(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0065723
(43) 공개일자 2013년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7011483(분할)
(22) 출원일자(국제) 2004년06월25일
심사청구일자 2013년05월29일
(62) 원출원 특허 10-2012-7019601
원출원일자(국제) 2004년06월25일
심사청구일자 2012년08월23일
(85) 번역문제출일자 2013년05월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/020564
(87) 국제공개번호 WO 2005/012479
국제공개일자 2005년02월10일
(30) 우선권주장
60/483,145 2003년06월27일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
암젠 프레몬트 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 94555, 프레몬트, 카이져 드라이브 6701
(72) 발명자
웨버, 리챠드
미국, 캘리포니아 94116, 샌 프랜시스코, 파체코 스트리트 2537
펭, 쟈오
미국, 캘리포니아 94587, 유니온 씨티, 레드 세더 레인 135
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주양헌

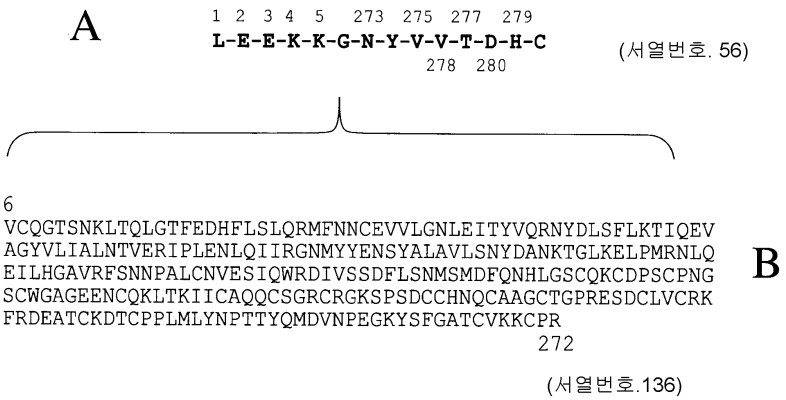
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **상피 성장 인자 수용체의 결실 돌연변이체 지향 항체 및 그 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 항체, 특히 상피 성장 인자 수용체의 결실 돌연변이체 지향성 항체, 및 특히 Ⅲ형 결실 돌연변이체 EGFRvⅢ에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상피 성장 인자 수용체의 결실 돌연변이체에 지향성인 인간 단클론성 항체 및 특히 EGFRvⅢ에 관한 것이다. 이러한 항체의 진단 및 치료 제형, 및 이들 항체의 면역 접합체가 또한 제공된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

푸어드, 오리트

미국, 캘리포니아 94404, 포스터 씨티, 케이만 레인 712

그린, 래리

미국, 캘리포니아 94114, 샌 프랜시스코, 힐 스트리트 464

구다스, 진

미국, 캘리포니아 94560, 뉴워크, 크리스탈 스프링스 드라이브 36178

케이트, 브루스

미국, 캘리포니아 94010, 힐스보로우, 레이크뷰 드라이브 1180

류, 잉

미국, 캘리포니아 94040, 마운틴 뷰, 필리스 애비뉴 1105

라타나스와미, 팔라니

캐나다, 브리티쉬 콜럼비아 브이6피, 4브이7, 밴쿠버, 프렌치 스트리트 7878

라야, 로버트

미국, 캘리포니아 94536, 프레몬트, 그린우드 드라이브 3367

양, 쟈오, 동

미국, 캘리포니아 94306, 팔로 알토, 브라이언트 스트리트 2833

코르발란, 요세

미국, 캘리포니아 94404, 포스터 씨티, 윌리암스 스트리트 125

폴츠, 이안

캐나다, 브리티쉬 콜럼비아 브이5에이 4비9, 버너비, 나이츠우드 플레이스 2108

지아, 쟈오-치

미국, 캘리포니아 94403, 샌 마테오, 머레이 코트 22

캉, 야스팰

캐나다, 브리티쉬 콜럼비아 브이4엔 5에이치6, 써레이, 애비뉴 109 16727

킹, 채드윅, 티.

캐나다, 브리티쉬 콜럼비아 브이4엔 5에치6, 밴쿠버, 니콜라 스트리트, 1501-535

클라캠프, 스콧, 엘.

미국, 캘리포니아 94538, 프레몬트, 쵸핀 테라스 #301 1160

슈, 키아오쥬안, 제인

미국, 캘리포니아 95135, 샌 요세, 필란 웨이 4073

(30) 우선권주장

60/525,570 2003년11월26일 미국(US)

60/562,453 2004년04월15일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 분리된 인간 단클론성 항체(isolated human monoclonal antibody)로서,

상기 중쇄 폴리펩타이드는 서열번호: 2 및 서열번호: 142로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고,

상기 경쇄 폴리펩타이드는 서열번호: 19 및 서열번호: 144로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고,

상기 인간 단클론성 항체는 EEKKGNYVVT(서열번호: 94)를 포함하는 펩티드에 특이적으로 결합하는 것인, 분리된 인간 단클론성 항체.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 실시형태는 신규한 항체, 특히 상피 성장 인자 수용체의 결실 돌연변이체 지향성 항체, 및 특히 Ⅲ형 결실 돌연변이체 EGFRvⅢ에 관한 것이다. 또한, 본 실시형태는 상피 성장 인자 수용체의 결실 돌연변이체에 지향성인 인간 단클론성 항체 및 특히 EGFRvⅢ에 관한 것이다. 또한, 본 실시형태는 이러한 항체의 변이체에 관한 것이다. 이러한 항체의 진단 및 치료 제형, 및 이들 항체의 면역 접합체가 또한 제공된다.

[0002] 본 출원은 2004년 4월 15일자로 출원된 미국 가출원 번호 제 60/562,453호, 2003년 11월 26일자 제 60/525570호 및 2003년 6월 27일자 제 60/483,145호에 대한 우선권을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] 지난 세기 이후로, 인간 및 동물 암의 보다 양호한 진단 및 치료를 보조하기 위한 종양 특이적 분자가 탐구되어 왔다. 분자 구조 데이터를 토대로 하여, 바이러스-유도 암을 기초로 하고 바이러스 게놈에 의해 구체화된 분자 구조를 포함하는 증거를 제외하고는 대부분의 인간 암 유형에서는 종양-특이적 물질의 견고한 증거를 제공하기가 곤란하였다. 신규한 분자 구조를 기반으로 하는 종양-특이적 분자의 예가 극히 드물었다. 유방 암종 및 기타 인간 암종과 같은 상피 성장 인자 수용체 분자에서 증폭 또는 변화와 잠재적으로 관련된 악성 인간 신경교종(glioma) 및 기타 종양의 경우, 고유한 서열로 구조적으로 변경된 분자의 명백한 증거가 전혀 없었다.

[0004] 상피 성장 인자 수용체(EGFR)은 원형-종양 유전자(proto-oncogene) c-erb B의 170 킬로달톤 막 지단백질 산물이다. EGFR 유전자의 서열은 알려져 있다(Ullrich et al.(1984). Human Epidermal Growth Factor Receptor cDNA Sequence and Aberrant Expression of the Amplified Gene in A431 Epidermoid Carcinoma Cells. Nature 309: 418-425). EGFR 유전자는 원래 조류 적아세포증(avian erythroblastosis) 바이러스에서 동정된 erb B 종양 유전자의 세포 동족체(homolog)이다(Downward et al.(1984). Close Similarity of Epidermal Growth Factor Receptor and v-erb B Oncogene Protein Sequence. Nature 307: 521-527, Ullrich, et al.(1984)). 유전자 증폭에 의한 상기 종양 유전자의 활성화는 다양한 인간 종양(Haley et al.(1987A). The Epidermal Growth Factor Receptor Gene in: Oncogenes, Genes, and Growth Factors Edited by: Guroff, G.12th Edition. Chapter 2. pp.40-76. Wiley, N. Y.), 특히 신경교질 세포 유래의 인간 종양(Libermann et al.(1985). Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin. Nature 313: 144-147; Wong et al.(1987). Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6899-6903; Yamazaki et al.(1988). Amplification of the Structurally and Functionally Altered Epidermal Growth Factor Receptor Gene(c-erbB) in Human Brain Tumors. Molecular and Cellular Biology 8: 1816-1820; Malden et al. ,(1988). Selective Amplification of

the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme. Cancer Research 4: 2711-2714)에서 관찰되었다.

[0005] EGF-r은 다양한 유형의 인간 고형 종양에 대해 과발현되는 것으로 증명되었다. Mendelsohn Cancer Cells 7: 359(1989), Mendelsohn Cancer Biology 1: 339-344(1990), Modjtahedi and Dean Int'l J. Oncology 4: 277-296(1994). 예를 들면, EGFR 과발현은 일부 폐, 유방, 결장, 위, 뇌, 방광, 두경부, 난소, 신장 및 전립선 암종에서 관찰되었다. Modjtahedi and Dean Int'l J. Oncology 4: 277-296(1994). 상피 성장 인자(EGF) 및 형질전환 성장 인자-알파(TGF-알파)는 EFG-r에 결합하여 세포 증식 및 종양 성장을 유도하는 것으로 밝혀졌다.

[0006] v-erb B 종양 유전자 및 정상 EGFR 유전자 사이의 주요한 차이점 하나는 바이러스성 종양 유전자가 정상 수용체의 아미노-절단된(truncated) 형태라는데 있으며; 이들은 대부분의 세포외질 도메인이 결여되어 있지만, 막간(transmembrane) 도메인 및 티로신 키나아제 도메인을 보유하고 있다(Fung et al.,(1984) Activation of the Cellular Oncogene c-erb B by LTR Insertion: Molecular Basis for Induction of Erythroblastosis by Avian Leukosis Virus. Cell 33: 357-368; Yamamoto et al. ,(1983). A New Avain Erythroblastosis Virus, AEV-H Carries erbB Gene Responsible for the Induction of Both Erythroblastosis and Sarcoma. Cell 34: 225-232, Nilsen et al.,(1985). c-erbB Activation in ALV-Induced Erythroblastosis: Novel RNA Processing and Promoter Insertion Results in Expression of an Amino-Truncated EGF Receptor. Cell 41: 719-726; Gammett et al.,(1986). Differences in Sequences Encoding the Carboxy-Terminal Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Correlate with Differences in the Disease Potential of Viral erbB Genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6053-6057). 상피 성장 인자(EGF)와 결합할 수 없지만, 여전히 다른 기질을 인산화할 수 있는 단백질을 생성하며(Gilmore et al.,(1985). Protein Phosphorlytion at Tyrosine is Induced by the v-erb B Gene Product in Vivo and In Vitro. Cell 40: 609-618; Kris et al.,(1985). Antibodies Against a Synthetic Peptide as a Probe for the Kinase Activity of the Avian EGF Receptor andv-erB Protein. Cell 40: 619-625), 키나아제 도메인은 조절되지 않고, 구조적으로 활성이기 때문에 v-erb B 단백질은 종양 유전성이 있다고 추측된다(Downward et al., 1984).

[0007] 다양한 유전적 변경, 예를 들면 유전자의 카르복시 말단에서 아미노산 치환 및 결실과 같은 변경이 바이러스성 erb B 종양 유전자에서 발생할 수 있다. 그러나, 입수가능한 증거들은 아미노 절단이 발암(carcinogenesis)에 있어서 중요하다는 것을 입증한다. 아미노 절단은 프로모터 삽입 및 레트로바이러스성 형질도입(transductio n)에 의해 발생하는 종양 유전자를 포함하는 모든 v-erb B 종양 유전자의 특징이다(Nilsen et al., (1985). c-erbB Activation in ALV-Induced Erythroblastosis: Novel RNA Processing and Promoter Insertion Results in Expression of an Amino-Truncated EGF Receptor. Cell 41: 719-726; Gammett et al.,(1986). Differences in Sequences Encoding the Carboxy-Terminal Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Correlate with Differences in the Disease Potential of Viral erbB Genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6053-6057).

[0008] 이에 비해, 카르복시-말단 결실은 레트로바이러스성 형질 전환을 통해 일어나는 종양하고만 관련되어 있는 것으로 보이며, 숙주 범위 및 종양 유형 특이성을 결정하는 것으로 보인다(Gammett et al., 1986; Raines et al.,(1985). c-erbB Activation in Avian Leukosis Virus-Induced Erythroblastosis : Clustered Integration Sites and the Arrangement of Provirus in the c-erbB Alleles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2287-2291). 아미노-절단된 조류 c-erb B 유전자 또는 키메라 바이러스성 종양 유전자-인간 EGF 수용체를 이용한 형질감염(transfection) 실험을 통해 이러한 결실이 형질 전환 단백질을 생성하기에 충분함을 알 수 있다(Pelley et al.,(1988). Proviral-Activatedc-erbB is Leukemogenic but not Sarcomagenic: Characterization of a Replication--Competent Retrovirus Containing the Activatedc-erbB. Journal of Virology 62:1840-1844; Wells et al.,(1988). Genetic Determinants of Neoplastic Transformation by the Retroviral Oncogenev-erbB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7597-7601).

[0009] EGFR 유전자의 증폭은 악성 인간 신경교질 세포의 40%에서 일어난다(Libermann et al.,(1985) Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin. Nature 313: 144-147; Wong et al.,(1987). Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6899-6903). 상기 수용체 유전자의 재배열은 유전자 증폭에 의해 다수의 종양에서 명백히 나타난다. 이러한 구조적 변경은 유전자의 절반인 아미노 말단기에 우선적으로 영향을 미치는 것으로 추측되지만(Yamazaki et al.,(1985). Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of

EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin. Nature 313: 144-147; Malden et al.,(1988). Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme. Cancer Research 4: 2711-2714), 당시에는 이러한 재배열의 속성이 모든 종양에서 정확하게 특성이 규명되지 않았다.

[0010] 크기 변이체 EGFR 유전자 및 증폭이 몇몇 인간 암에서 보고되었다(Humphrey et al.,(1988). Amplification and Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Human Glioma Xenografts. Cancer Research 48: 2231-2238; Bigner et al.,(1988) J. Neuropathol. Exp. Neurol. , 47 : 191-205; Wong et al.,(1987). Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6899-6903; and Humphrey et al. Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts. Cancer Res. 48(8): 2231-8(1988)). 그러나, 세포내 변경된 EGFR 분자에 대한 분자적 기반에 대한 어떠한 결정도 없었다.

[0011] 1989년 Bigner 및 Vogelstein 박사는 연구를 통해 Ⅲ형 돌연변이체(델타-EGFr 또는 EGFrvIII로서 언급되기도 함)로서 알려져 있는 EGF 수용체 돌연변이체의 서열을 밝혔다. 이 연구는 미국 특허 제 6,455,498호, 6,127,126호, 5,981,725호, 5,814,317호, 5,710,010호, 5,401,828호 및 5,212,290호에 기재되어 있다.

[0012] EGFR 변이체는 EGFR 유전자 증폭에 의해 수반되는 유전자 재배열에 의해 유발된다. 다음과 같이 알려져 있는 8개의 주요 EGFr 변이체들이 있다: (i) EGFRvI은 EGFR의 세포외 도메인의 대부분이 결여되어 있으며, (ii) EGFRvII는 EGFR의 세포외 도메인에서 83 aa 인-프레임(in-frame) 결실로 구성되어 있으며, (iii) EGFRvⅢ은 EGFR의 세포외 도메인에서 267 aa 인-프레임 결실로 구성되어 있으며, (iv) EGFRvIV는 EGFR의 세포질 도메인에 결실을 포함하며, (v) EGFRvV는 EGFR의 세포질 도메인에 결실을 포함하며, (vi) EGFR.TDM/2-7은 EGFR의 세포외 도메인에 엑손 2-7의 복제를 포함하며, (vii) EGFR.TDM/18-25는 EGFR의 세포외 도메인에 엑손 18-26의 복제를 포함하며, (viii) EGFR.TDM/18-26는 EGFR의 티로신 키나아제에 엑손 18-26의 복제를 포함하며(Kuan et al. EGF mutant receptor vⅢ as a molecular target in cancer therapy. Endocr Relat Cancer. 8(2): 83-96(2001)). 또한, 엑손 11 및 14의 접합부에서 신규한 히스티딘 잔기를 도입하는 제 2 결실을 갖는 희귀한 제 2의 EGFRvⅢ 돌연변이체(EGFRvⅢ/Δ12-13)가 있다(Kuan et al. EGF mutant receptor vⅢ as a molecular target in cancer therapy. Endocr Relat Cancer. 8(2):83-96(2001)).

[0013] EGFRvⅢ는 인간 암에서 가장 통상적으로 발생하는 상피 성장 인자(EGF)의 변이체이다(Kuan et al. EGF mutant receptor vⅢ as a molecular target in cancer therapy. Endocr Relat Cancer. 8(2): 83-96(2001)). 유전자 증폭 과정 중, 267 아미노산 결실이 종양 특이적 단클론성 항체가 지향될 수 있는 신규 접합부를 생성하는 세포외 도메인에서 발생한다. 이러한 EGFR 수용체의 변이체는 리간드 독립적인 방식으로 구조적 신호화(signaling)를 통해 종양 진행에 기여한다. EGFrVⅢ는 모든 정상 조직에서 발현되는 것으로 알려져 있지 않다(Wikstrand, CJ. et al. Monoclonal antibodies against EGFRJII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas. Cancer Research 55(14): 3140-3148(1995); Olapade-Olaopa, EO. et al. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br J Cancer. 82(1) : 186-94(2000)). 그럼에도 불구하고, EGFRvⅢ는 종양 세포에서 유의적인 발현을 나타내는 바, 예를 들면 27-76% 유방암 생검은 EGFRvⅢ를 발현하고(Wikstrand, CJ. et al. Monoclonal antibodies against EGFRvⅢ are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas. Cancer Research 55(14): 3140-3148(1995); Ge H. et al. Evidence of high incidence of EGFRvⅢ expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis. Int J Cancer. 98(3): 357-61(2002)), 50-70% 신경교질은 EGFRvⅢ을 발현하며(Wikstrand, CJ. et al. Monoclonal antibodies against EGFRVⅢ are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas. Cancer Research 55(14): 3140-3148(1995); Moscatello, G. et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. Cancer Res. 55(23): 5536-9(1995)), 16% NSCL 암은 EGFRvⅢ을 발현하고(Garcia de Palazzo, IE. et al. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. Cancer Res. 53(14): 3217-20(1993)), 75% 난소암은 EGFRvⅢ을 발현하고(Moscatello, G. et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. Cancer Res. 55(23): 5536-9(1995)), 또한 68% 전립선암은 EGFRvⅢ을 발현한다(Olapade-Olaopa, EO. et al. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br J Cancer. 82(1): 186-

94(2000)).

[0014] 글리신 치환을 가진 267개 아미노산의 결실은 항체를 타겟화할 수 있는 고유의 접합부를 형성한다. 또한, 일부 종양에서 EGFRvⅢ의 발현 및 정상 조직에서 발현이 부족하다는 것을 고려하면, EGFRvⅢ는 종양 치료법에서 약물 타겟화를 위한 이상적인 타겟일 수 있다. 특히, EGFRvⅢ는 종양의 면역 접합체 치료법에 대한 이상적인 후보인 것으로 보인다(예를 들면, 혈관신생 억제제 또는 독소에 접합되는 항체). EGFRvⅢ 과발현하는 암을 치료하는 또 다른 방법은 정상 EGFR를 개열하지 않은 변이체 수용체에 특이적으로 타겟되는 종양-특이적 리보자임을 사용하는 것을 포함한다. 이러한 리보자임은 비흉선(athymic) 누드 마우스에서 유방암 성장을 유의적으로 억제하는 것으로 밝혀졌다(Luo et al. Int. J. Cancer. 104(6): 716-21(2003)).

[0015] 전체 EGFRvⅢ 단백질에 대한 일반적인 항체가 기술되어 있다. 국제특허출원 WO 01/62931 and Kuan et al. EGF mutant receptor vⅢ as a molecular target in cancer therapy. Endocr Relat Cancer. 8(2): 83-96(2001), Kuan et al. EGFRvⅢ as a promising target for antibody-based brain tumor therapy. Brain Tumor Pathol. 17(2): 71-78(2000), Kuan et al. Increased binding affinity enhances targeting of glioma xenografts by EGFRvⅢ- specific scFv. International Journal of Cancer. 88(6): 962-969(2000), Landry et al. Antibody recognition of a conformational epitope in a peptide antigen: Fv-peptide complex of an antibody fragment specific for the mutant EGF receptor, EGFRvⅢ. Journal of Molecular Biology. 308(5): 883-893(2001), Reist et al. Astatine-211 labeling of internalizing anti-EGFRvⅢ monoclonal antibody using N-succinimidyl 5-[211At] astato-3-pyridinecarboxylate. Nuclear Medicine and Biology. 26(4): 405-411(1999), Reist et al. In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvⅢ monoclonal antibody: comparison with its murine parent. Nuclear Medicine and Biology. 24(7): 639-647(1997), Wikstrand et al. Generation of anti-idiotypic reagents in the EGFRvⅢ tumor-associated antigen system. Cancer Immunology, Immunotherapy. 50(12): 639-652(2002), Wikstrand et al. Monoclonal antibodies against EGFRvⅢ are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas. Cancer Research. 55(14): 3140-3148(1995), Wikstrand et al. The class Ⅲ variant of the epidermal growth factor receptor(EGFRvⅢ): characterization and utilization as animmunotherapeutic target. J. Neurovirol. 4(2): 148-158(1998), Wikstrand et al. The class Ⅲ variant of the epidermal growth factor receptor(EGFRvⅢ): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. J. Neurovirol. 4(2): 148-158(1998), Jungbluth et al. A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(2):639-44(2003), Mamot et al. Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)-targeted Immunoliposomes Mediate Specific and Efficient Drug Delivery to EGFR-and EGFRvⅢ-overexpressing Tumor Cells. Cancer Research 63: 3154-3161(2003)). 그러나, 상술한 항체 각각은 가변 및/또는 불변 영역에서 쥐의 서열을 갖거나 또는 포함한다. 이러한 쥐 유도 단백질의 존재에 의해 항체가 신속하게 제거되거나 환자에 있어서 항체에 대해 면역 반응이 발생할 수 있다. 또한, 이러한 항체는 친화도 증진(affinity maturation) 이후에도 2.2×10^{-8} 내지 1.5×10^{-9} 정도의 상대적으로 낮은 친화도를 갖는다(Kuan et al. EGF mutant receptorvin as a molecular target in cancer therapy. Endocr Relat Cancer. 8(2):83-96(2001)).

[0016] 쥐 또는 래트 유도된 항체의 이용을 피하기 위해, 연구자들은 설치류로 인간 항체 기능을 도입하여 설치류가 인간 항체를 완전히 생성할 수 있도록 하였다(예를 들면, Mendez et al. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. Nat Genet.15(2): 146-56(1997) 참조). 이러한 접근법은 야생형 EGFR에 지향적인 성공적인 항체의 생성과 관련하여 이용되어 왔다(예를 들면 Yang X et al. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. Crit Rev Oncol Hemato 38(1): 17-23(2001); Yang X-D et al. Eradication of Established Tumors by a Fully Human Monoclonal Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor without Concomitant Chemotherapy. Cancer Research 59(6): 1236-1243(1999); and 미국특허 제 6,235,883호 참조).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 목적은 EGFRvⅢ에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 단클론성 항체를 제공하는 것이다.

[0018] 또한, 본 발명의 다른 목적은 EGFRvⅢ를 발현하는 세포를 유효량의 항체 또는 그의 단편으로 치료하는 것을 포함하는 EGFRvⅢ의 발현과 관련된 세포 증식을 억제하기 위한 방법 및 타겟 세포를 사멸시키기 위한 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 EGFRvⅢ에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 단클론성 항체 및 서열 LEEKKGNYVVTDHC(서열번호: 56)를 포함하는 펩타이드를 포함한다. 또 다른 일실시형태에 있어서, 본 발명은 LEEKKGNYVVTDHC(서열번호: 56)를 포함하는 서열 내에 함유되어 있는 에피토프에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 단클론성 항체를 포함하는 것으로, SPOTs 어레이에서 알라닌 스캐닝법에 의해 결정된 결합에 필요한 잔기는 EEK, KKNYV, LEK, EKNY 및 EEKGN으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0020] 또 다른 실시형태는 VH3-33 유전자에 의해 코딩되는 중쇄(heavy chain) 가변 영역 아미노 서열을 포함하는 분리된 인간 단클론성 항체를 포함한다. 상기 중쇄 가변 영역 아미노 서열은 JH4b 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 D6-13 및 D3-9로 이루어진 군으로부터 선택되는 D 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0021] 또 다른 실시형태는 A23(VK2) 유전자에 의해 코딩되는 경쇄(light chain) 가변 영역 아미노 서열을 포함하는 분리된 인간 단클론성 항체를 포함한다. 상기 경쇄 가변 영역 아미노 서열은 JK1 유전자에 의해 코딩되는 아미노 서열을 포함할 수 있다.

[0022] 다른 실시형태는 EGFRvⅢ와 결합하고, 서열번호: 138, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 및 17로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 095, 250, 139, 211, 124, 318, 342 및 333의 중쇄 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 분리된 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 상기 항체는 단클론성 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 상기 항체 또는 그의 단편은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 결합될 수 있고, 치료제에 접합될 수 있다. 상기 치료제는 독소일 수 있다. 상기 치료제는 DM-1, AEFP, AURISTATIN E 또는 ZAP와 같은 독소일 수 있다. 상기 치료제는 링커(linker)를 통해 항체와 결합될 수 있다. 상기 독소는 제 2 항체를 통해 항체와 결합될 수 있다. 또 다른 실시형태는 항체를 생성하는 하이브리도마(hybridoma) 세포주, 및 항체를 코딩하는 유전자를 포함하는 형질전환 세포를 포함한다. 상기 세포는 예를 들면 중국 햄스터 난소 세포일 수 있다.

[0023] 또 다른 실시형태는 EGFRvⅢ를 발현하는 세포를 유효량의 항체 또는 그의 단편으로 치료하는 것을 포함하는 EGFRvⅢ의 발현과 관련된 세포 증식을 억제하기 위한 방법을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 항체 13.1.2(서열번호:138), 131(서열번호: 2), 170(서열번호: 4), 150(서열번호: 5), 095(서열번호: 7), 250(서열번호: 9), 139(서열번호: 10), 211(서열번호: 12), 124(서열번호: 13), 318(서열번호: 15), 342(서열번호: 16) 및 333(서열번호: 17)의 중쇄 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 아미노산 서열을 포함한다. 상기 방법은 체내에서 수행되거나 또한 폐, 결장, 위, 신장, 전립선, 유방, 교모세포 또는 난소 암종과 같은 상피 세포 증식을 수반하는 암 환자와 같은 포유류를 대상으로 수행될 수 있다.

[0024] 또 다른 실시형태는 타겟 세포를 사멸시키기 위한 방법을 포함한다. 상기 방법은 독소에 결합된 항체와 타겟 세포를 접촉시킴으로써 달성된다. 상기 항체는 펩타이드 LEEKKGNY(서열번호: 133)와 결합한다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 상기 펩타이드에 대해 $1.3*10^{-9}$M가 넘는 결합 친화도를 갖는다. 일실시형태에 있어서, 상기 독소는 AEFP, DM-1 및 ZAP로부터 선택된다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체 독소 화합물은 상기 펩타이드가 없는 세포에 비해 타겟 세포에 대해 10배 이상 독성이 있다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 항체 13.1.2(서열번호: 138), 131(서열번호: 2), 170(서열번호: 4), 150(서열번호: 5), 095(서열번호: 7), 250(서열번호: 9), 139(서열번호: 10), 211(서열번호: 12), 124(서열번호: 13), 318(서열번호: 15), 342(서열번호: 16) 및 333(서열번호: 17)의 중쇄 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 펩타이드 링커 또는 제 2 항체를 통해 독소와 결합된다.

[0025] 본 발명의 또 다른 실시형태는 EGFRvⅢ에 결합하고, 다음과 같은 상보성(complementarity) 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 분리된 항체를 포함한다:

[0026] (a) 서열번호: 138, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 및 17로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 095, 250, 139, 211, 124, 318, 342 및 333의 CDR1 영역에 대한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진 CDR1;

[0027] (b) 서열번호: 138, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 및 17로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 095, 250, 139, 211, 124, 318, 342 및 333의 CDR2 영역에 대한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진 CDR2; 및

[0028] (c) 서열번호: 138, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 및 17로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 095, 250, 139, 211, 124, 318, 342 및 333의 CDR3 영역에 대한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진 CDR3.

[0029] 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 단클론성 항체, 키메라 항체, 인간 또는 인간화된 항체이다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 치료제와 결합된다. 일실시형태에 있어서, 상기 치료제는 독소이다. 일실시형태에 있어서, 상기 독소는 DM-1 또는 Auristatin E이다.

[0030] 또한 EGFRvⅢ와 결합하고, 서열번호: 140, 19, 20, 21, 29, 23, 25, 26, 28, 33, 31 및 32로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 123, 095, 139, 250, 211, 318, 342 및 333의 경쇄 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 분리된 항체 또는 그의 단편이 포함된다. 상기 항체는 단클론성 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체이다. 상기 항체는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 결합되거나 또는 독소와 같은 치료제, 예를 들면 DM-1 또는 Auristatin E에 접합될 수 있다. 일실시형태에 있어서, 서열번호: 140, 19, 20, 21, 29, 23, 25, 26, 28, 33, 31 및 32로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 123, 095, 139, 250, 211, 318, 342 및 333의 경쇄 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주 또는 형질전환 세포가 고려된다.

[0031] 또 다른 실시형태는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주 및 상기 항체를 코딩하는 유전자를 포함하는 중국 햄스터 난소 세포와 같은 형질전환 세포를 포함한다.

[0032] 또 다른 일실시형태는 EGFRvⅢ를 발현하는 세포를 상술한 항체 또는 그의 단편의 유효량으로 치료하는 것을 포함하는, EGFRvⅢ의 발현과 관련된 세포 증식을 억제하기 위한 방법을 포함한다. 상기 방법은 체내에서 수행되거나 또한 폐, 결장, 위, 신장, 전립선, 유방, 교모세포 또는 난소 암종과 같은 상피 세포 증식을 수반하는 암 환자와 같은 포유류에 대해 수행될 수 있다.

[0033] 또 다른 실시형태는 EGFRvⅢ와 결합하고, 다음과 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 분리된 항체를 포함한다:

[0034] (a) 서열번호: 140, 19, 20, 21, 29, 23, 25, 26, 28, 33, 31 및 32로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 123, 095, 139, 250, 211, 318, 342 및 333의 CDR1 영역에 대한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진 CDR1;

[0035] (b) 서열번호: 140, 19, 20, 21, 29, 23, 25, 26, 28, 33, 31 및 32로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 123, 095, 139, 250, 211, 318, 342 및 333의 CDR2 영역에 대한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진 CDR2; 및

[0036] (c) 서열번호: 140, 19, 20, 21, 29, 23, 25, 26, 28, 33, 31 및 32로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 123, 095, 139, 250, 211, 318, 342 및 333의 CDR3 영역에 대한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진 CDR3.

[0037] 상기에서 동정된 항체는 또한 다음과 같은 상보성 결정 영역을 포함하는 중쇄 아미노산 서열을 포함할 수 있다:

[0038] (a) 서열번호: 138, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 및 17로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 095, 250, 139, 211, 124, 318, 342 및 333의 CDR1 영역에 대한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진 CDR1;

[0039] *(b) 서열번호: 138, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 및 17로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 095, 250, 139, 211, 124, 318, 342 및 333의 CDR2 영역에 대한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진 CDR2; 및

[0040] (c) 서열번호: 138, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 및 17로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 095, 250, 139, 211, 124, 318, 342 및 333의 CDR3 영역에 대한 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서

열로 이루어진 CDR3.

[0041] 또 다른 실시형태는 EGFRvⅢ를 발현하는 세포를 상기 항체 또는 그의 단편의 유효량으로 치료하는 것을 포함하는, EGFRvⅢ의 발현과 관련된 세포 증식을 억제하기 위한 방법을 포함한다. 상기 방법은 체내에서 수행되거나 또는 폐 암종, 유방 암종, 두경부암, 전립선 암종 또는 교모세포종과 같은 상피 세포 증식을 포함하는 암에 걸린 인간과 같은 포유류에 대해 수행될 수 있다.

[0042] 다른 실시형태는 서열번호: 138, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 및 17로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 095, 250, 139, 211, 124, 318, 342 및 333의 중쇄 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 아미노산 서열 또는 그의 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 서열번호: 140, 19, 20, 21, 29, 23, 25, 26, 28, 33, 31 및 32으로 동정된 항체 13.1.2, 131, 170, 150, 123, 095, 139, 250, 211, 318, 342 및 333의 경쇄 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 아미노산 서열 또는 그의 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다.

[0043] 다른 실시형태는 용기, 그 안에 함유되는 조성물, 및 패키지 인서트 또는 표지(label)를 포함하는 제조 물품을 포함하는 것으로, 상기 조성물은 상술한 바와 같은 항체를 포함하는 EGFRvⅢ의 발현을 특징으로 하는 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 암은 폐암종, 유방암종, 두경부암, 전립선 암종 또는 교모세포종을 포함한다. 또한 폐, 결장, 위, 신장, 전립선 또는 난소 암종에 대해 스크린하기 위해 포유류 조직 또는 세포에서 EGFRvⅢ 검출용 어세이 키트를 포함하는 것으로, 상기 EGFRvⅢ는 상피암에 의해 발현되는 항원이고, 상기 키트는 항원 단백질에 결합하는 항체 및, 필요에 따라 항원과 항체의 반응을 지시하기 위한 수단을 포함한다. 상기 항체는 표지된 단클론성 항체이거나, 상기 항체는 표지된 제 1 항체일 수 있고, 상기 반응을 지시하기 위한 수단은 항-면역 글로불린인 표지된 제 2 항체를 포함한다. 상기 항원에 결합하는 항체는 형광색소(fluorochrome), 효소, 방사성핵종(Radionuclide) 및 방사선비투과성(radiopaque) 물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 표지자(marker)에 의해 표지될 수 있다. 상기 항원에 결합하는 항체는 또한 과발현된 wtEGFR에 결합할 수 있다. 상기 키트는 환자 선택을 위해 임상적으로 사용될 수 있다.

[0044] 또 다른 실시형태는 신규 Gly 잔기를 함유하는 EGFRvⅢ의 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체를 포함한다.

[0045] 또 다른 실시형태는 EGFRvⅢ의 단백질 변이체를 포함한다. 상기 변이체는 pFLAG 인서트를 포함하고, 서열번호: 56의 아미노산으로 이루어지고, 인 실리코(in silico) 존재할 수 있다.

[0046] 또 다른 실시형태는 인식 서열 EEKKGNYWT(서열번호: 57)에 결합하는 항체 또는 그의 변이체를 포함한다.

[0047] 또 다른 실시형태는 EGFRvⅢ에 특이적으로 결합하는 항체 변이체를 포함한다. 상기 항체 변이체는 서열번호: 57을 포함하는 펩타이드에 더 결합할 수 있다. 상기 항체 변이체는 상기 펩타이드에서 잔기 EKNY 또는 EEKGN와 상호 작용하는 잔기를 가질 수 있다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체 변이체는 야생형 EGFR 단백질에 결합하는 것보다 10배 이상 견고하게 상기 펩타이드 서열에 결합한다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 EGFRvⅢ 및 서열번호: 56의 펩타이드에 특이적으로 결합한다. 일실시형태에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 변이체는 깊은 공동(cavity)을 포함하는 상보성 결정 영역을 가지며, 상기 공동은 상기 중쇄의 CDR2 및 CDR3, 상기 경쇄의 CDR3 및 상기 경쇄의 CDR1의 소부분에 의해 형성된다. 일실시형태에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 변이체는 결합 공동의 5옹스트롬 내에 잔기 31, 37, 95-101, 143-147, 159, 162-166, 169-171, 211-219, 221 및 223을 갖는다. 일실시형태에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 변이체는 좁은 홈(groove)을 포함하는 상보성 결정 영역을 가지며, 상기 홈은 중쇄 CDR2 및 CDR3, 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3에 의해 형성된다. 일실시형태에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 변이체는 결합 홈의 5옹스트롬 내에 잔기 31, 33, 35-39, 51, 54-56, 58-61, 94-101, 144-148, 160, 163-166, 172 및 211-221를 갖는다. 일실시형태에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 변이체는 결합 홈의 5옹스트롬 내에 잔기 31-33, 35, 37, 55, 96-101, 148, 163, 165, 170, 172, 178, 217 및 218를 갖는다. 일실시형태에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 변이체는 파라토프(paratope)를 가지며, 상기 파라토프는 펩타이드 EEKKGN(서열번호 127)의 에피토프가 상기 항체의 상기 파라토프에 결합할 때, 하나 이상의 결합이 E2과 Y172, K3과 H31, K4과 H31, N6과 D33, N6과 Y37, 및 N6과 K55로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개의 잔기 사이에 형성되도록 구성된다. 일실시형태에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 변이체는 파라토프를 가지며, 상기 파라토프는 펩타이드 EEKKGNY(서열번호: 131)의 에피토프가 상기 항체의 상기 파라토프에 결합할 때, 하나 이상의 결합이 K4과 Q95, K4과 Q95, N6과 Q98, G5과 H31, Y7과 H31 및 Y7과 W165로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개의 잔기 사이에 형성되도록 구성된다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 인 실리코 결정되는 구조 또는 그 구조와 상호 작용을 갖는다.

[0048] 또 다른 일실시형태는 특정 결합 특성을 갖는 EGFRvⅢ에 결합하는 변이체를 선택하기 위한 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 파라토프를 형성하기 위한 분자 구조의 사용, 에피토프를 형성하기 위한 분자 구조의 사용, 상기 2 구조 사이의 상호 작용 에너지를 계산하고, 에너지 수준을 상기 에피토프 및 mAb 변이체의 제 2 파라토프의 에너지 수준과 비교하고, 상기 에너지 수준 차이를 토대로 변이체를 선택하는 것을 포함한다. 상기 방법은 파라토프의 제 2 변이체 및 에피토프 사이의 상호 작용 에너지를 이용하여 제 3 상호 작용 에너지를 결정하고, 상기 제 3 상호 작용 에너지를 제 2 상호 작용 에너지와 비교하여 어느 변이체를 선택할지 결정하는 것을 더 포함할 수 있다. 일실시형태에 있어서, 상기 변이체는 생성되고 결합에 대해 시험된다.

[0049] 또 다른 실시형태는 특정 결합 특성을 갖는 EGFRvⅢ에 결합하는 변이체를 선택하기 위한 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 파라토프와 상호 작용하는 에피토프의 잔기를 검사하고, 중요한 잔기를 선택하여 인식 서열을 생성하고, 상기 서열을 사용하여 EGFRvⅢ 변이체를 생성하고, 상기 EGFRvⅢ 변이체를 사용하여 mAb 변이체를 선택하는 것을 포함한다.

[0050] 또 다른 실시형태는 EGFRvⅢ에 항체 변이체를 제조하는 방법을 제공하는 바, 상기 방법은 파라토프와 상호 작용하는 에피토프의 잔기를 분석하고, 에피토프의 보다 중요한 잔기를 선택하여 인식 서열을 생성하고, 상기 인식 서열을 사용하여 EGFRvⅢ 변이체를 생성하고, 상기 EGFRvⅢ 변이체를 사용하여 항체 변이체를 선택하는 것을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체의 선택은 인 실리코로 달성된다. 일실시형태에 있어서, 상기 EGFRvⅢ 변이체를 이용한 항체의 선택은 EGFRvⅢ 변이체에 대한 항체를 증가시킴으로써 달성된다.

[0051] 상기 분리된 항체 변이체가 EGFRvⅢ 및 서열번호: 57의 펩타이드에 결합하는 실시형태에 있어서, 상기 항체는 다음과 같은 점(point) 돌연변이를 더 포함할 수 있다: Tyr172Arg, Leu99Glu, Arg101Glu, Leu217Glu, Leu99Asn, Leu99His, L99T, Arg101Asp, 또는 이들의 일부 조합. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 단클론성 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체이다.

[0052] 일실시형태에 있어서, 상기 항체 또는 그의 변이체는 서열 EEKKGNYVVT(서열번호: 57)에 결합하고, 상기 항체 또는 변이체는 나노몰 이하의(subnanomolar) 결합능을 갖는다.

[0053] 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 항체는 EGFRvⅢ에 결합하고, 상기 항체는 에피토프에 결합하는 파라토프를 가지며, 상기 에피토프는 E, K, N 및 Y를 포함하는 파라토프와 상호 작용하는 잔기 세트를 갖는다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 항체 131이다.

[0054] 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 항체는 EGFRvⅢ에 결합하고, 상기 항체는 E, E, K, G 및 N을 포함하는 파라토프에 상호 작용하는 잔기 세트를 갖는 에피토프에 결합하는 파라토프를 갖는다. 일실시형태에 있어서, 상기 에피토프의 1차 구조는 EEKKGNY(서열번호:131)이다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 13.1.2이다.

[0055] 또 다른 실시형태에 있어서, EGFRvⅢ에 결합하는 항체는 $1.3*10^{-9}$ M 미만, $1.0*10^{-9}$ M, 또는 500 pM 미만의 K_D를 갖는다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 야생형 EGFR 펩타이드에 비해 서열번호: 56에 대해 더욱 특이적이다. 일실시형태에 있어서, 야생형 EGFR 펩타이드(서열번호: 134)에 대한 상기 항체의 비특이적 결합은 EGFRVⅢ(서열번호: 135)에 대한 상기 항체의 특이적 결합에 대해 10% 미만이다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 131, 139 및 13.1.2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 내재화(internalization)되어 있다. 일실시형태에 있어서, 상기 내재화는 상기 항체의 약 70% 이상 또는 약 80%에 대해 발생한다.

[0056] 일실시형태에 있어서, 상기 변이체 인간 단클론성 항체는 야생형 EGFR 단백질 또는 그의 변이체(서열번호: 134)에 비해 EGFRvⅢ 단백질에 실질적으로 고유한 에피토프에 우선적으로 결합한다. 일실시형태에 있어서, 상기 변이체는 표준(canonical)형 1에 해당하는 중쇄 상보성 결정 영역(CDR1)을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 변이체는 표준형 3에 해당하는 중쇄 상보성 결정 영역(CDR2)을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 변이체는 표준형 4에 해당하는 경쇄 상보성 결정 영역(CDR1)을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 변이체는 표준형 1에 해당하는 경쇄 상보성 결정 영역(CDR2)을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 변이체는 표준형 1에 해당하는 경쇄 상보성 결정 영역(CDR3)을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 변이체는 표준형 1에 해당하는 제 1 중쇄 상보성 결정 영역(CDR1), 표준형 3에 해당하는 제 2 중쇄 상보성 결정 영역(CDR2), 표준형 4에 해당하는 제 1 경쇄 상보성 결정 영역(CDR2), 표준형 1에 해당하는 제 2 경쇄 상보성 결정 영역(CDR2), 및 표준형 1에 해당하는 제 3 경쇄 상보성 결정 영역(CDR3)을 포함하며, 상기 상보성 결정 영역들은 상기 변이체가 EGFR 단백질에 비해 EGFRvⅢ 단백질에 실질적으로 고유한 에피토프와 결합하도록 구성된다.

발명의 효과

[0057] 본 발명의 EGFRvⅢ에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 단클론성 항체는 EGFRvⅢ의 발현을 특징으로 하는 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 암은 폐암종, 유방암종, 두경부암, 전립선 암종 또는 교모세포종을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 267 아미노산 결실 및 G 치환을 나타내는 야생형 EGFR 및 EGFRvⅢ 간의 정렬을 나타내는 도면이다.

도 2는 EGFRvⅢ PEP3 14-mer 펩타이드의 디자인을 나타내는 도면이다. 도 2A에서, EGFR의 N-말단 서열과 동일한 N-말단 서열 LEEKK(서열번호: 58)(1-5)을 가진 EGFRvⅢ의 N-말단 서열, 고유한 글리신 잔기, EGFR에서 잔기 273 내지 280과 동일한 아미노산을 차례로 나타낸다. 도 2B는 EGFRvⅢ(6-272)에서 결실되는 EGFR의 아미노산을 나타낸다.

도 3a-l은 본 발명에 따른 항체의 서열을 제공한다. 제공되어 있는 각 항체에 대해, 중쇄 및 경쇄 변이 영역에 대해 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 제공되어 있다. 따라서, 4개의 서열이 나열되어 있는 모든 항체에 대해 제공되어 있다.

도 4는 13.1.2 항체 중쇄 영역을 특정 배선(germ line) 중쇄 영역과 비교한 표이다. "-"는 하이브리도마 중쇄 영역의 아미노산 잔기가 상기 특정 위치에 대한 배선과 동일함을 나타낸다. 상기 배선으로부터의 편차는 적절한 아미노산 잔기에 의해 나타난다.

도 5는 13.1.2 항체 경쇄 영역을 특정 배선 경쇄 영역과 비교한 표이다. "-"는 하이브리도마 경쇄 영역의 아미노산 잔기가 상기 특정 위치에 대한 배선과 동일함을 나타낸다. 상기 배선으로부터의 편차는 적절한 아미노산 잔기에 의해 나타난다.

도 6은 다양한 하이브리도마 유도 항체 중쇄 영역을 특정 배선 중쇄 영역과 비교한 표이다. "-"는 하이브리도마 중쇄 영역의 아미노산 잔기가 상기 특정 위치에 대한 배선과 동일함을 나타낸다. 상기 배선으로부터의 편차는 적절한 아미노산 잔기에 의해 나타난다.

도 7은 다양한 하이브리도마 유도 항체 경쇄 영역을 특정 배선 경쇄 영역과 비교한 표이다. "-"는 하이브리도마 경쇄 영역의 아미노산 잔기가 상기 특정 위치에 대한 배선과 동일함을 나타낸다. 상기 배선으로부터의 편차는 적절한 아미노산 잔기에 의해 나타난다.

도 8은 EGFRvⅢ를 발현하는 세포(NR6 세포)에 대한 재조합 EGFRvⅢ mAb의 결합을 나타내는 대표도이다. 마름모는 95를 나타내고, 삼각형은 133을 나타내며, 정사각형은 139를 나타내고, "x"는 150을 나타내며, 별표는 170을 나타내고, 원은 221을 나타내며, 선은 230을 나타내고, 직사각형은 250을 나타낸다.

도 9a는 H80에 대한 인간 항-EGFR 항체(ABX-EGF)의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9b는 H80에 대한 항체 131의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9c는 H80에 대한 항체 139의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9d는 H80에 대한 항체 131.1.2의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9e는 H1477에 대한 항체 ABX-EGF의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9f는 H1477에 대한 항체 131의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9f는 H1477에 대한 항체 139의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9h는 H1477에 대한 항체 13.1.2의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9i는 A549에 대한 항체 ABX-EGF의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9j는 A549에 대한 항체 131의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9k는 A549에 대한 항체 139의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9l은 A549에 대한 항체 131.1.2의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 9m은 교모세포종 세포에 대한 EGFRvⅢ mAb의 결합을 보여주는 그래프이다. 검정 삼각형은 H1477에 결합하는 항체 131을 나타낸다. 검정 정사각형은 H1477에 결합하는 항체 13.1.2를 나타낸다. 백색 삼각형은 H80에 결합하는 항체 131을 나타낸다. 백색 정사각형은 H80에 결합하는 항체 13.1.2를 나타낸다.

도 9n은 인간 표피 암종 세포주 A431에 대한 EGFRvⅢ mAb의 결합을 보여주는 그래프이다. 검정 정사각형은 항체 13.1.2을 나타낸다. 검정 삼각형은 항체 131을 나타낸다.

도 9o는 NR6 쥐 섬유 아세포 세포주에 대한 항체 13.1.2의 결합을 보여주는 그래프이다. 정사각형은 NR6를 나타낸다. 삼각형은 야생형 EGFR와 함께 NR6를 나타낸다. 원은 EGFRvⅢ와 함께 NR6을 나타낸다.

도 9p는 쥐 섬유 아세포 세포주에 대한 항체 131의 결합을 보여주는 그래프이다. 정사각형은 NR6를 나타낸다. 삼각형은 야생형 EGFR와 함께 NR6를 나타낸다. 원은 EGFRvⅢ와 함께 NR6를 나타낸다.

도 10a는 EGFR를 발현하는 세포(A431)에 결합하는 인간 항-EGFR 항체(ABX-EGF)의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 10b는 EGFR를 발현하는 세포(A431)에 대한 항체 131의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 10c는 EGFR를 발현하는 세포(A431)에 대한 항체 139의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 10d는 EGFR를 발현하는 세포(A431)에 대한 항체 13.1.2의 FACS 염색 분석을 나타낸다.

도 11은 항체 131 구조 모델의 분자 표면을 나타낸다. 6개의 CDR은 서로 다른 색조로 음영 처리되어 그 경계가 확연하다. 결합 공동은 중심 가까이에 위치해 있다.

도 12는 항체 13.1.2의 분자 표면의 구조 모델을 나타낸다. 6개의 CDR 영역은 음영 처리되어 있으며, 숫자에 의해 식별된다. 긴 홈은 수직 중심선 가까이에 위치해 있다.

도 13a는 13.1.2 항체 및 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127) 복합체의 가능한 도킹(docking) 모델이다. CDR 영역은 음영 처리되어 경계가 표시된다.

도 13b는 13.1.2 항체 및 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127) 복합체의 도킹 모델에서 수소 결합을 나타낸다. CDR 루프(loop) 및 잔기의 음영 처리는 도 12와 동일하다. 펩타이드 잔기는 도면의 상부에서 N-말단으로부터 C-말단으로 1 내지 6의 숫자로 표시되어 있다. 6개의 수소 결합은 파선에 의해 표시되어 있다. 수소 결합을 형성하는 6쌍의 아미노산은 다음과 같다: E2... Y172, K3...H31, K4...H31, N6... D33, N6... Y37 및 N6... K55.

도 14는 에피토프-항체 결합 에너지와 선택된 도킹 모델 중 하나에 대한 Kd의 로그함수 사이의 상관관계를 나타내는 그래프이다.

도 15은 펩타이드-13.1.2 항체 복합체에 대한 정교한 도킹 모델의 도면이다. 상기 펩타이드는 공간-채워지는 방식으로 표시된다.

도 16은 정교한 도킹 모델에서 수소 결합을 나타내는 도면이다.

