



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0137696  
(43) 공개일자 2022년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/40 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
G01N 33/573 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 16/40 (2013.01)  
G01N 33/573 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-7030350  
(22) 출원일자(국제) 2021년02월03일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2022년09월01일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/016409  
(87) 국제공개번호 WO 2021/158660  
국제공개일자 2021년08월12일  
(30) 우선권주장  
62/970,626 2020년02월05일 미국(US)

(71) 출원인  
나보, 인크.  
미국 72204 아칸소주 리틀록 콜로넬 글렌 로드  
10912 스위트 500  
(72) 발명자  
존슨 블레이크 피  
미국 72204 아칸소주 리틀 록 콜로넬 글렌 로드  
10912 스위트 500  
오브라이언 티모티 제이  
미국 72204 아칸소주 리틀 록 콜로넬 글렌 로드  
10912 스위트 500  
(74) 대리인  
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 53 항

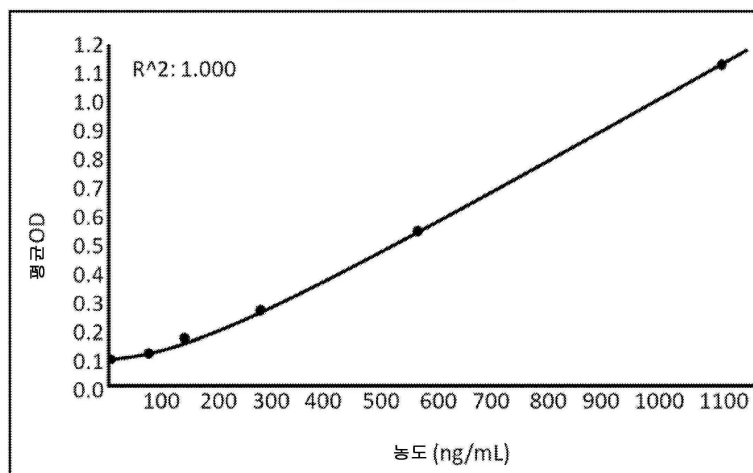
(54) 발명의 명칭 항-헵신 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 출원은 항-헵신 항체의 제조 방법, 항-헵신 항체, 항-헵신 항체의 활성을 스크리닝하는 방법, 항-헵신 항체의 약제학적 조성물, 항-헵신 항체를 포함하는 키트, 및 암을 진단하기 위해 항-헵신 항체를 사용하는 방법을 개시한다.

대표도

헵신 표준 곡선 검정



(52) CPC특허분류

**G01N 33/57407** (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/30 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2333/96433 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

순환 헵신 또는 순환 헵신의 c-말단에 선택적으로 결합하는 단리된 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 항체가 세린 프로테아제인 마트립타제, KLK6, KLK7 및 KLK8에 선택적으로 결합하지 않는 것인 항체.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 헵신이 인간 헵신인 항체.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 헵신이 생물학적으로 활성인 세포의 헵신인 항체.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 순환 헵신이 서열 번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 야생형 인간 헵신이 서열 번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

#### 청구항 7

서열 번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 재조합 헵신 서열에 결합하는 단리된 항체.

#### 청구항 8

가변 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, CDR-H1은 서열 번호 16, 18 및 19 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H2는 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H3은 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 9

가변 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, CDR-L1은 서열 번호 17 및 20 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L2는 서열 번호 12 및 15 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L3은 서열 번호 7 및 10 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 10

항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및

가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고,

CDR-H1은 서열 번호 16, 18 및 19 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H2는 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을

포함하고, CDR-H3은 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고,

CDR-L1은 서열 번호 17 및 20 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L2는 서열 번호 12 및 15 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L3은 서열 번호 7 및 10 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 11

가변 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 가변 중쇄가 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 12

가변 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 가변 경쇄가 서열 번호 4 및 5 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 13

항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 (예를 들어, 여기서 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3은 코티아(Chothia) 넘버링, 마틴(Martin) 넘버링, 카바트(Kabat) 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의됨) 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 14

항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 서열 번호 4 및 5 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 (예를 들어, 여기서 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의됨) 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 15

항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및

서열 번호 4 및 5 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고,

CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의되고,

CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의되는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 16

항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하는 가변 중쇄; 및

서열 번호 4 및 5 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하는 가변 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

#### 청구항 17

단리된 핵산으로서, 항체의 중쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 재구축된 핵산 컨센서스 서열을 포함하고, 핵산 컨센서스 서열이 서열 번호 21 내지 23 중 어느 하나로부터 선택되는 것인 단리된 핵산.

#### 청구항 18

단리된 핵산으로서, 항체의 경쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 재구축된 핵산 컨센서스 서열을 포함하고, 핵산 컨센서스 서열이 서열 번호 24 및 25 중 어느 하나로부터 선택되는 것인 단리된 핵산.

#### 청구항 19

제17항 또는 제18항의 단리된 핵산을 포함하는 벡터.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 단리된 핵산이 조절 제어 서열에 작동 가능하게 연결되는 것인 벡터.

#### 청구항 21

제19항의 벡터 또는 제17항 또는 제18항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 항체 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물.

#### 청구항 23

(a) (예를 들어, 개체, 예를 들어, 암의 위험이 있거나 암을 가진 것으로 의심되는 개체로부터 얻은) 생물학적 샘플을 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계; 및

(b) 순환 헵신이 생물학적 샘플에 존재하는지의 여부를 결정하는 단계(예를 들어, 순환 헵신의 양이 증가되었는지의 여부를 결정하는 단계)

를 포함하는, 생물학적 샘플에서 순환 헵신의 존재를 확인하는 방법.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체가

서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및

서열 번호 4 및 5 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고,

CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의되고,

CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의되는 것인 방법.

#### 청구항 25

제23항에 있어서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체가

가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및

가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고,

CDR-H1은 서열 번호 16, 18 및 19 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H2는 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H3은 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고,

CDR-L1은 서열 번호 17 및 20 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L2는 서열 번호 12 및 15 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L3은 서열 번호 7 및 10 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 비조직 샘플인 방법.

#### 청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 효소 결합 면역 흡착 점 적법(ELISPOT), 면역조직화학(IHC), 멀티플렉스 및/또는 미세유체 플랫폼용 마이크로비드에 대한 항체 적응을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 28

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체가 이에 커플링된 검출 가능한 모이어티를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 29

제26항에 있어서, 검출 가능한 모이어티가 형광 표지, 효소, 콜로이드상 금속, 자성 입자 및 라텍스 비드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 30

제26항에 있어서, 검출 가능한 모이어티가 항체에 직접적으로 커플링되는 것인 방법.

#### 청구항 31

제26항에 있어서, 검출 가능한 모이어티가 항체에 간접적으로 커플링되는 것인 방법.

#### 청구항 32

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 측방 유동 검정을 포함하는 방법.

#### 청구항 33

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 순환 헵신이 생물학적 샘플에 존재하는지의 여부를 결정하는 단계가 샘플에서 순환 헵신의 존재를 검출하는 것을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 34

제23항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 개체(예를 들어, 암이 의심되거나 암 위험이 있는 개체)에서 암의 존재 또는 암의 발병 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 35

제23항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 개체(예를 들어, 재발 위험이 있는 것으로 의심되는 개체)에서 암의 재발 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 36

제23항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 개체(예를 들어, 재발 위험이 있는 것으로 의심되는 개체)에서 암의 전이 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 37

제26항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 상피암인 방법.

#### 청구항 38

제37항에 있어서, 암이 난소암, 전립선암, 암종 또는 이들의 조합인 방법.

#### 청구항 39

제38항에 있어서, 암이 난소암인 방법.

#### 청구항 40

제38항에 있어서, 암이 전립선암인 방법.

#### 청구항 41

제37항에 있어서, 암이 암종인 방법.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 암종이 신세포 암종(RCC) 또는 전이성 신세포 암종인 방법.

#### 청구항 43

순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 순환 헵신의 상승된 수준과 관련된 장애를 치료하는 방법.

#### 청구항 44

순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 고헵신혈증을 치료하는 방법.

#### 청구항 45

헵신의 단리된 c-말단 부분에 대해 동물을 헵신으로 면역화함으로써 생성된 하이브리도마를 스크리닝하는 것을 포함하는, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체의 생산 방법.

#### 청구항 46

서열 번호 42를 포함하는 단리된 재조합 헵신 폴리뉴클레오타이드 서열.

#### 청구항 47

서열 번호 43을 포함하는 단리된 재조합 헵신 아미노산 서열.

#### 청구항 48

서열 번호 44를 포함하는 단리된 재조합 헵신 아미노산 서열.

#### 청구항 49

서열 번호 48을 포함하는 단리된 촉매 활성의 재조합 헵신 아미노산 서열.

#### 청구항 50

순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체의, 치료를 필요로 하는 대상체에서 고헵신혈증을 치료하는 방법에서의 용도.

#### 청구항 51

제50항에 있어서, 방법이 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 것인 용도.

#### 청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체가

서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및

서열 번호 4 및 5 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고,

CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의되고,

CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의되는 것인 용도.

### 청구항 53

제50항 또는 제51항에 있어서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체가

가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및

가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고,

CDR-H1은 서열 번호 16, 18 및 19 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H2는 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H3은 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고,

CDR-L1은 서열 번호 17 및 20 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L2는 서열 번호 12 및 15 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L3은 서열 번호 7 및 10 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하는 것인 용도.

## 발명의 설명

## 기술 분야

## 배경 기술

### 상호 참조

본 출원은 2020년 2월 5일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/970,626호의 이익을 주장하며, 상기 출원은 본원에 참조로 포함된다.

### 발명의 배경

암은 선진국의 주요 사망 원인 중 하나이며, 매년 전 세계적으로 1,400만 건 이상의 새로운 암 사례가 발생한다. 유전적 요인 및 환경적 요인이 암을 유발할 수 있으며, 나이가 들수록 암의 위험이 크게 증가한다. 사람들이 더 오래 살고 개발 도상국에서 생활 방식이 변화함에 따라 암 발생률이 증가하고 있다. 암에 대한 새로운 진단 방법이 필요한 상황이다.

## 발명의 내용

### 발명의 요약

타입 II 막횡단 세린 프로테아제인 헵신은 일반적으로 다양한 상피암에서 과다발현되며, 상피암에서 헵신의 과다발현 및 이와 동시의 단백질 분해 활성화는 중앙 진행과 상관관계가 있다. 최근 연구에 따르면, 헵신은 자가촉매 작용 및 후속 엑토도메인 흘림(shedding)을 통해 활성화되어, 혈청 기반 바이오마커로서의 잠재력을 강력하게 나타낸다. 전립선 전암종의 유전자 도입 마우스 모델을 사용하여, 헵신 과다발현이 이전에 질병 진행, 특히 사실상 신경내분비계 전이에 연루됨이 밝혀졌다. 종합적으로, 그의 전이성 변이체를 포함하는 전립선암의 진행에서 헵신 발현의 진단적 유용성에 대한 필요성이 존재한다.

순환 헵신 또는 순환 헵신의 c-말단에 선택적으로 결합하는 단리된 항체가 본원에서 제공된다. 한 예에서, 항체는 세린 프로테아제 매트릭스 메탈로프로테아제, KLK6, KLK7 및 KLK8에 선택적으로 결합하지 않는다. 한 예에서, 서열 번호 42를 포함하는 단리된 재조합 헵신 폴리뉴클레오타이드 서열이 본원에서 제공된다. 또 다른 예에서, 서열 번호 43을 포함하는 단리된 재조합 헵신 아미노산 서열이 본원에서 제공된다. 또 다른 예에서, 서열 번호 44를 포함하는 단리된 재조합 헵신 아미노산 서열이 본원에서 제공된다. 또 다른 예에서, 서열 번호 48을 포함하는 단리된 촉매 활성의 재조합 헵신 아미노산 서열이 본원에서 제공된다.

한 예에서, 본원에서 설명되는 단리된 항체는 (a) 하이브리도마를 제조하는 단계(예를 들어, 막횡단 부분(예를

들어, 야생형 헵신의)이 결합된 재조합 헵신 서열로 번역화된 설치류로부터); (b) 개체(예를 들어, 상피암으로 진단된)로부터 얻은 혈청에 대해 (a)의 하이브리도마를 스크리닝하는 단계; 및 (c) 순환하는(또는 세포외) 헵신에 특이적으로 결합하는 (b)의 하이브리도마를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0009] 또 다른 예에서, 본원에서 설명되는 분리된 항체는 (a) 하이브리도마를 제조하는 단계(예를 들어, 막획단 부분(예를 들어, 야생형 헵신의)이 결합된 재조합 헵신 서열로 번역화된 설치류로부터); (b) 개체(예를 들어, 상피암으로 진단된)로부터 얻은 혈청에 대해 (a)의 하이브리도마를 스크리닝하는 단계; (c) 세포외 헵신에 특이적으로 결합하는 (b)의 하이브리도마를 분리하는 단계; (d) 생물학적 활성의 재조합 세포외 헵신에 대해 (c)의 하이브리도마를 스크리닝하는 단계; 및 (e) 헵신의 세포외 순환하는 c-말단 부분에 특이적으로 결합하는 (d)의 하이브리도마를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0010] 설명된 방법의 일부 예에서, 헵신은 인간 헵신을 포함한다. 생물학적 활성의 재조합 세포외 헵신은 일부 경우에 트롬빈 절단 부위 및 선택적으로 스페이서(링커)를 추가로 포함한다. 순환 헵신은 서열 번호 44의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 플래그 태그가 있는 촉매 활성 헵신은 서열 번호 48의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 야생형 인간 헵신은 서열 번호 41의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0011] 한 측면에서, 서열 번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 재조합 헵신 서열에 결합하는 분리된 항체가 본원에서 제공된다. 일부 경우에, 결합은 선택적이다.

[0012] 한 측면에서, 가변 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 제공되며, 여기서 CDR-H1은 서열 번호 16, 18, 및 19 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H2는 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H3은 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 가변 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 제공되며, 여기서 CDR-L1은 서열 번호 17 및 20 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L2는 서열 번호 12 및 15 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L3은 서열 번호 7 및 10 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함한다.

[0014] 한 측면에서, 가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 제공되며, 여기서 CDR-H1은 서열 번호 16, 18, 및 19 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H2는 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H3은 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L1은 서열 번호 17 및 20 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L2는 서열 번호 12 및 15 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L3은 서열 번호 7 및 10 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함한다.

[0015] 한 측면에서, 가변 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 제공되며, 여기서 가변 중쇄는 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함한다.

[0016] 한 측면에서, 가변 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 제공되고, 여기서 가변 경쇄는 서열 번호 4 및 5 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함한다.

[0017] 한 측면에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 제공되며, 여기서 가변 중쇄는 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고; 가변 경쇄는 서열 번호 4 및 5 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함한다.

[0018] 한 측면에서, 상기 설명된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 생성하는 하이브리도마가 본원에서 제공된다.

[0019] 일부 실시양태에서, 항체는 IgG, IgA, 또는 IgM 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgGA1 또는 IgGA2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 모노클로날 항체, 탈면역화 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 다중특이적 항체를 포함한

다. 일부 실시양태에서, 항체는 다가 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub>, 디아바디, 선형 항체, 단일 도메인 항체(sdAb), 낙타류 V<sub>H</sub> 도메인, 또는 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 재조합 또는 합성 항체 단편이다.

- [0021] 한 측면에서, 항체의 중쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 재구축된 핵산 컨센서스 서열을 포함하는 단리된 핵산이 본원에서 제공되고, 여기서 핵산 컨센서스 서열은 서열 번호 21, 22, 및 23 중 어느 하나로부터 선택된다.
- [0022] 한 측면에서, 항체의 경쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 재구축된 핵산 컨센서스 서열을 포함하는 단리된 핵산이 본원에서 제공되며, 여기서 핵산 컨센서스 서열은 서열 24 및 25 중 어느 하나로부터 선택된다.
- [0023] 한 측면에서, 상기 설명된 단리된 핵산을 포함하는 벡터가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 조절 제어 서열에 작동 가능하게 연결된다.
- [0024] 한 측면에서, 상기 설명된 측면 중 어느 하나의 벡터 또는 핵산을 포함하는 숙주 세포가 본원에서 제공된다.
- [0025] 한 측면에서, 상기 설명된 측면 중 어느 한 항의 항체 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 본원에서 제공된다.
- [0026] 한 측면에서, (a) 생물학적 샘플(예를 들어, 개체, 예를 들어, 암이 존재하는 것으로 의심되거나 암 위험이 있는 개체로부터 얻은)을 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계; 및 (b) 순환 헵신이 생물학적 샘플에 존재하는지의 여부를 결정하는 단계(예를 들어, 순환 헵신의 양이 증가되었는지의 여부를 결정하는 단계)를 포함하는, 생물학적 샘플에서 순환 헵신의 존재를 확인하는 방법이 본원에서 제공된다. 생물학적 샘플은 예를 들어 혈액(또는 비조직) 샘플(예를 들어, 전혈, 혈청, 소변 등)일 수 있다.
- [0027] 한 예에서, 상기 방법은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 효소 결합 면역 흡착 점적법(ELISPOT), 면역조직화학(IHC), 멀티플렉스 및/또는 미세유체 플랫폼용 마이크로비드에 대한 항체 적응 등을 포함한다.
- [0028] 또 다른 예에서, 상기 방법은 개체(예를 들어, 암이 의심되거나 암 위험이 있는 개체)에서 암의 존재 또는 암의 발병 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0029] 또 다른 예에서, 상기 방법은 개체(예를 들어, 재발 위험이 있는 것으로 의심되는 개체)에서 암의 재발 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0030] 또 다른 예에서, 상기 방법은 개체(예를 들어, 재발 위험이 있는 것으로 의심되는 개체)에서 암의 전이 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0031] 암은 예를 들어 난소암, 전립선암, 암종, 또는 이들의 조합과 같은 상피암일 수 있다. 한 예에서, 암은 난소암이다. 또 다른 예에서, 암은 전립선암이다. 또 다른 예에서, 암은 암종이다. 암종의 비제한적인 예는 신세포 암종(RCC) 또는 전이성 신세포 암종을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0032] 한 측면에서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 그 치료를 필요로 하는 대상체에서 상승된 수준의 순환 헵신과 관련된 장애를 치료하는 방법이 본원에서 제공된다.
- [0033] 한 측면에서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 그 치료를 필요로 하는 대상체에서 고헵신혈증을 치료하는 방법이 본원에서 제공된다.
- [0034] 한 측면에서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체를 생산하는 방법이 본원에서 제공되며, 이 방법은 동물을 헵신의 단리된 c-말단 부분에 대해 헵신으로 면역화함으로써 생성된 하이브리도마를 스크리닝하는 것을 포함한다.

#### [0035] 참조에 의한 통합

[0036] 본 명세서에서 언급되는 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 마치 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0037] 출원 전반에 걸쳐 설명된 서열은 본 명세서에 참조로 포함된다.

### 도면의 간단한 설명

[0038] 도면의 간략한 개시

본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구범위에서 구체적으로 제시된다. 본 개시내용의 특징 및 이점은 개시내용의 원리가 활용되는 예시적인 실시양태를 제시하는 다음의 상세한 설명 및 첨부 도면을 참조하여 보다 잘 이해될 것이다.

도 1a는 본 명세서에서 설명되는 진단 방법에 대한 예시적인 검정 계획을 예시한 것이다. 단계 1에서, 샘플 항원을 친화도 정제된 항원 특이적 항체로 코팅된 웰에 첨가한 다음, 단계 2에서 항원이 항체에 결합할 수 있도록 인큐베이션한다. 플레이트를 세척하고, 스트렙타비딘-양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 접합체를 플레이트에 첨가하고(단계 3), 인큐베이션한다. 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 기질을 첨가하고, 정지 용액을 인큐베이션 후에 최종적으로 첨가한다. 색상은 45 nM에서 검출된다.

도 1b는 도 1a의 결과의 예시적인 표준 곡선을 도시한 것이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 발명의 상세한 설명

본 발명의 실시는 달리 지시되지 않는 한, 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 사용할 것이며, 이들은 관련 기술 분야의 기술 내에 있다. 이러한 기술은 문헌, 예를 들어 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook *et al.*, 1989) Cold Spring Harbor Press]; [Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, *ed.*, 1984)]; [Methods in Molecular Biology, Humana Press]; [Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, *ed.*, 1998) Academic Press]; [Animal Cell Culture (R. I. Freshney, *ed.*, 1987)]; [Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press]; [Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, *eds.*, 1993-1998) J. Wiley and Sons]; [Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)]; [Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, *eds.*)]; [Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Cabs, *eds.*, 1987)]; [Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel *et al.*, *eds.*, 1987)]; [PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, *eds.*, 1994)]; [Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, *eds.*, 1991)]; [Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)]; [Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)]; [Antibodies (P. Finch, 1997)]; [Antibodies: a practical approach (D. Catty, *ed.*, IRL Press, 1988-1989)]; [Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, *eds.*, Oxford University Press, 2000)]; [Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)]; 및 [The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, *eds.*, Harwood Academic Publishers, 1995)]에 자세히 설명되어 있다.

용어 "약"은 제시된 값, 및 주어진 측정에서 실험 오차를 고려하고 플러스 또는 마이너스 5, 4, 3, 2 또는 1% 또는 그 사이의 임의의 수치를 나타낼 수 있는 범위를 포함한다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "실질적으로 순수한", "단리된" 또는 "정제된"은 적어도 50% 순수한(즉, 오염물이 없음), 보다 바람직하게는 적어도 90% 순수한, 보다 바람직하게는 적어도 95% 순수한, 보다 바람직하게는 적어도 98% 순수한, 보다 바람직하게는 적어도 99% 순수한 물질을 지칭한다. 항체는 포화 황산암모늄 침전법, 유글로불린 침전법, 카프로산 방법, 카프릴산 방법, 이온 교환 크로마토그래피(DEAE 또는 DE52), 또는 관련 기술 분야에서 인정하는 통상적인 방법을 사용하여 항-Ig 컬럼 또는 단백질 A, G 또는 L 컬럼을 사용한 친화도 크로마토그래피에 의해 상기 언급된 배양 상청액 또는 복수로부터 분리 및 정제될 수 있다.

