 생물 발광 표지(예를 들어, FITC 또는 로다민 등), 상자성 원자 등을 사용하여 검출 가능하도록 표지화될 수 있다. 이와 같이 표지화하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있는데; 예를 들어, 문헌[Sternberger, L.A.외 다수, J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A.외 다수, Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E.외 다수, Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)]을 참조하시오.

[0332] 항체 부위의 접합에 관하여는 미국 특허 제6,306,393호에 개시되어 있다. 일반적인 기술에 관하여는 문헌[Shih 외 다수, Int. J. Cancer 41 :832-839 (1988); Shih외 다수, Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990); 및 Shih외 다수, 미국 특허 제5,057,313호]에 개시되어 있다. 이와 같은 일반적인 방법은, 산화된 탄수화물 부를 가지는 항체 성분과, 하나 이상의 유리 아민 작용기를 가지고, 다수의 약물, 독소, 킬레이트화제, 보론 아덴드(boron addend), 또는 기타 치료제로 로딩된 담체 중합체를 반응시키는 단계를 포함한다. 이와 같은 반응으로 인하여, 처음에는, 환원에 의해 안정화될 수 있는 슈프(Schiff) 염기(이민)와 2차 아민의 결합이 형성되며, 그 결과, 최종 접합체가 생성된다.

[0333] 담체 중합체는 예를 들어, 아미노텍스트란 또는 50개 이상의 아미노산 잔기들로 이루어진 폴리펩티드일 수 있다. 약물 또는 기타 제제를 담체 중합체에 접합하는 다양한 기술에 관하여는 당 업계에 공지되어 있다. 아미노텍스트란 대신에 폴리펩티드 담체가 사용될 수 있지만, 상기 폴리펩티드 담체는 그 사슬 내에 50개 이상의 아미노산 잔기, 바람직하게는 100~5000개의 아미노산 잔기들을 가져야 한다. 아미노산 중 몇몇은 적어도 리신 잔기 또는 글루타메이트 또는 아스파테이트 잔기이어야 한다. 리신 잔기의 현수성 아민과, 글루타민 및 아스파테이트의 현수성 카복실레이트는 약물, 독소, 면역 조정제, 킬레이트화제, 보론 아덴드 또는 기타 치료제를 부착하는데 편리하다. 적당한 폴리펩티드 담체의 예로서는, 결과로 로딩된 담체 및 접합체에 원하는 가용성을 부여하는, 폴리리신, 폴리글루탐산, 폴리아스파르트산, 이것들의 공중합체, 그리고 이와 같은 아미노산과 기타 아미노산(예를 들어, 세린)의 혼합 중합체를 포함한다.

[0334] 대안적으로, 접합형 항체는 항체 성분과 치료제를 직접 접합함으로써 제조될 수 있다. 일반적인 방법은, 치료제가 산화 항체 성분에 직접 부착된다는 점을 제외하고는, 간접적인 접합법과 유사하다. 예를 들어, 반감기를 연장시키기 위하여 항체의 탄수화물 부를 폴리에틸렌글리콜에 부착시킬 수 있다.

[0335] 대안적으로, 치료제는 이황화 결합을 형성하거나, 또는 이중 이 작용성 가교제 예를 들어, N-숙시닐 3-(2-피리

딜디티오)프로피오네이트(SPDP)를 사용하여, 환원된 항체 성분의 힌지 부에 부착될 수 있다[Yu와 다수, Int. J. Cancer56:244 (1994)]. 이와 같은 일반적인 접합 기술은 당 업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Wong, Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking (CRC Press 1991); Upešlaciš와 다수, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch와 다수 (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter와 다수 (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)]을 참조하십시오. 다양한 이 작용성 단백질 커플링 제제 예를 들어, N-숙신이미딜-3-(2-피리디디티올)프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미노에스테르의 이 작용성 유도체(예를 들어, 디메틸 아디피메이트 HCL), 활성 에스테르(예를 들어, 디숙신이미딜 수버레이트), 알데히드(예를 들어, 글루타렐데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들어, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 그리고 비스-플루오르 활성 화합물(예를 들어, 1,5-디플루오르-2,4-디니트로벤젠)이 당 업계에 공지되어 있다.

[0336] 마지막으로, 하나 이상의 항-EphB3 항체부와 기타 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 구성할 수 있다. 항체 융합 단백질을 제조하는 방법에 관하여는 당 업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,306,393호를 참조하십시오. 인터루킨-2부를 포함하는 항체 융합 단백질에 관하여는 문헌[Boleti와 다수, Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet와 다수, Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker와 다수, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank와 다수, Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), 및 Hu와 다수, Cancer Res. 56:4998 (1996)]에 개시되어 있다.

[0337] 본 발명의 항체는 "본래의" 형태 또는 접합되지 않은 형태로 투여될 수 있거나, 또는 치료제와 접합한 형태를 가질 수 있다. 하나의 구체예에서, 본 발명의 항체는 방사선 증감제로서 사용된다. 이러한 구체예에서, 항체는 방사선 증감제에 접합된다. 본원에 사용된 "방사선 증감제"란 용어는, 치료학적 유효량으로 동물에 투여되면, 전자기 방사선에 대하여 방사선 감각될 세포의 감수성을 증가시키고/증가시키거나, 전자기 방사선으로 치료할 수 있는 질병의 치료를 촉진하는 분자, 바람직하게는 저 분자량 분자로서 정의된다. 전자기 방사선으로 치료할 수 있는 질병으로서는 신생물 질환, 양성 및 악성 종양 그리고 암 세포를 포함한다.

[0338] 본원에 사용된 "전자기 방사선" 및 "방사선"이란 용어로서는, 파장이 10^{-20} ~100미터인 방사선을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 구체예에서는, 다음과 같은 전자기 방사선을 사용한다: 감마-방사선 (10^{-20} 에서 10^{-13} m), X-선 방사선(10^{-12} ~ 10^{-9} m), 자외 광선(10~400nm), 가시 광선(400~700nm), 적외선(700nm~1.0mm), 그리고 극초단파(1mm~30cm).

[0339] 방사선 증감제는 전자기 방사선의 독성 효과에 대한 암 세포의 감수성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 현재, 다수의 암 치료 방법에서는 X-선의 전자기 방사선에 의해 활성화되는 방사선 증감제를 사용한다. X-선 활성화 방사선 증감제의 예로서는 다음과 같은 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다: 메트로니다졸, 미소니다졸, 테스메틸미소니다졸, 피모니다졸, 에타니다졸, 니모라졸, 미토마이신 C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, 니코틴아미드, 5-브로모데옥시우리딘(BuDR), 5-요도데옥시우리딘(IuDR), 브로모데옥시시티딘, 플루오로데옥시우리딘(FuDR), 하이드록시우레아, 시스플라틴, 그리고 이것들의 치료학적 유효 유사체 및 유도체.

[0340] 암의 광 역동 치료(PDT)에서는, 증감제의 방사선 활성 인자로서 가시 광선을 이용한다. 광 역동 방사선 증감제의 예로서는 다음과 같은 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다: 헤마토포르피린 유도체, 포토프린(Photofrin)(r), 벤조포르피린 유도체, NPe6, 주석 에티오포르피린(SnET2), 페오보르비드-a, 박테리오클로로필 -a, 나프탈로시아닌, 프탈로시아닌, 아연 프탈로시아닌, 그리고 이것들의 치료학적 유효 유사체 및 유도체.

[0341] 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 종양 예비 표적화(pretargeting)에 이용하기 위해 수용체(예를 들어, 스트렙타비딘)와 접합할 수 있는데, 여기서, 항체-수용체의 접합체는 환자에게 투여되고, 미결합 접합체는 소멸제를 사용하여 혈류로부터 제거하며, 그 다음에는 상기 환자에게 세포 독성 제제(예를 들어, 방사선 핵종)에 접합된 리간드(예를 들어, 아비딘)가 투여된다.

[0342] 본 발명은 또한, 검출 가능하도록 표지화된 형태를 하고 있는, 전술한 항체를 제공하기도 한다. 항체는 방사선 동위 원소, 친화성 표지(예를 들어, 바이오틴 및 아비딘 등), 효소 표지(예를 들어, 호소스래디쉬 퍼옥시다제 및 알칼리성 인산화 효소 등), 형광 또는 발광 또는 생물 발광 표지(예를 들어, FITC 또는 로다민 등), 상자성 원자 등을 사용함으로써, 검출 가능하도록 표지화될 수 있다. 이와 같이 표지화하는 방법에 관하여는 당 업계에

널리 공지되어 있다[예를 들어, Sternberger, L.A.의 다수, J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A.의 다수, Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E.의 다수, Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976) 참조].

- [0343] "표지"란, 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된 검출 가능 화합물 또는 조성물을 의미한다. 상기 표지(예를 들어, 방사성 동위 원소 표지 또는 형광 표지)는 그 자체로서 검출될 수 있거나, 또는 효소 표지의 경우에는 검출 가능한 기질 화합물 또는 조성물이 화학적으로 변형되는 것을 촉진할 수 있다. 대안적으로, 표지는 그 자체로서는 검출될 수 없지만, 검출 가능한 다른 제제에 의해 결합하고 있는 요소(예를 들어, 에피토프 태그, 또는 결합 파트너 예를 들어, 바이오틴-아비딘 등 중 어느 하나)일 수 있다. 그러므로, 본 발명의 항체는 분리를 촉진하는 표지 또는 태그를 포함할 수 있으며, 항체를 동정하는 본 발명의 방법은 표지 또는 태그와의 상호 작용을 통해서 항체를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0344] 대표적인 치료용 면역 접합체는, 세포 독성 제제 예를 들어, 화학 요법 제제, 독소(예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 이의 단편), 또는 방사성 동위 원소(즉, 방사성 접합체)와 접합된, 본원에 개시된 항체를 포함한다. 융합 단백질에 관하여는 이하에 보다 상세히 기술되어 있다.
- [0345] 면역 접합체를 생산하는 방법에 관하여는 미국 특허 제6,306,393호에 개시되어 있다. 면역 접합체는 치료제를 항체 성분에 간접적으로 접합함으로써 제조될 수 있다. 일반적인 기술에 관하여는 문헌[Shih의 다수, Int. J. Cancer 41:832-839 (1988); Shih의 다수, Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990); 및 Shih의 다수, 미국 특허 제 5,057,313호]에 개시되어 있다. 이와 같은 일반적인 방법은, 산화된 탄수화물 부를 가지는 항체 성분과, 하나 이상의 유리 아민 작용기를 가지고, 다수의 약물, 독소, 킬레이트화제, 보론 아텐드, 또는 기타 치료제로 로딩된 담체 중합체를 반응시키는 단계를 포함한다. 이와 같은 반응으로 인하여, 처음에는, 환원에 의해 안정화될 수 있는 슈프 염기(이민)와 2차 아민의 결합이 형성되며, 그 결과, 최종 접합체가 생성된다.
- [0346] 비록, 기타 실질적으로 균등한 중합체 담체도 사용될 수 있지만, 담체 중합체는 바람직하게는, 아미노텍스트란 또는 50개 이상의 아미노산 잔기들로 이루어진 폴리펩티드이다. 투여의 용이함과 치료시 표적화가 효율적으로 진행되기 위해서는, 최종 면역 접합체는 수용액 예를 들어, 포유동물의 혈청 중에서 가용성인 것이 바람직하다. 그러므로, 담체 중합체 상에 존재하는 작용기들을 용해하면, 최종 면역 접합체의 혈청 내 가용성이 증가할 것이다. 구체적으로, 아미노텍스트란이 바람직할 것이다.
- [0347] 아미노텍스트란 담체와의 면역 접합체를 제조하는 방법은, 통상적으로 텍스트란 중합체를 사용하여 개시하며, 유리하게는 평균 분자량이 약 10,000~100,000인 텍스트란을 사용하여 개시한다. 이 텍스트란은 산화제와 반응하여, 텍스트란의 탄수화물 고리의 일부분을 조절된 방식으로 산화시키는데, 그 결과, 알데히드가 생성된다. 산화는 종래의 방법에 따라서, 화학적 해당 시약 예를 들어, NaIO_4 를 사용하면 편리하게 진행된다.
- [0348] 이후, 산화 텍스트란은 폴리아민, 바람직하게는 디아민, 더욱 바람직하게는 모노- 또는 폴리하이드록시 디아민과 반응한다. 적당한 아민으로서는 에틸렌 디아민, 프로필렌 디아민, 또는 기타 유사한 폴리메틸렌 디아민, 디에틸렌 트리아민 또는 유사한 폴리아민, 1,3-디아미노-2-하이드록시프로판, 또는 기타 하이드록실화된 디아민 또는 폴리아민 등을 포함한다. 텍스트란의 알데히드기에 비하여 아민이 과량으로 사용되면, 알데히드 작용기들이 거의 전부 슈프 염기기로 전환된다.
- [0349] 환원제 예를 들어, NaBH_4 또는 NaBH_3CN 등은, 결과로 생성되는 슈프 염기 중간 물질을 환원에 의해 안정화시키는데 사용된다. 결과로 생성되는 부산물은 종래의 크기별 분류 컬럼(sizing column)을 통과하여 정제되며, 그 결과 가교 텍스트란이 제거될 수 있다.
- [0350] 아민 작용기를 도입하기 위해 텍스트란을 유도체화시키는 기타 종래의 방법 예를 들어, 브롬화시아노겐과 반응시킨 후, 디아민과 반응시키는 방법도 사용될 수 있다.
- [0351] 이후, 아미노텍스트란은, 종래의 방법 예를 들어, 디사이클로헥실카보디이미드(DCC) 또는 이의 수용성 변이체를 사용하는 방법에 의해 제조되어, 활성화된 형태, 바람직하게는 카복실-활성화 유도체의 형태로 로딩될 특정 약물, 독소, 킬레이트화제, 면역 조정제, 보론 아텐드 또는 기타 치료제의 유도체와 반응하며, 그 결과 중간 부산물이 생성된다.
- [0352] 대안적으로, 폴리펩티드 독소 예를 들어, 미국 자리공 항바이러스 단백질 또는 리신 A-사슬 등은, 글루타르알데히드 축합 반응이나, 또는 아미노텍스트란 상에 존재하는 아민과 단백질상에 존재하는 활성화 카복실기의 반응에 의해서, 아미노텍스트란에 커플링될 수 있다.