도 17은 항체-항원 결합 에너지 대 상대적 친화도의 로그함수의 선형 피팅(fitting)을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 위에서 논의한 바와 같이, EGFRvⅢ는 EGFR의 세포외 도메인에서 267 아미노산이 접합부에서 글리신의 단일 아미노산 치환과 함께 결실되어 있는 EGFR의 결실 돌연변이체이다. 이러한 특징들은 도 1에서 야생형 EGFR 및 EGFRvⅢ 사이의 서열 정렬도에 표시되어 있다. 결실 접합부에서 글리신의 아미노산 치환을 고려하면, 야생형 EGFR에는 존재하지 않는 EGFRvⅢ에 존재하는 신규 에피토프에 대한 항체를 이론적으로 생성시킬 수 있게 된다. 따라서, 도 2에 도시한 바와 같이, PEP3으로 명명된 펩타이를 면역화 및 스크리닝을 위해 디자인하였다(Kuan et al. EGF mutant receptor vⅢ as a molecular target in cancer therapy. Endocr Relat Cancer. 8(2): 83-96(2001)). 이러한 14-mer 펩타이드는 EGFRvⅢ 및 야생형 EGFR에 공통적인 5n-말단 아미노산, 고유 글리신 접합 부위, 및 야생형 EGFR(잔기 273-280에 해당) 및 EGFRvⅢ(잔기 7-14에 해당) 사이의 보존된 서열에 함유되어 있는 8개의 아미노산 잔기를 갖는다. 또한, 교모세포종 세포 및 EGFRvⅢ를 코딩하는 유전자로 형질감염된 세포(B300.19 세포)가 또한 면역화 및 스크리닝을 위해 사용되었다(때때로, 본 명세서에서 B300.19/EGFRvⅢ 형질감염체로 언급함).

[0060] EGFRvⅢ에 대한 인간 항체를 형성하기 위해, 트랜스제닉 XenoMouse® 마우스를 교모세포종 세포/EGFRvⅢ,

B300.19/EGFRvⅢ 세포 및 야생형 EGFR에 비해 EGFRvⅢ으로 표시되는 신규 세포외 도메인에서 접합부 영역에 대해 지향성인 펩타이드(PEP3)의 복합체로 면역화시켰다. 면역화된 마우스로부터 B 세포를 분리하여 사용하여 하이브리도마를 형성한 후, EGFRvⅢ에 결합시키기 위한 스크리닝 또는 XenoMax™/SLAM™ 기술을 사용하여 EGFRvⅢ에 결합시키기 위한 스크리닝에 직접 사용된다(Babcook et al. A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(15): 7843-8(1996), and 미국 특허 5,627,052). EGFRvⅢ에 결합되는 동정된 항체를 일련의 분석에서 스크리닝하여 EGFRvⅢ의 특이적 인식을 확인하였다. 상기 과정을 통해, EGFRvⅢ에 결합하고 특이적인 인간 단클론성 항체의 패널(panel)을 형성하고, 분리하고, 특성을 규명하였다. 후속 에피토프 매핑을 통해 독창적이지만 오버래핑(overlapping) 특이성이 있다는 것을 증명하였다. 또한, 모든 항체를 세포에 세포 독성 약물을 전달할 목적으로 세포에 의해 내재화되는 항체 능력에 대해 시험관내 평가하였다. 효율적인 약물 전달을 증명하기 위한 항체를 직접 세포 독성 약물에 접합시키고, EGFRvⅢ을 시험관내 및 체내 발현시키는 종양 세포를 사멸시킬 수 있는 능력을 조사하였다. 이러한 연구는 종양 잠복(harbor) 특이적 유전적 병변을 가진 환자의 암을 치료하기 위한 항체 약물 접합체의 후속 생성을 위한 기초로 제공된다.

[0061] 상술한 과정을 통해, 완전 인간 항-EGFRvⅢ 항체의 패널을 형성하였다. 상기 하이브리도마 접근법을 이용하여, PEP3와의 결합에 대한 ELISA에 대해 양성인 항체 13.1, 13.2, 13.3 및 13.4를 포함하고, 야생형 EGFR와 제한된 교차-반응성(cross-reactivity)을 갖는 몇몇 항체를 형성하였다. 이들 중에서, 항체 13.1(특히 그의 서브클론(subclone) 13.1.2)을 추가적인 연구 개발을 위해 선택하였다. XenoMax 접근법을 이용하여, PEP3 올리고뉴클레오티드와 결합에 대해 매우 특이적이고, 야생형 EGFR와 제한된 교차 반응성을 갖는 항체 131,139, 250 및 095를 포함하는 항체의 패널을 형성하였다. 이들 중에서, 131 항체는 매우 중요한 특성을 갖는다. 상기 각각의 항체에 대한 서열을 도 4 내지 도 7에 나타내었다(서열번호: 1-33 및 141-144). 상기 서열 및 여러 가지 항체의 결합능을 비교하고, 그 결과를 도 4 내지 도 10에 나타내었다. 도 9A 내지 도 9L 및 도 10A 내지 10D에서 알 수 있는 바와 같이, 항체 131, 139 및 13.1.2 모두는 ABX-EGF와 비교하여 EGFRvⅢ를 발현하는 세포(H1477)에 대해 우수한 선택성을 증명하고 있다. 이들 결과 중 일부를 도 9M 내지 도 9P에 그래프로서 나타내었으며, 이 그래프는 항체 13.1.2 및 131 2개 이상은 단순히 EGFRvⅢ 세포와 비교하여 EGFRvⅢ를 발현하는 세포에 대한 우수한 특이성이 있음을 증명하고 있다. 최종적으로, 예측 구조 모델을 토대로, 변경된 결합 특성을 갖는 항체를 얻기 위해 항체의 변이체를 만들었다.

[0062] 또한, 본 발명의 항체는 동일 또는 유사한 에피토프와 결합하는 다른 항체를 스크리닝하는데 매우 유용하다. 본 발명의 항체는 형성되는 항원-항체 복합체의 특성에 대해 동일하거나 개선된 효과를 가질 것으로 기대되는 다른 항체의 규명을 위한 교차 경쟁(cross competition) 연구에서 활용될 수 있다.

[0063] 131 항체 및 13.1.2 각각은 EGFRvⅢ에 대한 매우 높은 친화도를 가지며, 세포에 의해 잘 내재화되며, 독소와 조합시 세포 사멸에 있어 매우 유효한 것으로 예측되었다. 흥미로운 것은, 상기 2개의 항체는 XenoMouse 마우스의 서로 다른 면역화 및 상이한 기술을 이용하여 형성되었음에도 불구하고, 매우 유사한 배선 유전자로부터 유도되었다. 그러나, 에피토프 매핑 작업을 토대로, 각 항체는 EGFRvⅢ 분자에 대해 약간씩 다른 에피토프와 결합하는 것으로 보이며, EGFRvⅢ 분자에 대해 약간 다른 잔기를 가지며, 결합에 필수적인 EGFRvⅢ에 대해 약간 다른 잔기를 갖는다. 이러한 결과를 통해, 배선 유전자 활용은 EGFRvⅢ를 타겟으로 하는 항체 치료제의 생산에 있어 중요하며, 구조적 발견을 토대로 작은 변화가 항체의 결합 및 효과를 변형시켜 항체의 또 다른 디자인 및 다른 치료제가 가능함을 알 수 있다.

[0064] 13.1.2 및 131 항체로서 동일한 에피토프에 결합하거나 또는 이들 항체와 결합에 대해 경쟁하는 항체가 매우 바람직하다. 이하 상세히 논의하는 바와 같이, SPOTs 어레이에 대한 알라닌 스캐닝을 통해 임의의 항체의 결합에 대해 중요한 잔기가 밝혀졌다. 따라서, 중요한 결합 잔기를 공유하는 항체 또한 매우 바람직하다.

[0065] 정의

[0066] 특별히 정의하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 과학 및 기술 용어들은 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 또한, 문맥에 의해 필요로 하지 않는 이상, 단수 용어는 복수를 포함하며, 복수 용어는 또한 단수 용어를 포함한다. 일반적으로, 본 명세서에 기재되어 있는 세포 및 조직 배양, 분자 생물학 및 단백질 및 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드 화학 및 혼성화 기술 및 이들의 관련 기술에서 사용되는 명명법은 본 기술 분야에 잘 알려져 있으며 통상적으로 사용되고 있다. 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환(예를 들면, 전기영동, 리포좀 감염(lipofection))을 위한 표준 기술이 사용된다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조자의 규격에 따라 또는 본 기술 분야에서 통상적으로 달성되거나 또는 본 명세서에 기재된 바대로 수행

된다. 상술한 기술 및 절차는 본 기술 분야에 잘 알려져 있는 종래의 방법에 따라 또한 본 명세서를 통해 인용되고 논의되어 있는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 인용 문헌에 기재된 바대로 일반적으로 수행된다. 예를 들면, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Mannual(2d ed. , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989) 참조. 본 명세서에 기재되어 있는 실험 절차 및 분석 화학, 합성 유기 화합 및 의학 및 약제 화학 기술 및 이들의 관련 기술에 사용되고 있는 명명법은 본 기술 분야에 공지되어 있으며 통상적으로 사용되고 있다. 표준 기술은 화학 합성, 화학 분석, 약제학적 제제, 제형 및 전달 및 환자의 치료를 위해 사용된다.

[0067] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "분리된 폴리뉴클레오티드"는 게놈, cDNA 또는 합성 기원 또는 이들의 일부 조합을 의미하며, "분리된 폴리뉴클레오티드"는 그 기원에 의하면 (1) 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드의 모두 또는 일부와 관련이 없거나, (2) 자연 중에서 연관되지 않는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연관되거나, 또는 (3) 보다 큰 서열의 일부로서 자연 중에서 발생하지 않는다.

[0068] 본 명세서에서 언급되어 있는 용어 "분리된 단백질"은 cDNA, 재조합 RNA 또는 합성 기원 또는 이들의 일부 조합을 의미하며, "분리된 단백질"은 그 기원 또는 유도 소스에 의하면 (1) 자연에서 발견되는 단백질과 관련이 없거나, (2) 예를 들면 쥐 단백질과 같은 동일한 소스로부터 다른 단백질이 없거나, (3) 상이한 종의 세포에 의해 발현되거나, 또는 (4) 자연 중에서 발생하지 않는다.

[0069] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "폴리펩타이드"는 천연 단백질, 단편, 또는 폴리펩타이드 서열의 유사체를 의미한다. 따라서, 천연 단백질, 단편 및 유사체는 폴리펩타이드 속의 종들이다. 본 발명에 따른 바람직한 폴리펩타이드는 인간 중쇄 면역 글로불린 분자 및 인간 카파 경쇄 면역 글로블린 분자를 포함할 뿐 아니라, 상기 중쇄 면역 글로불린 분자와 예를 들면 카파 경쇄 면역 글로불린 분자 또는 람다 경쇄 면역 글로불린 분자와 같은 경쇄 면역 글로불린 분자를 포함하는 조합에 의해 형성되는 항체 분자, 및 그 반대, 뿐 아니라 이들의 단편 및 유사체를 포함한다.

[0070] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "자연 발생"은 물체에 적용되는 것으로, 물체가 자연 중에서 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들면, 자연 중의 소스로부터 분리될 수 있고, 인간에 의해 실험실 또는 그 외 다른 장소에서 의도적으로 변형되지 않은 유기체(바이러스 포함)에 존재하는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연 발생이다.

[0071] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "작동적으로 연관된"은 성분의 위치를 의미하는 것으로, 이들의 의도된 방식으로 작동하도록 하는 관계에 있다. 코딩 서열에 "작동적으로 연관된" 대조 서열은 상기 코딩 서열의 발현이 상기 대조 서열과 친화성이 있는 조건하에서 달성되도록 결찰(ligation)된다.

[0072] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "대조 서열"은 이들이 결찰되어 있는 코딩 서열의 발현 및 진행을 수행하기에 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 이러한 대조 서열의 속성은 숙주 유기체에 따라 다르다; 원핵생물에서는 이러한 대조 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결 서열을 포함하며; 진핵생물에서는 일반적으로 이러한 대조 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "대조 서열"은, 최소한, 발현 및 진행을 위해 그 존재가 필수인 모든 성분을 포함하며, 또한 그 존재가 유리한 추가적인 성분, 예를 들면 리더(leader) 서열 및 융합 파트너(fusion partner) 서열을 포함할 수도 있다.

[0073] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "폴리뉴클레오티드"는 길이가 10 염기 이상인 뉴클레오티드의 중합체 형태, 리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드 또는 이들 뉴클레오티드 유형의 변형을 의미한다. 상기 용어는 DNA의 단일 및 이중 가닥 형태를 포함한다.

[0074] 상기 용어 "올리고뉴클레오티드"는 자연 발생, 및 자연 발생 및 비-자연 발생 올리고뉴클레오티드 연관에 의해 함께 연관되는 변형 뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 길이가 200 이하 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서브세트이다. 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 길이가 10 내지 60 염기 및 가장 바람직하게는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 내지 40 염기이다. 올리고뉴클레오티드는 통상적으로 예를 들면 프로브에 대해 단일 가닥이며; 올리고뉴클레오티드가 예를 들면 유전자 돌연변이의 구성을 위해 사용하기 위한 2중 가닥일 수도 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0075] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "자연 발생 뉴클레오티드"는 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함한다. 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "올리고뉴클레오티드 연관"은 포스포로티오에이트, 포스포로디티

오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐라데이트, 포스포로아미데이트 등과 같은 올리고뉴클레오티드 연관을 포함한다(예를 들면, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14: 9081(1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106: 6077(1984); Stein et al. Nucl. Acids Res. 16: 3209(1988); Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6: 539(1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108(F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England(1991)); Stec et al. 미국특허 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90: 543(1990) 참조). 필요한 경우, 올리고뉴클레오티드는 검출용 표지를 포함할 수 있다.

[0076] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "변이체"은 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드와 다른 분자이지만, 단 단백질의 활성은 유해적으로 변경되지 않는다. 에피토프의 변이체일 수 있다. 항체의 변이체일 수도 있다. 바람직한 일실시형태에 있어서, 에피토프에 결합하는 단백질 변이체의 능력은 유해적으로 변경되지 않는다. 일실시형태에 있어서, 상기 단백질 변이체는 야생형 mAb의 능력의 10-500%으로 결합할 수 있다. 예를 들면, 상기 단백질은 야생형 mAb의 능력의 10%, 50%, 110%, 500% 이상으로 결합할 수 있다. 일실시형태에 있어서, 10-500% 사이의 결합능 범위가 포함된다. 결합능은 에피토프에 대한 변이체의 k_a, k_d 또는 K_D를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다양한 방법으로 반영될 수 있다. 바람직한 일실시형태에 있어서, 상기 에피토프는 본 명세서에 기재되어 있는 에피토프이다.

[0077] 일실시형태에 있어서, 변이체 항체는 5개 아미노산 이하의 치환, 결실 또는 부가에 의해 야생형 서열과 상이할 수 있다. 이러한 변이체는 일반적으로 개시된 폴리펩타이드 서열 중 하나를 변형시키고, 예를 들면 본 명세서에 기재되어 있는 대표적인 절차를 이용하여 변형 폴리펩타이드의 결합 특성을 평가함으로써 동정될 수 있다. 또 다른 일실시형태에 있어서, 폴리펩타이드 변이체는 동정된 폴리펩타이드에 대해 바람직하게는 약 70% 이상, 보다 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 동일성을 나타낸다. 바람직하게는, 상기 변이체는 보존성 치환 및/또는 변형에서만 상이하다. 변이체 단백질은 본 명세서에 기재되어 있는 단백질 구조와 구조적으로 유사하고, 기능적으로 동일한 단백질을 포함한다. 또 다른 일실시형태에 있어서, 상기 단백질은 변이체의 파라토프가 본 명세서에 기재되어 있는 파라토프와 유사하다면, 본 명세서에 기재되어 있는 단백질과 기능적으로 동일한 변이체이다. 일실시형태에 있어서, 도 11에 기재되어 있는 파라토프와 유사한 형상을 가진 임의의 물질은 변이체이다. 일실시형태에 있어서, 도 12에 기재되어 있는 파라토프와 유사한 형상을 가진 임의의 물질은 변이체이다. 일실시형태에 있어서, 도 13A 및 13B에 기재되어 있는 상호 작용 표면과 유사한 형상을 가진 임의의 물질은 변이체이다.

[0078] 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 상기 핵산 서열이 스트린전트(stringent) 조건하에서 야생형 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있는 경우 변이체이다. 일실시형태에 있어서, 적절한 스트린전트 조건은 5xSSC; 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA(pH 8:0)의 용액 중에서 예비-세척하고, 50-65℃에서 5xSSC로 밤새 혼성화하거나 교차-종 상동성의 경우 45℃에서 0.5xSSC로 혼성화한 후; 0.1% SDS를 함유하는 2x, 0.5x 및 0.2xSSC 각각으로 20분 동안 65℃에서 2번 세척하는 것을 포함한다. 이러한 혼성화 DNA 서열은 또한 본 발명의 범위 내이기도 하고, 코드 축퇴에 의해 DNA 서열을 혼성화함으로써 코딩되는 항체 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이다. 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "선택적으로 혼성화"는 검출할 수 있게 특이적으로 결합하는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 및 이들의 단편은 비-특이적 핵산에 검출 가능한 결합의 상당량을 최소화하는 혼성화 및 세척 조건하에서 핵산 가닥에 선택적으로 혼성화한다. 본 기술 분야에서 공지되고 또한 본 명세서에 논의되는 선택적인 혼성화 조건을 달성하기 위해 높은 스트린전시 조건이 사용될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 및 이들의 단편 사이의 핵산 서열 상동성, 및 대상 핵산 서열은 80% 이상일 것이고, 보다 전형적으로는 85%, 90%, 95%, 99% 및 100% 이상으로 점차 증가하는 상동성을 갖는다. 이들의 서열간 부분 또는 완전 동일성이 있다면, 2개의 아미노산 서열은 상동성이다. 예를 들면, 85% 상동성은 2개의 서열이 최대 매칭을 위해 정렬될 때 아미노산의 85%가 동일함을 의미한다. 갭(2개 중 하나의 서열에서 매칭됨)은 최대 매칭이 가능하고; 5 이하의 갭 길이가 바람직하고, 2 이하가 더욱 바람직하다. 이와 달리 또한 바람직하게는, 2개의 단백질 서열(또는 이들로부터 유도되는 길이 30 이상의 아미노산의 폴리펩타이드 서열)이 돌연변이 데이터 매트릭스 및 갭 페널티 6 이상을 갖는 프로그램 ALIGN를 사용하여 5를 넘는 정렬 스코어를 갖는다면(표준 유도화 유닛에서), 2개의 단백질 서열은 상동성이 있다. Dayhoff, M. O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110(Volume 5, National Biomedical Research Foundation(1972)) and Supplement 2 to this volume, pp.1-10 참조. 상기 2개의 서열 또는 이들의 일부는 이들의 아미노산이 ALIGN 프로그램을 사용하여 적절히 정렬될 때 동일한 50% 이상인 경우, 보다 바람직하게 상동성이다. 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "해당함"은 폴리뉴클레오티드 서열이 대조 폴리뉴클레오티드 서열의 모두 또는 일부

에 상동적이거나(즉, 동일하지만, 엄밀히 점진적으로 관련됨), 또는 폴리펩타이드 서열이 대조 폴리펩타이드 서열과 동일함을 의미한다. 이에 반해, 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "상보적"은 상보 서열이 대조 폴리뉴클레오티드 서열의 모두 또는 일부에 대해 상동적임을 의미한다. 예시적으로, 뉴클레오티드 서열 "TATAC"는 대조 서열 "TATAC"에 해당하고, 대조 서열 "GTATA"에 상보적이다.

[0079] 다음과 같은 용어들은 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 서열 관계를 기재하기 위해 사용된다: "대조 서열", "비교 윈도우", "서열 동일성", "서열 동일성의 비율" 및 "실질적 동일성". "대조 서열"은 서열 비교를 위한 기초로서 사용되는 정의된 서열이고; 대조 서열은 예를 들면 전장 cDNA 또는 서열 목록에 나타난 유전자 서열의 단편으로서 보다 큰 서열의 서브 세트이거나, 완전 cDNA 또는 유전자 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 대조 서열은 길이가 18 뉴클레오티드 또는 6 아미노산 이상이며, 가끔은 길이가 24 뉴클레오티드 또는 8 아미노산 이상이며, 종종 길이가 48 뉴클레오티드 또는 16 아미노산 이상이다. 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열은 각각 (1) 2개의 분자 사이에 유사한 서열(즉, 완전 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 일부)을 포함하고, (2) 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이에 분기된(divergent) 서열을 더 포함할 수 있기 때문에, 2개(또는 그 이상)의 분자 사이의 서열 비교는 전형적으로 "비교 윈도우" 상에 상기 2개의 분자의 서열을 비교하여 서열 유사성의 국소 영역을 동정하고 비교함으로써 수행된다. 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "비교 윈도우"는 18개 이상의 인접 뉴클레오티드 위치 또는 6개 아미노산 이상의 개념적 단편을 의미하는 것으로, 폴리뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열은 18개 인접 뉴클레오티드 또는 6개 아미노산 서열 이상의 대조 서열과 비교될 수 있고, 비교 윈도우에서 폴리뉴클레오티드서열의 일부는 상기 2개의 서열의 최적 정렬을 위한 대조 서열(부가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 20퍼센트 이하의 부가, 결실, 치환 등(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교 윈도우를 정렬시키기 위한 서열의 최적 정렬은 Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482(1981)의 국소 상동성 알고리즘에 의해, Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443(1970)의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci.(U. S. A.) 85: 2444(1988)의 유사성 방법을 위한 검색에 의해, 이들 알고리즘의 전산화 과정에 의해(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0,(Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, or MacVector software packages), 또는 검사에 의해 수행될 수 있고, 다양한 방법에 의해 얻어지는 최선의 정렬(즉, 비교 윈도우 상에서 최고의 상동성 비율을 얻음)이 선택된다.

[0080] 상기 용어 "서열 동일성"은 상기 비교 윈도우에 대해 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 동일함을 의미한다(즉, 뉴클레오티드 대 뉴클레오티드 또는 잔기 대 잔기 기준으로). 상기 용어 "서열 동일성의 비율"은 비교 윈도우 상에서 2개의 최적 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예를 들면, A, T, C, G, U, 또는 I) 또는 잔기가 2개의 서열에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 얻고, 상기 매칭된 위치의 수를 비교 윈도우에서 위치의 전체 수로 나누고(즉, 윈도우 크기), 상기 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 비율을 얻음으로써 계산된다. 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "실질적 동일성"은 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 특성을 의미하는 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산은 18 뉴클레오티드 이상(6 아미노산) 위치의 비교 윈도우 상에서, 종종 24-48 뉴클레오티드(8-16 아미노산)의 윈도우 상에서 대조 서열과 비교하여, 85 퍼센트 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 90 내지 95 퍼센트 이상의 서열 동일성, 보다 일반적으로는 99퍼센트 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 서열 동일성의 비율은 대조 윈도우에 대해 대조 서열의 총 20 퍼센트 이하의 결실 또는 부가를 포함할 수 있는 서열과 대조 서열을 비교함으로써 계산된다. 상기 대조 서열은 보다 큰 서열의 서브세트일 수 있다. 야생형 단백질 또는 핵산에 대해 실질적인 동일성을 갖는 아미노산 또는 핵산은 야생형 단백질 또는 핵산의 변이체의 일례들이다.

[0081] 본 명세서에서 사용되고 있는 20개의 관용 아미노산 및 이들의 약칭은 종래 용법에 따른다. Immunology - A Synthesis(2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass.(1991)) 참조. 20개의 관용 아미노산의 입체 이성질체(예를 들면, D-아미노산), 비-천연 아미노산, 예를 들면 α-, α-이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산 및 기타 비관용적인 아미노산은 또한 본 발명의 폴리펩타이드에 대해 적절한 성분일 수도 있다. 비관용적인 아미노산의 예는 다음을 포함한다: 4-히드록시프롤린, γ-카르복시글루타메이트, ε-N,N,N-트리메틸라이신, ε-N-아세틸세린, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-히드록실라이신, σ-N-메틸아르기닌, 및 기타 유사한 아미노산 및 이미노산(예를 들면, 4-히드록시프롤린). 폴리펩타이드에서 본 명세서에서 사용되고 있는 표시는 표준 용도 및 종래의 방법에 따라 좌측 손 방향은 아미노 말단 방향이고, 우측 손 방향은 카르복시-말단 방향이다.

[0082] 유사하게, 특별히 규정하지 않는 한, 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 손 말단은 5' 말단이고; 2중 가

닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 손 방향은 5' 방향을 의미한다. 초기 RNA 전사물의 5' 내지 3' 부가의 방향은 전사 방향을 의미하며; RNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 서열 영역 및 RNA 전사의 5' 내지 5' 말단인 DNA 가닥에 대한 서열 영역은 "상류 서열(upstream sequence)"로서 언급되며; RNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 서열 영역 및 RNA 전사의 3' 내지 3'말단인 서열 영역은 "하류(downstream) 서열"로서 언급된다.

[0083] 폴리펩타이드에서 사용되는 바와 같이, 상기 용어 "실질적 동일성"은 예를 들면 디폴트(default) 갭 중량을 사용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해, 최적 정렬될 때, 상기 2개의 펩타이드 서열은 80퍼센트 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 90퍼센트 이상의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 95퍼센트 이상의 서열 동일성, 가장 바람직하게는 99퍼센트 이상의 서열 동일성을 공유한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존성 아미노산 치환에 의해 상이하다. 보존성 아미노산 치환은 유사한 측쇄를 갖는 잔기의 호환성을 의미한다. 예를 들면, 지방족 측쇄를 갖는 일군의 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신이고; 지방족 히드록실 측쇄를 갖는 일군의 아미노산은 세린 및 쓰레오닌이며; 아미드-함유 측쇄를 갖는 일군의 아미노산은 아스파라긴 및 글루타민이며; 방향족 측쇄를 갖는 일군의 아미노산은 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판이고; 기본 측쇄를 갖는 일군의 아미노산은 라이신, 아르기닌 및 히스티딘이고; 황-함유 측쇄를 갖는 일군의 아미노산은 시스테인 및 메티오닌이다. 바람직한 보존성 아미노산 치환기는 다음과 같다: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루탐산-아스파르트산 및 아스파라긴-글루타민. 실질적 동일성을 갖는 폴리펩타이드는 변이체일 수 있다.

[0084] 변이체 단백질은 또한 변화가 작은 단백질을 포함한다. 본 명세서에서 논의된 바와 같이, 항체 또는 면역 글로불린의 아미노산 서열에서 작은 변화는 본 발명에 포함되는 것으로 고려되며, 아미노산 서열에서 변화는 75% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 90%, 95% 및 가장 바람직하게는 99%이상을 유지함을 제공한다. 특히, 보존성 아미노산 대체가 고려된다.

[0085] 보존성 대체는 이들의 측쇄에 관련된 일군의 아미노산 내에서 발생하는 것들이다. 유전적으로 코딩되는 아미노산은 일반적으로 다음과 같은 군으로 분류된다:(1) 산성 = 아스파르테이트, 글루타메이트; (2) 염기성 = 라이신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비-극성 = 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 무전하 극성 = 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 쓰레오닌, 티로신. 보다 바람직한 군은: 세린 및 쓰레오닌은 지방족-히드록시 군이고; 아스파라긴 및 글루타민은 아미드-함유 군이고; 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신은 지방족 군이고; 또한 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 방향족 군이다. 예를 들면, 특히 대체물이 골격 부위 내에서 아미노산을 포함하지 않는 경우, 이소류신 또는 발린을 갖는 류신, 글루타메이트를 갖는 아스파르테이트, 세린을 갖는 쓰레오닌의 분리된 대체물, 또는 구조적으로 관련된 아미노산을 갖는 아미노산의 유사한 대체물은 그 결과 얻어진 분자의 결합 또는 특성에 대한 큰 효과를 갖지 않을 것이라고 예측하는 것이 합리적이다. 아미노산 변화가 기능성 펩타이드를 초래하는지 여부는 폴리펩타이드 유도체의 특이적 활성을 분석으로써 쉽게 결정될 수 있다. 분석은 본 명세서에 상세히 기재되어 있다. 항체의 단편 또는 유사체 또는 면역 글로불린 분자는 당업자에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 단편 또는 유사체의 바람직한 아미노-및 카르복시-말단은 기능성 도메인의 경계 근처에서 일어난다. 구조적 및 기능성 도메인은 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 데이터를 공유 또는 사유 서열 데이터 베이스와 비교함으로써 동정될 수 있다. 바람직하게는, 전산화 비교 방법은 공지된 구조 및/또는 기능의 다른 단백질에서 발생하는 주요 서열 또는 예측된 단백질 형태 도메인을 동정하기 위해 사용된다. 공지된 3-차원 구조로 겹치는 단백질 서열을 동정하기 위한 방법이 공지되어 있다. Bowie et al. Science 253: 164(1991). 따라서, 상기 예들을 통해 당업자들은 본 명세서에 기재되어 있는 항체에 따라 구조적 및 기능적 도메인을 정의하기 위해 사용될 수 있는 주요 서열 및 구조적 형태를 인식할 수 있다.

[0086] 바람직한 아미노산 치환체는 (1) 단백질 분해에 대한 감수성을 감소시키고, (2) 산화에 대한 감수성을 감소시키며, (3) 단백질 복합체를 형성하기 위한 결합 친수성을 변경하고, (4) 결합 친수성을 변경하며, (4) 이러한 유사체의 다른 물리화학적 또는 기능적 특성을 제공 또는 변형하는 것들이다. 유사체는 천연 펩타이드 서열 이외의 서열의 다양한 뮤테인(mutein)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 단일 또는 다중 아미노산 치환체(바람직하게는 보존성 아미노산 치환체)는 자연 발생 서열에서 만들어질 수 있다(바람직하게는, 분자간 접촉을 형성하는 도메인(들) 외부의 폴리펩타이드의 부분에서). 보존성 아미노산 치환은 모(parent) 서열의 구조적 특성을 실질적으로 변경해서는 안 된다(예를 들면, 대체 아미노산은 모 서열에서 발생하는 나선 구조를 파괴하거나 또는 모 서열을 특성을 규명하는 제 2 구조의 다른 유형을 파괴하는 경향이 있어서는 안 된다). 본 기술 분야에서 인식되고 있는 폴리펩타이드 제 2 및 제 3 구조의 예는 Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton, Ed. , W. H. Freeman and Company, New York(1984)); Introduction to Protein

Structure(C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y.(1991)); and Thornton et at. Nature 354: 105(1991)에 기재되어 있다.

[0087] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "폴리펩타이드 단편"은 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 결실을 갖지만, 남아있는 아미노산 서열이 예를 들면 전장 cDNA 서열로부터 유도된 자연-발생 서열에서 상응하는 위치와 동일한 폴리펩타이드를 의미한다. 단편은 전형적으로 길이가 6, 8 또는 10 이상의 아미노산, 바람직하게는 길이가 14 이상의 아미노산, 보다 바람직하게는 길이가 20 이상의 아미노산, 통상적으로 길이가 50 이상의 아미노산, 더욱 더 바람직하게는 길이가 70 이상의 아미노산이다. 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "유사체"는 유도된 아미노산 서열과 실질적인 동일성을 갖는 25 이상의 아미노산의 단편을 포함하는 폴리펩타이드을 의미한다. 유사체는 전형적으로 길이가 20 이상의 아미노산, 바람직하게는 길이가 50 이상의 아미노산이고, 종종 전장 천연 폴리펩타이드 길이일 수 있다. 2개의 단편 및 유사체는 변이체의 형태이다.

[0088] 펩타이드 유사체는 주형(template) 펩타이드의 특성과 유사한 특성을 갖는 비-펩타이드 약물로서 약제학 분야에서 통상적으로 사용된다. 이러한 유형의 비-펩타이드 화합물은 "펩타이드 미메틱(mimetic)" 또는 "펩타이도미메틱"으로 명명된다. Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29(1986); Veber and Freidinger TINS p. 392(1985); and Evans et al. J. Med. Chem. 30: 1229(1987). 이러한 화합물은 종종 전산화 분자 모델링에 의해 개발된다. 치료학적으로 유용한 펩타이드와 구조적으로 유사한 펩타이드 미메틱은 동일한 치료 또는 예방 효과를 얻기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 펩티드 미메틱은 구조적으로 인간 항체와 같은 파라다임 폴리펩타이드(즉, 생화학적 특성 또는 약리학적 활성을 갖는 폴리펩타이드)와 유사하지만, 본 기술 분야에 공지되어 있는 방법에 의해 --CH_2NH--, --CH_2S--, --CH_2-CH_2--, --CH=CH--(시스 및 트랜스), --$COCH_2$--, --$CH(OH)CH_2$-- 및 -CH_2SO--으로 이루어진 군으로부터 선택되는 연관에 의해 선택적으로 대체되는 하나 이상의 펩타이드 연관을 갖는다. 동일한 유형의 D-아미노산을 갖는 공통(consensus) 서열의 하나 이상의 아미노산의 규칙 치환(예를 들면 L-라이신 대신 D-라이신)은 보다 안정한 펩타이드를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 공통 서열 또는 실질적으로 동일한 공통 서열 변경을 포함하는 콘스트레인드(constrained) 펩타이드는 본 기술 분야에 공지된 방법, 예를 들면 펩타이드를 고리화하는 분자간 디술피드 브릿지를 형성할 수 있는 내부 시스테인 잔기를 첨가함으로써 생성될 수 있다(Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387(1992)). 펩타이드 미메틱 및 펩타이도미메틱은 둘 다 변이체의 형태일 수 있다.

[0089] "항체" 또는 "항체 펩타이드(들)"은 온전한(intact) 항체 또는 특이적 결합에 대한 온전한 항체와 경쟁하는 그의 결합 단편을 의미한다. 결합 단편은 재조합 DNA 기술 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단 기술에 의해 생성될 수 있다. 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')$_2$, Fv 및 단일-사슬 항체를 포함한다. "이중 특이성" 또는 "이관능성" 항체 이외의 다른 항체는 각각 동일한 결합 부위를 갖는 것으로 이해된다. 항체는 과량의 항체가 반대 수용체에 결합된 수용체의 양을 약 20%, 40%, 60% 또는 80% 이상, 보다 통상적으로는 약 85%를 초과 감소시킬 때(시험관내 경쟁적 결합 분석으로 측정함), 반대 수용체에 대한 수용체의 부착을 실질적으로 억제한다.

[0090] 상기 용어 "에피토프"는 면역 글로불린 또는 T-세포 수용체와 특이적으로 결합하거나, 또는 분자와 상호 작용할 수 있는 모든 단백질 결정 인자를 포함한다. 에피토프성 결정 인자는 아미노산 또는 탄수화물 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹으로 이루어지며, 일반적으로 3-차원 구조적 특성 뿐 아니라 특이적 전하 특성을 갖는다. 에피토프는 "선형" 또는 "형태적"일 수 있다. 선형 에피토프에서, 단백질 및 그와 상호 작용하는 분자(예를 들면 항체) 사이의 상호 작용하는 모든 위치는 단백질의 제 1 아미노산 서열을 따라 선형적으로 발생한다. 형태적 에피토프에서, 상호 작용하는 위치는 서로 분리되는 단백질 상의 아미노산 잔기를 따라 발생한다. 항체는 해리 상수(dissociation constant)가 ≤ 1μM, 바람직하게는 ≤ 100nM, 보다 바람직하게는 ≤ 10 nM, 및 더욱 더 바람직하게는≤ lnM일 때 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있다. 항원 상의 원하는 에피토프가 결정되면, 예를 들면 본 발명에 기재되어 있는 기술을 이용하여 상기 에피토프에 항체를 생성시킬 수 있다. 이와 달리, 발견 과정에서, 항체의 생성 및 특성 규명은 바람직한 에피토프에 대한 정보를 밝힐 수 있다. 이후, 이러한 정보로부터 동일한 에피토프에 결합시키기 위한 항체를 경쟁적으로 스크리닝할 수 있다. 이를 달성하기 위한 접근법으로, 서로 경쟁적으로 결합하는 항체, 예를 들면 항원에 대해 결합시키기 위해 경쟁하는 항체를 찾기 위한 교차-경쟁 연구를 수행하는 것이다. 항체의 교차-경쟁을 토대로, 항체에 "결합"시키기 위한 고수율 공정이 국제특허출원 제 WO 03/48731호에 기재되어 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 실제로 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 것은 에피토프일 수 있다. 에피토프는 항체가 결합하는 잔기를 포함할 수 있다. 일실시형태에 있어서, 상기 에피토프는 EGFRvⅢ 에피토프이다. 보다 바람직한 일실시형태에 있어서, 상기 에피토프는 본 명세서의 실시예 4에 기재되어 있는 에피토프이다. 일실시형태에 있어서, 상기

에피토프는 실시예 14에 기재되어 있는 에피토프이다. 일실시형태에 있어서, 상기 에피토프는 서열 LEEKKGNYVVTD(서열번호: 59)을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 에피토프는 서열 EEKKGNYWT(서열번호: 57)을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 에피토프는 서열 EKNY(서열번호: 60)을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 에피토프는 서열 EEKGN(서열번호: 61)을 포함한다. 당업자는 이들이 단일 펩타이드 상에 실제로 상기 순서에 따라 구성될 필요가 없고, 오히려 파라토프와 상호 작용하는 에피토프를 형성하는 잔기임을 알 수 있을 것이다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 분자의 형상을 생성하는 잔기 또는 측쇄가 차지하는 공간은 에피토프가 무엇인지 결정하는 것을 돕는다. 마찬가지로, 에피토프와 관련된 작용기, 반 데르 발스 상호 작용, 측쇄 이동도 모두를 통해 에피토프가 실제로 무엇인지 결정할 수 있다. 따라서, 에피토프는 강력한 상호 작용을 포함할 수도 있다.

[0091] 상기 용어 "파라토프"는 에피토프에 대한 결합을 결정하는 결합 영역의 일반적인 구조를 기재하는 것이다. 이러한 구조는 결합 영역이 에피토프에 결합하는지 여부와 어떠한 방식으로 결합하는지에 영향을 준다. 파라토프는 항원성 결정 인자에 결합하는 항체 또는 그의 단편을 담당하는 항체의 항원성 부위를 의미할 수 있다. 파라토프는 또한 항체의 이디오토프(idiotope)를 의미하며, 에피토프에 결합하는 상보성 결정 영역(CDR)을 의미한다. 일실시형태에 있어서, 상기 파라토프는 도 11에서 L1 10, L2 30, L3 50, H1 20, H2 40 및 H3 60인 항체의 영역이다. 일실시형태에 있어서, 상기 파라토프는 실시예 16에서 L1, L2, L3, H1, H2 및 H3에 대한 CDR 서열을 포함하는 항체의 영역이다. 일실시형태에 있어서, 상기 파라토프는 도 12에서 L1 110, L2 130, L3 150, H1 120, H2 140 및 H3 160인 항체의 영역이다. 일실시형태에 있어서, 상기 파라토프는 실시예 18에서 L1, L2, L3, H1, H2 및 H3에 대한 CDR 서열을 포함하는 항체의 영역이다. 일실시형태에 있어서, 상기 파라토프는 실시예 18에 기재되어 있는 서열을 포함한다. 일실시형태에 있어서, 상기 파라토프는 도 13A 및 도 13B에 나타낸 바와 같이 에피토프와 상호 작용하는 잔기를 포함한다. 진한 흑색 구조는 펩타이드 구조이다. 일실시형태에 있어서, 상기 파라토프는 13.1.2 mAb의 잔기 Tyr172Arg를 포함한다. 일실시형태에 있어서, 13.1.2 mAb의 파라토프는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 잔기를 포함한다: Tyr 172Arg, Arg101Glu, Leu99Asn, Leu99His, Arg101Asp, Leu217Gln, Leu99Thr, Leu217Asn, Arg101Gln 및 Asn35Gly. 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 항체 또는 그의 변이체의 파라토프는 본 출원에 기재되어 있는 방식으로 결정될 수 있다. 잔기가 결합 에너지의 10%에 기여하는 것으로 예상되는 경우, "중요한" 것으로 간주된다. 일실시형태에 있어서, 잔기가 결합 에너지의 2%에 기여하는 것으로 예상되는 경우, "중요한" 것으로 간주된다. 일실시형태에 있어서, 잔기가 결합 에너지의 50%에 기여하는 것으로 예상되는 경우 "중요한" 것으로 간주된다. 일실시형태에 있어서, 잔기가 에피토프의 표면 또는 파라토프의 표면과 상호 작용하는 것으로 예상되는 경우 "중요한" 것으로 간주된다. 일실시형태에 있어서, 잔기의 변화가 결합 손실을 초래하는 경우, 잔기는 "중요한" 것으로 간주된다.

[0092] 상기 용어 "특이적으로" 또는 "우선적으로 결합한다", 또는 이와 유사한 문구는 항체가 상기 에피토프에 독점적으로 결합하는 것을 뜻하는 것은 아니다. 오히려, 항체가 상기 항체가 노출되는 하나 이상의 다른 물질과 결합하기보다는 항체 또는 그의 변이체가 상기 에피토프에 상당 정도 결합할 수 있음을 의미한다. 일실시형태에 있어서, 특이적으로 결합하는 항체는 EGFR 단백질에 결합하는 것보다 (보다 정확하게는 또는 K_D 미만) 높은 친화도를 갖고 EGFRvⅢ 단백질에 결합할 것이다. 예를 들면, 상기 특이적으로 결합하는 항체는 최소한 1, 1-2, 2-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-70, 70-90, 90-120, 120-150, 150-200, 200-300, 300-500, 500-1000 퍼센트 이상으로 보다 견고하게 결합할 것이다.

[0093] 아미노산의 약칭, 수, 아미노산, 예를 들면 Leu217Gln은 제 1 아미노산으로부터 제 2 아미노산으로 수 매김된 아미노산에서의 돌연변이를 나타낸다. 따라서, Tyr172Arg는 야생형 단백질이 위치 172에서 티로신을 갖고, 돌연변이체는 위치 172에서 아르기닌을 가짐을 의미한다.

[0094] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "제제"는 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대 분자 또는 생물학적 물질로 제조되는 추출물을 의미한다.

[0095] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "포유류"는 인간을 포함하는 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 상기 포유류는 인간이다.

[0096] 효소, 파파인(papain)으로 항체를 분해(digestion)하면, 항원-결합 활성을 갖지 않지만 결정화 능력을 갖는 "Fab" 단편 및 "Fc" 단편으로 공지되어 있기도 한 2개의 동일한 항원-결합 단편이 형성된다. 항체를 효소, 펩신으로 분해하면, 항체 분자의 2개의 아암(Arm)이 결합되어 남게 되고, 2개의 항원 결합 부위를 포함하는

F(ab') 2 단편을 형성한다. 상기 $F(ab')_2$ 단편은 항원을 가교시키는 능력을 갖는다.

[0097] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "Fv"는 항원-인식 및 항원-결합 부위를 유지하는 항체의 최소 단편을 의미한다. 이들 단편은 또한 항체의 변이체으로서 간주될 수도 있다.

[0098] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "Fab"는 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 CH1 도메인을 포함하는 항체의 단편을 의미한다.

[0099] 상기 용어 "mAb"는 단클론성 항체를 의미한다.

[0100] 생성된 항체 서열의 XenoMax 방법 기재는 다음과 같이 코딩된다: "AB"는 항체를 의미하고, "EGFRvⅢ"는 항체의 결합 특이성을 의미하며, "X"는 유도된 XenoMouse 마우스를 의미하고, "G1"은 IgG1 동위형(isotype)을 의미하며, "G2"는 IgG2 동위형을 의미하며, 마지막 3자리는 항체가 유도되는 단일 세포 수를 의미하는 바, 예를 들면 AB-EGFRvⅢ-XG1-095는 IgG1 동위형의 XenoMouse 마우스 및 세포 수 95로부터 EGFRvⅢ에 대한 결합 특이성을 갖는 항체이다.

[0101] 상기 용어 "SC"는 단일 세포를 의미하며, 특정 XenoMax 방법으로 유도된 항체는 3 자리 뒤의 SC로서 언급될 수 있거나 또는 3 자리 자체가 항체가 유도되는 단일 세포수를 의미한다.

[0102] 하이브리도마 유도된 항체 서열의 기재는 다음과 같이 코딩된다: "AB"는 항체를 의미하고, "EGFRvⅢ"는 항체의 결합 특이성을 의미하며, "X"는 유도된 XenoMouse 마우스를 의미하고, "G1"은 IgG1 동위형을 의미하며, "G2"는 IgG2 동위형을 의미하며, "K"는 카파를 의미하고, "L"은 람다를 의미한다. 마지막 3자리는 항체가 유도되는 클론을 의미한다: 예를 들면 AB-EGFRvⅢ-XG1K-13.1.2.

[0103] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "표지" 또는 "표지된"은 폴리펩타이드에 검출가능한 기(moiety)를 첨가하는 것으로, 예를 들면 방사선 표지, 형광 표지, 효소 표지, 화학 발광 표지 또는 비오티닐기를 의미한다. 방사성 동위형 또는 방사성 핵종은 ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I를 포함할 수 있고, 형광 표지는 로다민, 란타나이드 형광체 또는 FITC를 포함하며, 효소 표지는 양고추냉이(horseradish) 퍼옥시다아제, β-갈락토오시다아제, 루시퍼라아제, 알칼리성 포스페이타아제를 포함할 수 있다.

[0104] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "약제학적 제제 또는 약물"은 환자에게 적절히 투여되었을 때 원하는 치료 효과를 유도할 수 있는 화학적 화합물 또는 조성물을 의미한다. 본 명세서에서 사용되고 있는 다른 화학 용어는 본 기술 분야의 종래 용도에 따라 사용되는 것으로, The McGraw-Hill Dictionary of Chenaical Terrns(Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco(1985))에 그 예가 기재되어 있다.

[0105] 본 명세서에서 사용되고 있는 용어 "실질적으로 순수한"은 대상 종이 우세종으로 존재하는 것을 의미하는 것으로(즉, 몰 기준으로 조성물에 임의의 다른 개별적인 종보다 보다 풍부하게 존재함), 바람직하게는 실질적으로 순수한 분획은 대상 종이 존재하는 모든 거대 분자 종의 약 50 퍼센트 이상(몰 기준)을 포함하는 조성물이다. 일반적으로, 실질적으로 순수한 조성물은 조성물에 존재하는 모든 거대 분자 종의 약 80퍼센트, 보다 바람직하게는 85%, 90%, 95%, 99% 및 99.9%가 넘는 양을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 대상 종은 필수적인 균질성까지 순수화되는데(오염 종은 종래의 검출 방법에 의해서 조성물에서는 검출될 수 없음), 상기 조성물은 주로 단일 거대 분자종으로 이루어진다.

[0106] 상기 용어 "환자"는 인간 및 가축을 포함한다.

[0107] 상기 용어 "SLAM^{R} Technology"은 "선택된 림프구 항체 방법(Selected Lymphocyte Antibody Method)"을 의미한다(Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US1, i93 :7843-7848(1996), 및 Schrader, 미국특허 5,627,052).

[0108] 상기 용어 "XenoMax^{TM}"는 SLAM 기술과 XenoMouse^{R} 마우스를 사용하는 것을 의미한다(후술함).

[0109] 항체 구조

[0110] 상기 기본 항체 구조 유닛은 4합체(tetramer)를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각 4합체는 2개의 동일한 폴리펩타이드 사슬 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄"(약 50-70kDa)를 갖는다. 각 사슬의 아미노-말단부는 항원 인식을 일차적으로 담당하는 약 100 내지 100 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각 사슬의 카르복시-말단부는 효과 인자 기능을 일차적으로 담당하는 불변 영역을 정의한다. 인간 중쇄는 카파 및 람다 경쇄로서 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 엡실론으로서 분류되며, 항체의

동위형을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE으로서 정의한다. 경쇄 및 중쇄 중에서, 가변 및 불변 영역은 약 10 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함하는 중쇄와 약 12 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결된다. 일반적으로, Fundamental Immunology Ch. 7(Paul, W. , ed. , 2nd ed. Raven Press, N. Y.(1989)) 참조. 각 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다.

[0111] 따라서, 온전한 항체는 2개의 결합 부위를 갖는다. 이관능성 또는 이중 특이성 항체에서 이외에는, 2개의 결합 부위는 동일하다.

[0112] 상기 사슬 모두는 상보성 결정 영역 또는 CDR로 명명되기도 하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결되는 상대적으로 보존된 골격 영역(FR)의 동일한 일반적 구조를 나타낸다. 각 상의 2개의 사슬로부터 CDR은 골격 영역에 의해 정렬되어 특이적 에피토프에 결합할 수 있다. N-말단으로부터 C-말단으로, 2개의 경쇄 및 중쇄는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4을 포함한다. 각 도메인에 대한 아미노산의 할당은 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1987 and 1991)), or Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917(1987); Chothia et al. Nature 342: 878-883(1989)의 정의에 따른다.

[0113] 이중 특이성 또는 이관능성 항체는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 혼성 항체이다. 이중 특이성 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연관을 포함하는 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321(1990), Kostelny et al. J. Immunol. 148: 1547-1553(1992) 참조. 이중 특이성 항체의 생성은 종래의 항체 생성과 비교하여 상대적으로 덜 노동 집약적인 공정일 수 있으며, 순도는 이중 특이성 항체에 대해 일반적으로 낮다. 이중 특이성 항체는 단일 결합 부위를 갖는 단편의 형태로 존재하지 않는다(예를 들면 Fab, Fab' 및 Fv).

[0114] 일반적인 항체 구조적 양상 이외에, 파라토프 및 에피토프 사이의 보다 특이적 상호 작용은 구조적 접근법에 의해 조사될 수 있다. 일실시형태에 있어서, CDR의 구조는 파라토프를 형성하며, 이를 통해 항체가 에피토프와 결합할 수 있다. 이러한 파라토프의 구조는 다양한 방식으로 결정될 수 있다. 예를 들면 NMR 또는 x-선 결정법과 같은 전통적 구조 조사 접근법이 사용될 수 있다. 이러한 접근법은 파라토프의 구조만으로도 또는 에피토프에 결합된 상태에서 조사할 수 있다. 이와 달리, 분자 모델은 인 실리코 제작될 수 있다. 구조는 Accelrys(San Diego, CA)의 InsightII 모델링 패키지와 같은 상업용 패키지의 도움으로 상동성 모델링을 통해 형성될 수 있다. 요약하면, 조사할 항체의 서열을 사용하여 단백질 데이터 은행(Protein Data Bank)과 같은 공지된 구조를 갖는 단백질의 데이터베이스에 대해 검색할 수 있다. 공지된 구조를 이용하여 상동성 단백질을 동정한 후, 이들 상동성 단백질을 모델링 주형으로서 사용한다. 가능한 주형의 각각은 정렬될 수 있으므로, 이들 주형 중에서 구조 기반 서열 정렬을 얻을 수 있다. 이후, 미지의 구조를 이용하여 항체의 서열은 이들 주형과 함께 정렬하여 상기 미지의 구조와 함께 항체에 대한 분자 모델을 만든다. 당업자가 잘 이해하고 있는 바와 같이, 이러한 구조를 인 실리코 형성하기 위한 많은 선택적인 방법이 있으며, 이들 중 하나를 사용할 수 있다. 예를 들면, QUANTA(Polygen Corp. , Waltham, Mass.) and CHARM(Brooks, B. R. , Bruccoleri, R. E. , Olafson, B. D. , States, D. J. , Swaminathan, S. and Karplus, M. , 1983, J. Comp. Chem,. 4: 187)를 사용하는 Hardman 등의 미국 특허 5,958,708에 기재된 방법과 유사한 방법이 사용될 수 있다.