용어 "폴리펩타이드", "올리고펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 교환 가능하게 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비아미노산에 의해 중단될 수 있다. 이들 용어는 또한 자연적으로 또는 개입, 예를 들어 디설파이드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예를 들어 표지 성분과의 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다. 또한, 상기 정의에는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 유사체(예를 들어, 비천연 아미노산 등 포함), 및 관련 기술 분야에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩타이드가 포함된다. 본 발명의 폴리펩타이드는 항체를 기반으로 하기 때문에, 폴리펩타이드는 단일쇄 또는 회합된 사슬로서 발생할 수 있는 것으로 이해된다.

본원에서 교환 가능하게 사용되는 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형

된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 중합체에 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화된 뉴클레오타이드 및 이들의 유사체와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 뉴클레오타이드가 아닌 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어 표지 성분과의 접합에 의해 중합 후에 추가로 변형될 수 있다. 다른 유형의 변형에는 예를 들어 "캡(cap)", 하나 이상의 천연 발생 뉴클레오타이드의 유사체로의 치환, 뉴클레오타이드간 변형, 예를 들어 비하전 연결(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등) 및 하전 연결(예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 갖는 것, 예를 들어 단백질(예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩타이드, 플라이-L-리신 등)과 같은 펜던트 모이어티를 함유하는 것, 인터칼레이터(예를 들어, 아크리딘, 소랄렌 등)가 있는 것, 킬레이터(예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화 금속 등)를 함유하는 것, 알킬화제를 함유하는 것, 변형된 결합을 갖는 것(예를 들어, 알파 아노머 핵산 등)뿐만 아니라, 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오타이드(들)가 포함된다. 더 나아가, 당에 일반적으로 존재하는 임의의 하이드록실 기는 예를 들어 포스포네이트 기, 포스페이트 기로 대체되거나, 표준 보호기에 의해 보호되거나, 추가의 뉴클레오타이드에 대한 추가 연결을 만들기 위해 활성화되거나, 고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 또는 아민 또는 1 내지 20개의 탄소 원자의 유기 캐핑기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 하이드록실도 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 예를 들어 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보사이클릭 당 유사체, 알파-아노머 당, 에피머 당, 예를 들어 아라비노스, 자일로스 또는 리소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥토로스, 비사이클릭 유사체 및 염기성 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어 메틸 리보사이드를 포함하는, 관련 기술 분야에 일반적으로 공지된 유사한 형태의 리보스 또는 데옥시리보스 당을 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결은 대체 연결기로 대체될 수 있다. 이들 대안적인 연결기는 포스페이트가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S("디티오에이트"), (O)NR<sub>2</sub>("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH<sub>2</sub>("포름아세탈")에 의해 대체된 실시양태를 포함하지만 이에 제한되지는 않고, 여기서 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H이거나, 또는 선택적으로 에테르(--O--) 연결, 아릴, 알케닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐 또는 아르알킬을 함유하는 치환 또는 비치환된 알킬(1-20 C)이다. 폴리뉴클레오타이드의 모든 연결이 동일할 필요는 없다. 상기 설명은 RNA 및 DNA를 비롯하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0045] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헵신", "HPN", 또는 "TMPRSS1"은 상피 세포의 표면 상에서 발현되는 타입 II 막횡단 세린 프로테아제(TTSP)를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 헵신은 모든 포유동물 중, 예를 들어 인간, 개, 고양이, 말, 소 등의 천연 서열 헵신을 포함한다. 헵신(HPN)은 인간 전립선암에서 상향조절되는 대부분의 유전자 중 하나이며, 그 수준이 종종 10배 초과로 증가할 정도로 전립선 종양의 최대 90%에서 과다발현되는 타입 II 막횡단 세린 프로테아제를 코딩한다. 헵신은 전립선암 발병 초기에 상향조절되며, 진행 및 전이 전반에 걸쳐 높은 수준으로 유지된다. 또한, 헵신은 난소 암종, 신세포 암종(예를 들어, 전이성 신세포 암종) 및 자궁내막암에서도 과다발현된다. 헵신 과다발현은 전립선암 진행 및 전이의 촉진에서 중요한 역할을 수행한다. 헵신은 프로-유로키나제 플라스미노겐 활성화인자(pro-uPA) 및 프로-간세포 성장 인자(pro-HGF)를 활성화할 수 있다. uPA 세포 표면 세린 프로테아제 시스템 및 HGF-Met 산란 경로의 활성화는 헵신에 의한 전이 촉진의 원인이 될 수 있다. 본 개시내용은 헵신의 임상적으로 관련된 c-말단 부분에 특이적으로 결합하고 전립선암, 난소 암종, 신장 암종, 자궁내막암 또는 이들의 조합의 진단에 사용될 수 있는 항체를 제공한다. 417개 아미노산 단백질은 짧은 N-말단 세포질 도메인, 막횡단 도메인 및 C-말단 프로테아제 도메인에 대해 단단히 패킹되는 단일 스캐빈저 수용체 시스템 풍부 도메인으로 이루어진다. 천연 야생형 인간 헵신은 서열 번호 41로서 아래에서 제시된다.

[0046] 항체

[0047] 본원에서 사용되는 바와 같이, "항-헵신 항체"는 헵신의 c-말단 부분에 선택적으로 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 헵신에 결합하는 단리되거나 정제된 항체, 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 제공된다. 본원에서 설명되는 항체는 아래에서 설명되는 바와 같이 또는 관련 기술 분야에 공지된 바와 같이 변형될 수 있음이 이해될 것이다.

[0048] 본 발명에 유용한 "항체"는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 항체 단편(예를 들어, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc 등), 키메라 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 이중접합체 항체, 단일쇄(ScFv), 이들의 돌연변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질(예를 들어, 도메인 항체), 인간화 항체, 인간 항체, 및 항체의 글리코실화

변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체, 및 공유 변형된 항체를 포함하는 요구되는 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0049] 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 클래스로 분류될 수 있다. 면역글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM과 같은 5가지의 주요 클래스가 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위 클래스(이소형), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더 나눌 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배열은 관련 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0050] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파 또는 ("κ" 또는 "K") 및 람다 또는 ("λ")라고 하는 2개의 명확하게 구별되는 유형 중 하나로 지정될 수 있다.

[0051] 본원에서 사용되는 바와 같이, "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자(에피토프)에 대해 작용한다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 수득되는 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256:495]에 의해 처음으로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 미국 특허 제4,816,567호에 기술된 바와 같은 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어 문헌 [McCafferty *et al.*, 1990, *Nature*, 348:552-554]에 설명된 기술을 사용하여 생성된 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 다른 방법이 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 본 명세서에서 사용하기 위해 고려된다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같이, "인간화" 항체는 비인간 면역글로불린으로부터 유래되는 최소 서열을 포함하는 특이적 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 그의 단편(예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv 또는 항체의 다른 항원 결합 하위서열)인 비인간(예를 들어, 뮌) 항체의 형태를 지칭한다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역(CDR)의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 생물학적 활성을 갖는 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비인간 종의 CDR(공여자 항체)로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않지만 항체 성능을 추가로 정제하고 최적화하기 위해 포함되는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 비인간 면역글로불린의 영역에 상응하고 FR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 영역인 적어도 하나 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함할 것이다. 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc), 일반적으로 인간 면역글로불린의 영역 또는 도메인의 적어도 일부를 최적으로 포함할 것이다. 항체는 예를 들어 WO 99/58572에 설명되는 바와 같이 변형된 Fc 영역을 가질 수 있다. 다른 형태의 인간화 항체는 본래의 항체와 관련하여 변경된 하나 이상의 CDR(1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)을 가지며, 이는 또한 본래의 항체로부터의 1개 이상의 CDR로부터 "유래된" 하나 이상의 CDR로 지칭된다.

[0053] 본원에서 사용되는 바와 같이, "인간 항체"는 인간에 의해 생성되고/되거나, 관련 기술 분야에 공지된 또는 본원에서 개시되는 인간 항체를 제조하기 위한 임의의 기술을 사용하여 제조된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 인간 항체의 이러한 정의는 적어도 하나의 인간 중쇄 폴리펩타이드 또는 적어도 하나의 인간 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체를 포함한다. 하나의 그러한 예는 뮌 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체이다. 인간 항체는 관련 기술 분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선택되며, 여기서 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다([Vaughan *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314]; [Sheets *et al.*, 1998, *PNAS USA*, 95:6157-6162]; [Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381]; [Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581]). 인간 항체는 또한 인간 면역글로불린 유전자 로커스를 유전자 도입 동물, 예를 들어 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스에 도입함으로써 제조될 수 있다. 이 접근법은 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 제5,661,016호에 기재되어 있다. 대안적으로, 인간 항체는 표적 항원에 대해 작용하는 항체를 생성하는 인간 B 림프구를 불멸화함으로써 제조될 수 있다(이러한 B 림프구는 개체로부터 회수될 수 있거나 또는 시험관 내에서 면역화될 수

있음). 예를 들어, 문헌 [Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; [Boerner *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95]; 및 미국 특허 제5,750,373호를 참조한다.

[0054] 항체의 "가변 영역"은 단독으로 또는 조합하여 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 초가변 영역으로도 알려진 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역(FR)으로 구성된다. 각각의 사슬의 CDR은 FR에 의해 밀접하게 함께 유지되고, 다른 사슬의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다. 다음과 같은 적어도 두 가지의 CDR 결정 기술이 있다: (1) 종간(cross-species) 서열 가변성에 기초한 방법(Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); 및 (2) 항원-항체 복합체에 대한 결정학적 연구에 기초한 방법(Al-lazikani *et al.* (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). 본원에서 사용되는 바와 같이, CDR은 상기 두 방법 중 어느 하나 또는 둘 모두의 조합에 의해 규정되는 CDR을 지칭할 수 있다.

[0055] 항체의 "불변 영역"은 단독으로 또는 조합하여 항체 경쇄의 불변 영역 또는 항체 중쇄의 불변 영역을 지칭한다.

[0056] "에피토프"는 항체의 가변 영역 결합 포켓과 결합 상호작용을 형성할 수 있는 항원 또는 다른 거대분자의 부분을 지칭한다. 이러한 결합 상호작용은 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 아미노산 잔기와의 분자간 접촉으로 나타날 수 있다. 항원 결합은 예를 들어 CDR3 또는 CDR3 쌍, 또는 일부 경우에는  $V_H$  및  $V_L$  사슬의 최대 6개의 모든 CDR의 상호작용을 포함할 수 있다. 에피토프는 선형 펩타이드 서열(즉, "연속적")일 수 있거나, 비연속적인 아미노산 서열(즉, "입체형태적" 또는 "불연속적")로 이루어질 수 있다. 항체는 하나 이상의 아미노산 서열을 인식할 수 있고, 따라서 에피토프는 하나 초과와 별개의 아미노산 서열을 규정할 수 있다. 항체에 의해 인식되는 에피토프는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 펩타이드 매핑 및 서열 분석 기술에 의해 결정될 수 있다. 결합 상호작용은 항원 상의 에피토프와 CDR의 하나 이상의 아미노산 잔기 사이의 분자간 접촉으로 나타난다.

[0057] 항체 또는 폴리펩타이드에 "우선적으로 결합하는" 또는 "특이적으로 결합하는"(본원에서 교환 가능하게 사용됨) 에피토프는 관련 기술 분야에서 잘 이해되는 용어이고, 이러한 특이적 또는 우선적인 결합을 결정하는 방법은 또한 관련 기술 분야에 잘 알려져 있다. 항체가 다른 물질에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합력으로, 보다 쉽게 및/또는 보다 긴 지속 시간으로 결합하는 경우, 항체는 표적에 특이적으로 결합하거나 우선적으로 결합하는 것이다. 예를 들어, 헵신 에피토프에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체는 다른 헵신 에피토프 또는 비-헵신 에피토프에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합력으로, 보다 쉽게 및/또는 보다 긴 지속 시간으로 그의 에피토프에 결합하는 항체이다. 또한, 이 정의를 읽으면, 예를 들어 제1 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체(또는 모이어티 또는 에피토프)는 제2 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있거나 결합하지 않을 수 있음이 이해된다. 따라서, "특이적인 결합" 또는 "우선적인 결합"이 반드시 배타적인 결합을 필요로 하는 것은 아니다(배타적인 결합을 포함할 수는 있지만). 반드시 그런 것은 아니지만, 일반적으로, 결합에 대한 언급은 항체, 또는 그의 항원 결합 단편의 친화도가 관련되지 않은 아미노산 서열에 대한 항체의 친화도보다 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 또는 적어도 1000배 더 큰 경우에 우선적인 결합을 의미한다.

[0058] 본원에서 사용되는 바와 같이, "Fc 수용체" 및 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명한다.

[0059] 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226 또는 Pro230의 아미노산 잔기로부터 그의 카르복실 말단까지 연장되는 것으로 정의된다. Fc 영역에서 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991]에 제시된 바와 같은 EU 인덱스의 넘버링이다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, 즉 CH2 및 CH3을 포함한다.

[0060] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 적어도 하나의 이펙터 기능을 갖는다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC); 식균 작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체, BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 이러한 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 도메인)과 결합되는 것을 필요로 하며, 이러한 항체 이펙터 기능을 평가하기 위한 관련 기술 분야에 공지된 다양한 검정을 사용하여 평가할 수 있다.

- [0061] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해 천연 서열 Fc 영역의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함하지만, 천연 서열 Fc 영역의 적어도 하나의 이펙터 기능을 유지한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩타이드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩타이드의 Fc 영역에서의 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩타이드의 Fc 영역에 대해 적어도 약 80%의 서열 동일성, 가장 바람직하게는 상기 영역에 대해 적어도 약 90%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 95%의 서열 동일성, 적어도 약 96%의 서열 동일성, 적어도 약 97%의 서열 동일성, 적어도 약 98%의 서열 동일성, 적어도 약 99%의 서열 동일성을 가질 것이다.
- [0062] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "초가변 영역" 및 "CDR"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. CDR은 항원에 상보적인 방식으로 결합하고  $V_H$  및  $V_L$  사슬 각각에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 알려진 3개의 서열 영역으로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. 경쇄 가변 도메인에서, CDR은 카바트(Kabat) 등의 상기 문헌에 따라 일반적으로 대략 잔기 24-34(CDR1), 50-56(CDR2) 및 89-97(CDR3)에 해당하고, 경쇄 가변 도메인에서, CDR은 일반적으로 대략 잔기 31-35(CDRH1), 50-65(CDRH2) 및 95-102(CDRH3)에 해당한다. 상이한 항체의 CDR은 삽입을 포함할 수 있고, 따라서 아미노산 넘버링은 상이할 수 있는 것으로 이해된다. 카바트 넘버링 시스템은 상이한 항체 사이의 넘버링에서 임의의 삽입을 반영하기 위해 특정 잔기에 부착된 문자(예를 들어, 경쇄에서 CDR1의 27A, 27B, 27C, 27D, 27E 및 27F)를 활용하는 넘버링 방식을 사용하여 상기 삽입을 설명한다. 대안적으로, 경쇄 가변 도메인에서 CDR은 문헌 [Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)]에 따라 일반적으로 대략 잔기 26-32(CDR1), 50-52(CDR2) 및 91-96(CDR3)에 해당하고, 중쇄 가변 도메인에서 CDR은 일반적으로 대략 잔기 26-32(CDRH1), 53-55(CDRH2) 및 96-101(CDRH3)에 해당한다.
- [0063] 본원에서 사용되는 바와 같이, "프레임워크 영역" 또는 "FR"은 항원 결합 포켓 또는 홈의 일부를 형성하는 프레임워크 아미노산 잔기를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 프레임워크 잔기는 항원 결합 포켓 또는 홈의 일부인 루프를 형성하고, 루프 내의 아미노산 잔기는 항원과 접촉할 수 있거나 접촉하지 않을 수 있다. 프레임워크 영역은 일반적으로 CDR 사이의 영역을 포함한다. 경쇄 가변 도메인에서, FR은 카바트 등의 상기 문헌에 따라 전형적으로 대략 잔기 0-23(FRL1), 35-49(FRL2), 57-88(FRL3), 및 98-109에 해당하고, 중쇄 가변 도메인에서 FR은 전형적으로 잔기 0-30(FRH1), 36-49(FRH2), 66-94(FRH3), 및 103-133에 해당한다. 경쇄에 대한 카바트 넘버링에 대해 위에서 논의한 바와 같이, 중쇄도 유사한 방식으로 삽입을 설명한다(예를 들어, 중쇄에서 CDRH1의 35A, 35B). 대안적으로, 경쇄 가변 도메인에서, FR은 전형적으로 문헌 [Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)]에 따라 일반적으로 대략 잔기 0-25(FRL1), 33-49(FRL2), 53-90(FRL3), 및 97-109(FRL4)에 해당하고, 중쇄 가변 도메인에서 FR은 일반적으로 잔기 0-25(FRH1), 33-52(FRH2), 56-95(FRH3), 및 102-113(FRH4)에 해당한다.
- [0064] FR의 루프 아미노산은 항체 중쇄 및/또는 항체 경쇄의 3차원 구조의 검사에 의해 평가 및 결정될 수 있다. 3차원 구조는 용매 접근 가능한 아미노산 위치가 루프를 형성하고/하거나 항체 가변 도메인에서 항원 접촉을 제공할 가능성이 있기 때문에 상기 아미노산 위치에 대해 분석될 수 있다. 용매 접근 가능한 위치 중 일부는 아미노산 서열 다양성을 견딜 수 있고, 다른 위치(예를 들어, 구조적 위치)는 일반적으로 덜 다양하다. 항체 가변 도메인의 3차원 구조는 결정 구조 또는 단백질 모델링으로부터 유도될 수 있다.
- [0065] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "친화도"는 두 작용제의 가역적 결합에 대한 평형 상수를 나타내며,  $K_D$ 로 표현된다. 본원에서 설명되는 항체의 결합 친화도( $K_D$ )는 약 0.02 pM 내지 약 500 nM, 또는 그 사이의 임의의 정수일 수 있다.
- [0066] 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명(SPR), 키넥사 바이오센서(Kinexa Biocensor), 섬광 근접 검정, 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 오리젠(ORIGEN) 면역검정(IGEN), 형광 소광, 형광 전달, 효모 디스플레이, 또는 이들의 임의의 조합을 사용하여 결정할 수 있다. 결합 친화도는 또한 적합한 생물검정을 사용하여 스크리닝될 수 있다.
- [0067] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합력"은 희석 후 해리에 대한 둘 이상의 작용제의 복합체의 저항성을 지칭한다. 겔보기 친화도는 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 또는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 친숙한 임의의 다른 기술과 같은 방법에 의해 결정될 수 있다. 결합력은 스캐차드(Scatchard) 분석과 같은 방법 또는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 친숙한 임의의 다른 기술에 의해 결정될 수 있다.
- [0068] 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 보존적 또는 비보존적 치환을 사용하여 아미노산 서열에서 하나 이상의 치환

을 수행함으로써 변형될 수 있다.

- [0069] "보존적 아미노산 치환"이라는 어구는 특정 공통 특성에 기초한 아미노산의 그룹화를 지칭한다. 개별 아미노산 사이의 공통 특성을 정의하는 기능적 방법은 상동 유기체의 상응하는 단백질 사이의 아미노산 변화의 정규화된 빈도를 분석하는 것이다(Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). 이러한 분석에 따르면, 아미노산의 그룹은 그룹 내의 아미노산이 서로 우선적으로 교환되고, 따라서 전체 단백질 구조에 미치는 영향이 서로 가장 유사한 것으로 정의될 수 있다. 이러한 방식으로 정의된 아미노산 그룹의 예는 다음을 포함한다:
- [0070] (i) Glu 및 Asp, Lys, Arg 및 His로 구성된 하전된 그룹;
- [0071] (ii) Lys, Arg 및 His로 구성된 양으로 하전된 그룹;
- [0072] (iii) Glu 및 Asp로 구성된 음으로 하전된 그룹;
- [0073] (iv) Phe, Tyr 및 Trp로 이루어진 방향족 그룹;
- [0074] (v) His 및 Trp로 구성된 질소 고리 그룹;
- [0075] (vi) Val, Leu 및 Ile로 구성된 큰 지방족 비극성 그룹;
- [0076] (vii) Met 및 Cys로 구성된 저극성 그룹;
- [0077] (viii) Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln 및 Pro로 구성된 작은 잔기 그룹;
- [0078] (ix) Val, Leu, Ile, Met 및 Cys로 구성된 지방족 그룹; 및
- [0079] (x) Ser 및 Thr로 구성된 작은 하이드록실 그룹.
- [0080] 상기 제시된 그룹에 더하여, 각각의 아미노산 잔기는 자체 그룹을 형성할 수 있고, 개별 아미노산에 의해 형성된 그룹은 일반적으로 상기 설명된 바와 같이 관련 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 해당 아미노산에 대한 1 문자 및/또는 3문자 약어로 간단히 지칭될 수 있다.
- [0081] "보존된 잔기"는 다양한 유사한 단백질에 걸쳐 비교적 불변인 아미노산이다. 종종 보존된 잔기는 "보존적 아미노산 치환"에 대해 위에서 설명한 바와 같이 유사한 아미노산으로 대체됨으로써만 달라질 것이다.
- [0082] 본원에서 아미노산 서열에 사용된 문자 "x" 또는 "xaa"는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 20개의 표준 아미노산 중 임의의 아미노산이 그 위치에 존재할 수 있음을 나타내는 것으로 의도된다. 펩타이드 모방체 설계를 위해, 아미노산 서열의 "x" 또는 "xaa"는 표적 서열에 존재하는 아미노산의 모방체로 대체될 수 있거나, 또는 아미노산은 펩타이드 모방체의 활성을 방해하지 않는, 본질적으로 임의의 형태의 스페이서로 대체될 수 있다.
- [0083] "상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성"은 2개의 펩타이드 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 상동성 및 동일성은 비교 목적으로 정렬될 수 있는 각각의 서열의 위치를 비교함으로써 각각 결정될 수 있다. 비교되는 서열의 동등한 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유될 때, 분자는 그 위치에서 동일하고; 동등한 부위가 동일하거나 유사한 아미노산 잔기(예를 들어, 입체 및/또는 전자 성질이 유사함)에 의해 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 상동성(유사한)인 것으로 지칭될 수 있다. 상동성/유사성 또는 동일성의 백분율로서의 표현은 비교되는 서열에 의해 공유되는 위치에서 동일하거나 유사한 아미노산의 수의 함수를 지칭한다. "비관련된" 또는 "비상동성"인 서열은 본 발명의 서열과 40% 미만의 동일성, 바람직하게는 25% 미만의 동일성을 공유한다. 두 서열을 비교할 때, 잔기(아미노산 또는 핵산)의 부재 또는 추가의 잔기의 존재가 또한 동일성 및 상동성/유사성을 감소시킨다.
- [0084] 용어 "상동성"은 유사한 기능 또는 모티프를 갖는 유전자 또는 단백질을 확인하기 위해 사용되는 서열 유사성에 대한 수학적 기반 비교를 설명한다. 본 발명의 핵산(뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드) 및 아미노산(단백질) 서열은 예를 들어 다른 패밀리 구성원, 관련 서열 또는 상동체를 확인하기 위해 공개 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "쿼리 서열"로 사용될 수 있다. 이러한 검색은 문헌 [Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행할 수 있다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 본 발명의 핵산 분자와 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 얻기 위해 NBLAST 프로그램, 점수=100, 단어 길이=12로 수행될 수 있다. BLAST 아미노산 검색은 본 발명의 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 얻기 위해 XBLAST 프로그램, 점수=50, 단어 길이=3으로 수행될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭 도입 정렬을 얻기 위해, 문헌 [Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402]에 설명된 바와 같이 Gapped BLAST를 사용

할 수 있다. BLAS 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 BLAST)의 디폴트 파라미터를 사용할 수 있다(www.ncbi.nlm.nih.gov 참조).