- [0353] 방사성 금속 또는 자기 공명 강화제에 대한 킬레이트화제에 관하여는 당 업계에 널리 공지되어 있다. 통상적인 것으로서는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 및 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)의 유도체가 있다. 이와 같은 킬레이트화제는 통상적으로 측쇄 상에 기를 보유하고 있는데, 이 기에 의해 킬레이트화제가 담체에 부착될 수 있는 것이다. 이와 같은 기로서는 예를 들어, 벤질이소티오시아네이트를 포함하는데, 이 기에 의하여, DTPA 또는 EDTA는 담체의 아민기와 커플링될 수 있다. 대안적으로, 킬레이트화제 상에 존재하는 카복실기 또는 아민기는 활성화되거나, 또는 유도체화된 후 커플링됨으로써, 담체와 커플링될 수 있다(이 모든 과정은 널리 공지된 방법에 의함).
- [0354] 보론 아덴드 예를 들어, 카보란은 종래의 방법에 의하여 항체 성분에 부착될 수 있다. 예를 들어, 카보란은, 당 업계에 널리 공지되어 있는 바와 같이, 현수성 측쇄 상에 존재하는 카복실 작용기로 제조될 수 있다. 상기 카보란의 카복실기를 활성화하고, 담체 상에 존재하는 아민과 축합시켜, 중간 접합체를 생산함으로써, 이와 같은 카보란을 담체 예를 들어, 아미노텍스트란에 부착시킬 수 있다. 이러한 중간 접합체는 이후 항체 성분에 부착되며, 그 결과, 이하에 기술된 바와 같이, 치료학적으로 유용한 면역 접합체가 생산된다.
- [0355] 아미노텍스트란 대신, 폴리펩티드 담체를 사용할 수 있으나, 상기 폴리펩티드 담체는 사슬 내 50개 이상, 바람직하게는 100~5000개의 아미노산 잔기를 가지는 것이어야 한다. 아미노산 중 적어도 일부는 리신 잔기 또는 글루타메이트 잔기 또는 아스파테이트 잔기이어야 한다. 리신 잔기의 현수성 아민과, 글루타민 및 아스파테이트의 현수성 잔기는, 약물, 독소, 면역 조정제, 킬레이트화제, 보론 아덴드 또는 기타 치료제를 부착시키기 편리하다. 적당한 폴리펩티드 담체의 예로서는, 결과로 로딩되는 담체와 면역 접합체에 바람직한 가용성을 부여하는, 폴리리신, 폴리글루탐산, 폴리아스파르트산, 이의 공중합체, 그리고 이와 같은 아미노산 및 기타 아미노산 예를 들어, 세린의 혼합 중합체를 포함한다.
- [0356] 약물, 독소, 킬레이트화제, 면역 조정제, 보론 아덴드 또는 기타 치료제로 로딩을 끝낸 후, 항체 성분의 탄수화물 부분을 산화하고, 결과로 생성된 알데히드(및 케톤) 카보닐과 담체 상에 잔류하는 아민기를 반응시킴으로써, 중간 접합체와 항체 성분을 접합할 수 있다. 대안적으로, 중간 접합체는, 치료제와의 로딩 이후, 중간 접합체 내에 도입된 아민기를 통하여, 산화된 항체 성분에 부착될 수 있다. 산화는 예를 들어, NaIO₄ 또는 기타 해당 시약을 이용하여 화학적 방식으로 수행되거나, 또는 예를 들어, 뉴라미니다제 및 갈락토스 산화 효소를 이용하여 효소에 의한 방식으로 수행되는 것이 편리하다. 아미노텍스트란 담체의 경우, 통상적으로 치료제를 로딩하는데 이 아미노텍스트란의 모든 아민이 사용되는 것은 아니다. 아미노텍스트란에 잔류하는 아민은 산화 항체 성분과 축합되고, 그 결과, 쉬프 염기 부산물이 형성되는데, 이 부산물은 이후 다시 수소화붕소 환원제로 인해 환원되어 안정화되는 것이 일반적이다.
- [0357] 본 발명에 따라서, 유사한 방법을 이용하여 기타 면역 접합체를 생산하게 된다. 항체 성분의 산화 탄수화물 부분과의 축합을 위해서는, 로딩된 폴리펩티드 담체에 유리 리신 잔기들이 잔류하고 있는 것이 바람직하다. 폴리펩티드 담체 상에 존재하는 카복실은, 필요에 따라서, 예를 들어, DCC에 의한 활성화 및 과량의 디아민과의 반응에 의해, 아민으로 전환될 수 있다.
- [0358] 종래의 기술 예를 들어, 세파크릴(Sephacryl) S-300 상에서의 크기별 분류 크로마토그래피 또는 친화성 크로마토그래피(하나 이상의 CD84Hy 에피토프 이용)를 이용하여, 최종 면역 접합체를 정제한다.
- [0359] 대안적으로, 면역 접합체는 치료제와 항체 성분을 직접 접합함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로 행해지는 방법은, 치료제가 산화 항체 성분에 직접 결합한다는 점을 제외하고는, 간접적인 접합 방법과 유사하다.
- [0360] 기타 치료제를 본원에 개시된 킬레이트화제로 대체할 수 있음을 알 것이다. 당 업자는 부적절한 실험을 수행하지 않고서도 접합 과정을 고안할 수 있을 것이다.
- [0361] 추가의 예로서, 이황화 결합을 형성함으로써, 환원된 항체 성분의 힌지 부에 치료제를 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 과산화 독성 펩티드는 펩티드를 항체 성분에 부착시키는데 사용되는 시스테인 잔기 하나와 함께 구성될 수 있다. 대안으로서, 이러한 펩티드는 이중 이 작용성 가교제 예를 들어, N-숙시닐 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)를 사용하여 항체의 성분에 부착될 수 있다[Yu외 다수, Int. J. Cancer56:244 (1994)]. 이와 같이 접합시키는 일반적인 방법에 관하여는 당 업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Wong, Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking (CRC Press 1991); Upeslasis외 다수, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch외 다수 (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter외 다수

(eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)]을 참조하시오.

- [0362] 항체와 세포 독성 제제의 접합체는 다양한 이 작용성 단백질 커플링 제제 예를 들어, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜 디티올)프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이 작용성 유도체(예를 들어, 디메틸 아디 피미데이트 HCL), 활성 에스테르(예를 들어, 디숙신이미딜 수버레이트), 알데히드(예를 들어, 글루타렐데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민, 비스-디아조늄 유도체(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들어, 툴리엔 2,6-디아소시아네이트), 그리고 비스-활성 플루오르 화합물(예를 들어, 1,5-디플루오르-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 제조된다. 예를 들어, 리신 면역 독소는 문헌[Vitetta와 다수, Science 238: 1098 (1987)]에 개시된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지화 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성 핵종을 항체에 접합하기 위한 킬레이트화 제제로서 대표적인 것이다(예를 들어, WO 94/11026 참조).
- [0363] 전술한 바와 같이, 항체의 Fc 부위 내에 존재하는 탄수화물 부위들은 치료제를 접합하는데 사용될 수 있다. 그러나, 만일 항체 단편이 면역 접합체의 항체 성분으로 사용되면, 상기 Fc 부위는 존재하지 않을 수 있다. 그러나, 탄수화물 부를 항체 또는 항체 단편의 경쇄 가변 부에 도입할 수도 있다. 예를 들어, 문헌[Leung와 다수, J. Immunol. 154:5919 (1995); Hansen와 다수, 미국 특허 제5,443,953호]을 참조하시오. 이후, 조작된 탄수화물 부는 치료제를 부착시키는데 사용된다.
- [0364] 뿐만 아니라, 당 업자는 접합 방법에 관한 다수의 변형을 알게 될 것이다. 예를 들어, 탄수화물 부위는 비변형 항체, 또는 이의 항원-결합 단편의 혈액, 림프 또는 기타 세포 외 유체 내 반감기를 연장하기 위해 폴리에틸렌 글리콜을 부착하는데 사용될 수 있다. 더욱이, 치료제를 탄수화물 부위와 유리 설피히드릴기에 부착함으로써 "2가 면역 접합체"를 구성할 수 있다. 이러한 유리 설피히드릴기는 항체 성분의 힌지 부에 위치할 수 있다.
- [0365] 항체 융합 단백질
- [0366] 본 발명은 하나 이상의 항체 부위와 다른 폴리펩티드 예를 들어, 면역 조정 인자 또는 독소 부위를 포함하는 융합 단백질을 사용하는 것도 고려한다. 항체 융합 단백질을 제조하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제6,306,393호를 참조하시오. 인터루킨-2 부위를 포함하는 항체 융합 단백질에 관하여는 문헌[Boletti와 다수, Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet와 다수, Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker와 다수, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank와 다수, Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), 및 Hu와 다수, Cancer Res. 56:4998 (1996)]에 개시되어 있다. 뿐만 아니라, 문헌[Yang와 다수, Hum. Antibodies Hybridomas 6:129 (1995)]에는, F(ab')₂ 단편과 중앙 피사 인자 알파 부위를 포함하는 융합 단백질에 관하여 개시되어 있다.
- [0367] 제조합 분자가 하나 이상의 항체 성분 및 독소 또는 화학 요법 제제를 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 제조하는 방법도 당 업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 항체-슈도모나스(*Pseudomonas*) 내독소 A 융합 단백질에 관하여는 문헌[Chaudhary와 다수, Nature 339:394 (1989), Brinkmann와 다수, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:8616 (1991), Batra와 다수, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:5867 (1992), Friedman와 다수, J. Immunol. 150:3054 (1993), Wels와 다수, Int. J. Can. 60:137 (1995), Fominaya와 다수, J. Biol. Chem. 271:10560 (1996), Kuan와 다수, Biochemistry 35:2872 (1996), 및 Schmidt와 다수, Int. J. Can. 65:538 (1996)]에 개시되어 있다. 디프테리아 독소 부위를 함유하는 항체-독소 융합 단백질에 관하여는 문헌[Kreitman와 다수, Leukemia 7:553 (1993), Nicholls와 다수, J. Biol. Chem. 268:5302 (1993), Thompson와 다수, J. Biol. Chem. 270:28037 (1995), 및 Vallera와 다수, Blood 88:2342 (1996)]에 개시되어 있다. 문헌[Deonarain와 다수, Tumor Targeting 1:177 (1995)]에는, RNase 부위를 보유하는 항체-독소 융합 단백질에 관하여 개시되어 있는 반면에, 문헌[Linardou와 다수, Cell Biophys. 24-25:243 (1994)]에는, DNase I 성분을 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 생산하는 방법에 관하여 개시되어 있다. 겔로닌(gelonin)은 문헌[Wang와 다수, Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif, Apr. 2-6, 1995, Part 1, BIOT005]의 항체-독소 융합 단백질 내 독소 부위로서 사용되었다. 추가의 예로서, 문헌[Dohlsten와 다수, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:8945 (1994)]에는, 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 내독소-A를 포함하는 항체-독소 융합 단백질에 관하여 개시되어 있다.
- [0368] 이와 같은 접합체를 제조하는데 적당히 사용되는 독소의 예로서는, 리신, 아브린, 리보뉴클레아제, DNase I, 스태필로코커스 내독소-A, 자리공 항바이러스 단백질, 겔로닌, 디프테린 독소, 슈도모나스 외독소 및 슈도모나스 내독소가 있다. 예를 들어, 문헌[Pastan와 다수, Cell 47:641 (1986), 및 Goldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994)]을 참조하시오. 기타 적당한 독소에 관하여는 당 업자에게 공지되어 있다.

- [0369] 본 발명의 항체는 또한, 전구 약물(예를 들어, 펩티딜 화학 요법 제제(WO 81/01145 참조)을 활성 항암 약물로 전환시키는 전구 약물-활성화 효소에 접합되어, ADEPT에서 사용될 수도 있다. 예를 들어, 문헌[WO 88/07378 및 미국 특허 제4,975,278호]을 참조하시오.
- [0370] ADEPT에 유용한 면역 접합체의 효소 성분으로서, 전구 약물을 그것의 보다 활성이 큰 세포 독성 형태의 것으로 전환시키는 방식으로, 전구 약물 상에서 작용을 할 수 있는 임의의 효소를 포함한다.
- [0371] 본 발명의 방법에 유용한 효소로서는 인산염-함유 전구 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리성 인산화 효소; 황산염-함유 전구 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아틸설과타제; 무독성 5-플루오로시토신을 항암 약물인 5-플루오로우라실로 전환하는데 유용한 시토신 탈 아민 효소; 펩티드-함유 전구 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 단백질 분해 효소 예를 들어, 세라티아(*serratia*) 단백질 분해 효소, 서모리신, 서브틸리신, 카복시펩티다제 및 카텡신(예를 들어, 카텡신 B 및 L); D-아미노산 치환기를 함유하는 전구 약물을 전환시키는데 유용한 D-알라닐카복시펩티다제; 당화된 전구 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물-절단 효소 예를 들어, β -갈락토시다제 및 뉴라미니다제; β -락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 β -락타마제; 그리고 아민 질소에서 페녹시아세틸기 또는 페닐아세틸기로 각각 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페니실린 아미다제 예를 들어, 페니실린 V 아미다제 또는 페니실린 G 아미다제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 대안적으로, 효소 활성을 가지는 항체(당 업계에는 애브자임(abzyme)이라고도 알려짐)는 본 발명의 전구 약물을 유리 활성 약물로 전환시키는데 사용될 수 있다[예를 들어, Massey, Nature 328: 457-458 (1987) 참조]. 본원에 기술된 바에 따르면, 항체-애브자임 접합체는 애브자임을 중앙 세포 군집에 전달하기 위해 제조될 수 있다.
- [0372] 본 발명의 효소는, 당 업계에 널리 공지된 기술 예를 들어, 전술한 바와 같은 이중 이 작용성 가교 시약을 사용하는 기술을 통하여, 항체에 공유 결합될 수 있다. 대안적으로, 적어도 본 발명의 효소의 기능상 활성인 부분이, 적어도 본 발명의 항체의 항원 결합부에 결합하고 있는 융합 단백질은, 당 업계에 알려진 재조합 DNA 기술을 이용하여 구성될 수 있다[예를 들어, Neuberger 외 다수, Nature 312: 604-608 (1984) 참조].
- [0373] **치료 목적 이외의 목적**
- [0374] 본 발명의 항체는 표적 항원에 대한 친화성 정제 제제로서 사용될 수 있거나, 또는 예를 들어, 특정 세포, 조직 또는 혈청 중 표적 항원의 발현 여부를 검출하는, 표적 항원에 대한 진단 검정법에서 사용될 수 있다. 항체는 또한 생체 내 진단 검정법에서 사용될 수도 있다. 일반적으로, 이러한 목적으로, 항체를 방사성 핵종(예를 들어, ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , P 또는 ^{35}S)으로 표지화하고, 면역 신틸레이션 측정기(immunoscintigraphy)를 사용하여 종양을 국소화할 수 있다.
- [0375] 본 발명의 항체는 임의의 공지된 검정법 예를 들어, 경쟁적 결합 검정법, 직간접 샌드위치 검정법 예를 들어, ELISA, 그리고 면역 침전 검정법에서 사용될 수 있다[Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)]. 항체는 또한 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 종양 시료를 표지화하기 위한 면역 조직 화학법에서도 사용될 수 있다.
- [0376] 편의상, 본 발명의 항체를 키트의 형태로 제공할 수도 있는데, 즉, 진단 검정법을 수행하는 지침과 아울러, 소정량의 시약들을 함께 포장하여 키트의 형태로 제공할 수 있다. 항체를 효소로 표지화할 경우, 상기 키트는 효소가 필요로 하는 기질과 보조 인자(예를 들어, 검출 가능한 발색단 또는 형광단을 제공하는 기질 전구체)를 포함할 것이다. 뿐만 아니라, 기타 부가제 예를 들어, 안정화제, 완충액(예를 들어, 차단 완충액 또는 용해 완충액) 등이 포함될 수도 있다. 검정법의 감수성을 실질적으로 최적화하는 시약 용액 중 농도를 제공하는, 다양한 시약들의 상대적 양은 매우 다양할 수 있다. 특히, 용해시 적당한 농도의 시약 용액을 제공할 부형제를 포함하는 시약들은, 일반적으로 동결 건조된 건조 분말로서 제공될 수 있다.
- [0377] **[실시예]**
- [0378] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 기술할 것인데, 이 실시예들은 어떠한 방식으로든지 본 발명을 제한하는 것은 아니다.
- [0379] **실시예 1**
- [0380] **EphB3 세포의 도메인(ECD)의 제조**
- [0381] EphB3의 ECD를 재조합 방식으로 발현하기 위해, 우선, 이중 중합 효소 PCR(nested PCR) 방법을 수행하여 태그를

통합하고, 또한 발현 벡터에 통합하기 위해 제제 내 암호화 부위의 말단을 조작하였다. 이때, 다음과 같은 프라이머들을 사용하였다(이하, 5'→3' 서열 방향으로 제시함):

- [0382] 정방향 #1 :
- [0383] TCGTATACATTTCTTACATCTATGCGCTGGAAGAGACCCTCATGGACACAAA (서열 번호 422)
- [0384] 정방향 #2:
- [0385] GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACATATGAAATCTT
- [0386] AGTCAACGTTGCCCTTGTTTTATGGTCGTATACATTTCTTACATCTATGCG (서열 번호 423)
- [0387] 역방향 #1:
- [0388] CGGGTCGTCGAGGTCCTCGTGAAGGGCCTCGTGTAGTGGTAGTGGTAGTGCCT (서열 번호 424)
- [0389] 역방향 #2:
- [0390] CCTCGTGTAGTGGTAGTGGTAGTGCCTCGAATTTGGGTGCAAGAACATGTTTACCAGGG (서열 번호 425)

[0391] 제조자의 지침에 따라서, Pfu울트라™ 핫스타트 PCR 마스터 믹스(PfuUltra™ Hotstart PCR Master Mix; Stratagene)를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 증폭에 사용된 주형은 pDONOR201에 클로닝된 EphB3 ECD 단편이었다. 토포이소머라제 클로닝 기술을 이용하여 pBlueBac4.5GW에 ECD PCR 생성물을 클로닝하였다. 이중 사슬 서열 결정법을 이용하여 최종적으로 선택된 클론을 확인하였다. 곤충에 형질 감염시키기 위해, 각각의 클론을 대표하는 10~20µg의 DNA를 제조하였다.

[0392] 재조합 구조물을 사용하여 다음과 같이 곤충 세포 내에서 EphB3 ECD를 발현시켰다. EphB3의 세포외 도메인을 암호화하는 플라스미드 DNA와, 사파이어(Sapphire)™ 게놈 오토그라프 캘리포니카(Autographa californica) DNA를 함께 형질 감염시킨 것을 플라크 정제하여, 바큘로바이러스(Baculovirus)를 분리하였다. 재조합 바이러스를 증폭시킨 후, 이를 곤충 세포인 Tn5 곤충 세포를 감염시키는데 사용하였다[밀도 = 1~1.5 × 10⁶ 세포/ml, 감염 다중도(multiplicity of infection; moi) = 10 ℓ(작업 부피)들이 과장 생물 반응기 내 2~10]. 감염시킨 지 48 시간 경과 후, 세포와 상청액을 수집한 다음, 이를 원심 분리시키고, 상청액을 준비하여 농축시켰다. 상청액을 0.45µm의 공동 섬유 카트리지가 상에서 투명하게 만든 다음, 접선 유속 10kDa MW 컷-오프 막으로 8회 원심 분리시켰다. 단백질을 정제하기 전, 상청액을 1ℓ 들이, 0.2µm 공극 진공 플라스크를 사용하여 여과 살균하였다.

[0393] EphB3 ECD는 다음과 같이 정제하였다. EphB3 ECD를 함유하는 곤충 세포 배양 상청액을 13ml/분의 유속으로 25ml Ni 킬레이트화 컬럼(G.E. 수지 카탈로그 번호: 17-5318-03)[완충액 A(PBS/0.35M NaCl/5mM 이미다졸) 중 평형]에 통과시켰다. 30-컬럼-부피 구배[완충액 A→완충액 B(PBS/0.35M NaCl/250mM 이미다졸)]를 걸어주어, 결합한 단백질 즉, EphB3 ECD를 함유하는 단백질을 용출시켰다. 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 원하는 순도의 EphB3 ECD를 함유하는 분획들을 풀링(pooling)하였다. 상기 풀을 완충액 A에 대해 투석한 다음, 5ml들이 HisTrap(G.E.) 컬럼에 2회 통과시켰다. 처음 행하여졌던 Ni 킬레이트화 컬럼 사용 과정과 동일한 방식으로 상기 HisTrap 컬럼을 용출시켰다. 분획들을 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 원하는 순도의 EphB3 ECD 단백질을 함유하는 분획들을 풀링하였다. 최종 풀을 PBS/0.1M 아르기닌에 대해 투석하였다. N-말단 서열 결정법과 환원 및 비 환원 SDS-PAGE(쿠마시(Coomassie) 염색법 및 웨스턴 분석법)를 이용하여, 최종 물질의 동일성과 순도를 분석하였다.

[0394] **실시예 2**

[0395] **젓과 동물 하이브리도마에 의해 분비된 표적-특이적 항체의 동정**

[0396] 하이브리도마 생산에 사용된 면역원은, 인간 EphB3의 세포외 도메인(ECD)(서열 번호 2의 37~558번 아미노산에 해당함)의 재조합된 형태의 것으로서, 바큘로바이러스/곤충 세포 발현 시스템을 통해 생산된 것이었다. 면역화하기 위해서, 상기 ECD를 동 부피의 애쥬반트와 혼합하였으며, 이 혼합물을 실험 동물의 뒷다리 발바닥의 배면에 피하 주사하였다. 다양한 면역화 스케줄에 따라서 3~14일마다 면역원을 마우스에 주사하여, 강력한 면역 반응을 유발시켰다. 이후, 면역 반응이 우수한 마우스를 안락사시킨 후, 림프절을 꺼내어, 이 림프절 내 B 세포들을 수집하였다. 그 다음, 당 업계에 널리 공지된 기술에 따라서 B 세포를 골수종 세포에 융합시키고, 하이브리도마가 ELISA 및 FACS 검정법에서 EphB3 단백질을 인지하는 항체를 생산하는지 여부에 대해 스크리닝하였다.

[0397] **실시예 3**

- [0398] **과지 디스플레이에 의한 표적-특이적 항체의 동정**
- [0399] **항체 스크리닝**
- [0400] 작동 활성을 가지는 항-EphB3 항체 패널을 분리하기 위해, EphB3의 세포의 도메인(ECD)으로 초 면역화된(hyperimmunized) 마우스로부터 생산된 옴니클로날 과지 디스플레이 라이브러리(Omnichlonal phage display library)(Buechler외 다수 Patent Number 6057098)를 스크리닝하였다.
- [0401] 미국 특허 제6,057,098호의 프로토콜에 따라서, 상기 옴니클로날 라이브러리로부터 얻어진 단일 콜로니가 결합 활성을 갖는지 여부에 대해 ELISA 검정법을 통하여 스크리닝하였다. 요약하면, 극미 배양액(microculture)을 OD₆₀₀이 0.6이 될 때(즉, 0.2% w/v의 아라비노스를 첨가한 후 30℃의 진탕 항온 처리기 내에서 밤새도록 배양하였을 때, 가용성 항체 단편의 발현이 유도되는 시점)까지 생육시켰다. 박테리아를 스피인 다운(spin down)시키고, 세포질 주변 추출물을 준비하여, 이를, 미세 평판 제조자에 의해 제공된 표준적인 ELISA 프로토콜에 따라서, Nunc MaxiSorp™ 미세 평판 상에 고정된 EphB3-ECD의 항체 결합 활성을 검출하는데 사용하였다. 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석법을 이용하여, 항체가 CHO-K1-EphB3 발현 세포에 결합하였는지 여부를 평가하였다.
- [0402] **과지 디스플레이에 의해 동정된 후보 항체의 전 IgG로의 전환**
- [0403] 초기 스크리닝으로부터 얻어진 리드 후보 결합체를, 항체 중쇄 및 경쇄 불변 부를 포함하는 항체로 전환하기 위하여, 상기 결합체의 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 부에 대한 암호화 서열을, 카파(κ) 및 감마-1($\gamma 1$) 불변 부 유전자를 암호화하는 독점 포유동물 발현 벡터(WO 2004/033693)에 클로닝하였다.
- [0404] 항체를 293E 세포에서 일시적으로 발현시켰다[Handa외 다수, 2004 American Society of Cancer Biology Poster #1937]. 형질 감염된 세포의 상청액을 배양후 6일 경과시에 수집하고, 제조자의 프로토콜에 따라서 단백질 A 세파로스(GE Healthcare)를 이용하여 IgG를 정제하였다.
- [0405] **실시예 4**
- [0406] **선택된 항-EphB3 항체의 친화도 측정**
- [0407] 제1 프로토콜:
- [0408] 아민 커플링 현상을 이용하여, 단백질 A를 CM5 바이오센서 칩 상에 고정시켰다. 항-EphB3 항체(0.75 μ g/ml)를 HBS-EP 완충액(0.1M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 계면 활성제 P20) 중에 1:100으로 희석시키고, 이를 1분 30초 동안, 변형된 바이오센서 표면에 포착시켰다. 제조합 가용성 EphB3 ECD(세포의 도메인)을, HBS-EP 완충액 중 다양한 농도로, 바이오센서 표면에 흘려보냈다. 스크러버 소프트웨어(Scrubber software) 및 바이어이벨류에이션 소프트웨어(BiaEvaluation software)(상호 작용 모델/전체적 부합성(global fit)이 1:1)를 병용하여, 역학 상수 및 친화도 상수를 측정하였다.
- [0409] 제2 프로토콜:
- [0410] 래트 항-마우스 Fc(RamFc)를 CM5 바이오센서 칩 상에 고정시켰다(아민 커플링에 의함). 항-EphB3 항체(0.75 μ g/ml)를 HBS-EP 완충액 중에 1:200의 비율로 희석시킨 다음, 이를 1분 30초 동안 변형 바이오센서 표면상에 포착시켰다. 제조합 가용성 EphB3 ECDfmf, HBS-EP 완충액 중 다양한 농도로, 바이오센서 표면에 흘려보냈다. 스크러버 소프트웨어 및 바이어이벨류에이션 소프트웨어(상호 작용 모델/전체적 부합성이 1:1)를 병용하여, 역학 상수 및 친화도 상수를 측정하였다.
- [0411] 친화도 측정 실험의 결과들을 이하 표 3에 제시하였다.

[0412] [표 3]

| 항체 | $K_a(M^{-1}sec^{-1})$ | $K_d(sec^{-1})$ | $K_D(nM)$ |
|-------------|-----------------------|-----------------|-----------|
| XHA.05.337 | 3.53e4 | 2.79e-3 | 79 |
| XHA.05.228 | 2.15e4 | 4.52e-3 | 210 |
| XHA.05.200 | 4.86e4 | 1.39e-3 | 28.6 |
| XHA.05.111* | 2.14e5 | 1.21e-2 | 57 |
| XHA.05.885* | 1.39e5 | 1.19e-3 | 8.5 |
| XPA.04.001 | 2.15e5 | 3.19e-4 | 1.5 |
| XPA.04.019 | 1.18e5 | 7.20e-4 | 6.1 |
| XPA.04.013 | 1.16e5 | 3.88e-4 | 3.4 |
| XPA.04.018 | 1.49e5 | 2.34e-4 | 1.6 |
| XPA.04.048 | 2.66e5 | 1.60e-4 | 0.6 |

* RamFc 포맷으로 XHA.05.111 및 XHA.05.885를 분석함

[0413]

[0414] 실시예 5

[0415] EphB3 항체 에피토프 비닝(binning)

[0416] 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술을 이용하는 연속적인 경쟁 검정 기술에 의해 항-EphB3 항체를 에피토프 빈(bin)에 할당하였다. 이 방법에 있어서, 하나의 항체를 센서 칩 상에 직접적으로 또는 포착 체제를 통해 고정시켜, 고정된 항체에 리간드(EphB3 ECD)를 주입할 때 이 리간드가 결합할 수 있도록 만들었다. 이후 제2의 테스트용 항체를 주입하여, 상기 제1 항체에 의해 포착된 리간드와 이 제2 테스트 항체가 결합하는 능력을 측정하였다. 만일 항체가 리간드 상 에피토프와 공간적으로 분리되어 있다면, 상기 제2 항체는 리간드/제1 항체의 복합체에 결합할 수 있을 것이다. 2개의 상이한 항체들이 리간드의 동일한 분자에 동시에 결합할 수 있는 능력을 짝 형성(pairing)이라고 한다.

[0417] 1. 실험의 첫 번째 시리즈에서는 모든 유동성 세포 상에 토끼 항-마우스 Fc 특이적 항체(RAM-Fc)를 고 밀도로 코팅한 CM5 센서 칩을 사용하였다.

[0418] a. 전개 완충액은 HBS-EP(Biacore®, Inc.)이었으며, 온도는 25°C로 설정하였고, 유속은 10 μ l/분이었다.

[0419] b. 1~3분 동안 희석액을 1~10 μ g/ml 주사하여 각각의 유동성 세포 상에 상이한 항체를 포착시켰으며, 이때, 포착 수준은 200~1000RU였다.

[0420] c. 이후, 30분 동안 100 μ g/ml의 마우스 IgG(HBS-EP 중)를 주입하여 상기 표면을 차단하였다.

[0421] d. 짝 형성 여부에 대해 테스트될 항체를 1 μ g/ml의 농도로 주입하여, 상기 칩이 효과적으로 차단되었는지 확인함과 아울러, 상기 항체의 배경 결합 수준을 측정하였다.

[0422] e. 2~4분 동안 2~10 μ g/ml의 리간드를 주입하였다.

[0423] f. 상기 1d 단계에서와 같이, 짝을 형성할 항체를 다시 주입하였다. 만일 이와 같은 주입 과정 중에 항체가 결합하면, 상기 두 항체들은 짝을 형성하므로, 이 항체들은 별도의 에피토프 빈에 포함시킨다. 만일 제2 항체가 결합하지 않았다면, 이 항체는 제1 항체와 결합에 대해 경쟁하는 것이며, 이들 항체는 동일한 에피토프 빈(BIN) 또는 중첩 에피토프 빈에 포함시킨다.

[0424] g. 자가-짝 형성에 대한 대조군으로서, 각각의 포착된 항체들이 그 자체와 짝을 형성하는지에 대해 테스트하였다.

[0425] 2. 일단 몇몇 에피토프 빈 또는 짝을 형성하지 않은 유일한 항체 세트들이 규명되면, 이 항체들을 사용하여 항

체에 관한 관찰을 추가로 실시하였다. 한거번에, 4개의 항체를 사용하여 연속적으로 항체를 분석하였다. 4개의 유동성 세포 각각에 존재하는 상이한 에피토프 빈으로부터 하이브리도마 항체를 포착한 후, 전술한 짝 형성 프로토콜을 동시에 4개의 세포 전부에 대해 수행함으로써, 보다 큰 시료 세트를 분석하였다.

[0426] 3. 이 과정은, RAM-Fc 표면이 인간 Fab을 포착하지 않는 것과 같이, 100µg/ml의 마우스 IgG를 사용하는 차단 단계를 수행하지 않는 변형을 통해 인간 항체 Fab 단편을 평가하는데 이용되었다.

[0427] 경쟁 실험의 결과로서, 표 4에 제시한 에피토프 빈을 한정하였다. 결합 친화도가 가장 큰 항체 전부(상기 실시예 4 참조)는 빈 3에 속한다.

[0428] [표 4]

바이어코어® 2000 짝형성 데이터를 통해 분류한 에피토프 빈

| 빈 1 | 빈 2 | 빈 3 | 빈 4 | 빈 5 | 빈 6 | 빈 7 | 빈 8 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| XHA.05.465 | XHA.05.119 | XHA.05.964 | XHA.05.660 | XHA.05.676 | XHA.05.030 | XHA.05.200 | XHA.05.111 |
| XHA.05.783 | XHA.05.228 | XHA.05.653 | XHA.05.552 | | | XHA.05.005 | |
| XHA.05.031 | XHA.05.337 | XHA.05.885 | XHA.05.949 | | | XHA.05.001 | |
| XHA.05.942 | XHA.05.440 | XPA.04.001 | XHA.05.151 | | | XHA.05.888 | |
| XHA.05.751 | XPA.04.022 | XPA.04.013 | XPA.04.019 | | | | |
| XHA.05.599 | | XPA.04.018 | | | | | |
| XPA.04.031 | | XPA.04.036 | | | | | |
| XPA.04.030 | | XPA.04.046 | | | | | |
| XPA.04.040 | | XPA.04.048 | | | | | |

[0429]

[0430] 실시예 6

[0431] 유동성 세포 측정법을 바탕으로 한 검정법과 EphB3 인산화 및 분해를 측정하는 방법을 통한, 작동성 EphB3 항체의 선별

[0432] EphB3에 표적화된 작동성 항체를 동정하기 위해서, 2가지 유동성 세포 측정법(FACS)을 바탕으로 한 검정법을 개발하여, 수용체 활성화의 하루 효과를 관찰하였다: (1) 신호 전달 경로 활성화에 관한 척도로서의 총 세포 포스포-티로신(pY); 및 (2) 수용체 내재화(활성화된 수용체의 하향 조절 여부를 측정하기 위함).

[0433] 총 세포 내 티로신 인산화

[0434] 총 세포 내 pY 검정법에서는, 현탁-적용되었고, 안정하게 형질 감염된 CHO 세포주(높은 수준의 수용체 발현)를 사용하였다. 이 검정법에서는 하이브리도마 상청액, 정제된 하이브리도마-유래 항체, 그리고 정제된 전 IgG 재설정 파지 디스플레이-유래 항체를 사용하였다.

[0435] EphB3을 과발현하는 현탁 적용 CHO-K1 세포를 둥근 바닥 96-웰 평판에 접종하였다(2×10^5 세포/웰). 이후, EphB3에 대한 항체를 각각의 시료 웰에 1:10의 비율로 직접 희석하였다. 시료를 37°C에서 40~45분 동안 항온 처리하였다. 항온 처리 후, 세포를 20분 동안 실온에서, 2%의 포름알데히드로 고정시켰다. 이후, 세포를 투과 완충액으로 2회 세척하고, 이를 PE 접합 마우스 항-포스포티로신 항체(PY20)를 함유하는 투과 완충액 중에 재현탁하였다. 세포를 4°C에서 1시간 동안 항온 처리하고, 이를 투과 완충액으로 2회 세척한 다음, 유동성 세포 측정법으로 분석하였다.

[0436] 테스트된 항체 중 약 24%가 pY 검정법에서 작동 활성을 나타내었다. 항체-처리된 세포(EphB3 과발현 CHO 세포주 및 종양 세포주)로부터 유래하는 용해물을 대상으로 하여 면역 침전법을 수행한 다음, 웨스턴 분석법(이하 참조)을 수행하였으며, 이로부터 얻어진 데이터를 통해, pY-유도 항체가 EphB3의 인산화를 촉발시킴을 알 수 있었다.

[0437] 세포 표면상 EphB3의 정상-상태 수준을 측정하는 검정법

[0438] 총 세포 내 pY 검정법을 이용하여 동정된 상층 후보 항체들을 대상으로, 세포 표면 EphB3 하향 조절 및 분해에 대해 추가로 특성 규명하였다. 우선, FACS 및 바이어코어(Biacore)®를 이용하여 에피토프 경쟁 연구를 수행하였으며, 그 결과, 상층 pY-유도성 항체와 최소한으로 경쟁하는, 강력한 FACS-포지티브 "검출" 항체를 동정하였다. 이와 같은 항체들을 사용하여, pY-유도성 항체를 첨가한지 2~72 시간 경과시의 세포 표면 EphB3 수준을 관찰하는 FACS-계 검정법을 진행하였다.

[0439] 현탁 적용된 SW620 세포를 항-EphB3 항체 또는 제조합 리간드 단백질(10µg/ml)과 함께 2~72 시간 동안 배양하였다. 각 시점에서, 유동성 세포 측정 분석법[하이브리도마-유래 마우스 항-표적 검출 항체(키메라 인간 항체로

처리한 세포용) 또는 키메라 인간 항-표적 검출 항체(하이브리도마 유래 항체로 처리한 세포용) 사용]에 의해 EphB3의 세포 표면 수준을 측정하였다. 비록 스크리닝은 EphB3 결합 처리가 된 항체와 최소한으로 경쟁하는 검출용 항체를 선별하기 위해 행하여졌지만, 대부분의 경우, 간섭은 낮은 수준에 불과하였다(10~20%). 신선한 SW620 세포를 처리 항체로 간단하게 예비 항은 처리한 후 검출용 항체로 염색하는 조건을 적용하여, 각각의 처리 항체에 대한 검출용 항체의 최대 결합 능을 측정하였다.

[0440] 항체의 하위 세트에서는, 2시간 경과시 세포 표면 수용체가 급진적으로 하향 조절되었으며, 이 상태는 72시간 경과시까지 유지되었다(예를 들어, 도 1 참조).

[0441] 표적 인산화를 검출하기 위한 IP-웨스턴:

[0442] EphB3를 발현하는 인간 세포주를 준 합류 상태(subconfluency)가 될 때까지 생육시키고, 이를 30분 동안 무 혈청 배지 중에서 항은 처리한 다음, 다양한 농도(0.2~10 μ g/ml)의 작동성 항체 또는 리간드로 처리하였다(37 $^{\circ}$ C). 세포를 PBS로 세척한 다음, 이를 단백질 분해 효소 억제제(로슈 컴플리트 미니(Roche Complete Mini), 제조자의 지침에 따라 사용되는 무 EDTA 단백질 분해 효소 억제제 카테일 정제) 및 인산화 효소 억제제(제조자의 권고에 따라 사용되는, 시그마(Sigma) 인산화 효소 억제제 카테일 1 및 2) 존재하에서, 1% Triton X-100 및 0.1% SDS 함유 Tris-완충 염수 중에서 분해하였다. 항-EphB3 특이적 항체를 사용하여 약 800 μ g의 투명한 용해물로부터 표적을 면역 침전시키고, 이를 SDS-PAGE로 분석한 다음, 니트로셀룰로스로 옮기고 나서, 항-포스포티로신 항체(4G10, Upstate)를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다. 블롯을 가늘게 자르고, 이를 항-EphB3 특이 항체로 다시 프로빙하여, 단백질이 로딩되었는지 여부를 측정하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 항-EphB3 mAb은 SW620 세포 내 EphB3의 인산화를 촉발하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 항-EphB3 항체는 낮은 항체 농도(0.2 μ g/ml)에서 EphB3의 인산화를 유도하였다.

[0443] 표적의 분해를 확인하기 위한 웨스턴 블롯:

[0444] EphB3를 발현하는 인간 세포주를 미처리 상태로 남겨두거나 또는 이를 특정 기간 동안(2~72 시간 동안) 완전 배지 중에서 리간드 또는 작동성 Ab 10 μ g/ml로 처리하였다. 본 실험을 시작할 때 리간드 또는 항체를 1회 투여 하였다. 선택한 시점에서, 세포를 PBS로 세척한 다음, 이를 단백질 분해 효소 억제제(로슈 컴플리트 미니(Roche Complete Mini), 제조자의 지침에 따라 사용되는 무 EDTA 단백질 분해 효소 억제제 카테일 정제) 및 인산화 효소 억제제(제조자의 권고에 따라 사용되는, 시그마(Sigma) 인산화 효소 억제제 카테일 1 및 2) 존재하에서, 1% Triton X-100 및 0.1% SDS 함유 Tris-완충 염수 중에서 분해하였다. 40 $^{\circ}$ C 및 14,000rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 투명하도록 만든 다음, 40 μ g의 용해물을 SDS-PAGE로 분획화하고, 이를 니트로셀룰로스에 옮긴 후, 항-EphB3 특이 항체로 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. β -튜불린을 로딩 대조군으로 하여 가시화하였다. 표적을 강화 화학 발광법과 방사선 사진 촬영술로 검출하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 항-EphB3 mAb은 EphB3의 내재화는 유도하지 않고, EphB3의 분해를 유도하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, mAb의 하위 세트는 72 시간 이상의 기간 동안, EphB3을 적게 발현하였다. 마지막으로, 도 6에 나타낸 바와 같이, 다수의 세포주는 EphB3을 인산화 함으로써 작동성 mAb에 반응하였다.

[0445] 진술한 검정법과 관련하여 선별된 항체에 관하여는 이하 표 5에 요약하여 제시하였다:

[0446] [표 5]

| 항 체 | M F I | 총pY (증가한 배수) | 정상 상태 EphB3 (감소%) | 빈 |
|------------|-------|--------------------|-------------------------|---|
| XPA.04.048 | 611 | 1.7 | 47.2 | 3 |
| XPA.04.018 | 1610 | 1.7 | 46.4 | 3 |
| XPA.04.01 | 1171 | 1.6 | 46.9 | 3 |
| XPA.04.013 | 1283 | 1.6 | 49.8 | 3 |
| XHA.05.337 | 559 | 2.8 | 71.7 | 2 |
| XHA.05.200 | 942 | 1.5 | 70.4 | 7 |
| XHA.05.111 | 1110 | 1.5 | 69.4 | 8 |
| XHA.05.005 | 1280 | 1.6 | 67.1 | 7 |
| XHA.05.228 | 666 | 3.3 | 66.8 | 2 |
| XHA.05.030 | 500 | 2 | 52 | 6 |
| XHA.05.964 | 800 | 1.5 | 48.6 | 3 |
| XHA.05.885 | 1200 | 1.8 | 56.4 | 3 |

[0447]

- [0448] 실시예 7
- [0449] **젓과 동물 항체의 인간화**
- [0450] 본 실시예는 젓과 동물 항-EphB3 항체의 인간화 방법에 관하여 기술하고 있다.
- [0451] 인간화된 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048 경쇄 및 중쇄에 대한 유전자 디자인
- [0452] 젓과 동물 항체 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018 및 XPA.04.048에 대한 경쇄 및 중쇄 가변 부 아미노산 서열을 도 7에 제시하였다. 국립 생물 의학 기금 단백질 분석 공급원(National Biomedical Foundation Protein Identification Resource) 또는 유사한 데이터베이스를 활용하여 동정된 인간 항체의 서열을 사용하여, 인간화된 항체의 골격을 얻을 수 있다. 인간화된 중쇄 서열을 선별하기 위하여, 젓과 동물 중쇄 서열을 인간 항체 중쇄 서열과 함께 정렬한다. 만일 특정 위치가 이하 정의한 4개의 카테고리 중 어느 하나에도 속하지 않는다면, 각각의 위치에 있는 인간 항체 아미노산을 인간화된 항체로서 간주하였는데, 이를 통하여, 젓과 동물 아미노산이 선별된다:
- [0453] (1) 상보성 결정 부위(CDR) 내에 속하는 위치[캐벳에 의한 정의, J. Immunol., 125, 961-969 (1980)];
- [0454] (2) 인간 항체 아미노산은 특정 위치에 있는 인간 중쇄에 대해 희귀한 것인 반면에, 젓과 동물 아미노산은 그 위치에 있는 인간 중쇄에 대해 일반적인 것인 위치;
- [0455] (3) 젓과 동물 중쇄의 아미노산 서열 내 CDR에 바로 인접하여 존재하는 위치; 또는
- [0456] (4) 젓과 동물 항체를 3차원 모델링한 결과, 항원 결합부와 물리적으로 인접한 것으로 확인된 아미노산 위치.
- [0457] 인간화된 경쇄의 서열을 선별하기 위해, 젓과 동물 경쇄 서열을 인간 항체 경쇄 서열과 함께 정렬한다. 만일 특정 위치가 상기 정의하였고, 이하에도 반복하여 정의한 4개의 카테고리 중 어느 하나에도 속하지 않는다면, 각각의 위치에 존재하는 인간 항체 아미노산을 인간화된 항체로서 간주한다:
- [0458] (1) CDR;
- [0459] (2) 인간 항체 아미노산보다 더욱 통상적인 젓과 동물 아미노산;
- [0460] (3) CDR에 인접하는 위치; 또는
- [0461] (4) 결합부에 3차원적으로 인접하여 존재할 수 있는 위치.
- [0462] 중쇄 및 경쇄의 실제 뉴클레오티드 서열은 다음과 같이 간주한다:
- [0463] (1) 전술한 바와 같이 선택된 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- [0464] (2) 이와 같은 암호화 서열 즉, 리더(신호) 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5' 말단(여기서, 상기 리더 서열들은 항체에 대한 정형으로서 선택함);
- [0465] (3) 암호화 서열의 3' 말단으로서, 상기 뉴클레오티드 서열은 마우스 경쇄 J5 분절과 마우스 중쇄 J2 분절의 뒤에 위치하며, 젓과 동물 서열의 일부인 것인 서열(여기서, 상기 서열들은 스플라이싱 공여 신호를 함유하므로, 이 서열들이 포함됨); 그리고
- [0466] (4) 서열의 각 말단에 XbaI 위치가 존재하여, 벡터의 XbaI 위치에서 잘라질 수 있고, 또한 이 XbaI 위치에 클로닝될 수 있는 것인 서열.
- [0467] 인간화된 경쇄 및 중쇄 유전자의 구성
- [0468] 중쇄를 합성하기 위하여, 어플라이드 바이오시스템즈 380B DNA 합성기기(Applied Biosystems 380B DNA synthesizer)를 사용해 4개의 올리고뉴클레오티드를 합성한다. 올리고뉴클레오티드 중 2개는 중쇄의 각 사슬의 일부이고, 각각의 올리고뉴클레오티드는 그 다음에 있는 뉴클레오티드와 약 20개의 뉴클레오티드가 중첩되므로 어닐링될 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 올리고뉴클레오티드는 각각의 말단부에 소수의 잉여 뉴클레오티드들을 가지는, 전체가 인간화된 중쇄 가변 부를 포함하고 있어서, XbaI 위치에서 잘라질 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 폴리아크릴아미드 겔로부터 정제된다.
- [0469] 표준적인 절차에 따라서, ATP 및 T4 폴리뉴클레오티드 키나제를 이용하여 각각의 올리고뉴클레오티드를 인산화한다[Maniatis외 다수, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)]. 인산화된 올리고뉴클레오티드를 어닐링하기 위해, 이 올리고뉴클레오티드

를 모두 40ul의 TA(33 mM 아세트산Tris, pH 7.9, 66 mM 아세트산칼륨, 10 mM 아세트산 마그네슘) 중에 현탁(각각의 농도 = 약 3.75 μM)한 다음, 이를 4분 동안 95℃로 가열한 후 4℃로 서서히 냉각시킨다. 각각의 올리고뉴클레오티드의 반대 사슬을 합성하여 올리고뉴클레오티드로부터 완전한 유전자를 합성하기 위해서, 다음과 같은 성분들을 최종 부피 100ul가 되도록 첨가한다:

- [0470] 10ul의 어닐링된 올리고뉴클레오티드
- [0471] 0.16mM의 각각의 데옥시리보뉴클레오티드
- [0472] 0.5mM의 ATP
- [0473] 0.5mM의 DTT
- [0474] 100ug/ml의 BSA
- [0475] 3.5ug/ml의 T4 g43 단백질(DNA 중합 효소)
- [0476] 25ug/ml의 T4 g44/62 단백질(중합 효소 부속 단백질)
- [0477] 25ug/ml의 45 단백질(중합 효소 부속 단백질)
- [0478] 상기 혼합물을 37℃에서 30분 동안 항온 처리한다. 이후, 10u의 T4 DNA 리가제를 첨가하고, 이를 37℃에서 30분 동안 다시 항온 처리한다. 70℃에서 15분 동안 반응물을 항온 처리하여 중합 효소 및 리가제를 불활성화시킨다. 상기 유전자를 XbaI로 분해하기 위하여, 50ul의 2 × TA(BSA 함유) 200ug/ml와 DTT 1mM, 43ul의 물, 그리고 50u의 XbaI(5uI)을 상기 반응물에 첨가한다. 이 반응물을 37℃에서 3시간 동안 항온 처리한 다음, 이를 겔 상에서 정제한다. 표준적 방법에 의해 XbaI 단편을 이 겔로부터 분리한 다음, 이를 플라스미드 pUC19의 XbaI 위치에 클로닝한다. 표준적인 기술을 사용하여 플라스미드를 정제하고, 디데옥시 방법을 이용하여 서열 결정을 한다.
- [0479] pUC19 플라스미드로부터 경쇄 및 중쇄 XbaI 단편을 분리하여, 인간화된 경쇄 및 중쇄를 발현하는 플라스미드(XbaI 위치가 삽입되어 있음)를 구성하는데, 이때, 상기 단편은 적당한 숙주 세포에 형질 감염될 때 완전한 중쇄를 높은 수준으로 발현할 적당한 발현 벡터의 XbaI 위치에 삽입된다.
- [0480] 인간화된 항체의 합성 및 친화도
- [0481] 발현 벡터를 마우스 Sp2/0 세포에 형질 감염시키고, 표준적인 방법에 의하여 발현 벡터에 의해 부여된 선별 마커(들)를 바탕으로 하여, 상기 플라스미드가 통합된 세포를 선별한다. 이 세포들이 EphB3과 결합하는 항체를 분비한다는 사실을 입증하기 위해, 상기 세포로부터 유래하는 상청액을, EphB3을 발현하는 것으로 알려진 세포와 함께 항온 처리한다. 세척 후, 상기 세포를 플루오레세인-접합 염소 항-인간 항체와 함께 항온 처리하여 세척한 다음, FACSCAN 세포 형광 분석기 상에서 이 항체의 형광도를 분석하였다.
- [0482] 다음 실험을 위해서, 인간화된 항체를 생산하는 세포를 마우스에 주입하고, 결과로 생성되는 복수를 수집한다. 표준적인 기술에 따라서, 어피겔(Affigel)-10 지지체(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, Calif.) 상에 제조된 염소 항-인간 면역 글로불린 항체의 친화성 컬럼을 통과시켜, 인간화된 항체를 실질적으로 상동성인 상태로 상기 복수로부터 정제한다. 당 업계에 공지된 기술에 따라서, 쥐와 동물 기원 항체에 대한 인간화된 항체의 친화도를 측정한다.
- [0483] **실시예 8**
- [0484] **쥐와 동물 항체의 휴먼 엔지니어링**
- [0485] 본 실시예는 휴먼 엔지니어링™된 항체의 클로닝 및 발현, 그리고 이러한 항체의 정제 및 결합 활성 테스트에 관하여 기술하고 있다.
- [0486] 휴먼 엔지니어링™된 서열의 디자인
- [0487] 스투드니카(Studnicka)에 따르면, 항체 가변 부 도메인의 휴먼 엔지니어링™이란, 항체 분자의 결합 활성은 유지시키면서 면역원성은 감소시키는 방법이라고 한다[예를 들어, Studnicka와 다수, 미국 특허 제5,766,886호; Studnicka와 다수 Protein Engineering 7: 805-814 (1994)]. 이 방법에 따르면, 각각의 가변 부 아미노산에 치환 위험도가 할당된다. 아미노산 치환은 3개의 위험도 카테고리 중 하나의 카테고리에 의해 구별된다: (1) 항원 결합을 파괴할 가능성이 최소이고, 면역원성이 감소될 잠재성이 최대인, 저 위험도 변이; (2) 면역원성은 더욱 감소하지만, 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 영향을 미칠 가능성은 더욱 증가하는, 중 위험도 변이; (3) 결합 또

는 항체 구조를 유지시키는데 중요하고, 항원 결합 또는 단백질 폴딩이 영향을 받게 될 위험성이 최고인, 고 위험도 잔기. 프롤린의 3차원 구조로 인하여, 프롤린에서 일어나는 변형은 일반적으로, 그 위치가 저 위험도 위치 일지라도, 적어도 중 위험도 변이가 될 것으로 간주된다. 치환에 의한 변이가 바람직하지만, 삽입 및 결실에 의하여도 변이될 수 있다. 도 7은 XPA.04.001, XPA.04.013, XPA.04.018, XPA.04.048 경쇄 및 중쇄를 구성하는 각각의 아미노산 잔기에 대한 위험도 할당(고 위험도 변이, 중 위험도 변이 또는 저 위험도 변이)을 나타내는 것이다.

[0488] 젓과 동물 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변 부는 이 방법을 통해 휴먼 엔지니어링™된다. 본 발명의 방법에 의한 변형(저 위험도 위치에서 일어나는 변형)의 후보 잔기인 아미노산 잔기는, 인간 가변 부 서열을 보유하는 젓과 동물 가변 부의 아미노산 서열을 정렬함으로써 동정된다. 임의의 인간 가변 부 예를 들어, 각각의 V_H 또는 V_L 서열이나 인간 공통 V_H 또는 V_L 서열이 사용될 수 있다. 저 위험도 위치 중 임의의 수의 위치, 또는 저 위험도 위치 전부에 존재하는 아미노산 잔기들이 변이될 수 있다.

[0489] 이와 유사하게, 본 발명의 방법에 의한 변형(저 위험도 위치 및 중 위험도 위치 전부에서 일어나는 변형)의 후보 대상 잔기인 아미노산 잔기는, 젓과 동물 가변 부의 아미노산 서열을 인간 가변 부 서열과 함께 정렬함으로써 동정된다. 저 위험도 위치 또는 중 위험도 위치 중 임의의 수의 위치, 또는 저 위험도 위치 및 중 위험도 위치 전부에 존재하는 아미노산 잔기들이 변이될 수 있다.

[0490] 영구 세포주 발생을 위한 발현 벡터의 제조

[0491] 항체-유래 신호 서열과 함께, 합성 뉴클레오티드 합성법을 이용하여, 전술한 중쇄 및 경쇄 V 부위 서열 각각을 암호화하는 DNA 단편을 구성한다. 전술한 경쇄 V 부위 아미노산 서열 각각을 암호화하는 DNA를, 인간 카파 경쇄 불변 부를 함유하는 벡터 pMXP10에 삽입한다. 전술한 중쇄 V 부위 아미노산 서열 각각을 암호화하는 DNA를, 인간 감마-1, 2, 3 또는 4 중쇄 불변 부를 함유하는 벡터 pMXP6에 삽입한다. 이 벡터들 전부는 hCMV 프로모터와 마우스 카파 경쇄 3'-비번역 부위, 그리고 선별 마커 유전자 예를 들어, *neo* 또는 *his*(G418 선별용) - 또는 히스티딘 - 내성 형질 감염체를 각각 함유한다.

[0492] 일시적 발현을 위한 발현 벡터의 제조

[0493] 전술한 경쇄 유전자 또는 중쇄 유전자 중 어느 하나를 함유하는 벡터를 일시 형질 감염용으로 구성한다. 이 벡터들은, *neo* 또는 *his* 유전자 대신에, 엡스타인-바 바이러스 *oriP*[엡스타인-바 바이러스 핵 내 항원을 발현하는 HEK293 세포 내 복제용]를 함유한다는 점을 제외하고는, 전술한 바와 같은 영구 형질 감염용 벡터와 유사하다.

[0494] 휴먼 엔지니어링된 항-EphB3 항체의 HEK293E 세포 내에서의 일시 발현

[0495] 각각 엡스타인-바 바이러스로부터 유래하는 *oriP*와, 전술한 경쇄 또는 중쇄 유전자를 함유하는 별도의 벡터들을 일시적으로 HEK293E 세포에 형질 감염시킨다. 일시적으로 형질 감염된 세포들을 10일 이하의 기간 동안 항온 처리하고, 이후, 상청액을 회수한 다음, 단백질 A 크로마토그래피를 이용하여 항체를 정제하였다.

[0496] 영구 형질 감염된 CHO-K1 세포의 발생

[0497] 전술한 벡터 즉, 경쇄 및 중쇄 유전자 각각의 복사체를 하나씩 함유하는 벡터를 Ex-Cell 302-적용 CHO-K1 세포에 형질 감염시킨다. Ex-Cell 302 배지 중에서의 현탁 성장에 적응된 CHO-K1 세포는 통상적으로 선형 벡터 40ug으로 전기 천공된다. 대안적으로, 선형화된 DNA는 선형 폴리에틸렌이민(PEI)과 복합체를 형성할 수 있으며, 또한 형질 감염에 사용될 수도 있다. 이 세포들을 1% FBS 및 G418이 보충된 Ex-Cell 302 배지를 함유하는 96 웰 평판에 도말한다. 클론들을 96 웰 평판 내에서 스크리닝하고, 각각의 형질 감염으로부터 얻어진 클론 중 상층에 존재하는 약 10%의 클론들을 Ex-Cell 302 배지 함유 24 웰 평판에 옮긴다.

[0498] 7일 및 14일(이 시간은 배양액 상청액을, IgG에 대한 면역 글로불린 ELISA 검정법에 의해, 분비된 항체의 수준에 대해 테스트하는 시점임) 동안 생육한 배양액에 대해, Ex-Cell 302 배지 중 24 웰 평판 내에서 생산성 테스트를 수행한다.

[0499] 상층에 존재하는 클론을, Ex-Cell 302 배지 함유 진탕 플라스크에 옮긴다. 상기 세포가 현탁 성장에 적응하게 되면, 곧, 이 클론들을 사용하여 Ex-Cell 302 배지 중에서 진탕 플라스크 테스트를 실시한다. 상기 세포를 125 ml들이 엘렌메이어 플라스크(25ml 배지 함유) 내에서 10일 이하의 기간 동안 생육시킨다. 항온 처리 기간중 적어도 하루 걸러 상기 플라스크를 개방시켜, 공기를 교환해주고, 항원 처리 기간의 마지막 단계에는 IgG ELISA에 의해 배양 배지 중 면역 글로불린 폴리펩티드의 수준을 측정한다. 동일한 세포주를 2개 이상의 다중-단위 전사

벡터를 이용하여 연속으로 다수 회 형질 감염시킨 결과, 면역 글로불린 생산 수준이 더욱 증가한(바람직하게는 300 μ g/ml 이상으로 증가한) 클론 및 세포주가 생산된다.

[0500] 정제

[0501] 본 발명에 따라서 벡터 및 모든 세포주로부터 면역 글로불린 폴리펩티드를 정제하는 방법을 디자인할 수 있다. 예를 들어, 당 업계에 널리 공지된 방법에 의하면, 세포는 반응 종결 후 여과에 의해 분리된다. 여과물을 단백질 A 컬럼 상에 로딩한다(필요에 따라서 복수 회 통과). 이 컬럼을 세척한 다음, 발현 및 분비된 면역 글로불린 폴리펩티드를 상기 컬럼으로부터 용출시킨다. 항체 생성물을 생산하기 위하여, 바이러스 불활성화 단계에서와 같이, 낮은 pH(최소 30분에서 최대 1 시간 동안 pH3)에서 단백질 A 폴링을 수행한다. 그 다음, 흡착 양이온 교환 단계를 실시하여 생산물을 더 정제한다. 흡착성 분리 컬럼으로부터 유래하는 용출물을 바이러스 체류 필터에 통과시켜, 잔류할 가능성이 있는 바이러스 입자들을 추가로 제거한다. 상기 여과물을 음이온 교환 컬럼(생산물이 결합하지 않음)에 통과시켜 추가로 정제한다. 마지막으로, 정용 여과를 통해 생산물을 제형 완충액으로 옮겨 정제 방법을 수행한다. 투석 유물의 농도를 단백질 농도로 맞추고(1mg/ml 이상), 여기에 안정화제를 첨가한다.

[0502] 결합 활성

[0503] 제조함 휴먼 엔지니어링™된 항체들의 EphB3 결합 활성을 평가한다. 단백질을 단백질 A 컬럼을 통과시켜 진탕 플라스크 배양 상청액으로부터 정제한 후, A₂₈₀으로 농도를 측정한다. 다른 실시예에 기술한 바와 같이 결합 검정법을 실시한다.

[0504] **실시예 9**

[0505] **EphB3-특이적 항체의 생체 내 효능**

[0506] 생체 내 종양 성장에 대한 항-EphB3 항체의 효능을 테스트하기 위하여, 유방암 세포주 예를 들어, MDA-MB-231 또는 MDA-MB-435를 암컷 SCID-베이지 마우스 유방의 지방층 내 또는 그 근처에 이식한 동소성 이종 이식 모델을 사용한다. 암 세포(마우스 당: 5 × 10⁶ 세포, 50~100 μ l)를 동 부피의 매트릭셀(matrigel)과 혼합하고, 이 혼합물을 수술에 의해 노출시킨 유방의 지방층에 직접 주입하거나, 또는 유방의 지방층 위에 피하 주입한다. 마우스를 다시 우리에 넣은 후, 부피가 약 100~150mm³에 이를 때까지 종양의 성장 양상을 관찰한다. 이후 마우스를 처리군으로 무작위로 나눈다.

[0507] 처리 방법은 1주일에 2회 항체 또는 이소타입형 대조군 항체를 복막 내 주사하는 과정으로 이루어져 있다. 효능 연구에 적용된 투여량 범위는 0.2~20mg/kg이다. 종양 부피를 1주일에 2~3회 측정하고, 효능은 작동제-처리한 마우스와 대조 처리 마우스 간 종양 부피의 감소율로 판단한다.

[0508] 전술한 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및, 본 발명의 명세서에 언급되었으며/언급되었거나 출원 데이터 시트에 나열된 특허 공보가 아닌 문헌 모두는 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있다.

[0509] 전술한 바로부터, 본 발명의 특정 구체예들은 예시를 위한 목적으로 본원에 기술되어 있지만, 본 발명의 사상과 범위를 벗어나지 않고 이와 같은 구체예들을 변형할 수 있음을 알 수 있을 것이다.

수탁번호

[0510]

기탁기관명 : ATCC
 수탁번호 : PTA-7779
 수탁일자 : 20060804

기탁기관명 : ATCC
 수탁번호 : PTA-7780

수탁일자 : 20060804

기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-7781

수탁일자 : 20060804

기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-7782

수탁일자 : 20060804

기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-7783

수탁일자 : 20060804

기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-7784

수탁일자 : 20060804

기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-7785

수탁일자 : 20060804

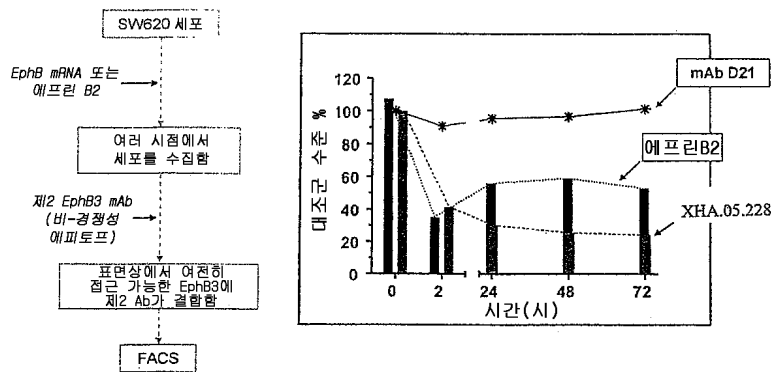
기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-7786

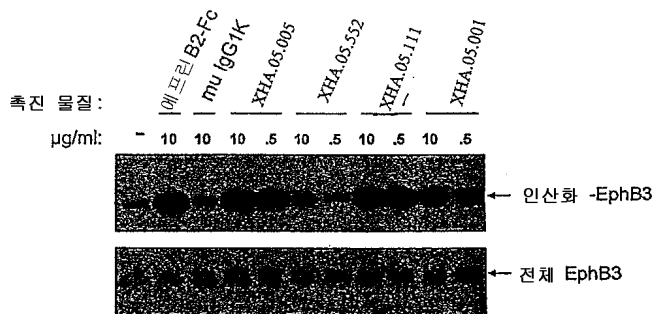
수탁일자 : 20060804

도면

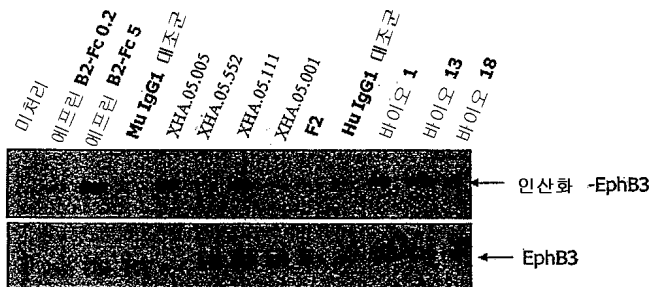
도면1



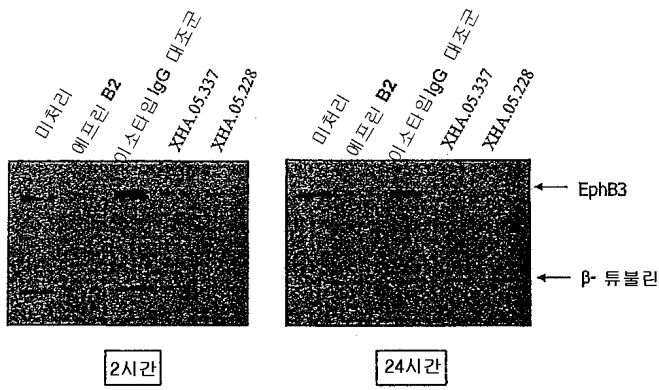
도면2



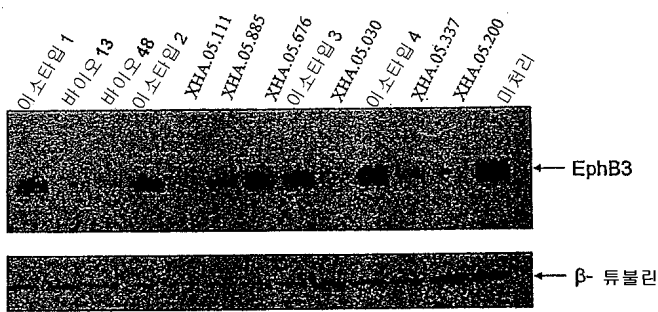
도면3



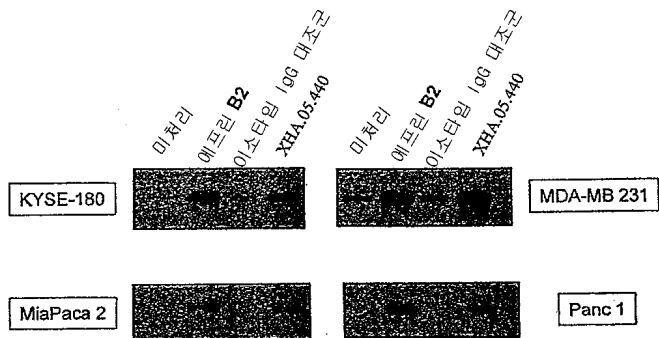
도면4



도면5



도면6



<211> 4234

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cgtgagcggc gcagcaagat cccagctcgg accccggacg gcgcgcgcc cccaagcccc 60
ggatcccagt cgggcccga gctgaccgcc agattactgt gcatcccga tcaagaccac 120
ctgcaccctc ctgccccggc ccgccccca agtcctcagg caccagctc cccggcgccc 180

cggatcctcc tggaccggtc cgtccagatt cccgcgggac cgacctgtcc gcatcccag 240
gaccgccggg ctcggtgac gcctcggtc ccggagccgc ccgcctggat tgcatccct 300
cctctcctgg atctcctggg acccgacgcg agcctgcccc ggagccccgc gagcgcacc 360
tctctcgggt gctgcagcc ccgcccggc ggccccggcc ggcgccggcc ggctcggctc 420
ctagagctgc cacggccatg gccagagccc gcccgcccgc gccccctgc ccgcccggg 480
ggcttctgcc gctgctccct ccgctgctgc tgcctccgct gctgctgctg cccgcccggct 540
gccggcgct ggaagagacc ctcatggaca caaatgggt aacatctgag ttggcgtgga 600

catctcatcc agaaagtggg tgggaagagg tgagtggcta cgatgagcc atgaatcca 660
tccgcacata ccaggtgtgt aatgtgcgcg agtcaagcca gaacaactgg cttcgcacgg 720
ggttcatctg gcggcgggat gtgcagcggg tctacgtgga gctcaagttc actgtgcgtg 780
actgcaacag catcccaac atccccgct cctgcaagga gaccttaac ctcttctact 840
acgaggtga cagcgtatgt gcctcagcct cctccccctt ctggatggag aacctctacg 900
tgaaagtgga caccattgca cccgatgaga gcttctcgcg gctggatgcc gccctgtca 960
acaccaaggt ggcagcttt gggccacttt ccaaggctgg cttctacctg gccttcagg 1020

accagggcgc ctgcatgctg ctcatctccg tgcgcgctt ctacaagaag tgtgcatcca 1080
ccaccgagg cttcgactc tccccgaga ccctactgg ggcggagccc acctcgtgg 1140
tcattgctcc tggcactgc atccctaacg ccgtggaggt gtcggtgcca ctcaagctct 1200
actgcaacgg cgatggggag tggatggtgc ctgtgggtgc ctgcacctgt gccaccggcc 1260
atgagccagc tgccaaggag tcccagtgcc gccctgtcc ccctgggagc tacaaggcga 1320
agcagggaga ggggcccctgc ctcccattgc ccccacag ccgtaccacc tcccagccg 1380
ccagcatctg cacctgccac aataacttct accgtgcaga ctcggactct gcggacagtg 1440

cctgtaccac cgtgccatct ccaccccgag gtgtgatctc caatgtgaat gaaacctcac 1500
tgatcctcga gtggagtgag ccccgggacc tgggtggccg ggatgacctc ctgtacaatg 1560
tcatctgcaa gaagtgcat ggggctggag gggcctcagc ctgctcacgc tgtgatgaca 1620

```

acgtggagtt tgtgcctcgg cagctgggccc tgacggagcg ccgggtccac atcagccatc 1680
 tgctggccca cacgcgctac acctttgagg tgcaggcggc caacgggtgc tgggcaaga 1740
 gccctctgcc gcctcgttat gcggccgtga atatcaccac aaaccagget gccccgtctg 1800
 aagtgccac actacgcctg cacagcagct caggcagcag cctcaccta tcctgggcac 1860

 ccccagagcg gcccaacgga gtcacctctg actacagat gaagtacttt gagaagagcg 1920
 agggcatcgc ctccacagt accagccaga tgaactccgt gcagctggac gggcttcggc 1980
 ctgaccccc ctatgtggtc caggctcgtg cccgcacagt agctggctat gggcagtaca 2040
 gccgccctgc cgagtttgag accacaagt agagaggctc tggggcccag cagctccagg 2100
 agcagcttc ctcacatcgt ggctccgcta cagctgggct tgtcttcgtg gtggctgtcg 2160
 tggctcatcg tatcgtctgc ctgaggaagc agcgacacgg ctctgattcg gactacacgg 2220
 agaagctgca gcagtacatt gctcctggaa tgaaggttta tattgacct ttacctaag 2280

 aggaccctaa ttaggctgtt cgggagtttg ccaaggagat cgactgtcc tgcgtcaaga 2340
 tcgaggaggt gatcggagct ggggaatttg gggaagtgtg ccgtggctga ctgaaacagc 2400
 ctggccgccg agaggtgtt gtggccatca agacgctgaa ggtgggctac accgagagcg 2460
 agcggcggga ctctcaagc gaggcctcca tcatgggtca gttgatcac cccaataaa 2520
 tccggtcga gggcgtggc accaaaagtc ggccagtat gatcctact gattcatgg 2580
 aaaactgcgc cctggactcc ttctccggc tcaacgatgg gcagttcag gtcacccagc 2640
 tgggtggcat gttcggggc attgctgccg gcatgaagta cctgtccgag atgaactatg 2700

 tgaccgcga cctggctgct cgcaacatcc ttgtcaacag caacctggc tgcaaagtct 2760
 cagactttgg cctctcccgc ttctggagg atgaccctc cgatcctacc tacaccagtt 2820
 ccctgggcgg gaagatcccc atccgtgga ctgcccaga ggccatagcc tatcggaagt 2880
 tcacttctgc tagtgatgct tggagctacg gaattgtcat gtgggaggtc atgagctatg 2940
 gagagcgacc ctactgggac atgagcaacc aggatgtcat caatgccgtg gagcaggatt 3000
 accggtgcc accaccatg gactgtcca cagcaactgca ccagctcatg ctggactgct 3060
 ggggtcggga ccggaacctc aggeccaaat tctcccagat tgtcaatacc ctggacaagc 3120

 tcatccgaa tgcctccagc ctcaaggcca ttgccagcgc tcagctctggc atgtcacagc 3180
 cctcctgga ccgcacggc ccagattaca caaccttcac gacagttggt gattggctgg 3240
 atgccatcaa gatggggcgg tacaaggaga gcttcgtcag tgcggggttt gcatctttt 3300
 acctggtggc ccagatgacg gcagaagacc tgctccgtat tggggtcacc ctggccggcc 3360
 accagaagaa gatcctgagc agtatccagg acatgcggct gcagatgaac cagacgctgc 3420
 ctgtgcaggt ctgacaccgg ctcccacggg gaccctgagg accgtgcagg gatgccaagc 3480

agccggctgg acittcggac tcttggactt ttggatgcct ggccttaggc tgtggcccag 3540

aagctggaag ttgggaaag gccaagctg ggacttctcc aggcctgtgt tcctcccca 3600

ggaagtgcgc cccaaacctc ttcatattga agatggatta ggagaggggg tgatgacccc 3660

tccccaaacc cctcagggcc cagaccttc tgctctccag caggggatcc ccacaacctc 3720

acacttgctt gttcttcagt gctggaggtc ctggcagggt caggctgggg taagccgggg 3780

ttccacaggg ccagccctg gcaggggtct ggccccccag gtaggcggag agcagtcctt 3840

ccctcaggaa ctggaggagg ggactccagg aatggggaaa tgtgacacca ccatcctgaa 3900

ggcagcttgc acctccagtt tgcacaggga ttgttctgg gggctgaggg cctgtcccc 3960

acccccgcc ttggtgctgt cataaaaggg caggcagggg caggctgagg agttgcctt 4020

tgccccccag agactgactc tcagagccag agatgggatg tgtgagtgtg tgtgtgtgtg 4080

tgtgtgtgtg cgcgcgcgcg cgcgtgtgtg tgtgcacgca ctggcctgca cagagagcat 4140

gggtgagcgt gtaaaagctt ggccctgtgc cctacaatgg ggccagctgg gccgacagca 4200

gaataaaggc aataagatga aaaaaaaaaa aaaa 4234

<210> 2

<211> 998

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Arg Ala Arg Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Pro Pro Gly Leu

1 5 10 15

Leu Pro Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Pro

20 25 30

Ala Gly Cys Arg Ala Leu Glu Glu Thr Leu Met Asp Thr Lys Trp Val

35 40 45

Thr Ser Glu Leu Ala Trp Thr Ser His Pro Glu Ser Gly Trp Glu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn Val Arg Glu Ser Ser Gln Asn Asn Trp Leu Arg Thr Gly Phe

85 90 95

Ile Trp Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
| Val Arg Asp Cys Asn Ser Ile Pro Asn Ile Pro Gly Ser Cys Lys Glu | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Thr Phe Asn Leu Phe Tyr Tyr Glu Ala Asp Ser Asp Val Ala Ser Ala | | |
| 130 | 135 | 140 |
| 145 | 150 | 155 |
| Ser Ser Pro Phe Trp Met Glu Asn Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Phe Gln Asp Gln Gly Ala Cys Met Ser Leu Ile Ser Val Arg Ala Phe | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Tyr Lys Lys Cys Ala Ser Thr Thr Ala Gly Phe Ala Leu Phe Pro Glu | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Thr Leu Thr Gly Ala Glu Pro Thr Ser Leu Val Ile Ala Pro Gly Thr | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Cys Ile Pro Asn Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr Cys | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Asn Gly Asp Gly Glu Trp Met Val Pro Val Gly Ala Cys Thr Cys Ala | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Gly His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly Glu Gly Pro Cys Leu Pro Cys | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Pro Pro Asn Ser Arg Thr Thr Ser Pro Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys | | |
| 325 | 330 | 335 |
| His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala Cys | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Thr Thr Val Pro Ser Pro Pro Arg Gly Val Ile Ser Asn Val Asn Glu | | |

Thr Ser Leu Ile Leu Glu Trp Ser Glu Pro Arg Asp Leu Gly Gly Arg
 355 360 365
 Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly Ala Gly
 370 375 380
 Gly Ala Ser Ala Cys Ser Arg Cys Asp Asp Asn Val Glu Phe Val Pro
 385 390 395 400

 Arg Gln Leu Gly Leu Thr Glu Arg Arg Val His Ile Ser His Leu Leu
 405 410 415
 Ala His Thr Arg Tyr Thr Phe Glu Val Gln Ala Val Asn Gly Val Ser
 420 425 430
 Gly Lys Ser Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr
 435 440 445
 Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser
 450 455 460

 Ser Gly Ser Ser Leu Thr Leu Ser Trp Ala Pro Pro Glu Arg Pro Asn
 465 470 475 480
 Gly Val Ile Leu Asp Tyr Glu Met Lys Tyr Phe Glu Lys Ser Glu Gly
 485 490 495
 Ile Ala Ser Thr Val Thr Ser Gln Met Asn Ser Val Gln Leu Asp Gly
 500 505 510
 Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val
 515 520 525

 Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Ser Arg Pro Ala Glu Phe Glu Thr Thr Ser
 530 535 540
 Glu Arg Gly Ser Gly Ala Gln Gln Leu Gln Glu Gln Leu Pro Leu Ile
 545 550 555 560
 Val Gly Ser Ala Thr Ala Gly Leu Val Phe Val Val Ala Val Val Val
 565 570 575
 Ile Ala Ile Val Cys Leu Arg Lys Gln Arg His Gly Ser Asp Ser Glu
 580 585 590

 Tyr Thr Glu Lys Leu Gln Gln Tyr Ile Ala Pro Gly Met Lys Val Tyr

595 600 605
 Ile Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Glu Ala Val Arg Glu Phe
 610 615 620
 Ala Lys Glu Ile Asp Val Ser Cys Val Lys Ile Glu Glu Val Ile Gly
 625 630 635 640
 Ala Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Arg Gly Arg Leu Lys Gln Pro Gly
 645 650 655

 Arg Arg Glu Val Phe Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Val Gly Tyr Thr
 660 665 670
 Glu Arg Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser Ile Met Gly Gln
 675 680 685
 Phe Asp His Pro Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val Val Thr Lys Ser
 690 695 700
 Arg Pro Val Met Ile Leu Thr Glu Phe Met Glu Asn Cys Ala Leu Asp
 705 710 715 720

 Ser Phe Leu Arg Leu Asn Asp Gly Gln Phe Thr Val Ile Gln Leu Val
 725 730 735
 Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys Tyr Leu Ser Glu Met
 740 745 750
 Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Asn Ser
 755 760 765
 Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Phe Leu Glu
 770 775 780

 Asp Asp Pro Ser Asp Pro Thr Tyr Thr Ser Ser Leu Gly Gly Lys Ile
 785 790 795 800
 Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Tyr Arg Lys Phe Thr
 805 810 815
 Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met
 820 825 830
 Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp Val Ile
 835 840 845

Asn Ala Val Glu Gln Asp Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp Cys Pro
 850 855 860
 Thr Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Val Arg Asp Arg Asn
 865 870 875 880
 Leu Arg Pro Lys Phe Ser Gln Ile Val Asn Thr Leu Asp Lys Leu Ile
 885 890 895
 Arg Asn Ala Ala Ser Leu Lys Val Ile Ala Ser Ala Gln Ser Gly Met
 900 905 910

 Ser Gln Pro Leu Leu Asp Arg Thr Val Pro Asp Tyr Thr Thr Phe Thr
 915 920 925
 Thr Val Gly Asp Trp Leu Asp Ala Ile Lys Met Gly Arg Tyr Lys Glu
 930 935 940
 Ser Phe Val Ser Ala Gly Phe Ala Ser Phe Asp Leu Val Ala Gln Met
 945 950 955 960
 Thr Ala Glu Asp Leu Leu Arg Ile Gly Val Thr Leu Ala Gly His Gln
 965 970 975

 Lys Lys Ile Leu Ser Ser Ile Gln Asp Met Arg Leu Gln Met Asn Gln
 980 985 990
 Thr Leu Pro Val Gln Val
 995
 <210> 3
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

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

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Met Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 5
 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

 100 105 110

Arg

<210> 6

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Pro Asp Leu Val Met Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Gln Ile Asp Pro Ser Asp Ser Ser Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ser Thr Gly Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 7

<211> 113

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Met Pro Gly Ala

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

65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ile Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105 110

Arg

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Ser

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Trp Arg Arg Asp Val Gln Arg Val

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe

1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr

1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg

1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Trp Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg

1 5
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31
Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp

1 5
<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32
Trp Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val

1 5 10
<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33
Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu

1 5 10
<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 34
Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu

1 5 10
<210> 35

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys

1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe

1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 40
Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp
1 5 10

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Asn Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro

1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 45

Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp

1 5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu

1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser

1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe

1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu

1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp

1 5

<210> 53

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala

1 5

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly

1 5
<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 55
Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg

1 5
<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 56
Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val

1 5
<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 57
Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn

1 5
<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 58
Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr

1 5
<210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 59

Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 60

Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val

1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser

1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe

1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly

1 5

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro

1 5

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu

1 5

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser

1 5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys

1 5

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 75

Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Asn Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala

1 5

<210

> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser

1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp

1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser

1 5
<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 103
Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys

1 5
<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 104
Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala

1 5
<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 105
Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly

1 5
<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 106
Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe

1 5
<210> 107
<211> 9
<212>
> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr

1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe

1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln

1 5

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 112
 Asn Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala
 1 5 10

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro
 1 5 10

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp
 1 5 10

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu
 1 5 10

<210> 116

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser
 1 5 10

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe

1 5 10

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser

1 5 10

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg

1 5 10

<210> 120

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu

1 5 10

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp

1 5 10

<210> 122
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 122
 Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala
 1 5 10

<210> 123
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 123
 Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly
 1 5 10

<210> 124
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 124
 Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg
 1 5 10

<210> 125
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 125
 Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val
 1 5 10

<210> 126
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 126
 Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn

1 5 10

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 127

Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr

1 5 10

<210> 128

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys

1 5 10

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val

1 5 10

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg

1 5 10

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser

1 5 10

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe

1 5 10

<210> 133

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly

1 5 10

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro

1 5 10

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu

1 5 10

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser

1 5 10

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 137

Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys

1 5 10

<210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala

1 5 10

<210> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly

1 5 10

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe

1 5 10

<210> 141

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr

1 5 10

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu

1 5 10

<210> 143

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 144

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 145

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln

1 5 10

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Asn Ala Val Glu Val Ser Val Pro

1 5

<210> 147

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu

1 5

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys

1 5

<210> 149

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu

1 5

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr

1 5

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr Cys

1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

Asn Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu

1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys

1 5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu

1 5

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr

1 5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr Cys

1 5

<210> 157

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Asn Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys

1 5 10

<210> 158

<211>

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu

1 5 10

<210> 159

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 159

Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr

1 5 10

<210> 160

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 160

Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr Cys

1 5 10

<210> 161

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 161

Gly His Glu Pro Ala Ala Lys Glu

1 5

<210> 162

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser

1 5

<210> 163

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 163

Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln

1 5

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 164

Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys

1 5

<210> 165

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg

1 5

<210> 166

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 166

Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro

1 5

<210> 167

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 167

Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys

1 5

<210> 168

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro

1 5

<210> 169

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro

1 5

<210> 170

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 170

Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly

1 5

<210> 171

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 171

Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser

1 5

<210> 172

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 172

Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr

1 5

<210> 173

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 173

Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys

1 5

<210> 174

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 174

Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala

1 5
<210> 175
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 175
Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys

1 5
<210> 176

<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 176
Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln

1 5
<210> 177
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 177
Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly

1 5
<210> 178
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 178
Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly Glu

1 5
<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 179

Gly His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser

1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln

1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys

1 5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg

1 5

<210> 183

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 183

Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro

1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184

Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys

1 5

<210> 185

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 185

Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro

1 5

<210> 186

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro

1 5

<210> 187

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 187

Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly

1 5

<210> 188

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 188

Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser

1 5

<210> 189

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr

1 5

<210> 190

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 190

Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys

1 5

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala

1 5

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys

1 5

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln

1 5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly

1 5

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 195

Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly Glu

1 5

<210> 196

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

Gly His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln

1 5 10

<210> 197

<211>

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys

1 5 10

<210> 198

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg

1 5 10
 <210> 199
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 199
 Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro

1 5 10
 <210> 200
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 200
 Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys

1 5 10
 <210> 201
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 201
 Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro

1 5 10
 <210> 202
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 202
 Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro

1 5 10
 <210> 203
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 203

Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly

1 5 10

<210> 204

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser

1 5 10

<210> 205

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 205

Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr

1 5 10

<210> 206

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 206

Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys

1 5 10

<210> 207

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 207

Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala

1 5 10

<210> 208

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 208
 Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys
 1 5 10

<210> 209

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln
 1 5 10

<210> 210

<211> 10

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 210

Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly
 1 5 10

<210> 211

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 211

Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly Glu
 1 5 10

<210> 212

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 212

Pro Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys

1 5

<210> 213

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 213

Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His

1 5

<210> 214

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 214

Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn

1 5

<210> 215

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 215

Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn

1 5

<210> 216

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 216

Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe

1 5

<210> 217

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 217

Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr

1 5

<210> 218

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 218

Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg

1 5

<210> 219

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 219

Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala

1 5

<210> 220

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 220

His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp

1 5

<210> 221

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 221

Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser

1 5

<210> 222

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 222

Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp

1 5
<210> 223
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 223
Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser

1 5
<210> 224
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 224
Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala

1 5
<210> 225
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 225
Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp

1 5
<210> 226
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 226
Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser

1 5
<210> 227
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 227

Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala

1 5

<210> 228

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 228

Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala Cys

1 5

<210> 229

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 229

Pro Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His

1 5

<210> 230

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 230

Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn

1 5

<210> 231

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 231

Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn

1 5

<210> 232

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 232

Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe

1 5

<210> 233

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 233

Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr

1 5

<210> 234

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 234

Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg

1 5

<210> 235

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 235

Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala

1 5

<210> 236

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 236

Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp

1 5

<210> 237

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 237

His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser

1 5

<210> 238

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 238

Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp

1 5

<210> 239

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 239

Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser

1 5

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 240

Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala

1 5

<210> 241

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 241

Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp

1 5

<210> 242

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 242

Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser

1 5

<210> 243

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 243

Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala

1 5

<210> 244

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 244

Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala Cys

1 5

<210> 245

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 245

Pro Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn

1 5 10

<210> 246

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 246

Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn

1 5 10
 <210> 247
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 247
 Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe
 1 5 10
 <210> 248
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 248
 Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr
 1 5 10
 <210> 249
 <211> 10
 <212> PRT
 <
 213> Homo sapiens
 <400> 249
 Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg
 1 5 10
 <210> 250
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 250
 Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala
 1 5 10
 <210> 251
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 251

Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp

1 5 10

<210> 252

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 252

Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser

1 5 10

<210> 253

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 253

His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp

1 5 10

<210> 254

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 254

Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser

1 5 10

<210> 255

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 255

Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala

1 5 10

<210> 256

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 256
Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp
1 5 10

<210> 257

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 257

Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser
1 5 10

<210> 258

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 258

Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala
1 5 10

<210> 259

<211> 10

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 259

Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala Cys
1 5 10

<210> 260

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 260

Pro Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp

1 5

<210> 261

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 261

Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp

1 5

<210> 262

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 262

Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu

1 5

<210> 263

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 263

Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu

1 5

<210> 264

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 264

Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr

1 5

<210> 265

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 265

Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn

1 5

<210> 266

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 266

Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val

1 5

<210> 267

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 267

Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile

1 5

<210> 268

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 268

Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys

1 5

<210> 269

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 269

Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys

1 5

<210> 270

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 270

Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys

1 5
<210> 271
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 271
Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys

1 5
<210> 272
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 272
Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His

1 5
<210> 273
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 273
Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly

1 5
<210> 274

<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 274

Ile Cys Lys Lys Cys His Gly Ala
1 5
<210> 275
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 275

Pro Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp

1 5

<210> 276

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 276

Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu

1 5

<210> 277

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 277

Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu

1 5

<210> 278

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 278

Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr

1 5

<210> 279

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 279

Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn

1 5

<210> 280

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 280

Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val

1 5

<210> 281

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 281

Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile

1 5

<210> 282

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 282

Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys

1 5

<210> 283

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 283

Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys

1 5

<210> 284

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 284

Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys

1 5

<210> 285

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 285

Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys

1 5

<210> 286

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 286

Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His

1 5

<210> 287

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 287

Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly

1 5

<210> 288

<211> 9

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 288

Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly Ala

1 5

<210> 289

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 289

Pro Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu

1 5 10

<210> 290

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 290

Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu

1 5 10

<210> 291

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 291

Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr

1 5 10

<210> 292

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 292

Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn

1 5 10

<210> 293

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 293

Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val

1 5 10

<210> 294

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 294

Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile

1 5 10

<210> 295

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 295

Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys

1 5 10

<210> 296

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 296

Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys

1 5 10

<210> 297

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 297

Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys

1 5 10

<210> 298

<211> 10

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 298

Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys

1 5 10

<210> 299

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 299

Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His

1 5 10

<210> 300

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 300

Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly

1 5 10

<210> 301

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 301

Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly Ala

1 5 10

<210> 302

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 302

Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala

1 5

<210> 303

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 303

Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val

1 5

<210> 304

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 304

Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn

1 5

<210> 305

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 305

Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile

1 5

<210> 306

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 306

Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr

1 5

<210> 307

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 307

Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr

1 5

<210> 308

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 308

Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn

1 5

<210> 309

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 309

Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln

1 5

<210> 310

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 310

Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala

1 5

<210> 311

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 311

Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala

1 5

<210> 312

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 312

Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro

1 5

<210> 313

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 313

Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser

1 5

<210> 314

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 314

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu

1 5

<210> 315

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 315

Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val

1 5

<210> 316

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 316

Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro

1 5

<210> 317

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 317

Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr

1 5

<210> 318

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 318

Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu

1 5

<210> 319

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 319

Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg

1 5

<210> 320

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 320

Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu

1 5

<210> 321

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 321

Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His

1 5

<210> 322

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 322

Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser

1 5

<210> 323

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 323

Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser

1 5

<210> 324

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 324

Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser

1 5

<210> 325

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 325

Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 326

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 326

Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser

1 5

<210> 327

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 327

Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser

1 5

<210> 328

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 328

His Ser Ser Ser Gly Ser Ser Leu

1 5

<210> 329

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 329

Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val

1 5

<210> 330

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 330

Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn

1 5

<210> 331

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 331

Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile

1 5

<210> 332

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 332

Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr

1 5

<210> 333

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 333

Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr

1 5

<210> 334

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 334

Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn

1 5

<210> 335

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 335

Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln

1 5

<210> 336

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 336

Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala

1 5

<210> 337

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 337

Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala

1 5

<210> 338

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 338

Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro

1 5

<210> 339

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 339

Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser

1 5

<210> 340

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 340

Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu

1 5

<210> 341

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 341

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val

1 5

<210> 342

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 342

Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro

1 5

<210> 343

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 343

Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr

1 5

<210> 344

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 344

Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu

1 5

<210> 345

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 345

Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg

1 5

<210> 346

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 346

Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu

1 5

<210> 347

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 347

Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His

1 5

<210> 348

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 348

Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser

1 5

<210> 349

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 349

Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser

1 5

<210> 350

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 350

Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser

1 5

<210> 351

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 351

Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 352

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 352

Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser

1 5

<210> 353

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 353

Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser

1 5

<210> 354

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 354

Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser Leu

1 5

<210> 355

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 355

Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn

1 5 10

<210> 356

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 356

Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile

1 5 10

<210> 357

<211> 10

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 357
 Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr
 1 5 10

<210> 358

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 358

Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr
 1 5 10

<210> 359

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 359

Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn
 1 5 10

<210> 360

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 360

Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln
 1 5 10

<210> 361

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 361

Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala
 1 5 10

<210> 362
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 362
 Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala
 1 5 10

<210> 363
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 363
 Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro
 1 5 10

<210> 364
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 364
 Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser
 1 5 10

<210> 365
 <211> 10
 <212> PRT
 <
 213> Homo sapiens
 <400> 365

Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu
 1 5 10
 <210> 366
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 366

Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val

1 5 10
 <210> 367
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 367

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro

1 5 10
 <210> 368
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 368

Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr

1 5 10
 <210> 369
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 369

Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu

1 5 10
 <210> 370
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 370

Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg

1 5 10
 <210> 371
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 371

Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu

1 5 10

<210> 372

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 372

Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His

1 5 10

<210> 373

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 373

Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser

1 5 10

<210> 374

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 374

Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser

1 5 10

<210> 375

<211> 10

<212> PRT

<

213> Homo sapiens

<400> 375

Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser

1 5 10

<210> 376

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 376

Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly

1 5 10

<210> 377

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 377

Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 378

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 378

Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser

1 5 10

<210> 379

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 379

Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser Leu

1 5 10

<210> 380

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 380

Gln Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp

1 5

<210> 381

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 381

Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala

1 5

<210> 382

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 382

Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg

1 5

<210> 383

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 383

Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr

1 5

<210> 384

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 384

Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val

1 5

<210> 385

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 385

Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val

1 5

<210> 386

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 386

Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln

1 5

<210> 387

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 387

Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val

1 5

<210> 388

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 388

Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg

1 5

<210> 389

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 389

Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala

1 5

<210> 390

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 390

Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg

1 5
 <210> 391
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 391
 Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr

1 5
 <210> 392
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 392
 Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val

1 5
 <210> 393
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 393

Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala
 1 5
 <210> 394
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 394

Val Arg Ala Arg Thr Val Ala Gly
 1 5
 <210> 395
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 395

Gln Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala

1 5

<210> 396

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 396

Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg

1 5

<210> 397

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 397

Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr

1 5

<210> 398

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 398

Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val

1 5

<210> 399

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 399

Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val

1 5

<210> 400

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 400

Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln

1 5

<210> 401

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 401

Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val

1 5

<210> 402

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 402

Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg

1 5

<210> 403

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 403

Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala

1 5

<210> 404

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 404

Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg

1 5

<210> 405

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 405

Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr

1 5

<210> 406

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 406

Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val

1 5

<210> 407

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 407

Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala

1 5

<210> 408

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 408

Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala Gly

1 5

<210> 409

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 409

Gln Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg

1 5 10

<210> 410

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 410
 Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr
 1 5 10

<210> 411
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 411
 Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val
 1 5 10

<210> 412
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 412
 Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val
 1 5 10

<210> 413
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 413
 Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln
 1 5 10

<210> 414
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 414
 Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val

1 5 10
 <210> 415
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 415
 Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg

1 5 10
 <210> 416
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 416

Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala
 1 5 10
 <210> 417
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 417

Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg

1 5 10
 <210> 418
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 418

Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr
 1 5 10
 <210> 419
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 419

Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val

1 5 10

<210> 420

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 420

Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala

1 5 10

<210> 421

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 421

Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala Gly

1 5 10

<210> 422

<211> 52

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 422

tcgtatacat ttcttacatc tatgcgctgg aagagaccct catggacaca aa 52

<210> 423

<211> 108

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 423

gggacaagtt tgtacaaaaa agcaggctac gaaggagata tacatatgaa attcttagtc 60

aacgttgccc ttgtttttat ggtcgtatac atttcttaca tctatgcg 108

<210> 424

<211> 54

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 424

cgggtcgtcg aggtcctcgt cgaaggcct cgtgtagtgg tagtggtagt gcct 54

<210> 425

<211> 61

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 425

cctcgtgtag tggtagtgg agtgcctcga atttgggtcg aaagaacatg tttcaccagg 60

g 61