[0115] 가능한 파라토프가 에피토프에 대해 결합할 수 있는지 여부 및 잘 결합할지 결정하는데 있어서 파라토프의 형상이 중요할 뿐 아니라, 에피토프 및 파라토프 사이의 상호 작용 자체도 변이체 항체의 디자인에 있어 중요한 정보의 소스이다. 당업자가 잘 알고 있는 바와 같이, 이러한 상호 작용이 연구될 수 있는 다양한 방법들이 있다. 하나의 방법은 아마 상술한 바와 같이 발생된 구조적 모델을 사용하는 것이고, 이후 도킹 모듈을 갖는 InsightII(Accelrys, San Diego, CA)와 같은 프로그램을 사용하는 것으로, 이는 특히, 파라토프 및 그의 에피토프 사이의 형태 및 배향적 공간에 대한 Monte Carlo 검색을 수행할 수 있다. 이 결과는 에피토프가 어디에서 어떻게 파라토프와 상호 작용하는지 평가할 수 있다는 것이다. 일실시형태에 있어서, 에피토프의 단편 또는 변이체 만이 관련 상호 작용을 결정하는 것을 보조하기 위해 사용된다. 일실시형태에 있어서, 전체 에피토프는 파라토프 및 에피토프 사이의 상호 작용의 모델링에서 사용된다. 당업자가 잘 알고 있는 바와 같이, 이러한 2개의 상이한 접근법은 상이한 단점 및 장점을 가지고 있다. 예를 들면, 에피토프의 단편만을 사용하는 경우 상당한 시간 소요없이 각 측쇄의 가능한 변형의 보다 상세한 조사가 가능하다. 한편, 에피토프의 단편만을 사용하거나 전체 단백질 대신에 에피토프만을 단순히 사용하는 경우, 에피토프 단편의 특성이 전체 에피토프에 대한 특성과 동일할 수 없어 전산 모델링 중 잘못 유도될 위험이 증가할 가능성이 있다. 일실시형태에 있어서, 2개의 접근법은 그 결과를 교차 조사하기 위해 제한된 범위로 사용된다. 바람직한 일실시형태에 있어서, 에피토프의 변이체가 사용되는 경우, 에피토프의 변이체가 에피토프의 가장 중요한 잔기를 포함하도록 최적화될 수 있을

것이다. 가장 중요한 잔기의 동일성은 다양한 방법으로 결정될 수 있는데, 예를 들면 본 명세서의 실시예 4 및 14에 기재된 방법을 들 수 있다.

[0116] 이들 생성된 구조를 사용함으로써, 에피토프 및 파라토프 사이의 상호 작용에서 어떠한 잔기가 가장 중요한 것인지 결정할 수 있다. 따라서, 일실시형태에 있어서, 항체의 결합 특성을 변경시키기 위해 어떠한 잔기를 변화시킬지 쉽게 선택할 수 있다. 예를 들면, 파라토프에서 임의의 잔기의 측쇄가 에피토프의 결합을 입체적으로 장애할 수 있어 이들 잔기를 작은 측쇄를 가진 잔기로 변경하는 것이 유리할 것임은 도킹 모델로부터 명백할 것이다. 이는 다양한 방법으로 결정될 수 있다. 예를 들면, 관능기 및 근접성을 기반으로 2개의 모델을 단순히 고려함으로써 상호 작용을 평가할 수 있다. 이와 달리, 상술한 바와 같이 보다 유리한 에너지 상호 작용을 얻기 위해 에피토프 및 파라토프의 반복되는 짝짓기를 수행할 수 있다. 또한, 항체가 에피토프에 결합할 수 있는 선택적인 방법을 결정하기 위해 항체의 다양한 변이체에 대한 이러한 상호 작용을 결정할 수 있다. 원하는 특정의 특성을 가진 항체를 얻기 위해 항체의 구조를 어떻게 변경하여야 하는지 결정하기 위해 다양한 모델을 조합할 수도 있다.

[0117] 이와 같이 결정된 모델은 다양한 기술을 통해 시험될 수 있다. 예를 들면, 상호 작용 에너지는 어떠한 변이체를 더 조사할지 결정하기 위해 위에서 논의한 프로그램을 결정할 수 있다. 또한, 쿨롱 및 반 데르 발스 상호 작용이 에피토프 및 변이체 파라토프의 상호 작용 에너지를 결정하기 위해 사용된다. 만일 항체 구조에서 예측된 변화가 실제로 결합 특성에서 원하는 변화를 초래할 수 있는지 알아보기 위해 부위 지향적 돌연변이 유발(mutagenesis)이 사용되기도 한다. 이와 달리, 상기 모델이 파라토프 및 에피토프 사이에 발생할 수 있는 일반적인 결합 테마를 보정하거나 결정하는 것을 확인하기 위해 에피토프를 변화시킬 수 있다.

[0118] 상기 구조 모델링 방법들은 단백질 구조에 있어 어떠한 변화가 항체의 특정의 소망하는 특성을 초래할 것인지 결정하기 위해 사용될 수 있다. 이들 방법은 단백질 구조에 있어 어떠한 변화가 원하는 특성을 초래하지 않을지를 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0119] 당업자에 의해 알 수 있는 바와 같이, 이들 모델이 본 발명의 실시형태에 따른 항체 및 이들의 변이체를 생성하기에 필요한 길잡이를 제공할 것이며, 시험관내 연구를 통해 인 실리코 모델의 일상적인 시험을 수행하는 것이 훨씬 바람직할 것이다. 또한, 당업자에게 명백한 바와 같이, 어떠한 변형은 항체의 활성에 대한 추가적인 부작용이 있을 수도 있다. 예를 들면, 보다 큰 결합을 초래하는 것으로 예상되는 어떠한 변경은 보다 큰 결합을 유도할 수 있고, 항체의 활성을 감소시키거나 변경시킬 수 있는 다른 구조적 변화를 초래할 수도 있다. 이러한 것이 해당되는지 여부를 결정하는 것은 본 기술분야에서 일상적인 것이며, 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 예를 들면, 활성은 실시예 21에서와 같이 ELISA 시험을 통해 시험될 수 있다. 이와 달리, 샘플들은 표면 플라즈몬 공명 기기를 사용하여 시험될 수 있다.

[0120] 항체 결합, 및 우수한 결합을 위한 변이체 항체

[0121] 일실시형태에 있어서, 상술한 모델들은 그 에피토프에 대한 항체의 결합능을 증가시키기 위해 사용된다. 상기 항체는 에피토프와 보다 용이하게 결합할 수 있어, 보다 높은 결합 상수(ka)를 갖는다. 이와 다르게, 상기 항체는 에피토프로부터 보다 느리게 해리될 수 있기 때문에, 보다 낮은 해리 상수(k_d)를 갖거나 또는 에피토프-파라토프 상호 작용의 K_D가 더 작을 수 있어 에피토프와 파라토프 사이의 결합 정도가 증가하게 된다.

[0122] 일부 실시형태에 있어서, 상기 변이체 항체는 반대 특성을 갖고 결합하도록 디자인된다. 즉, 상기 항체는 견고하게 또는 신속하게 결합하지 않는다.

[0123] 다른 실시형태에 있어서, 상기 변이체 항체의 K_D는 야생형 항체의 K_D와 상이하지 않지만, 상기 변이체 항체는 특정 에피토프에 대해 보다 특이적이다. 이는 디자인된 항체의 파라토프가 다른 에피토프와 결합할 위험성이 낮다는 것을 의미한다. 상기 항체는 이미 변경된 다른 특성을 가질 수 있다. 예를 들면, 변이체는 비특이적 항체 결합에 대해 보다 면역적일 수 있거나 또는 항체가 고농도로 용액 중에 존재할 때 용매화 상태로 잔류할 수 있다. 이러한 항체는 논의된 항체로 존재할 수 있다. 예를 들면, 하기에서 조사될 일부 변이체 항체, 예를 들면 13.1.2 mAb의 보다 높은 농도는 Biacore 실험에서 보다 느린 결합 성분을 초래하였고, 어떤 변이체, 예를 들면 L217N-2.1은 동일 농도에서도 이러한 느린 성분을 나타내었다.

[0124] 위에서 결정된 모델에 의해 예측된 변이체들은 생성된 다음, 원하는 특성을 갖고 실제로 결합할지 여부를 결정하기 위해 시험될 수 있다. 에피토프와 보다 큰 전체 상호 작용 에너지를 가진 돌연변이체가 더 시험하기 위해 선택될 수 있다. 이러한 상호 작용 에너지는 상술한 방법을 포함하는 다양한 방법으로 결정될 수 있다.

[0125] 이들 변이체는 다양한 방법으로 시험될 수 있다. 선택 예는 KinExA(예를 들면, Lackie의 미국 특허 5,372,783, 1994년 12월 13일)(Sapidyne Instruments Inc., ID, Boise), 표면 플라즈몬 공명(SPR)(예를 들면, BIACORETM Biacore, Inc., Pistcataway, N. J.), 정지된-유동 형광법(stopped-flow fluorescence), 공명 거울법(resonant mirror), 및 형광 분극법(fluorescence polarization)을 포함하지만, 이들에 한정되지는 않는다. 이러한 선택 예의 다수는 데이터를 기록할 수 있을 뿐 아니라, 얻어진 데이터를 통해 다양한 이론 곡선으로 도시할 있고, 따라서 k_a, k_d 및 K_D 뿐 아니라 다른 특성을 결정하기 위한 즉석 수단을 제공한다. 이러한 곡선을 얻어진 데이터로 피팅하면 일부 변화 가능성이 있다는 것을 주목하는 것은 중요하다. 이 때문에, 관련 결합, 해리, 평형 상수는 상기 곡선 피팅 매카니즘 뿐 아니라, 상호 직접 비교함으로써 알 수 있고, 당업자의 지식에 비추어 알 수도 있다.

[0126] 인간 항체 및 항체의 인간화

[0127] 인간 항체는 쥐 또는 래트 변이체 및/또는 불변 영역을 갖는 항체와 관련된 문제 중 일부를 해결한다. 이러한 쥐 또는 래트 유도 단백질의 존재는 항체의 빠른 제거로 이어지거나, 환자에 의해 항체에 대한 면역 반응의 발생으로 이어질 수 있다. 쥐 또는 래트 유도 항체의 활용을 방지하기 위해서, 완전한 인간 항체는 설치류로 인간 항체 기능을 도입함으로써 생성하여 설치류가 완전 인간 항체를 생성할 수 있도록 할 수 있다.

[0128] 메가베이스-크기의 인간 유전자좌(loci)를 복제하고 재구성하며, 마우스 배선으로 도입할 수 있는 능력은 매우 크거나 가공하지 않은 매핑된 유전자좌의 기능 성분을 밝히고 인간 질병의 유용한 모델을 만들기 위한 강력한 접근법을 제공한다. 더 나아가, 마우스 유전자좌를 인간 유전자좌로 치환하기 위한 이러한 기술을 활용하면, 진행 중에 인간 유전자 산물의 발현 및 조절에 대한 고유의 통찰력, 다른 계와의 관계, 및 질병 유도 및 진행에 있어 관련도를 제공할 수 있다.

[0129] 이러한 방법의 중요한 실제 용도는 마우스 체액(humoral) 면역계의 "인간화"이다. 인간 면역 글로불린(Ig) 유전자좌를 내생 Ig 유전자가 불활성화되어 있는 마우스에 도입하면, 항체의 프로그램된 발현 및 조합의 근원 메커니즘 뿐 아니라 B-세포 전개에 있어 이들의 역할에 대한 연구 기회를 제공한다. 더욱이, 이러한 방법은 인간 질병에서 항체 치료의 유망성을 수행하기 위한 중요한 지표인 완전 인간 단클론성 항체(mAb)의 생성을 위한 이상적인 소스를 제공할 수 있다. 완전 인간 항체는 마우스 또는 마우스-유도화 mAb에 고유한 면역 및 알레르기 반응을 최소화하여 투여된 항체의 효능 및 안전성을 증가시키는 것으로 기대된다. 완전 인간 항체를 사용하면, 항체 투여를 반복해야 하는 만성 및 재발성 인간 질병, 예를 들면 염증, 자가면역 및 암을 치료하는데 있어 실질적인 이점을 제공하는 것으로 기대할 수 있다.

[0130] 이러한 목표를 위한 하나의 접근법으로, 마우스 항체 부재하에서 인간 항체의 큰 레퍼토리를 생성하도록 기대되는 인간 Ig 유전자좌의 큰 단편으로 인간 항체 생성이 결여된 마우스 품종을 가공하는 방법이 있다. 큰 인간 Ig 단편은 큰 가변 유전자 다양성 뿐 아니라, 항체 생성 및 발현의 적절한 조절을 보존할 것이다. 인간 단백질에 대한 면역학적 내성의 항체 다양성, 선택 및 결핍에 대한 마우스 과정(machinery)을 이용함으로써, 이러한 마우스 숙주에서 복제된 인간 항체 레퍼토리는 인간 항원을 포함하는 대상 항원에 대한 고 치환도 항체를 생성하여야 한다. 하이브리도마 기술을 이용하여 원하는 특이성을 가진 항원-특이적 인간 mAb는 쉽게 생성 및 선택될 수 있다. 이러한 일반적인 방법은 1994년에 공지된 바에 따르면 제 1 XenoMouse 마우스 숙주의 세대와 관련하여 증명되었다(Green et al. Nature Genetics 7: 13-21(1994) 참조). 상기 XenoMouse 숙주는 각각 코어 가변 및 불변 영역 서열, Id를 함유한 인간 중쇄 및 카파 경쇄좌의 245kb 및 190kb-크기의 배선 형태의 단편을 함유하는 효모 인공 염색체(YAC)로 가공되었다. YAC를 함유한 인간 Ig는 항체의 재배열 및 발현에 대해 마우스계와 상용성이 있고, 불활성 마우스 Ig 유전자에 대해 치환할 수 있음이 증명되었다. 이는 완전 인간 항체의 성인-형 인간 레퍼토리를 생성하고, 항원-특이적 인간 mAb를 생성하는 B-세포 전개를 유도하는 능력에 의해 증명되었다. 이러한 결과는 또한 보다 큰 수의 V 유전자, 추가적인 조절 요소 및 인간 Ig 가변 영역을 함유하는 대부분의 인간 Ig 유전자좌의 도입이 형질감염 및 면역화에 대한 인간 체액 반응의 특성인 완전 레퍼토리를 실질적으로 반복할 것임을 제안하였다. Green 등의 저서를 통해, 최근 인간 중쇄 유전자좌 및 카파 경쇄 유전자좌의 메가베이스 크기의 배선 형태의 YAC 단편을 도입함으로써 인간 항체 레퍼토리의 약 80%가 넘는 도입으로 이어졌다. Mendez et al. Nature Genetics 15: 146-156(1997) 및 1996년 12월 3일자 출원된 미국 특허출원 제 08/759,620 참조.

[0131] XenoMouse 마우스의 생산은 또한 미국 특허출원 제 07/466,008(출원일 1990년 1월 12일), 07/610,515(출원일 1990년 11월 8일), 07/919,297(출원일 1992년 7월 24일), 07/922,649(1992년 7월 30일), 08/031,801(출원일 1993년 3월 15일), 08/112,848(출원일 1993년 8월 27일), 08/234,145(출원일 1994년 4월 28일), 08/376,279(출

원일 1995년 1월 20일), 08/430,938(출원일 1995년 4월 27일), 08/464,584(출원일 1995년 6월 5일), 08/464,582(출원일 1995년 6월 5일), 08/463,191(출원일 1995년 6월 5일), 08/462,837(출원일 1995년 6월 5일), 08/486,853(출원일 1995년 6월 5일), 08/486,857(출원일 1995년 6월 5일), 08/486,859(출원일 1995년 6월 5일), 08/462,513(출원일 1995년 6월 5일), 08/724,752(출원일 1996년 12월 2일) 및 08/759,620(출원일 1996년 12월 3일) 및 미국 특허 제 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598, 6,075,181 및 5,939,598 및 일본 특허 제 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 및 3 068 507 B2에 더 논의 및 기술되어 있다. 또한 Mendez et al. Nature Genetics 15: 146-156(1997) 및 Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188: 483-495(1998) 참조. 유럽 특허 제 EP 0 463 151B1(등록일 1996년 6월 12일), 국제특허출원 제 WO 94/02602호(1994년 2월 3일 공개), 국제특허출원 제 WO 96/34096호(1996년 10월 31일 공개), WO 98/24893(1998년 6월 11일 4일 공개), WO 00/76310(2000년 12월 21일 공개), WO 03/47336를 참조.

[0132] GenPharm International, Inc.를 포함한 또 다른 접근법으로는 "minilocus" 접근법을 활용하는 것이다. minilocus 접근법에서, 외생 Ig 좌는 Ig 좌로부터 단편들(개별적인 유전자)의 내포(inclusion)를 통해 모방된다. 따라서, 하나 이상의 V_H 유전자, 하나 이상의 D_H 유전자, 하나 이상의 J_H 유전자, 뮤 불변 영역 및 제 2 불변 영역(바람직하게는 감마 불변 영역)은 동물로 삽입하기 위한 구조체로 형성된다). 이러한 접근법은 Surani 등의 미국 특허 제 5,545,807, Lonberg 및 Kay의 미국 특허 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,877,397, 5,874,299 및 6,255,458, Krimpenfort 및 Berns의 미국특허 5,591,669 및 6,023,010, Berns 등의 미국특허 5,612,205, 5,721,367 및 5,789,215, Choi 및 Dunn의 미국특허 5,643,763, 및 GenPharm International 미국 특허출원 07/574,748(출원일 1990년 8월 29일), 07/575,962(1990년 8월 31일), 07/810,279(출원일 1991년 12월 17일), 07/853,408(1992년 3월 18일), 07/904,068(1992년 6월 23일), 07/990,860(1992년 12월 16일), 08/053,131(1993년 4월 26일), 08/096,762(출원일 1993년 7월 22일), 08/155,301(출원일 1993년 11월 18일), 08/161,739(출원일 1993년 12월 3일), 08/165,699(출원일 1993년 12월 10일), 08/209,741(1994년 3월 9일)에 기재되어 있다. 또한 유럽특허 0 546 073B1호, 국제특허출원 WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 및 WO 98/24884 및 미국특허 5,981,175. Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuaillon et al., 1993, Choi et al.,1923, Lonberg et al.,(1994), Taylor et al.,(1994), and Tuaillon et al.,(1995), Fishwild et al.,(1996) 참조.

[0133] Kirin은 또한 마이크로셀 융합을 통해 거대 단편의 염색체 또는 전체 염색체가 도입되는 마우스로부터 인간 항체의 생성을 밝혔다. 유럽특허 773 288 및 843 961호 참조. Xenerex Biosciences는 인간 항체의 잠재적 생성을 위한 기술을 개발 중에 있다. 이러한 기술에서, SCID 마우스는 인간 임파성 세포, 예를 들면 B 및/또는 T세포로 재구성된다. 이후, 마우스는 항원으로 면역화되고, 이러한 항원에 대해 면역 반응을 일으킨다. 미국특허 5,476,996, 5,698,767 및 5,958,765 참조.

[0134] 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응은 키메라 또는 이와 달리 인간화된 항체를 생성하기 위한 산업을 주도해 왔다. 키메라 항체가 인간 불변 영역 및 쥐 가변 영역을 가지며, 특히 항체의 만성 또는 다중 투여 사용에 있어 인간 항-키메라 항체(HACA) 반응이 관찰될 것임이 기대된다. 따라서, HAMA 또는 HACA 반응의 관심 및/또는 효과를 손상시키기 위해 EGFRvⅢ에 대한 완전 인간 항체를 제공하는 것은 바람직한 일일 것이다.

[0135] 항체 치료제

[0136] 이상 논의한 바와 같이, EGFRvⅢ 항체의 기능은 작동 모드의 적어도 일부에 있어 중요한 것으로 보인다. 기능은 예를 들면 EGFRvⅢ로 작동하는 EGFRvⅢ 항체의 활성을 의미하는 것이다. 따라서, 치료제 후보 종으로서 항체의 생성과 관련하여 상기 항체가 보체(complement)를 고정시키고 세포 독성 림프구를 보충할 수 있어 CDC 및 ADCC에 참여하게 되어 바람직한 일일 것이다. 이와 동일할 수 있는, 다음을 포함하는 항체의 많은 동위형이 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다: 쥐 IgM, 쥐 IgG2a, 쥐 IgG2b, 쥐 IgG3, 인간 IgM, 인간 IgG1, 인간 IgG3 및 인간 IgA. 또한, EGFRvIII에 대한 치료제 후보 종으로서 항체의 생성과 관련하여, 항체가 천연 킬러(NK) 세포와 같은 효과 인자 세포에 대한 Fc 수용체의 개입을 통해 항체-의존적 세포의 세포 독성(ADCC)를 활성화시킬 수 있어 바람직한 일일 것이다. 다음을 포함하는, ADCC할 수 있는 항체의 많은 동위형이 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다: 쥐 IgG2a, 쥐 IgG2b, 쥐 IgG3, 인간 IgG1 및 인간 IgG3. 생성된 항체는 이러한 동위형을 초기에 가질 필요가 없고, 이후 생성된 항체는 동위형을 가질 수 있으며 본 기술 분야에 공지된 종래 기술을 이용하여 동위형 전환될 수 있음은 물론이다. 이들 중, 직접 재조합 기술을 사용하는 것을 포함한다(예를 들면, 미국특허 4,816,397 참조) 및 세포-세포 융합 기술(예를 들면, 미국특허 5,916,771 및 6,207,418 참조).

[0137] 세포-세포 융합 기술에서, 임의의 원하는 동위형을 가진 중쇄를 갖는 골수종(myeloma) 또는 기타 세포주가 생성되며, 경쇄를 갖는 골수종 또는 기타 세포주가 생성된다. 이후, 이러한 세포는 융합될 수 있으며, 온전한 항체를 발현하는 세포주가 분리될 수 있다.

[0138] 본 명세서에서 논의되어 있는 임의의 항-EGFRvⅢ 항체는 예를 들면 인간 항-EGFRvⅢ IgGI 항체이다. 이러한 항체가 원하는 EGFRvⅢ 분자에 결합을 갖는 경우, 여전히 동일한 가변 영역(항체의 특이성 및 그 친화도의 일부를 한정한다)을 가지면서 인간 IgM, 인간 IgG3 또는 인간 IgGA를 생성하도록 쉽게 동위형 전환될 수 있다. 이후, IgG1을 포함하는 이러한 분자는 보체를 고정시킬 수 있으며, CDC에 참여할 수 있고, IgG1 또는 IgG3 불변 영역을 포함하는 경우에는 이러한 분자는 또한 세포 독성 림프구를 통해 항체-의존적 세포의 세포 독성(ADCC)에 참여할 수 있을 것이다.

[0139] 따라서, 위에서 논의된 대로 원하는 "구조적" 특성을 만족하는 항체 후보 종으로서, 동위형 전환을 통해 일반적으로 원하는 "기능적" 특성의 적어도 일부를 제공할 수 있다.

[0140] 기타 치료제의 디자인 및 생성

[0141] EGFRvⅢ에 대해 본 명세서에서 생성되고 특성이 규명된 항체의 활성을 토대로, 항체 기 이상으로 기타 치료 양식의 디자인이 용이하게 된다. 이러한 양식은 이중 특이성 항체, 면역 독소 및 방사선 표지된 치료제와 같은 발전된 항체 치료제, 펩타이드 치료제의 생성, 유전자 치료제, 특히 인트라바디(intrabody), 안티센스 치료제 및 소분자 치료제를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0142] 발전된 항체 치료의 개발과 관련하여, 세포 독성 림프구의 보체 고정 및 보충이 바람직한 특성인 경우, 예를 들면 이중 특이성, 면역 독소 또는 방사선 표지의 사용을 통해 세포 사멸을 강화시킬 수 있다.

[0143] 예를 들면, 이중 특이성 항체와 관련하여,(1) 하나는 EGFRvⅢ에 특이성을 갖고 다른 하나는 제 2 분자에 특이성을 갖는 서로 결합된 2개의 항체, (ii) 하나의 사슬은 EGFRvⅢ에 특이적이고, 제 2 사슬은 제 2 분자에 특이적인 단일 항체 또는 (iii) EGFRvⅢ 및 다른 분자에 특이성을 갖는 단일 사슬 항체를 갖는 단일 항체를 포함하는 이중 특이성 항체가 생성될 수 있다. 이러한 이중 특이성 항체는 예를 들면 (i) 및(ii)와 관련하여 잘 알려져 있는 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들면, Fanger, et al., Immunol Methods 4: 72-81(1994) and Wright and Harris, supra 참조, (iii)과 관련하여 예를 들면 Traunecker et al.Int. J. Cancer(Suppl.) 7: 51-52(1992) 참조. 각각의 경우, 제 2 특이성은 CD16 또는 CD64(예를 들면, Deo et al. 18: 127(1997) 참조), CD3(Micromet's BiTE technology) 또는 CD89(예를 들면, Valerius et al. Blood 90:4485-4492(1997)참조)를 포함하지만 이들에 한정되는 것이 아닌 Fc 사슬 활성화 수용체에 대해 행해질 수 있다. 상술한 바에 따라 생성된 이중 특이성 항체는 EGFRvⅢ를 발현하는 세포, 특히 본 발명의 EGFRvⅢ 항체가 효과적인 세포를 사멸시키는 경향이 있다.

[0144] 면역 독소와 관련하여, 항체는 본 기술 분야에 잘 알려져 있는 기술을 활용하여 면역 독소로서 작용하도록 변형될 수 있다. 예를 들면 Vitetta Immunol Today 14: 252(1993)를 참조. 또한 미국특허 5,194,594호 참조. 방사선 표지된 항체의 생성과 관련하여, 이러한 변형 항체는 또한 본 기술분야에 잘 알려져 있는 기술을 활용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들면, Junghans et al. in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686(2d edition, Chafner and Longo, eds. , Lippincott Raven(1996)) 참조. 예를 들면, 미국특허 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990(RE 35,500), 5,648,471 및 5,697,902 참조. 면역 독소 및 방사선 표지된 분자 각각은 EGFRvⅢ를 발현하는 세포, 특히 본 명세서에 기재되어 있는 항체가 유효한 세포를 사멸시키기 쉬울 것이다.

[0145] 상기 항체는 보다 신속하게 결합하거나, 에피토프로부터 보다 서서히 해리되도록 디자인될 수 있어, 항체 그 자체가 치료제로 디자인될 수 있다. 상기 항체의 변경된 특성은 예를 들면 환자에게 치료제를 투여하는데 있어 사용될 수 있다.

[0146] 치료 면역 접합체

[0147] 알려져 있는 바와 같이, 약물, 독소 또는 다른 분자들(면역 접합체 또는 면역 독소)에 결합된 항체는 항체와 같은 특이적 결합 분자에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 분자를 발현시키는 세포를 타겟으로 사멸시키는데 있어 매우 유용하다. 위에서 논의한 바와 같이, EGFRvⅢ는 임의의 정상 조직 상에서 발현하는 것으로 알려져 있지 않다. 또한, EGFRvⅢ는 다양한 인간 종양에서 유의적인 발현을 나타낸다. 따라서, EGFRvⅢ는 면역 독소와 함께 타겟하기 위한 매우 매력적인 분자이다.

[0148] 단클론성 항체-약물 접합체와 함께 종양을 특이적으로 타겟으로 하는 시도에 대한 많은 보고가 있어 왔다(Sela et al. in Immunoconjugates 189-216(C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, in Targeted Drugs 1-22(E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al, in Antibody Mediated Delivery Systems 1-23(J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, in Antibody Mediated Delivery Systems 25-53(J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, in Antibody Mediated Delivery Systems 55-79(J. Rodwell, ed. 1988). 메토트렉세이트, 다우노루비신, 독소루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 멜파란, 미토마이신 C와 같은 세포 독성 약물이 다양한 쥐 단클론성 항체에 접합되어 왔다. 몇몇의 경우, 약물 분자는 혈청 알부민(Garnett et al. Cancer Res. 46: 2407-2412(1986); Ohkawa et al. Cancer Immumol. Immunother. 23: 81-86(1986); Endo et al. Cancer Res. 47: 1076-1080(1980)), dextran(Hurwitz et al.Appl. Biochem. 2: 25-35(1980); Manabi et al. Biochem. Pharmacol. 34: 289-291(1985); Dillman et al. Cancer Res. 46: 4886-4891(1986); Shoval et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8276-8280(1988)), 또는 폴리글루탐산(Tsukada et al. J. Natl. Canc.Inst. 73: 721-729(1984); Kato et al. J. Med. Chem. 27: 1602-1607(1984); Tsukada et al. Br. J. Cancer 52: 111-116(1985))과 같은 매개 담체 분자를 통해 항체 분자와 연관된다.

[0149] 다양한 링커 기술이 이러한 면역 접합체를 제조하기 위해 사용되어 왔으며, 개열성 및 비-개열성 링커가 연구되어 왔다. 그러나, 대부분의 경우, 약물 분자가 타겟 부위에서 변형되지 않은 형태의 접합체로부터 방출될 수 있다면, 약물의 완전 세포 독성 잠재성 만이 관찰될 수 있다.

[0150] 항체-약물 접합체를 생성하기 위해 사용되어 온 개열성 링커의 하나는 수용체 매개 세포 이물 흡수(endocytosis) 및 리소솜(lysosome) 중에 발생하는 엔도솜(endosome)과 같은 상이한 세포내 구획의 산성 환경을 이용하는 시스-아코니틴산을 기재로 하는 산-불안정성 링커이다. Shen 및 Ryser는 거대 분자 담체와 함께 다우노루비신의 접합체를 제조하기 위한 상기 방법을 소개하였다(Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1048-1054(1981)). Yang 및 Reisfeld는 항-멜라노마 항체에 다우노루비신을 결합시키기 위해 동일한 기술을 사용하였다(J. Natl. Canc.Inst. 80: 1154-1159(1988)). 최근에, Dillman et al.는 또한 항-T 세포 항체와 함께 다우노루비신의 접합체를 생성하기 위해 유사한 방식으로 산-불안정한 링커를 사용하였다(Cancer Res. 48: 6097-6102(1988)).

[0151] Trouet 등에 의해 사용된 또 다른 접근법은 펩타이드 스페이스 아암을 통해 항체에 다우노루비신을 결합시키는 것을 포함시켰다(Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 626-629(1982)). 이것은 유리 약물이 리소솜 펩티다아제의 작용에 의해 이러한 접합체로부터 방출될 수 있다는 전제하에 수행되었다.

[0152] 그러나, 시험관내 세포 독성 시험을 통해, 항체-약물 접합체는 유리 미결합된 약물과 동일한 세포 독성 능력을 달성하기 어렵다는 것을 알 수 있었다. 이는 약물 분자가 항체로부터 방출되는 매카니즘이 매우 비효율적임을 시사한다. 면역 독소의 분야에서, 단클론성 항체 및 촉매 활성인 단백질 사이의 디술피드 브릿지를 통해 형성된 접합체는 다른 링커를 함유하는 접합체에 비해 보다 세포 독성이 있는 것으로 밝혀졌다. Lambert et al. J. Biol. Chem. 260: 12035-12041(1985); Lambert et al. in Immunotoxins 175-209(A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al. Cancer Res. 48: 2610-2617(1988) 참조. 이는 항체 분자와 독소 사이에 디술피드 결합의 효율적인 절단에 기여하는 글루타티온의 세포내 고농도에 기인하였다. 그럼에도 불구하고, 약물과 거대 분자 사이의 접합체를 제조하기 위한 디술피드 브릿지의 사용 예가 소수 보고되어 있다. Shen 등은 메토트렉세이트를 메르캅토에틸아미드 유도체로 전환시킨 후, 디술피드 결합을 통해 폴리-D-라이신과 결합시키는 것을 기재하였다(J. Biol. Chem. 260: 10905-10908(1985)). 또한, 항체와 트리술피드-함유 독성 약물인 칼리케아미신의 접합체를 제조하는 보고가 있었다(Menendez et al. Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer, San Diego, Abstract 81(1989)). 항체와 트리술피드-함유 독성 약물인 칼리케아미신의 접합체를 제조하는 또 다른 보고가 있었다(Hinman et al, 53 Cancer Res. 3336-3342(1993)).

[0153] 디술피드 결합된 항체-약물 접합체의 결여에 대한 하나의 이유는 디술피드 브릿지를 통해 약물을 항체에 결합시키기 위해 용이하게 사용될 수 있는 기를 함유하는 황 원자를 갖는 세포 독성 약물의 불이용성(unavailability)이다. 더욱이, 종래의 약물을 화학적으로 변형하는 것은 세포 독성력을 감소시키는 것 없이는 어렵다.

[0154] 종래의 항체-약물 접합체의 또 다른 주요한 단점은 타겟 항원의 제한된 수와 메토트렉세이트, 다우노루비신 및 빈크리스틴과 같은 종양 정지(cancerostatic) 약물의 상대적으로 적정한 세포 독성 때문에 충분한 농도의 약물을 타겟 부위로 전달할 수 없다는 것이다. 유의적인 세포 독성을 달성하기 위해, 약물 분자를 항체로 또는 중합체 담체를 통한 연관이 필요하게 된다. 그러나, 이와 같이 상당히 변형된 항체는 타겟 항원에 대한 손상된 결합 및 신속한 혈류로부터의 체내 제거를 나타내기도 한다.

[0155] 마이탄시노이드(maytansinoid)는 세포 독성이 강한 약물이다. 마이탄신은 Kupchan 등에 의해 동아프리카 관목인 Maytenus serrata로부터 처음 분리되었고, 메토트렉세이트, 다우노루비신 및 빈크리스틴과 같은 종래의 암 화학 치료제보다 100 내지 1000배 더 세포 독성이 있는 것으로 밝혀졌다(미국특허 3,896,111). 이어서, 몇몇 미생물이 마이탄시놀 및 마이탄시놀의 C-3 에스테르와 같은 마이탄시노이드를 생성하는 것으로 밝혀졌다(미국특허4,151,042). 마이탄시놀의 합성 C-3 에스테르 및 마이탄시놀의 유사체가 또한 보고되었다(Kupchan et al. J. Med. Chem. 21: 31-37(1978); Higashide et al. Nature 270: 721-722(1977); Kawai et al. Chem. Pharm. Bull. 32: 3441-3451(1984)). C-3 에스테르가 제조되는 마이탄시놀의 유사체의 예는 방향족 고리(예를 들면 데클로로) 또는 C-9, C-14(예를 들면 히드록실화된 메틸기), C-15, C-18, C-20 및 C-4,5에서 변형된 마이탄시놀을 포함한다.

[0156] 천연 및 합성 C-3 에스테르는 다음 2개의 그룹으로 분류될 수 있다:

[0157] (a) 단순한 카르복실산을 갖는 C-3에스테르(미국특허 4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348; 및 4,331,598), 및

[0158] (b) N-메틸-L-알라닌의 유도체를 갖는 C-3 에스테르(미국특허 4,137,230; 4,260,608; 5,208,020; 및 Chem. Pharm. Bull. 12: 3441(1984)).

[0159] 상기 그룹(b)의 에스테르는 그룹의 에스테르(a)에 비해 훨씬 보다 세포 독성이 있는 것으로 밝혀졌다.

[0160] 마이탄신은 유사분열(mitotic) 억제제이다. 체내에서 마이탄신으로 L1210 세포를 처리하는 것이 유사분열에서 축적되는 세포의 67%를 초래하는 것으로 보고되었다. 미처리된 대조 세포는 3.2 내지 5.8%의 유사분열 지수를 나타내는 것으로 보고되었다(Sieber et al. 43 Comparative Leukemia Research 1975, Bibl. Haemat. 495-500(1976)). 섬게(sea urchin egg)알 및 대합(clam)알을 이용한 실험은 마이탄신이 미세관(microtubule) 단백질인 투불린(tubulin)의 중합화를 억제함으로써 미세관의 형성을 방해함으로써 유사분열을 억제함을 알 수 있다(Remillard et al. Science 189: 1002-1005(1975)).

[0161] 시험관내, P388, L1210 및 LY5178 쥐 백혈병 세포 현탁액은 가장 민감한 P388 라인과 함께 10-3 내지 10-1 mug/mul의 투여량의 마이탄신에 의해 억제되는 것으로 밝혀졌다.

[0162] 마이탄신은 또한 인간 비인두(nasopharyngeal) 암종 세포의 시험관내 성장의 활성 억제제인 것으로 밝혀지기도 했으며, 인간 급성 림프성 백혈병(lymphoblastic leukemia) 라인 CEM은 10-7 mg/ml의 저농도에 의해 억제되는 것으로 보고되었다(Wolpert-DeFillippes et al. Biochem. Pharmacol. 24: 1735-1738(1975)).

[0163] 마이탄신은 또한 체내 활성인 것으로 밝혀지기도 했다. P388 림프성 백혈병 계에서 종양 성장은 50 내지 100배 투여량 범위 이상에서 억제되는 것으로 밝혀졌으며, 이는 높은 치료 지수를 시사하며; 또한 유의적인 억제 활성은 L1210 마우스 백혈병계, 인간 루이스(Lewis) 폐암종계 및 인간 B-16 흑생종(melanocarcinoma)계에 의해 밝혀질 수 있었다(Kupchan, Ped. Proc. 33: 2288-2295(1974)).

[0164] 세포 결합제(항체와 같은)와 마이탄시노이드를 접합시키기 위한 현재의 방법은 2개의 반응 단계를 포함한다. 먼저, 예를 들면 항체와 같은 세포 결합제를 디티오피리딜기를 항체에 도입하기 위한 N-숙시니미딜 피리딜디티오프로피오네이트(SPDP)와 같은 가교제에 의해 변형시킨다(Carlsson et al. Biochem. J. 173: 723-737(1978); 미국특허 5,208,020). 제 2 단계에서, 출발 시약으로서 DM1(공식적으로는 $N^{2'}$-데아세틸-$N^{2'}$-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-마이탄신과 같은 티올기를 갖는 반응성 마이탄시노이드가 변형된 항체에 첨가되어 변형된 항체에서 티오피리딜기의 치환 및 디술피드-연관된 세포 독성 마이탄시노이드/항체 접합체를 생성시킨다(미국특허 5,208,020). 마이탄시노이드의 결합에 대한 1-단계 공정이 미국특허 6,441,163에 기재되어 있다. 마이탄시노이드-기재 면역 독소 기술은 Immunogen Corporation(Cambridge, MA)로부터 입수할 수 있다.

[0165] 또 다른 중요한 독소 기술은 아우리스타틴 독소를 기초로 한다. 아우리스타틴은 강력한 세포 성정 억제 물질로서 인도양 산토끼 Dolabella로부터 얻어진 돌라스타틴 100으로부터 유도한다. 미국특허 4,816,444 및 4,978,744 참조. 다른 돌라스타틴에 대해서는, 미국특허 4,414,205(돌라스타틴-1, 2 및 3), 5,076,973(돌라스타틴-3), 4,486,414(돌라스타틴-A 및 B); 4,986,988(돌라스타틴-13), 5,138,036(돌라스타틴-14) 및 4,879,278(돌라스타틴-15) 참조. 아리조나 대학의 Pettit 박사 및 동료에 의해 분리되고 합성된 다양한 아우리스타틴 유도체는 세포에 대해 독성이 큰 것으로 시험되고 밝혀졌다. Pettit et al. Antineoplastic agents 337. Synthesis of dolastatin 10 structural modifications. Anticancer Drug Des. 10(7): 529-44(1995), Woyke et al. In vitro activities and postantifungal effects of the potent dolastatin 10 structural

modification auristatin PHE. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45: 3580-3584(2001), Pettit et al. Specific activities of dolastatin 10 and peptide derivatives against Cryptococcus neoformans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42: 2961- 2965(1998), Woyke Three-dimensional visualization of microtubules during the Cryptococcus neoformans cell cycle and the effects of auristatin PHE on microtubule integrity and nuclear localization. Submitted, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 참조.

[0166] 최근에, 항체에 대한 최대 하중(payload)으로서 전달될 때 매우 효과적인 것으로 보이는 추가적인 아우리스타틴 유도체를 개발하였다. 예를 들면, 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이 종양 특이적 항체에 결합될 때 종양 세포에 대한 강력한 독소로서 밝혀졌다. Doronina et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology.(2003)(available online), Francisco et al.cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood. (2003) May 8 [Epub ahead of print]. Epub 2003 Apr 24(available online). 아우리스타틴 분자의 세포 독성 이외에, 펩타이드-연관된 접합체가 매우 안정하여 완충액 및 혈장에서 다른 링커 기술보다 정상 조직에 대해 보다 특이적이고 덜 독성적이라는 것이 연구를 통해 밝혀졌다. Doronina et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology.(2003)(available online), Francisco et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood.(2003) May 8 [Epub ahead of print]. Epub 2003 Apr 24(available online). 이러한 링커는 분지된 펩타이드 디자인을 토대로 하며, 예를 들면 mAb-발린-시트룰린-MMAE 및 mAb-페닐알라닌-라이신-MMAE 접합체를 포함한다. Doronina et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology.(2003)(available online), Francisco et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30- monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood.(2003) May 8 [Epub ahead of print]. Epub 2003 Apr 24(available online). 이러한 링커는 분지된 펩타이드 디자인을 토대로 하며, 예를 들면 mAb-발린-시트룰린-MMAE 및 mAb-페닐알라닌-라이신-MMAE 접합체를 포함한다. Doronina, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology.(2003)(available online), Francisco et al.cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood. (2003) May 8 [Epub ahead of print]. Epub 2003 Apr 24(available online). 이러한 디자인 및 접합 기술은 예를 들면 King et al. Monoclonal antibody conjugates ofdoxorubicin prepared with branched peptide linkers: inhibition of aggregation by methoxytriethyleneglycol chains. J Med Chem. 45(19): 4336-43(2002) and Dubowchik et al. Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 2. Models of anticancer drugspaclitaxel(Taxol),mitomycin C and doxorubicin. Bioorg Med Chem Lett. 8(23): 3347-52(1998)에 기재되어 있다. 상술한 문헌을 기초로 한 아우리스타틴 E-기재 면역 독소 기술은 Seattle Genetics Corporation(Seattle, WA)로부터 입수할 수 있다.

[0167] 면역 접합체의 생성을 위한 독소로서 가능성이 있는 것을 보이는 천연 소스-추출물, 반합성 및 합성 유사체로부터 얻어진 신규 미세관 영향 화합물이 상당수 있다(웹사이트 newmedinc "dot" com 참조). 이들을 활용하는 약물 생성물의 분자 및 예들은 다음을 포함한다: 콜키친-부위 결합제(Curacin), 콤브레타스타틴(AVE8062, 콤브레타스타틴 A-4 약물 전구체(CA4P), Oxi-4503), 크립토파이신(LY355703), 디스코데르몰리드, 돌라스타틴 및 유사체(Auristatin PHE, Dolastatin 10, ILX-651, Symplostatin 1, TZT-1027), 에포틸론(BMS-247550, BMS-310705,EP0906, KOS-862, ZK-EPO), 엘레우테로빈, FR182877, 할리콘드린 B(E7389), 할리미드(NPI-2352 및 NPI-2358), 헤미아스테르린(HTI-286), 라울리말리드, 마이탄시노이드("DM1")(Bivatuzumab mertansine, Cantuzumab mertansine, huN901-DM1/BB-10901TAP, MLN591DM1, My9-6-DM1, Trastuzumab-DM1), PC-SPES, Peloruside A, Resveratrol, S-allylmercaptocysteine(SAMC), Spongistatins, Vitilevuamide, MolecularMotor-Kinesins(SB-715992), 디자인된 콜키친-부위 결합제(A-289099, A-293620/A-318315, ABT-751/E7010, D-24851/D-64131, ZD6126), 기타 신규 스핀들 독물(2-메톡시에스트라디올(2-ME2), 벤지미다졸 카르바메이트(ANG 600 series, Mebendazole), CP248/CP461, HMN-214, R440, SDX-103, T67/T607). 또한, 추가적인 쥐 유도 독소가 Mayer, A. M. S. Marine Pharmacology in 1998: Antitumor and Cytotoxic Compounds. The Pharmacologist. 41(4): 159-164(1999)에 검토되어 있다.

[0168] 치료제 투여 및 제형

[0169] 연장된 작용 지속 시간은 정맥내, 피하 또는 근육내 주사와 같은 다른 비경구 경로에 의해 덜 빈번하고 보다 편리한 투여 계획이 가능하도록 할 것이다.

[0170] 체내 투여용으로 사용될 경우, 본 명세서에 기재된 항체 제형은 멸균 처리되어야 한다. 동결건조 및 재구성 전 또는 후에 멸균 여과막을 통과시킴으로써 멸균처리된다. 항체는 통상적으로 멸균된 형태 또는 용액 형태로 저장될 것이다. 치료 항체 조성물은 일반적으로 멸균 도입구를 갖는 용기, 예를 들면 피하 주사용 투여 바늘에 의해 관통가능한 스토퍼와 같은 제형의 보충이 가능한 어댑터를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 넣는다.

[0171] 항체 투여 경로는 공지된 방법, 예를 들면 후술하는 정맥내 주사 또는 주입, 복강내, 뇌내, 근육내, 안내, 동맥내, 초내, 흡입 또는 병소내 경로, 또는 서방계에 따른다. 항체는 바람직하게는 주입 또는 전량(bolus) 주사에 의해 연속적으로 투여된다.

[0172] 치료적으로 사용될 항체의 유효량은 예를 들면 치료 대상, 투여 경로 및 환자의 상태에 따라 다를 것이다. 따라서, 치료 전문가는 적절한 치료효과를 얻기 위해 필요한 만큼 투여량을 조절하고 투여 경로를 변화시키는 것이 바람직하다. 전형적으로, 의사는 투여량이 원하는 효과를 달성할 때까지 항체를 투여할 것이다. 이러한 치료의 진행은 종래의 분석 또는 본 명세서에 기재되어 있는 분석법에 의해 용이하게 관찰된다.

[0173] 본 명세서에 기재되어 있는 항체는 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합물 형태로 제조될 수 있다. 치료 조성물은 정맥내 또는 비강 또는 폐를 통해 액체 또는 분말 에어로졸(동결 건조 형태)로서 투여될 수 있다. 조성물은 필요한 경우 비경구 또는 피하 투여될 수도 있다. 전신 투여시, 치료 조성물은 pH, 등장성 및 안정성을 고려하여 멸균, 무-발열원, 경구적으로 허용되는 용액이어야 한다. 이러한 조건들은 당업자에게 알려져 있다. 요약하면, 화합물의 투여 제형은 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 원하는 순도를 갖는 화합물을 혼합함으로써 저장 또는 투여용으로 제조된다. 이러한 물질은 사용된 투여량 및 농도에서 수혜자에게는 비독성이며, TRIS HCl, 포스페이트, 시트레이트, 아세테이트 및 기타 유기산염과 같은 완충액; 아스코르브산과 같은 산화방지제; 폴리아르기닌과 같은 저분자량(약 10 잔기 미만) 펩타이드, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역 글로불린과 같은 단백질; 글리신, 글루탐산, 아스파르트산 또는 아르기닌과 같은 아미노산; 단당류, 이당류 및 셀룰로오스 또는 그의 유도체, 글루코오스, 만노오스 또는 덱스트린을 포함하는 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이팅제; 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알코올; 나트륨과 같은 대이온 및/또는 TWEEN, PLURONICS 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비이온성 계면활성제을 포함한다.

[0174] 투여용 멸균 조성물은 Remington's Pharmaceutical Sciences(18th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990)에 기재된 바대로 종래의 약제학적 절차에 따라 제형화될 수 있다. 예를 들면, 물 또는 참기름, 땅콩유, 또는 목화씨유와 같은 천연 식물성 오일, 또는 에틸 올레에이트 등과 같은 합성 지방 배지에 활성 화합물의 용해 또는 현탁화가 바람직할 수 있다. 완충액, 보존제, 산화방지제 등은 허용되는 약제학적 절차에 따라 혼입될 수 있다.

[0175] 서방성 제제의 적절한 예는 폴리펩타이드를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 기질을 포함하며, 이때 기질은 성형품, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 기질의 예는 폴리에스테르, Langer et al., J. Biomed Mater. Res.,(1981) 15: 167-277 and Langer, Clieni. Tech.,(1982) 12: 98-105, or poly(vinylalcohol)), polylactides(U. S. Pat. No. 3,773, 919, EP 58,481)에 기재되어 있는 하이드로겔(예를 들면, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), L-글루탐산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman et al., Biopolymers,(1983) 22: 547-556), 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트(Langer et al., supra), LUPRON Depot와 같은 분해성 락트산-글리콜산 공중합체(락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사성 미세구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산(EP 133,988)를 포함한다.

[0176] 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 이상 동안 분자의 방출을 가능케 하는 반면, 일부 하이드로겔은 보다 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다. 장시간 동안 체내에 캡슐화된 단백질이 잔류할 때, 37℃에서 습기에 노출된 결과 변성되거나 응집되어 생물학적 활성 손실 및 면역원성에 있어 변화를 초래할 수 있다. 관여 매카니즘에 따라 단백질 안정화에 대해 이성적인 방법이 고안될 수 있다. 예를 들면, 응집 매카니즘이 디술피드 상호 교환을 통해 분자간 S-S 결합 형성으로 발견되는 경우, 안정화는 술피드릴 잔기를 개질하고, 산성 용액으로부터 동결건조하며, 수분 함량을 조절하고, 적절한 첨가제를 사용하며, 특이적 중합체 기질 조성물을 전개함으로써 달성될 수 있다.