- [0085] 본원에서 사용되는 바와 같이, "동일성"은 서열이 서열 매칭을 최대화하도록 정렬될 때, 즉 갭 및 삽입을 고려하는 경우, 2개 이상의 서열에서 상응하는 위치에서 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 백분율을 의미한다. 동일성은 문헌 [Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988]; [Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993]; [Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994]; [Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987]; [Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991]; 및 [Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. *Applied Math.*, 48: 1073 (1988)]에 설명된 방법을 포함하지만 이로 제한되지 않는 공지의 방법에 의해 쉽게 계산될 수 있다. 동일성을 결정하는 방법은 시험되는 서열 사이에 가장 큰 일치율을 제공하도록 설계된다. 더욱이, 동일성을 결정하는 방법은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 프로그램에 코딩되어 있다. 2개의 서열 사이의 동일성을 결정하기 위한 컴퓨터 프로그램 방법은 다음을 포함하지만 이로 제한되지 않는다: GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA([Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990)] 및 [Altschul et al. *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997)]). BLAST X 프로그램은 NCBI 및 기타 출처([BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894]; [Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)])에서 공개적으로 입수할 수 있다. 또한, 스미스 워터맨(Smith Waterman)도 동일성을 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0086] 필요한 경우, 본원에서 설명되는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 면역원성에 대해 평가될 수 있고, 필요에 따라 탈면역화될 수 있다(즉, 항체의 하나 이상의 T 세포 에피토프를 변경함으로써 항체의 면역반응성이 낮게 된다). 본원에서 설명되는 항체 및 항원 결합 단편에 존재하는 면역원성 및 T-세포 에피토프의 분석은 소프트웨어 및 특정 데이터베이스의 사용을 통해 수행될 수 있다. 예시적인 소프트웨어 및 데이터베이스는 영국 케임브리지 소재의 안티토프(Antitope)에 의해 개발된 iTope™를 포함하고, 이것은 인간 MHC 클래스 II 대립유전자에 대한 펩타이드의 결합을 분석하기 위한 인-실리코(in-silico) 기술이다.
- [0087] iTope™ 소프트웨어는 인간 MHC 클래스 II 대립유전자에 대한 펩타이드 결합을 예측하고, 이에 의해 "잠재적 T 세포 에피토프"의 위치에 대한 초기 스크리닝을 제공한다. iTope™ 소프트웨어는 34개의 인간 MHC 클래스 II 대립유전자의 결합 홈 내의 특이적 결합 포켓과 펩타이드의 아미노산 측쇄 사이의 유리한 상호작용을 예측한다. 주요 결합 잔기의 위치는 시험 항체 가변 영역 서열에 걸쳐 있는 하나의 아미노산이 중첩되는 9mer 펩타이드의 인-실리코 생성에 의해 달성된다. 각각의 9mer 펩타이드는 34개의 MHC 클래스 II 알로타입(allotype) 각각에 대해 시험되고, 잠재적인 "맞음(fit)" 및 MHC 클래스 II 결합 홈과의 상호작용을 기초로 하여 채점될 수 있다. MHC 클래스 II 대립유전자의 50% 초과에 대해 높은 평균 결합 점수(iTope™ 채점 기능에서 >0.55)를 생성하는 펩타이드는 잠재적인 T 세포 에피토프로 간주된다. 그러한 영역에서, MHC 클래스 II 홈 내의 펩타이드 결합을 위한 코어 9 아미노산 서열은 MHC 클래스 II 포켓 잔기(P1, P4, P6, P7 및 P9) 및 가능한 T 세포 수용체(TCR) 접촉 잔기(P-1, P2, P3, P5, P8)를 결정하기 위해 분석된다.
- [0088] 임의의 T-세포 에피토프의 확인 후, 확인된 T-세포 에피토프를 제거하기 위해 아미노산 잔기 변화, 치환, 부가 및/또는 결실을 도입할 수 있다. 확인된 에피토프를 계속 제거하면서 항체 구조 및 기능을 보존하도록 이러한 변경이 이루어질 수 있다. 예시적인 변경은 보존적 아미노산 변경을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0089] 헵신에 결합하고 헵신의 활성을 억제하는 중화 항체 또는 항원 결합 단편이 본원에서 제공된다.
- [0090] 음성 대조군보다 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배 더 큰, 또는 이를 초과하는 항-헵신 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 의한 억제/중화 백분율(%)은 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 헵신을 억제하거나 중화한다는 것을 나타낸다. 음성 대조군보다 2배 미만으로 더 큰 항-헵신 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 의한 헵신 억제 백분율은 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 헵신을 억제하지 않음을 나타낸다.
- [0091] 본원에서 설명되는 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 또한 면역접합체로서 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 명세서 및 청구범위의 목적을 위해 면역접합체는 본 발명에 따른 항-헵신 항체 또는 그의 단편 및

적어도 하나의 치료 표지를 포함하는 접합체를 지칭한다. 치료 표지에는 항종양제 및 혈관신생 억제제가 포함된다. 이러한 항종양제는 관련 기술 분야에 공지되어 있으며, 독소, 약물, 효소, 사이토카인, 방사성핵종 및 광역학적 치료제(photodynamic agent)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 독소에는 리신 A 사슬, 돌연변이체 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소, 디프테리아 독소이드, 스트렙토니그린, 보아마이신, 사포린, 겔로닌 및 미국자리공(pokeweed) 항바이러스 단백질이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 약물에는 다우노루비신, 메토타렉세이트 및 칼리케아미신이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 방사성핵종에는 방사성 금속이 포함된다. 사이토카인은 변형 성장 인자 베타(TGF- $\beta$ ), 인터루킨, 인터페론 및 종양 괴사 인자를 포함하지만, 이에 제한되지 않고; 이들 각각의 사이토카인의 예 및 기능은 관련 기술 분야에 잘 알려져 있다. 광역학적 치료제는 포르피린 및 그의 유도체가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 추가적인 치료적 표지는 관련 기술 분야에 공지되어 있을 것이며, 또한 본원에서 고려된다. 항-헵신 mAb 또는 그의 항원 결합 단편을 적어도 하나의 작용제와 복합체화하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다(즉, 문헌 [Ghetie *et al.*, 1994, *Pharmacol. Ther.* 63:209-34]에서 검토된 바와 같은 항체 접합체). 이러한 방법은 분자를 커플링하거나 연결하기 위해 사용되는 여러 가지 이용 가능한 이중작용성 시약 중 하나를 사용할 수 있다. 항체를 다른 모이어티에 접합시키기 위한 링커는 관련 기술 분야에 잘 알려져 있고, 본원에서 고려된다.

- [0092] 폴리펩타이드를 접합하거나 연결하는 방법은 관련 기술 분야에 잘 알려져 있다. 항체와 표지 사이의 회합(결합)은 공유 및 비공유 상호작용, 화학적 결합 및 제조합 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 관련 기술 분야에 공지된 임의의 수단을 포함한다.
- [0093] 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 첨가와 같은 다양한 목적을 위해 관련 기술 분야에 공지된 기술을 사용하여 변형될 수 있다. PEG 변형(PEG화)은 순환 시간 개선, 용해도 개선, 단백질 분해에 대한 저항성 개선, 항원성 및 면역원성 감소, 생체이용률 개선, 독성 감소, 안정성 개선, 및 제제화 용이성 중 하나 이상을 유도할 수 있다(검토에 대해서는, 문헌 [Francis *et al.*, *International Journal of Hematology* 68:1-18, 1998] 참조).
- [0094] 순환 중인 항체 기반 융합 단백질의 반감기를 개선하는 다른 방법은 또한 예를 들어 각각 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제7,091,321호 및 제6,737,056호에 설명되는 바와 같이 공지되어 있다. 또한, 항체 및 그의 항원 결합 단편은 그의 복잡한 N-글리코사이드 연결 당 사슬에 푸코스를 함유하지 않도록 생산되거나 발현될 수 있다. 복잡한 N-글리코사이드 연결 당 사슬로부터 푸코스를 제거하면, 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC)을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 항체 및 항원 결합 단편의 이펙터 기능이 증가하는 것으로 알려져 있다. 이와 비슷하게, 헵신에 결합할 수 있는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 임의의 항체 이소형, 예를 들어 IgG, IgA, IgE, IgD 및 IgM 및 이소형 서브클래스, 특히 IgG1, IgG2b, IgG2a, IgG3 및 IgG4 중 임의의 것으로부터 유래된 면역글로불린 중쇄의 전부 또는 일부에 대해 그의 C-말단에서 부착될 수 있다.
- [0095] 헵신에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 또한 헵신의 정제 및/또는 샘플 또는 대상체에서 헵신 수준의 검출을 위해 사용될 수 있다. 본원에서 설명되는 항체 및 항원 결합 단편의 조성물은 비-치료제로서(예를 들어, 친화도 정제제로서) 사용될 수 있다. 일반적으로, 하나의 이러한 실시양태에서, 관심 단백질은 관련 기술 분야에 공지된 통상적인 방법을 사용하여 세파덱스(Sephadex) 수지 또는 여과지와 같은 고체 상에 고정된다. 고정된 단백질은 정제되는 관심 표적(또는 그의 단편)을 함유하는 샘플과 접촉되고, 이어서 지지체는 고정된 항체에 결합된 표적 단백질을 제외한 샘플 내의 실질적으로 모든 물질을 제거하는 적절한 용매로 세척된다. 최종적으로, 지지체는 표적 단백질을 방출하게 만드는 또 다른 적합한 용매, 예를 들어 글라이신 완충제(pH 5.0)으로 세척된다.
- [0096] 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 친화도 태그(예를 들어, 정제 태그)에 접합되거나 제조합 방식으로 조작될 수 있다. 예를 들어, 6x His 태그(His-His-His-His-His-His; 서열 번호 47)와 같은 친화도 태그는 관련 기술 분야에서 통상적인 것이다.
- [0097] 항체를 만드는 방법
- [0098] 본원에서 설명되는 항체는 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 숙주 동물의 면역화 경로 및 일정은 일반적으로 본원에서 추가로 설명되는 바와 같이 항체 자극 및 생산을 위한 확립되고 통상적인 기술에 따른다. 인간 및 마우스 항체의 생산을 위한 일반적인 기술은 관련 기술 분야에 공지되어 있으며, 본 명세서 및 하기 실시예에 기재되어 있다.

- [0099] 인간을 포함하는 임의의 포유동물 대상체 또는 이로부터 유래된 항체 생산 세포는 인간을 포함한 포유동물의 하이브리도마 세포주를 생산하기 위한 기초로서 작용하도록 조작될 수 있는 것이 고려된다. 전형적으로, 숙주 동물은 본원에서 설명되는 것을 포함하는 일정량의 면역원으로 복강 내로, 근육 내로, 경구로, 피하, 발바닥 내로 및/또는 피내로 접종된다.
- [0100] 이작용성 또는 유도체화제, 예를 들어 말레이미도벤조일 설포숙신이미드 에스테르(시스테인 잔기를 통한 접합), N-하이드록시숙신이미드(라이신 잔기를 통해), 글루타르알데하이드, 숙신산 무수물,  $\text{SOCl}_2$ , 또는 관련 기술 분야에 공지된 임의의 다른 면역보강제(adjuvant)를 사용하여 면역화되는 종에서 면역원성인 면역보강제, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 접합된 표적 아미노산 서열을 함유하는 인간 단백질 또는 단편으로 숙주 동물의 면역화하면, 항체 집단을 생성할 수 있다.
- [0101] 하이브리도마는 문헌 [Kohler, B. and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497]의 일반적인 체세포 혼성화 기술을 사용하거나 문헌 [Buck, D. W., *et al.*, *In Vitro*, 18:377-381 (1982)]에 의해 변형된 바와 같이 면역화된 동물 및 불멸화 골수종 세포의 림프구로부터 제조될 수 있다. X63-Ag8.653 및 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 솔크 인스티튜트, 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute, Cell Distribution Center)로부터 입수한 세포주를 포함하지만 이에 제한되지 않는 이용 가능한 골수종 세포주가 혼성화에 사용될 수 있다. 일반적으로, 이 기술은 폴리에틸렌 글리콜과 같은 융합촉진제(fusogen)를 사용하거나 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 전기적 수단을 사용하여 골수종 세포와 림프성 세포를 융합하는 것을 포함한다. 융합 후, 세포는 융합 배지에서 분리되고, 하이포크산틴-아미노프테린-티미딘(HAT) 배지와 같은 선택적 성장 배지에서 성장하여 혼성화되지 않은 모세포를 제거한다. 혈청으로 보충되거나 보충되지 않은, 본원에서 설명되는 임의의 배지가 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 배양하기 위해 사용할 수 있다. 세포 융합 기술에 대한 또 다른 대안으로서, EBV 불멸화 B 세포가 모노클로날 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 하이브리도마는 원하는 경우 확장 및 서브클로닝하고, 상청액을 통상적인 면역검정 절차(예를 들어, 방사선 면역검정, 효소 면역검정, 형광 면역검정 등)에 의해 항-면역원 활성화에 대해 검정한다.
- [0102] 항체의 공급원으로 사용될 수 있는 하이브리도마는 모노클로날 항체, 또는 그의 일부를 생산하는 모 하이브리도마의 모든 유도체, 자손체 세포를 포함한다.
- [0103] 이러한 항체를 생산하는 하이브리도마는 공지된 절차를 사용하여 시험관 내에서 또는 생체 내에서 성장할 수 있다. 모노클로날 항체는 원하는 경우 황산암모늄 침전, 겔 전기영동, 투석, 크로마토그래피 및 한외여과와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지 또는 체액으로부터 분리될 수 있다.
- [0104] 존재하는 경우 원하지 않는 활성은 예를 들어 고체상에 부착된 면역원으로 제조된 흡착제 상에서 제제를 이동시키고 면역원으로부터 원하는 항체를 용리 또는 방출함으로써 제거될 수 있다.
- [0105] 항체는 재조합 방식으로 만들어지고, 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 발현될 수 있다.
- [0106] 항체는 파지 디스플레이 기술에 의해 재조합 방식으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,565,332호; 제5,580,717호; 제5,733,743호; 및 제6,265,150호; 및 문헌 [Winter *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994)]을 참조한다. 대안적으로, 파지 디스플레이 기술(McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990))을 사용하여 면역화되지 않은 공여자로부터 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 시험관 내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생성할 수 있다. 이 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자는 M13 또는 fd와 같은 사상 박테리오파지의 주 또는 부 외피 단백질 유전자로 인-프레임으로 클로닝되고, 파지 입자의 표면에 기능성 항체 단편으로 디스플레이된다. 사상 입자는 파지 게놈의 단일 가닥 DNA 카피를 포함하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 또한 그러한 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자의 선택을 초래한다. 따라서, 파지는 B 세포의 일부 특성을 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 형식으로 수행될 수 있고, 검토를 위해 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology*, 3:564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 세그먼트의 여러 공급원을 파지 디스플레이에 사용할 수 있다. 문헌 [Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 다양한 항-옥사졸론 항체 어레이를 분리하였다. 면역화되지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리가 구축될 수 있고, 다양한 항원 어레이(자가 항원 포함)에 대한 항체가 본질적으로 문헌 [Mark *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 분리될 수 있다. 자연 면역 반응에서, 항체 유전자는 높은 비율로 돌연변이를 축적한다(체세포 과돌연변이). 도입된 변경 사항 중 일부는 보다 높은 친화도를 부여하고, 고친화도 표면 면역글로불린을 디스플레이

이하는 B 세포는 후속 항원 펙틴지 동안 우선적으로 복제되고 분화된다. 이 자연적인 과정은 "사슬 셔플링(chain shuffling)"으로 알려진 기술을 사용하여 모방할 수 있다(Marks, *et al.*, *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)). 이 방법에서, 파지 디스플레이에 의해 수득된 "1차" 인간 항체의 친화도는 중쇄 및 경쇄 V 영역 유전자를 번역화되지 않은 공여자로부터 수득된 V 도메인 유전자의 천연 발생 변이체(레퍼토리)의 레퍼토리로 순차적으로 대체함으로써 개선될 수 있다. 이 기술을 사용하면, pM-nM 범위의 친화도를 갖는 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다. 매우 큰 파지 항체 레퍼토리("모든 것의 어머니(mother-of-all) 라이브러리"로도 알려짐)를 만들기 위한 전략은 문헌 [Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993)]에 기재되어 있다. 유전자 셔플링은 또한 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도하기 위해 사용될 수 있으며, 여기서 인간 항체는 출발 설치류 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 각인(imprinting)"이라고도 하는 이 방법에 따르면, 파지 디스플레이 기술로 얻은 설치류 항체의 중쇄 또는 경쇄 V 도메인 유전자는 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어 설치류-인간 키메라를 생성한다. 항원에 대한 선택을 통해, 기능적 항원 결합 부위를 회복할 수 있는 인간 가변 영역을 단리할 수 있고, 즉 에피토프가 파트너 선택을 좌우(각인)한다. 남아있는 설치류 V 도메인을 대체하기 위해 이러한 과정을 반복하면, 인간 항체가 얻어진다(1993년 4월 1일 공개된 PCT 공개 WO 93/06213 참조). CDR 이식에 의한 설치류 항체의 전통적인 인간화와 달리, 이 기술은 설치류 기원의 프레임워크 또는 CDR 잔기가 없는 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0107] 모노클로날 항체를 인간화하기 위한 4가지의 일반적인 단계가 있다. 그 단계는 다음과 같다: (1) 시작 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오타이드 및 예측된 아미노산 서열의 결정, (2) 인간화 항체의 설계, 즉, 인간화 과정 동안 사용할 항체 프레임워크 영역의 결정, (3) 실제 인간화 방법/기술, 및 (4) 인간화 항체의 형질감염 및 발현. 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호; 제5,807,715호; 제5,866,692호; 제6,331,415호; 제5,530,101호; 제5,693,761호; 제5,693,762호; 제5,585,089호; 및 제6,180,370호를 참조한다.

[0108] 인간 불변 도메인에 융합된 설치류 또는 변형된 설치류 V 영역 및 그의 관련 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 키메라 항체를 포함하여, 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 항원 결합 부위를 포함하는 다수의 "인간화" 항체 분자가 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Winter *et al.* *Nature* 349:293-299 (1991)], [Lobuglio *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989)], [Shaw *et al.* *J. Immunol.* 138:4534-4538 (1987)], 및 [Brown *et al.* *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987)]을 참조한다.

[0109] 다른 참고문헌은 적절한 인간 항체 불변 도메인과 융합하기 전에 인간의 지지 프레임워크 영역(FR)에 이식된 설치류 CDR을 기술한다. 예를 들어, 문헌 [Riechmann *et al.* *Nature* 332:323-327 (1988)], [Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)], 및 [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986)]을 참조한다. 또 다른 참고문헌은 재조합 방식으로 구축된 설치류 프레임워크 영역에 의해 지지되는 설치류 CDR을 설명한다. 예를 들어, 유럽 특허 공개 제0519596호를 참조한다. 이러한 "인간화" 분자는 인간 수용자에서 모이머티의 치료적 적용의 기간 및 효과를 제한하는 설치류 항-인간 항체 분자에 대한 원치 않는 면역학적 반응을 최소화하도록 설계된다. 예를 들어, 항체 불변 영역은 면역학적으로 불활성화되도록 조작될 수 있다(예를 들어, 보체 용해를 촉발하지 않음). 예를 들어, PCT 공개 제WO 99/058572호; 및 영국 특허 출원 제9809951.8호를 참조한다.

[0110] 또한, 사용될 수 있는 항체를 인간화하는 다른 방법은 문헌 [Daugherty *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19:2471-2476 (1991)] 및 미국 특허 제6,180,377호; 제6,054,297호; 제5,997,867호; 제5,866,692호; 제6,210,671호; 및 제6,350,861호; 및 PCT 공개 제WO 01/27160호에 개시되어 있다.

[0111] 또 다른 대안에서, 완전한 인간 항체는 특정 인간 면역글로불린 단백질을 발현하도록 조작된 상업적으로 입수 가능한 마우스를 사용하여 얻을 수 있다. 보다 바람직한(예를 들어, 완전한 인간 항체) 또는 보다 강력한 면역 반응을 생성하도록 설계된 유전자 도입 동물은 또한 인간화 또는 인간 항체의 생성을 위해 사용될 수 있다. 이러한 기술의 예는 아브게닉스, 인크.(Abgenix, Inc., 미국 캘리포니아주 프레몬트 소재)의 XENOMOUSE™ 및 메다렉스, 인크.(Medarex, Inc., 미국 뉴저지주 프린스턴 소재)의 HUMAB-MOUSE® 및 TC MOUSE™이다.