[0177] 서방성 조성물은 또한 현탁액 중 결정을 유지할 수 있는 적절한 제형에 현탁되어 있는 항체의 결정의 제조를 포함한다. 이들 제제가 피하 또는 복강내 주사될 때 서방성 효과를 얻을 수 있다. 다른 조성물들은 또한 리포솜으로 포집된 항체를 포함한다. 이러한 항체를 함유하는 리포솜은 공지된 방법에 의해 제조된다: 미국특허 DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,(1985) 82: 3688-3692; Hwang etal., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA,(1980) 77: 4030-4034; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; 142,641; 일본특허출원 83-118008; 미국특허 4,485,045 및 4,544,545; 및 EP 102,324.

[0178] 주어진 환자에 대한 항체 제형의 투여량은 약물의 작용을 변형시키는 것으로 알려져 있는 질환의 중증도, 유형, 체중, 성별, 식이, 투여 시간 및 경로, 다른 치료법 및 기타 관련 임상 인자를 포함하는 여러 가지 인자를 고려하여 주치의에 의해 결정될 수 있다. 치료 유효 투여량은 체외 또는 체내 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0179] 치료적으로 사용되는 항체의 유효량은 예를 들면 치료 목적, 투여 경로, 환자 상태에 따라 다르다. 따라서, 치료자는 적절한 치료 효과를 얻기 위해 필요한 경우 투여량을 및 투여 경로를 변경하는 것이 바람직하다.

[0180] 전형적인 1일 투여량은 상술한 인자에 따라 약 0.001 mg/kg 내지 100 mg/kg 이상일 수 있다. 전형적으로, 의사는 투여량이 원하는 효과를 달성할 때까지 치료 항체를 투여할 것이다. 이러한 치료법의 진행은 종래의 분석 또는 본 명세서에 기재되어 있는 분석법에 의해 용이하게 관찰된다.

[0181] 본 명세서에 기재되어 있는 조성물 및 방법에 따라 치료 실체의 투여는 적절한 담체, 부형제 및 제형으로 혼입되는 기타 제제와 함께 투여되어 개선된 주입, 전달, 내성 등을 제공하는 것으로 이해될 것이다. 다수의 적절한 제형은 모든 약제학자에게 알려져 있는 처방전에서 찾을 수 있다(18th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA(1990)), 특히 상기 저서 내용 중 Chapter 87 by Block, Lawrence). 이러한 제형은 예를 들면 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 베시클(예를 들면 리포펙틴)을 함유하는 지질(양이온성 또는 음이온성), DNA 접합체, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수 유제, 유제 카르보왁스(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고형 겔, 카르보왁스를 함유하는 반고형 혼합물을 포함한다. 제형 중 활성 성분이 제형에 의해 불활성화되고, 제형이 투여 경로와 생리학적으로 상용적이고 내성이 있는 경우에는 상술한 모든 혼합물이 본 발명에 따른 치료 및 요법에서 적당할 것이다. Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance."Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2): 210-8(2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. "Int. J. Pharm. 203(1-2): 1-60(2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts. "J Pharm Sci. 89(8): 967-78(2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations "PDA J Pharm Sci Technol 52: 238-311(1998) and the citations therein for additional information related to formulations, excipients and carriers well known to pharmaceutical chemists.

[0182] 항체의 제제

[0183] 본 명세서에 기재되어 있는 바와 같이, 항체는 후술하는 바와 같이 XenoMouse 기술을 활용함으로써 제조하였다. 이후, 상기 마우스는 인간 면역 글로불린 분자 및 항체를 생성할 수 있으며, 쥐 면역 글로불린 분자 및 항체의 생성에 있어 결핍되어 있다. 이와 동일하게 활용되는 기술이 본 명세서에 기재되어 있는 특허, 특허출원 및 참고 문헌에 개시되어 있다. 그러나, 특히 마우스의 트랜스제닉 생성 및 그로부터 항체의 생성에 대한 일실시형태가 미국특허출원 08/759,620(출원일 1996년 12월 3일) 및 국제특허출원 WO 98/24893(공개일 1998년 6월 11일), WO 00/76310(공개일 2000년 12월 21일)에 개시되어 있다. 또한, Mendez et al. Nature Genetics 15: 146-156(1997) 참조.

[0184] 이러한 기술을 이용함으로써, 다양한 항원에 대한 완전 인간 단클론성 항체가 생성될 수 있다. 일실시형태에 있어서, 마우스의 XenoMouse® 라인이 대상 항원으로 면역화되고(예를 들면 EGFRvⅢ), 림프구 세포는 항체를 발현한 마우스로부터 재생되며(예를 들면, B-세포), 이러한 세포는 골수-형 세포주와 융합되어 영구(immortal) 하이브리도마 세포주를 생성하며, 이러한 하이브리도마 세포주는 스크리닝 및 선택되어 대상 항원에 특이적인 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 동정하게 된다. 본 발명에 따르면, EGFRvⅢ에 특이적인 항체를 생성하는 다중 하이브리도마 세포주를 생성하기 위한 방법이 제공된다. 또한, 본 발명에 따르면, 이러한 항체의 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 포함하는, 상기 세포주에 의해 생성되는 항체의 특성 규명화가 제공된다.

[0185] 이와 달리, 골수종 세포에 융합되어 하이브리도마를 생성하는 대신에, 재생된 세포에 의해 생성되고, 면역화된 마우스의 XenoMouse® 라인으로부터 분리된 항체는 초기 항원, 바람직하게는 EGFRvⅢ 단백질에 대한 반응성에 대해 더 스크린된다. 이러한 스크리닝은 EGFRvⅢ 단백질을 이용한 ELISA, 전장 EGFRvⅢ를 안정하게 발현하는 NR6 M 세포에 대한 시험관내 결합 및 NR6 M 세포에서 항체에 의한 EGFRvⅢ 수용체의 내재화를 포함한다. 이후, 대상 항체를 분비하는 단일 B 세포가 EGFRvⅢ-특이적 용혈 플라크(hemolytic plaque) 분석법에 의해 분리된다(Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, i93: 7843-7848(1996)). 세포 용해를 위한 타겟 세포는 바람직

하게는 EGFRvⅢ 항원으로 코팅된 양의 적혈구 세포(SRBC)이다. 면역 글로불린 및 보체를 분비하는 B 세포 배양물의 존재하에서, 플라크의 형성은 특이적 EGFRvⅢ: 타겟 세포의 I-매개 세포 용해를 의미한다. 플라크의 중심에 있는 상기 단일 항원-특이적 혈장 세포가 분리될 수 있고, 항체의 특이성을 코딩하는 유전 정보는 상기 단일 혈장 세포로부터 분리된다. 역-전사 효소 PCR을 이용하여, 분비된 항체의 가변 영역을 코딩하는 DNA가 복제될 수 있다. 이후, 이렇게 복제된 DNA는 적절한 발현 벡터, 바람직하게는 pcDNA와 같은 벡터 카세트, 보다 바람직하게는 면역 글로불린 중쇄 및 경쇄의 불변 도메인을 함유하는 pcDNA 벡터로 더 첨가될 수 있다. 이후, 생성된 벡터는 숙주 세포, 바람직하게는 CHO 세포로 형질감염되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭하기 위해 필요한 만큼 변형된 종래의 영양분 배지에서 배양될 수 있다. 이때, 본 발명자는 EGFRvⅢ에 특이적인 항체를 생성하는 다중 단일 플라즈마 세포의 분리를 제공하고자 한다. 또한, 항-EGFRvⅢ 항체의 특이성을 코딩하는 유전 물질이 분리된 다음, 숙주 세포로 형질감염되는 절절한 발현 벡터로 도입된다. XenoMouse 마우스로부터 B 세포는 또한 항체 표시 라이브러리가 만든 유전 물질의 소스로서 사용될 수도 있다. 이러한 라이브러리는 본 기술 분야의 일반적인 기술을 이용한 박테리오파아지, 효모에서 또는 리보솜 표시를 통한 시험관내 제작될 수 있다. 고도 면역화된 XenoMouse 마우스는 고-친화도, 항원-반응성 항체가 분리될 수 있는 리치(rich) 소스일 수 있다. 따라서, EGFRvⅢ에 대해 고도 면역화된 XenoMouse 마우스가 EGFRvⅢ에 대한 고-친화도 항체가 분리될 수 있는 항체 표시 라이브러리를 만들기 위해 사용될 수 있다. 이러한 라이브러리는 pep3 올리고펩타이드에 대해 스크리닝할 수 있고, 결과적으로 EGFRvⅢ를 발현하는 세포에 대해 스크리닝하는 항체가 유도되어 네이티브 표시 항원에 대한 특이성을 확인할 수 있었다. 이후, 완전 IgG 항체는 재조합 DNA 기술을 이용하여 발현될 수 있다. 예를 들면, WO 99/53049 참조.

[0186] 일반적으로, 상술한 세포주에 의해 생성된 항체는 인간 카파 경쇄와 함께 완전 인간 IgG1 또는 IgG2 중쇄를 가졌다. 일실시형태에 있어서, 상기 항체는 고상 및 용액상으로 측정하였을 때 약 10^{-9} 내지 약 10^{-3}M의 K_d를 전형적으로 갖는 고친화성을 가졌다. 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 항체는 약 10^{-6} 내지 약 10^{-8}M의 저친화도를 가졌다.

[0187] 당업자가 잘 이해하고 있는 바와 같이, 본 실시형태들에 따른 항체는 하이브리도마 세포주 이외의 세포주에서 발현될 수 있다. 특정 항체를 코딩하는 서열이 적절한 포유류 숙주 세포의 형질 전환에 대해 사용가능하다. 형질 전환은 숙주 세포로 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 임의의 공지된 방법일 수 있다. 형질전환은 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하게 위한 공지된 방법, 예를 들면 미국특허 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 및 4,959,455에 예시된 대로 바이러스에서 폴리뉴클레오티드를 패키징하고(또는 바이러스 벡터로 패키징하거나), 숙주세포를 바이러스(또는 벡터)를 이용하여 형질도입하거나, 본 기술분야에 공지된 형질감염 절차에 의해 달성될 수 있다. 사용된 형질전환 절차는 형질전환할 숙주에 따라 다르다. 이형성 폴리뉴클레오티드를 포유류 세포로 도입하기 위한 방법은 본 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 덱스트란-매개 형질감염법, 인산 칼슘 침전법, 폴리브렌 매개 형질감염법, 원형질체(protoplast) 융합법, 전기천공법(electroporation), 리포솜에 폴리뉴클레오티드(들)의 캡슐화 및 핵으로 DNA의 직접 미세 주사법(microinjection)을 포함한다.

[0188] 발현을 위한 숙주로서 이용가능한 포유류 세포주는 본 기술 분야에 잘 알려져 있으며, American type Culture Collection(ATCC)로부터 입수 가능한 많은 영구 세포주를 포함하는 바, 이러한 세포주는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포(hepatocellular) 암종 세포(예를 들면, Hep G2), 및 다수의 기타 세포주를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 특히 바람직한 세포주는 어떠한 세포주가 높은 발현 수준을 갖고 구조적 EGFRvⅢ 결합 특성을 갖고 항체를 생성하는지를 결정함으로써 선택된다.

[0189] 실시예

[0190] 수행된 실험과 얻어진 결과를 포함하는 하기 실시예는 예시 목적으로 제공될 뿐, 본 발명을 한정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0191] EGFRvⅢ-특이적 항체를 생성하기 위한 방법은 우선 항원의 조합(펩타이드, 각종 용해성 단백질, 항원-발현 세포)으로 XenoMouse 마우스의 면역화시킨 다음, 융합법으로 항체 생성 세포를 분리하여 하이브리도마를 생성하거나 또는 XenoMax™/SLAM™ 기술을 통해 B 세포를 분리시키는 것을 포함하였다. 항체 생성 세포를 ELISA에 의해 특이성에 대해 1차 스크리닝하고, FMAT 및/또는 FACS에 의해 세포 표면 결합에 대해서 2차 스크리닝을 실시하였다. 이후, 내재화 분석법을 실시하여 약물 전달에 대해 유용한 항체를 동정하였다. 항체의 친화도를 측정

하였다. 일부 항체를 에피토프 매핑을 위해 선택하였다. 또한, 일부 항체를 시험관내 및 체내 시험을 위해 선택하여 암 치료를 위한 상기 항체의 효능을 분석하였다.

[0192] 실시예 1

[0193] 항원 제제

[0194] A. EGFRvⅢ PEP3-KLH 항원 제제

[0195] 실시예 2와 관련하여, 14-mer 인간 EGFRvⅢ PEP3(LEEKKGNYVVTDHC(서열번호: 56)) 펩티드를 R & D Systems에 의해 주문(custom) 합성하였다. 이후, 상기 PEP3 펩타이드를 다음과 같이 keyhole limpet hemocyanin(KLH)에 결합시켰다: EGFRvⅢ PEP3(200 mcg)(R & D)를 50mcg의 keyhole limpet hemocyanin(KLH; Pierce, Rockford, IL)과 혼합하고 증류수를 사용 최종 부피 165mcl로 맞추었다. 250mcl의 접합 완충액(0.1M MES, 0.9M NaCl, pH 4.7)을 첨가하고, EGFRvⅢ PEP3 및 KLH를 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카르보디이미드 염산염(EDC, Pierce, Rockford, IL)의 10mg/ml 모액 25mcl을 첨가함으로써 가교시켰다. 접합체를 2시간 동안 상온에서 배양하고, 미반응된 EDC를 PBS(pH 7.4)를 이용하여 1 kDa 필터를 통해 원심분리하여 제거하였다(원심분리 필터; Millipore, Bedford, MA).

[0196] 실시예 3과 관련하여, 14-mer 인간 EGFRvⅢ PEP3(LEEKKGNYVVTDHC(서열번호: 56)) 펩티드를 주문 합성하였다. 이후, 상기 PEP3 펩타이드를 다음과 같이 KLH에 결합시켰다: EGFRvⅢ PEP3(200 mcg)를 50mcg의 keyhole limpet hemocyanin(KLH; Pierce, Rockford, IL)과 혼합하고 증류수를 사용 최종 부피 165mcl로 맞추었다. 250mcl의 접합 완충액(0.1M MES, 0.9M NaCl, pH 4.7)을 첨가하고, EGFRvⅢ PEP3 및 KLH를 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카르보디이미드 염산염(EDC, Pierce, Rockford, IL)의 10mg/ml 모액 25mcl을 첨가함으로써 가교시켰다. 접합체를 2시간 동안 상온에서 배양하고, 미반응된 EDC를 PBS(pH 7.4)를 이용하여 1 kDa 필터를 통해 원심분리하여 제거하였다(원심분리 필터; Millipore, Bedford, MA).

[0197] B. B300.19/EGFRvⅢ 형질감염체

[0198] B300.19/EGFRvⅢ 형질감염체를 제조하기 위해, 야생형 EGFR를 A431 세포로부터 초기 클론하고, EGFR 유전자를 변형시켜 EGFRvⅢ에 대해 코딩함으로써 잔기 6-273을 코딩하는 코돈을 결실 접합부에서 생성된 글리신 잔기를 코딩하는 코돈을 이용하여 결실시켰다. 결실 GTT(발린) 및 CGT(아르기닌)을 포위하는 코돈 내에서 결실이 일어나, 결실 후 얻어진 코돈은 GGT(글리신)이다(Wikstrand et al.J Neurovirol. 4(2): 148-58(1998))

[0199] 1. 야생형 EGFR 구조체의 클로닝:

[0200] PolyA+mRNA를 Micro-fast RNA 키트(Invitrogen, Burlington, ON)을 이용하여 A431(ATCC) 세포로부터 추출하였다. 전체 cDNA을 랜덤 pdN6 프라이머 및 M-MuLV 역 전사효소(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.)를 이용하여 polyA+mRNA로부터 합성하였다. 2.3kb PCR 산물을 Pfu DNA 폴리머라아제를 이용하여 다음과 같은 프라이머로 A431cDNA로부터 증폭하였다:

[0201] 센스 5'-GGATCTCGAGCCAGACCGGAACGACAGGCCACCTC-3'; (서열번호: 62)

[0202] 안티센스 5'-CGGATCTCGAGCCGGAGCCCAGCACTTTGATCTT-3'(서열번호: 63).

[0203] 상기 PCR 산물을 XhoI로 분해하고, 겔 정제한 다음, XhoI로 선형화시킨 플라스미드 pWBFNP로 결찰시켜(국제특허출원 WO 99/45031) 플라스미드 Wt-EGFR/pWBFNP를 생성하였다.

[0204] 2. EGFRvⅢ 구조체의 형성:

[0205] C29538 및 C29539가 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.)에 의해 인산화된 프라이머 쌍 C13659/C29538 및 C29539/C14288(BioSource International)으로 플라스미드 Wt-EGFR/pWBFNP 주형으로부터 증폭시킨 PCR 산물:

[0206] C13659: 5'-CGGATGAATTCCCAGACCGGACGACAGGCCACCTC-3'(센스)(서열번호: 64);

[0207] C29538: 5'-CTTTCTTTTCCTCCAGAGCC-3'(안티센스)(서열번호: 65);

[0208] C29539: 5'-GTAATTATGTGGTGACAGATC-3'(센스)(서열번호: 66);

[0209] C14288: 5'-CGGATCTCGAGCTCAAGAGAGCTTGGTTGGGAGCT-3'(안티센스) (서열번호: 67)을 결찰시켜 EGFR 세포외 도메인의 6 내지 273을 코딩하는 서열에서 결실을 도입하고, 발현 벡터 pWBDHFR2로 서브클로닝하였다(국제특허출원 WO 99/45031 참조).

[0210] 상기 결실 5'말단을 나타내는 232 bp 단편을 Pfu 폴리머아라제(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.)로 증폭시킨 Wt-EGFR/pWBFNP 주형으로부터 프라이머쌍 C13659/C29538을 이용하여 생성시켰다. 상기 PCR 산물을 EcoRl(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.)으로 분해하고, 겔 정제하였다. 상기 결실 3'말단을 나타내는 1273 bp 단편을 Pfu 폴리머아라제로 증폭시킨 Wt-EGFR/pWBFNP 및 주형으로부터 프라이머쌍 C29539/14288 을 이용하여 생성시켰다. 상기 PCR 산물을 EcoRl(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.)으로 분해하고, 겔 정제하였다. 단편을 T4 DNA 리가아제(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.)로 EcoRl/Xhol 분해된 pWBDHFR2로 결찰시켜 구조체 EGFRvⅢ/pWBDHFR를 생성하였다.

[0211] EGFR의 세포내 도메인을 다음과 같이 구조체로 도입하였다: 1566bp DraⅢ/XhoI 단편을 플라스미드 Wt-EGFR/pWBFNP로부터 분리하고, DraⅢ/XhoI 분해된 EGFRvⅢ/pWBDHFR를 결찰시켜 EGFRvⅢ-FL/pWBDHFR를 생성하였다.

[0212]

[0213] 3. EGFRvE-FL/pWBDHFR를 이용한 B300.19 세포의 형질감염:

[0214] B300.19 세포($8x10^6$)를 700μl DMEM/HI 배지에 형질감염을 위해 사용하였다. 20μg의 EGFRvⅢ-FL/pWBDHFR 및 2μg CMV-Puro 플라스미드 DNA를 첨가하였다. 세포를 Bio-Rad Gene Pulser를 이용하여 300 볼트/960μF에서 전기천공하였다. 전기천공 후, 세포를 10분 동안 얼음에서 냉각시킨 다음, 10ml 비-선택 배지(DMEM/HI 글루코오스, 10% FBS, 50 μM BME, 2mML-글루타민, 100 유닛 페니실린-G/ml, 100 유닛 MCG 스트렙토마이신/ml)을 첨가하였다. 세포를 48시간 동안 37℃에서 7.5% CO_2 조건하에서 배양하였다.

[0215] 배양 후, 세포를 선택 배지(DMEM/HI 글루코오스, 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 50 μM BME, 100 유닛 페니실린-G/ml, 100 유닛 MCG 스트렙토마이신/ml, 2μg/ml 푸로마이신)로 96 웰 플레이트에서 $2x10^4$, $0.4x10^4$ 및 $0.08x10^4$ 셀/웰로 분할하고, 14일 동안 선택 배지에서 선택하여 안정한 클론을 생성하였다. 푸로(puro) 저항 클론을 Yang et al., Crit Rev Oncol Hematol., 38(1): 17-23(2001))에 기재된 대로 E752 mAb(항-EGFR)으로 염색한 다음, 염소 항-인간 IgG PE를 FACS Vantage(Becton Dickinson) 상에서 분석하였다.

[0216] C. EGFRvⅢ-RbFc 발현 구조체의 구성

[0217] EGFRvⅢ 토끼 Fc 융합 단백질을 생성하기 위해, 본 발명자들은 먼저 토끼 Fc를 코딩하는 DNA를 함유하는 벡터를 구성하였다. 이것을 EGFRvⅢ를 코딩하는 DNA로 결찰하였다. 이러한 방법을 다음과 같이 상세히 기재한다.

[0218] 1. RbFc/pcDNA3.1 Hygro의 구성:

[0219] 프라이머 1322/867(아래)를 사용하여 토끼 IgG의 Hinge-CH2-CH3 도메인을 코딩하는 721bp 단편을 증폭하였다.

[0220] #1322(센스): 5'-GGTGGCGGTACCTGGACAAGACCGTTGCG-3'(서열번호: 68)

[0221] #;867(안티센스): 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGAGCGGGA-3'(서열번호: 69)

[0222] 이렇게 얻어진 PCR 산물을 KpnI 및 NotI를 사용하여 분해하고, 겔 정제한 다음, KpnI/NotI 분해된 pcDNA3 1(+)/Hygro(Invitrogen, Burlington, ON)로 결찰하여 플라스미드RbFc/pcDNA3.1 Hygro를 생성하였다.

[0223] 2. EGFRvⅢ-RbFc/pCEP4의 구성:

[0224] 프라이머 1290/1293(아래)를 사용하여 1165bp 산물을 Pfu 폴리머라아제를 이용하여 EGFRvⅢ-FL/pWBDHFR 플라스미드 주형으로부터 증폭하였다.

[0225] #1290(센스): 5'-CTACTAGCTAGCCACCATGCGACCCTCCGGGA-3'(서열번호: 70)

[0226] #1293(안티센스): 5'-CGGGGTACCCGGCGATGGACGGGATC-3'(서열번호: 71)

[0227] 이렇게 얻어진 PCR 산물을 KpnI 및 NotI를 사용하여 분해하고, 겔 정제한 다음, KpnI/NotI 분해된 RbFc/pcDNA3.1 Hygro로 결찰하여 플라스미드 EGFRvIII-RbFc/pcDNA3.1Hygro를 얻었다.

[0228] 2170 bp SnaBI/XhoI 단편을 EGFRvⅢ-RbFc/pcDNA3.1Hygro로부터 분리하고, SnaBI/XhoI 분해된 pCEP4(Invitrogen, Burlington, ON)로 서브클로닝하여 플라스미드 EGFRvⅢ-RbFc/pCEP4를 얻었다.

[0229] 3. 293F EGFRvⅢ-RbFc 안정한 세포주의 생성:

[0230] 플라스미드 EGFRvⅢ-RbFc/pCEP4를 인산칼슘 형질감염법에 의해 다음과 같이 293F 세포(Gibco, Grand Island, NY)로 도입하였다: 형질감염 1일 전, $1x10^6$ 293F 세포를 젤라틴 코팅된 100mm 조직 배양 페트리 접시 상에 도말하고, 5% CO_2, 37℃에서 배양하였다. 세포를 10ml의 신선한 비-선택 배지(DMEM/F12, 10% FBS, 2mM L-Glutamine, 100U/ml Penicillin G, 100U/ml MCG Streptomycin)로 형질감염 2-3시간전에 공급하였다. 형질감염 시약을 미세원침관에서 다음과 같이 제조하였다: 10μg의 DNA(EGFRvⅢ-RbFc/pCEP4)를 62의 μg의 2M 인산칼슘과 탈이온수와 혼합하여 최종 부피 500㎕로 만들었다. 또 다른 튜브에서, 피펫 500㎕의 2XHBS를 꺼내 형질감염 시약을 전달하기 위해 사용한다.

[0231] 형질감염을 수행하기 전까지 5% CO_2 배양기 내 세포를 잔류시킴으로써 적절한 pH를 유지하면서, 튜브 피펫 중 용액을 한 방울씩 세포에 첨가하였다. 형질감염 15-20 시간 후, 세포를 PBS로 세척하고, 10ml의 신선한 293F 비-선택 배지를 공급하였다. 발현 중의 세포를 형질감염 48-72시간 후 트립신으로 수거하고, 세포를 293F 선택 배지(DMEM/F12, 10% FBS, 2mM L-글루타민, 100U/ml 페니실린 G, 100U/ml MCG 스트렙토마이신, 250μ/ml 하이그로마이신)에서 14일간 96웰 플레이트에서 $0.08x10^4$ 세포/웰로 도말하였다.

[0232] 하이그로마이신 내성 클론을 1μg/ml의 캡쳐 항체로서 항-EGFR 항체 E763(미국특허 6,235,883)를 이용하여 ELISA에 의해 스크리닝하였고, 1:100 희석비의 염소 항-토끼 IgG HRPO(CalTag)를 이용하여 검출하였다.

[0233] 실시예 2

[0234] 하이브리도마 생성을 통한 항-EGFRvⅢ 항체의 생성

[0235] 감마-1 불변 영역(XenoMouse G1 마우스)을 가진 항체를 생성하는 8마리의 XenoMouse 마우스를 프로토콜 0일째에 면역화시키고, 프로토콜 11, 21, 32, 44 및 54일째에 접종(boost)하고, 58일째에 융합을 실시하였다. 꼬리 바닥에서 피하 주사하고 복강 투여를 통해 모든 면역화시켰다. 0일째에, Freunds 완전 보조제(complete Freunds adjuvant, CFA)(Sigma, St. Louis, MO)와 1:1 v/v로 혼합된 무-발열원 DPBS에 현탁된 1.5×10^7 B300.19/EGFRvⅢ 형질감염된 세포(실시예 1A)로 면역화시켰다. 11, 21 및 32일째에 접종을 Freunds 불완전 보조제(IFA)(Sigma, St. Louis, MO)와 1:1 v/v로 혼합된 DPBS에서 $1.5 x10^7$ B300.19/EGFRvⅢ 형질감염된 세포를 사용하여 수행하였다. 44일 째에 접종을 IFA와 1:1 v/v로 혼합된 DPBS에서 5㎍의 PEP3(EGFRvⅢ 펩타이드)-KLH 접합체(실시예 1)을 사용하여 수행하였고, 최종 접종을 54일째에 보조제 없이 DPBS에서 5㎍의 PEP3(EGFRvⅢ 펩타이드)-KLH 접합체를 사용하여 수행하였다.

[0236] 58일째에, 마우스를 안락사시킨 다음, 서혜부 (inguinal) 및 요추부(Lumbar) 림프절을 재생하였다. 림프절을 조직 분쇄기를 이용하여 기계적으로 파괴시켜 림프구를 방출시킨 다음, CD90 음성 선택에 의해 T 세포를 고갈시켰다. 세척된 풍부한 B 세포와 ATCC, cat #. # CRL 1580(Kearney et al, J. Immunol. 123: 1548-1550(1979))로부터 구입한 비-분비 골수종 P3X63Ag8.653 세포를 1:1의 비로 혼합하여 융합을 실시하였다. 상기 세포 혼합물을 800g에서 원심분리하여 부드럽게 펠렛화하였다. 상청액을 완전히 제거한 후, 세포를 2분만 2-4mL의 프로나아제 용액(CalBiochem, cat. # 53702; PBS 중 0.5 mg/ml)으로 처리하였다. 이후, 3-5 ml의 FBS를 첨가하여 효소 활성을 중지시키고, 현탁액의 부피를 전기 세포 융합 용액 ECFS(0.3M 수크로오스, Sigma, Cat# S7903, 0.1mM 초산마그네슘, Sigma, # M2545, 0.1 mM 초산칼슘, Sigma, Cat# C4705(St. Louis, MO))을 사용하여 총 40ml로 조절하였다.

[0237] 상청액을 원심분리한 후 제거하고, 세포를 40ml의 ECFS에서 재현탁하여 세척하였다. 이러한 세척 단계를 반복

하고, 세포를 재차 $2x10^6$ 세포/ml의 농도까지 ECFS에 재현탁하였다. 전기 세포 융합을 융합 발생기(model ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA.)를 이용하여 수행하였다. 사용된 융합 챔버 크기는 2.0ml이었고, 다음과 같은 장치를 사용하였다: 정렬 조건: 전압: 50V, 시간: 50초, 전압: 3000V에서 막 브레이킹, 시간: 30μs, 후-융합 정지 시간: 3초. 융합 후, 세포를 DMEM(JRH Biosciences), HAT 함유 및 L-글루다민 보충된 15% FCS(Hyclone), pen/strep, OPI(옥살로아세테이트, 피루베이트, 소 인슐린)(Sigma, St. Louis, MO) 및 IL-6(Boehringer Mannheim)에 37℃ 및 공기 중 10% CO_2에서 배양을 위해 재현탁시켰다.

[0238] 세포를 평평한 바닥을 가진 96-웰 조직 배양 플레이트에 각 웰 당 $4x10^4$ 세포수로 도말시켰다. 배양물을 HAT(히폭산틴, 아미노프테린 및 티미딘)가 함유된 배지에서 HT(히폭산틴 및 티미딘)가 함유된 배지로 옮기기 전 2주 동안 유지하였다. 하이브리도마를 HAT 배지 중에 생존률에 의해 선택하고, 상청액을 ELISA에 의해 항원 반응성을 위해 스크리닝하였다. 상기 ELISA 포맷은 항원 코팅된 플레이트(EGFRvⅢ 펩타이드-OVA 코팅된 플레이트 및 대조 스크린으로서 야생형 EGFr 펩타이드-OVA 코팅된 플레이트) 상에서 상청액을 배양하고, 양고추냉이 퍼옥시다아제(HRP) 표지된 마우스 항-인간 IgG를 이용하여 EGFRvⅢ-특이적 결합을 검출하는 것을 포함하였다.(표 2.1 참조)

표 2.1

플레이트 웰	하이브리도마	1st OD	2nd OD	
		융합 플레이트	muEGFr	EGFr
13.2D10	13.1	4.034	2.653	0.051
13.3C12	13.2	3.829	2.443	0.049
13.3F11	13.3	3.874	1.081	0.049
13.6B11	13.4	3.322	1.311	0.052
클론	플레이트xfv	OD #1	OD #2	
		클로닝 플레이트	muEGFr	EGFr
13.1.1	0.5c/w D2	2.614	2.586	0.042
13.1.2	0.5c/w F5	2.248	1.272	0.041

[0239]

[0240] 상기 표로부터 알 수 있는 바와 같이, 4개 이상의 항원 특이적 하이브리도마를 검출하였다: 13.1, 13.2, 13.3 및 13.4. ELISA 분석 EGFRvⅢ 특이성에 양성인 이들 하이브리도마를 EGFRvⅢ를 발현하는 안정하게 형질감염된 300.19 세포 대 300.19 미형질감염된 모세포에 대해 FACS에 의해 확인하였다.

[0241] 클로닝을 제한된 희석 도말법을 이용하여 선택된 항원-양성 웰 상에서 수행하였다. 단일 콜로니 웰로부터 단일 콜로니 성장 및 상청액의 존재에 대해 플레이트를 육안으로 검사한 다음, 상술한 바와 같이 항원-특이적 ELISA 및 FACS에 의해 스크리닝하였다. 고반응성 클론을 분석하여 인간 감마 및 카파 사슬의 순도를 Luminex 기기를 이용하는 multiplex ELISA에 의해 확인하였다. ELISA 및 FACS 분석에서 EGFRvⅢ 특이성을 기초로, 클론 13.1.2을 추가적인 스크리닝 및 분석을 위해 가장 유망한 후보로서 선택하였다. 13.1.2 항체의 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 도 3L에 기재되어 있으며, 중쇄 및 경쇄 핵산에 대해서는 서열번호: 137 및 139에, 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열에 대해서는 서열번호: 138 및 140에 기재되어 있다. 또한, 도 4 및 5에 기재된 바와 같이 13.1.2 중쇄 및 경쇄 서열과 이들이 유도된 배선 서열과 비교하였다.

[0242] *실시예 3

[0243] XenoMax 기술을 이용한 항체 생성

[0244] Xenomouse 동물의 면역화

[0245] 인간 EGFRvⅢ에 대한 인간 단클론성 항체를 감마-1 불변 영역(XenoMouse G1 마우스)을 가진 항체를 생성하는 XenoMouse 마우스, 감마-2 불변 영역(XenoMouse XMG2 마우스)을 가진 항체를 생성하는 XenoMouse 마우스 및 감마-4 불변 영역(XenoMouse G4 마우스)을 가진 항체를 생성하는 XenoMouse 마우스를 순차적으로 면역화함으로써 생성하였다.

[0246] XenoMax 기술을 통해 mAb를 생성하기 위해, 일련의 XenoMouse G1 및 XMG2 마우스를 EGFRvⅢ PEP3(실시예 1A) 및 EGFRvⅢ-발현 300.19 세포 (실시예 1B) 또는 EGFRvⅢ 단백질(EGFRvⅢ-ECD)(Dr. Bigner, Duke University) 및 EGFRvⅢ-발현 300.19 세포의 박테리아 발현된 세포외 도메인 또는 EGFRvⅢ-토끼 Fc 융합 단백질(EGFRvⅢ-

RbFc)(실시예 1C) 및 EGFRvⅢ-발현 300.19 세포 또는 발바닥(FP)을 통해서만 EGFRvⅢ-RbFc, 또는 피하 주사 및 복강내(BIP)에 의한 꼬리 바닥을 통해 면역화하였다.

[0247] 발바닥 면역화를 위해, 초기 면역화는 마우스 당 Titermax gold(Sigma, Oakville, ON)와 1:1 v/v로 혼합된 10 X 10^6 EGFRvⅢ-발현 300.19 세포 또는 10 μg의 EGFRvⅢ PEP3 또는 EGFRvⅢ-ECD 또는 EGFRvⅢ-RbFc의 존재 또는 부재하에서 실시하였다. 후속 접종을 초기 면역화에서 사용된 면역원 양의 절반으로 수행하였다. 초기 4번의 접종을 하기 표 3.1에 나타낸 바와 같이 마우스 마리 당 명반(Sigma, Oakville, ON)과 혼합한 면역원을 취해 밤새 흡착하였다. 이후, 표 3.1에 나타낸 바와 같이, Titermax gold 중의 각 면역원으로 1번 주사, 명반으로 1번 주사, PBS 중 면역원으로 최종 접종하였다. 특히, 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 및 24일째에 동물들을 면역화시켰다. 19일째에 동물로부터 채혈하여 혈청을 얻고, 수거 선택을 위해 역가(titer)를 결정하였다. 28일 째에 동물들을 수거하였다.

표 3.1

발바닥 면역화 스케줄

[0248]

그룹 번호	1	2	3	4	5	6	7	8
동물수	5	5	5	5	5	5	5	5
마우스 품종	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3
접종 횟수	보조제	면역원		면역원		면역원		면역원
1st	Titermax gold	EGFRvIII-300.19 세포+PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 세포+EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 세포+EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc
2nd	명반	EGFRvIII-300.19 세포		EGFRvIII-300.19 세포		EGFRvIII-300.19 세포		EGFRvIII-RbFc
3rd	명반	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc
4th	명반	EGFRvIII-300.19 세포		EGFRvIII-300.19 세포		EGFRvIII-300.19 세포		EGFRvIII-RbFc
5th	명반	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc
6th	Titermax gold	EGFRvIII-300.19 세포		EGFRvIII-300.19 세포		EGFRvIII-300.19 세포		EGFRvIII-RbFc
7th	명반	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		FRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc
8th	PBS	EGFRvIII-300.19 세포+PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 세포+EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 세포+EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc
수거율								

[0249] 발바닥 면역에 대해 기재된 바와 같이, 각 면역원으로 초기 BIP 면역화를 마우스 마리당 Freund's 완전 보조제(CFA, Sigma, Oakville, ON)과 1:1 v/v로 혼합하였다. 후속 접종을 마우스 마리당 Freund's 불완전 보조제(IFA, Sigma, Oakville, ON)로 1:1 v/v로 혼합한 각각의 면역원을 이용하여 실시하고, 마우스 마리당 PBS 에서 최종 접종을 수행하였다. 표 3.2에 나타낸 바와 같이, 0, 14, 28, 42, 56 및 75(최종 접종)일 째에 동물들을 면역화시켰다. 63일째에 동물로부터 채혈하여 혈청을 얻고, 수거 선택을 위해 역가를 결정하였다. 78일 째에 동물들을 수거하였다.

표 3.2

Bip 면역화 스케쥴

그룹	9	10	11	12	13	14	15	16
동물수	5	5	5	5	5	5	5	5
마우스 품종	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3
접종 횟수	보조제	면역원		면역원		면역원		면역원
1st	CFA	EGFRvIII-300.19 cells+PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc
2nd	IFA	EGFRvIII-300.19 cells		EGFRvIII-300.19 cells		EGFRvIII-300.19 cells		EGFRvIII-RbFc
3rd	IFA	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc
4th	IFA	EGFRvIII-300.19 cells		EGFRvIII-300.19 cells		EGFRvIII-300.19 cells		EGFRvIII-RbFc
5th	IFA	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc
6th	PBS	EGFRvIII-300.19 cells+PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc
수거율								

[0250]

[0251] 역가 결정에 의한 수거를 위한 동물의 선택

[0252] 항-hEGFRvⅢ 항체 역가를 ELISA에 의해 결정하였다. EGFRvⅢ-RbFc(2.5μg/ml) 또는 대조 RbFc(2μg/ml) 또는 EGFRvⅢ 펩타이드-OVA(2μg/ml)(실시예 1) 또는 대조 OVA(4μg/ml)를 Costar Labcoat Universal Binding Polystyrene 96-웰 플레이트(Corning, Acton, MA)에 밤새 4℃에서 코팅하였다. 미결합 항원을 함유하는 용액을 제거하고, 상기 플레이트를 UV광(365nm)으로 4분(4000 마이크로주울) 동안 처리하였다. 상기 플레이트를 H_2O로 5번 세척하였다. EGFRvⅢ 면역화된 Xenomouse^{R}동물, 또는 나이브(naive) Xenomouse^R 로 부터 얻은 혈청을 1:100 초기 희석비로부터 2번 1:2 희석비의 2% 우유/PBS에서 적정하였다. 최종 웰은 블랭크로 방치하였다. 상기 플레이트를 dH_2O로 5번 세척하였다. 염소 항-인간 IgG Fc 특이적 양고추냉이 퍼옥시다아제(HRP, Pierce, Rockford, IL) 접합된 항체를 최종 농도 1μg/ml로 1시간 동안 상온에서 첨가하였다. 상기 플레이트를 dH_2O로 5번 세척하였다. 상기 플레이트를 TMB 크로모제닉(chromogenic) 기질(Gaithersburg, MD)를 30분 동안 첨가하여 진행시키고, ELISA를 1M 인산을 첨가하여 중지시켰다. 각 Xenomouse^R 의 특이성 역가를 450nm에서 광학 밀도로부터 결정하고, 그 결과를 표 3.3 및 3.4에 나타내었다. 역가는 혈청의 희석비의 역수를 의미하므로, 수치가 높을수록 hEGFRvⅢ에 대한 체액 면역 반응이 보다 크다.

[0253] 피하 주사 및 복강내 주사에 의해 꼬리의 바닥을 통해 면역화된 마우스에 대해, 플레이트가 EGFRvⅢ-RbFc(2.0μg/ml) 또는 대조 RbFc(2.5μg/ml)로 코팅한 것을 제외하고는 상술한 바와 같이 역가를 결정하였다.

표 3.3

[0254]

그룹	면역화(부위 및 면역원)	마우스 품종 및 성	마우스 I.Ds	EGFRvIII-RbFc@ 2.5㎍/㎖	Control RbFc@ 2.5ug/㎖	EGFRvIII peptide-OVA coated at 2.0㎍/㎖	OVA coated at 4.0㎍/㎖
1	FP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII PEP3-KLH(참조 Imm. Sched.)	XMG2	0748-1	330		13549	<100
			0748-2	237		7635	<100
			0748-3	109		9824	<100
			0748-4	714		8014	<100
			0748-5	165		9421	<100
			Naive	<100		n/a	n/a
2	FP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII PEP3-KLH(참조 Imm. Sched.)	SM3C-3	0741-1	388		347	<100
			0741-2	327		240	<100
			0741-3	385		330	<100
			0741-4	589		227	<100
			0741-5	273		626	<100
			Naive	<100		n/a	n/a
3	FP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII ECD(참조 Imm. Sched.)	XMG2	0749-1	552		<100	<100
			0749-2	477		<100	<100
			0749-3	100		<100	<100
			0749-4	100		<100	<100
			0749-5	1631		<100	<100
			Naive	100		n/a	n/a
4	FP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII ECD(참조 Imm. Sched.)	SM3C-3	0742-1	372		<100	<100
			0742-2	745		<100	<100
			0742-3	484		<100	<100
			0742-4	530		<100	<100
			0742-5	270		<100	<100
			Naive	100		n/a	n/a
5	FP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII RbFc(참조 Imm. Sched.)	XMG2	0750-1	5399	175	<100	<100
			0750-2	3072	151	<100	<100
			0750-3	>6400	358	<100	<100
			0750-4	5845	196	<100	<100
			0750-5	5770	196	<100	<100
			Naive	100	100	n/a	n/a
6	FP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII RbFc(참조 Imm. Sched.)	SM3C-3	0743-1	1220	<100	<100	<100
			0743-2	1183	<100	<100	<100
			0743-3	645	<100	<100	<100
			0743-4	759	<100	<100	<100
			0743-5	1260	<100	<100	<100
			Naive	100	<100	n/a	n/a

[0255]

그룹	면역화(부위 및 면역원)	마우스 품종 및 성	마우스 I.Ds	EGFRvIII-RbFc@ 2.5㎍/㎖	Control RbFc@ 2.5ug/㎖	EGFRvIII peptide-OVA coated at 2.0㎍/㎖	OVA coated at 4.0㎍/㎖
7	FP EGFRvIII-RbFc (참조 Imm.Sched.)	XMG2	0745-1	1897	<100	<100	<100
			0745-2	>6400	323	<100	<100
			0745-3	1225	<100	<100	<100
			0745-4	4047	<100	<100	<100
			0745-5	852	<100	<100	<100
			Naive	100	<100	n/a	n/a
8	FP EGFRvIII-RbFc (참조 Imm. Sched.)	SM3C-3	0744-1	362	<100	<100	<100
			0744-2	807	<100	<100	<100
			0744-3	479	<100	<100	<100
			0744-4	631	<100	<100	<100
			0744-5	1112	<100	<100	<100
			Naive	100	<100	n/a	n/a

[0256] 표 3.3에서 5 그룹의 모든 XenoMouse 동물과 6 그룹의 XenoMouse 동물 0743-5를 혈청학을 기반으로 XenoMax에 수거에 대해 선택하였다.

표 3.4

	면역화(부위 및 면역원)	마우스 품종 및 성	마우스 I.Ds	EGFRvIII-RbFc@ 2.5㎍/㎖	Control RbFc@ 2.5ug/㎖	EGFRvIII peptide-OVA coated at 2.0㎍/㎖	OVA coated at 4.0㎍/㎖
9	BIP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII PEP3-KLH(참조 Imm. Sched.)	XMG2	0695-1	2921		>128000	472
			0695-2	2219		30504	379
			0695-3	4609		>128000	608
			0695-4	>6400		>128000	368
			0695-5	1580		19757	269
			Naive	<100		n/a	242
10	BIP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII PEP3-KLH(참조 Imm. Sched.)	SM3C-3	0700-1	<100			
			0700-2	<100			
			0700-3	>6400			
			0700-4	5342			
			0700-5	>6400			
			Naive	<100			
11	BIP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII ECD(참조 Imm. Sched.)	XMG2	0696-1	<100		561	240
			0696-2	<100		788	326
			0696-3	<100		604	266
			0696-4	143		444	263
			0696-5	<100		303	254
			Naive	<100			242
12	BIP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII ECD(참조 Imm. Sched.)	SM3C-3	0702-1	358			
			0702-2	469			
			0702-3	401			
			0702-4	>6400			
			0702-5	>6400			
			Naive	<100			

[0257]

그룹	면역화(부위 및 면역원)	마우스 품종 및 성	마우스 I.Ds	EGFRvIII-RbFc@ 2.5㎍/㎖	Control RbFc@ 2.5ug/㎖	EGFRvIII peptide-OVA coated at 2.0㎍/㎖	OVA coated at 4.0㎍/㎖
13	BIP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII RbFc(참조 Imm. Sched.)	XMG2	0694-1	>6400	>6400	250	243
			0694-2	>6400	>6400	296	309
			0694-3	>6400	>6400	736	605
			0694-4	>6400	>6400	739	1111
			0694-5	3710	>6400	517	465
			Naive	<100	>6400		242
14	BIP EGFRvIII-300.19 cells+EGFRvIII RbFc(참조 Imm. Sched.)	SM3C-3	0703-1	2740	>6400		
			0703-2	408	>6400		
			0703-3	1406	>6400		
			0703-4	1017	>6400		
			0703-5	403	>6400		
			Naive	<100	>6400		
15	BIP EGFRvIII RbFc (참조 Imm. Sched.)	XMG2	0697-1	>6400	>6400	340	348
			0697-2	>6400	>6400	642	1793
			0697-3	6242	>6400	319	246
			0697-4	1766	>6400	133	<100
			0697-5	>6400	>6400	685	448
			Naive	<100	>6400	243	242
16	BIP EGFRvIII RbFc (참조 Imm. Sched.)	SM3C-3	0701-1	592	>6400		
			0701-2	1118	>6400		
			0701-3	>6400	>6400		
			0701-4	<100	<100		
			0701-5	n/a	n/a		
			Naive	<100	>6400		

[0258]

[0259] 표 3.4 에서 XenoMouse 동물(0695-1, 0695-3 및 0695-4)을 혈청학을 기반으로 XenoMax에 수거에 대해 선택하였다.

[0260] B 세포의 선택

[0261] 상술한 동물의 B-세포를 수거하여 배양하였다. EGFRvⅢ-펩타이드 특이적 항체를 분비하는 동물을 Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7843-7848(1996)에 기재된 바대로 분리하였다. ELISA를 이용하여 제 1 EGFRvⅢ-peptide-OVA-특이적 웰을 확인하였다. 약 5백만 B-세포를 XenoMouse 동물로부터 245 96웰 플레이트에서 500 또는 150 또는 50 세포/웰로 배양하고, EGFRvⅢ-peptide-OVA 상에서 스크린하여 항원-특이적 웰을 확인하였다. 약 515 웰이 바탕에 비해 OD를 유의적으로 나타났으며, 그 대표적인 샘플을 표 3.5에 나타내었다.

표 3.5

[0262]

	플레이트 층수	컷오프 OD 이상의 양성															
		0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Cansera 500 cells/well	12	1152	634	81	56	49	45	38	32	29	26	25	18	11	4	1	0
Sigma 500 cells/well	13	1248	773	195	139	117	99	80	73	58	53	49	21	9	5	1	0
Sigma 500 cells/well	20	1920	1304	478	178	91	67	55	47	45	36	33	19	9	5	2	0
합계	45	4320	2711	754	373	257	211	173	152	132	115	107	58	29	14	4	0

[0263] OD > 0.5의 244개 EGFRvⅢ-펩타이드-OVA-Elisa 양성 웰을 재차 EGFRvⅢ-펩타이드-OVA 및 OVA 상에서 스크린하여 이들이 EGFRvⅢ-펩타이드 특이적이라는 것을 확인하였다. 이들 결과의 대표적인 예를 표 3.6에 나타내었다.

표 3.6

[0264]

플레이트	웰		1'EGFRvIII 펩타이드-OVA OD	2'EGFRvIII 펩타이드-OVA OD	OVA OD
121	G	1	0.7534	1.4065	0.1355
121	A	7	1.3472	2.1491	0.1268
121	D	8	0.6743	0.4179	0.1531
121	E	8	2.0415	2.6965	0.1498
121	H	10	0.8611	0.4288	0.1595
121	C	12	2.1455	2.6443	0.1404
122	H	1	1.8890	2.5987	0.1164
122	H	5	0.5943	0.8321	0.1572
122	F	8	0.6834	0.7715	0.1450

[0265] 제한된 항원 평가 및 분석

[0266] 제한된 항원 분석법은 다른 모든 항원-특이적 항체에 비해 B-세포 배양 상청액에 존재하는 항원-특이적 항체를 친화성-등급화하는 방법이다. 매우 낮은 코팅의 항원의 존재하에서, 최고 친화도 항체만이 평형상태에서 검출할만한 수준으로 결합할 수 있어야 한다(예를 들면, 국제특허출원 WO 03/48730 참조).

[0267] EGFRvⅢ 펩타이드-OVA를 3개의 농도 7.5 ng/ml, 1.5 ng/ml 및 0.03 ng/ml로 밤새 4℃에서 96-웰 ELISA 플레이트 상에서 플레이트에 코팅하였다. 0.05% 소듐 아지드를 함유하는 PBS 중 1% 우유 50㎕를 플레이트에 첨가하기 전에 각 플레이트를 5번 dH_2O로 세척한 후, 각 웰에 4ml B 세포 상청액을 첨가하였다. 상온 진탕기에서 18시간 후, 상기 플레이트를 재차 dH_2O로 5번 세척하였다. 각 웰에, 50㎕의 Gt 항-인간(Fc)-HRP을 1㎍/ml로 첨가하였다. 상온에서 1시간 후, 상기 플레이트를 재차 dH_2O로 5번 세척하고, 50㎕의 TMB 기질을 각 웰에 첨가하였다. 1M 인산 50㎕를 각 웰에 첨가하여 상기 반응을 정지시키고, 플레이트를 450nm의 파장에서 판독하여 그 결과를 표 3.7에 나타내었다.

표 3.7

[0268]

배양 플레이트	웰		제한된 Ag						고항원 (1.0㎍/㎖)
			0.03ng/㎖		1.5ng/㎖		7.5ng/㎖		
			OD	등위	OD	등위	OD	등위	
133	B	2	0.7670	1	1.189	54	1.871	95	2.050
124	G	12	1	0.7400	2	1.895	1	3.101	13.463
145	C	1	0.715	3	1.552	7	2.671	10	3.194
129	G	10	0.6720	4	1.367	22	2.692	8	2.977
186	B	6	0.657	5	1.842	2	2.859	3	3.411
143	F	12	0.653	6	1.677	3	2.741	6	3.156
136	E	3	0.6340	7	1.468	15	2.683	9	3.280
137	C	11	0.595	8	1.582	5	2.94	2	3.444
139	A	11	0.582	9	1.374	19	2.282	47	2.255
174	F	1	0.573	10	1.577	6	2.775	4	2.364

[0269] 제한 항원 분석으로부터 얻은 결과를 고 항원 분석에서 얻은 총 OD와 비교하였다. 친화도의 상대적 등위를 고 항원 분석에서 얻은 것에 대한 제한 항원 분석법에서 얻은 OD의 비를 얻어 평가하였다. 고비율의 항체는 최고 친화도를 가질 것이다. 표 3.7은 고 항원 분석 OD에 대한 제한 항원 분석 OD(최저 항원 도말 농도 0.03ng/ml에 대해)를 기초로 순위화한 B-세포 배양 상청액의 샘플을 나타낸다.

[0270] FMAT에 의한 네이티브 세포 결합 분석

[0271] NR6 세포(NR6 M 세포)에 대해 안정하게 발현되는 EGFRvⅢ의 네이티브 형태에 결합하는 EGFRvⅢ 펩타이드-OVA-ELISA 양성 웰 상청액의 능력을 분석하였다(See, Batra et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvⅢ gene. Cell Growth Differ. 6(10): 1251-9(1995)). NR 6 M 세포를 웰 당 8000개의 세포로 접종하고, 밤새 96 웰 FMAT 플레이트에서 배양하였다. 이후, 배지를 제거하였더니 웰에는 15 ㎕가 잔류하였다. 15 ㎕ B-세포 배양 상청액을 첨가하고, 15 ㎕ 항-인간 IgG FcCyS를 최종 농도 1 ㎍/ml로 웰에 첨가하였다. 이후, 4℃에서 2시간 동안 방치하여 배양시켰다. 세포를 150 ㎕ PBS으로 세척하고, FMAT 상에서 판독하기 전에 고정시켰다. 얻어진 결과를 총 형광 세기로 환산하였다(표 3.8). 인간 항-EGFRvⅢ mAb 13.1.2를 1㎍/ml 최종 농도에서 개시하는 양성 대조군으로서 사용하고, 음성 대조군은 동일 농도의 PK 16.3.1이었다. 시험된 244 샘플 중 134개가 NR6 M 세포에 결합되었고, 이중 62개가 8000이 넘는 총 형광을 가졌다. 134 결합제 중 6개가 허위(false) 양성이었다.

[0272] 동일한 유형의 네이티브 결합 분석을 NR6 Wt 세포에 대해 실시하여(EGF 수용체를 발현하는 NR6 세포)(Batra et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, celltransforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvⅢ gene. Cell Growth Differ. 6(10):1251-9(1995) 참조) Wt 수용체에 대한 결합을 제거하였다(표 3.8). ABX-EGF를 양성 대조군으로서 사용하였고, 동일 농도의 PK 16.3.1를 음성 대조군 항체로서 사용하였다. 134 NR6 M 결합제 중 3개가 NR6 Wt 세포에 강하게 결합하였다. ELISA에서 EGFRvⅢ 펩타이드에 결합된 244 웰 중 190웰은 또한 세포 상에서 네이티브 형태에 결합되었다. 그 예들을 표 3.8에 나타내었다.

표 3.8

[0273]

플레이트			1'VIII-pep -OVA OD	2'VIII-pep -OVA OD	OVA OD	NR6 M세포에 대한 FMAT 네이티브 결합	NR6 WT세포에 대한 FMAT 네이티브 결합
174	F	1	2.4945	3.0308	0.1900	138373	1668
187	A	4	1.5337	1.2085	0.1920	128626	202459.8
132	D	8	0.8555	1.2070	0.1649	109379	0
142	C	11	2.2889	2.8194	0.2239	94944	0
129	A	7	2.1501	2.8208	0.1515	84024	0
127	E	1	2.6923	3.1986	0.1219	82031	0
124	G	12	3.2929	3.5634	0.1455	73080	0
141	C	6	0.7512	1.2567	0.1547	60816	814.5
173	C	1	2.5728	2.5714	0.2134	58702	2523.4
128	G	9	0.6293	0.7483	0.1520	49631	0
129	H	6	2.9370	3.0952	0.2582	0	0
183	E	11	2.3450	2.7717	0.1050	0	0

[0274] 표 3.8에서, 웰 187A4로부터 상청액을 Wt 결합제로서 확인하였고, 141C6는 NR6 M 세포 결합에 대한 허위 양성군이었다. 웰 129H6 및 183E11는 어떠한 네이티브 결합도 갖지 않는 강력한 펩타이드 결합제이었다.

[0275] 내재화 분석

[0276] 상위 60 네이티브 결합 B 세포 배양 상청액의 수용체를 내재화하는 능력에 대해 더 분석하였다. NR6 M 세포를 8000 세포/웰로 96웰 FMAT 플레이트에 접종하고, 밤새 배양하였다. 배지를 제거하고, 총 부피 30 ㎕ 배지 중 10-15㎕ B-세포 배양 상청액을 2번 첨가하였다. 다음, 15㎕의 2차 항체(최종 농도 1.5㎍/ml의 SS Alexa 647 항-인간 IgG Fab)를 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 얼음 상에서 배양하였다. 배양 배지의 효과를 알아보기 위해 관련이 없는 B-세포 배양 상청액을 사용하였다. 인간 항-EGFRvⅢ mAb 13.2.1를 1㎍/ml(최종 농도)로 개시하는 양성 대조군으로서 사용하고, 음성 대조군은 동일 농도의 PK 16.3.1(인간 항-KLH IgG2 항체)이었다. 배양 후, 상기 세포를 차가운 PBS로 세척하고, 50 ㎕ 배지를 모든 웰에 첨가하고, 2개 중 1개를 37℃에서 30분 동안 배양하고, 다른 하나는 얼음에 방치하였다. 배양 후, 배지를 제거하고, 100㎕의 차가운 50 mM 글루타티온을 상기 세트에 첨가하여 37℃에서 배양하고, 100 ㎕의 차가운 배지를 다른 세트에 첨가한 다음, 2개의 세트를 1시간 동안 얼음에 방치하였다. 이후, 상기 세포를 100 ㎕ 차가운 PBS로 세척한 다음, 1% 파라포름알데히드로 고정하고, FMAT에서 판독하였다. 그 결과를 내재화 %로서 환산하였고, 글루타티온의 존재하에서의 총 형광/글루타티온 부재하에서의 총 형광으로 계산하였다. 대표적인 정보를 표 3.9에 기재하였다.

표 3.9

[0277]

웰 번호	글루타티온 부재 FL1 x count	글루타티온 존재 FL1 x count	내재화 %, (glut+/glut-) x 100
124C9	1877	1394	74.3%
124G12	26465	9959	37.6%
125H1	14608	3686	25.2%
125D10	2342	1236	52.8%
127E1	15059	1318	8.7%
127B9	12444	7109	57.1%
127E11	6623	0	0.0%
128G9	10071	1851	18.4%
129A7	27648	8708	31.5%
130B4	4558	4354	95.5%
131H5	9258	2656	28.7%
132D8	35820	13293	37.1%
133F9	9773	3621	37.0%
136F10	2392	0	0.0%
137G6	5104	1021	20.0%
137G10	3451	0	0.0%

[0278] EGFRvⅢ-특이적 용혈 플라크 분석.

[0279] 상기 분석을 수행하기 위해 다수의 특별한 시약이 필요하였다. 이러한 시약을 다음과 같이 제조하였다.

[0280] 1. 양 적혈구 세포(SRBC)의 비오티닐레이션. SRBC를 25% 모액으로서 RPMI 배지에 보관하였다. 250 ㎕ SRBC 충진된-세포 펠렛을 신선한 에펜도르프 튜브에 1.0ml의 SRBC를 분획하여 얻었다. 상기 SRBC를 미세원침관에서 8000 rpm(6800rcf)의 펄스 스핀을 이용하여 펠렛화하고, 상청액을 제거한 다음, 상기 펠렛을 pH 8.6의 1.0ml PBS에 재현탁시킨 후, 원심분리를 반복하였다. 세척 사이클을 2번 반복한 다음, 상기 SRBC 펠렛을 15-ml 팔콘 튜브로 옮겨 pH 8.6의 PBS로 5ml로 만들었다. 별도의 50ml 팔콘 튜브에서, 2.5mg의 Sulfo-NHS 비오틴을 pH 8.6의 PBS 45ml에 첨가하였다. 비오틴을 완전히 용해시키자 마자, 5 ml의 SRBC를 첨가하고, 상기 튜브를 1시간 동안 RT에서 회전시켰다. 상기 SRBC를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 비오티닐화된 SRBC를 에펜도르프 튜브에 옮겨 pH 7.4의 PBS를 사용한 것을 제외하고는 상술한 바와 같이 3번 세척한 다음, 15ml 팔콘 튜브(5% B-SRBC 모액) 중 면역 세포 배지(RPMI 1640)으로 5ml까지 만들었다. 모액을 필요로 하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

[0281] 2. B-SRBC의 스트렙타비딘(SA) 코팅. 1 ml의 5% B-SRBC 모액을 신선한 에펜도르프 튜브에 옮겼다. 상기 B-SRBC 세포를 상술한 바와 같이 3번 세척하고, pH 7.4의 PBS 1.0ml에 재현탁시켜 최종 농도 5%(v/v)를 얻었다. 10 ㎕의 10 mg/ml 스트렙타비딘(CalBiochem, San Diego, CA) 모액을 첨가하고, 상기 튜브를 혼합하고, 20분 동안 RT에서 회전시켰다. 세척 단계를 반복하고, SA-SRBC를 pH 7.4의 1ml PBS(5%(v/v))에 재현탁시켰다.

[0282] 3. SA-SRBC의 EGFRvⅢ 코팅. 상기 SA-SRBC를 비오티닐화-EGFRvⅢ 펩타이드-OVA에 의해 10 μg/ml로 코팅하고, 혼합한 다음, 20분 동안 RT에서 회전시켰다. SRBC를 상술한 바와 같이 pH 7.4의 PBS 1.0ml를 이용하여 2번 세척하였다. EGFRvⅢ-코팅된 SRBC를 최종 농도 5%(v/v)까지 RPMI(+10% FCS)에 재현탁시켰다.

[0283] 4. 면역 형광법(IF)에 의한 EGFRvⅢ 펩타이드-SRBC 품질의 결정. 10㎕의 5% SA-SRBC 및 10㎕의 5% EGFRvⅢ 펩타이드-코팅된 SRBC를 각각 40㎕의 PBS를 함유하는 별도의 신선한 1.5ml 에펜도르프 튜브에 첨가하였다. 대조 인간 항-EGFRvⅢ 항체를 SRBC의 각 샘플에 45㎍/ml로 첨가하였다. 상기 튜브를 25분 동안 RT에서 회전시킨 다음, 상기 세포를 100㎕의 PBS로 3번 세척하였다. 상기 세포를 50㎕의 PBS에 재현탁하고, Alexa488(Molecular Probes, Eugene, OR)에 결합된 40mcg/mL Gt-항 인간 IgG Fc 항체와 함께 배양하였다. 상기 튜브를 25분 동안 RT에서 회전시킨 다음, 100㎕ PBS로 세척하고, 상기 세포를 1011l PBS에 재현탁시켰다. 10 ㎕의 염색된 세포를 깨끗한 유리 현미경 슬라이드 상에 떨어뜨리고, 유리 커버슬립으로 덮은 다음, 형광등 아래서 관찰하여 임의 스케일 0-4로 점수화하였다.

[0284] 5. 혈장 세포의 생성. 다양한 분석에 의해 대상 면역 글로불린을 분비하는 B 세포 클론을 함유하는 사전에 확인한 단일 미세 배양 웰의 내용물을 수거하였다. 100-1000㎕ 피펫맨(pipetman)을 이용하여, 각 웰의 내용물을 37C RPMI(10%FCS)를 첨가함으로써 재생시켰다. 상기 셀을 피펫하여 재현탁한 다음, 신선한 1.5ml의 에펜도르프 튜브(최종 부피. 약 500-700리터)로 옮겼다. 상기 세포를 상온에서 1분동안 2500 rpm(660rcf)에서 미세원침관에서 원심분리한 다음, 상기 튜브를 180도로 회전시키고, 1분 동안 2500rpm에서 재차 회전시켰다. 동결 배지를 제거하고, 면역 세포를 100 ㎕ RPMI(10% FCS)에서 재현탁시킨 다음, 원심분리하였다. RPMI(10% FCS)를 이용하여 세척을 반복하고, 상기 세포를 601 RPMI(10% FCS)에서 재현탁한 다음, 얼음상에서 사용 전까지 보관하였다.

[0285] 6. 혈장 세포의 미세 조작. 유리 슬라이드(2 x 3 인치)를 실리콘 에지에 의해 사전 제조하고, RT에서 밤새 경화시켰다. 사용 전에, 상기 슬라이드를 유리 표면 상에 균일하게 닦아낸 약 5㎕의 SigmaCoat(Sigma, Oakville, ON)로 처리하고, 건조한 다음, 세게 닦았다. 60㎕의 세포 샘플에 EGFRvⅢ 펩타이드-코팅된 SRBC(5% v/v 모액), RPMI(10% FCS)에서 제조된 4x 기니 피그 보체(Sigma, Oakville, ON) 모액 및 4x 강화 혈청 모액(10% FCS를 함유한 RPMI에서 1:150) 각각 60 ㎕에 첨가하였다. 상기 혼합물을 제작된 슬라이드 상에 떨어뜨리고(10-15 l), 스폿을 희석하지 않은 파라핀 오일로 덮었다. 상기 슬라이드를 최소 45분 동안 37℃에서 배양하였다. EGFRvⅢ-특이적 혈장 세포를 플라크로부터 확인하고, 미세 조작에 의해 구제하였다(표 3.10 참조).

표 3.10

[0286]

웰 ID			단일 세포 번호	선택된 단일 세포의 총수
124	G	12	EGFRvIII-SCX-105-116(LL)	12
129	A	7	EGFRvIII-SCX-117-128(DM)	12
174	F	1	EGFRvIII-SCX-129-137(DM)	9
182	A	5	EGFRvIII-SCX-138-149(LL); 162-169(OP)	20
125	D	10	EGFRvIII-SCX-170-181(DM); 194-201(LL)	20
127	B	9	EGFRvIII-SCX-182-193(LL); 202-209(OP)	20
190	D	7	EGFRvIII-SCX-210-229(LL)	20
130	B	4	EGFRvIII-SCX-230-249(LL)	20
138	D	2	EGFRvIII-SCX-250-269(LL)	20
145	C	1	EGFRvIII-SCX-80-92(DM)	13
172	B	12	EGFRvIII-SCX-93-104(LL)	12
187	A	4	EGFRvIII-SCX-270-281(LL)	12
173	C	1	EGFRvIII-SCX-282-293(BC)	12
127	E	1	EGFRvIII-SCX-294-305(LL)	12
142	C	11	EGFRvIII-SCX-306-317(LL)	12
141	A	10	EGFRvIII-SCX-318-329(BC)	12
132	D	8	EGFRvIII-SCX-330-341(LL)	12
124	D	4	EGFRvIII-SCX-342-349(BC)	8

[0287] 재조합 항-EGFRvⅢ 항체의 단일 세포 PCR, 클로닝, 발현, 정제 및 특성 규명

[0288] 가변 영역을 코딩하는 유전자를 단일 미세 조작된 혈장 세포 상에서 RT-PCR에 의해 구제하였다. mRNA를 추출하고, 역 전사효소 PCR을 실시하여 cDNA를 생성하였다. 상기 가변 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 cDNA를 폴리머라아제 사슬 반응을 이용하여 특이적으로 증폭시켰다. 상기 인간 가변 중쇄 영역을 IgG1 발현 벡터로 클론하였다. 상기 벡터를 인간 IgG1의 불변 도메인을 pcDNA3.1+/Hygro(Invitrogen, Burlington, ON)의 다중 클로닝 부위로 클로닝함으로써 생성하였다. 상기 인간 가변 경쇄 영역을 IgK 발현벡터로 클로닝하였다. 상기 벡터를 인간 IgK의 불변 도메인을 pcDNA3.1+/Neo(Invitrogen, Burlington, ON)의 다중 클로닝 부위로 클로닝함으로써 생성하였다. 이후, 상기 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 70% 융합 인간 배아 신장 293 세포의 60 mm 접시에 공-리포좀 감염시키고, 상기 형질감염된 세포를 24-72시간 동안 처음 혈장 세포와 동일한 특이성을 갖는 재조합 항체를 분비하도록 하였다. 상청액(3mL)을 HEK 293 세포로부터 수거하고, 온전한 항체의 분비를 샌드위치 ELISA로 확인하여 특이적으로 인간 IgG를 검출하였다(표 3.11). ELISA를 이용하여 재조합 항체를 EGFRvⅢ에 결합함으로써 특이성을 평가하였다(Table 3.11).

표 3.11

[0289]

mAb ID	Cell 번호	역가	
		총 항체	항원 결합
129A7	SC-EGFRvIII-XG1-123/124	>1:64	>1:64
138D2	SC-EGFRvIII-XG1-250	>1:64	>1:64
174F1	SC-EGFRvIII-XG1-131	>1:64	>1:64
182A5	SC-EGFRvIII-XG1-139	>1:64	>1:64
190D7	SC-EGFRvIII-XG1-211	>1:64	>1:64
125D10	SC-EGFRvIII-XG1-170	>1:64	>1:64
182D5	SC-EGFRvIII-XG1-150	>1:64	>1:64
141A10	SC-EGFRvIII-XG1-318	1:64	1:64
132D8	SC-EGFRvIII-XG1-333	>1:64	>1:64
124D4	SC-EGFRvIII-XG1-342	>1:64	>1:64

[0290] 분비 ELISA 시험을 다음과 같이 수행하였다. Ab 분비를 위해 2㎕/mL의 염소 항-인간 IgG H+L를, 항원 결합을 위해 1.5μg/ml의 EGFRvⅢ-Rab Ig Fc 융합 단백질을 Costar Labcoat Universal Binding Polystyrene 96 웰 플레이트 상에 코팅하고, 밤새 4℃에서 방치하였다. 상기 플레이트를 H_2O로 5번 세척하였다. 재조합 항체를 희석하지 않은 리포좀 감염 상청액의 7 웰에 대해 1: 2로 적정하였다. 상기 플레이트를 dH_2O로 5번 세척하였다. 염소 항-인간 IgG Fc-특이적 HRP-결합된 항체를 분비 플레이트에 대해 RT에서 1시간 동안 1㎍/mL의 최종 농도로

첨가하고, 결합 플레이트를 상온에서 1시간 동안 1㎍/ml의 Rb 항 Hu Fc을 이용하여 검출하였다. 상기 플레이트를 dH_2O로 5번 세척하였다. 상기 플레이트를 30분 동안 TMB를 첨가함으로써 전개하고, ELISA를 1M 인산을 첨가함으로써 정지시켰다. 각 ELISA 플레이트를 분석하여 각 웰의 광학 밀도를 450nm에서 측정하였다.

[0291] 서열 작성 및 서열 분석

[0292] 클로닝된 중쇄 및 경쇄 cDNA를 2개의 방향으로 시퀀싱하고, 분석하여 항체의 배선 서열 유도화를 결정하고, 배선 서열로부터 변화를 확인하였다. 이러한 서열을 도 3A 내지 3K 및 서열번호; 34-55에 나타내었다. 중쇄 및 경쇄 서열 각각과 이들이 유도된 배선 서열을 비교하여 도 4 내지 도 7에 나타내었다. 또한, 하이브리도마 유도 13.1.2 항체의 서열을 도 4 및 도 5에서 그의 배선 서열과 비교하였다.

[0293] 본 명세서의 기재 내용으로부터 알 수 있는 바와 같이, 131 항체 및 13.1.2 항체 각각은 EGFRvⅢ에 대한 매우 높은 친화도를 갖고 있으며, 세포에 의해 내재화되며, 독소와 결합시 세포 사멸에 매우 효과적인 것으로 보인다. 흥미로운 것은, 각 항체는 XenoMouse 마우스의 상이한 면역화에서 생성되고 상이한 기술을 활용함에도 불구하고 매우 유사한 배선 유전자로부터 유도된다. 그러나, 에피토프 매핑 작업(본 명세서에 기재됨)을 토대로, 각 항체는 EGFRvⅢ 분자에 대해 약간 상이한 에피토프에 결합하는 것으로 보이며, 결합에 필수적인 EGFRvⅢ에 대한 약간 상이한 잔기를 갖는다. 이러한 결과를 통해, 배선 유전자 활용은 EGFRvⅢ를 타겟으로 하는 항체 치료제의 개발에 있어 중요하며, 작은 변화는 이러한 구조적 발견을 토대로 항체 및 기타 치료제의 추가적인 디자인을 가능케 하는 방식으로 항체의 결합 및 효과를 변형시킬 수 있다.

[0294] 세포에 대해 발현된 네이티브 EGFRvⅢ에 대한 항-EGFRvⅢ mAb의 결합

[0295] 본 실시예에서, NR6 M 세포에 대한 항-EGFRvⅢ 항체의 결합을 측정하였다. 구체적으로, XenoMax 유도된 IgG1 재조합 항체의 미정량 상청액의 NR6 M 세포 및 NR6 WT 세포에 대한 결합 능력을 분석하였다. 세포를 1000/웰로 접종하고, 37℃의 FMAT 96 웰 플레이트에서 밤새 배양하였다. 배지를 제거하고, 40㎕ 미니 리포 상청액(하향 적정됨)을 첨가하고, 상기 세포를 1시간 동안 얼음상에서 배양하였다. 인간 13.1.2 EGFRvⅢ 항체 및 ABX EGF(E7.6.3, 미국특허 6,235,883) 항체를 양성 대조군으로서 첨가하였다. PK 16.3.1 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. 상기 세포를 차가운 PBS로 세척하고, 2차 항체(SS Alexa 항 인간 IgG Fc)를 1㎍/ml로 40㎕/웰 첨가하고, 1시간 동안 얼음속에서 배양하였다. 이후, 상기 세포를 차가운 PBS로 세척하고, 고정하고, FMAT에 의해 판독하였다. 모든 항체의 결합에 대한 특이성을 카운터 스크리닝에 의해 NR6 WT 세포에 대한 시험하였다.

[0296] 재조합 항-EGFRvⅢ 항체의 정제

[0297] 대량 생성을 위해, 중쇄 및 경쇄 발현 벡터(각 사슬/접시 2.5ag)를 HEK 293 세포로 70% 융합된 10개의 100 mm 접시로 리포솜 감염시켰다. 형질감염된 세포를 37℃에서 4일 동안 배양하고, 상청액(6mL)을 수거한 다음, 신선한 배지 6mL로 대체하였다. 7일째에, 상청액을 제거하고, 초기 수거로 풀링(pooling)하였다(10 플레이트로부터 총 120mL). 각 항체를 단백질-A 세파로오스(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 친화도 크로마토그래피(1mL)법에 의해 상청액으로부터 정제하였다. 상기 항체를 pH 2.5의 0.1M 글리신 500 mcL을 이용하여 단백질-A 칼럼으로부터 용출시켰다. 상기 용출액을 pH 7.4의 PBS에서 투석하고, 필터-멸균화하였다. 상기 항체를 비-환원 SDS-PAGE에 의해 분석하여 순도 및 수율을 평가하였다. OD 250에서 UV 분석법에 의해 농도를 측정하였다.

[0298] 재조합 항-EGFRvⅢ mAb에 의한 EGFRvⅢ 수용체의 내재화

[0299] 상술한 바와 같이, XenoMax 유도 IgG1 재조합 항체를 발현하고, 정제한 다음 정량화하였다. 항체의 NR6 M 세포에서 EGFRvⅢ 수용체를 내재화하는 능력에 대해 더 분석하였다. 250,000 NR6 M 세포를 96웰 v-바닥 플레이트에서 3번 제 1 항체(SC95, SC131, SC133, SC139, SC150, SC170, SC211, SC230, SC250 및 대조군으로서 인간 13.1.2)로 0.25 ㎍/ml에서 7분 동안 얼음속에서 배양하였다. 상기 세포를 PBS 중 차가운 10% FCS로 세척하고, 3㎍/ml Fab로 2차 항체(SS Alexa 항-인간 IgG Fab)를 첨가하고, 7분 동안 얼음 상에서 배양하였다. 상기 세포를 PBS 중 차가운 10% FCS로 1번 세척한 다음, 차가운 배지에서 재현탁하였다. 다음, 3 개중 2세트를 37℃에서 배양하고, 나머지 1 세트를 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 세포를 4℃에서 배양하고, 37℃에서 배양된 세포의 1세트를 글루타티온(상술한 바와 같이)으로 얼음 상에서 1시간 동안 처리하였다. 이후, 상기 세

포를 세척하고, PBS 중 차가운 1% FCS 100 ㎕에서 재현탁한 다음, FACS에 의해 분석하였다. 내재화 %를 FACS 분석으로부터 얻은 기하 평균으로부터 계산하였다[(글루타티온 존재하 37℃에서의 평균 - 4℃에서 글루타티온 존재하 평균)/(글루타티온 부재하 37℃에서의 평균 - 글루타티온 존재하 4℃에서의 평균]. NA는 FACS 분석을 수행하였지만 데이터가 표 3.12에 제공되지 않은 것을 의미한다.

표 3.12

[0300]

mAb	FACS 기하 평균			내재화 %
	글루타티온 부재하 37℃	글루타티온 존재하 37℃	글루타티온 존재하 w4℃	
13.1.2	22.12	19.19	5.38	82.5%
sc95	22.56	17.75	5.13	72.4%
sc131	NA	NA	NA	72%
sc133	23.39	18.63	6.24	72.2%
sc139	22.64	19.23	4.88	80.8%
sc150	20.29	7.78	4.66	20.0%
sc170	19.97	7.75	4.67	20.1%
sc211	20.76	8.23	4.78	21.6%
sc230	20.68	7.97	5.02	18.8%
sc250	24.13	8.07	4.84	16.7%

[0301] 13.1.2은 이전에 EGFRvⅢ 에피토프에 대해 지향적인 하이브리도마 생성(실시예 2)을 통해 생성된 항체로서, 본 실험에서는 양성 대조군으로서 사용하였다. 표 3.12에 기재된 결과를 통해, 효율적으로 내재화(70%-80%)되고 내재화되지 않은(22% 이하) 항체의 2 세트가 존재함을 알 수 있다.

[0302] 실시예 4

[0303] 인간 항 EGFRvⅢ 항체의 에피토프 매핑

[0304] 본 발명의 일부 항체가 결합된 에피토프를 결정하기 위해, EGFRvⅢ에 대한 6개의 인간 및 3개의 쥐 단클론성 항체(mab)를 특이적 EGFRvⅢ 펩타이드 서열로부터 유도된 합성 펩타이드를 이용하여 매핑하였다. 매핑된 항체는 인간 하이브리도마 유도된 항-EGFRvⅢ 13.1.2 항체, 인간 XenoMax 유도된 항-EGFRvⅢ 131, 139, 250, 095 및 211 항체, 및 쥐 항-EGFRvⅢ H10, Y10 및 B9 항체이었다(Dr. D. Bigner, Duke University).

[0305] 사용된 접근법은 인간 항-EGFRvⅢ 항체와 이들의 펩타이드 에피토프의 분자 상호 작용을 연구하기 위한 주문형 SPOTs 펩타이드 어레이(Sigma Genosys)이었다. SPOTs 기술은 항체 에피토프의 체계적인 분석에 적합한 포맷으로 펩타이드의 고상 합성법을 기초로 한다. 주문형 어레이된 올리고펩타이드의 합성법은 Sigma-Genosys로부터 입수 가능하다. EGFRvⅢ 변이체의 아미노산 서열로부터 유도된 오버래핑 올리고펩타이드의 펩타이드 어레이는 Sigma-Genosys에 의해 정리되었다.

[0306] 일련의 9개 12-mer 펩타이드를 폴리프로필렌 막 쉬트 상에 스팟으로서 합성하였다. EGFRvⅢ 서열의 펩타이드 어레이 연결된 잔기 1-20은 wtEGFR의 세포외 도메인에서 아미노산 6-273의 결실 및 접합점에서 글리신(G) 잔기의 발생을 나타낸다. 일련의 펩타이드 각각은 이전의 펩타이드로부터 1 잔기에 의해 옵셋되어 네스티드(nested) 어레이된 올리고펩타이드의 오버래핑 라이브러리가 만들어진다. 9개의 펩타이드를 수반하는 막을 9개의 다른 항 항체(1 μg/ml)와 반응시켰다. 막-결합된 펩타이드에 대한 mAb의 결합을 HRP-접합된 2차 항체를 사용하는 효소-연관된 면역 흡수 분석법 및 추후 강화된 화학발광법(ECL)에 의해 평가하였다. 상기 사용된 어레이를 표 4.1에 나타내었다.

표 4.1

스폿 어레이 서열:

[0307]

1. ALEEKKGNYVVT (서열번호: 72)
2. LEEKKGNYVVTD (서열번호 : 59)
3. EEKKGNYVVTDH (서열번호 : 73)
4. EKKGNYVVTDHG (서열번호 : 74)
5. KKGNYVVTDHGS (서열번호 : 75)
6. KGNYVVTDHGSC (서열번호 : 76)
7. GNYVVTDHGSCV (서열번호 : 77)
8. NYVVTDHGSCVR (서열번호 : 78)
9. YVVTDHGSCVRA (서열번호 : 79)

[0308]

[0309] 또한, 기능성 에피토프를 조합 알라닌 스캐닝법(combinatorial Alanine scanning)에 의해 매핑하였다. 이 과정에서, 조합 알라닌-스캐닝법을 사용하여 항-EGFRvⅢ mAb와 상호 작용을 위해 필요한 EGFRvⅢ 펩타이드에서 아미노산을 동정하였다. 이를 달성하기 위해, SPOTs 어레이의 제 2 세트를 알라닌 스캐닝법을 위해 정렬시켰다. 12 잔기의 각각에서 알라닌 치환을 갖는 변이체 펩타이드의 패널을 상술한 바와 같이 스캐닝하였다. 비돌연변이된 서열인 Spot #1은 항체 결합에 대한 양성 대조군이다. 사용된 어레이를 표 4.2에 나타내었다.

표 4.2

알라닌 스캐닝 어레이:

[0310]

1. LEEKKGNYVVTD (서열번호 : 59)
2. AEEKKGNYVVTD (서열번호 : 80)
3. LAEKKGNYVVTD (서열번호 : 81)
4. LEAKKGNYVVTD (서열번호 : 82)
5. LEEAKGNYVVTD (서열번호 : 83)
6. LEEKAGNYVVTD (서열번호 : 84)
7. LEEKKANYVVTD (서열번호 : 85)
8. LEEKKGAYVVTD (서열번호 : 86)
9. LEEKKGNAVVTD (서열번호 : 87)
10. LEEKKGNYAVTD (서열번호 : 88)
11. LEEKKGNYVATD (서열번호 : 89)
12. LEEKKGNYVVAD (서열번호 : 90)
13. LEEKKGNYVVTA (서열번호 : 91)

[0311] 인간 EGFrVE에 대한 9개의 모든 mAb의 에피토프를 매핑하고, SPOTs 절차에 따라 동정하였다. 9개의 항체 모두는 펩타이드와 반응적이었다. 3개의 쥐 항체 및 6개의 XenoMouse 마우스 유도된 인간 항체에 의해 얻은 결과를 표 4.3에 제공하였다. 중요한 잔기는 본 발명자들이 알라닌에 돌연변이한 것들이고, 시험 항체에 의해 결합을 제거하였다. 따라서, 이들은 항체에 대한 결합에 대해 관련 잔기들이다.

표 4.3

[0312]

EGFR	EGFRvIII	13.1.2	131	139	250	095	211	H10	Y10	B9
A										
T										
C										
V	**L**			**L**	L					
K	**E**	**E**	E	**E**	E				**E**	
K	**E**	E	E	E	E				E	
C	**K**	K	**K**	**K**	K				K	
P	**K**	**K**	**K**	K	K				K	
R	**G**	G	G	G	G				**G**	G
N	N	N	**N**	N	N				**N**	N
Y	Y	Y	**Y**	Y	Y	Y	Y	**Y**	**Y**	Y
V	V	V	**V**	V	V	V	V	V	V	V
V	V	V	V	V	V	V	V	**V**	V	V
T	T	T	T	T	T	T	T	**T**	T	T
D	D			D	D	D	D	D		
H	H					H				
G	G									
S	S									
C	C									
V	V									
R	R									
A	A									
(서열번호:92)	(서열번호:93)	(서열번호:94)	(서열번호:94)	(서열번호:95)	(서열번호:95)	(서열번호:96)	(서열번호:97)	(서열번호:97)	(서열번호:98)	(서열번호:99)

[0313] 표 4.3에 나타낸 굵게 처리된 아미노산은 항체 인식에 대한 에피토프에서 가장 관련이 있는 잔기들이다. 10개의 mAb 모두의 에피토프의 최소 길이를 오버래핑 서열의 펩타이드를 이용하여 정확하게 매핑하고, 돌연변이된 에피토프에 대한 mAb 결합에 대한 내성을 에피토프 내 각 잔기를 알라닌으로 체계적으로 치환함으로써 측정하였다.

[0314] 표 4.4에서, 항체의 추가적인 특성을 요약하였다. 구체적으로, 비-환원 또는 환원 조건하에서 폴리아크릴아미드 겔 전기영동의 웨스턴 플레이트에서 종양 세포주의 용해물에 대한 항체의 서브세트의 결합에 대해 시험하였다. 정제된 재조합 단백질이 또한 포함된다. 환원 및 비-환원 조건에서 항체 결합은 에피토프가 선형임을 시사하고 있다. 샘플 확인:

[0315] EGFRvⅢ - 토끼 Fc 융합 단백질

[0316] H1477 - EGFRvⅢ 발현 구조체로 감염된 H80 인간 종양 세포주. 이들 세포는 EGFR 및 EGFRvⅢ를 둘 다 발현한다.

[0317] EGFR - 정제된 야생형 EGFR 단백질

[0318] A431 - 야생형 EGFR 만을 발현하는 인간 종양 세포주

[0319] A549 - 야생형 EGFR80 만을 발현하는 인간 종양 세포주

[0320] H80 - 야생형 EGFR 만을 발현하는 인간 종양 세포주.

[0321] EGFR Biacore - mAb를 특이성에 대한 고민감도 시험으로서 정제된 EGFR에 대한 결합에 대해 Biacore에서 시험하였다.

표 4.4

[0322]

MAb	EGFRvIII 웨스턴(네이티브)	rEGFRvIII 웨스턴(환원된)	EGFRvIII FACS	H1477 웨스턴(네이티브)	H1477 웨스턴(환원된)	pep3 KinExA	EGFR 웨스턴(네이티브)	EGFR 웨스턴(환원된)
13.1.2	+	+	+	+	+	25pM	-	-
131	+	+	+	+	+	0.05pM	-	-
139	?	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
095	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
211	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
250	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND

MAb	EGFR	A431 FACS	A431 웨스턴(네이티브)	A431 웨스턴(환원된)	A549 FACS	A549 웨스턴(네이티브)	A549 웨스턴(환원된)	H80 FACS	H80 웨스턴(네이티브)	H80 웨스턴(환원된)
13.1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-
139	N.D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
095	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
211	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
250	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

[0323] 상기 결과를 통해, 상기 mAb의 대부분은 동일한 결합 특이성을 주로 가지며, mAb 중 7개는 EGFRvⅢ 변이체에 대해 특이적으로 결합하는 것을 밝혀진 반면, 2개의 mAb는 정제된 단백질의 웨스턴 블롯 및 A431 세포의 용해물에서 야생형 EGFR(쥐 H10 및 인간 211)과 교차 반응하였다. 그러나, 항체 211이 웨스턴 블롯에서 네이티브와 감소된 정제 EGFRvⅢ에 결합하는 반면, 비-환원된 단백질에는 약간 더 강하게 결합함을 알 수 있다. A431 세포의 용해물에 대한 시험에서, 항체 211은 비-환원된 샘플에서 야생형 EGFR의 크기의 밴드에 강하게 결합하지만, 환원된 샘플에서는 어떠한 신호도 없다. 이는 항체 211의 결합은 야생형 EGFR에 존재하는 형태에피토프 때문인 것임을 시사하며, EGFRvⅢ 변이체에서 상이하게 나타났다. 5개의 mAb의 에피토프는 EGFRvⅢ 변이체 특이적 글리신 잔기를 연결하는 잔기 2-12 내에 있는 반면, 4개의 mAb(H10 및 211을 포함)의 에피토프는 EGFRvⅢ 및 야생형 EGFR에 공통인 잔기 7-16을 연결한다. 항체 131은 FACS에서 A431 및 A549 세포에 결합한다. 이러한 세포는 EGFRvⅢ의 발현에 대해 명백히 음성인 반면, EGFR 발현에 대해 양성이다. 항체 131은 비-환원되거나 비-환원된 정제된 EGFR 또는 웨스턴에서 A43 및 A549 세포의 환원되거나 비-환원된 용해물에 결합하지 않으며, 이는 항체 131이 몇몇 인간 종양 세포주의 세포 표면 상에 발현된 EGFR의 변이체에 결합함을 시사하고 있다. 이는 변성에 민감할 것이다.

[0324] 실시예 5

[0325] 시험관내 항-EGFRvⅢ 항체의 특이성의 특성 규명

[0326] 정제된 항체의 특이성을 야생형 또는 돌연변이체 EGFR에 의해 형질감염된 NR6 세포에 대한 FACS 분석을 수행함으로써 확인하였다. 세포를 1시간 동안 각 항체 5 ㎍/ml로 얼음상에서 배양하고, FACS 완충액에서 세척한 다음, PE-접합된 염소 항-인간 IgG로 배양하였다.

[0327] 실시예 6

[0328] 증폭된 EGFR를 이용한 교차-반응성

[0329] 변이체 EGF 수용체 지향적인 항체는 유전자 증폭이 일어난 세포에서 야생형 EGF 수용체의 서브세트와 교차 반응하는 것으로 밝혀졌다(Johns et al., Int. J. Cancer. 98: 398,2002). 동정된 인간 EGFRvⅢ 항체가 유사한 특성을 갖는지 결정하기 위해, 상기 항체의 배양물에서 각종 세포에 대한 야생형 EGF 수용체를 인식하는 능력을 시험하였다. 항체를 4℃에서 지시된 세포주와 함께 배양하였다. FACS 완충액에서 세척한 후, 피오에리트린과 결합된 제 2 항체를 첨가하고, 배양을 계속하였다. 분석한 모든 세포주는 야생형 EGFR을 발현하였다. 야생형 EGFR의 서브세트는 A431 및 SF-539 세포에 대해서는 항체 XG1-131에 의해 인식되었지만, A498 또는 SKRC-52 세

포에 대해서는 인식되지 않았다. EGFRvⅢ, 13.1.2에 대한 또 다른 항체는 야생형 EGFR의 서브세트를 인식하지 않았다. 함께 고려되는 경우, 이들 데이터를 통해 돌연변이체 EGFRvⅢ에 지향적인 항체의 서브세트 만이 세포의 표면에 대한 야생형 EGFR를 인식할 수 있음을 알 수 있다. 돌연변이체 EGFRvⅢ에 지향적인 일부 항체의 야생형 EGF 수용체의 서브 집단(subpopulation)을 인식하는 능력은 전체 EGFR 밀도에 대해 의존적이지 않지만, 종양 세포에 고유한 신규한 형태 에피토프를 나타낸다. EGFRvⅢ에 지향적인 항체의 야생형 수용체의 서브 집단과 교차 반응하는 능력은 돌연변이체 수용체의 접합부 내에서 특이적 에피토프 및 이러한 고유한 에피토프에 대한 항체의 친화도에 의해 결정될 수 있다(본 명세서의 에피토프 매핑 및 친화도 결정 편을 참조).

[0330] 실시예 7

[0331] 시험관내 항-EGFRvⅢ 항체의 특이성의 특성 규명: 세포주에 대한 항체의 결합

[0332] 세포주의 패널에 대한 FACS 분석을 수행함으로써 정제된 항체의 특이성을 확인하였다. 인간 교모세포종 세포주인 H80 및 EGFRvⅢ의 고수준을 발현하는 H1477(H80-EGFRvⅢ), 인간 상피 암종 세포주인 A431 및 인간 폐 암종 세포주인 A549를 세포주로서 사용하였다. A431 및 A549를 제외한 모든 세포주를 Bigner 박사로부터 입수하였으며, A431 및 A549는 ATCC(Rockville, MD, U. S. A.)로부터 얻었다. 세포를 30분 동안 각 항체 10㎍/ml와 함께 얼음 상에서 배양하고, FACS 완충액에서 세척한 다음, Jackson ImmunoResearch(West Grove, PA, U. S. A.)의 PE-결합된 염소 항-인간 IgG와 함께 배양하였다. 도 9A 내지 도 9L 및 10A 내지 10D의 검정 막대 그래프는 관련이 없는 IgG로 염색된 세포를 나타내거나, 윤곽 처리 또는 백색 막대 그래프는 관련 항체의 염색을 나타낸다. 항-EGFRvⅢ 항체 13.1.2, 131 및 139는 형질감염된 세포주에 대한 EGFRvⅢ 단백질에 결합한다. 몇몇 결과를 요약한 그래프가 도 9M 내지 도 9P에 도시되어 있다.

[0333] 변이체 EGF 수용체에 지향적인 항체는 유전자 증폭이 발생하는 세포에 대해 야생형 EGF 수용체의 서브세트와 교차 결합하는 것으로 밝혀졌다(Johns etal., Int. J. Cancer. 98: 398,2002). 본 실시예에서는, XG1-131 및 XG1-139으로 A431 및 A549를 염색하였다. 도 10B 및 도 10C는 131 및 139가 H80, A431 및 A549 라인에서 집단(population)의 서브세트를 인식하는 대신 야생형 EGFR와 일부 교차 반응성을 가짐을 나타내고 있다. 그러나, 이러한 교차 반응성은 이들 세포주에 대해 염색하는 ABX-EGF(E7.6.3)의 수준의 10%일 뿐이다. 상기 결과는 도 9A-9P 및 10A-10D에 제공되어 있다.

[0334] 세포 표면 항원에 지향적인 항체는 약물 또는 독소를 특이적으로 세포로 수송하는 전달 배지로서 사용될 수 있다. 상기 항체가 항원의 내재화를 자극하는 경우, 약물 또는 독소는 예상컨대 상기 항체로부터 약물 또는 독소가 절단된 후 세포의 사멸을 초래할 수 있다. 이러한 매카니즘은 동물 및 환자에서 종양 세포를 특이적으로 사멸시키기 위해 활용될 수 있다. 약물을 세포로 전달할 수 있는 항체를 선택하기 위한 하나의 방법은 제 2 세포독성 분석을 이용하는 것이다. 이러한 분석에 있어서, 상기 제 1 항체는 세포 표면에 결합하고, 약물 또는 독소와 결합되는 제 2 항체가 첨가된다. 상기 제 1 항체가 항원 내재화를 자극하는 경우, 상기 제 2 항체는 공-내재화될 것이고, 약물 또는 독소의 절단시 세포 사멸을 초래한다.

[0335] 실시예 8

[0336] 제 2 세포 독성

[0337] 본 실시예는 어떻게 항체가 타겟 에피토프(타겟 세포)를 발현하는 세포에 대해 2차 항체를 통해 독소의 접합을 지시하기 위해 사용될 수 있는지를 설명한다. 독소에 접합되는 항체는 타겟 펩타이드를 발현하는 세포에 투여된다. 이러한 세포의 사멸은 항체 독소 조합체의 효능을 의미한다. Y

[0338] 특이적 사멸에 필요한 양은 특정 용도에 따라 다양할 수 있다. 일실시형태에 있어서, 암 세포의 감소가 충분할 수 있다. 예를 들면, 타겟 세포의 0-1, 1-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 또는 100% 감소가 충분할 것이다. 또 다른 일실시형태에 있어서, 타겟 세포 수의 바람직한 감소는 또한 항체 조합의 비특이적 치사율(lethality)의 함수이다. 예를 들면, 만일 항체에 의해 비특이적 타겟화 및 치사율이 있는 경우, 타겟 세포수에서 10% 감소만을 갖는 항체/독소 조합이면 충분할 것이다. 예를 들면, 상기 항체 독소 조합은 비-타겟 집단의 10% 미만을 사멸시킨다. 재차, 특정 양은 특정 필요성 및 상황에 따라 다를 것이다. 특히, 타겟 세포(예를 들면 H1477)에 대해 선택성이 크고, 타겟 세포에 잘 결합하는 항체, 또는 상기 세포에 잘 결합되는 단백질이 유용하다. 일실시형태에 있어서, 타겟은 EGFRvⅢ 단백질 또는 그의 단

편이다. 일실시형태에 있어서, 인간 또는 인간화된 항체는 내재화되는 상태에서 효율적이고, EGFRvⅢ 단백질 또는 그의 단편에 특이적이며, EGFRvⅢ 단백질 또는 그의 단편과 견고하게 결합하며, 효과적인 독소와 결합하며, 상기 실시예에 개시되어 있다.

[0339] 실시예 9

[0340] 2차 세포 독성 클로노제닉 분석

[0341] 2차 세포 독성 분석 이외에, EGFRvⅢ-특이적 항체를 클로노제닉 분석에서 시험하였다. 상술한 바와 같이, 독소에 결합된 항체는 세포에 투여된다. 세포의 증식 능력을 관찰한다. 증식 감소는 상기 항체 독소 조합체가 효과적임을 나타낸다.

[0342] 실시예 10

[0343] 항-EGFRvE 항체(13. 1. 2) 세포 독성 분석에서 직접 접합체

[0344] 상기 간접 접합된 예들 이외에, 이러한 시험들은 독소에 직접 접합되는 항체를 이용하여 수행될 수도 있다. 독소에 직접 접합되는 항체는 실시예 8에서 항체 독소 접합체에 대해 기재되어 있는 바와 동일하게 사용된다.

[0345] 실시예 11

[0346] 시험관내 항-EGFRvⅢ 항체 특성 규명

[0347] 상기 항체 독소 접합체들은 체내 시험될 수도 있다. 타겟 펩타이드를 발현하는 타겟 세포를 갖는 시험 유기체에 항체 독소 접합체를 투여한다. 상기 시험 유기체에서 타겟 세포의 수가 감소하면, 체내 세팅에서 상기 항체 접합된 독소의 작용력이 있음을 의미한다.

[0348] 실시예 12

[0349] *암 환자/인간 종양에서 EGFRvⅢ의 발현

[0350] 인간 종양에 대한 EGFRvⅢ의 발현을 EGFRvⅢ에 특이적으로 결합하는 것으로 알려진 2개의 쥐 단클론성 항체(B9, IgGl 및 Y10, IgG2(Dr. Bigner, Duke University))의 조합으로 다양한 암 환자의 동결 조직 단면을 염색함으로써 결정하였다. 동일한 단면을 동위형 매칭된 대조군 항체로 염색하였다. 모든 환자 샘플로부터 얻은 염색 결과를 표 12.1에 요약하였다.

표 12.1

[0351]

종양 유형	샘플 크기(N)	EGFRvIII > +	EGRFvIII > ++
신경교종	8	100%	100%
유방암	100	31%	24%
NSCL암	51	47%	39%
두경부암	21	42%	38%
전립선암	22	4.5%	4.5%

[0352] EGFRvⅢ >+: EGFRvⅢ를 발현하는 모든 종양을 포함한다.

[0353] EGFRvⅢ++: 10% 이상 EGFRvⅢ를 발현하는 종양만을 포함한다.

[0354] 상기 발현을 세포막 및/또는 세포질 상에서 1차적으로 발견하였다. 유방암(31%), NSCL(47%) 및 두경부암(42%) 표본의 유의적인 수가 EGFRvⅢ에 대해 양성적으로 염색되었다. 일부 예에 있어서, 고품질 IHC 염색을 얻기 위해, 2개의 항체를 사용하면, 항체를 사용하는 것보다 양호할 수 있다. 동결 조직 표면은 고정 조직에 비해 우수하였다.

[0355] 당업자가 잘 이해하고 있는 바와 같이, 치료 항체를 사용하기 전에 환자를 시험하여 치료할 종양이 EGFRvⅢ를 발현한다는 것을 확인하는 것이 유리할 것이다.

[0356] 실시예 13

[0357] 체내 항-EGFRvⅢ 항체 특성 규명

[0358] 폐암 및 신경교종을 치료하기 위해 실시예 11의 방법을 사용할 것이다. 동물 모델을 제작함으로써 광범위하게 조사할 것이다. 교모세포종 및 폐암에 대한 동물 모델은 다음과 같이 전개한다: wt-EGFR를 발현하는 폐암 세포를 EGFRvⅢ으로 형질감염시킨다. 세포를 nu/nu 마우스의 폐로 주사하고, 종양을 상당한 단계까지 진행하도록 하였다. 이후, 항-EGFRvⅢ 접합체를 상술한 바대로 1 내지 10일마다 필요한 만큼 정맥내 주사할 것이다. 이후, 이들 암세포의 지속적인 성장의 크기 및 예방 또는 억제를 기록하여 항-EGFRvⅢ 항체 및 항체-독소 복합체의 효과를 결정할 것이다. 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 본 명세서에 기재되어 있는 임의의 항체에 대해 수행할 수 있다.

[0359] 실시예 14

[0360] 치환 분석에 의한 에피토프의 기능성 특성 규명

[0361] EGFRvⅢ 에피토프 내에서 결합에 필수적인 아미노산 잔기의 동일성을 더 분석하기 위해, 에피토프 펩타이드에서 아미노산의 치환 분석을 수행하였다. 출발점은 실시예 4로부터 유도된 서열 LEEKKGNYWTD(서열번호 59)이었다. 본 실시예에서, 매핑된 에피토프의 각 아미노산을 모두 20L-아미노산에 의해 한번에 하나씩 치환함으로써, 모든 가능한 단일 부위 치환 유사체를 합성하고 스크린하여 펩타이드 결합의 모드에 대한 상세한 정보를 제공하였다. mAb 131 및 13.1.2에 대한 불연속 치환 패턴을 동정하였다. 이러한 치환으로부터 얻은 결과를 표 14.1에 요약하였다.