[0112] 상기 논의가 인간화 항체에 관한 것이지만, 논의된 일반 원리는 예를 들어 개, 고양이, 영장류, 말 및 소에서 사용하기 위해 항체를 맞춤화하는데 적용 가능하다는 것이 명백할 것이다. 본원에서 설명되는 항체 인간화의 하나 이상의 측면, 예를 들어 CDR 이식, 프레임워크 돌연변이 및 CDR 돌연변이가 조합될 수 있다는 것이 또한 명백하다.

[0113] 원하는 경우, 관심 항체는 임의의 공지된 방법을 사용하여 서열결정될 수 있고, 이어서 폴리뉴클레오타이드 서열은 발현 또는 증식을 위해 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 관심 항체를 코딩하는 서열은 숙주 세포에서 벡터로 유지될 수 있고, 이후 숙주 세포는 확장되어 항원 사용을 위해 동결될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오타이드

드 서열은 항체를 "인간화"하거나 항체의 친화도 또는 기타 특성을 개선하기 위한 유전자 조작에 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체가 인간에 대한 임상 시험 및 치료에 사용되는 경우, 불변 영역은 면역 반응을 피하기 위해 인간 불변 영역과 더 유사하도록 조작될 수 있다.

[0114] 또한, 상기 임의의 항체 또는 폴리펩타이드를 제조하는 방법이 본원에서 제공된다. 본 발명의 항체는 관련 기술 분야에 알려진 임의의 통상적인 절차를 사용하여 제조될 수 있다. 폴리펩타이드는 항체의 단백질 분해 또는 다른 분해에 의해, 상기 설명한 바와 같은 재조합 방법(즉, 단일 또는 융합 폴리펩타이드)에 의해 또는 화학적 합성에 의해 생산될 수 있다. 항체의 폴리펩타이드, 특히 약 50개 아미노산 이하의 더 짧은 폴리펩타이드는 화학적 합성에 의해 편리하게 제조된다. 화학적 합성 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있으며, 상업적으로 입수 가능하다. 예를 들어, 항체는 고체상 방법을 사용하는 자동화된 폴리펩타이드 합성기에 의해 생산될 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,807,715호; 제4,816,567호; 및 제6,331,415호를 참조한다.

[0115] 항체는 먼저 숙주 동물로부터 항체 및 항체 생산 세포를 분리하고, 유전자 서열을 얻고, 유전자 서열을 사용하여 숙주 세포(예를 들어, CHO 세포)에서 항체를 재조합 방식으로 발현함으로써 재조합 방식으로 제조될 수 있다. 사용될 수 있는 또 다른 방법은 식물(예를 들어, 담배) 또는 유전자 도입 우유에서 항체 서열을 발현시키는 것이다. 식물 또는 우유에서 항체를 재조합 방식으로 발현시키는 방법이 문헌에 개시되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Peeters, *et al.* *Vaccine* 19:2756 (2001)]; [Lonberg, N. and D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65 (1995)]; 및 [Pollock, *et al.*, *J Immunol Methods* 231:147 (1999)]을 참조한다. 항체의 유도체, 예를 들어, 단일쇄 등을 제조하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다.

[0116] 본원에서 사용되는 바와 같이, "숙주 세포"는 폴리뉴클레오타이드 삽입체의 도입을 위한 벡터(들)의 수용자일 수 있거나 수용자였던 개별 세포 또는 세포 배양물을 포함한다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손체를 포함하며, 자손체는 자연적, 우발적 또는 고의적 돌연변이로 인해 원래의 모 세포와 반드시 완전히 동일한 것은 아닐 수 있다(형태 또는 게놈 DNA 상보체에서). 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(들)로 형질감염된 세포를 포함한다.

[0117] 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여(예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 쉽게 분리되고 서열결정될 수 있다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 작용할 수 있다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터(예를 들어, PCT 공개 제WO 87/04462호에 개시된 발현 벡터) 내에 배치될 수 있으며, 이는 이어서 재조합 숙주 세포에서 단일클론 항체를 합성하기 위해 이. 콜라이(*E. coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염된다. 예를 들어, PCT 공개 제WO 87/04462호를 참조한다. DNA는 또한 예를 들어, 상동 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인을 코딩하는 서열로 치환함으로써(Morrison *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851 (1984)), 또는 면역글로불린 코딩 서열에 비-면역글로불린 폴리펩타이드를 코딩하는 서열의 전부 또는 일부를 공유 연결함으로써 변형될 수 있다. 이러한 방식으로, 본원에서 설명되는 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.

[0118] 본원에서 사용되는 바와 같이, "벡터"는 숙주 세포에서 하나 이상의 관심 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달할 수 있고 바람직하게는 발현할 수 있는 구축물을 의미한다. 벡터의 예는 바이러스 벡터, 네이키드 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온성 축합제와 관련된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 특정 진핵 세포, 예를 들어 특정 생산자 세포를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0119] 본원에서 사용되는 바와 같이, "발현 제어 서열"은 핵산의 전사를 지시하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 제어 서열은 구성적 또는 유도성 프로모터와 같은 프로모터, 또는 인핸서일 수 있다. 발현 제어 서열은 전사되는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0120] 일부 경우에, 헵신에 대한 더 큰 친화도 및 헵신의 억제 및/또는 중화에 있어서 더 큰 효능을 얻기 위해 항체 서열을 유전적으로 조작하는 것이 바람직할 수 있다. 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 변화가 항체에 대해 이루어질 수 있고 여전히 헵신에 대한 그의 결합 능력을 유지할 수 있다는 것이 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0121] 발현 벡터는 항체의 발현을 지시하기 위해 사용될 수 있다. 통상의 기술자는 생체 내에서 외인성 단백질을 발현시키기 위한 발현 벡터의 투여에 대해 잘 알고 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,436,908호; 제6,413,942호; 및 제6,376,471호를 참조한다.

- [0122] 항체의 단일쇄 가변 영역 단편("scFv")이 본원에 기술되어 있다. 단일쇄 가변 영역 단편은 짧은 연결 펩타이드를 사용하여 경쇄 및/또는 중쇄 가변 영역을 연결함으로써 제조될 수 있다(Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426). 연결 펩타이드의 예는 한 가변 영역의 카르복시 말단과 다른 가변 영역의 아미노 말단 사이를 대략 3.5 nm 연결하는 (GGGGS)<sub>3</sub>(서열 번호 22)이다. 다른 서열의 링커가 설계 및 사용되었다(Bird *et al.* (Id)). 링커는 다시 약물의 부착 또는 고체 지지체에 대한 부착과 같은 추가의 기능을 위해 변형될 수 있다. 단일쇄 변이체는 재조합 방식으로 또는 합성에 의해 생성될 수 있다. scFv의 합성에 의한 생산을 위해, 자동 합성기를 사용할 수 있다. scFv의 재조합 생산을 위해, scFv를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 적합한 플라스미드는 효모, 식물, 곤충 또는 포유동물 세포와 같은 진핵생물 또는 이. 콜라이와 같은 원핵생물인 적합한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 관심 scFv를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드의 라이게이션과 같은 통상적인 조작으로 만들 수 있다. 생성되는 scFv는 관련 기술 분야에 공지된 표준 단백질 정제 기술을 사용하여 분리될 수 있다.
- [0123] 디아바디와 같은 다른 형태의 단일쇄 항체가 또한 포함된다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩타이드 사슬에서 발현되지만, 2개의 다른 사슬 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧아서 도메인이 또 다른 사슬의 상보성 도메인과 페어링하도록 강제하여 2개의 항원 결합 부위를 생성하는 링커를 사용하는 2가의 이중특이적 항체이다(예를 들어, 문헌 [Holliger, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]; 및 [Poljak, R. J., *et al.*, *Structure*, 2:1121-1123 (1994)] 참조).
- [0124] 예를 들어, 적어도 2개의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체인 이중특이적 항체는 본원에 개시된 항체를 사용하여 제조될 수 있다. 이중특이적 항체를 제조하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymology* 121:210] 참조). 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현을 기반으로 하며, 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다(Millstein and Cuello, 1983, *Nature*, 305, 537-539). 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(제2 결합 특이성을 제공함)으로 구성될 수 있다. 이중특이적 분자의 절반에만 면역글로불린 경쇄가 있는 이러한 비대칭 구조는 원하지 않는 면역글로불린 사슬 조합으로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 할 수 있다. 이 방법은 PCT 공개 제W0 94/04690호에 설명되어 있다.
- [0125] 이중특이적 항체를 제조하기 위한 한 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합이다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 포함하는 제1 중쇄 불변 영역(CH1)이 융합체 중 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및 원하는 경우 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별도의 발현 벡터에 삽입하고, 적합한 숙주 유기체에 공동으로 형질 감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3개의 폴리펩타이드 사슬의 균등하지 않은 비율이 최적의 수율을 제공할 때, 실시양태에서 3개의 폴리펩타이드 단편의 상호 비율을 조정하는 데 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 2개의 폴리펩타이드 사슬의 발현이 높은 수율을 초래하거나 비율이 특별한 의미가 없을 때, 하나의 발현 벡터에 2개 또는 3개의 모든 폴리펩타이드 사슬을 코딩하는 서열을 삽입하는 것이 가능하다.
- [0126] 2개의 공유 연결된 항체를 포함하는 이중접합체 항체도 본 발명의 범위 내에 있다. 이러한 항체는 면역계 세포를 원치 않는 세포로 표적화하기 위해 사용되어 왔다(미국 특허 제4,676,980호). 이중접합체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 사용하여 만들 수 있다. 적합한 가교결합제 및 기술은 미국 특허 제4,676,980호에 기재된 바와 같이 관련 기술 분야에 잘 알려져 있다.
- [0127] 키메라 또는 하이브리드 항체는 또한 가교결합제를 포함하는 합성 단백질 화학의 공지된 방법을 사용하여 시험관 내에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 디설파이드 교환 반응을 사용하거나 티오에테르 결합을 형성함으로써 구축될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 시약의 예에는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티리미데이트가 포함된다.
- [0128] 항-헵신 항체, 및 그의 항원 결합 단편은 헵신의 생물학적 활성의 감소, 개선 또는 중화가 검출 및/또는 측정되는 관련 기술 분야에 공지된 방법을 사용하여 확인 또는 특성화될 수 있다.
- [0129] 항체는 관련 기술 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 특성화될 수 있다. 예를 들어, 한 가지 방법은 항체가 결합하는 에피토프를 확인하는 것 또는 "에피토프 매핑"이다. 예를 들어 문헌 [Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Chapter 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

N.Y., 1999]에 기술된 바와 같이 항체-항원 복합체의 결정 구조 해결, 경쟁 검정, 유전자 단편 발현 검정 및 합성 펩타이드 기반 검정을 포함하는, 단백질 상의 에피토프의 위치를 매핑하고 특성화하기 위한 많은 방법이 관련 기술 분야에 알려져 있다. 추가의 예에서, 에피토프 매핑을 사용하여 항-헵신 항체가 결합하는 서열을 결정할 수 있다. 에피토프 매핑은 다양한 공급처, 예를 들어 펩스칸 시스템즈(Pepscan Systems, 네덜란드 8219 피에이치 펠리스타트 에델허트베크 15 소재)로부터 상업적으로 이용 가능하다. 에피토프는 선형 에피토프이거나, 즉, 단일 아미노산 스트레치에 함유되거나, 또는 단일 스트레치에 반드시 함유되는 것은 아닐 수 있는 아미노산의 3차원 상호작용에 의해 형성된 입체형대적 에피토프일 수 있다. 다양한 길이(예를 들어, 적어도 4-6개의 아미노산 길이)의 펩타이드가 단리되거나 합성될 수 있고(예를 들어, 재조합 방식으로), 항-헵신 항체와의 결합 검정에 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 항-헵신 항체가 결합하는 에피토프는 항-헵신 서열로부터 유래된 중첩 펩타이드를 사용하고 항-헵신 항체에 의한 결합을 결정함으로써 체계적인 스크리닝에서 결정될 수 있다. 유전자 단편 발현 분석에 따르면, 헵신을 인코딩하는 개방 관독 프레임은 무작위로 또는 특정 유전자 구성에 의해 단편화되고, 헵신의 발현된 단편과 시험되는 항체의 반응성이 결정된다. 유전자 단편은 예를 들어 PCR에 의해 생성된 다음, 방사성 아미노산의 존재 하에 시험관 내에서 전사되고, 단백질로 번역될 수 있다. 이어서, 방사성 표지된 헵신 단편에 대한 항체의 결합은 면역침전 및 겔 전기영동에 의해 결정된다. 특정 에피토프는 또한 표지 입자의 표면에 디스플레이되는 무작위 펩타이드 서열의 큰 라이브러리(표지 라이브러리)를 사용하여 확인할 수 있다. 대안적으로, 중첩 펩타이드 단편의 정의된 라이브러리는 단순 결합 검정에서 시험 항체에 대한 결합에 대해 시험될 수 있다. 추가의 예에서, 항원 결합 도메인의 돌연변이 유발, 도메인 스와핑 실험 및 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발은 에피토프 결합에 요구되는, 충분한 및/또는 필요한 잔기를 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, 도메인 스와핑 실험은 헵신 폴리펩타이드의 다양한 단편이 밀접하게 관련되지만 항원상 구별되는 단백질로부터의 서열로 대체된(스와핑된) 돌연변이체 헵신을 사용하여 수행될 수 있다. 돌연변이체 헵신에 대한 항체의 결합을 평가함으로써, 항체 결합에 대한 특정 헵신 단편의 중요성을 평가할 수 있다.

[0130] 항-헵신 항체를 특성화하기 위해 사용될 수 있는 또 다른 방법은 항-헵신 항체가 다른 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지의 여부를 결정하기 위해, 헵신 상의 동일한 항원에 결합하는 것으로 알려진 다른 항체, 즉 다양한 단편을 사용하는 경쟁 검정을 사용하는 것이다. 경쟁 검정은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[0131] 또한, 친화도 성숙 항체가 본원에서 제공된다. 예를 들어, 친화도 성숙 항체는 관련 기술 분야에 공지된 절차에 의해 생성될 수 있다([Marks *et al.*, 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783]; [Barbas *et al.*, 1994, *Proc Nat. Acad. Sci., USA* 91:3809-3813]; [Schier *et al.*, 1995, *Gene*, 169:147-155]; [Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunol.*, 155:1994-2004]; [Jackson *et al.*, 1995, *J. Immunol.*, 154(7):3310-9]; [Hawkins *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896]; 및 WO2004/058184).

[0132] 항체의 친화도를 조정하고 CDR을 특성화하기 위해 다음 방법을 사용할 수 있다. 항체의 CDR을 특성화하고/하거나 항체와 같은 폴리펩타이드의 결합 친화도를 변경(예를 들어, 개선)하는 한 가지 방법은 "라이브러리 스캐닝 돌연변이 유발"로 지칭된다. 일반적으로, 라이브러리 스캐닝 돌연변이 유발은 다음과 같이 이루어진다. CDR의 하나 이상의 아미노산 위치는 관련 기술 분야에 인정된 방법을 사용하여 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개)의 아미노산으로 교체된다. 이것은 클론의 작은 라이브러리(일부 실시양태에서는 분석되는 모든 아미노산 위치에 대해 하나씩)를 생성하며, 그 각각은 2개 이상의 구성원의 복잡성(2개 이상의 아미노산이 모든 위치에서 치환되는 경우)을 갖는다. 일반적으로, 라이브러리는 또한 천연(치환되지 않은) 아미노산을 포함하는 클론을 포함한다. 각각의 라이브러리로부터의 소수의 클론, 예를 들어 약 20-80개의 클론(라이브러리의 복잡성에 따라 다름)을 표적 폴리펩타이드(또는 다른 결합 표적)에 대한 결합 친화도에 대해 스크리닝하고, 증가된, 동일한, 감소된 결합 또는 비결합을 보이는 후보를 확인한다. 결합 친화도를 결정하는 방법은 관련 기술 분야에 잘 알려져 있다. 결합 친화도는 약 2배 이상의 결합 친화도 차이를 검출하는 Biacore 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용하여 결정할 수 있다. Biacore는 출발 항체가 이미 상대적으로 높은 친화도(예를 들어, 약 10 nM 이하의  $K_D$ )로 결합할 때 특히 유용하다.

[0133] 일부 실시양태에서, CDR의 모든 아미노산 위치는 관련 기술 분야에 인정된 돌연변이 유발 방법(그 일부는 본원에 기재됨)을 사용하여 20개의 모든 천연 아미노산으로 (일부 실시양태에서는 한 번에 하나씩) 대체된다. 이것은 클론의 작은 라이브러리(일부 실시양태에서는 분석되는 모든 아미노산 위치에 대해 하나씩)를 생성하며, 그 각각은 20개 구성원의 복잡성(20개의 모든 아미노산이 모든 위치에서 치환되는 경우)을 갖는다.

[0134] 일부 실시양태에서, 스크리닝되는 라이브러리는 2개 이상의 위치에 치환을 포함하며, 이는 동일한 CDR 또는 2개

이상의 CDR에 있을 수 있다. 따라서, 라이브러리는 하나의 CDR에서 2개 이상의 위치에 치환을 포함할 수 있다. 라이브러리는 2개 이상의 CDR에서 2개 이상의 위치에 치환을 포함할 수 있다. 라이브러리는 3개, 4개, 5개 또는 그 초과에 위치에 치환을 포함할 수 있으며, 상기 위치는 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR에서 발견된다. 낮은 중복성 코돈을 사용하여 치환을 제조할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Balint *et al.*, *Gene*, 137(1):109-18(1993)]의 표 2를 참조한다. CDR은 CDRH3 및/또는 CDRL3일 수 있다. CDR은 CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, 및/또는 CDRH3 중 하나 이상일 수 있다. CDR은 카바트 CDR, 코티아(Chothia) CDR, 또는 확장된 CDR일 수 있다.

[0135] 개선된 결합을 갖는 후보는 서열결정될 수 있고, 이에 의해 개선된 친화도(또한 "개선된" 치환으로 지칭됨)를 초래하는 CDR 치환 돌연변이체를 확인할 수 있다. 결합하는 후보는 또한 서열결정되어 결합을 유지하는 CDR 치환을 확인할 수 있다.

[0136] 여러 라운드의 스크리닝을 수행할 수 있다. 예를 들어, 개선된 결합을 갖는 후보들(각각 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함함)은 각각의 개선된 CDR 위치(즉, 치환 돌연변이체가 개선된 결합을 나타내는 CDR 내의 아미노산 위치)에서 적어도 원래의 및 치환된 아미노산을 함유하는 제2 라이브러리의 설계에 유용하다. 이 라이브러리의 제조, 스크리닝 또는 선택은 아래에서 더 자세히 논의된다.

[0137] 라이브러리 스캐닝 돌연변이 유발은 또한 개선된 결합, 동일한 결합, 감소된 결합 또는 결합이 없는 클론의 빈도가 또한 항체-항원 복합체의 안정성에 대한 각각의 아미노산 위치의 중요성에 관한 정보를 제공하는 한, CDR을 특성화하기 위한 수단을 제공한다. 예를 들어, CDR의 위치가 20개의 모든 아미노산으로 변경되었을 때 결합을 유지하는 경우, 해당 위치는 항원 결합에 필요하지 않을 것으로 보이는 위치로 확인된다. 이와 반대로, CDR의 위치가 단지 적은 비율의 치환에서만 결합을 유지한다면, 그 위치는 CDR 기능에 중요한 위치로 확인된다. 따라서, 라이브러리 스캐닝 돌연변이 유발 방법은 많은 상이한 아미노산(20개의 모든 아미노산 포함)으로 변경될 수 있는 CDR 내의 위치, 및 변경될 수 없거나 단지 몇몇 아미노산으로만 변경될 수 있는 CDR 내의 위치에 대한 정보를 생성한다.

[0138] 개선된 친화도를 갖는 후보는 해당 위치에서 개선된 아미노산을 포함하는 두 번째 라이브러리에서 결합될 수 있으며, 이는 원하는 스크리닝 또는 선택 방법을 사용하여 요구되거나 허용되는 라이브러리의 복잡성에 따라 해당 위치에 추가의 치환을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 원하는 경우, 인접한 아미노산 위치를 적어도 2개 이상의 아미노산으로 무작위화할 수 있다. 인접한 아미노산의 무작위화는 돌연변이체 CDR에서 추가의 입체형태적 유연성을 허용할 수 있으며, 이는 다시 더 많은 수의 개선 돌연변이의 도입을 허용하거나 촉진할 수 있다. 또한, 라이브러리는 첫 번째 스크리닝 라운드에서 개선된 친화도를 나타내지 않은 위치에 치환을 포함할 수 있다.

[0139] 제2 라이브러리는 Biacore 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용한 스크리닝, 및 파지 디스플레이, 효모 디스플레이 및 리보솜 디스플레이를 비롯하여 선택을 위해 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법을 사용한 선택을 포함하는, 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 개선된 및/또는 변경된 결합 친화도를 갖는 라이브러리 구성원에 대해 스크리닝 또는 선택된다.

[0140] 예시적인 항-헵신 항체 아미노산 서열

[0141] 한 측면에서, 본 개시내용은 순환 헵신 또는 순환 헵신의 c-말단에 선택적으로 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 본원에서 설명되는 항-헵신 항체는 일부 경우에 세린 프로테아제인 매트릭파제, KLK6, KLK7, 및 KLK8에 선택적으로 결합하지 않는다. 아래에서 제공되는 예시적인 VH 및 VL 서열에서, 신호 서열은 최종 가변 영역 서열에 포함되지 않는 것으로 이해될 것이다.

[0142] 한 측면에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1, 2, 및 3 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 항체는 모 항체의 항원(예를 들어, 암 관련 항원)과 동일한 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 1, 2 및 3 중 어느 하나의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서(예를 들어, FR에서)에서 발생한다. 선택적으로, 항체는 서열 번호 1, 2, 및 3 중 어느 하나의 아미노산 서열의 VH 서열(해당 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 특정 실시양태에서, VH는 (a) 서열 번호 16, 18, 및 19 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2,

및 (c) 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3 개의 CDR을 포함한다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 코티아 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 마틴(Martin) 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 카바트 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 AHo 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 IMGT 넘버링에 의해 정의된다.