표 14.1

[0362]

MAbs	인식 서열
131	EEKKGNYVVT(서열번호: 57)
13.1.2	EEKKGNYVVT(서열번호: 57)

[0363] mAb 13.1.2에 대하여 5개의 잔기가 결합에 대해 중요한 반면(굵게 표시), 4개의 잔기만이 mAb131의 결합에 대해 필수적인 것으로 보인다. 상기 잔기 중 나머지는 유의적인 결합 손실없이 다양한 아미노산에 의해 치환되었다. 131 및 13.1.2 에피토프의 서열 및 길이가 동일하더라도, 각각에 대한 결합 패턴은 상이하게 나타난다. mAb 131의 결합은 잔기 EKNY(서열번호: 60)에 따라 크게 의존한다. 한편, 상기 데이터를 통해, 잔기 EEKGN(서열번호:61)는 mAb 13.1.2의 결합을 포함한다.

[0364] 실시예 15

[0365] mAb 사슬 뒤섞임(shuffling)

[0366] mAb 131 및 13.1.2의 중쇄 및 경쇄를 뒤섞고, 293T 세포로 일시 형질감염시켰다. 72시간 후, 상청액을 수거하고, 분비 및 ELIS에 의해 EGFRvⅢ 항원에 대한 결합을 분석하였다.

[0367] 상기 결과를 통해, 13.1.2 카파 체인을 가진 131 중쇄의 발현으로부터 유도된 항체 및 그 반대로 잘 발현하였지만, 결합 활성은 추측컨대 EGFRvⅢ 항원에 대한 2개의 mAb의 상이한 결합 패턴에 의해 75%만큼 감소하였음을 알 수 있다(데이터는 나타내지 않음). 이를 통해, 131 및 13.1.2 mAb의 2개의 파라토프 사이의 차이점을 알 수 있으며, 다시 2개의 mAb 사이에 대해 선택된 에피토프의 구조적 특성이 상이함을 시사한다.

[0368] 실시예 16

[0369] 131 및 그의 파라토프의 분자 모델링

[0370] 본 실시예는 상기 실시형태의 단백질에 대해 어떻게 3차원 구조가 생성될 수 있는지를 증명한다. 항체 131의 가변 영역의 3차원 구조 모델은 Accelrys(San Diego, CA)의 Insight II 모델링 패키지를 이용하여 상동성 모델링 접근법을 통해 제작되었다. 상기 모델은 후술하는 가변 영역 서열(표 16.1)로부터 제작하였다. 잔기 번호는 경쇄 아미노산으로부터 시작하여 중쇄 아미노산으로 이어진다.

표 16.1

[0371]

경쇄 가변 영역	
DTVMTQTPLSSHVTLGQPASISC	(서열번호 : 100)
RSSQSLVHSDGNTYLS(CDR1)	(서열번호 : 101)
WLQQRPGPPRLLIY	(서열번호 : 102)
RISRRFS(CDR2)	(서열번호 : 103)
GVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYC	(서열번호 : 104)
MQSTHVPRT(CDR3)	(서열번호 : 105)
FGQGTKVEIK	(서열번호 : 106)

[0372]

중쇄 가변 영역	
QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFR	(서열번호 : 107)
NYGMH(CDR1)	(서열번호 : 108)
WVRQAPGKGLEWVA	(서열번호 : 109)
VIWYDGSDKYYADSVRG(CDR2)	(서열번호 : 110)
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(서열번호 : 111)
DGYDILTGNPRDFDY(CDR3)	(서열번호 : 112)
WGQGTLVTVSS	(서열번호 : 113)

[0373] 항체 131 서열을 사용하여 Protein Data Bank에 대해 검색함으로써 상동성 항체 및 그 구조를 확인하였다. 131 항체와 유사한 상동성 항체의 서열을 토대로, 몇 개의 구조를 선택하였다. Protein Data Bank로부터 얻은 샘플을 모델링하기 위해 선택된 구조는 1HEZ, 2H1P, 1AQK, 1DQL, 1MF2 및 1FLR의 Protein Data Bank 동일성을 가졌다. 이후, 이들 주형 구조를 겹침에 의해 정렬하고, 상기 주형들 중에서 구조-기반 서열 정렬을 형성하기 위해 사용하였다. 이후, 항체 131의 가변 영역의 서열을 주형 서열로 정렬시켰다. 상기 구조 및 서열 정렬을 이용하여 131 항체의 가변 영역에 대한 분자 모델을 제작하였다. 경쇄인 CDR1에 대한 서열은 RSSQSLVHSDGNTYLS(서열번호 101)이었다. 경쇄인 CDR2에 대한 서열은 RISRRFS(서열번호 103)이었다. 경쇄인 CDR3에 대한 서열은 MQSTHVPRT(서열번호 105)이었다. 중쇄인 CDR1에 대한 서열은 NYGMH(서열번호108)이었다. 중쇄인 CDR2에 대한 서열은 VIWYDGSDKYYADSVRG(서열번호 110)이었다. 중쇄인 CDR3에 대한 서열은 DGYDILTGNPRDFDY(서열번호 112)이었다.

[0374] 항체 131에 대한 상호 작용 표면을 상기 구조 모델로부터 계산하여 도 11에 도시하였다. 상기 여러 가지 CDR을 다음과 같이 확인하였다: L1(경쇄 CDR1) 10, H1(중쇄 CDR1) 20, L2 30, H2 40, L3 50 및 H3 60. 예측된 항체 131 상호 작용 표면에 대한 특이한 특징은 깊은 공동(cavity)이 있다는 것이다. 상기 공동은 주로 중쇄 CDR2, CDR3 및 경쇄 CDR3와 경쇄 CDR1에 의해 기여된 소부분과 함께 포위되어 있다. 상기 공동은 추측컨대 결합 포켓이다. 결합 공동의 5옹스트롬 내에 잔기 31, 37, 95-101, 143-147, 159, 162-166, 169-171, 211-219, 221 및 223이 존재한다. 이들 잔기는 파라토프를 포함하고, EGFRvⅢ 에피토프의 결합에 있어 중요한 접촉점을 형성하는 것으로 보인다. 또한, 상기 잔기는 일반적으로 결합 부위에 중요한 구조적 특징을 제공하는 것으로 보인다.

[0375] 실시예 17

[0376] 항체 131에 대한 모델을 확인하는 부위-지향 돌연변이 유발

[0377] 본 실시예는 결합에 있어 중요한 잔기를 시사하는 모델을 테스트할 수 있는 방법을 설명한다. 상기 실시예는 또한 몇 개의 항체 변이체를 초래한다. 131 클론의 항체 변이체를 mAb 131의 중쇄 및 경쇄로 도입된 단일 잔기 돌연변이에 의해 생성하였다. 이후, 이들 변이체를 분석하여 점 돌연변이로부터 변경된 측쇄가 어떻게 항원 결합에 기여하는지 결정하였다.

[0378] mAb 131의 중쇄 및 경쇄를 변화시켰다. 중쇄 상의 L216을 부위 지향 돌연변이 유발에 의해 변화시켰다. 경쇄

상에서 V99를 F로 변화시켰다. 2개의 돌연변이는 야생형 서열과 비교하여 변이체 항체의 발현 및 분비에 영향을 주었다. 2개의 돌연변이는 EGFRvⅢ 항원에 대한 mAb 변이체의 결합 손실을 초래하였다. 이는 L216 및 V99가 추측컨대 EGFRvⅢ 항원과 유의적으로 접촉함을 증명하는데, 이는 이들 잔기를 각각 R 및 F로 치환하였더니 활성 감소가 초래되었기 때문이다. 물론, 이러한 치환은 항상 항체의 일반적인 구조를 파괴시킬 수 있다.

[0379] 실시예 18

[0380] 13.1.2 및 그의 파라토프의 분자 모델링

[0381] 13.1.2 항체의 가변 영역의 3차원 구조 모델을 Accelrys(San Diego, CA)의 Insight II 모델링 패키지를 이용하여 상동성 모델링 접근법을 통해 제작하였다. 상기 모델을 주형으로서 공지된 x-선 결정 구조를 이용하여 하기 표 18.1에 나타낸 가변 영역 서열로부터 제작하였다.

표 18.1

[0382]

경쇄 가변 영역(1-113)	
DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC	(서열번호 : 114)
RSSQSLVHSDGNTYLS(CDR1)	(서열번호 : 101)
WLHQRPGQPPRLLIY	(서열번호 : 115)
KISNRFS(CDR2)	(서열번호 : 116)
GVPDRFSGSGAGTAFTLKISRVEAEDVGVYYC	(서열번호 : 117)
MQATQLPRT(CDR3)	(서열번호 : 118)
FGQGTKVEIKR	(서열번호 : 119)

[0383]

중쇄 가변 영역(114-234)	
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	(서열번호 : 120)
SYGMH(CDR1)	(서열번호 : 121)
WVRQAPGKGLEWVA	(서열번호 : 122)
VIWYDGSNKYYVDSVKG(CDR2)	(서열번호 : 123)
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(서열번호 : 124)
DGWQQLAPFDY(CDR3)	(서열번호 : 125)
WGQGTLVTVSSA	(서열번호 : 126)

[0384] 경쇄인 CDR1에 대한 서열은 RSSQSLVHSDGNTYLS(서열번호: 101)이었다. 경쇄인 CDR2에 대한 서열은 KISNRFS(서열번호: 116)이었다. 경쇄인 CDR3에 대한 서열은 MQATQLPRT(서열번호: 118)이었다. 중쇄인 CDR1에 대한 서열은 SYGMH(서열번호: 121)이었다. 중쇄인 CDR2에 대한 서열은 VIWYDGSNKYYVDSVKG(서열번호:123)이었다. 중쇄인 CDR3에 대한 서열은 DGWQQLAPFDY(서열번호: 125)이었다. 중쇄인 CDR2에 대한 서열은 VIWYDGSNKYYVDSVKG(서열번호:123)이었다. 중쇄인 CDR3에 대한 서열은 DGWQQLAPFDY(서열번호: 125)이었다.

[0385] 항체 13.1.2 서열을 사용하여 Protein Data Bank에 대해 검색함으로써 상동성 항체를 확인하였다. 13.1.2 항체와 서열 유사성을 토대로, 1HEZ, 2H1P, 8FAB 및 1AQK의 Protein Data Bank 확인을 이용하여 그 구조를 모델링 주형으로서 선택하였다. 이들 주형 구조를 겹침에 의해 정렬하고, 상기 주형들 중에서 구조-기반 서열 정렬을 형성하기 위해 사용하였다. 이후, 13.1.2 항체의 가변 영역의 서열을 주형 서열에 정렬시켰다. 구조 및 서열 정렬을 사용하여 항체 13.1.2 가변 영역에 대한 분자 모델을 제작하였다.

[0386] 상호 작용 표면을 상기 모델에 대해 계산하고, 도 12에 나타내었다. 13.1.2 모델의 중요한 특징은 CDR 영역의 표면상에 길고 좁은 홈이 있다는 것이다. 상기 홈은 중쇄 CDR2 140, CDR3 160 및 경쇄 CDR1 110, CDR2 130 및 CDR3 150에 의해 윤곽이 드러난다. 상기 홈의 일단은 경쇄 CDR3 150의 잔부와 접촉하고, 다른 일단은 중쇄-경쇄 계면 근처에서 중쇄 CDR3 160의 보다 넓은 영역으로 개방되어 있다. 상기 홈은 추측컨대 항원에 대한 결합 포켓이다. 상기 결합 홈의 5옹스트롬 내에는 잔기 31,33, 35-39, 51, 54-56, 58-61, 94-101, 144-148, 160, 163-166, 172 및 211-221가 있다. 상기 잔기들은 EGFRvⅢ 에피토프의 결합에 대한 파라토프를 포함하는 것으로 보인다. 또한 상기 잔기는 일반적으로 결합 부위에 중요한 구조적 특징을 제공하는 것으로 보인다.

[0387] 실시예 19

[0388] 항체에 대한 펩타이드의 도킹 모델

[0389] 실시예 14에서 에피토프 매핑 연구를 통해, 13.1.2 mAb의 파라토프에 대한 에피토프의 결합을 위해 필요한 관련 아미노산은 6-잔기 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127)에 있다는 것을 알 수 있다. 따라서, 13.1.2 구조 모델의 CDR 영역에 대해 조합되는 6-잔기 펩타이드의 도킹 모델을 제작하였다. 먼저, 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127)의 모델을 제작하였다. Protein Data Bank에서 확인한 바와 같이 주형으로서 1181의 x-선 결정 구조를 사용한 것을 제외하고는 상술한 바와 유사하게 실시하였다. 다음, 상기 펩타이드 구조를 손을 사용하여 길다란 홈에 위치시켜 초기 회합 복합체 A를 형성하였다. 이후, 형태 및 배향 공간에서 Monte Carlo 검색을 InsightII에서 도킹 모델을 이용하여 자동적으로 실시하였다. 상기 펩타이드 형태는 Phi, Psi and Chi 각도의 각각을 완전 회전 자유도를 제공함으로써 유연하게 되었다. 도킹 과정 중에, 항체의 나머지 잔기를 고정시키고, 결합 홈 5 옹스트롬 내의 잔기를 움직이도록 하였다. Monte Carlo 검색에 의해 발견된 그럴듯한 배열을 모의 열처리 및 에너지 최소화 처리하여 최종 복합 구조 모델에 이르게 되었다. 얻어진 각 도킹 모델에 대해, 항체 및 펩타이드 사이의 상호 작용 에너지를 InsightII 패키지의 Discover_3 모듈을 이용하여 계산하였다. 모든 도킹 모델에 대한 상호 작용 에너지를 평가하고, 가장 강력한 전체 항체-펩타이드 상호 작용을 가진 모델을 조사하여 도 13A 및 13B에 나타내었다.

[0390] 도 13B에 나타낸 바와 같이, 상기 도킹 모델에서 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127) 및 항체 13.1.2 사이에 6개의 수소 결합이 있음을 알 수 있다. 펩타이드 잔기의 수를 N-말단으로부터 C-말단까지 숫자 1 내지 6로 표지한다. 6개의 수소 결합은 녹색 파선으로 표시되어 있다. 수소 결합을 형성하는 아미노산 6쌍은 다음과 같다: E2...Y172, K3...H31, K4...H31, N6... D33, N6... Y37 및 N6...K55. 상기 도킹 모델에서, 상기 펩타이드는 연장된 3-가닥 형태로 상기 홈에 결합되어 있다. 상기 펩타이드에서 잔기는 용매 및 항체 표면에 교차적으로 접하게 된다. 상기 항체에 대한 가장 중요한 접촉을 갖는 결합 홈에 접하는 잔기는 E2, K4 및 N6이다. 이는 이들 3가지 잔기가 펩타이드 결합에 중요할 것이라는 것을 의미하며, 이는 에피토프 매핑 결과와 일치한다. 13.1.2 파라토프와 6개의 펩타이드 잔기 각각에 대한 상호 작용 에너지를 Discover_3 모듈을 사용하여 계산하고, 그 결과를 표 19.1에 나타내었다. 표 19.1은 13.1.2 파라토프와 6개의 펩타이드 잔기 각각에 대한 상호 작용 에너지를 나타낸다. 모든 에너지를 kcal/mol 단위로 나타내었다.

[0391] 가장 강한 상호 작용 에너지를 가진 잔기는 N6, K4 및 E2 순이며, 이는 3개의 잔기가 항체-항원 상호 작용에서 항원 쪽에 대해 중요한 기여를 한다는 것을 확인시켜 주며, 이는 재차 실험 데이터와 일치한다. 이들 데이터는 도킹 모델을 지지하는 강력한 증거를 제공한다. 본 실험에서, 상기 파라토프는 도킹된 펩타이드의 5옹스트롬 내에 잔기로서 정의된다. 이렇게 정의된 파라토프를 포함하는 20개의 잔기는 31-33, 35, 37, 55, 96-101, 148, 163, 165, 170, 172, 178 및 217-218이다. 각 잔기를 기준으로, 항원 항체 상호 작용에서 항체의 상기 잔기 각각의 기여도를 평가하기 위해, 파라토프 잔기와 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127) 사이의 상호 작용 에너지를 20개 이상의 잔기 각각에 대해 계산하였다. 그 결과를 표 19.2에 나열하였다. 표 19.2는 20개 파라토프 잔기와 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127) 사이의 상호 작용 에너지를 나타낸다. 모든 에너지를 kcal/mol 단위로 나타낸다. 상기 펩타이드와 가장 강력한 상호 작용 에너지를 갖는 잔기는 Lys55 및 His31이고, 다음으로 Tyr172, Ala96, Asp33, Tyr37, Leu99, Thr97, Gln98, Lys178 및 Asn170 순이다.

표 19.1

펩타이드 잔기	쿨롱	VdW	합계
E1	-2.013	-3.738	-5.751
E2	-10.661	-0.617	-11.278
K3	-9.816	-0.493	-10.309
K4	-11.123	-0.968	-12.091
G5	-1.241	-1.468	-2.709
N6	-16.504	-0.181	-16.685

[0392]

표 19.2

[0393]

13.1.2 잔기	쿨롱	VdW	합계
His31	-12.835	3.033	-9.801
Ser32	2.857	-1.062	1.794
Asp33	-4.181	-0.698	-4.879
Asn35	0.253	-1.009	-0.756
Tyr37	-2.058	-2.463	-4.521
Lys55	-14.363	1.568	-12.794
Ala96	-6.077	0.896	-5.182
Thr97	-2.739	-1.431	-4.171
Gln98	-2.542	-1.548	-4.09
Leu99	-1.507	-2.779	-4.286
Pro100	0.439	-0.379	0.061
Arg101	3.992	-0.549	3.443
His148	0.101	-0.083	0.018
Val163	-0.104	-0.237	-0.342
Trp165	1.358	-1.122	0.236
Asn170	-2.102	-0.487	-2.589
Tyr172	-8.7	0.896	-7.804
Lys178	-3.614	-0.03	-3.644
Leu217	0.761	-1.426	-0.664
Ala218	-0.071	-0.281	-0.352

[0394] 실시예 20

[0395] 친화도-개선된 항체에 대한 합리적 디자인

[0396] 본 실시예는 도킹 모델을 어떻게 부위-지향 돌연변이 유발에 의해 친화도-개선된 항체에 대해 합리적 디자인의 토대로서 사용할 수 있는지 설명한다. 13.1.2 파라토프 잔기 각각을 인 실리코 19개의 다른 모든 아미노산에 돌연변이시켜 총 19 x 20 또는 380개의 실제 돌연변이체를 얻었다. 이러한 돌연변이는 잔기 치환에 이어 에너지 최소화의 50단계에 의해 수행되어 측쇄 변화에 의해 유도될 수 있는 국소 형태 변화를 설명한다. 전체 펩타이드와 전체 파라토프 사이의 상호 작용 에너지를 각 돌연변이체에 대해 계산하였다. 야생형 13.1.2에 비해 강력한 전체 상호 작용 에피토프를 가진 돌연변이체는 잠재적으로 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127) 및 추측컨대 전체 EGFRvⅢ 단백질에 대한 보다 큰 친화도를 갖는다. 이들 돌연변이체는 대개 야생형 13.1.2에 비해 강력한 쿨롱 상호 작용을 갖지만, 이들 중 일부는 야생형 항체 보다 약한 반 데르 발스(VdW) 상호 작용을 갖는다. 야생형 13.1.2 항체에서 VdW 상호 작용 에너지가 -9.689 kcal/mol인 것을 고려하면, -8.5 kcal/mol 보다 약한 VdW 상호 작용 에너지를 가진 돌연변이체를 필터링하였다. 야생형 13.1.2 보다 강한 전체 상호 작용 에너지를 갖는 상기 돌연변이체의 나머지를 표 20.1에 나열하였다. 비교를 위해, 상기 야생형 데이터를 하단에 열거하였다. 모든 에너지를 kcal/mol 단위로 나타내었다.

【표 20.1】

[0397]

돌연변이체	쿨롱	VdW	합계
Tyr172Arg	-93.004	-8.702	-101.706
Leu99Glu	-79.897	-8.506	-88.403
Arg101Glu	-77.984	-8.833	-86.817
Leu217Glu	-75.124	-8.993	-84.123
Leu99Asn	-73.337	-9.894	-83.231
Leu99His	-73.631	-9.008	-82.639
Arg101Asp	-71.983	-9.877	-81.861
Leu217Gln	-70.263	-9.795	-80.058
Leu99Thr	-69.882	-10.153	-80.035
Gln98Glu	-70.651	-9.257	-79.908
Leu217Asn	-70.989	-8.769	-79.758
Arg101Gln	-69.432	-10.164	-79.596
Leu217Asp	-69.934	-9.643	-79.578
Asn35Gly	-69.016	-10.191	-79.207
Tyr172His	-69.312	-9.509	-78.820
Val163Asn	-68.841	-9.944	-78.784
Tyr172Asn	-68.896	-9.871	-78.767
Ala218Lys	-70.024	-8.570	-78.594
Asn35Arg	-68.989	-9.604	-78.593
Trp165Lys	-69.578	-8.766	-78.344
Trp165Arg	-68.814	-9.216	-78.030
Leu99Tyr	-67.052	-10.464	-77.517
Tyr172Thr	-68.146	-9.225	-77.371
Ala96Thr	-67.534	-9.623	-77.158
Ala96Ser	-67.222	-9.822	-77.045
Pro100Trp	-67.399	-9.496	-76.894
Leu217Ser	-66.676	-10.133	-76.810
Ser32Ile	-66.700	-10.077	76.777
Tyr172Ser	-67.588	-9.146	-76.734
His31Glu	-67.070	-9.461	-76.531
Leu217Tyr	-65.605	-10.726	-76.331
Val163His	-67.236	-9.064	-76.300
His148Ser	-66.780	-9.495	-76.274
His148Val	-66.634	-9.629	-76.263
His148Ala	-66.770	-9.473	-76.243
His148Gly	-66.762	-9.456	-76.217
His148Thr	-66.700	-9.508	-76.209
Leu99Ser	-66.126	-10.006	-76.132
Pro100Asp	-66.153	-9.787	-75.940
Trp165Glu	-66.665	-9.267	-75.932
His148Asn	-66.010	-9.889	-75.899
Pro100Gln	-65.873	-9.871	-75.745
Leu217Thr	-66.045	-9.672	-75.717
Ser32Val	-65.845	-9.854	-75.699
Ser32Pro	-65.807	-9.813	-75.620
Pro100Gly	-65.841	-9.774	-75.615
Pro100Ala	-65.889	-9.712	-75.601
Ser32Ala	-65.497	-10.089	-75.586
Ser32Thr	-65.723	-9.861	-75.584

[0398]

돌연변이체	쿨롱	VdW	합계
Ala218Thr	-66.054	-9.505	-75.560
Pro100Ser	-65.831	-9.699	-75.530
Val163Gly	-65.993	-9.536	-75.529
Gln98Thr	-66.162	-9.277	-75.438
Pro100Met	-65.811	-9.602	-75.412
Ser32Met	-66.252	-9.153	-75.406
Ser32Gly	-65.509	-9.891	-75.399
Pro100Asn	-65.729	-9.655	-75.384
Tyr37Phe	-66.253	-9.020	-75.272
Val163Ala	-65.713	-9.543	-75.255
Leu217Ile	-65.479	-9.759	-75.238
	-65.517	-9.689	-75.205

[0399] 표 20.1에 나열된 돌연변이체는 친화도-개선된 항체를 가공하기 위한 후보 종일 수 있다. 상기 리스트의 상위 14 후보종에 대해, 제안된 변형의 영향력을 조사하기 위해 상기 항원 및 항체 측에 대한 잔기별 기여도를 더 분석하였다. 시험관내 부위-지향 돌연변이 유발에 대해 선택된 10개의 돌연변이체는 Tyr172Arg, Arg101Glu, Leu99Asn, Leu99His, Arg101Asp, Leu217Gln, Leu99Thr, Leu217Asn, Arg101Gln 및 Asn35Gly이었다. 그 결과는

실시예 21에서 찾아볼 수 있다.

[0400] 실시예 21

[0401] 13.1.2에 대한 모델을 확인하는 부위-지향 돌연변이 유발

[0402] 본 실시예는 결합에 있어 중요한 잔기를 제안하는 상기 모델을 시험할 수 있는 방법을 설명한다. 본 실시예는 또한 몇몇 항체 변이체를 초래한다. 13.1.1의 항체 변이체를 13.1.2 mAb의 중쇄 및 경쇄로 도입된 단일 잔기 돌연변이에 의해 생성하였다. 상기 변이체를 분석하여 다양한 측쇄가 항원 결합에 갖는 기여도를 측정하였다. 부위-지향 돌연변이 유발에 의해 도입된 돌연변이의 목록을 표 21.1에 요약하였다.

표 21.1

[0403]

	사슬	돌연변이
1	(CDR3)	Arg101Asp
2	(CDR3)	Arg101Gln
3	(CDR3)	Arg101Glu
4	(CDR1)	Asn35Gly
5	(CDR3)	Leu217Asn
6	(CDR3)	Leu217Gln
7	(CDR3)	Leu99Asn
8	(CDR3)	Leu99His
9	(CDR3)	Leu99Thr
10	(CDR2)	Tyr172Arg

[0404] 표 21.1에서 10개의 돌연변이 각각을 13.1.2 mAb의 중쇄 또는 경쇄로 도입하였다. 이후, 각 돌연변이된 사슬을 293 세포에서 상보 야생형 사슬로 형질감염시켰다. 이후, 상청액을 인간 IgG 항체의 발현 및 분비, EGFRvⅢ 항원에 대한 결합에 대해 시험하였다. ELISA에 의해 측정된 결과를 표 21.2에 요약하였다.

표 21.2

[0405]

	돌연변이	결합 에너지	발현	결합
1	Arg101Asp	-81.861	Yes	No
2	Arg101Gln	-79.596	Yes	No
3	Arg101Glu	-86.817	Yes	No
4	Asn35Gly	-79.207	Yes	Yes
5	Leu217Asn	-79.758	Yes	Yes
6	Leu217Gln	-80.058	Yes	Yes
7	Leu99Asn	-83.231	Yes	Yes
8	Leu99His	-82.639	Yes	Yes
9	Leu99Thr	-80.035	Yes	Yes
10	Tyr172Arg	-101.706	Yes	Yes
11	WT	-75.205	Yes	Yes

[0406] 실시예 22

[0407] EGFRvⅢ/pFLAG 변이체 구조체의 제조

[0408] 본 실시예는 어떻게 EGFRvⅢ의 변이체가 생성될 수 있는지 설명한다. EGFRvⅢ의 세포외 도메인을 코딩하는 1092bp 단편을 프라이머 쌍 9712 및 9713:

[0409] 프라이머 #9712: 5'-ataaaagcttctggaggaaaagaaaggtaatta-3'(센스)(서열번호 128)

[0410] 프라이머 #9713: 5'-TTATTGGTACCTCAGGCGATGGACGGGATCTTA-3'(안티센스)(서열번호 129)

[0411] 을 이용하여 Pfu DNA 폴리머라아제 효소(Stratagene, La Jolle, CA)를 이용하여 증폭한 플라스미드 주형 EGFRvⅢ-rbIgG/pCEP4(상술한 바와 같음)으로부터 생성하였다(Qiagen, Valencia, CA). 프라이머 # 9712는 HindⅢ 부위를 도입하였고, 프라이머 # 9713은 KpnI 부위를 도입하였다. 상기 PCR 산물을 칼럼 정제하고(Qiagen 칼럼 정제 키트, Valencia, CA), HindⅢ 및 Kpnl(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.)를 이용하여 분해하고, 겔 정제하였다(Qiagen 겔 정제 키트, Valencia, CA). 단편을 T4 DNA 리가아제를 이용하여 HindⅢ 및

KpnI(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.)으로 선형화한 pFLAG-CMV-1(Sigma, St. Louis, MO)로 결찰하였다(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.). 얻어진 벡터를 EGFRvⅢ/pFLAG-CMV-1 #1으로 명명하였다.

[0412] 실시예 23

[0413] EGFRvⅢ/pFLAG 재조합 단백질의 제조

[0414] 본 실시예는 변이체 EGFRvⅢ 단백질이 어떻게 생성될 수 있는지 설명한다. 먼저, 500㎍의 EGFRvⅢ/pFLAG-CMV-1#1 플라스미드 DNA를 25 ml의 Opti-MEMI(Invitrogen, Burlington, ON)에 재현탁하고, 25 ml의 Opti-MEMI에 재현탁한 500㎕의 293 펙틴(Invitrogen, Burlington, ON)와 조합하였다. 상기 혼합물을 상온에서 20분 동안 배양한 다음, 2% FBS 및 50㎍/ml G418(Invitrogen, Burlington, ON)를 함유한 1L 293 FreeStyle 배지(Invitrogen, Burlington, ON)에서 제조한 293T 세포($1x10^9$)와 혼합하였다. 세포를 125 rpm으로 진탕하면서 8% CO_2 중 37℃에서 7일 동안 성장시켰다.

[0415] EGFRvⅢ-FLAG 융합 단백질 정제를 제작자의 프로토콜에 따라 Anti-FLAG M2 친화도 크로마토그래피 키트(Sigma, St. Louis, MO)를 이용하여 수행하였다.

[0416] 단량체 융합 단백질을 다음과 같이 생성하였다. 먼저 정제된 단백질(1508㎍)을 최종 농도 10mM의 DTT로 30분 동안 55℃에서 환원시켰다. 이후, IAA(요오도아세트산)(Sigma, St. Louis, MO)를 22mM에 첨가하고, 15분 동안 상온의 암소에서 15분간 배양한 다음, 7k MWCO 투석 카세트(Pierce, Rockford,Ill.)에서 4℃의 PBS에 대해 투석하였다.

[0417] 실시예 24-30

[0418] 항체 변이체의 결합 연구

[0419] 하기 실시예들은 Biacore 실험(표면 플라즈몬 공명) 및 KinExA 실험을 수반한다. 이들 실시예는 상기 실시예에서 생성한 다양한 항체 및 이들의 변이체를 원하는 결합 특성을 갖는지를 결정하기 위해 어떻게 시험할 수 있을지를 설명한다.

[0420] 기기 사용

[0421] 모든 표면 플라즈몬 공명 실험을 Biacore 2000 광학 바이오센서(Biacore, Inc. , Piscataway, NJ)을 이용하여 수행하였다. 모든 동력학 배재(Kinetic Exclusion) 분석을 KinExA 3000 기기(Sapidyne Instruments, Inc. , Boise, ID)를 이용하여 수행하였다.

[0422] 시약

[0423] Pep-3, NH_2-LEEKKGNYVVTDHG-OH(MW = 1590 Da)(서열번호: 130)를 주문 합성하고, Anatech, Inc.(San Jose, CA)로부터 구입하였다. 모든 mAb를 실험실에서 제조하였다. 분자량 39,907의 항원 EGFRvⅢpflag(유리 술프드릴기를 통한 응집을 차단하기 위해 요오도아세트산을 반응시켰다)를 실험실에서 제조하였다. 우혈청 알부민(BSA) 분획 V(#BP1605-100)을 Fisher Scientific(Pittsburgh, PA)로부터 구입하였다. 기타 다른 모든 일반적인 시약을 Sigma-Aldrich, Inc(St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

[0424] Biacore 및 KinExA 분석을 위한 모든 항원 및 mAb 샘플을 100 ㎍/mL BSA를 함유한 진공-탈기된 HBS-P 완충액(0.01M HEPES, 0.15M NaCl, 0.005% 계면활성제 P-20, Biacore Inc. , Uppsala, Sweden)에서 제조하였다. Biacore 아민-커플링 시약, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), N-히드록시숙신이미드(NHS) 및 에탄올아민을 Biacore, Inc로부터 구입하였다. Biacore 표면 재생은 pep-3/mAb 131 실험을 위한 26 mM NaOH의 12초 펄스로 수행하였다. 다른 모든 mAb를 20분 내 바탕선까지 해리시켰다. 연구용 등급의 CM5 바이오센서 칩을 Biacore, Inc로부터 구입하였다.

[0425] KinExA 검출 항체는 Fcɣ 특이적(Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc., West Grove, PA, #109-175-

008)인 Cy5-표지된 염소 항-인간 IgG이었고, 0.5 mg/mL 모액(1 X PBS, pH 7.4)으로부터 HEPES 완충액(0.01 M HEPES, 0.15 MNaCl, pH 7.2)에 1000배 희석시켰다. KinExA 실험을 위해 사용된 고형 입자는 NHS-활성화시킨 세파로오스 4 Fast Flow 비드(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden, #17-0906-01)이었다. 상기 세파로오스 비드를 항원과 반응시키기 전에, 미세원심분리 튜브 내 비드 모액 분획 1.5mL를 회전 침전시키고, 차가운 탈이온수로 6번 이상 세척하였다. 상기 비드를 탄산나트륨 완충액(0.05M, pH 9.3)으로 1번 헹군 후, 탄산나트륨 완충액 중 항원(약 40g)을 세파로오스 비드에 첨가하였다. 세파로오스/항원 튜브를 밤새 4℃에서 로킹(rock)하였다. 로킹 후, 상기 세파로오스를 회전시키고, 1M Tris 완충액(pH 8.3)으로 2번 헹구었다. 이후, 항원-코팅된 비드를 1시간 동안 상온의 2% BSA를 함유한 1M Tris 완충액에서 로킹하였다.

[0426] Biacore 측정

[0427] 표준 EDC/NHS 및 탄수화물 커플링을 이용하여 mAb를 CM5 센서 칩에 공유 고정시켰다. 질량 수송 및 밀집화(crowding)를 최소화하기 위해, mAb를 50-100 RU 정도의 최대 항원 결합 반응(R_{max})을 제공하는 수준에서 고정화하였다. 각 칩상에서 대조 유동 셀을 활성화시키고, mAb 고정화가 전혀 없이 블로킹하여 대조군으로서 사용하였다.

[0428] 모든 Biacore 동력학 실험을 23℃에서 수행하였다. 각 실험을 위해, 6 내지 8개의 일련의 항원 농도(1.01 μm pep-3로부터 개시)를 2배 희석비를 이용하여 제조하였다. 항원 샘플을 100㎕/분으로 바이오센서 표면 상에 무작위로 3번 주사하였다. 수 개의 완충 블랭크를 간헐적으로 2중 대조를 위한 실험 과정 중에 간헐적으로 주사하였다. 각 pep-3 농도 및 블랭크를 90초 동안 주사하였다. 13 내지 180분 동안 해리시켰다. 3번의 추가 블랭크 주사와 함께 251 nM pep-3의 2번 추가적인 주사를 교차 실시하고 3-4시간 동안 해리시켜 mAb 131에 대한 pep-3 결합에 대한 해리 데이터를 얻었다.

[0429] 모든 Biacore 센서그램을 Scrubber 소프트웨어(Versionl.lf, BioLogic Software, Australia)를 이용하여 처리하였다. 센서그램을 먼저 y-축에 대해 0점 처리한 다음, 주사 초기에 x-정렬시켰다. 벌크 굴절율 변화를 대조 유동 셀 반응을 공제함으로써 제거하였다. 모든 블랭크 주사의 평균 반응을 모든 분석물질 및 블랭크 센서그램으로부터 공제하여 실험 및 대조 유동 셀 사이에 구조적 인공 산물을 제거하였다. CLAMP 바이오센서 데이터 분석 소프트웨어(Version 3.40, BioLogic Software, Australia)를 이용하여 처리된 데이터 세트로부터 k_a 및 k_d를 결정하였다. 모든 유동 셀로부터 얻은 데이터를 질량 수송 기간을 포함시킨 1:1 생체 분자 결합 모델로 광범위하게 피팅하였다. 몇몇 mAb에 대해, pep-3 시리즈의 제1 또는 제2 농도에 상응하는 주사액을 센서그램이 1:1 상호 작용 모델에 의해 잘 기재되지 않음이 명백한 경우 비선형 동력학 피팅에서 배제시켰다. K_D를 k_d/k_a 비율로부터 계산하였다.

[0430] KinExA 평형 측정

[0431] 모든 KinExA 실험을 상온에서(약 23℃) 수행하였다. 모든 평형 실험을 위해, 항원을 불변 mAb 결합 부위 농도를 갖는 용액으로 연속적으로 희석하였다. 첫 번째 10 적정점에 대해, 희석비는 2배이고, 11번째 12번째 연속 희석비는 10배이었다. 모든 실험에 대한 상기 샘플 유동 속도는 0.25 mL/분이고, 표지 항체 유동 속도는 0.5mL/분이었다. 이후, 항원/항체 샘플을 평형에 도달하도록 하였으며, 이때 소요 시간은 48-72시간이었다. pep-3/mAb 131 KinExA 실험을 위해, K_D-제어된 적정에서 pep-3의 출발 농도는 352 nM이고, 상수 [mAb 결합 부위]는 219pM이었고; mAb-제어된 적정에서는, 초기 [pep-3]는 251nM이고, [mAb 결합 부위]는 11 nM이었다. pep-3/mAb 131을 이용한 K_D-제어된 실험 중에, 각 샘플의 1.25mL를 유동 셀을 통해 취출하였다. 250㎕의 샘플 부피를 항체-제어된 실험을 위해 분석하였다. 각 샘플당 2 또는 3개의 복제물을 모든 평형 실험에 대해 측정하였다. 평형 적정 데이터를 2중 곡선(dual curve) 분석에서 KinExA 소프트웨어(Version 2.4, Sapidyne Instruments)를 이용하여 1:1 결합 모델로 피팅하였다.

[0432] EGFRvⅢpflag/mAb 131 복합체를 K_D-제어된 조건하의 KinExA만을 이용하여 연구하였다. 초기 [EGFRvⅢpflag]는 198nM이었고, [mAb 결합 부위]는 150 pM이었다. 샘플 부피 1mL를 유동 셀을 통해 취출하였다. 모든 샘플에 대해 2번 측정하여 그 값을 취합하였다. 평형 적정 데이터를 2중 곡선 분석에서 KinExA 소프트웨어(Version 2.4, Sapidyne Instruments)를 이용하여 1:1 결합 모델로 피팅하였다. 결과와 예측된 평형 상수에 대해 하기 실시예

28을 참조.

[0433] *EGFRvⅢpflag/mAb 13.1.2 복합체의 KinExA 적정을 위해, EGFRvⅢ의 초기 농도는 5.26 μM(mAb-제어된), 230.1nM(K_D-제어된) 및 [mAb 결합 부위]는 9.59 nM(mAb-제어된), 498 pM(K_D-제어된)이었다. K_D-제어된 실험 중에, 각 샘플 1.30mL을 유동 셀을 통해 취출하였다. 샘플 부피 250㎕를 항원-제어된 실험에 대해 분석하였다. 각 샘플당 2 또는 3개의 복제물을 모든 평형 실험에 대해 측정하였다. 평형 적정 데이터를 2중 곡선 분석에서 KinExA 소프트웨어(Version 2.4, Sapidyne Instruments)를 이용하여 1:1 결합 모델로 피팅하였다.

[0434] 실시예 24

[0435] 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 측정

[0436] 야생형 mAb 131의 결합 동력학을 Biacore의 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기기를 이용하여 관찰하였다. k_d가 매우 느리고 k_a가 빠르기 때문에 K_D는 380 pM로 매우 낮았다. 그래프 피팅으로부터 유도된 다른 동력학 파라미터에 대한 예측값은 ka는 $2.246*10^{6}$ 이고 k_d는 $8.502*10^{-4}$이었다.

[0437] 일실시형태에 있어서, 개선되거나 개선된 동력학을 가진 변이체 항체가 개시된다. 개선된 동력학은 에피토프에 결합하는 항체의 동력학 요소 중 하나가 동일한 에피토프에 대해 이미 알려져 있는 항체에서 동일한 요소에 비해 우수함을 의미한다. 예를 들면, $1.3 * 10^{-9}$ M보다 큰(결합능에 있어서) K_D를 가진 pep-3에 결합하는 항체가 개선된 항체일 것이다. 이와 같이, 500 nM, 500-300 nM, 300-100nM, 100-1nM, 1.3 nM, 1.3 nM 내지 1000 pM, 1000 pM 내지 900 pM, 900-500pM, 500-400 pM, 400-300 pM, 300-100 pM, 100-50 pM, 50-1 pM 이하의 K_D를 가진 pep-3에 결합하는 항체가 고려된다.

[0438] 실시예 25

[0439] 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0440] 실시예 24와 유사하게, pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)에 대한 mAb 13.1.2의 결합 동력학을 조사하였다. K_D의 예상치는 67nM이었지만, 실험에 따라 다소 변하였다. 그래프 피팅으로부터 유도된 동력학 파라미터에 대한 예상치는 ka는 $2.835*10^{5}$이고, k_d는 0.01922이었다.

[0441] 실시예 26

[0442] 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0443] 실시예 24와 유사하게, pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)에 대한 mAb 095의 결합 동력학을 조사하였다. K_D의 예상치는 66nM이었다. 그래프 피팅으로부터 유도된 동력학 파라미터에 대한 예상치는 ka는 $1.491*10^{5}$이고, k_d는 $9.927*10^{-3}$이었다.

[0444] 실시예 27

[0445] 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0446] 실시예 24와 유사하게, pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)에 대한 mAb 139의 결합 동력학을 조사하였다. K_D의 예상치는 290nM이었다. 그래프 피팅으로부터 유도된 동력학 파라미터에 대한 예상치는 k_a는 10328이고, k_d는 $2.981 * 10^{-3}$이었다.

[0447] 실시예 28

[0448] 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0449] 항체의 결합 특성을 보다 완전하게 분석하기 위해, KinExA 실험을 수행하여 mAb 131의 결합 특성을 결정하였다. 2중 곡선 분석으로부터 결정된 K_D는 $1.74*10^{-10}$이었다. KinExA 실험에서, mAb 131에 대한 EGFRvⅢpflag 에 대한 K_D는 $6.266*10^{-11}$이었다.

[0450] 실시예 29

[0451] 변이체 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0452] 13.1.2 항체의 결합 특성을 보다 완전하게 분석하기 위해, KinExA 실험을 수행하여 mAb 131.1.2의 결합 특성을 결정하였다. 2중 곡선 분석으로부터 결정된 K_D는 $7.538*10^{-10}$이었다. 부가적으로, 본 실시예에서는 항원이 EGFRvⅢpflag 변이체이었고, 요오도아세트산(IAA)와 반응시켰다.

[0453] 실시예 30

[0454] Biacore 결과 및 KinExA 결과의 비교

[0455] 이전 실시예와 KinExA 시험의 결과를 하기 표 30.1에 제공되어 있다. 표 30.1에서 괄호안에 숫자는 95% 신뢰도 구간이다. "ND,"는 결정되지 않았음을, "*"는 pep-3 대신 EGFRvⅢpflag(요오도아세트산 반응됨)에 대한 결합을 나타낸다.

[0456] 속도 상수에 의해 증명된 바와 같이, mAb 131은 가장 큰 결합상수 및 가장 낮은 해리 상수를 가져 결국 mAb 131은 가장 낮은 K_D를 갖는 것으로 보인다.

표 30.1

[0457]

MAb	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	K_D(nM)	KinExA K_D(nM)
131	2.25×10^{6}	8.50×10^{-4}	0.380	0.174(EGFRvIIIpflag 0.0627)
13.1.2	$2.10(0.58)\times10^{5}$	0.016(0.003)	75(14)	0.75(EGFRvIIIpflag(IAA 반응)
095	1.49×10^{5}	9.90×10^{-3}	66	ND
139	1.03×10^{4}	2.98×10^{-3}	290	ND

[0458] 실시예 31

[0459] L99T-5.3 변이체 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0460] mAb L99T-5.3 내지 Pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)의 결합 동력학을 조사하였다. 첫 번째 단계는 표준 EDC/NHS 커플링 화학을 이용하여 mAb L99T-5.3의 5,600 공명 단위(RU) 내지 8,000RU를 CM5 센서칩의 2개의 유동 셀(Fc)에 고정시키고, mAb 13.1.2의 5,600 공명 단위(RU) 내지 8,000RU를 하나의 Fc에 고정시키는 것이다. 이러한 표면 밀도는 100RU 미만의 pep-3을 이용하여 결합 신호를 발생시켰다. 총 2개의 CM5 센서칩을 사용하여 2개의 mAb를 고정시켰다. 이전에 수집된 데이터를 이용하여, 95% 신뢰도 구간을 계산가능하게 하는 2개의 항체에 대해 총 5개의 독립적인 실험을 하였다. Biacore 2000 광학 바이오센서를 모든 연구에 대해 사용하였다.

[0461] 다음, pep-3을 mAb 고정된 바이오센서 표면을 통해 유동시켰다. pep-3의 출발 농도는 1.25 μM이었고, 이는 무작위로 3번의 주사에서 8개의 2배 연속 희석액이었다. 블랭크 주사를 2중으로 대조하기 위해 연속 주사를 통해 6번째 샘플마다 수행하였다.

[0462] 최종적으로, 바이오센서 데이터를 Scrubber를 이용하여 처리하고, 데이터를 이용하여 질량 수송을 위해 포함된

기간과 함께 1:1 상호 작용 모델을 가진 Clamp를 이용하여 그래프를 도시하였다. 고농도(1.25uM) 주사액은 데이터가 1:1 상호 작용 모델과 일치하지 않았기 때문에 동력학 피팅으로부터 배제하였다. 이러한 오차는 pep-3의 고농도에서 발생하는 비-특이적 상호 작용에 의해 유발된 것으로 보인다. 모든 동력학 데이터를 1:1 상호 작용 모델에 만족스럽게 피팅한다.

[0463] K_D의 예상치는 54-70nm로 다양하였다. 다른 동력학 파라미터에 대한 예상치는 작동별로 다소 다르지만 k_a는 $2.238*10^5$이고, k_d는 0.01217이었다.

[0464] 실시예 32-38

[0465] *실시예 32-38에서는 Biacore 기기를 사용하여 변이체 mAb의 결합 동력학을 더 조사하였다. 이들 실시예에서 첫 번째 단계는 표준 EDC/NHS 커플링 화학을 이용하여 mAb의 5,600 공명 단위(RU) 내지 8,000RU를 CM5 센서칩의 2개의 유동 셀(Fc)에 고정시키는 것이다. 이러한 표면 밀도는 100RU 미만의 pep-3을 이용하여 결합 신호를 발생시켰다. 총 3개의 CM5 센서칩을 사용하여 각 유동 셀에 고정된 고유의 mAb와 함께 모든 변이체 mAb를 고정시켰다. mAb 13.1.2를 상기 3개의 CM5 센서 칩 중 2개에 대해 하나의 유동체 상에 포함시켰다. 모든 연구를 위해 Biacore 2000 광학 바이오센서를 이용하였다.

[0466] 다음, pep-3을 mAb 고정된 바이오센서 표면을 통해 유동시켰다. pep-3의 초기 농도는 4.98 μM이었고, 이는 무작위로 3번의 주사에서 11개의 2배 연속 희석액이었다. 블랭크 주사를 2중으로 대조하기 위해 연속 주사를 통해 6번째 샘플마다 수행하였다.

[0467] 최종적으로, 바이오센서 데이터를 Scrubber를 이용하여 처리하고, 데이터를 이용하여 질량 수송을 위해 포함된 기간과 함께 1:1 상호 작용 모델을 가진 Clamp를 이용하여 그래프를 도시하였다. mAb 및 그의 친화도에 의존하는 일부 고농도 주사액(4.98-1.25μM)은 데이터가 1:1 상호 작용 모델과 일치하지 않았기 때문에 동력학 피팅으로부터 배제하였다. 이러한 오차는 pep-3의 고농도에서 발생하는 비-특이적 상호 작용에 의해 유발된 것으로 보인다. 모든 동력학 데이터는 1:1 상호 작용 모델에 피팅한다.

[0468] 실시예 32

[0469] L217Q-10.1 변이체 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0470] Pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)에 대한 mAb L217Q-10.1의 결합 동력학을 조사하였다. K_D 예상치는 92nM이었다. 그래프 피팅으로부터 유도된 다른 동력학 파라미터에 대한 예상치는 k_a가 $2.04*10^5$이고, k_d는 0.01885이었다.

[0471] 실시예 33

[0472] L217N-2.1 변이체 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0473] 실시예 32와 유사하게, Pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)에 대한 mAb L217N-2.1의 결합 동력학을 조사하였다. K_D 예상치는 1.85nM이었다. 그래프 피팅으로부터 유도된 다른 동력학 파라미터에 대한 예상치는 k_a가 $2.198*10^5$이고, k_d는 0.04069이었다.

[0474] 실시예 34

[0475] N35G-3.1 변이체 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0476] 실시예 32와 유사하게, Pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)에 대한 N35G-3.1의 결합 동력학을 조사하였다. K_D 예상치는 204nM이었다. 그래프 피팅으로부터 유도된 다른 동력학 파라미터에 대한 예상치는 k_a가 $1.497*10^5$이고, k_d는

0.03057이었다.

[0477] 실시예 35

[0478] 변이체 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0479] 실시예 32와 유사하게, Pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)에 대한 mAb L99H-9.2의 결합 동력학을 조사하였다. K_D 예상치는 395nM이었다. 그래프 피팅으로부터 유도된 다른 동력학 파라미터에 대한 예상치는 k_a가 83390이고, k_d는 0.03293이었다.

[0480] 실시예 36

[0481] 변이체 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0482] 실시예 32와 유사하게, Pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)에 대한 mAb Y172R-1.2의 결합 동력학을 조사하였다. K_D 예상치는 927nM이었다. 그래프 피팅으로부터 유도된 다른 동력학 파라미터에 대한 예상치는 k_a가 82237이고, k_d는 0.07622이었다.

[0483]

[0484] 실시예 37

[0485] 변이체 항체에 대한 결합 상수의 시험관내 결정

[0486] 실시예 32와 유사하게, Pep-3(EGFRvⅢ 에피토프)에 대한 mAb L99H-4.1의 결합 동력학을 조사하였다. K_D 예상치는 1.4 μM이었다. 동력학은 속도가 너무 높아 피팅할 수 없었기 때문에 K_D를 결정하기 위해 정상 상태(평형 상태) 결합 모델을 이용하여 MAb L99N-4.1를 피팅하였다.

[0487] 실시예 38

[0488] 13.1.2과 디자인된 변이체의 비교

[0489] 표 38.1에서 알 수 있는 바와 같이, 개선된 결합 특성을 가진 mAb를 전개하였다. 괄호 안에 95% 신뢰도 구간이 나타나 있다. L99T-5.3는 증가된 k_a, 감소된 k_d를 나타내어 전체적으로 K_D가 느렸다. mAb 13.1.2 및 L99T-5.3(95% 신뢰도 구간에서)에 대한 pep-3 결합의 평형 해리 상수 및 동력학 속도 상수에서의 유의적인 편차가 있더라도 통계적으로는 무시할만한 것인 반면에, L99T-5.3에 대한 pep-3 결합에 대한 친화도에서 여분의 증가에 대한 직관적인 편향이 있는 것으로 보인다. 더욱이, 동일한 바이오센서 칩이 사용되었을 때, L99T-5.3는 항상 13.1.2보다 더 큰 친화도를 갖는 것으로 보였다.

표 38.1

[0490]

MAb	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	K_D(nM)
13.1.2	$2.10(0.58)\times10^{5}$	0.016(0.003)	75(14)
L99T-5.3	$2.16(0.12)\times10^{5}$	0.013(0.001)	60(10)
L217Q-10.1	2.041×10^{5}	0.019	92
L217N-2.1	2.201×10^{5}	0.040	185
N35G-3.1	1.501×10^{5}	0.030	204
L99H-9.2	8.341×10^{4}	0.033	395
Y172042R-1.2	8.221×10^{4}	0.076	927
395L99N-4.1	ND	ND	1,400*

[0491] **모델을 선택하고 결합 친화도를 예상하기 위한 추가적인 도킹 모델 및 방법**

[0492] 다른 실시형태에 있어서, 주요 결합 잔기가 펩타이드에 포함되어 있다면, 상술한 실시예들은 길이가 6 아미노산인 펩타이드 보다는 다양한 길이의 펩타이드를 이용하여 실시할 수 있다. 예를 들면, 6 아미노산 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127) 대신에, 7 아미노산 펩타이드 EEKKGNY(서열번호:131)을 사용할 수 있다. 에피토프에 대한 임의 크기의 펩타이드가 사용될 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 다음과 같은 펩타이드로부터 선택된다: LEEKKGNYVVTDHC(서열번호: 56), LEEKKGNYVVTD(서열번호: 59), LEEKKGNYVVT(서열번호: 132), 및 EEKKGNYWT(서열번호: 57). 본 명세서에 기재되어 있는 짧은 단편에서 전장 펩타이드 또는 그의 변이체에 이르는 임의 크기의 펩타이드가 사용될 수 있다.

[0493] 당업자가 잘 이해하고 있는 바와 같이, 추가적인 아미노산의 존재는 펩타이드가 항체에 결합하는 방식을 변경할 수 있다. 추가적인 아미노산의 존재는 펩타이드 및 항체 사이에 형성될 선택적인 또한 추가적인 결합을 가능하게 할 뿐 아니라, 추가적인 아미노산은 항체와 펩타이드의 결합시 펩타이드의 구조 및 항체의 구조를 변화시킬 수 있다. 따라서, 일실시형태에 있어서, 에피토프 펩타이드, 예를 들면 EEKKGN(서열번호: 127) 및 EEKKGNY(서열번호:131)의 다양한 길이는 결합 특성 및 결합 적성을 위해 조사될 수 있다. 펩타이드의 보다 긴 단편은 펩타이드의 보다 긴 단편에 대한 펩타이드-항체 상호 작용의 정확한 서술을 제공할 뿐 아니라, 결합력 변화 및 결합에 관여된 잔기에 대한 조사는 얻어진 데이터로부터 외삽될 보다 긴 펩타이드에 대한 추가적인 정보를 가능하게 할 것이다.

[0494] 또한, 추측컨대 보다 긴 펩타이드 단편의 시험에 대한 보완으로, 추가적인 필터링 단계가 정교한 도킹 모델을 선택하기 위해 다양한 도킹 모델에 대해 수행될 수 있다. 추가적인 필터링 단계는 입수가능한 실험 데이터와 일치하는 모델을 찾기 위해 다양한 도킹 모델을 통해 필터링하도록 할 수 있다.

[0495] 일실시형태에 있어서, 상기 필터는 상기 펩타이드에서 각 아미노산에 대한 전산화 결합 에너지 프로필과 상관될 수 있는 미세-분해능 에피토프 매핑 데이터, 예를 들면 실험적으로 특성이 규명된 개별적인 잔기 결합 프로필을 기초로 한다. 결합 에너지 프로필은 특정 아미노산에 대한 펩타이드 내 각 아미노산의 결합 에너지의 할당으로, 상기 모델에서 각 아미노산의 결합 에너지 차원에서 펩타이드의 프로필을 만든다. 예를 들면, 하나의 도킹 모델에서, A는 -5의 결합 에너지를 갖고, B는 -20의 결합 에너지를 갖는 아미노산 A 및 B를 포함하는 펩타이드의 경우, A1(-5) 및 B2(-20)의 프로필을 가질 것이다. 이러한 프로필은 다른 도킹 모델을 선택하기 위한 필터로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 필터 또는 "주형"으로서 결합 에너지 프로필을 사용하면 후보 모델에서 펩타이드가 위치 A에 귀결되는 상대적으로 낮은 값을 갖고, 위치 B에 귀결되는 상대적으로 높은 값(보다 큰 음의 절대값이 높은 값)을 갖는 경우, 선택되는 다른 도킹 모델을 얻을 것이다. 또 다른 일실시형태에서, 상기 주형은 예를 들면 위치 B에서 값은 위치 A에서 값 보다 4배가 넘는다는 추가적인 한계를 필요로 한다.

[0496] 결합 에너지 프로필 주형을 다른 도킹 모델에서 펩타이드의 프로필과 다양한 방법으로 비교할 수 있다. 결합 에너지 프로필 주형이 소망하는 결합 에너지 프로필과 유사한 경우, 필터가 더 이상의 조사를 위한 바람직한 도킹 모델을 선택하기 위해 사용될 수 있다. 결합 에너지 프로필 주형이 소망하는 결합 에너지 프로필과 상이한 경우, 필터가 바람직하지 않은 도킹 모델을 제거하기 위해 사용될 수 있다. 일실시형태에 있어서, 상기 필터링 과정은 바람직한 결합 에너지와 바람직하지 않은 결합 에너지를 갖는 주형을 포함하며, 필터는 도킹 모델을 선택하고 배제하기 위해 사용된다. 당업자가 잘 이해하고 있는 바와 같이, 많은 가능한 서로 다른 결합 에너지 프로필이 있고, 따라서 많은 상이한 결합 에너지 프로필 주형이 상황에 따라 사용될 수 있다.

[0497] 일실시형태에 있어서, 펩타이드의 특정 위치에서 일련의 상대적으로 높은 결합 에너지를 갖는 주형으로서 결합 에너지 프로필 주형을 정의할 수 있다. 바람직한 일실시형태에 있어서, 결합 에너지 프로필 주형 및 상기 주형에 의해 선택되는 결합 에너지 프로필은 펩타이드 EEKKGNY(서열번호:131)의 2, 4 또는 6번 위치에서 상대적으로 높은 결합 에너지를 가질 것이다. 또 다른 일실시형태에 있어서, 상기 결합 에너지 프로필 주형은 펩타이드 EEKKGNY(서열번호:131)의 2, 4 및 6번 위치에서 상대적으로 높은 결합 에너지를 가질 것이다. 또 다른 일실시형태에 있어서, 상기 결합 에너지 프로필 주형은 펩타이드의 EEKKGNY(서열번호: 131)의 위치 3에 기인하는 상대적으로 낮은 결합 에너지를 가질 것이다. 이상, 상기 위치는 다음과 같이 할당된다: E1, E2, K3, K4 G5, N6, Y7.

[0498] 일실시형태에 있어서, 여과 과정은 먼저 K3 및 K4에서 결합 에너지의 비교를 포함한다. K3에 비해 K4에 대한 상대적으로 높은 결합 에너지를 갖는 도킹 모델이 선택되고, K3에 비해 K4에 대한 낮은 결합 에너지를 갖는 도킹 모델이 필터링된다. 따라서, "상대적으로 높은"은 K4에 대한 결합 에너지가 K3보다(보다 음의 수, 절대값은 더 큼) 더 크다는 것을 의미한다. 다음, 상기 도킹 모델을 재차 결합 에너지 프로필 주형을 통해 필터링하고,

이때 2, 4 및 6 위치에서 상대적으로 높은 에너지를 갖는 결합 모델이 선택되고, 다른 모델은 제거될 수 있다. 따라서, "상대적으로 높은"은 위치 2, 4 및 6에서 결합 에너지가 펩타이드에서 가장 낮은 결합 에너지보다 높다(보다 음의 수, 절대값은 더 큼)는 것을 의미한다. 따라서, 본 실시형태에 있어서, 결합 에너지 프로필 주형은 다음과 같이 요약될 수 있다: E1은 임의의 값일 수 있고, E2는 최저값보다 커야 하며, K3은 K4 미만이어야 하고, K4는 최저값보다 커야 하며, G5는 임의의 수일 수 있고, N6는 최저값보다 커야 하며, Y7은 임의의 값일 수 있다. 따라서, 하나 이상(또는 K3)이 E2, K4 및 N6 중 하나 이상 보다 낮은 경우 E1, G5 및 Y7은 임의의 값일 수 있다. 또 다른 일실시형태에 있어서, "상대적으로 높은"은 모델링 또는 실험을 통해 결정되는 표준값으로 고정될 수 있다. 일실시형태에 있어서, 상기 도킹 모델이 제 1 필터를 통과하는 것은 도킹 모델이 제 2 필터링 단계를 통과하는 것보다 더 중요하다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 상기 2단계를 순차적으로 수행할 필요가 없고 동시에 수행될 수 있다.

[0499] 추가적으로, 이들 필터링을 위한 프로필 주형은 펩타이드, 항체 및 결합 조건에 따라 다양할 것이다. 본 기재내용에 주어진 바에 따라, 특히 실시예 14를 참조로 하면, 당업자는 적절한 결합 에너지 프로필 주형을 결정할 수 있다. 예를 들면, 표 14.1에 나타낸 바와 같이 131 및 13.1.2 항체에서 펩타이드 결합에 대한 몇 개의 가능성 있는 중요한 잔기가 있다. 131mAb에서, E2, K4, N6 및 Y7위치는 시험된 특정 펩타이드에 대해 중요하고, 13.1.2 mAb에서, E1, E2, K4, G5 및 N6는 시험된 특정 펩타이드에 대해 중요하다. 중요한 잔기는 결합 에너지 프로필 주형의 제작에 관련된 잔기일 수 있다. 하기에서 명백한 바와 같이, 실시예 39에서 결합 에너지 프로필 주형은 실시예 14의 분석에 의해 제안된 것과는 상이한 것으로 보인다. 실시예 39는 보다 많은 모델이 스크리닝 단계를 통과하도록 하는 주형이 덜 까다로운 형태이다. 스크리닝 단계를 통과하도록 하는 모델의 수를 감소시키기를 원하는 경우, E1 및 G5에 대한 요건을 더 추가할 수 있다.

[0500] 하기 실시예는 보다 긴 펩타이드의 사용, 상술한 결과를 어떻게 변경시킬 수 있는지, 이러한 변화가 무엇을 의미하는지를 설명하고 있을 뿐 아니라 특정 도킹 모델을 선택하기 위한 상기 필터 중 하나의 사용을 설명하고 있다.

[0501] 실시예 39

[0502] 7 아미노산 펩타이드에 대한 에피토프-항체 도킹 모델

[0503] 본 실시예는 13.1.2 구조 모델의 CDR 영역에 결합되는 7-잔기 펩타이드에 대한 도킹 모델 세트의 제작을 설명한다. 추가적으로, 본 실시예는 또 다른 도킹 모델에 대해 하나의 도킹 모델을 선택하기 위한 방법을 설명한다.

[0504] 먼저, 7-잔기 펩타이드 EEKKGNY(서열번호:131)에 대한 구조적 모델을 InsightII 모델링 패키지에서 Discover_3 모듈을 사용하여 감소된 연장된 형태 및 에너지로 제작하였다. 다음, 펩타이드 구조를 결합 부위에 손을 사용하여 넣어 초기 회합체를 형성하였다. 이후, InsightII에서 도킹 모델에서 이완된 에너지 구속(constraint)을 갖는 병진(translational) 및 회전 공간에서 Monte Carlo 검색을 자동으로 수행하였다. 도킹 과정 중에, 다른 항체 잔기를 고정시키는 동안 결합 홈의 5 옹스트롬 내 잔기를 이동시키도록 하였다. 상기 펩타이드는 초기 위치의 5 옹스트롬 내에 구속되어 있다. Monte Carlo 검색에 의해 발견된 그럴듯한 배열은 모의 어닐링 및 에너지 최소화에 의해 최종 복합체 구조 모델에 이르도록 함으로써 달성되었다. 전체 63개의 도킹 모델이 얻어졌다.

[0505] 각 도킹 모델에 대해, 펩타이드 내 항체 및 개별작인 잔기 사이의 상호 작용 에너지를 Discover 3을 이용하여 계산하였다. 에피토프-항체 결합에 있어 개별적인 잔기 기여도의 프로필을 검사하여 미세-분해능 에피토프 매핑 데이터, 즉 "결합 에너지 프로필 주형" 과 일치하는 도킹 모델을 선택한다. 63 도킹 모델 중 19개가 이 검사를 통과하였다. 전형적인 개별적 잔기 결합 에너지 프로필이 표 39.1에 기재되어 있다. 실시예 14에서 에피토프 매핑 데이터와 일치하여, K4에 대한 결합 에너지가 특별히 크며, N6 및 E2에 대한 결합 에너지가 크다. 이러한 결합 에너지 프로필 주형은 K4가 K3보다 크다는 사실을 특별히 강조한다. 또한 이러한 결합 에너지 프로필 주형은 E2, K4 및 N6가 상대적으로 큰 요건을 강조한다. 환원하면, E2, K4 및 N6의 결합 에너지는 펩타이드에서 가장 낮은 결합 에너지(최소 음의 값 또는 가장 작은 절대값)가 아니다.

[0506] 표 39.1. 항체 13.1.2에 대한 7-잔기 펩타이드 내 개별적인 잔기에 대한 결합 에너지 프로필은 실시예 14에 기재되어 있는 에피토프 매핑 데이터와 일치한다.

E1	E2	K3	K4	G5	N6	Y7	합계
-10.97	-19.34	-13.46	-24.26	-10.1	-18.19	15.15	-111.45

[0507]

[0508] 결합 에너지 프로필을 토대로 필터를 통과한 19개 모듈에 대해, 에피토프-항체 결합 에너지학 모의 실험을 친화도 데이터(Tyr172Arg, 실시예 36; Leu2, 17Asn, 실시예 33; Leu217Gln, 실시예 32; Asn35Gly, 실시예 34; Leu99Asn, 실시예 37; Leu99His, 실시예 35; 및 Leu99Thr, 실시예 31)를 가진 7개의 돌연변이체 각각에 대해 수행하였다. 이러한 복합체에서 정전기 상호 작용의 범위가 대략화되어야 하기 때문에, 일련의 계산에서 다수의 상이한 유전상수가 사용되었다. 측쇄 변화에 의해 유도되는 국소 형태 변화를 설명하기 위해 잔기 치환한 후 30-100 단계의 에너지 최소화를 이용하여 돌연변이를 수행하였다. 각 도킹 모델에 대해, 7-잔기 펩타이드 및 전체 항체 사이의 상호 작용 에너지를 선택된 파라미터에 대한 각 돌연변이체에 대해 계산하였다. 8개 결합 에너지의 각 세트에 대해(7개 돌연변이체과 야생형), 선형 피팅 과정을 K_d의 로그함수와 비교하여 결합 데이터 각 세트에 대해 수행하였다. 각 선형 피팅에 대해 상관 계수를 계산하였다. 가장 좋은 상관 관계는 유전 상수 1*r 및 에너지 최소화 50 단계를 가진, 표 39.1에 기재되어 있는 데이터를 가진 하나의 모델에서 얻어졌다. 이 모델에 대한 에피토프-항체 결합 에너지는 표 39.2에 기재되어 있다. 상관 계수는 모든 데이터를 이용하면 0.80이었다. Leu99Asn에 대한 K_D는 고정확도로 측정하지 않았기 때문에(실시예 37 참조), Leu99Asn에 대한 데이터를 배제하여 별도의 선형 피팅을 수행하였다. 도 14에 나타낸 바와 같이, 0.91의 높은 상관 계수가 얻어졌다. 따라서, 상기 선택된 모델에 의해 정교한 도킹 모델이 표시된다. 공간-채워진 펩타이드를 가진 모델이 도 15에 나타나 있으며, 수소 결합이 도 16에 나타나 있다. 도 16에서 L3 150은 하단부이고, H3 160은 상단부이다. H2 140은 펩타이드 결합 영역의 오른쪽이다. 펩타이드 자체는 밝은 음영으로 페이지의 상부에 위치한 E1을 가진 결합 부위에 위치되며, K3, K4, G5, N6 및 Y7을 통해 아래로 점차 음영 처리된다. 수소 결합을 수반하는 상기 항체 잔기는 도 16에 나타나 있다. 상기 실시예로부터 얻어진 모델을 통해 7개의 수소 결합이 있음을 알 수 있다: K4... Q95, K4...Q95, N6... Q98, G5...H31, Y7...H31, 및 Y7...W165.

표 39.2.

에피토프-항체 결합 에너지학 모의 실험, K_d의 로그 함수와 비교

돌연변이종	쿨롱	vdw	합계	Ln(Kd)
172Arg	-19.103	-27.962	-47.065	-13.891
217Asn	-19.003	-28.715	-47.718	-15.503
217Gln	-18.977	-28.73	-47.707	-16.201
35Gly	-19.095	-28.431	-47.526	-15.405
99Asn	-18.719	-28.778	-47.497	(-13.497)
99His	-18.837	-28.719	-47.556	-14.744
99Thr	-19.155	-28.704	-47.859	-16.475
WT	-18.981	-28.728	-47.708	-16.269

[0509]

[0510] 실시예 39에서 선택된 모델(도 15에 표시되어 있는 모델)로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 도킹 모델은 뜻밖의 몇몇 결과를 보여주었다. 하나의 흥미있는 결과는 잔기 E2, K4 및 N6가 전체적으로 펩타이드의 결합에 있어 중요한 잔기이지만, 이들 모든 아미노산이 항체와 H-결합을 형성하는데 수반되는 것으로 모델화되지는 않는다는 것이다. K4는 2개의 H-결합 형성에 Q95와 함께 관여하는 것으로 보이는데, 이는 결합 에너지 프로필과 프로필 주형에서 K4의 중요성과 부합한다. 또한, N6는 Q98에 결합하도록 모델화되는 것으로 보이지만; 이러한 특정 모델에서 E2는 상기 모델에서 H-결합을 형성하는 것으로 보이지 않는다. 부합하는 한가지 흥미로운 점은 상기 결합 에너지 프로필 주형으로부터 중요한 잔기 각각(예를 들면, E2, K4 및 N6)은 대부분 매립되어 있어 항체 결합 홈과 근접 접촉한다는 것이다. 따라서, 상기 도킹 모델 선택은 이들 주요 잔기가 항체와 긴밀하게 상호 작용하기 때문에 중요하다는 사실을 설명할 수 있다. 또한, E1은 W214와 수소 결합에 관여할 수 있다.

[0511] 실시예 39는 또한 상기 기재된 방법이 결합 에너지 및 K_D 사이에 강한 상관 관계가 있음을 나타내며, 이는 상기 방법에 의해 만들어진 모델이 또한 최적화를 가능하게 하거나 항체-펩타이드 복합체의 K_D를 최소한 예측을 가능하게 할 것이다.

[0512] 실시예 39 및 실시예 19의 비교로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 2개의 모델 사이에 중요한 몇 개의 잔기가 있고, 7개 아미노산 도킹 모델에서만 나타나는 몇 개의 잔기 뿐 아니라 7 아미노산 도킹 모델에서 중요하지 않은 것으로 보이는 몇 개의 잔기가 있다. 예를 들면, 상기 7 펩타이드 에피토프는 K4... Q95, K4... Q95, N6... Q98, G5...H31, Y7...H31, 및 Y7...W165 사이에 H 결합을 형성하는 것으로 보인다. 한편, 6 펩타이드 에피토프는 E2...Y172, K3...H31, K4... H31, N6... D33, N6... Y37 및 N6... K55 사이에 H 결합을 형성하는 것으로 보인다. 상기 데이터로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 6 및 7 아미노산 펩타이드 모델은 H31의 중요성을 강조하며, 상기 2개의 모델은 펩타이드와 함께 2개의 수소 결합을 형성하는 H31을 포함한다. 2개의 데이터 세트 사이에 다른 가능성 있는 점이 있는 반면, 또한 다수의 결합 상호 작용은 6 아미노산 모델로부터 7 아미노산 모델로 변한 것으로 보이기도 한다. 그러나, 상기 실시예들은 에피토프 크기에 따른 변화는 상기 모델들을 이용하여 검출될 수 있어 짧은 에피토프 펩타이드로부터 긴 에피토프 펩타이드로 크기를 증가시키는 것은 본 발명의 기재 내용에 비추어 문제가 되지 않음을 설명하고 있다. 다양한 결합 모델에서 일관성있게 중요성을 설명하고 있는 아미노산의 존재는 다양한 상호 작용의 중요성을 왜곡되도록 할 수 있어 짧은 펩타이드 모델은 긴 펩타이드 상호 작용이 보다 대표적일 수 있다.

[0513] 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 6 아미노산 펩타이드 EEKKGN(서열번호: 127)에 관한 상기 논의 내용 또는 실시예들 중 일부는 또한 7 아미노산 펩타이드 EEKKGNY(서열번호:131) 또는 보다 긴 펩타이드에 적용할 수 있다. 예를 들면, 실시예 20은 부위-지향 돌연변이 유발에 의해 친화도-개량된 항체에 대한 합리적 디자인에 대한 실시예 39로부터 얻은 정보를 이용하여 반복될 수 있다. 더 나아가, 실시예 21은 실시예 39의 결과를 이용하여 실시예 20으로부터 유도된 새로운 일부 항체를 시험하기 위해 부위-지향 돌연변이 유발에 의해 친화도-개량된 항체에 대한 합리적 디자인의 시도 후에 반복될 수 있다.

[0514] 일실시형태에 있어서, 실시예 39의 결과는 항체와 펩타이드 사이의 상호 작용 영역을 재정의하기 위해 사용된다. 예를 들면, EEKKGNY(서열번호: 131)에 대한 파라토프는 펩타이드, 예를 들면 잔기 95와 상호 작용하는 것으로 예상되는 항체 상의 다른 잔기를 포함하는 것으로 정의될 수 있다. 이와 달리, 실시예 19에서와 같이, 상기 파라토프는 도킹된 펩타이드의 5 옹스트롬 내 모든 잔기로서 정의될 수 있다.

[0515] **상이한 단백질에서 인 실리코 친화도 증진**

[0516] 다수의 상이한 연구에서 시험관내 항체 친화도 증진이 성공적으로 수행되었다. 전형적으로, 무작위 돌연변이체 라이브러리는 분자 생물학 방법에 의해 구축될 필요가 있으며, 선택/스크리닝 분석은 양호한 결합능을 갖닌 클론을 풍부하게 하기 위해 개발될 필요가 있다. 이후, 선택된 변이체는 친화도를 결정하기 위해 정제될 필요가 있다. 이러한 과정은 일련의 길고 힘든 실험을 필요로 한다. 하기 실시예는 항체-항원 복합 구조만을 활용하는 인 실리코 선택을 통해 친화도 증진을 정확하게 예측할 수 있음을 설명한다.

[0517] 실시예 40

[0518] 항체-항원 결합 에너지학 모의 실험을 통한 인 실리코 친화도 증진

[0519] 본 실시예는 인 실리코 항체-항원 결합 에너지학 모의 실험은 친화도 증진을 위해 사용될 수 있음을 설명한다. 특히, 본 실시예는 VEGF(혈관 상피 성장 인자)에 대한 Fab-12(rhuMAb VEGF로서 알려진 IgG 형태)의 결합 동력학은 상기 인 실리코 과정을 통해 예측될 수 있음을 설명한다.

[0520] 사용된 VEGF-Fab 복합체의결정 구조는 2.4옹스트롬의 분해능으로 등록 번호 1BJ1로 PDB 데이터베이스에 위치해 있다. 항-VEGF Fab의 일련의 돌연변이체에 대한 공지된 실험 친화도 데이터를 사용하여 상기 개념을 시험하였다. VEGF-Fab 구조의 3-D 좌표를 이용하여 다음과 같은 돌연변이체에 대한 인 실리코 돌연변이를 수행하였다: H97Y, S100aT, T28D, 28D31H, 28D31H97Y100aT, N31H, Y53W, 71I73K, 71V73V. 이러한 친화도 데이터는 Chen, Y et al.,(J Mol Biol. , 293(4): 865-81(1999))의 논문으로부터 얻었다.

[0521] 실시예 39에 기재된 바와 같이, 에너지학 모의 실험을 다양한 VEGF-Fab 돌연변이체 사이에서 수행하였다. 얻어진 결과를 표 40.1에 나열하였다. 상기 실시예로부터 얻은 결과는 상기 과정을 통해 결합 에너지와 친화도 순위 사이의 유의적인 상관 관계가 얻어졌다. 결합 에너지 대 상대 친화도의 로그함수의 선형 피팅이 도 17에 도시되어 있다. -0.91의 상관 계수는 인 실리코 모의 실험이 원자 수준에서 상세한 상호 작용을 정확하게 포착하고 있음을 의미한다.

표 40.1. 친화도 데이터와 비교한 항체-항원 결합 에너지 모의 실험

[0522]

Kabat 번호	서열번호	상대적 친화도	Ln(상대적 친화도)	결합에너지
H97Y	101Y	14	2.639	-59.065
S100aT	105T	1.9	0.642	-57.465
T28D	28D	1.4	0.336	-57.647
28D31H	28D31H	3.1	1.131	-57.699
28D31H97Y100aT	28D31H101Y105T	20	2.996	-59.518
N31H	31H	3.6	1.281	-57.724
Y53W	54W	1.3	0.262	-57.504
71I73K	72I74K	0.9	-0.105	-57.158
71V73V	72V74V	0.3	-1.204	-57.314
WT	WT	1	0.000	-57.404

[0523] 상기 실시예들로부터 명백한 바와 같이, 시험관내 실험을 이용하지 않고도 높은 친화도 돌연변이체를 동정하기 위해 모의 실험을 이용할 수 있다. 추가로, 이러한 접근법은 상이한 항체 및 상이한 펩타이드에 대해 유용하다는 것은 분명하다. 이러한 방법은 고해상도 항체-항원 복합체 구조만을 사용하여 인 실리코 친화도 증진를 수행하기 위해 일반적으로 적용될 수 있다. 일실시형태에 있어서, 인 실리코 친화도 증진을 사용하면 상당한 시간 및 자원을 절약할 수 있을 것이다.

[0524] 실시예 41

[0525] 항체의 표준형 결정

[0526] Chothia 등은 각 면역 글로불린 사슬의 초가변(hypervariable) 영역에 대해 "표준형"의 관점에서 항체 구조를 기술하였다(J. Mol. Biol. 1987 Aug20; 196(4): 901-17). 다양한 면역 글로불린의 Fab 및 VL 단편의 원자 구조를 분석하여 아미노산 서열과 이들의 항원 결합 부위의 3차원 구조 사이의 관계를 결정하였다. Chothia 등은 패킹, 수소 결합 또는 특수한 phi, psi 또는 omega 형태를 추정하는 능력을 통해 초가변 영역의 주쇄 형태를 주로 담당하는 상대적으로 소소인 잔기가 있음을 발견하였다. 이러한 잔기들은 초가변 영역내 부위 및 보존된 베타-시트 골격에서 발생하는 것으로 밝혀졌다. 미지의 구조를 갖는 면역 글로불린의 서열을 조사함으로써, Chothia 등은 많은 면역 글로불린이 공지된 구조 중 하나와 유사한 크기를 가지며 또한 관찰된 형태를 담당하는 부위에서 동일한 잔기를 함유하는 초가변 영역을 갖고 있음을 보여주고 있다.

[0527] 이러한 발견은 초가변 영역은 공지된 구조의 영역과 유사한 형태를 가짐을 의미한다. 초가변 영역 중 5개에 대해, 형태의 레퍼토리는 상대적으로 소수인 불연속 구조 유형으로 한정되는 것으로 보였다. 초가변 영역의 주쇄 형태를 통상 구성하는 구조를 "표준형 구조"로 명명하였다. 또한 Chothia의 논문(Nature. 1989 Dec 21-28; 342(6252): 877-83) 및 다른 논문(Martin, et al. J Mol Biol. 1996 Nov 15; 263(5): 800-15)은 항체의 6개의 초가변 영역 중 최소 5개에 대한 주쇄 형태의 소수 레퍼토리가 있음을 확인하였다.

[0528] 상술한 항체 중 일부를 분석하여 항체의 상보성 결정 영역(CDR)의 각각에 대한 표준형을 결정하였다. 알려진 바와 같이, 표준형은 단지 항체 경쇄의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 따라 항체 중쇄의 CDR1 및 CDR2에 대해 할당되어 왔다. 이러한 분석의 결과가 하기 표 41.1에 요약되어 있다. 표준형 데이터는 *HCDR1-HCDR2-LCDR1-LCDR2-LCDR3의 형태로서, "HCDR"은 중쇄 CDR을 나타내고, "LCDR"은 경쇄 CDR을 나타낸다. 따라서, 예를 들면 1-3-2-1-5의 표준형은 표준형 1에 해당하는 HCDR1, 표준형 3에 해당하는 HCDR2, 표준형 2에 해당하는 LCDR1, 표준형 1에 해당하는 LCDR2 및 표준형 5에 해당하는 LCDR3을 갖는 항체를 의미한다.

표 41.1

[0529]

Mab	H1-H2-L1-L2-L3
139	1-3-2-1-1
250	1-3-2-1-1
123	1-3-4-1-1
131	1-3-4-1-1
13.1.2	1-3-4-1-1
211	1-3-4-1-1
318	1-3-4-1-1
333	1-3-4-1-1
342	1-3-4-1-1
95	3-1-4-1-1
150	3-Y-4-1-1
170	3-Y-4-1-1

[0530] 길이 요건을 만족하고 표준형으로 정의되는 주요 잔기를 매칭시킨다면, 각 CDR(H3 제외)을 표준형 구조에 할당하였다. 각 항체에 대해 정의되어 있는 아미노산은 예를 들면 상술한 Chothia 등의 논문에서 찾을 수 있다.

[0531] **균등론**

[0532] 이상, 상세한 설명과 실시예는 본 발명의 일부 바람직한 실시형태를 상세히 설명하며, 본 발명자가 고려하고 있는 최선의 형태를 기재하고 있다. 그러나, 비록 상세하게 기재되어 있더라도, 본 발명은 다양한 방법으로 실시될 수 있으며, 본 발명은 후술하는 청구범위 및 이들의 균등론에 따라 해석되어야 한다.

도면

도면1

```
EGFR wt    1   LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE 60
EGFRvIII   1   LEEKK------------------------------------------------------- 1

EGFR wt   61   VAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL 120
EGFRvIII   1   ------------------------------------------------------------ 1

EGFR wt  121   HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGE 180
EGFRvIII   1   ------------------------------------------------------------ 1

EGFR wt  181   ENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTC 240
EGFRvIII   1   ------------------------------------------------------------ 1

EGFR wt  241   PPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVR 300
EGFRvIII   1   ---------------------------------GNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVR 33

EGFR wt  301   KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHT 360
EGFRvIII  34   KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHT 93

EGFR wt  361   PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN 420
EGFRvIII  94   PPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN 153

EGFR wt  421   ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ 480
EGFRvIII 154   ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ 213

EGFR wt  481   VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP 540
EGFRvIII 214   VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP 273

EGFR wt  541   QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC 600
EGFRvIII 274   QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC 333

EGFR wt  601   TYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTLRRLLQ 660
EGFRvIII 334   TYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTLRRLLQ 393

EGFR wt  661   ERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAI 720
EGFRvIII 394   ERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAI 453

EGFR wt  721   KELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVRE 780
EGFRvIII 454   KELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVRE 513

EGFR wt  781   HKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGA 840
EGFRvIII 514   HKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGA 573

EGFR wt  841   EEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEIS 900
EGFRvIII 574   EEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEIS 633

EGFR wt  901   SILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGD 960
EGFRvIII 634   SILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGD 693

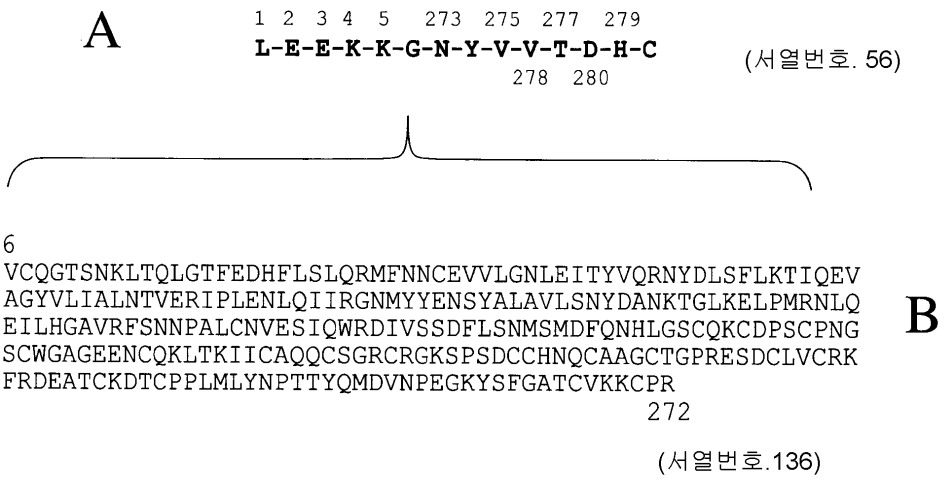
EGFR wt  961   ERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNN 1020
EGFRvIII 694   ERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNN 753

EGFR wt  1021  STVACIDRNGLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGS 1080
EGFRvIII 754   STVACIDRNGLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGS 813

EGFR wt  1081  VQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSHQ 1140
EGFRvIII 814   VQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSHQ 873

EGFR wt  1141  ISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA 1186 ( 서열 번호 :134)
EGFRvIII 874   ISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA 919  ( 서열 번호 :135)
```

도면2


A
1 2 3 4 5 273 275 277 279
L-E-E-K-K-G-N-Y-V-V-T-D-H-C
278 280
(서열번호. 56)
6
VCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEV
AGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQ
EILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNG
SCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRK
FRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPR
272
B
(서열번호.136)

도면3a

XenoMax 유도 인간 항-EGFRvIII 항체 뉴클레오티드 및 아미노산 서열

095

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGT
CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCT
GGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTCATCTATTACAGA
GGGAACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTTGACACG
TCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTG
TATTACTGTGCGCGAGACGGATATTGTAGTAGAACCGGCTGCTATGGCGGCTGGTTC
GACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACGTCTCCT**3'** (서열 번호:35)

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLQESGPFLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGFIYYRGNTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGYCSRTGCYGGWFDPWGQ
GTLVTVSP (서열 번호:7)

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCATACACACTGATGGAAACATCTATTT
GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGATTTC
TAATCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTT
CACACTGAAGATCAGCAGGGTGGAAGCTGAGGATGTGGGGGTTTATTACTGCATGC
AAGGTACACAATTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA**3'**
(서열 번호:34)

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLIHTDGNIYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTQFPITFGQGTRLEIK (서열 번호:23)

도면3b

123k/124g

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATGTCATATGATGGAAGT
AAAGAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCTAGAGACAATTC
CGAGAACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTAT
ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTAGTAGTCGTAGCTGCTATAAGTACTACTACT
ACGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA**3'**(서열 번호:37)

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
KEDYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSEGYCSSRSCYKYYYYG
MDVWGQGTTVTVSS (서열 번호:13)

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'ATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC
TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGAAATGGAAACAACTATTTG
GATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCT
AATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCGGGCACAGATTTT
ACACTGAACATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGCATTATTACTGCATGCA
GGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA**3'**
(서열 번호:36)

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDVGHYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK
(서열 번호:29)

도면3c

131

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGAAACTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGT
GATAAATACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGATGGCTACGATATTTTGACTGGTAATCCTAGGGACTTTGACTA
CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (서열 번호: 39)

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGS
DKYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRDFDYW
GQGTLVTVSS (서열 번호 : 2)

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GATACTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACATGTAACCCTTGGACAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTACTT
GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAACCTCCAAGACTCCTAATTTATAGGATTTC
TAGGCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATT
TCACACTGGAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATG
CAATCTACACACGTTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA3'
(서열 번호 : 38)

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DTVMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRRFS
GVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQSTHVPRTFGQGTKVEIK
(서열 번호 : 19)

도면3d

139

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GAGGTGCAGGTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCGGCTATTAGTGGTAGTGGTGGT
AGTACAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTCT
ATTACTGTGCTGGGAGCAGTGGCTGGTCCGAGTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
ACCGTCTCCTCG**3' (** 서열 번호 **:41)**

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST
NYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGTLVTVS
S **(** 서열 번호 **:10)**

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCACTTGCCGGGCTAGTCAGGGCATTAGAAATAATTTAGCCTGGTATCAGCA
GAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCCTCCAATTTGCAAAGTG
GGGTCCCATCAAGGTTCACCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCATAGTCA
GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCGACTTATTACTGTCTACAGCATCACAGTTACC
CGCTCACTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA**3' (** 서열 번호 **:40)**

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNNLAWYQQKPGKAPKRLIYAASNLQSGVPS
RFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIK **(** 서열 번호 **:25)**

도면3e

150

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCTACAGTTCTGCTTGGAACT
GGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGGCATATCACAGG
TCCAGGTGGTATTACGAGTATGCAGTATCGGTGAAAAGTCGAATAAACATCACCCC
AGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGCAGTCGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
GGTCACCGTCTCCTCA**3' (** 서열 번호 **:43)**

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSYSSAWNWIRQSPSRGLEWLGRAYHRSRW
YYEYAVSVKSRINITPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGSRFDYWGQGTLVTVSS
(서열 번호 **:5)**

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGGGATGGAAATACCTACTT
GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGATTTC
TAACCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATT
TCACACTGAAAATTAGCAGGGTGGAAGCTGAGGATGTCGGGATTTATTTCTGCATGC
ATACTACACAATTTCCTTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAGGGTGGAAATCAAA**3'**
(서열 번호 **:42)**

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHRDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFS
GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGIYFCMHTTQFPWTFGQGTRVEIK (서열 번호
:21)

도면3f

170

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAATGCTGCTTGGAACT
GGATCAGGCAGTCCCCAGCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGG
TCCAAGTGGTATAATGATTATGTAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCA
GACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACG
GCTGTGTATTACTGTGTAAGAGGCAGTCGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCCTCA**3' (** 서열 번호 **:45)**

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNNAAWNWIRQSPARGLEWLGRTYYRSK
WYNDYVVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCVRATAFDYWGQGTLVTV
SS **(** 서열 번호 **:4)**

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GCTATTGTGTTGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTTCACAGGGATGGAAACACCTACTT
GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGATTTC
TAACCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATT
TCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAACCTGACGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGC
ATACTACACAACTTCCTTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA**3'**
(서열 번호 **:44)**

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

AIVLTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHRDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEPDDVGVYYCMHTTQLPWTFGQGTKVEIK **(** 서열 번호
:20)

도면3g

211

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGACATCATATGATGGAAGT
AAAAAAGACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT
ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTAGTAGTAGTAGCTGCTATAAGTACTACTATT
ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCA**3'** (서열 번호
:47)

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGSK
KDYADSAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSEGYCSSSSCYKYYYYGM
DVWGQGTTVTVSS **(** 서열 번호 **:12)**

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATATAGAAATGGAAACAACTATTT
GGATTGGTATCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACAACTCCTGATCTATTTGGGTTC
TAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTT
TACATTGAAAATCGGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCA
GGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA**3'**
(서열 번호 **:46)**

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK **(**서열 번호
:28)

도면3h

250

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GAGGGGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTACAGCCTGGGGAGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCGGCTATTAGTGGTAGTGGTGGT
AGCACAAATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTAT
ATTACTGTGCTGGGAGCAGTGGCTGGTCCGAGTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
ACCGTCTCCTCA3' (서열 번호 :49)

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

EGQLLESGGGWVQPGESLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST
NYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQVNSLRVEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGTLVTVSS
(서열 번호 :9)

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGCGT
CACCATCACTTGCCGGACAAGTCAGGGCATTAGAAAAAATTTAGGCTGGTATCAGC
AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTACAAAGT
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATC
CGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTCCAGCATCATAGTTAC
CCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGAGATCAGA3' (서열 번호 :48)

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDSVTITCRTSQGIRKNLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISRLQPEDFATYYCLQHHSYPLTFGGGTRVEIR (서열 번호 :26)

도면3i

318

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGACATCATATGATGGAAGT
AAAAAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT
ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTGATAGTAGTAGCTGCTATAAGTACTACTACT
ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCA3' (서열 번호
:51)

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGSK
KDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSEGYCDSSSCYKYYYYG
MDVWGQGTTVTVSS (서열 번호 :15)

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATATAGAAATGGAAACAACTATTT
GGATTGGTATCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACAACTCCTGATCTATTTGGGTTC
TAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTT
TACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC
AGGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA3'
(서열 번호 :50)

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK (서열 번호
:33)

도면3j

333

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCTAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGACATCATATGATGGAAGT
AAAAAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT
ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTGATAGTACTAGTTGCTATAAGTACTACTACT
ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCA**3'** **(**서열 번호
:53)

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTLSSYGMHWVRQALGKGLEWVAVTSYDGSK
KDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSEGYCDSTSCYKYYYYG
MDVWGQGTTVTVSS **(** 서열 번호 **:17)**

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATATAGAAATGGAAACAACTATTT
GGATTGGTATCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACAACTCCTGATCTATTTGGGTTC
TAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTT
TACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC
AGGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA**3'**
(서열 번호 **:52)**

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK **(** 서열 번호
:32)

도면3k

342

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGACATCATATGATGGAAGT
AAAAAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT
ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTGATAGTACTAGCTGCTATAAGTACTACTACT
ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCA**3'** (서열 번호
:55)

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGSK
KDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSEGYCDSTSCYKYYYYG
MDVWGQGTTVTVSS **(** 서열 번호 **:16)**

경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATATAGAAATGGAAACAACTATTT
GGATTGGTATCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACAACTCCTGATCTATTTGGGTTC
TAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTT
TACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC
AGGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA**3'**
(서열 번호 **:54)**

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK (서열 번호
:31)

도면31

13.1.2

중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT
CACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATG
ATGGAAGTAATAAATACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCG
ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT
TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCT
CTAGCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA (서열 번호 : 137)

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYY
VDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCARDGWQQLAPFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGV (서열 번호 : 138)

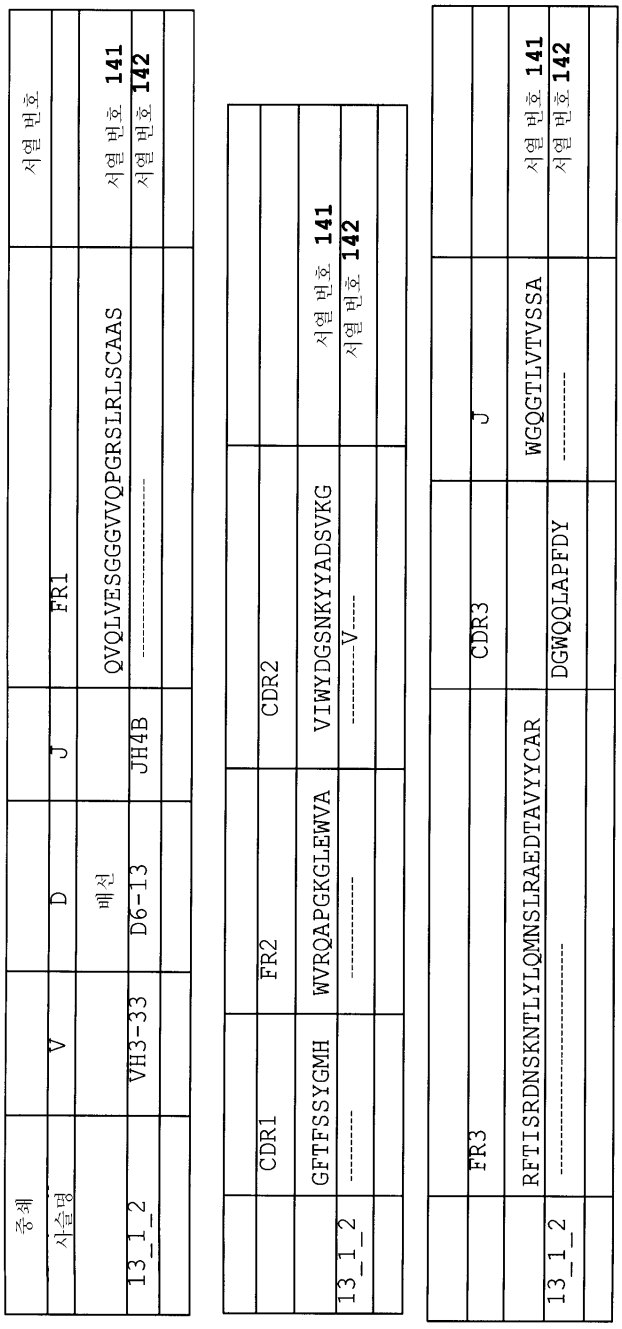
경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCA
CCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCA
AAGCCTCGTGCATAGTGATGGAAACACCTACTTGAGTTGG
CTTCACCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTT
ATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATT
CAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGCTTTCACACTGAAAATC
AGCAGGGTGGAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCA
TGCAAGCTACACAACTTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGAC
CAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCGGGTAACTCCCAGG (서열 번호 : 139)

경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLV
HSDGNTYLSWLHQRPGQPPRLLIYKISNRF
SGVPDRFSGSGAGTAFTLKISRVEAEDVGV
YYCMQATQLPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQ (서열 번호 : 140)

도면4

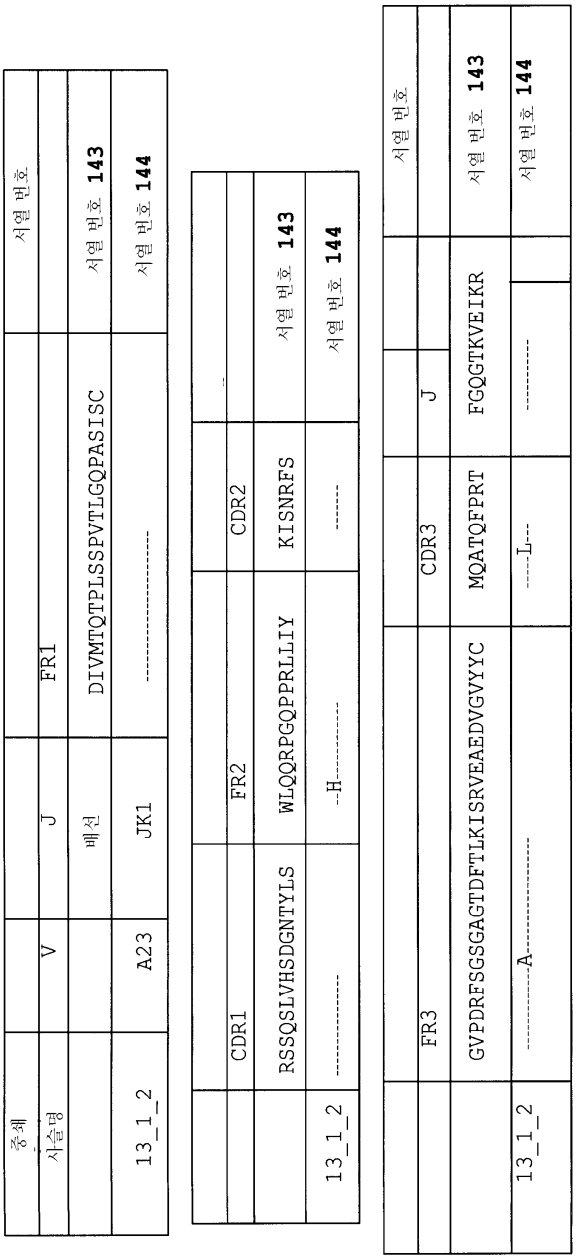


중쇄	V		D	J	FR1	서열 번호
사슬명	V		D	J		
			베선		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	서열 번호 **141**
13_1_2	VH3-33		D6-13	JH4B	----------	서열 번호 **142**

	CDR1	FR2	CDR2	
	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYDGSNKYYADSVKG	서열 번호 **141**
13_1_2	---------	----------	---------V----	서열 번호 **142**

	FR3	CDR3	J	
	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		WGQGTLVTVSSA	서열 번호 **141**
13_1_2	----------	DGWQQLAPFDY	----------	서열 번호 **142**

도면5



종쇄			서열 번호
사슬명	V	J	
		배선	서열 번호 **143**
13_1_2	A23	JK1	서열 번호 **144**

	CDR1	FR2	CDR2	-	
	RSSQSLVHSDGNTYLS	WLQQRPGQPPRLLIY	KISNRFS	서열 번호 **143**	
13_1_2	----------	--H----------	------	서열 번호 **144**	

				서열 번호	
	FR3	CDR3	J		
	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQATQFPRT	FGQGTKVEIKR	서열 번호 **143**	
13_1_2	----------A----------	----L---	----------	서열 번호 **144**	

웰	단일 세포	V Heavy/D/J	FR1	CDR1	FR2	서열 번호
-	-	Germline	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	1
174F1	131	VH-33/D3-9/JH4b	----------S----------R	N----	----------	2
-	-	Germline	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVS	SNSAAWN	WIRQSPSRGLEWLG	3
125D10	170	VH6-01/D2-21/JH4b	----------	--N----	------A-------	4
182D5	150		----------	-Y-S---	----------	5
-	-	Germline	QVQLQESGPFLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS	SGGYYWS	WIRQHPGKGLEWIG	6
172B12	095	VH4-31/D4/JH5b	----------	-------	----------	7
-	-	Germline	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	8
138D2	250	VH3-23/D6-19/JH5b	-G--------W----E----------	-----	----------	9
182A5	139		---V----------	-----	----------	10
-	-	Germline	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	11
190D7	211	VH3-30/D2-15/JH6b	----------V-----L-	-----	----------	12
129A7	124		----------L-	-----	----------	13
-	-	Germline	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	14
141A10	318	VH3-30/D2-2/JH6b	----------V-----L-	-----	----------	15
124D4	342		----------V-----L-	-----	----------	16
132D8	333		----------V-----L-	-----	-----L--------	17