[0143] 한 측면에서, 서열 번호 4 또는 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일부 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 모 항체의 항원(예를 들어, 암 관련 항원)과 동일한 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 4 또는 5의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서(예를 들어, FR에서)에서 발생한다. 선택적으로, 항체는 서열 번호 4 또는 5의 VL 서열(해당 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 특정 실시양태에서, VL은 (a) 서열 번호 17 또는 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호 12 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (c) 서열 번호 7 또는 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함한다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 코티아 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 마틴 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 카바트 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 AHo 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 IMGT 넘버링에 의해 정의된다.

[0144] 한 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH, 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 VH 및 VL을 포함하고, 여기서 VH는 서열 번호 1, 2, 및 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열 번호 4 또는 5의 아미노산 서열을 포함하며, 선택적으로 이들 서열의 번역후 변형을 포함한다.

[0145] 한 측면에서, 표 1의 임의의 VH로부터 선택된 VH를 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 한 측면에서, 표 1의 임의의 VL로부터 선택된 VL을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 한 측면에서, 표 1의 임의의 VH로부터 선택된 VH 및 표 1의 임의의 VL로부터 선택된 VL을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 선택된 VH 및 선택된 VL은 표 5에 따라 쌍을 이룬다. 한 측면에서, 표 2의 임의의 CDR-H3으로부터 선택된 CDR-H3 및 표 2의 임의의 CDR-L3으로부터 선택된 CDR-L3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 선택된 CDR-H3 및 CDR-L3은 표 5에 따라 쌍을 이룬다. 한 측면에서, 표 2의 임의의 CDR-H2로부터 선택된 CDR-H2 및 표 2의 임의의 CDR-L2로부터 선택된 CDR-L2를 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 선택된 CDR-H2 및 CDR-L2는 표 5에 따라 쌍을 이룬다. 한 측면에서, 표 2의 임의의 CDR-H1로부터 선택된 CDR-H1 및 표 2의 임의의 CDR-L1로부터 선택된 CDR-L1을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 선택된 CDR-H1 및 CDR-L1은 표 5에 따라 쌍을 이룬다. 한 측면에서, 표 2의 임의의 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3으로부터 선택된 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3 및 표 2의 임의의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로부터 선택된 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 선택된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3은 표 5에 따라 쌍을 이룬다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 코티아 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 마틴 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 카바트 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 AHo 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-H1, CDR-H2, 및/또는 CDR-H3의 아미노산은 IMGT 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 코티아 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 마틴 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 카바트 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 AHo 넘버링에 의해 정의된다. 특정 실시양태에서, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3의 아미노산은 IMGT 넘

버링에 의해 정의된다.

- [0146] H2a
- [0147] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH, (b) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL, 및 (c) 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0148] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (f) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0149] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; 및 (c) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; 및 (d) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VH CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0150] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (c) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3; 및 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VL CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0151] 한 측면에서, 본 개시내용은 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3의 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0152] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (c) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VL CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; 및 (c) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VH CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0153] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (f) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3의 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0154] 한 측면에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 1의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서(예를 들어, FR에서)에서 발생한다. 선택적으로, 항체는 서열 번호 1의 아미노산 서열의 VH 서열(해당 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 특정 실시양태에서, VH는 (a) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함한다.
- [0155] 한 측면에서, 서열 번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일부 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 4의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서(예를 들어, FR에서)에서 발생한다. 선택적으로, 항체는 서열 번호 4의 VL 서

열(해당 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 특정 실시양태에서, VL은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (c) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함한다.

[0156] 한 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH, 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 4의 VL 서열을 포함하고, 이들 서열의 번역후 변형을 포함한다.

[0157] H2b

[0158] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH, (b) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL, 및 (c) 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0159] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (f) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0160] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; 및 (c) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; 및 (d) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VL로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VH CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0161] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (c) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3; 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VL CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0162] 한 측면에서, 본 개시내용은 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3의 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0163] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (c) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VL CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; 및 (c) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VH CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0164] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (f) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3의 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0165] 한 측면에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 2의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서(예를 들어, FR에서)에서 발생한다. 선택적으로, 항체는 서열 번호 2의 아미노산 서열의 VH 서열(해당 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 특정 실시양태에서, VH는 (a) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함한다.

[0166] 한 측면에서, 서열 번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일부 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 4의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서(예를 들어, FR에서)에서 발생한다. 선택적으로, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 4의 VL 서열(해당 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 특정 실시양태에서, VL은 (a) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (c) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함한다.

[0167] 한 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH, 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 4의 VL 서열을 포함하고, 이들 서열의 번역후 변형을 포함한다.

[0168] H5

[0169] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH, (b) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나 또는 둘 모두의 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0170] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (f) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0171] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; 및 (c) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; 및 (d) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VH CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0172] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (b) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (c) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3; 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VL CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0173] 한 측면에서, 본 개시내용은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3의 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0174] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (b) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (c) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VL CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; 및 (c) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VH CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0175] 한 측면에서, 본 개시내용은 (a) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1; (b) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2; (c) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3; (d) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2; 및 (f) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3의 CDR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0176] 한 측면에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 3의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은

CDR 외부의 영역에서(예를 들어, FR에서)에서 발생한다. 선택적으로, 항체는 서열 번호 3의 아미노산 서열의 VH 서열(해당 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 특정 실시양태에서, VH는 (a) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함한다.

[0177] 한 측면에서, 서열 번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일부 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 해당 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 5의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서(예를 들어, FR에서)에서 발생한다. 선택적으로, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 번호 5의 VL 서열(해당 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 특정 실시양태에서, VL은 (a) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (c) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 CDR을 포함한다.

[0178] 한 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH, 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 5의 VL 서열을 포함하고, 이들 서열의 번역후 변형을 포함한다.

[0179] 예시적인 핵산 서열

[0180] 본 개시내용은 항체 폴리펩타이드 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 항체의 중쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 표 3, 4 및 6을 참조한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 21, 22, 및 23 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 항체의 경쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 24 또는 25 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 가변 중쇄의 CDR1 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 가변 중쇄의 CDR2 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 가변 중쇄의 CDR3 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 가변 중쇄의 CDR1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 16, 18, 및 19 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 가변 중쇄의 CDR2 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 가변 중쇄의 CDR3 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 가변 경쇄의 CDR1 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 가변 경쇄의 CDR2 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 가변 경쇄의 CDR3 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 가변 경쇄 폴리펩타이드의 CDR1 영역을 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 17 및 20 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 가변 경쇄 폴리펩타이드의 CDR2 영역을 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 12 및 15 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 가변 경쇄 폴리펩타이드의 CDR3 영역을 코딩하는 핵산 서열은 서열 번호 7 및 10 중 어느 하나로부터 선택된다.

[0181] 항체를 생산하는 예시적인 방법

[0182] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 핵신의 단리된 c-말단 부분에 대해 동물을 핵신으로 면역화함으로써 생성된 하이브리도마를 스크리닝하는 것을 포함하는, 순환 핵신에 선택적으로 결합하는 항체를 생산하는 방법을 제공한다.

[0183] 일부 예에서, 항체는 (a) 하이브리도마를 제조하는 단계(예를 들어, 막형단 부분(예를 들어, 야생형 핵신의)이 결합된 재조합 핵신 서열로 면역화된 설치류로부터); (b) 개체(예를 들어, (상피)암으로 진단된)로부터 얻은 혈청에 대해 (a)의 하이브리도마를 스크리닝하는 단계; 및 (c) 순환하는(또는 세포외) 핵신에 특이적으로 결합하는 (b)의 하이브리도마를 단리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0184] 일부 예에서, 항체는 (a) 하이브리도마를 제조하는 단계(예를 들어, 막형단 부분(예를 들어, 야생형 핵신의)이 결합된 재조합 핵신 서열로 면역화된 설치류로부터); (b) 개체(예를 들어, (상피)암으로 진단된)로부터 얻은 혈청에 대해 (a)의 하이브리도마를 스크리닝하는 단계; (c) 세포외 핵신에 특이적으로 결합하는 (b)의 하이브리도

마를 분리하는 단계; (d) 생물학적 활성의 제조합 세포의 헵신에 대해 (c)의 하이브리도마를 스크리닝하는 단계; 및 (e) 헵신의 세포의 순환하는 c-말단 부분에 특이적으로 결합하는 (d)의 하이브리도마를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

- [0185] 일부 예에서, 본원에서 설명되는 항체를 제조하기 위해 이용되는 헵신은 인간 헵신을 포함한다. 상기 방법의 일부 예에서, 생물학적 활성의 제조합 세포의 헵신은 트롬빈 절단 부위 및 선택적으로 스페이서를 추가로 포함한다. 일부 예에서 상기 방법의 순환 헵신은 서열 번호 44의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 예에서, 상기 방법에서 이용되는 야생형 인간 헵신은 서열 번호 41의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0186] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 서열 번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 제조합 헵신 서열에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 일부 경우에, 결합은 선택적이다.
- [0187] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 청구항 중 어느 한 항의 항체 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0188] 조성물 및 키트
- [0189] 본원에서 설명되는 항체는 저장을 위해 동결건조된 형태 또는 수용액으로 제조될 수 있다. 동결건조된 항체는 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 하나 이상의 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 사용을 위해 재구성될 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 일반적으로 무독성이며, 다음을 포함할 수 있다: 완충제, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산; 염, 예를 들어 염화나트륨; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG). 이러한 물질 중 하나 이상은 보관시 항체의 반감기를 연장할 수 있다.
- [0190] 헵신에 결합하고 본원의 다른 곳에서 기술된 것을 포함하는 항체 및 그의 항원 결합 단편의 조성물이 본원에서 제공된다. 본원에서 설명되는 바와 같은 헵신에 결합하는 항체 및 그의 항원 결합 단편은 아래에서 설명되는 다양한 형태의 암의 진단에 사용될 수 있다.
- [0191] 또한, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 키트가 본원에서 제공된다. 키트는 본 명세서에서 설명되는 항-헵신 항체를 포함하는 하나 이상의 용기 및 본 명세서에서 설명되는 임의의 방법에 따라 사용하기 위한 사용 설명서를 포함할 수 있다. 일반적으로, 이러한 사용 설명서는 본원에서 설명되는 임의의 방법에 따라 암을 진단하기 위한 항-헵신 항체의 투여에 대한 설명을 포함한다.
- [0192] 용기는 본원에서 설명되는 항체를 함유하는 단일 단위 또는 다중 단위의 용기일 수 있다. 본 발명의 키트에 제공되는 사용 설명서는 일반적으로 라벨 또는 포장 삽입물(예를 들어, 키트에 포함된 종이 시트)에 작성된 사용 설명서이지만, 기계 판독 가능 사용 설명서(예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크에 포함된 사용 설명서)가 또한 허용 가능하다.
- [0193] 라벨 또는 포장 삽입물은 항체가 예를 들어 전립선암, 난소암 또는 암종과 같은 암을 진단하기 위해 사용됨을 나타낸다. 한 예에서, 암은 난소암이다. 또 다른 예에서, 암은 전립선암이다. 또 다른 예에서, 암은 암종이다. 암종의 비제한적인 예는 신세포 암종(RCC) 또는 전이성 신세포 암종을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 본원에서 설명되는 방법 중 하나를 실행하기 위한 사용 설명서가 제공될 수 있다.
- [0194] 키트는 적절한 포장으로 제공될 수 있다. 적합한 포장재에는 바이알, 병, 단지, 가요성 포장재(예를 들어, 밀봉된 Mylar 또는 플라스틱 백) 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 키트는 선택적으로 동결건조된 항체의 재구성을 위한 완충제와 같은 추가의 성분 및 해석 정보를 제공할 수 있다. 일반적으로, 키트는 용기, 및 용기 위의 또는 용기와 결합된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다.
- [0195] 진단 방법
- [0196] 본 개시내용의 한 측면은 대상체에서 상승된 수준의 헵신과 관련된 장애의 진단에 관한 것이다. 본원의 방법에

의해 진단되는 "개체" 또는 "대상체"는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간일 수 있다. 또한, 포유동물에는 영장류, 말, 소, 알파카, 개, 고양이, 토끼, 마우스 및 래트가 포함되지만 이에 제한되지 않는, 농장 동물, 스포츠 동물, 애완동물이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0197] 한 예에서, 상승된 수준의 헵신과 관련된 장애는 암 또는 종양이다. 용어 "암" 및 "종양"은 (동일한 유형의 정상 조직에 의한 발현과 비교하여) 암 조직을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 종양에는 고형 종양(암) 및 반고형 종양(암)이 포함될 수 있다. 종양(암)은 또한 일부 경우에 전이성일 수 있다. 한 예에서, 종양 또는 암은 상피암이다. 종양(암)의 예는 전립선암, 난소암 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 상피 종양(암)의 다른 예에는 암종, 선암종, 또는 이들의 조합이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 한 예에서, 암은 난소암이다. 또 다른 예에서, 암은 전립선암이다. 또 다른 예에서, 암은 암종이다. 암종의 비제한적인 예는 신세포 암종(RCC) 또는 전이성 신세포 암종을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0198] 평가는 예를 들어 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플을 시험하는 것과 같은 객관적인 측정을 기초로 하여 수행될 수 있다. 추가의 유형의 평가는 아래에 설명되어 있다. 평가는 또한 대상체의 증상의 특성화와 같은 주관적인 측정을 기초로 하여 수행될 수 있다.

[0199] 본 개시내용의 한 측면은 생물학적 샘플에서 순환 헵신의 존재를 확인하는 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 생물학적 샘플(예를 들어, 개체, 예를 들어, 암이 존재하는 것으로 의심되거나 암 위험이 있는 개체로부터 얻은)을 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체(예를 들어, 본 명세서에서 설명되는 항체)와 접촉시키는 단계; 및 (b) 순환 헵신이 생물학적 샘플에 존재하는지의 여부를 결정하는 단계(예를 들어, 순환 헵신의 양이 증가되었는지의 여부를 결정하는 단계)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 순환 헵신에 특이적으로 결합하는 항체는 (1) 가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(여기서, CDR-H1은 서열 번호 16, 18 및 19 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H2는 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H3은 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함함); 및/또는 (2) 가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(여기서, CDR-L1은 서열 번호 17 및 20 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L2는 서열 번호 12 및 15 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L3은 서열 번호 7 및 10 중 어느 하나로부터 선택되는 재구성된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함함)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체는 (1) 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(여기서, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHO 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의됨); 및/또는 (2) 서열 번호 4-5 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(여기서, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHO 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의됨)을 포함한다.

[0200] 본원에서 사용되는 바와 같이, "생물학적 샘플"은 생물체 또는 이전에 살았던 생물체, 예를 들어 인간, 마우스, 래트, 원숭이, 개, 토끼 및 기타 동물로부터의 임의의 양의 물질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 샘플에는 혈액(또는 비조직) 샘플(예를 들어, 전혈, 혈청, 소변 등), 세포, 기관, 조직 및 이들의 조합이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 예에서, 생물학적 샘플은 본원에서 설명되는 진단 방법에 사용하기 전에 처리되거나 변형된다. 예를 들어, 헤파린을 혈액 샘플에 첨가하고, 혈청을 수집할 수 있다. 샘플이 조직 샘플인 경우, 조직 주변의 유체를 수집하여 사용하거나, 조직 샘플을 본원에서 설명되는 진단 방법에 사용하기 전에 완충 용액에서 균질화할 수 있다.

[0201] 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), ELISPOT, 면역조직화학(IHC), 멀티플렉스 및/또는 미세유체 플랫폼용 마이크로비드에 대한 항체 적응을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 검정이 설명된 진단 방법에 사용될 수 있다.

[0202] 한 측면에서, 순환 헵신에 결합하는 검출 가능하게 표지된 항체는 샘플 내의 순환 헵신의 검출에 유용하다. 따라서, 일부 실시양태에서, 순환 헵신 검출가능 모이어티에 결합하는 항체는 형광 표지, 효소, 콜로이드상 금속, 자성 입자, 및 라텍스 비드로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0203] 한 측면에서, 순환 헵신의 검출은 현장 진료 분석을 제공하는 측방 유동 검정 장치를 사용하여 달성될 수 있다. 특정 예에서, 측방 유동 검정의 사용은 샘플 내의 순환 헵신의 효과적인 검출을 제공한다. 특정 예에서, 측방 유동 검정 장치는 샘플과 같은 유체를 수용하는 임의의 장치를 말하며, 샘플이 그를 통해 모세관 힘 또는 다른 적용된 힘의 영향 하에 횡단하는, 다양한 시약(예를 들어, 순환 헵신에 결합하는 항체)을 지지하기 위한 다양한 부위 또는 대역이 그를 따라 제공되는 측방으로 배치되는 유체 수송 또는 유동 경로를 포함하고, 여기서 적어도

하나의 관심 분석물의 검출을 위해 측방 유동 검정이 수행된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 샘플은 순환 헤파에 결합하는 검출 가능한 항체를 포함하는 제1 대역 및 순환 헤파에 결합된 검출 가능한 항체의 검출을 위한 제2 대역을 갖는 막 상에 로딩되며, 여기서 모세관력에 의해 샘플이 제1 대역 및 제2 대역의 검출 가능한 항체와 접촉하게 된다. 샘플이 순환 헤파를 포함하는 경우, 제1 대역의 검출 가능한 항체는 순환 헤파에 결합하고, 제2 대역에서 검출될 것이다. 따라서, 본 명세서에서 설명되는 바와 같이, 순환 헤파에 결합하는 항체를 포함하는 측방 유동 검정 장치 또는 조성물이 추가로 본원에서 제공된다. 또한, 순환 헤파를 검출하는 방법에 사용하기 위한 측방 유동 검정 장치 또는 조성물이 제공되며, 여기서 측방 유동 검정 장치 또는 조성물은 순환 헤파에 결합하는 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 순환 헤파에 결합하는 항체를 샘플과 접촉시키는 단계, 및 순환 헤파에 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함한다. 특정 예에서, 본원에서 설명되는 순환 헤파에 결합하는 항체의 장점은 측방 유동 검정 장치 또는 조성물을 통해 샘플 내의 순환 헤파의 효과적인 검출을 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, 측방 유동 검정 장치 또는 조성물은 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL, 500 ng/mL 또는 이를 초과하는 값보다 더 큰 검출 한계를 제공하도록 구성된다.

[0204] 이러한 진단 방법 중 일부에서, 방법은 대상체(예를 들어, 암이 의심되거나 암 위험이 있는 대상체)에서 암의 존재 또는 암의 발병 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 진단 방법 중 일부에서, 방법은 대상체(예를 들어, 재발 위험이 있는 것으로 의심되는 대상체)에서 암의 재발 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 진단 방법 중 일부에서, 방법은 개체(예를 들어, 재발 위험이 있는 것으로 의심되는 개체)에서 암의 전이 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[0205] 본원에서 설명되는 진단 방법을 사용하여 검출되는 암은 상피암을 포함한다. 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 진단되는 상피암은 난소암, 전립선암, 암종 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 한 예에서, 암은 난소암이다. 또 다른 예에서, 암은 전립선암이다. 또 다른 예에서, 암은 암종이다. 암종의 비제한적인 예는 신세포 암종(RCC) 또는 전이성 신세포 암종을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

#### [0206] 치료 방법

[0207] 본 개시내용의 한 측면은 순환 헤파의 상승된 수준과 관련된 장애의 치료에 관한 것이다. 본원의 방법에 의해 치료되는 "개체" 또는 "대상체"는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간일 수 있다. 포유동물에는 영장류, 말, 소, 알파카, 개, 고양이, 토끼, 마우스 및 래트가 포함되지만 이에 제한되지 않는, 농장 동물, 스포츠 동물, 및 애완동물이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. "이를 필요로 하는 대상체"는 순환 헤파의 상승된 수준과 관련된 장애로 고통받을 수 있는 대상체임이 이해될 것이다.

[0208] 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에서 설명되는 약제학적 조성물의 "치료 유효 투여량" 또는 "치료 유효량"은 대상체에서 유익하거나 원하는 결과를 초래하기에 충분한 양이다. 유익하거나 원하는 결과에는 장애의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동적 증상, 장애의 발달 동안 나타나는 합병증 및 중간 병리학적 표현형을 비롯하여 장애의 중증도를 감소시키거나 장애의 진행을 지연시키는 것과 같은 결과가 포함된다.

[0209] 임상 측면에서 이해되는 바와 같이, 약제학적 조성물의 유효 투여량은 또 다른 약물, 화합물 또는 약제학적 조성물과 함께 달성되거나 달성되지 않을 수 있다. 따라서, "유효 투여량"은 하나 이상의 치료제를 투여하는 맥락에서 고려될 수 있으며, 하나 이상의 다른 치료제와 함께 원하는 결과가 달성될 수 있거나 달성된다면, 단일 치료제가 유효량으로 제공되는 것으로 고려될 수 있다. 따라서, 일부 경우에, 하나 이상의 치료제가 대상체에게 투여될 수 있다. 다른 경우에, 본원에서 설명되는 약제학적 조성물을 사용한 치료는 본원에서 설명되는 하나 이상의 다른 치료 방식 이전에 또는 이후에 수행된다.

[0210] 항-헤파 항체의 다양한 제제가 투여를 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-헤파 항체는 순수한 형태로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-헤파 항체 및 약제학적으로 허용되는 부형제는 다양한 제제로 존재할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 부형제는 관련 기술 분야에 공지되어 있으며, 약리학적으로 유효한 물질의 투여를 용이하게 하는 비교적 불활성인 물질을 포함한다. 예를 들어, 부형제는 형태 또는 일관성을 제공하거나, 희석제 역할을 수행할 수 있다. 적합한 부형제는 안정화제, 습윤제 및 유화제, 삼투압 농도를 변화시키기 위한 염, 캡슐화제, 완충제, 및 피부 침투 증강제를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 비경구 및 비경구 외의 약물 전달을 위한 제제 및 부형제는 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)]에 제시되어 있다.

[0211] 항체는 임의의 적합한 수단에 의한 투여용으로 제제화될 수 있다. 특정 투여 요법, 즉, 투여량, 시기 및 반복은 특정 개체 및 그 개체의 병력에 따라 달라질 것이다. 일부 경우에, 이들 항체는 주사(예를 들어, 정맥내, 복강

내, 피하, 근육내 등의)에 의한 투여를 위해 제제화된다. 따라서, 이들 항체는 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액 등과 같은 약제학적으로 허용되는 비히클과 조합될 수 있다. 다른 경우에, 항체는 또한 흡입을 통해 투여될 수 있다.

[0212] 일반적으로, 항-헵신 항체의 투여를 위한 초기 투여량은 약 2 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 전형적인 1일 투여량은 위에서 언급된 요인에 따라 최대 3  $\mu$ g/kg, 최대 약 30  $\mu$ g/kg, 최대 약 300  $\mu$ g/kg, 최대 약 3 mg/kg, 최대 30 mg/kg, 최대 100 mg/kg 또는 그 초과, 또는 그 사이의 임의의 정수일 수 있다. 예를 들어, 약 1 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 또는 약 25 mg/kg의 투여량이 사용될 수 있다. 며칠 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우, 상태에 따라 원하는 증상 억제가 발생할 때까지 또는 예를 들어 통증을 감소시키기에 충분한 치료 수준에 도달할 때까지 치료가 지속된다. 예시적인 투여 요법은 항-헵신 항체의 약 2 mg/kg의 초기 용량을 투여한 후, 매주 약 1 mg/kg의 유지 용량을 투여하거나, 격주로 약 1 mg/kg의 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다.

[0213] 그러나, 의사가 달성하고자 하는 약동학적 붕괴의 패턴에 따라 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 주당 1 내지 4회의 투여가 고려된다. 이 요법의 진행 상황은 통상적인 기술 및 검정에 의해 쉽게 모니터링할 수 있다. 투여 요법은 시간이 지남에 따라 달라질 수 있다. 항-헵신 항체의 적절한 투여량은 사용되는 항-헵신 항체, 치료되는 암의 유형 및 병기, 이전의 수술 및/또는 요법, 대상체의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 담당 주치의의 판단에 따라 결정될 것이다. 일반적으로, 임상적으론 원하는 결과를 얻을 수 있는 투여량에 도달할 때까지 항-헵신 항체를 투여할 것이다. 용량 및/또는 빈도는 치료 과정에 걸쳐 달라질 수 있다.

[0214] 반감기와 같은 경험적 고려 사항은 일반적으로 투여량의 결정에 기여할 것이다. 예를 들어, 인간화 항체 또는 완전한 인간 항체와 같은, 인간 면역계와 양립할 수 있는 항체를 사용하여 항체의 반감기를 연장하고 항체가 숙주의 면역계에 의해 공격받는 것을 방지할 수 있다.

[0215] 투여 빈도는 치료 과정에 걸쳐 결정되고 조정될 수 있다. 대안적으로, 항-헵신 항체의 지속 방출 제제가 적절할 수 있다. 지속 방출을 달성하기 위한 다양한 제제 및 장치가 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 항-헵신 항체의 효능을 평가하기 위해, 질병의 지표를 따를 수 있다.

[0216] 치료는 예를 들어 하나 이상의 증상의 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 20배, 약 50배, 또는 그 사이의 임의의 배수의 감소를 포함한다. 이와 유사하게, 치료는 하나 이상의 증상의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 100%, 또는 그 사이의 임의의 백분율의 감소를 포함할 수 있다.

[0217] 본 개시내용의 한 측면은 본원에서 설명되는 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 상승된 수준의 순환 헵신과 관련된 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0218] 본 개시내용의 또 다른 측면은 본원에서 설명되는 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 고헵신혈증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 순환 헵신에 특이적으로 결합하는 항체는 (1) 가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(여기서, CDR-H1은 서열 번호 16, 18 및 19 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H2는 서열 번호 11, 13, 및 14 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-H3은 서열 번호 6, 8, 및 9 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함함); 및/또는 (2) 가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(여기서, CDR-L1은 서열 번호 17 및 20 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L2는 서열 번호 12 및 15 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함하고, CDR-L3은 서열 번호 7 및 10 중 어느 하나로부터 선택되는 재구축된 폴리펩타이드 컨센서스 서열을 포함함)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 순환 헵신에 선택적으로 결합하는 항체는 (1) 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 중쇄 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(여기서, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의됨); 및/또는 (2) 서열 번호 4-5 중 어느 하나로부터 선택되는 가변 경쇄 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(여기서, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3은 코티아 넘버링, 마틴 넘버링, 카바트 넘버링, AHo 넘버링 또는 IMGT 넘버링에 의해 정의됨)을 포함한다.

[0219] 장애의 하나 이상의 증상이 부분적으로 또는 완전히 해소될 때까지 치료를 계속한다.

[0220] 예시적인 서열

[0221] 가변 중쇄, 가변 경쇄, 및 이들의 상응하는 CDR의 예시적인 아미노산 및 핵산 서열이 아래에 제공된다.

표 1은 가변 중쇄 (VH)의 예시적인 아미노산 서열 및 가변 경쇄 (VL)의 예시적인 아미노산 서열을 제시한다.

| 명칭 | 사슬  | SEQ ID No | 아미노산 서열                                                                                                                                                                                                                     |
|----|-----|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| H2 | VH1 | 1         | 신호 펩타이드-FR1- <u>CDR1</u> -FR2- <u>CDR2</u> -FR3- <u>CDR3</u> -FR4<br>MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGDFN <u>K</u><br>YWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDGSTIIYTPSLKDKFIISRDNARNTLY<br>LQMSKVRSEDTALYYCARRANWYYFDYWGGQTTLTVSS |
|    | VL  | 4         | 신호 펩타이드-FR1- <u>CDR1</u> -FR2- <u>CDR2</u> -FR3- <u>CDR3</u> -FR4<br>MDFQVQIFSLISASVIMSRGQIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCT <u>ASSS</u><br>VSSSNFHWYQQKPGSSPKLWIYSTNLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISS<br>MEAEDAATYYCHQYHRSPRTFGGGTKLEIK        |
|    | VH2 | 2         | 신호 펩타이드-FR1- <u>CDR1</u> -FR2- <u>CDR2</u> -FR3- <u>CDR3</u> -FR4<br>MRVLILLCLFTAFPGILSDVQLQESGPDVLPKPSQSLTCTVTGYST <u>SGY</u><br>SWHWIRQFPGNILEWMAYIHYNGNTNYPNPSLKSISRITRDTSKNQFFL<br>QLNSVTTEDTATYFCARAEFWGGQTTLTVSS      |
| H5 | VH  | 3         | 신호 펩타이드-FR1- <u>CDR1</u> -FR2- <u>CDR2</u> -FR3- <u>CDR3</u> -FR4<br>MDSRLNLVFLVLILKGVQCDVQLVESGGDLVQPGESRKLSAASGFTFS<br>SFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSAIYYADTVKGRFTISRDNPKNT<br>LFLHMTSLRSEDTAIYYCAGSNWDYFDYWGGQTTLTVSS        |
|    | VL  | 5         | 신호 펩타이드-FR1- <u>CDR1</u> -FR2- <u>CDR2</u> -FR3- <u>CDR3</u> -FR4<br>MDSQAQVLILLLLWVSGTCEDIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCK <u>SSQS</u><br>LLNSRIRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTD<br>FTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIK   |

[0222]

표 2는 가변 중쇄의 상보성 결정 영역(CDR-H)의 예시적인 아미노산 서열 및 가변 경쇄의 상보성 결정 영역(CDR-L)의 예시적인 아미노산 서열을 제시한다.

| 명칭 | 영역 및<br>사슬 | SEQ ID<br>No | 상보성 결정 영역의 아미노산 서열 |
|----|------------|--------------|--------------------|
| H2 | VH1 CDR-H3 | 6            | RANWYYFDY          |
|    | CDR-L3     | 7            | HQYHRSPRT          |
|    | VH2 CDR-H3 | 8            | ADF                |
| H5 | CDR-H3     | 9            | SNWDYFDY           |
|    | CDR-L3     | 10           | KQSYNLWT           |
| H2 | VH1 CDR-H2 | 11           | EINPDGSTIITYTPSLKD |
|    | CDR-L2     | 12           | STSNLAS            |
|    | VH2 CDR-H2 | 13           | YIHYNGNTNYNPSLKS   |
| H5 | CDR-H2     | 14           | YISSGSSAIYYADTVKG  |
|    | CDR-L2     | 15           | WASTRES            |
| H2 | VH1 CDR-H1 | 16           | KYWMS              |
|    | CDR-L1     | 17           | TASSSVSSSNFH       |
|    | VH2 CDR-H1 | 18           | SGYSWH             |
| H5 | CDR-H1     | 19           | SFGMH              |
|    | CDR-L1     | 20           | KSSQSLNLSRIRKNYLA  |

[0223]

표 3 은 가변 중쇄 (VH)의 예시적인 핵산 서열 및 가변 경쇄 (VL)의 예시적인 핵산 서열을 제시한다.

| 명칭 | 사슬  | SEQ ID No | 핵산 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|-----|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| H2 | VH  | 21        | <p>신호 서열-FR1-<u>CDR1</u>-FR2-<u>CDR2</u>-FR3-<u>CDR3</u>-FR4</p> <p>ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTATTGTTGCTCTTTAAAAGGGGTCC</p> <p>AGTGTGAGGTGAAACTTCTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCT</p> <p>GGAGGATCCCTGAAACTCTCTGTGCAGCCTCAGGATTGATTTTAAT</p> <p><u>AAATACTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGAAAGGGCTAG</u></p> <p>AATGGATTGGAGAAATTAATCCAGATGGCAGTACGATCATCTATACGC</p> <p><u>CATCTCTAAAGGATAAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAGAAATA</u></p> <p>CTCTGTACCTGCAAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTTT</p> <p>ATTACTGTGCAAGACGGGCTAACTGGTACTACTTTGACTACTGGGGCC</p> <p>AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA</p> |
|    | VL  | 24        | <p>신호 서열-FR1-<u>CDR1</u>-FR2-<u>CDR2</u>-FR3-<u>CDR3</u>-FR4</p> <p>ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAG</p> <p>TCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCAT</p> <p>GTCTGCATCTCTAGGGGAACGGGTACCATGACCTGC<u>ACTGCCAGCTC</u></p> <p><u>AAGTGTAAGTTCAGTAACCTTCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATC</u></p> <p>CTCCCCAAACTCTGGATTATAGCACCTCCAACCTGGCTTCTGGAGTC</p> <p>CCAACTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTACA</p> <p>ATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAG</p> <p><u>TATCATCGTTCCCCACGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATC</u></p> <p>AAA</p>             |
|    | VH2 | 22        | <p>신호 서열-FR1-<u>CDR1</u>-FR2-<u>CDR2</u>-FR3-<u>CDR3</u>-FR4</p> <p>ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGCCTGTTACAGCCTTTCCTGGTATCC</p> <p>TGTCTGATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTT</p> <p>CTCAGTCACTTCACTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCCATCACCAG</p> <p><u>TGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACATACTGG</u></p> <p>AATGGATGGCTACATACACTACAATGGTAACACTAACTACAACCCAT</p>                                                                                                                                                                                                              |

[0224]

|    |    |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----|----|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |    |    | <p><u>CTCTCAAAAGTCGGATCTCTATCACTCGAGACACCTCCAAGAACCAGT</u><br/> TCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACTGCCACATATTT<br/> CTGTGCAAGAG<u>CCGATTTCT</u>GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC<br/> CTCA</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| H5 | VH | 23 | <p><u>신호 서열-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4</u><br/> ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTTGTCCTTATTTTAAAAGGTG<br/> TCCAGTGTGATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAG<br/> CCTGGAGAGTCCCGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTC<br/> AGT<u>AGCTTTGGAATGCACT</u>GGGTTCTGTCAGGCTCCAGAGAAGGGGCT<br/> GGAGTGGGTCTGCATACATTAGTAGTGGCAGTAGTCCATCTACTATG<br/> <u>CAGACACAGTGAAGGGCCGATT</u>CACCATCTCCAGAGACAATCCAAG<br/> AACACCCTGTTCTACACATGACCACTCTAAGGTCTGAGGACACGGCC<br/> ATATATTACTGTGCAGGAAGCAACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGC<br/> CAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA</p> |
|    | VL | 25 | <p><u>신호 서열-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4</u><br/> ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGCTATGGGTATCTG<br/> GTACCTGTGAGGACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTG<br/> TGTACGAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAATCCAGTCAGAGT<br/> CTGCTAAACAGTAGAATCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAGCA<br/> GAAACCAGGGCAGTCTCCTAAATTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAG<br/> <u>GGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTT</u>CACAGGCAGTGGATCTGGGACAG<br/> ATTTCACTCTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAGGACCTGGCAGTTT<br/> ATTACTGCAACAATCTTATAATCTGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCA<br/> AGCTGGAAATCAAA</p>                    |

[0225]

표 4 는 가변 중쇄의 상보성 결정 영역(CDR-H)의 예시적인 핵산 서열 및 가변 경쇄의 상보성 결정 영역(CDR-L)의 예시적인 핵산 서열을 제시한다. 상응하는 단리된 핵산 서열상의 출발 및 정지 위치가 표시된다.

| 명칭 | 영역<br>및<br>사슬 | SEQ<br>ID<br>No | 출발<br>위치 | 정지<br>위치 | 상보성 결정 영역의 핵산 서열                                        |
|----|---------------|-----------------|----------|----------|---------------------------------------------------------|
| H2 | VH1<br>CDR-H3 | 26              | 289      | 351      | CGGGCTAACTGGTACTACTTTGACTAC                             |
|    | CDR-L3        | 29              | 270      | 299      | CACCAGTATCATCGTTCCACGACG                                |
|    | VH2<br>CDR-H3 | 27              | 289      | 324      | GCCGATTTC                                               |
| H5 | CDR-H3        | 28              | 289      | 327      | AGCAACTGGGACTACTTTGACTAC                                |
|    | CDR-L3        | 30              | 270      | 299      | AAACAATCTTATAATCTGTGGACG                                |
| H2 | VH1<br>CDR-H2 | 31              | 151      | 174      | GAAATTAATCCAGATGGCAGTACGATCATCT<br>ATACGCCATCTCTAAAGGAT |
|    | CDR-L2        | 34              | 153      | 161      | AGCACCTCCAACCTGGCTTCT                                   |
|    | VH2<br>CDR-H2 | 32              | 151      | 174      | TACATACTACAATGGTAACATACTACA<br>ACCCATCTCTCAAAAGT        |
| H5 | CDR-H2        | 33              | 151      | 174      | TACATTAGTAGTGGCAGTAGTGCCATCTACT<br>ATGCAGACACAGTGAAGGGC |
|    | CDR-L2        | 35              | 153      | 161      | AAACAATCTTATAATCTGTGGACG                                |
| H2 | VH1<br>CDR-H1 | 36              | 76       | 99       | AAATACTGGATGAGT                                         |
|    | CDR-L1        | 39              | 81       | 101      | ACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTCCAGTAACT<br>TTCAC                 |
|    | VH2<br>CDR-H1 | 37              | 76       | 99       | AGTGGTTATAGCTGGCAC                                      |
| H5 | CDR-H1        | 38              | 76       | 99       | AGCTTTGGAATGCAC                                         |
|    | CDR-L1        | 40              | 81       | 101      | AAATCCAGTCAGAGTCTGCTAAACAGTAGA<br>ATCCGAAAGAACTACTTGGCT |

[0226]

표 5 는 예시적인 아미노산 서열 중쇄 및 경쇄 페어링을 제시한다.

| 명칭  | SEQ ID No  |            |                    |                |                    |                |                    |                    |
|-----|------------|------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|--------------------|
|     | 가변 영역      |            | CDR3               |                | CDR2               |                | CDR1               |                    |
|     | 중쇄<br>(VH) | 경쇄<br>(VL) | 중쇄<br>(CDR-<br>H3) | 경쇄<br>(CDR-L3) | 중쇄<br>(CDR-<br>H2) | 경쇄<br>(CDR-L2) | 중쇄<br>(CDR-<br>H1) | 경쇄<br>(CDR-<br>L1) |
| H2a | 1          | 4          | 6                  | 7              | 11                 | 12             | 16                 | 17                 |
| H2b | 2          | 4          | 8                  | 7              | 13                 | 12             | 18                 | 17                 |
| H5  | 3          | 5          | 9                  | 10             | 14                 | 15             | 19                 | 20                 |

[0227]

표 6 은 예시적인 핵산 서열 중쇄 및 경쇄 페어링을 제시한다.

| 명칭  | SEQ ID No  |            |                    |                |                    |                |                    |                    |
|-----|------------|------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|--------------------|
|     | 가변 영역      |            | CDR3               |                | CDR2               |                | CDR1               |                    |
|     | 중쇄<br>(VH) | 경쇄<br>(VL) | 중쇄<br>(CDR-<br>H3) | 경쇄<br>(CDR-L3) | 중쇄<br>(CDR-<br>H2) | 경쇄<br>(CDR-L2) | 중쇄<br>(CDR-<br>H1) | 경쇄<br>(CDR-<br>L1) |
| H2a | 21         | 24         | 26                 | 29             | 31                 | 34             | 36                 | 39                 |
| H2b | 22         | 24         | 27                 | 29             | 32                 | 34             | 37                 | 39                 |
| H5  | 23         | 25         | 28                 | 30             | 33                 | 35             | 38                 | 40                 |

[0228]

[0229]

서열 번호 41: 천연 야생형 인간 헵신

MAQKEGGRTVPCCSRPKVAALTAGTLLLLTAIGAASWAIVAVLLRSDQEPLYPVQVSSA  
DARLMVFDKTEGTWRLLCSSRSNARVAGLSCEEMGFLRALTHSELDVRTAGANGTSGF  
FCVDEGRLPHTQRLLEVISVCDPCRGRFLAaicQDCGRRKLPVDRIVGGRDTSLG RWPW  
QVSLRYDGAHLCGGSLLSGDWVLTAAHCFERNRVL SRWRVFAGAVAQASPHGLQLG  
VQAVVYHGGYLPFRDPNSEENSNDIALVHLSSPLPLTEYIQPVCLPAAGQALVDGKICTV  
TGWGNTQYYGQAGVLQEARVPIISNDVCNGADFYGNQIKPKMFCAGYPEGGIDACQG  
DSGGPFVCEDSISRTPRWRLCGIVSWGTCALAQKPGVYTKVSDFREWIFQAIKTHSEAS  
GMVTQL

[0230]

[0231]

서열 번호 42: 원래의 재조합 헵신 폴리뉴클레오타이드 서열; c-말단 his 태그는 정제 목적으로 포함되었다.

```

1  cgggacacca  gcttgggccg  gtggccgtgg  caagtcagcc  ttcgctatga
51  tggagcacac  ctctgtgggg  gatccctgct  ctccggggac  tgggtgctga
101  cagccgcccc  ctgcttcccc  gagcgggaacc  gggtcctgtc  ccgatggcga
151  gtgtttgccc  gtgccgtggc  ccaggcctct  cccacaggtc  tgcagctggg
201  ggtgcaggct  gtggtctacc  acgggggcta  tcttcccttt  cgggacccca
251  acagcgagga  gaacagcaac  gatattgccc  tgggtccact  ctccagtccc
301  ctgccctcca  cagaatacat  ccagcctgtg  tgctccccag  ctgccggcca
351  ggccctggtg  gatggaaga  tctgtaccgt  gacgggctgg  ggcaacacgc
401  agtactatgg  ccaacaggcc  ggggtactcc  aggaggctcg  agtcccata
451  atcagcaatg  atgtctgcaa  tggcgtgac  ttctatggaa  accagatcaa
501  gcccaagatg  ttctgtgtg  gctacccgga  ggggtggcatt  gatgcctgcc
551  agggcgacag  cgggtgtccc  tttgtgtgtg  aggacagcat  ctctcgacg
601  ccacgttggc  ggctgtgtgg  cattgtgagt  tggggcactg  gctgtgccct
651  ggcccagaag  ccaggcgtct  acaccaaagt  cagtgacttc  cgggagtgga
701  tcttccaggc  cataaagact  cactccgaag  ccagcggcat  ggtgaccag
751  ctc

```

[0232]

[0233]

서열 번호 43: 원래의 재조합 헵신 아미노산 서열; c-말단 his 태그는 정제 목적으로 포함되었다.

```

1  RDTSLGRWPW  QVSLRYDGAH  LCGGSLLSGD  WVLTAHCFP  ERNRVLSRWR
51  VFAGAVAQAS  PHGLQLGVQA  VVYHGGYLPF  RDPNSEENSN  DIALVHLSSP
101  LPLTEYIQPV  CLPAAGQALV  DGKICTVTGW  GNTQYYGQQA  GVLQEARVPI
151  ISNDVCNGAD  FYGNQIKPKM  FCAGYPEGGI  DACQGDSGGP  FVCEDSISRT
201  PRWRLCGIVS  WGTGCALAQK  PGVYTKVSDF  REWIFQAIKT  HSEASGMVTQ
251  L

```

[0234]

[0235]

서열 번호 44: 트롬빈 절단 부위를 밑줄로 표시하고 c-말단 6x-his 태그는 이탤릭체로 표시된 재조합 헵신 단백질

MLYPVQVSSADARLMVFDKTEGTWRLLCSSRSNARVAGLSCEEMGFLRALTHSELDVR  
TAGANGTSGFFCVDEGRLPHTQRLLEVISVDCDCPRGRFLAAICQDCGRRKLPVDRLVPR  
GSIVGGRDTSLSGRWPWQVSLRYDGAHLCCGGSLLSGDWVLTAAHCFPERNRVLSRWRV  
FAGAVAQASPHGLQLGVQAVVYHGGYLPFRDPNSEENSNDIALVHLSSPLPLTEYIQPV

[0236]

LPAAGQALVDGKICTVTGWGNTQYYGQQAGVLQEARVPIISNDVCNGADFYGNQIKPK  
MFCAGYPEGGIDACQGDSSGPFVCEDSISRTPRWRLCGIVSWGTCALAQKPGVYTKVS  
DFREWIFQAIKTHSEASGMVTQLHHHHHH

[0237]

서열 번호 45: FLAG 태그를 밑줄로 표시하고 링커는 이탤릭체로 표시된 헵신

[0238]

MAQKEGGRTVPCCSRPKVAALTAGTLLLLTAIGAASWAIVAVLLRSDQEPLYPVQVSSA  
DARLMVFDKTEGTWRLLCSSRSNARVAGLSCEEMGFLRALTHSELDVRTAGANGTSGF  
FCVDEGRLPHTQRLLEVISVDCDCPRGRFLAAICQDCGRRKLPVDRIVGGRTSLGRWPW  
QVSLRYDGAHLCCGGSLLSGDWVLTAAHCFPERNRVLSRWRVFAGAVAQASPHGLQLG  
VQAVVYHGGYLPFRDPNSEENSNDIALVHLSSPLPLTEYIQPVCLPAAGQALVDGKICTV  
TGWGNTQYYGQQAGVLQEARVPIISNDVCNGADFYGNQIKPKMFCAGYPEGGIDACQG  
DSGGPFVCEDSISRTPRWRLCGIVSWGTCALAQKPGVYTKVSDFREWIFQAIKTHSEAS  
GMVTQLGTGGGSGGGSGGGASDYKDDDDK

[0239]

주황색으로 표시된 잔기는 삽입된 링커를 나타내고, 빨간색으로 표시된 잔기는 FLAG 태그를 나타낸다.

[0240]

서열 번호 46: 트롬빈 절단 부위를 밑줄로 표시하고 링커는 이탤릭체로 표시되고 FLAG 태그는 밑줄이 그어진 이  
탤릭체로 표시된 헵신

[0241]

MAQKEGGRTVPCCSRPKVAALTAGTLLLLTAIGAASWAIVAVLLRSDQEPLYPVQVSSA  
DARLMVFDKTEGTWRLLCSSRSNARVAGLSCEEMGFLRALTHSELDVRTAGANGTSGF  
FCVDEGRLPHTQRLLEVISVDCDCPRGRFLAAICQDCGRRKLPVDRLVPRGSIVGGRDTSLS  
GRWPWQVSLRYDGAHLCCGGSLLSGDWVLTAAHCFPERNRVLSRWRVFAGAVAQASPH  
GLQLGVQAVVYHGGYLPFRDPNSEENSNDIALVHLSSPLPLTEYIQPVCLPAAGQALVD  
GKICTVTGWGNTQYYGQQAGVLQEARVPIISNDVCNGADFYGNQIKPKMFCAGYPEGG  
IDACQGDSSGPFVCEDSISRTPRWRLCGIVSWGTCALAQKPGVYTKVSDFREWIFQAIK  
THSEASGMVTQLGTGGGSGGGSGGGASDYKDDDDK

[0242]

녹색으로 표시된 잔기는 삽입된 트롬빈 절단 부위를 나타내고, 주황색으로 표시된 잔기는 삽입된 링커를 나타내  
고, 빨간색으로 표시된 잔기는 FLAG 태그를 나타낸다.

[0243]

서열 번호 47: 6x-히스티딘-태그

[0244]

His-His-His-His-His-His

[0245]

서열 번호 48: FLAG 태그, 링커 및 gLUC 신호 서열을 갖는 세포의 도메인(ECD).

[0246]

MGVKVLFALICIAVAEAGRDTSLGRWPWQVSLRYDGAHLCCGGSLLSGDWVLTAAHCFP  
ERNRVLSRWRVFAGAVAQASPHGLQLGVQAVVYHGGYLPFRDPNSEENSNDIALVHLS  
SPLPLTEYIQPVCLPAAGQALVDGKICTVTGWGNTQYYGQQAGVLQEARVPIISNDVCN  
GADFYGNQIKPKMFCAGYPEGGIDACQGDSSGPFVCEDSISRTPRWRLCGIVSWGTCAL  
LAQKPGVYTKVSDFREWIFQAIKTHSEASGMVTQLGTGGGSGGGSGGGASDYKDDDDK

[0247]

밑줄로 표시되고 이탤릭체로 표시된 잔기는 FLAG 태그를 나타내고, 이탤릭체로 표시된 잔기는 삽입된 링커를 나  
타내고, 밑줄로 표시된 잔기는 gLUC 신호 서열을 나타낸다.

[0248]

실시예

[0249]

본 출원은 본 출원의 예시적인 실시양태로서 제공되는 다음의 비제한적인 실시예를 참조함으로써 더 잘 이해될

[0250]

수 있다. 하기 실시예는 실시양태를 보다 완전하게 예시하기 위해 제시되는 것이며, 본 출원의 넓은 범위를 제한하는 것으로 결코 해석되어서는 안 된다.

**[0251] 실시예 1: 하이브리도마의 확립.**

**[0252]** 서열 번호 43의 아미노산 서열을 갖는 His 태그 부착된 재조합 헵신 단백질을 이. 콜라이 시스템에서 발현 및 정제하였다. 상기 발현된 단백질을 사용하여 하이브리도마를 생성하였다.

**[0253]** 모노클로날 항체 2H2 및 5B8을 생산하는 마우스 기원의 하이브리도마는 21일마다 완전 프로인트(Freund) 면역보강제 내의 마우스당 25  $\mu$ g의 재조합 헵신(서열 번호 43)(1차 면역화; 125  $\mu$ L 및 후속 부스트), 불완전 프로인트 면역보강제 내의 25  $\mu$ g의 면역원(최대 주입 부피 125  $\mu$ L로 최대 5회 주입)을 사용하여 암컷 BALB/c 마우스를 복강 내로 면역화한 후에 표준 기술을 사용하여 제조되었다. 비장세포를 분리하고, PEG-1500 융합 기술을 사용하여 하이브리도마를 제조하였다.

**[0254]** 이어서, 생성된 항체를 천연 순환하는(홀린) 헵신 단백질의 인식을 위해 난소암 환자로부터의 복수액에 대해 스크리닝하였다(데이터는 나타나지 않음).

**[0255]** 이어서, 생성된 항체를 이중 결정인자 (1) 면역검정("샌드위치 ELISA")에 의해 표준 단백질로서 상기 언급한 이. 콜라이 생산 재조합 단백질을 사용하여 실행 가능한 표준 곡선을 생성하는 능력에 대해 추가로 스크리닝하였다.

**[0256]** 세포외 영역(381aa)을 포함하는 추가의 재조합 헵신 단백질은 헵신의 세포 표면 자가 활성화를 모방하고 저장 반감기를 증가시키기 위해 트롬빈 절단 부위의 부가를 통해 조작되었다(서열 번호 44).

**[0257]** 트롬빈으로 서열 번호 44를 활성화한 후, 활성화된 재조합 헵신을 사용하여 샌드위치 ELISA에 의해 mAb 2H2 및 mAb 5B8을 다시 스크리닝하였으며, 이는 또한 실행 가능한 표준 곡선을 생성하였다(도 1a 및 1b 참조).

표 7: 헵신 검정의 스파이크 및 회수 샘플 데이터

| 샘플      | 예상치 | 실제치 | 회수율  |
|---------|-----|-----|------|
| WB83017 | 500 | 509 | 102% |
| MH62217 | 500 | 464 | 93%  |

**[0258]** 이 스크리닝은 항체 mAb 2H2 및 mAb 5B8이 활성화된 가용성 c-말단 세포외 순환 헵신에 특이적으로 결합할 수 있지만, 전장 자이모겐에는 결합하지 않는다는 것을 확인시켜 주었다.

**[0260] 실시예 2: 특이성을 결정하기 위한 스크리닝**

**[0261]** 헵신의 세포외 부분의 c-말단이 트립신 유사 세린 프로테아제 패밀리의 다른 구성원에 대한 상동성을 나타낸다는 것을 감안하여, 항체는 ELISA 검정을 사용하여 재조합 세린 프로테아제의 패널에 대해 스크리닝되었다.

**[0262]** 다수의 세린 프로테아제 및 하나의 매트릭스 메탈로프로테이나제를 헵신 ELISA 검정으로 분석하여, 이들 중 어느 것이 헵신 검정과 교차 반응하는지의 여부를 결정하였다. 검정된 단백질은 재조합 단백질이었다. 세린 프로테아제 매트리카제, KLK6, KLK7 및 KLK8은 280 ng/ml에서 검정된 반면, 매트릭스 메탈로프로테이나제 MMP-7은 32 ng/ml에서 검정되었다. 각각의 단백질은 8개의 웰에서 검정되었다. 각각의 단백질은 헵신 검정의 10 ng/ml 민감도 미만의 평균 수준을 기록하였다. 표 8을 참조한다.

표 8:

| 280 ng/ml 로 스파이크됨 | 280 ng/ml 로 스파이크됨 | 280 ng/ml 로 스파이크됨 | 280 ng/ml 로 스파이크됨 | 32 ng/ml 로 스파이크됨 |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 마트립타제             | KLK6              | KLK7              | KLK8              | MMP-7            |
| ng/ml             | ng/ml             | ng/ml             | ng/ml             | ng/ml            |
| 4.56              | 4.56              | 3.28              | 5.19              | 3.93             |
| 3.28              | 3.28              | 1.20              | 4.56              | 1.20             |
| 2.62              | 1.93              | 1.20              | 4.56              | 1.20             |
| 3.28              | 1.93              | 1.93              | 3.93              | 0.41             |
| 2.62              | 23.79             | 1.20              | 5.80              | 0.41             |

| 280 ng/ml 로 스파이크됨 | 280 ng/ml 로 스파이크됨 | 280 ng/ml 로 스파이크됨 | 280 ng/ml 로 스파이크됨 | 32 ng/ml 로 스파이크됨 |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 마트립타제             | KLK6              | KLK7              | KLK8              | MMP-7            |
| ng/ml             | ng/ml             | ng/ml             | ng/ml             | ng/ml            |
| 3.28              | 1.93              | 2.62              | 3.93              | 1.93             |
| 4.56              | 1.93              | 3.28              | 8.18              | 2.62             |
| 3.93              | 4.56              | 5.80              | 2.62              | 1.93             |

데이터는 항체가 헵신의 세포의 부분의 c-말단에 특이적이며, 트립신 유사 세린 프로테아제 패밀리의 다른 구성 원과는 교차 반응하지 않는다는 것을 입증하였다.

### 실시예 3: 결합 친화도 평가

시험관 내에서 결합 친화도를 결정하기 위해, 샌드위치 ELISA를 사용하여 헵신을 과다발현하거나 낮다운하도록 조작된 인간 전립선암 세포 LNCaP의 용해물에서 발생하는 순환 헵신 수준을 분석하였다(표 9). 헵신 과다발현 또는 헵신 고갈(낮다운)된 세포의 세포 용해물, 및 벡터 대조군이 사용되었다. 마지막으로, 세포 표면의 활성화된 헵신에 대한 항체 결합 친화도는 야생형(wt) 헵신을 과다발현하는 HEK-293T 세포를 사용하여 각각 mAb 2H2 및 mAb 5B8의 유세포 분석을 통해 수행되었다.

표 9

| 세포주           | 헵신 수준 (ng/ml) |
|---------------|---------------|
| LNCaP 헵신 과다발현 | 3109.14       |
| LNCaP 헵신 낮다운  | 936.21        |
| LNCaP 벡터 대조군  | 2816.43       |

### 실시예 4: 세포의 헵신의 검출

이 실시예는 세포의 헵신을 검출하고 헵신의 세포의 영역에 특이적으로 결합하는 본원에서 설명되는 항체 또는 항원 결합 단편을 이용하여 암에 걸린 대상체를 진단하기 위한 시험관내 검정을 설명한다.

이 실시예에서, 본 발명자들은 양성 조직에 비해 종양 조직에서 헵신 유전자 발현의 유의한 상향조절을 제시하고, 안드로겐 의존성 전이성 병변 및 안드로겐 비의존성 전이성 병변에서 헵신 상향조절을 추가로 제시한, 기존의 공개적으로 이용 가능한 유전자 발현 데이터세트(2개의 데이터세트, 326명의 환자 샘플)를 재분석하였다. 헵신 과다발현과 안드로겐 비의존성의 잠재적 상관 관계를 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 LNCaP 모 클론 대 안드로겐 비의존성 LNCaP 서브클론을 비교한 시험관내 데이터를 재분석하였다. 이 분석은 PSA 발현의 감소를

동반한, 안드로겐 결핍의 과정에 걸쳐서 헵신 발현이 단계적으로 증가함을 보여주었다. 마지막으로, 환자의 혈청에서 발생하는 순환 헵신 단백질 수준을 평가하기 위해, 전립선암이 의심되는 총 424명의 환자를 대상으로 생검 당시 2015년부터 2018년까지 순환 헵신 수치를 분석하고, 연구 종료시까지 재발 또는 생존율을 추적 조사하였다. 효소 결합 면역흡착 검정에 의해 측정된 혈청 헵신 수준은 89%의 특이성을 제공하였다(Gleason < 6(3+3); 헵신 양성, >100 ng/mL). 이 코호트 내에서, 38명의 환자가 생화학적 재발을 나타내었고, 그 중 44%는 헵신 양성이었고, 22개월 동안 헵신 음성 환자에 비해 임상적으로 가속화된 재발 경로를 보였다. 종합적으로, 이러한 결과는 전이성 전립선암을 포함하여 전립선암 환경에서 순환 헵신 수준의 종단 진단 요도를 강조하는 것이다.

[0272] 예시적인 검정 프로토콜

[0273] 생물학적 샘플은 전립선암, 난소암, 암종(예를 들어, 신세포 암종), 이들의 전이(예를 들어, 전이성 전립선암, 전이성 난소암, 전이성 신세포 암종, 예를 들어 전이성 신세포 암종), 또는 이들의 조합이 있는 것으로 의심되는 대상체로부터 획득된다.

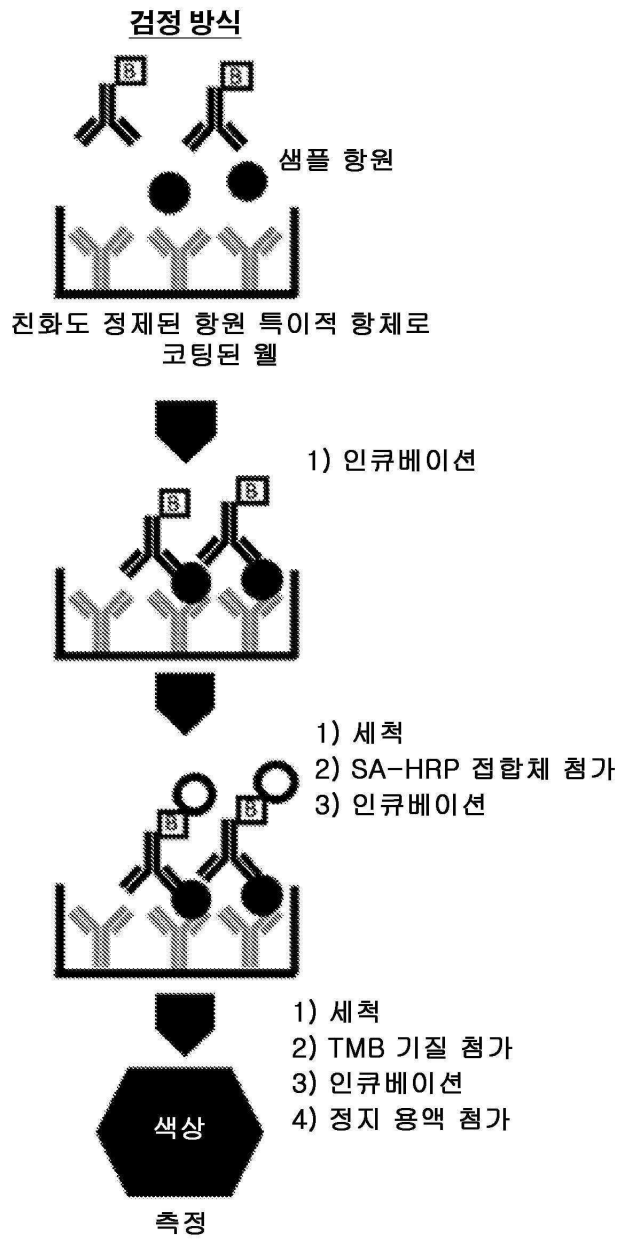
[0274] 생물학적 샘플은 검정에 사용하기 전에 선택적으로 처리된다. 그런 다음, 샘플은 예를 들어 ELISA 분석, ELISPOT, 면역조직화학 또는 멀티플렉스 및/또는 미세유체 플랫폼용 마이크로비드에 대한 항체 적응을 사용하여 시험된다. 한 예에서, mAb 2H2a, mAb 2H2b 또는 mAb 5B8을 사용한 결과는 대조군 항체를 포함하는 대조군 및/또는 샘플이 없는 대조군과 비교된다.

[0275] 결과가 얻어지고, 항체의 결합이 검출될 때 암이 검출된다.

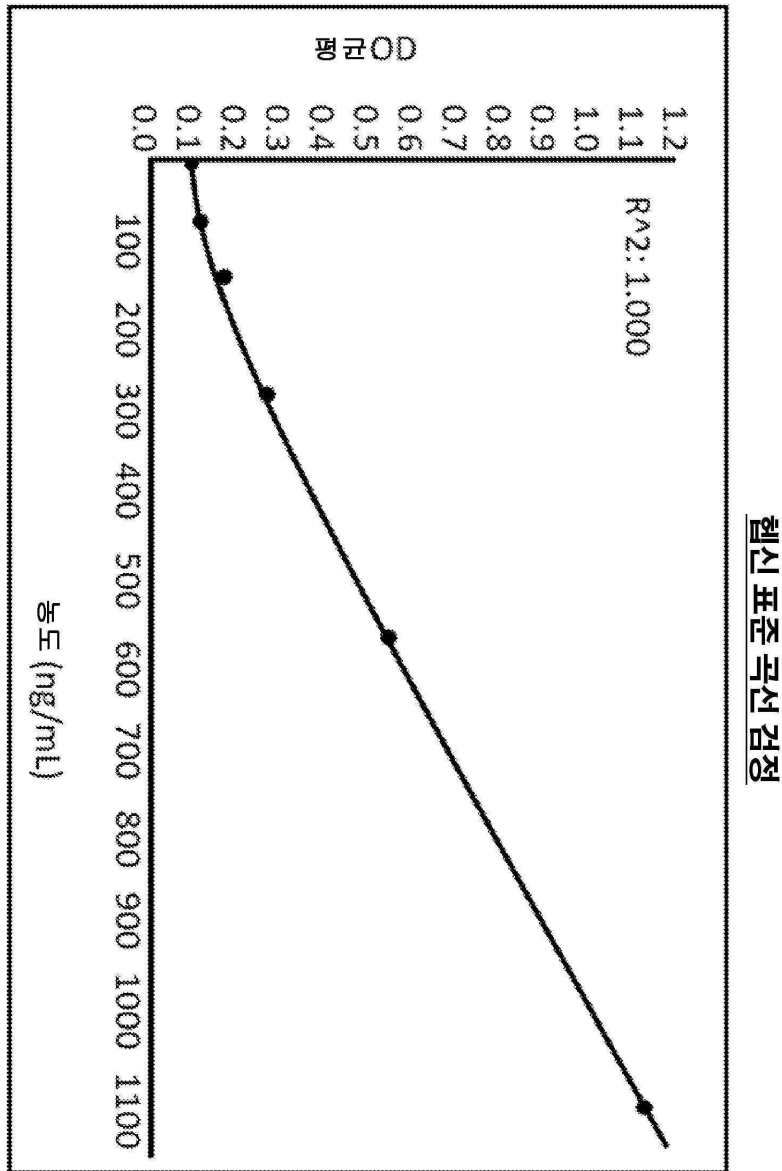
[0276] 본 출원의 특정 실시양태가 본원에서 제시되고 설명되었지만, 그러한 실시양태는 단지 예로서 제공된다는 것이 명백할 것이다. 많은 변형, 변경 및 대체가 실시양태로부터 벗어나지 않으면서 통상의 기술자에게 실시될 수 있으며; 본 명세서에서 설명되는 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 명세서에서 설명되는 방법을 실시하는데 이용될 수 있음을 이해하여야 한다.

도면

도면1a



도면1b



## 서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NAVAUX, INC.

<120> ANTI-HEPSIN ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> 55156-701.601

<140> PCT/US2021/016409

<141> 2021-02-03

<150> 62/970,626

<151> 2020-02-05

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 1

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Asn

35 40 45

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

50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Gly Ser Thr Ile Ile Tyr Thr Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asn Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 2

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 2

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Cys Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro  
                   20                    25                    30  
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
                   35                    40                    45  
 Ser Gly Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Ile Leu  
  
                   50                    55                    60  
 Glu Trp Met Ala Tyr Ile His Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
                   85                    90                    95  
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
                   100                    105                    110  
 Phe Cys Ala Arg Ala Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val

                  115                    120                    125  
 Ser Ser  
                   130

<210> 3

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

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

Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu  
50 55 60  
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala  
65 70 75 80  
Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn  
85 90 95  
Thr Leu Phe Leu His Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile  
100 105 110  
Tyr Tyr Cys Ala Gly Ser Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
115 120 125  
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
130 135  
<210> 4  
<211> 130  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide  
<400> 4  
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
1 5 10 15  
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
20 25 30  
Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser  
35 40 45  
Ser Ser Val Ser Ser Ser Asn Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
50 55 60  
Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
65 70 75 80  
Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
85 90 95  
Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His

100 105 110  
Gln Tyr His Arg Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

115 120 125

Ile Lys

130

<210> 5

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 5

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45

Leu Leu Asn Ser Arg Ile Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

115 120 125

Leu Glu Ile Lys

130

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 6

Arg Ala Asn Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 7

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Arg Thr

1 5

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 8

Ala Asp Phe

1

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 9

Ser Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 10

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 11

Glu Ile Asn Pro Asp Gly Ser Thr Ile Ile Tyr Thr Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 12

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 13

Tyr Ile His Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 14

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

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 15

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 16

Lys Tyr Trp Met Ser

1 5

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 17

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Asn Phe His

1 5 10

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 18

Ser Gly Tyr Ser Trp His

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 19

Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 20

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Ile Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 21

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 21

atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctgggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt taataaatac tggatgagtt ggggccgca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatggca gtacgatcat ctatacgcca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca gaaatactct gtacctgcaa 300

atgagcaaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagacg ggctaactgg 360

tactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 408

<210> 22

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 22

atgagagtgc tgattctttt gtgcctgttc acagcctttc ctggtatcct gtctgatgtg 60

cagcttcagg agtcaggacc tgacctgggtg aaaccttttc agtcactttc actcacctgc 120

actgtcactg gctactccat caccagtggg tatagctggc actggatccg gcagtttcca 180

ggaaacatac tggaatggat ggcctacata cactacaatg gtaacactaa ctacaacca 240

tctctcaaaa gtcggatctc tatcactcga gacacctcca agaaccagtt cttcctgcag 300

ttgaattctg tgactactga ggacactgcc acatatttct gtgcaagagc cgatttctgg 360

ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 390

<210> 23

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 23

atggactcca ggctcaattt agttttcctt gtccttattt taaaagggtg ccagtgtgat 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggagactta gtgcagcctg gagagtcccg gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac ttccagtagc ttggaatgc actgggttcg tcaggtctca 180

gagaaggggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggca gtagtgccat ctactatgca 240

gacacagtga agggccgatt caccatctcc agagacaatc ccaagaacac cctgttccta 300

catatgacca gtctaaggte tgaggacacg gccatatatt actgtgcagg aagcaactgg 360

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 408

<210> 24

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 24

atggattttc aggtgcagat ttccagcttc ctgctaata gtgcctcagt cataatgtcc 60

agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctct aggggaacgg 120

gtccacctga cctgcaactgc cagctcaagt gtaagttcca gtaactttca ctggtaccag 180

cagaagccag gatcctcccc caaactctgg atttatagca cctccaacct ggcttctgga 240

gtcccaactc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc 300

atggaggctg aagatgetgc cacttattac tgccaccagt atcatcgttc cccacggacg 360

ttcgggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 390

<210> 25

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| atggattcac aggccccaggt tcttatattg ctgctgctat gggatatctgg tacctgtgag | 60  |
| gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact   | 120 |
| atgagctgca aatccagtca gagtctgcta aacagtagaa tccgaaagaa ctacttggt    | 180 |
| tggtagcagc agaaaccagg gcagctctct aaattgttga tctactgggc atccactagg   | 240 |
| gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc   | 300 |
| atcagcagtg tgcaggctga ggacctggca gtttattact gcaacaatc ttataatctg    | 360 |
| tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa                             | 396 |

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 26

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| cgggctaact ggtactactt tgactac | 27 |
|-------------------------------|----|

<210> 27

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 27

|           |   |
|-----------|---|
| gccgatttc | 9 |
|-----------|---|

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| <400> 28                                                                    |    |
| agcaactggg actactttga ctac                                                  | 24 |
| <210> 29                                                                    |    |
| <211> 27                                                                    |    |
| <212> DNA                                                                   |    |
| <213> Artificial Sequence                                                   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 29                                                                    |    |
| caccagtatc atcggtcccc acggacg                                               | 27 |
| <210> 30                                                                    |    |
| <211> 24                                                                    |    |
| <212> DNA                                                                   |    |
| <213> Artificial Sequence                                                   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 30                                                                    |    |
| aaacaatctt ataattctgtg gacg                                                 | 24 |
| <210> 31                                                                    |    |
| <211> 51                                                                    |    |
| <212> DNA                                                                   |    |
| <213> Artificial Sequence                                                   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 31                                                                    |    |
| gaaattaatc cagatggcag tacgatcatc tatacgccat ctctaaagga t                    | 51 |
| <210> 32                                                                    |    |
| <211> 48                                                                    |    |
| <212> DNA                                                                   |    |
| <213> Artificial Sequence                                                   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 32                                                                    |    |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| tacatacact acaatggtaa cactaactac aacccatctc tcaaaagt                        | 48 |
| <210> 33                                                                    |    |
| <211> 51                                                                    |    |
| <212> DNA                                                                   |    |
| <213> Artificial Sequence                                                   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 33                                                                    |    |
| tacattagta gtggcagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaaggg c                    | 51 |
| <210> 34                                                                    |    |
| <211> 21                                                                    |    |
| <212> DNA                                                                   |    |
| <213> Artificial Sequence                                                   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 34                                                                    |    |
| agcacctcca acctggettc t                                                     | 21 |
| <210> 35                                                                    |    |
| <211> 24                                                                    |    |
| <212> DNA                                                                   |    |
| <213> Artificial Sequence                                                   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 35                                                                    |    |
| aaacaatctt ataatctgtg gacg                                                  | 24 |
| <210> 36                                                                    |    |
| <211> 15                                                                    |    |
| <212> DNA                                                                   |    |
| <213> Artificial Sequence                                                   |    |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>oligonucleotide |    |
| <400> 36                                                                    |    |
| aaatactgga tgagt                                                            | 15 |

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 37

agtgggtata gctggcac 18

<210> 38

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 38

agctttggaa tgcac 15

<210> 39

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 39

actgccagct caagtgtgtaag ttccagtaac tttcac 36

<210> 40

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 40

aaatccagtc agagtctgct aaacagtaga atccgaaaga actacttggc t 51

<210> 41

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Ala Gln Lys Glu Gly Gly Arg Thr Val Pro Cys Cys Ser Arg Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Ala Ser Trp Ala Ile Val Ala Val Leu Leu Arg Ser Asp Gln

35 40 45

Glu Pro Leu Tyr Pro Val Gln Val Ser Ser Ala Asp Ala Arg Leu Met

50 55 60

Val Phe Asp Lys Thr Glu Gly Thr Trp Arg Leu Leu Cys Ser Ser Arg

65 70 75 80

Ser Asn Ala Arg Val Ala Gly Leu Ser Cys Glu Glu Met Gly Phe Leu

85 90 95

Arg Ala Leu Thr His Ser Glu Leu Asp Val Arg Thr Ala Gly Ala Asn

100 105 110

Gly Thr Ser Gly Phe Phe Cys Val Asp Glu Gly Arg Leu Pro His Thr

115 120 125

Gln Arg Leu Leu Glu Val Ile Ser Val Cys Asp Cys Pro Arg Gly Arg

130 135 140

Phe Leu Ala Ala Ile Cys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Lys Leu Pro Val

145 150 155 160

Asp Arg Ile Val Gly Gly Arg Asp Thr Ser Leu Gly Arg Trp Pro Trp

165 170 175

Gln Val Ser Leu Arg Tyr Asp Gly Ala His Leu Cys Gly Gly Ser Leu

180 185 190

Leu Ser Gly Asp Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Pro Glu Arg

195 200 205

Asn Arg Val Leu Ser Arg Trp Arg Val Phe Ala Gly Ala Val Ala Gln

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Ser | Pro | His | Gly | Leu | Gln | Leu | Gly | Val | Gln | Ala | Val | Val | Tyr | His |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Gly | Gly | Tyr | Leu | Pro | Phe | Arg | Asp | Pro | Asn | Ser | Glu | Glu | Asn | Ser | Asn |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Ile | Ala | Leu | Val | His | Leu | Ser | Ser | Pro | Leu | Pro | Leu | Thr | Glu | Tyr |
| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile | Gln | Pro | Val | Cys | Leu | Pro | Ala | Ala | Gly | Gln | Ala | Leu | Val | Asp | Gly |
| 275 |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Ile | Cys | Thr | Val | Thr | Gly | Trp | Gly | Asn | Thr | Gln | Tyr | Tyr | Gly | Gln |
| 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Ala | Gly | Val | Leu | Gln | Glu | Ala | Arg | Val | Pro | Ile | Ile | Ser | Asn | Asp |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |     |     |
| Val | Cys | Asn | Gly | Ala | Asp | Phe | Tyr | Gly | Asn | Gln | Ile | Lys | Pro | Lys | Met |
| 325 |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Cys | Ala | Gly | Tyr | Pro | Glu | Gly | Gly | Ile | Asp | Ala | Cys | Gln | Gly | Asp |
| 340 |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Gly | Pro | Phe | Val | Cys | Glu | Asp | Ser | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Arg |
| 355 |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Arg | Leu | Cys | Gly | Ile | Val | Ser | Trp | Gly | Thr | Gly | Cys | Ala | Leu | Ala |
| 370 |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Lys | Pro | Gly | Val | Tyr | Thr | Lys | Val | Ser | Asp | Phe | Arg | Glu | Trp | Ile |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |     |     |     |
| Phe | Gln | Ala | Ile | Lys | Thr | His | Ser | Glu | Ala | Ser | Gly | Met | Val | Thr | Gln |
| 405 |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |     |     |     |     |     |     |

Leu

<210> 42

<211> 753

<212> DNA

### <213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 42

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| cgggacacca gcttgggccc gtggccgtgg caagtcagcc ttcgtatga tggagcacac   | 60  |
| ctctgtgggg gatccctgct ctccggggac tgggtgctga cagccgccca ctgcttccc   | 120 |
| gagcggaaac gggctctgtc ccgatggcga gtgtttgccg gtgccgtggc ccaggcctct  | 180 |
| ccccacggtc tgcagctggg ggtgcaggct gtggtctacc acgggggcta tcttcccttt  | 240 |
| cgggacccca acagcgagga gaacagcaac gatattgccc tggtcacact ctccagtccc  | 300 |
| ctgcccctca cagaatacat ccagcctgtg tgcctcccag ctgccggcca ggccctgggtg | 360 |
| gatggcaaga tctgtaccgt gacgggctgg ggcaacacgc agtactatgg ccaacaggcc  | 420 |
| ggggtactcc aggaggctcg agtcccata atcagcaatg atgtctgcaa tggcgtgac    | 480 |
| ttctatgaa accagatcaa gccaagatg tttctgtctg gctaccccga ggggtggcatt   | 540 |
| gatgcctgcc agggcgacag cgggtgtccc tttgtgtgtg aggacagcat ctctcggacg  | 600 |
| ccacgttggc ggctgtgtgg cattgtgagt tggggcactg gctgtgccct ggcccagaag  | 660 |
| ccaggcgtct acaccaaagt cagtgacttc cgggagtgga tcttcaggc cataaagact   | 720 |
| cactccgaag ccagcggcat ggtgaccag ctc                                | 753 |

<210> 43

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 43

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

65                      70                      75                      80  
 Arg Asp Pro Asn Ser Glu Glu Asn Ser Asn Asp Ile Ala Leu Val His  
                          85                      90                      95  
 Leu Ser Ser Pro Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Ile Gln Pro Val Cys Leu  
  
                          100                      105                      110  
 Pro Ala Ala Gly Gln Ala Leu Val Asp Gly Lys Ile Cys Thr Val Thr  
                          115                      120                      125  
 Gly Trp Gly Asn Thr Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln Ala Gly Val Leu Gln  
                          130                      135                      140  
 Glu Ala Arg Val Pro Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Gly Ala Asp  
 145                      150                      155                      160  
 Phe Tyr Gly Asn Gln Ile Lys Pro Lys Met Phe Cys Ala Gly Tyr Pro  
  
                          165                      170                      175  
 Glu Gly Gly Ile Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val  
                          180                      185                      190  
 Cys Glu Asp Ser Ile Ser Arg Thr Pro Arg Trp Arg Leu Cys Gly Ile  
                          195                      200                      205  
 Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys Ala Leu Ala Gln Lys Pro Gly Val Tyr  
                          210                      215                      220  
 Thr Lys Val Ser Asp Phe Arg Glu Trp Ile Phe Gln Ala Ile Lys Thr  
  
 225                      230                      235                      240  
 His Ser Glu Ala Ser Gly Met Val Thr Gln Leu  
                          245                      250  
  
 <210> 44  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                          polypeptide  
 <400> 44  
 Met Leu Tyr Pro Val Gln Val Ser Ser Ala Asp Ala Arg Leu Met Val  
 1                      5                      10                      15

Phe Asp Lys Thr Glu Gly Thr Trp Arg Leu Leu Cys Ser Ser Arg Ser  
20 25 30

Asn Ala Arg Val Ala Gly Leu Ser Cys Glu Glu Met Gly Phe Leu Arg  
35 40 45

Ala Leu Thr His Ser Glu Leu Asp Val Arg Thr Ala Gly Ala Asn Gly  
50 55 60

Thr Ser Gly Phe Phe Cys Val Asp Glu Gly Arg Leu Pro His Thr Gln  
65 70 75 80

Arg Leu Leu Glu Val Ile Ser Val Cys Asp Cys Pro Arg Gly Arg Phe  
85 90 95

Leu Ala Ala Ile Cys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Lys Leu Pro Val Asp  
100 105 110

Arg Leu Val Pro Arg Gly Ser Ile Val Gly Gly Arg Asp Thr Ser Leu  
115 120 125

Gly Arg Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Tyr Asp Gly Ala His Leu  
130 135 140

Cys Gly Gly Ser Leu Leu Ser Gly Asp Trp Val Leu Thr Ala Ala His  
145 150 155 160

Cys Phe Pro Glu Arg Asn Arg Val Leu Ser Arg Trp Arg Val Phe Ala  
165 170 175

Gly Ala Val Ala Gln Ala Ser Pro His Gly Leu Gln Leu Gly Val Gln  
180 185 190

Ala Val Val Tyr His Gly Gly Tyr Leu Pro Phe Arg Asp Pro Asn Ser  
195 200 205

Glu Glu Asn Ser Asn Asp Ile Ala Leu Val His Leu Ser Ser Pro Leu  
210 215 220

Pro Leu Thr Glu Tyr Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Gly Gln  
225 230 235 240

Ala Leu Val Asp Gly Lys Ile Cys Thr Val Thr Gly Trp Gly Asn Thr  
245 250 255

Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln Ala Gly Val Leu Gln Glu Ala Arg Val Pro

260 265 270  
Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Gly Ala Asp Phe Tyr Gly Asn Gln  
275 280 285

Ile Lys Pro Lys Met Phe Cys Ala Gly Tyr Pro Glu Gly Gly Ile Asp  
290 295 300  
Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Cys Glu Asp Ser Ile  
305 310 315 320  
Ser Arg Thr Pro Arg Trp Arg Leu Cys Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr  
325 330 335  
Gly Cys Ala Leu Ala Gln Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Asp  
340 345 350

Phe Arg Glu Trp Ile Phe Gln Ala Ile Lys Thr His Ser Glu Ala Ser  
355 360 365  
Gly Met Val Thr Gln Leu His His His His His His  
370 375 380

<210> 45

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

Met Ala Gln Lys Glu Gly Gly Arg Thr Val Pro Cys Cys Ser Arg Pro  
1 5 10 15

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Ser | Asn | Ala | Arg | Val | Ala | Gly | Leu | Ser | Cys | Glu | Glu | Met | Gly | Phe | Leu |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Arg | Ala | Leu | Thr | His | Ser | Glu | Leu | Asp | Val | Arg | Thr | Ala | Gly | Ala | Asn |  |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |  |
| Gly | Thr | Ser | Gly | Phe | Phe | Cys | Val | Asp | Glu | Gly | Arg | Leu | Pro | His | Thr |  |
|     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |  |
| Gln | Arg | Leu | Leu | Glu | Val | Ile | Ser | Val | Cys | Asp | Cys | Pro | Arg | Gly | Arg |  |
|     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Phe | Leu | Ala | Ala | Ile | Cys | Gln | Asp | Cys | Gly | Arg | Arg | Lys | Leu | Pro | Val |  |
|     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |  |
| Asp | Arg | Ile | Val | Gly | Gly | Arg | Asp | Thr | Ser | Leu | Gly | Arg | Trp | Pro | Trp |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Gln | Val | Ser | Leu | Arg | Tyr | Asp | Gly | Ala | His | Leu | Cys | Gly | Gly | Ser | Leu |  |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |  |
| Leu | Ser | Gly | Asp | Trp | Val | Leu | Thr | Ala | Ala | His | Cys | Phe | Pro | Glu | Arg |  |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Asn | Arg | Val | Leu | Ser | Arg | Trp | Arg | Val | Phe | Ala | Gly | Ala | Val | Ala | Gln |  |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |  |
| Ala | Ser | Pro | His | Gly | Leu | Gln | Leu | Gly | Val | Gln | Ala | Val | Val | Tyr | His |  |
|     |     |     |     | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |  |
| Gly | Gly | Tyr | Leu | Pro | Phe | Arg | Asp | Pro | Asn | Ser | Glu | Glu | Asn | Ser | Asn |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Asp | Ile | Ala | Leu | Val | His | Leu | Ser | Ser | Pro | Leu | Pro | Leu | Thr | Glu | Tyr |  |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Ile | Gln | Pro | Val | Cys | Leu | Pro | Ala | Ala | Gly | Gln | Ala | Leu | Val | Asp | Gly |  |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |  |
| Lys | Ile | Cys | Thr | Val | Thr | Gly | Trp | Gly | Asn | Thr | Gln | Tyr | Tyr | Gly | Gln |  |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |  |
| Gln | Ala | Gly | Val | Leu | Gln | Glu | Ala | Arg | Val | Pro | Ile | Ile | Ser | Asn | Asp |  |
|     |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

Val Cys Asn Gly Ala Asp Phe Tyr Gly Asn Gln Ile Lys Pro Lys Met  
325 330 335

Phe Cys Ala Gly Tyr Pro Glu Gly Gly Ile Asp Ala Cys Gln Gly Asp  
340 345 350

Ser Gly Gly Pro Phe Val Cys Glu Asp Ser Ile Ser Arg Thr Pro Arg  
355 360 365

Trp Arg Leu Cys Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys Ala Leu Ala  
370 375 380

Gln Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Asp Phe Arg Glu Trp Ile  
385 390 395 400

Phe Gln Ala Ile Lys Thr His Ser Glu Ala Ser Gly Met Val Thr Gln  
405 410 415

Leu Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser  
420 425 430

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys  
435 440

<210> 46

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 46

Met Ala Gln Lys Glu Gly Gly Arg Thr Val Pro Cys Cys Ser Arg Pro

1 5 10 15  
Lys Val Ala Ala Leu Thr Ala Gly Thr Leu Leu Leu Thr Ala Ile

20 25 30  
Gly Ala Ala Ser Trp Ala Ile Val Ala Val Leu Leu Arg Ser Asp Gln

35 40 45  
Glu Pro Leu Tyr Pro Val Gln Val Ser Ser Ala Asp Ala Arg Leu Met

50 55 60

Val Phe Asp Lys Thr Glu Gly Thr Trp Arg Leu Leu Cys Ser Ser Arg

65 70 75 80

Ser Asn Ala Arg Val Ala Gly Leu Ser Cys Glu Glu Met Gly Phe Leu

85 90 95

Arg Ala Leu Thr His Ser Glu Leu Asp Val Arg Thr Ala Gly Ala Asn

100 105 110

Gly Thr Ser Gly Phe Phe Cys Val Asp Glu Gly Arg Leu Pro His Thr

115 120 125

Gln Arg Leu Leu Glu Val Ile Ser Val Cys Asp Cys Pro Arg Gly Arg

130 135 140

Phe Leu Ala Ala Ile Cys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Lys Leu Pro Val

145 150 155 160

Asp Arg Leu Val Pro Arg Gly Ser Ile Val Gly Gly Arg Asp Thr Ser

165 170 175

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

180 185 190

Leu Cys Gly Gly Ser Leu Leu Ser Gly Asp Trp Val Leu Thr Ala Ala

195 200 205

His Cys Phe Pro Glu Arg Asn Arg Val Leu Ser Arg Trp Arg Val Phe

210 215 220

Ala Gly Ala Val Ala Gln Ala Ser Pro His Gly Leu Gln Leu Gly Val

225 230 235 240

Gln Ala Val Val Tyr His Gly Gly Tyr Leu Pro Phe Arg Asp Pro Asn

245 250 255

Ser Glu Glu Asn Ser Asn Asp Ile Ala Leu Val His Leu Ser Ser Pro

260 265 270

Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Gly

275 280 285

Gln Ala Leu Val Asp Gly Lys Ile Cys Thr Val Thr Gly Trp Gly Asn

290 295 300

Thr Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln Ala Gly Val Leu Gln Glu Ala Arg Val

305                                      310                                      315                                      320

Pro Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Gly Ala Asp Phe Tyr Gly Asn

325                      330                      335

Gln Ile Lys Pro Lys Met Phe Cys Ala Gly Tyr Pro Glu Gly Gly Ile

340                      345                      350

Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Cys Glu Asp Ser

Ile Ser Arg Thr Pro Arg Trp Arg Leu Cys Gly Ile Val Ser Trp Gly

370                      375                      380

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

Asp Phe Arg Glu Trp Ile Phe Gln Ala Ile Lys Thr His Ser Glu Ala

405                      410                      415

Ser Gly Met Val Thr Gln Leu Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

420 425 430  
Ser Gly Gly Gly Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

435 440 445

&lt;210&gt; 47

<211> 6

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

<220

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

6xHis tag

&lt;400&gt; 47

His His His His His His

1 5

<210> 48

<211> 292

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 48

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Tyr Asp Gly Ala His Leu Cys Gly Gly Ser Leu Leu Ser Gly Asp

35 40 45

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Pro Glu Arg Asn Arg Val Leu

50 55 60

Ser Arg Trp Arg Val Phe Ala Gly Ala Val Ala Gln Ala Ser Pro His

65 70 75 80

Gly Leu Gln Leu Gly Val Gln Ala Val Val Tyr His Gly Gly Tyr Leu

85 90 95

Pro Phe Arg Asp Pro Asn Ser Glu Glu Asn Ser Asn Asp Ile Ala Leu

100 105 110

Val His Leu Ser Ser Pro Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Ile Gln Pro Val

115 120 125

Cys Leu Pro Ala Ala Gly Gln Ala Leu Val Asp Gly Lys Ile Cys Thr

130 135 140

Val Thr Gly Trp Gly Asn Thr Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln Ala Gly Val

145 150 155 160

Leu Gln Glu Ala Arg Val Pro Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Gly

165 170 175

Ala Asp Phe Tyr Gly Asn Gln Ile Lys Pro Lys Met Phe Cys Ala Gly

180 185 190

Tyr Pro Glu Gly Gly Ile Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro

195 200 205

Phe Val Cys Glu Asp Ser Ile Ser Arg Thr Pro Arg Trp Arg Leu Cys

210 215 220

Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys Ala Leu Ala Gln Lys Pro Gly

225 230 235 240

Val Tyr Thr Lys Val Ser Asp Phe Arg Glu Trp Ile Phe Gln Ala Ile  
245 250 255  
Lys Thr His Ser Glu Ala Ser Gly Met Val Thr Gln Leu Gly Thr Gly  
260 265 270  
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Asp Tyr Lys Asp  
275 280 285

Asp Asp Asp Lys  
290

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15