웰	단일 세포	CDR2	FR3	CDR3	FR4	서열 번호
-	-	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		WGQGTLVTVSS	1
174F1	131	-------D-------R-	----------	DGYDILTGNPRDFDY	----------	2
-	-	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR		WGQGTLVTVSS	3
125D10	170	----------V-----	----------V-	ATAFDY	----------	4
182D5	150	-A-H--R--YE-------	--N-T----------	GSR---	----------	5
-	-	YIYYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR		WGQGTLVTVSS	6
172B12	095	F---R-N---------	----------	DGYCSRTGCYGGWFDP	----------	7
-	-	AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK		WGQGTLVTVSS	8
138D2	250	---------N-------	----------V----V---------G	SSGWSEY	----------	9
182A5	139	---------N-------	----------G	-------	----------	10
-	-	VISYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK		WGQGTLVTVSS	11
190D7	211	-T-----K-D-------	----------VS	EGYCSSSSCYKYYYYGMDV	----------	12
129A7	124	-M-----KED-------	---------E----------VS	------R----------	----------	13
-	-	VISYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK		WGQGTLVTVSS	14
141A10	318	-T-----K-D-------	----------VS	EGYCDSSSCYKYYYYGMDV	----------	15
124D4	342	-T-----K-D-------	----------VS	------T----------	----------	16
132D8	333	-T-----K-D-------	----------VS	------T----------	----------	17

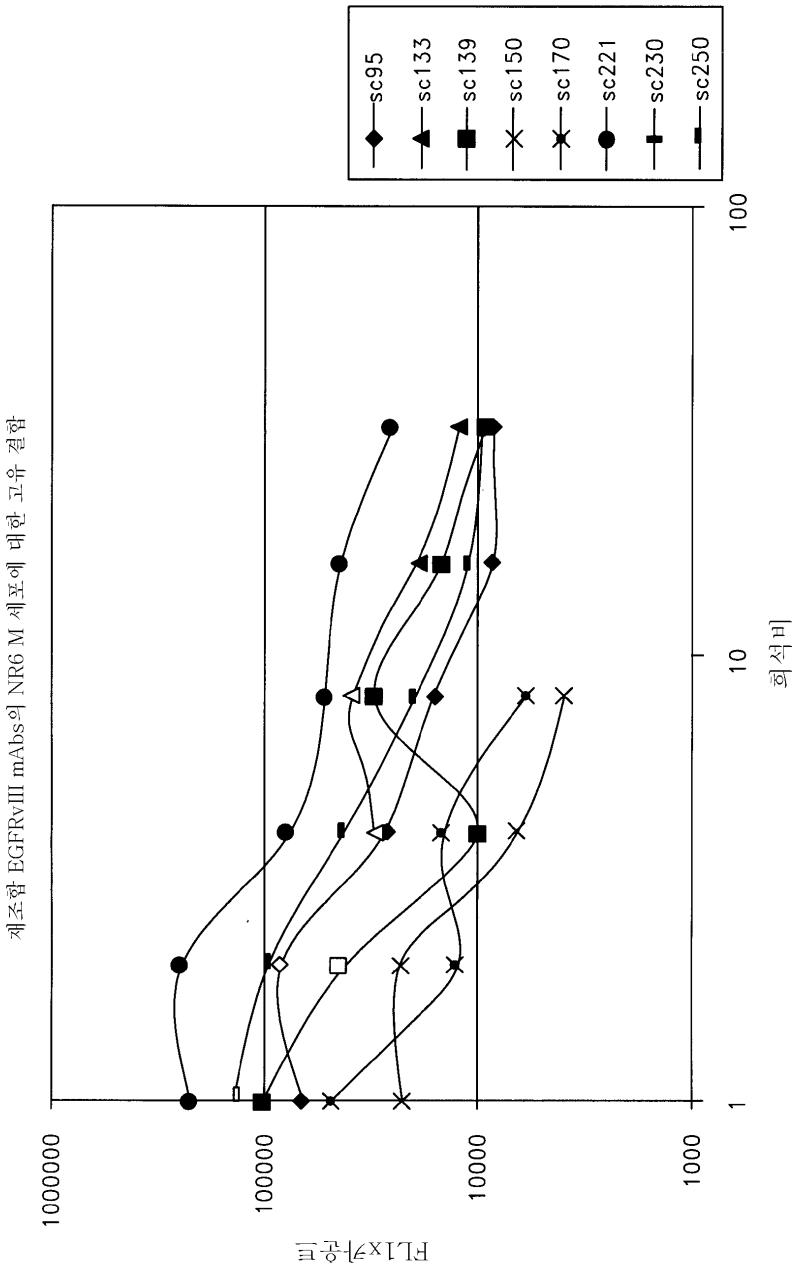
공개특허 10-2013-0065723

웰	단일 세포	V Kappa/J	FR1	CDR1	FR2	서열 번호
-	-	Germline	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC	RSSQSLVHSDGNTYLS	WLQQRPGQPPRLLIY	18
174F1	131	A23(VK2)/JK1	-T---------H----------	----------	----------	19
125D10	170		A--L----------	--------R-------	----------	20
182D5	150		----------	--------R-------	----------	21
-	-	Germline	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC	RSSQSLVHSDGNTYLS	WLQQRPGQPPRLLIY	22
172B12	095	A23(Vk2)/JK5	----------	------I-T---I---	----------	23
-	-	Germline	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	24
182A5	139	A30(VK1)/JK4	----------	--------N-A	----------	25
138D2	250		----------S-----	-T-----KN--	----------	26
-	-	Germline	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC	RSSQSLLHSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	27
190D7	211	A3(Vk2)/JK1	----------	-------YR--N----	----R----------	28
129A7	123		----------	-------YR--N----	----------	29
-	-	Germline	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC	RSSQSLLHSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	30
124D4	342	A3(Vk2)/JK1	----------	-------YR--N----	----R----------	31
132D8	333		----------	-------YR--N----	----R----------	32
141A10	318		----------	-------YR--N----	----R----------	33

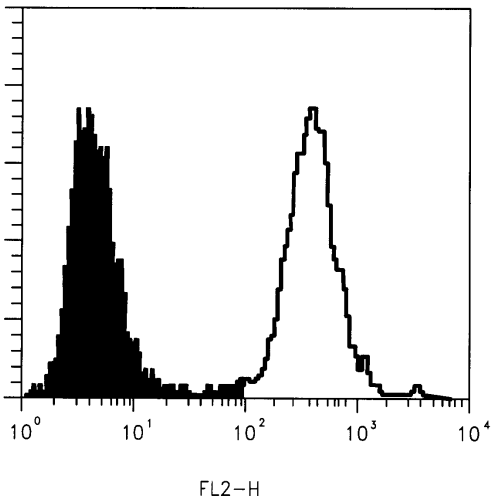
웰	단일 세포	CDR2	FR3	CDR3	FR4	서열 번호
-	-	KISNRFS	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQATQFPWT	FGQGTKVEIK	18
174F1	131	R--R---	----------E----------	--S-HV-R-	----------	19
125D10	170	-------	----------PD--------	-HT--L---	----------	20
182D5	150	-------	----------I-F-	-HT------	-----R----	21
-	-	KISNRFS	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQATQFPIT	FGQGTRLEIK	22
172B12	095	-------	----------	--G------	----------	23
-	-	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYPLT	FGGGTKVEIK	24
182A5	139	---N---	------T----------IV----------	---H-----	S---------	25
138D2	250	-------	----------R----------	---H-----	-----R---R	26
-	-	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQALQTPWT	FGQGTKVEIK	27
190D7	211	-------	----------	-------R-	---------	28
129A4	123	-------	----------N----------H---	-------R-	---------	29
-	-	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQALQTPWT	FGQGTKVEIK	30
124D4	342	-------	----------	-------R-	----------	31
132D8	333	-------	----------	-------R-	----------	32
141A10	318	-------	----------	-------R-	----------	33

공개특허 10-2013-0065723

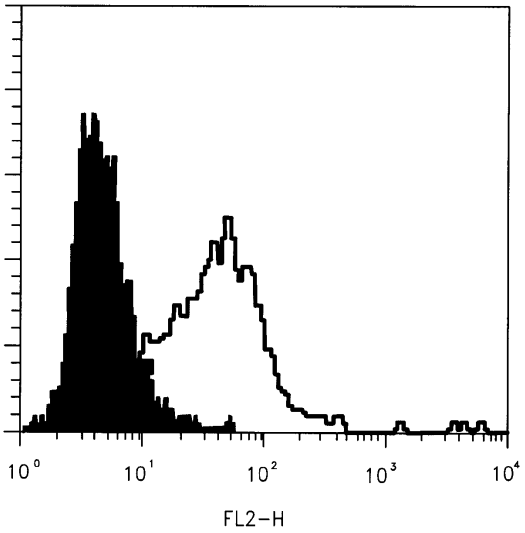
도면8


sc95
sc133
sc139
sc150
sc170
sc221
sc230
sc250
제조합 EGFRvIII mAbs의 NR6 M 세포에 대한 고유 결합
FL1x카운트
1000000
100000
10000
1000
희석비
100
10
1

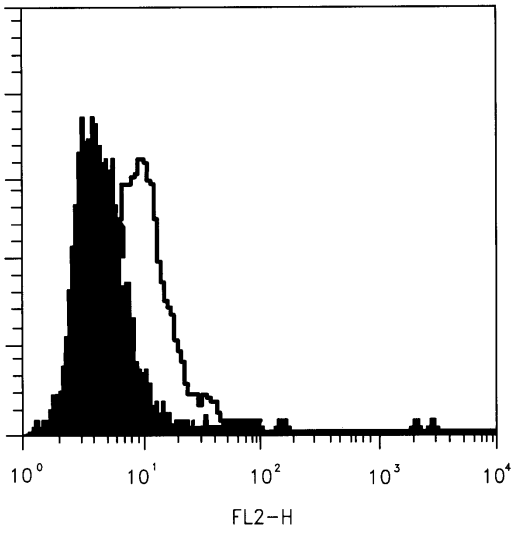
도면9a



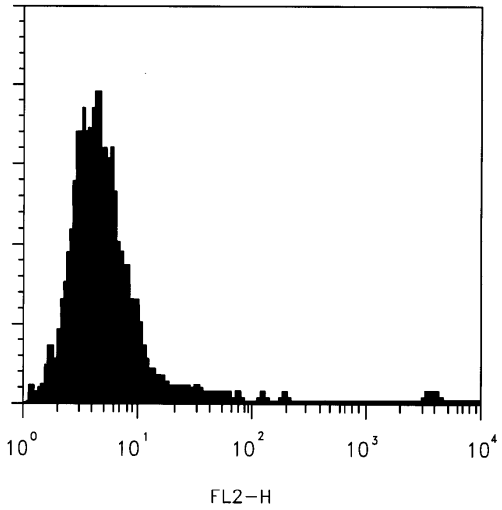
도면9b



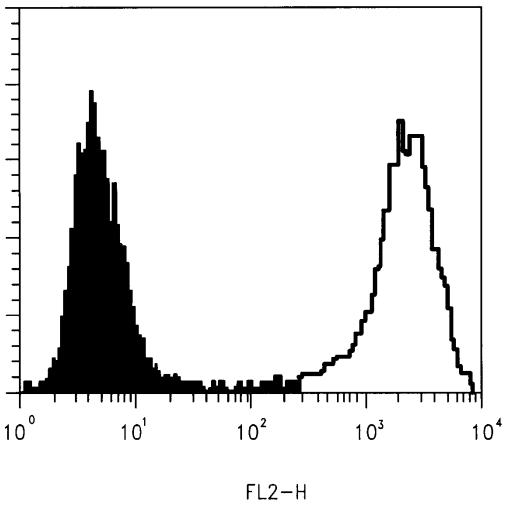
도면9c



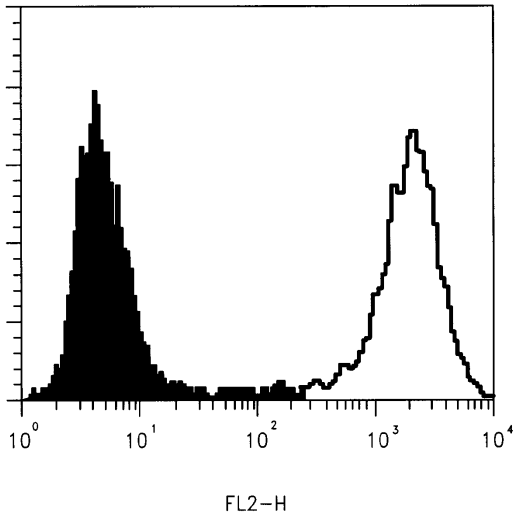
도면9d



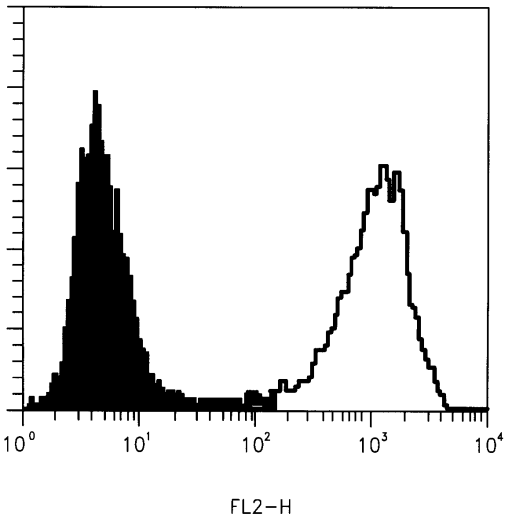
도면9e



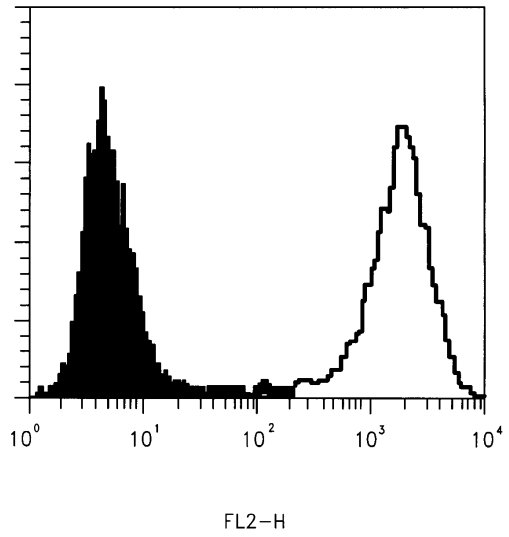
도면9f



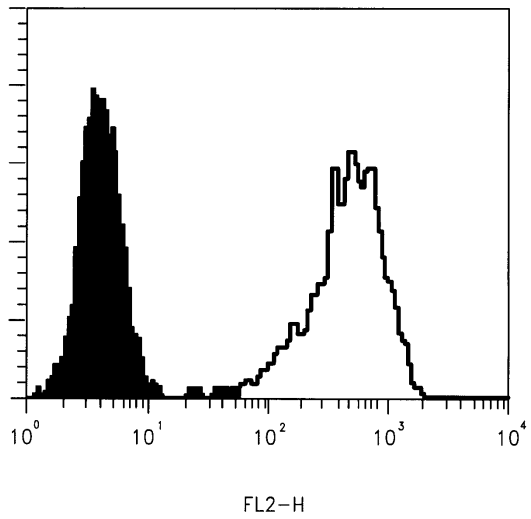
도면9g



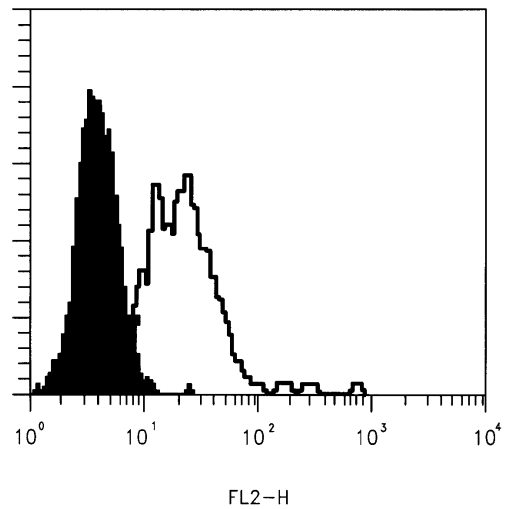
도면9h



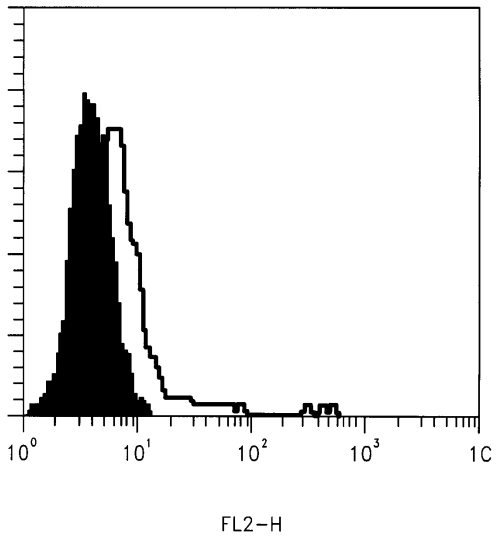
도면9i



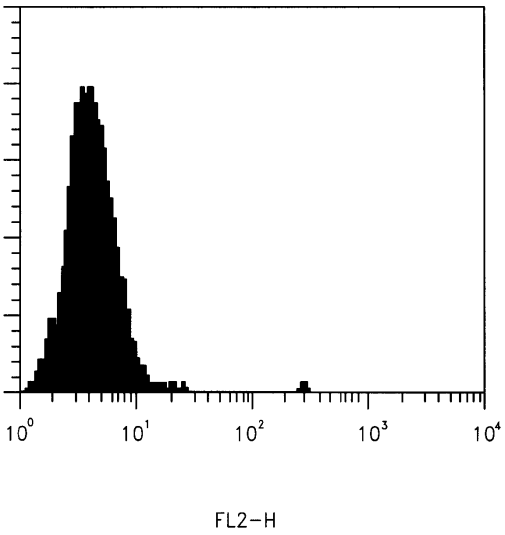
도면9j



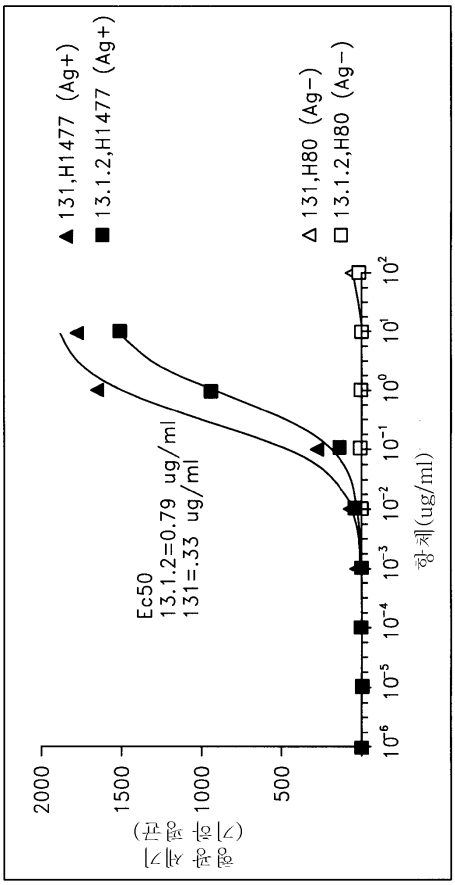
도면9k



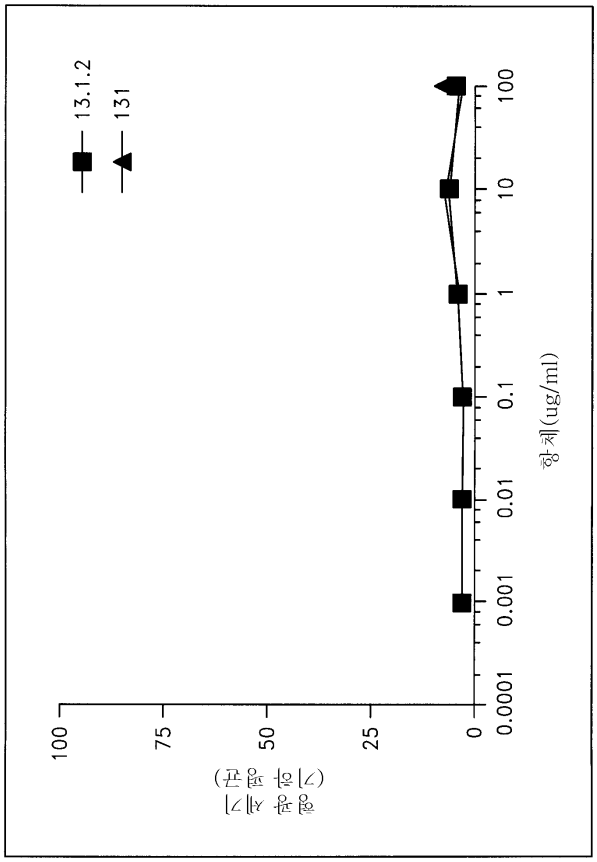
도면91



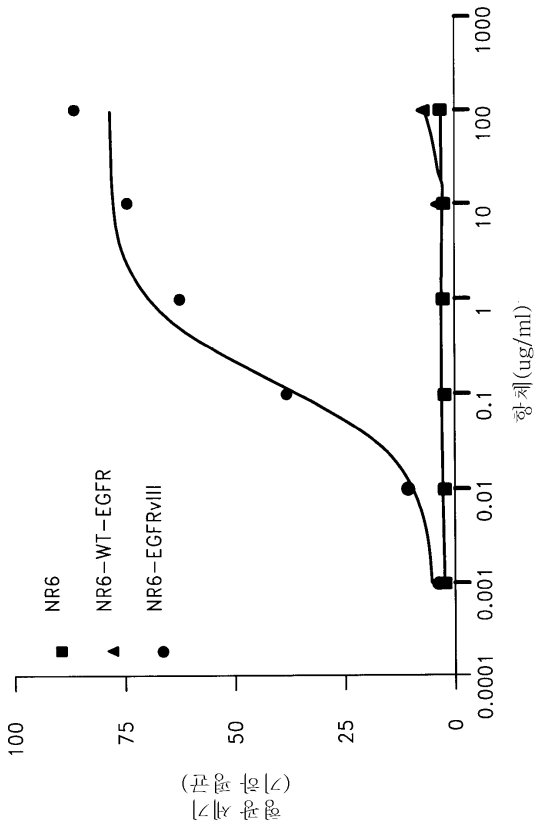
도면9m


▲ 131,H1477 (Ag+)
■ 13.1.2,H1477 (Ag+)
△ 131,H80 (Ag−)
□ 13.1.2,H80 (Ag−)
Ec50
13.1.2=0.79 ug/ml
131=.33 ug/ml
형광 량 세기
(기하 평균)
2000
1500
1000
500
10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
항체(ug/ml)

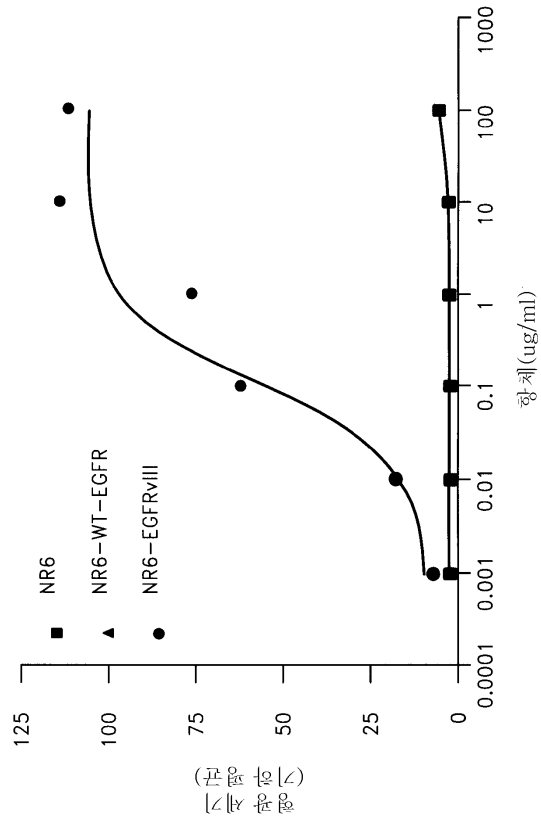
도면9n


13.1.2
131
형광 세기
(기하 평균)
100
75
50
25
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
항체(ug/ml)

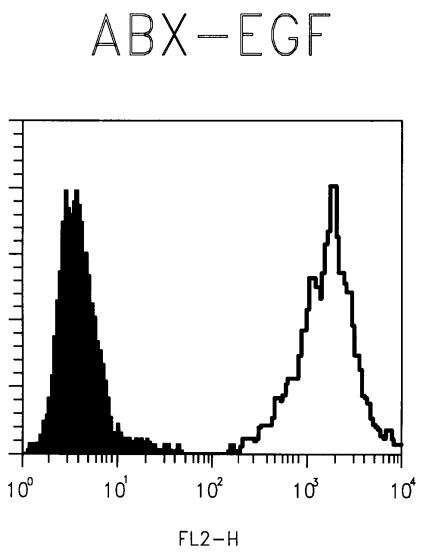
도면9o


형광 세기
(기하 평균)
100
75
50
25
0
NR6
NR6-WT-EGFR
NR6-EGFRvIII
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체(ug/ml)

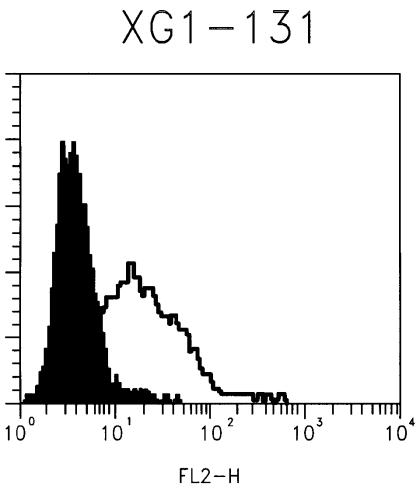
도면9p


형광 세기
(기하 평균)
125
100
75
50
25
0
NR6
NR6-WT-EGFR
NR6-EGFRvIII
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체(ug/ml)

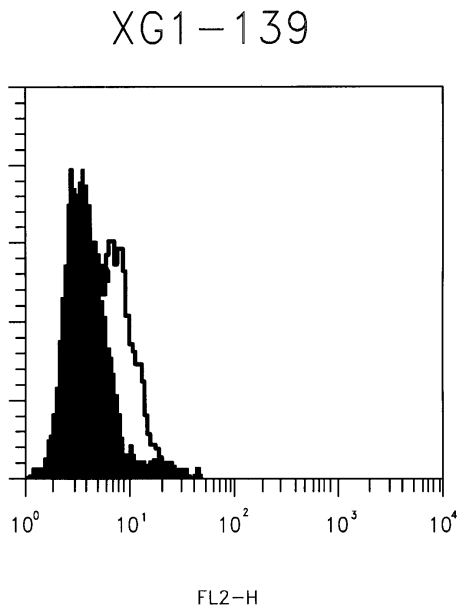
도면10a


ABX-EGF
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H

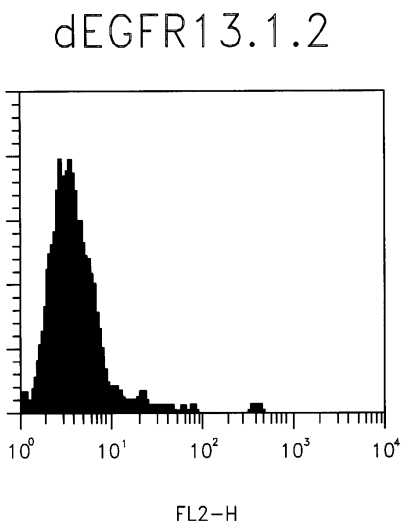
도면10b


XG1-131
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H

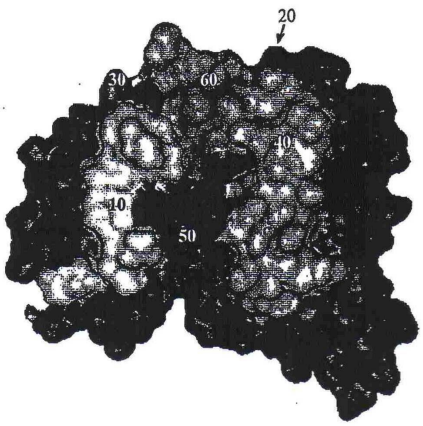
도면10c



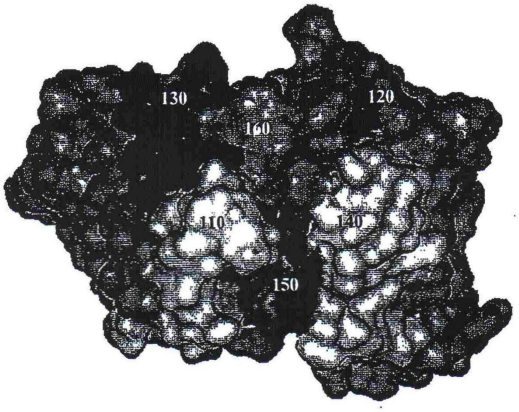
도면10d



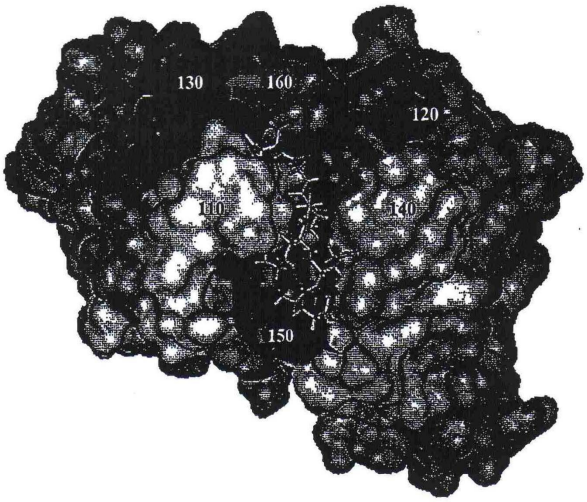
도면11



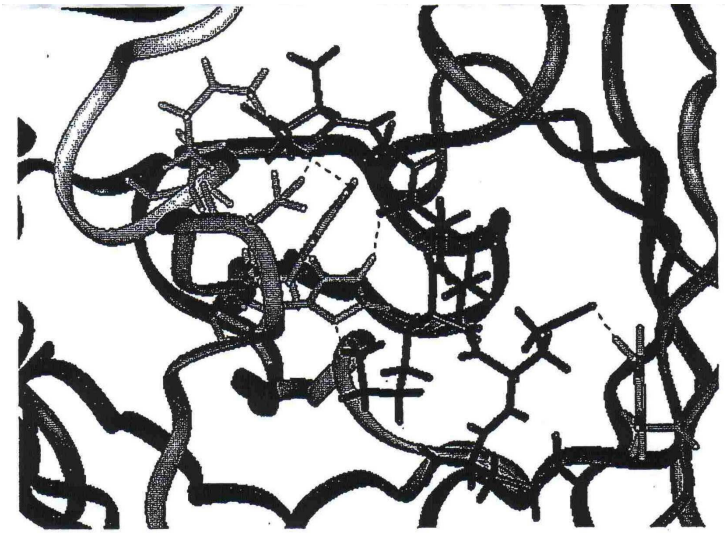
도면12



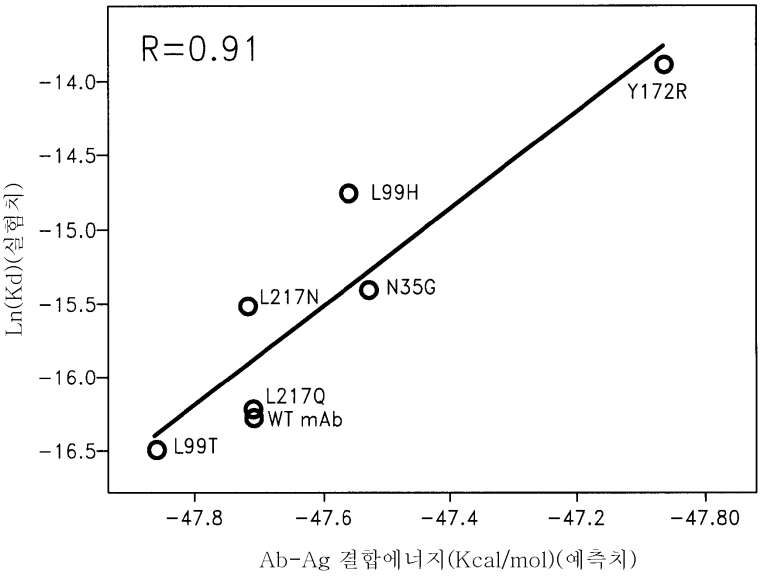
도면13a



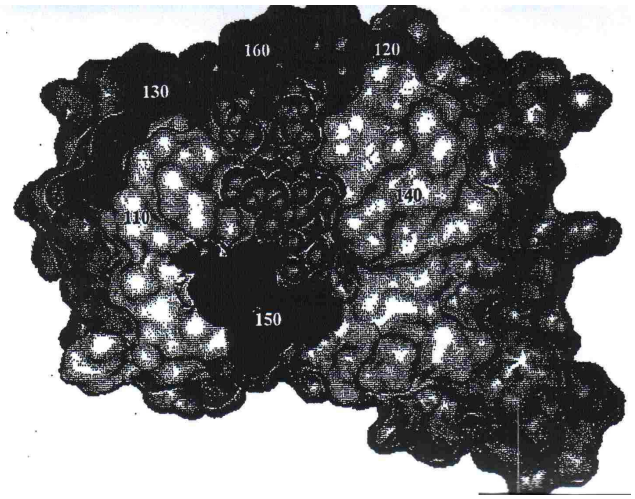
도면13b



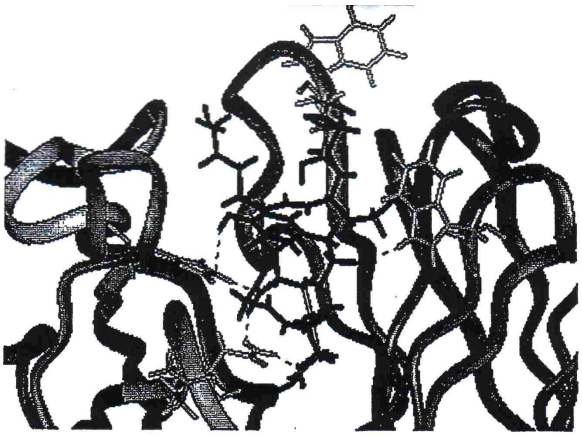
도면14



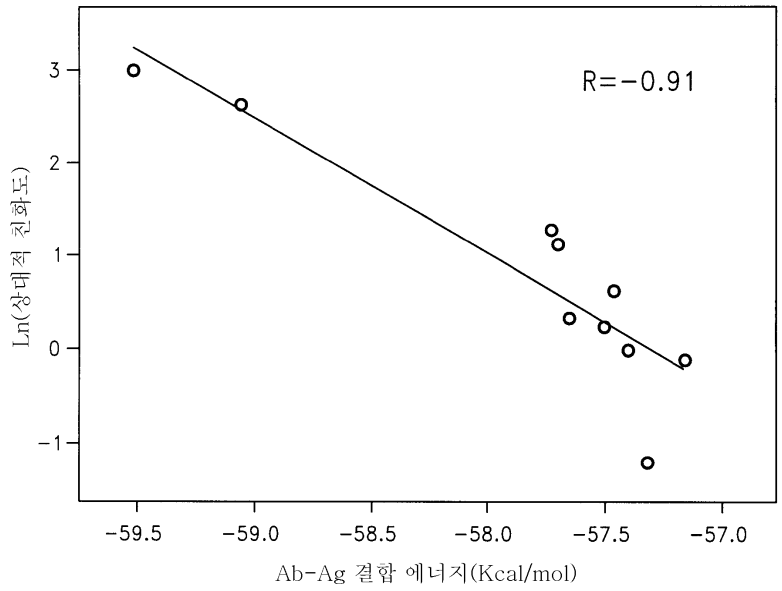
도면15



도면16



도면17



서 열 목 록

<110> ABGENIX,INC.

<120> ANTIBODIES DIRECTED TO THE DELETION MUTANTS OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR AND USES THEREOF

<130> AIP05230KR

<150> US 60/483,145

<151> 2003-06-27

<150> US 60/525,570

<151> 2003-11-26

<150> US 60/562,453

<151> 2004-04-15

<160> 144

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Ala Tyr His Arg Ser Arg Trp Tyr Tyr Glu Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 7

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Phe Ile Tyr Tyr Arg Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Cys Ser Arg Thr Gly Cys Tyr Gly Gly Trp
100 105 110
Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Pro
115 120 125

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

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

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

100 105

<210> 9
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9

Glu Gly Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

100 105 110
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13

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

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

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

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 15

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ser Glu Gly Tyr Cys Asp Ser Ser Ser Cys Tyr Lys Tyr Tyr Tyr

100 105 110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 16

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ser Glu Gly Tyr Cys Asp Ser Thr Ser Cys Tyr Lys Tyr Tyr Tyr

100 105 110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 17

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ser Glu Gly Tyr Cys Asp Ser Thr Ser Cys Tyr Lys Tyr Tyr Tyr
100 105 110

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

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Thr Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19

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

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

<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20
Ala Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

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

85 90 95
Thr Gln Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

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

100 105 110

<210> 22
<211> 112
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Thr Gln Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Thr
20 25 30

Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Arg Lys Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Arg

100 105

<210> 27

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

1 5 10 15

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn

20 25 30

Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu

85 90 95

Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg

20 25 30

Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly His Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg

20 25 30

Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

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

85 90 95
Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

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

Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 34

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcata cacactgatg gaaacatcta tttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagatttc taatcggttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaagatc 240

agcagggtgg aagctgagga tgtgggggtt tattactgca tgcaaggtac acaatttcct 300

atcaccttcg gccaagggac acgactggag attaaa 336

<210> 35

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggttcatct attacagagg gaacacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagttg acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgcgagac 300

ggatattgta gtagaaccgg ctgctatggc ggctggttcg acccctgggg ccagggaacc 360

ctggtcacgt ctcct 375

<210> 36

<211> 335

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

atattgtgat gactcagtct ccactctccc tgcccgtcac ccctggagag ccggcctcca 60

tctcctgcag gtctagtcag agcctcctgt atagaaatgg aaacaactat ttggattggt 120

atctgcagaa gccagggcag tctccacagc tcctgatcta tttgggttct aatcgggcct 180

ccggggtccc tgacaggttc agtggcagtg gatcgggcac agattttaca ctgaacatca 240

gcagagtgga ggctgaggat gttgggcatt attactgcat gcaggctcta caaactcctc 300

ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaa 335

<210> 37

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atgtcatatg atggaagtaa agaagactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tctagagaca attccgagaa catgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgt gagcgaagga 300

tattgtagta gtcgtagctg ctataagtac tactactacg gcatggacgt ctggggccaa 360

gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 38

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

gatactgtga tgacccagac tccactctcc tcacatgtaa cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca acctccaaga ctcctaattt ataggatttc taggcggttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actggaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgtcggggtt tattactgca tgcaatctac acacgttcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggag atcaaa 336

<210> 39

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagt ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcaga aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtga taaatactat 180

gcagactccg tgaggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggc 300

tacgatattt tgactggtaa tcctagggac tttgactact ggggccaggg aaccctggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 40

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

gaggtgcagg tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttta gc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcggct attagtggta gtggtggtag tacaaactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtct attactgtgc tgggagcagt 300

ggctggtccg agtactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctcg 348

<210> 41

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggctagtca gggcattaga aataatttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcctccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcaccg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca tagtcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg cgacttatta ctgtctacag catcacagtt acccgctcac ttccggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 42

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagggatg gaaataccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagatttc taaccggttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatt 240

agcagggtgg aagctgagga tgtcgggatt tatttctgca tgcatactac acaatttcct 300

tggacgttcg gccaagggac cagggtggaa atcaaa 336

<210> 43

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agctacagtt ctgcttggaa ctggatcagg 120

cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaagggcat atcacaggtc caggtggtat 180

tacgagtatg cagtatcggt gaaaagtcga ataaacatca ccccagacac atccaagaac 240

cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300

agaggcagtc gctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 44

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacaatg ctgcttggaa ctggatcagg 120

cagtccccag cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggtat 180

aatgattatg tagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240

cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgta 300

agaggcagtc gctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 45

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

gctattgtgt tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgtt cacagggatg gaaacaccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagatttc taaccggttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aacctgacga tgtcggggtt tattactgca tgcatactac acaacttcct 300

tggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 46

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctccta tatagaaatg gaaacaacta tttggattgg 120

tatctgcaga ggccagggca gtctccacaa ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac attgaaaatc 240

ggcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaggctct acaaactcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 47

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg acatcatatg atggaagtaa aaaagactat 180

gcagactccg cgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagcgaagga 300

tattgtagta gtagtagctg ctataagtac tactattacg gtatggacgt ctggggccaa 360

gggaccacgg tcaccgtctc ttca 384

<210> 48

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

gaggggcagc tgttggagtc tgggggaggc tgggtacagc ctggggagtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcggct attagtggta gtggtggtag cacaaattac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaagtga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgc tgggagcagt 300

ggctggtccg agtactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 49

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagcgtcacc 60

atcacttgcc ggacaagtca gggcattaga aaaaatttag gctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatccgcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtctccag catcatagtt acccgctcac tttcggcgga 300

gggaccaggg tggagatcag a 321

<210> 50

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctccta tatagaaatg gaaacaacta tttggattgg 120

tatctgcaga ggccagggca gtctccacaa ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaggctct acaaactcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 51

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg acatcatatg atggaagtaa aaaagactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagcgaagga 300

tattgtgata gtagtagctg ctataagtac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 360

gggaccacgg tcaccgtctc ttca 384

<210> 52

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctccta tatagaaatg gaaacaacta tttggattgg 120

tatctgcaga ggccagggca gtctccacaa ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaggctct acaaactcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

<

210> 53

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ctaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg acatcatatg atggaagtaa aaaagactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagcgaagga 300

tattgtgata gtactagttg ctataagtac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 360

gggaccacgg tcaccgtctc ttca 384

<210> 54

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctccta tatagaaatg gaaacaacta tttggattgg 120

tatctgcaga ggccagggca gtctccacaa ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaggctct acaaactcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 55

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg acatcatatg atggaagtaa aaaagactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagcgaagga 300

tattgtgata gtactagctg ctataagtac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 360

gggaccacgg tcaccgtctc ttca 384

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 56

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys

1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 57

Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr

1 5 10

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 58

Leu Glu Glu Lys Lys

1 5

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 59

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp

1 5 10

<210> 60

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 60

Glu Lys Asn Tyr

1

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 61

Glu Glu Lys Gly Asn

1 5

<210> 62

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400> 62

ggatctcgag ccagaccgga acgacaggcc acctc 35

<210> 63

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400> 63

cggatctcga gccggagccc agcactttga tctt 34

<210> 64

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400> 64

cggatgaatt cccagaccgg acgacaggcc acctc 35

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400> 65

ctttcttttc ctccagagcc 20

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400> 66

gtaattatgt ggtgacagat c 21

<210> 67

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400>

67

cggatctcga gctcaagaga gcttggttgg gagct 35

<210> 68

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400> 68

ggtggcggta cctggacaag accgttgcg 29

<210> 69

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400> 69

ataagaatgc ggccgctcat ttacccggag agcggga 37

<210> 70

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400> 70

ctactagcta gccaccatgc gaccctccgg ga 32

<210> 71

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide primer sequence

<400> 71

cggggtaccc ggcgatggac gggatc 26

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 72

Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr

1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 73

Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His

1 5 10

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 74

Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly

1 5 10

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 75

Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser

1 5 10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 76

Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys

1 5 10

<210> 77

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 77

Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val

1 5 10

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 78

Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg

1 5 10

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 79

Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala

1 5 10

<210> 80

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 80

Ala Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp

1 5 10

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 81

Leu Ala Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp

1 5 10

<210> 82

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 82

Leu Glu Ala Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp

1 5 10

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 83

Leu Glu Glu Ala Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp

1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 84

Leu Glu Glu Lys Ala Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp

1 5 10

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 85

Leu Glu Glu Lys Lys Ala Asn Tyr Val Val Thr Asp

1 5 10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 86

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

1 5 10

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 87

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Ala Val Val Thr Asp

1 5 10

<210> 88

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 88

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Ala Val Thr Asp

1 5 10

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 89

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Ala Thr Asp

1 5 10

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 90

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Ala Asp

1 5 10

<210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 91

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Ala

1 5 10

<210> 92

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 92

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His

1 5 10 15

Gly Ser Cys Val Arg Ala

20

<210> 93

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 93

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys

1 5 10 15

Val Arg Ala

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 94

Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr

1 5 10

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 95

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp

1 5 10

<210> 96

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 96

Tyr Val Val Thr Asp His

1 5

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 97

Tyr Val Val Thr Asp

1 5

<210> 98

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 98

Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr

1 5 10

<210> 99

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 99

Gly Asn Tyr Val Val Thr

1 5

<210> 100

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 100

Asp Thr Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser His Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 101

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser

1 5 10 15

<210> 102

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 102

Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1 5 10

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 103

Arg Ile Ser Arg Arg Phe Ser

1 5

<210> 104

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 104

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

1 5 10 15

Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 105

Met Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 106

Phe Gly Gln Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5

<210> 107

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 107

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 108

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 108

Asn Tyr Gly Met His

1 5

<210> 109

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 109

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

1 5 10

<210> 110

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 110

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15
Gly

<210> 111

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 111

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 112

Asp Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Pro Arg Asp Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 113

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 114

<211> 23

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 114

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 115

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

1 5 10 15

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 116

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 117

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 117

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

1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 118

Met Gln Ala Thr Gln Leu Pro Arg Thr

1 5

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 119

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 120

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 120

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 121

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 121

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 122

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 122

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

1 5 10

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 123

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 124

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 124

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400

> 125

Asp Gly Trp Gln Gln Leu Ala Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 126

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 126

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

1 5 10

<210> 127

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 127

Glu Glu Lys Lys Gly Asn

1 5

<210> 128

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 128

ataaaagctt ctggaggaaa agaaaggtaa tta 33

<210> 129

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 129

Thr Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly
1 5 10 15

Cys Gly Ala Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Gly Ala Thr Cys Thr Thr

20 25 30

Ala

<210> 130

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 130

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly
1 5 10

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 131

Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
1 5

<210

> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 132

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr
1 5 10

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 133

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr

1 5

<210> 134

<211> 1186

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln

1 5 10 15

Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn

20 25 30

Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg

35 40 45

Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr

50 55 60

Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu

65 70 75 80

Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala

85 90 95

Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro

100 105 110

Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu

145 150 155 160

Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp
165 170 175
Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala
180 185 190
Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys
195 200 205
His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys
210 215 220

Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys
225 230 235 240
Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn
245 250 255
Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro
260 265 270
Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly
275 280 285
Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys

290 295 300
Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu
305 310 315 320
Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys
325 330 335
Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe
340 345 350
Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
355 360 365

Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln
370 375 380
Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu
385 390 395 400
Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
405 410 415

Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
420 425 430
Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala

435 440 445
Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr
450 455 460
Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln
465 470 475 480
Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro
485 490 495
Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val
500 505 510

Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn
515 520 525
Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn
530 535 540
Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His
545 550 555 560
Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met
565 570 575
Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val

580 585 590
Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly
595 600 605
Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr
610 615 620
Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile
625 630 635 640
Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg
645 650 655

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

660 665 670

Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe

675 680 685

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

690 695 700

Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile

705 710 715 720

Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu

725 730 735

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg

740 745 750

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu

755 760 765

Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn

770 775 780

Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly

785 790 795 800

Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala

805 810 815

Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe

820 825 830

Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu

835 840 845

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His

850 855 860

Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val

865 870 875 880

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala

885 890 895

Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro

900 905 910

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met

915 920 925

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

930 935 940

Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp

945 950 955 960

Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala

965 970 975

Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr

980 985 990

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

995 1000 1005

Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala

1010 1015 1020

Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser

1025 1030 1035 1040

Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp

1045 1050 1055

Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser

1060 1065 1070

Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn

1075 1080 1085

Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro

1090 1095 1100

His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro

1105 1110 1115 1120

Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys

1125 1130 1135

Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe

1140 1145 1150

Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala

1155 1160 1165

Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile

1170 1175 1180

Gly Ala

1185

<210> 135

<211> 919

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile

65 70 75 80

Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu

85 90 95

Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly

100 105 110

Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala

115 120 125

Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln

130 135 140

Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg

145 150 155 160

Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys

165 170 175

Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr

180 185 190

Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys

195 200 205

Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys

210 215 220

Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg

225 230 235 240

Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg

245 250 255

Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu

260 265 270

Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys

275 280 285

Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys

290 295 300

Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala

305 310 315 320

Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly

325 330 335

Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile

340 345 350

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

355 360 365

Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg

370 375 380

Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro

385 390 395 400

Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu

405 410 415

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

420 425 430

Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys

435 440 445

Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala

450 455 460

Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn

465 470 475 480

Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln

485 490 495

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

500 505 510

Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val

515 520 525

Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His

530 535 540

Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val

545 550 555 560

Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys

565 570 575

Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu

580 585 590

Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser

595 600 605

Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr

610 615 620

Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu

625 630 635 640

Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met

645 650 655

Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu

660 665 670

Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu

675 680 685

Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser
690 695 700
Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val
705 710 715 720
Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro
725 730 735
Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn
740 745 750

Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro
755 760 765
Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly
770 775 780
Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu
785 790 795 800
Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn
805 810 815
Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro

820 825 830
His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu
835 840 845
Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala
850 855 860
His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp
865 870 875 880
Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe
885 890 895

Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
900 905 910
Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
915
<210> 136
<211> 268

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu
1 5 10 15

Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val
20 25 30

Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser
35 40 45

Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu
50 55 60

Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly
65 70 75 80

Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr
85 90 95

Asp Ala Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln

100 105 110

Glu Ile Leu His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys
115 120 125

Asn Val Glu Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu
130 135 140

Ser Asn Met Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys
145 150 155 160

Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu
165 170 175

Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly

180 185 190

Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala
195 200 205

Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys
210 215 220

Phe Arg Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu

225 230 235 240

Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr

245 250 255

Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg

260 265

<210> 137

<211> 512

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 137

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgga 300

tggcagcagc tggccccctt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct ctagcaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg ca 512

<210> 138

<211> 170

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Trp Gln Gln Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170

<210> 139
<211> 496
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 139
gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgtg catagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcaccaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagatttc taaccggttc 180
tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagctttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aagctgagga tgtcggggtt tattactgca tgcaagctac acaacttcct 300
cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgctagcgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccagg 496
<210> 140
<211> 165
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 140

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln

165

<210> 141

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

<210> 142
<211> 121

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 142
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Trp Gln Gln Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 143

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Thr Gln Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 144

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg