



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0123723
(43) 공개일자 2017년11월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01) A61K 49/14 (2006.01)
A61K 49/16 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7031272(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년10월22일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2012-7008350
원출원일자(국제) 2010년10월22일
심사청구일자 2015년10월22일
(85) 번역문제출일자 2017년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/053686
(87) 국제공개번호 WO 2011/050242
국제공개일자 2011년04월28일
(30) 우선권주장
61/254,474 2009년10월23일 미국(US)
- (71) 출원인
밀레니엄 파머슈티컬스 인코퍼레이티드
미합중국 메사추세츠 02139 캄브리지 랜즈다운 스트리트 40
암젠 브리티쉬 콜롬비아
캐나다 브리티시컬럼비아 버나비 엔터프라이즈 스트리트 7990 (우: 브이5에이 1브이7)
- (72) 발명자
남, 사무엘, 에스.
미국 01832 메사추세츠 하버힐 블라이스텔 스트리트 92
그린필드, 에드워드, 에이.
미국 메사추세츠 스타우턴 포스쿠스 스트리트 160
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 항 - G C C 항체 분자와 관련 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 GCC에 결합하는 항체 및 항체의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 상기 항체는 GCC의 세포외 도메인에 결합하여 내재화될 수 있다. 일부 구체예에서, 항체는 인간화되거나, 키메라 또는 인간이다. 항체 또는 이의 일부를 엔코딩하는 핵산 및 벡터, 핵산을 함유하는 재조합 세포, 및 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물이 또한 기재된다. 본 발명은 또한 본원에서 제공된 항체 및 항원-결합 단편을 이용하는 치료 및 진단 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/18 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 47/42 (2013.01)
A61K 49/14 (2013.01)
A61K 49/16 (2013.01)
C07K 14/435 (2013.01)
C07K 14/475 (2013.01)
C07K 16/18 (2013.01)
C07K 16/22 (2013.01)

(72) 발명자

밥콕, 존

캐나다 브이6알 2알2 브리티시 컬럼비아 밴쿠버 웨
스트 12 애브뉴 4480

오'키프, 데레사

미국 02453 메사추세츠 왈텡 리치그라인 애브뉴 20

킨, 시쎌

미국 02421 메사추세츠 렉싱턴 터프트 애브뉴 14

명세서

청구범위

청구항 1

항-GCC 항체 분자의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역이 하기 항체,

5F9;

Ab 229; 또는

3G1 중 어느 하나에 대해 본 발명의 상세한 설명의 표 2에 기재된 경쇄 및 중쇄 서열로부터 선택된, 항-GCC 항체 분자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항-GCC 항체 분자가 IgG1 항체인, 항-GCC 항체 분자.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 항-GCC 항체 분자가 치료제에 컨쥬게이션되지 않은, 항-GCC 항체 분자.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 항-GCC 항체 분자가 치료제에 컨쥬게이션된, 항-GCC 항체 분자.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 항-GCC 항체 분자가 검출가능한 표지에 컨쥬게이션된, 항-GCC 항체 분자.

청구항 6

하기 항체,

5F9;

Ab 229; 또는

3G1 중 어느 하나에 대해 본 발명의 상세한 설명의 표 5에 기재된 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는, 항-GCC 항체 분자.

청구항 7

제 6항에 있어서, 인간 또는 인간 유래 경쇄 및 중쇄 가변 영역 프레임워크를 추가로 포함하는, 항-GCC 항체 분자.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 항-GCC 항체가 IgG1 항체인, 항-GCC 항체 분자.

청구항 9

하기 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



상기 식에서,

Ab는 제 1항의 항-GCC 항체 분자이고;

X는 Ab를 Z에 연결시키는 링커 모이어티(moiety)이며;

Z는 치료제 또는 표지이고;

m은 1 내지 15의 정수이다.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 Z가 검출가능한 표지인, 면역컨쥬게이트.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 -Z가 마이탄신(maytansine) 또는 아우리스타틴(auristatin)인, 면역컨쥬게이트.

청구항 12

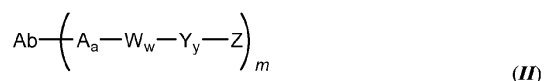
제 9항에 있어서, 상기 -Z가 N^{2'}-데아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신 (DM1) 또는 N^{2'}-데아세틸-N^{2'}-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)마이탄신 (DM4)인, 면역컨쥬게이트.

청구항 13

제 9항에 있어서, 상기 -Z가 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 또는 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)인, 면역컨쥬게이트.

청구항 14

제 9항에 있어서, 상기 링커 -X-가 화학식 -A_a-W_w-Y_y-를 지니고, 면역컨쥬게이트가 하기 화학식 (II)의 면역컨쥬게이트 또는 이의 약학적으로 허용되는 염임을 특징으로 하는, 면역컨쥬게이트:



상기 식에서,

-A-는 스트레처(Stretcher) 단위이고;

a는 0 또는 1이고;

각각의 -W-는 독립적으로 아미노산 단위이고;

w는 0 내지 12의 정수이며;

-Y-는 자가-희생적(self-immolative) 스페이서 단위이고;

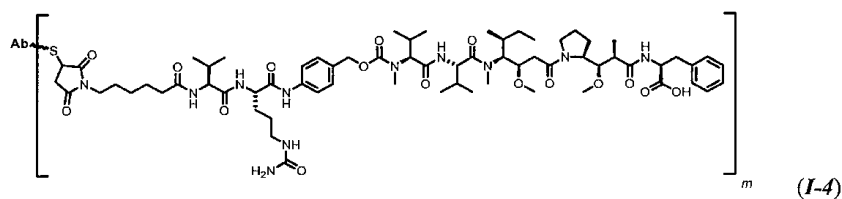
y는 0, 1, 또는 2이고;

Z는 치료제 또는 표지이며;

m은 약 1 내지 약 15이다.

청구항 15

하기 화학식 (I-4)의 면역컨쥬게이트 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



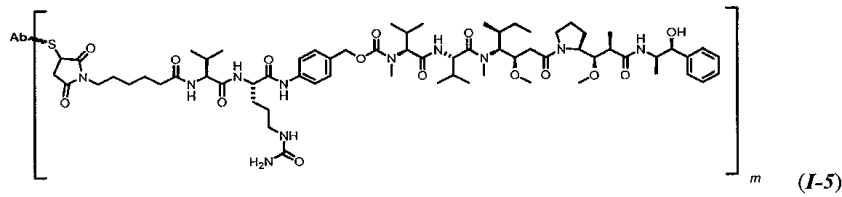
상기 식에서,

Ab는 5F9이고;

m 은 1 내지 8의 정수이다.

청구항 16

하기 화학식 (I-5)의 면역컨쥬게이트 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



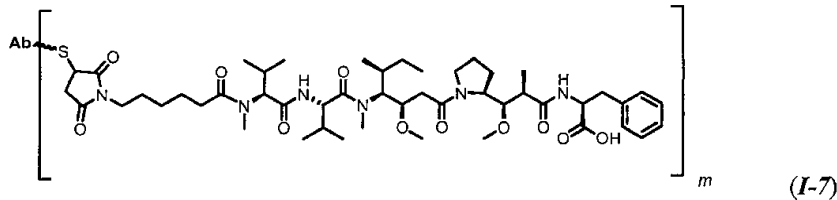
상기 식에서,

Ab는 5F9이고;

m 은 1 내지 8의 정수이다.

청구항 17

하기 화학식 (I-7)의 면역컨쥬게이트 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



상기 식에서,

Ab는 5F9이고;

m 은 1 내지 8의 정수이다.

청구항 18

제 15항에 있어서, 상기 m 이 1 내지 3인, 면역컨쥬게이트.

청구항 19

제 15항에 있어서, 상기 m 이 3 내지 5인, 면역컨쥬게이트.

청구항 20

제 16항에 있어서, 상기 m 이 3 내지 5인, 면역컨쥬게이트.

청구항 21

제 18항에 있어서, 상기 m 이 3 내지 5인, 면역컨쥬게이트.

청구항 22

치료적 유효량의 제 1항 또는 제 6항의 항체 분자를 피검체에게 투여하여 피검체를 치료하는 것을 포함하는, 결장암에 대해 피검체를 치료하는 방법.

청구항 23

치료적 유효량의 제 9항 내지 제 17항 중 어느 한 항의 면역컨쥬게이트를 피검체에게 투여하는 것을 포함하는, 결장암에 대해 피검체를 치료하는 방법.

청구항 24

제 1항 또는 제 6항의 항체 분자를 엔코딩하는 분리된 핵산 서열.

청구항 25

제 24항의 분리된 핵산 서열을 포함하는 세포.

청구항 26

제 25항의 세포를 항체 분자의 생산을 가능하게 하는 조건하에 배양함으로써 제 1항 또는 제 6항의 항체 분자를 생산하는 것을 포함하는, 제 1항 또는 제 6항의 항체 분자를 생산하는 방법.

청구항 27

제 1항 또는 제 6항의 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 벡터.

청구항 28

GCC 분자를 제 1항 또는 제 6항의 항체 분자와 접촉시키고 상기 항체 분자가 상기 GCC 분자에 결합하는 지를 결정하는 것을 포함하는, GCC 분자를 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 2009년 10월 23일 출원된 미국 가특허출원 61/254,474호의 이익을 주장한다. 미국 가특허출원 61/254,474호의 전문은 본원에 참조로서 포함된다.

[0002] 본 발명은 GCC에 결합하는 항체 분자 및 관련 분자, 예를 들어 그러한 항체 분자를 엔코딩하는 핵산, 조성물, 및 관련 방법, 예를 들어 치료 및 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 구아닐릴 시클라제 C (GCC)는 장보액의 유지, 전해질 항상성 및 세포 증식에 작용하는 막횡단(transmembrane) 세포 표면 수용체이다[예를 들어, Carrithers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3018-3020 (2003) 참조]. GCC는 소장, 대장 및 직장을 라이닝하는 점막 세포에서 발현된다 (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)). GCC 발현은 모든 일차 및 전이 결장직장 종양에서 발현되는 창자 상피 세포의 신 생물성 전환시에 유지된다 (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994)).

발명의 내용

[0004] 개요

[0005] 본 발명자들은 인간 및 무린 항체 둘 모두를 포함하는 수많은 항-GCC 항체를 발견하였다. 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자를 특징으로 한다. 항-GCC 항체 분자는 네이키드(naked) 항체 분자로서 그리고 면역결핍상태의 성분으로서 유용하다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-GCC 항체 분자 및 치료제 또는 표지를 포함하는 면역결핍상태를 특징으로 한다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 및 면역결핍상태를 포함하는 약학적 조성물을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 대로, GCC 및 GCC를 발현시키는 세포 또는 조직의 검출을 위해; GCC-매개 질환의 진단, 예후, 이미징, 또는 스테이징을 위해; GCC 단백질의 활성 또는 기능을 조절하기 위해; 및 GCC-매개 질환의 치료를 위해 세포 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 및 면역결핍상태를 이용하는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 항-GCC 항체 분자 아미노산 서열을 엔코딩하는 분리된 및/또는 재조합 핵산 뿐 아니라 그러한 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 그리고 항-GCC 항체 분자를 생산하는 방법을 특징으로 한다.

[0006] 모든 공개문헌, 특허 출원, 특허 및 본원에 언급된 다른 참조문헌들의 전문이 참조로서 포함된다.

[0007] 본원에 기재된 발명(들)의 그 밖의 특징, 목적 및 이점들이 상세한 설명과 도면, 그리고 청구범위로부터 자명할

것이다.

도면의 간단한 설명

- [0008] 도 1은 q14d 스케줄에 따라 5F9vc-MMAF, -DM1, 및 -DM4로 치료된 293-GCC#2 함유 SCID 마우스에서 종양 성장을 도시한다.
- 도 2는 0.9%NaCl; 40mg/kg의 209 항체; 또는 10 또는 40mg/kg의 5F9 항체로 처리된 마우스의 41일 p.i에서의 폐 중량을 도시한다.
- 도 3은 5F9 항체로 처리된 CT26-hGCC 종양-함유 마우스의 생존 곡선을 도시한다.
- 도 4는 GCC 상동체(ortholog)의 항체 교차-반응성을 시험하기 위한 ELISA 결합 검정을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0009] 구아닐릴 시클라제 C
- [0010] 구아닐릴 시클라제 C (GCC) (STAR, ST 수용체, GUC2C, 및 GUCY2C로도 알려짐)는 장보액의 유지, 전해질 항상성 및 세포 증식에 작용하는 막횡단 세포 표면 수용체이다 (Carrithers et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3018-3020 (2003); Mann et al., *Biochem Biophys Res Commun* 239: 463-466 (1997); Pitari et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2695-2699 (2003)); GenBank 수탁 번호 NM_004963, 각각은 본원에 참조로서 포함된다). 이러한 기능은 구아닐린의 결합을 통해 매개된다 (Wiegand et al. *FEBS Lett.* 311:150-154 (1992)). GCC는 또한 이. 콜라이(*E. coli*) 뿐 아니라 다른 감염성 유기체에 의해 생산된 펩티드인 열-안정성 장독소 (ST, 예를 들어, 아미노산 서열 NTFYCCELCNPACAGCY을 지님, SEQ ID NO:316)에 대한 수용체이다 (Rao, M.C. *Ciba Found. Symp.* 112:74-93 (1985); Knoop F.C. and Owens, M. J. *Pharmacol. Toxicol. Methods* 28:67-72 (1992)). GCC에 대한 ST의 결합은 신호 캐스케이드를 활성화시켜 설사와 같은 창자병을 초래한다.

- [0011] 인간 GCC에 대한 뉴클레오티드 서열 (GenBank 수탁 번호 NM_004963):

```

1      atgaagacgt tgctgttga cttgctttg tggctactgc tctccagcc cgggtgctg
61     tcttttagtt cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg
121    atgatgggca actcagcctt tgcagagccc ctgaaaaact tggaaagatgc ggtgaatgag
181    gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct
241    actttcatgt atcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcacctgt
301    gaaggcctcg acctactcag gaaaattfca aatgcacaac ggatgggctg tgtcctcata
361    gggccctcat gtacatactc cacttcag atgtacctg acacagaatt gagctacccc
421    atgatctcag ctggaagttt tggattgtca tgtgactata aagaacctt aaccagctg
481    atgtctccag ctagaagtt gatgtacttc ttggttaact ttggaaaac caacgatctg
541    ccctcaaaa cttattctg gagcacttgc tatgtttaca agaattgtac agaaactgag
601    gactgttct ggtaccttaa tgcctggag gctagcgtt cctattctc ccacgaactc
661    ggctttaagg tgggtttaag acaagataag gagttcagg atatcttaat ggaccacaac

```

- [0012]

721 aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggtccagagt tcctctacaa gctgaagggt
 781 gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atctttcaa tgaccagtac
 841 tttagggaca atgtcacagc ccctgactat atgaaaaatg tcctgttct gacgctgtct
 901 cctgggaatt ccttctaaa tagctcttc tccaggaaic tatcaccaac aaaacgagac
 961 ttgtctttg cctattfgaa tggaaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatatttctt
 1021 gaaaatggag aaaatattac ccccccaaa ttgtctcatg ctttcaggaa tctcactttt
 1081 gaagggtatg acgggtccagt gaccttggat gactgggggg atgttgacag taccatgggtg
 1141 ctctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaagggtc ttttgaccta tgataccac
 1201 gtaaaataga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca cttggaagaa ctctaaactt
 1261 cctaataata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact
 1321 ggagctgtgg tgctgtcct gctcgtcgt ctctgatgc tcagaaaata tagaaaagat
 1381 tatgaacttc gtcagaaaaa atgggtccac attctcctg aaaatatctt tcctctggag
 1441 accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgatgatg acaaaagacg agatacaatc
 1501 cagagactac gacagtgcac atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaga tctcaagcac
 1561 aatgatggta atttactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac
 1621 tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaacttg ataccatgat ctccgggtg
 1681 atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagtftaa atgacacaat ttctacact
 1741 gatggcacat tcatggattg ggagtttaag atctctgtct tgatgacat tgctaaggga
 1801 atgtcataic tgcactccag taagacagaa gtccatgggc gtctgaaic taccaactgc
 1861 gtagtggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaatc cattttacct
 1921 ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag caccctccgc aagccaacat ctctcagaaa
 1981 ggagatgtgt acagctatgg gatcatgca caggagatca tcctgcggaa agaaaccttc
 2041 tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagattttca gagtggaata ttccaatgga
 2101 atgaaacctt tccgccaga ttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg
 2161 tacctacttg taaaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga ttcaaaaaa
 2221 attgagacta cacttgccaa gatatttga cttttcatg accaaaaaaa tgaagctat

[0013]

2281 atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctgtagag
 2341 gaaaggacac agctgtacaa ggagagagg gacagggtg acagacttaa cttatgttg
 2401 ctccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat
 2461 gaggaagta caatctactt cagtgcatt gtaggtttca ctactctg caaatacagc
 2521 acccccatgg aagtgggtga catgcttaat gacatctata agattttga ccacattgtt
 2581 gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcgggtgat cgtacatggt ggctagtgg
 2641 ttgcctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaatc
 2701 ctacgttca tggggacctt tgagctggag catcttctg gcctccaat atggattcgc
 2761 attggagttc actctgggcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat
 2821 tgtctatttg gagatacggc caacacagcc tctagatgg aatccactgg cctccctttg
 2881 agaattcagc tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt
 2941 tatgaagtga gaggagaaac atactaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg
 3001 actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaaccctc ctactgtgga gaatcaacag
 3061 cgttgcaag cagaatttc agacatgatt gccactctt tacagaaaag acaggcagca
 3121 gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac
 3181 ttgcagctga ataccacaga caaggagagc accttttt aa

(SEQ ID NO:227)

[0014]

[0015] 인간 GCC에 대한 아미노산 서열 (GenPept 수탁 번호 NP_004954):

1 mktllldlal wslfqpgwl sfssqvsqnc hngsyecisl mmgnsafacp lknledavne
 61 gleivrglrq naglnvtvna tfmysdglh nsgdcrrstc egldllrkis naqrmgcvli
 121 gpcstystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwktnld
 181 pfktyswsts yvykngtete dcfwylnale asvsyfshef gfkvvlrqdk efqdlmdhn
 241 rksnviimcg gpeflyklkg dravaedivi ilvdlfndqy fednvtapdy mknvlvltls
 301 pgnslnssf srnlsptkrd falaylngil lfghmlkifl engenittpk fahafnltf

[0016]

361 egydgpvtld dwgdvdstmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvdmv pftfwknskl
 421 pnditgrgpq ilmiavfllt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple
 481 tnetnhvslk idddkrrdti qrlrqckyd krrvilkdlkh ndgnftekqk ielnklqid
 541 yynltkfygt vkldtmifgv icycergslr evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg
 601 msylhsskte vhgrrkstne vvdsmvcki tdfgensilp pkkdltwape hlrqanisqk
 661 gdvysygiia qeiiirktf ytlscrdme kifrvnsng mkpfpdfl etacekelev
 721 yllvknwec dpekrpdfkk ietlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql ysmlehlve
 781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvkslk ekgfvepely eevtiyfsdi vgfttickys
 841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lprkngnrha idiakmalei
 901 lsfmgtfele hplglpiwir igvhsqpcaa gvggikmpty clfgdtvnta smestglpl
 961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetylk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqq
 1021 rlqaefsdmi anslqkrqaa girsqkprv asykkgtley lqlnttdkes tyf

(SEQ ID NO:228)

[0017]

[0018] GCC 단백질은 일반적으로 허용되는 일부 도메인을 지니는데, 각각의 도메인은 GCC 분자에 분리될 수 있는 기능을 부여한다. GCC의 부분들은 SEQ ID NO:228의 아미노산 잔기 1 내지 대략 잔기 23, 또는 잔기 1 내지 대략 잔기 21 (SEQ ID NO:228의 대략적인 아미노산 잔기 22 또는 24 내지 1073의 작용성 성숙 단백질을 생성하도록 성

숙화를 위해 절제됨)의 신호 서열 (단백질을 세포 표면으로 유도하기 위한), SEQ ID NO:228의 대략 아미노산 잔기 24 내지 대략 잔기 420, 또는 대략 잔기 54 내지 대략 잔기 384에 결합하는 구아닐린 또는 ST와 같은 리간드에 대한 세포외 도메인, SEQ ID NO:228의 대략 아미노산 잔기 431 내지 대략 잔기 454, 또는 대략 잔기 436 내지 대략 잔기 452의 막횡단 도메인, SEQ ID NO:228의 대략 아미노산 잔기 489 내지 대략 잔기 749, 또는 대략 잔기 508 내지 대략 잔기 745의 티로신 키나제 활성을 지닐 것으로 예측되는, 키나제 상동성 도메인 및 SEQ ID NO:228의 대략 잔기 750 내지 대략 잔기 1007, 또는 대략 잔기 816 내지 대략 잔기 1002의 구아닐린 시클라제 촉매적 도메인을 포함한다.

[0019] 정상적인 인간 조직에서, GCC는 소장, 대장 및 직장을 라이닝하는 선단 술가장자리막(apical brush border membranes)과 같은 점막 세포에서 발현된다 (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)). GCC 발현은 모든 일차 및 전이 결장직장 종양에서 발현되는 창자 상피 세포의 신생물성 전환시에 유지된다 (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994)). 위, 식도 및 위식도 접합부로부터의 신생물 세포가 또한 GCC를 발현시킨다 (예를 들어, U.S. Patent No. 6,767,704; Debruyne et al. *Gastroenterology* 130:1191-1206 (2006) 참조). 조직 특이적 발현 및, 예를 들어 위창자 기관의 암 (예를 들어, 결장암, 위암 또는 식도암)과의 관련성은 이러한 질환에 대한 진단적 마커로서의 GCC의 용도를 위해 활용될 수 있다 (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005)).

[0020] 세포 표면 단백질로서, GCC는 또한 항체 또는 리간드와 같은 수용체 결합 단백질에 대한 치료적 표적으로서 기능할 수 있다. 정상 창자 조직에서, GCC는 관강내 환경 및 혈관 구획 사이에 불침투성 배리어를 형성하는 상피 세포 치밀 이음부의 선단측 상에서 발현된다 (Almenoff et al., *Mol Microbiol* 8: 865-873); Guarino et al., *Dig Dis Sci* 32: 1017-1026 (1987)). 이로 인해, GCC-결합 단백질 치료제의 전신적인 정맥내 투여는 침습성 또는 전이성 결장암 세포, 장외 또는 전이성 결장 종양, 식도 종양 또는 위 종양, 위식도 접합부에서의 샘암종을 포함하는 위창자계의 신생물 세포에 접근하는 동안 창자 GCC 수용체에 대해 극미한 효과를 지닐 것이다. 추가로, GCC는 리간드 결합시에 수용체 매개 세포내이입을 통해 내재화된다 (Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995)).

[0021] GCC의 세포외 도메인에 대해 생성된 폴리클로날 항체는 (Nandi et al. *Protein Expr. Purif.* 8:151-159 (1996)) 인간 및 래트 GCC에 결합하는 ST 펩티드를 억제하고 인간 GCC에 의한 ST-매개된 cGMP 생산을 억제할 수 있었다.

[0022] GCC는 결장암을 포함하는 암에 관련된 단백질로서의 특징을 나타내었다. 또한 문헌[Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995)]을 참조한다. GCC에 대해 유도된 항체 분자 치료제는 컨쥬게이션되지 않은 형태로 단독으로 사용되어 GCC-발현 암성 세포를 억제할 수 있다. 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 인간 GCC에 결합할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 GCC에 대한 구아닐린 또는 열-안정성 장독소와 같은 리간드의 결합을 억제할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 GCC에 대한 구아닐린 또는 열-안정성 장독소와 같은 리간드의 결합을 억제하지 않는다.

[0023] GCC에 특이적인 모노클로날 항체로는 GCC:B10 (Nandi et al., *J. Cell. Biochem.* 66:500-511 (1997)), GCC:4D7 (Vijayachandra et al. *Biochemistry* 39:16075-16083 (2000)) 및 GCC:C8 (Bakre et al. *Eur. J. Biochem.* 267:179-187 (2000))이 있다. GCC:B10은 카파 경쇄 및 IgG2a 아이소형을 지니며 래트, 돼지 및 원숭이 GCC에 교차반응한다. GCC:B10은 GCC의 세포내 도메인의 처음 63개 아미노산, 특히 SEQ ID NO:228의 잔기 470-480에 결합한다 (Nandi et al. *Protein Sci.* 7:2175-2183 (1998)). GCC:4D7는 GCC의 잔기 491-568 내에서 키나제 상동성 도메인에 결합한다 (Bhandari et al. *Biochemistry* 40:9196-9206 (2001)). GCC:C8은 GCC의 세포질 부분에서 단백질 키나제-유사 도메인에 결합한다.

[0024] 정의 및 방법

[0025] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 지닌다. 일반적으로 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 그리고 단백질 및 올리고- 또는 폴리뉴클레오타이드 화학 및 하이브리드화에 관해 사용된 명명법 및 이의 기술은 당 분야에 공지되어 있는 것이다. GenBank 또는 GenPept 수탁 번호 및 유용한 핵산 및 펩티드 서열은 National Center for

Biotechnological Information (Bethesda MD)에 의해 관리되는 웹사이트에서 찾아볼 수 있다. 제조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환 및 트랜스펙션 (예를 들어, 일렉트로포레이션, 리포펙션)을 위해 표준 기법을 이용한다. 효소적 반응 및 정제 기술은 제조자의 설명서에 따라 또는 당 분야에서 일반적으로 확립된 대로 또는 본원에 기재된 대로 수행된다. 상기의 기술 및 절차는 일반적으로 당 분야에 공지된 방법에 따라, 예를 들어 본 명세서의 전체에 걸쳐 인용되고 논의된 일반적이고 보다 구체적인 다양한 참조문헌에 기재된 대로 수행되었다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000))]을 참조하거나, 일반적으로 문헌 [Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]을 참조한다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 그리고 의학 및 약학적 화학과 관련하여 사용된 명명법 및 실험 절차와 기법은 당 분야에 공지되어 있다. 화학적 합성, 화학적 분석, 약학적 제조, 제형화, 및 전달, 및 환자의 치료를 위해 표준 기술을 이용한다. 더욱이, 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 것이고 복수 용어는 단수를 포함할 것이다.

[0026] 본원에서 사용된 용어 "항체 분자"는 항체, 항체 펩티드(들) 또는 면역글로불린, 또는 항체와 같은 전술한 임의의 것의 항원 결합 단편을 지칭한다. 항체 분자는 scFv (예를 들어, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; and Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 참조), 및 단일 도메인 항체 분자 (예를 들어, WO9404678호 참조)와 같은 단쇄 항체 분자를 포함한다. "항체 분자"의 용어 내에 있는 것은 아니지만, 본 발명은 또한 "항체 유사체(들)", 그 밖의 비-항체 분자 단백질-기반 스캐폴드, 예를 들어 특이적 항원 결합을 제공하기 위해 CDR을 이용한 융합 단백질 및/또는 면역컨쥬게이트를 포함한다.

[0027] "항-GCC 항체 분자"는 GCC, 예를 들어 인간 GCC와 상호작용하거나 이를 인지하는, 예를 들어 결합하는 (예컨대, 특이적으로 결합하는) 항체 분자 (즉, 항체, 항체의 항원-결합 단편 또는 항체 유사체)를 지칭한다. 예시적인 항-GCC 항체 분자는 예를 들어 표 1 및 2에 요약되어 있는 것들이다.

[0028] 본원에서 사용된 용어 "항체", "항체 펩티드(들)" 또는 "면역글로불린"은 단쇄, 2-쇄, 및 다중-쇄 단백질 및 당 단백질을 지칭한다. 항체라는 용어는 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, CDR-그래프트된(grafted) 항체 및 인간 또는 인간화된 항체를 포함하고, 이들 모두는 본원의 다른 부분에서 보다 상세하게 논의된다. 또한 상기 용어 내에 카멜리드(camelid) 항체 (예를 들어, US2005/0037421호 참조), 및 나노바디(nanobody), 예를 들어, IgNAR (상어 항체) (예를 들어, WO03/014161호 참조)이 포함된다. 용어 "항체"는 또한 합성 및 유전학적으로 공학처리된 변이체를 포함한다.

[0029] 본원에서 사용된 용어 "항체 단편" 또는 항체의 "항원 결합 단편"은 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 단쇄 항체, 작용성 중쇄 항체 (나노바디) 뿐 아니라 특이적 결합에 대해 온전한(intact) 항체와 경쟁하는, 하나 이상의 요망되는 에피토프에 대한 특이성을 지니는 항체의 임의의 부분 (예를 들어, 에피토프에 특이적으로 결합하기에 충분한 프레임워크 서열과 충분한 CDR 서열을 지니는 단편)을 지칭한다. 예컨대, 항원 결합 단편은 단편이 유래된 항체에 결합하는 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁할 수 있다. 본 문맥 및 유사한 문맥에서 사용된 유래되었다는 것은 임의의 특정 유래 방법 또는 공정을 함축하는 것은 아니며, 단순히 서열 유사성을 지칭할 수 있다. 항원 결합 단편은 제조합 기술, 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생산될 수 있다. 경쇄 및 중쇄를 지니는 항체의 단쇄, 예컨대 중쇄와 함께 이용될 때 항원 결합 단편이라는 용어는, 경쇄와 같은 다른 사슬의 완전한 가변 영역과 페어링될 때, 전체 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 보여지는 것의 적어도 25, 50, 75, 85 또는 90%의 결합을 가능하게 할 정도로 사슬의 단편이 충분하다는 것을 의미한다.

[0030] 본원에서 사용된 용어 "CDR의 항원 결합 배치(constellation)" 또는 "결합을 허용하기에 충분한 다수의 CDR" (및 유사한 표현)은, 프레임워크에 배치되고 다른 사슬의 완전한 가변 영역, 또는 경쇄와 같이 동일한 수의 CDR을 지니는 유사한 길이의 다른 사슬의 가변 영역의 부분과 페어링될 때, 전체 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 보여지는 것의 예를 들어 적어도 25, 50, 75, 85 또는 90%의 결합을 가능하게 할 중쇄와 같은 사슬의 충분한 CDR을 지칭한다.

[0031] 본원에서 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 생식세포계열(germ-line) 면역글로불린 서열로부터 유래된 서열을 소유하는 항체를 포함하고, 예를 들어 인간 면역글로불린 유전자를 지니는 유전자이식마우스로부터의 항체 (예를 들어, XENOMOUSE™ 유전적으로 공학처리된 마우스 (Abgenix, Fremont, CA)), 인간 파지 디스플레이 라이브러리, 인간 골수종 세포, 또는 인간 B 세포이다.

[0032] 본원에서 사용된 용어 "인간화된 항체"는 부모 항체의 항원-결합 성질을 보유하거나 실질적으로 보유하나 인간에서 덜 면역원성인 설치류 (예컨대, 뮌린)와 같은 비-인간 항체로부터 유래된 항체를 지칭한다. 본원에서 사

용된 인간화는 탈면역된 항체를 포함하고자 한다. 전형적으로 인간화된 항체는 비-인간 CDR 및 인간이나 인간 유래된 프레임워크 및 불변 영역을 포함한다.

- [0033] 본원에서 사용된 용어 "변형된" 항체는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 항체를 지칭하고, 예를 들어 숙주 세포로 트랜스펙션된 재조합 발현 벡터를 이용하여 발현된 항체, 재조합체로부터 분리된 항체, 복합 항체 라이브러리, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자이식된 동물 (예를 들어, 마우스, 양 또는 염소)로부터 분리된 항체 또는 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열로 스플라이싱(splicing)하는 것을 포함하는 어떠한 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 항체이다. 그러한 변형된 항체는 인간화, CDR 그래프트된 (예를 들어, 첫 번째 항체로부터의 CDR 및 다른 공급원, 예를 들어 두 번째 항체로부터의 프레임워크 영역 또는 컨센서스(consensus) 프레임워크를 갖는 항체), 키메라, 시험관내 발생된 (예를 들어, 파지 디스플레이에 의해) 항체를 포함하고, 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열 또는 인간 면역글로불린 유전자 또는 인간 면역글로불린 유전자 서열을 대안적인 면역글로불린 서열로 스플라이싱하는 것을 포함하는 어떠한 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 항체로부터 유래된 가변 또는 불변 영역을 임의로 포함할 수 있다. 구체에서, 변형된 항체 분자는 참조 항체의 서열과 차이가 있는 항체 분자를 포함한다.
- [0034] 용어 "일특이적 항체"는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화력을 나타내는 항체 또는 항체 제조물을 지칭한다. 이 용어는 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"을 포함한다.
- [0035] 용어 "이특이적 항체" 또는 "이작용성 항체"는 두 개의 에피토프에 이중 결합 특이성을 나타내는 항체를 지칭하며, 여기서 각각의 결합 부위는 상이하고 상이한 에피토프를 인지한다.
- [0036] 용어 "컨쥬게이션되지 않은 항체" 및 "네이키드 항체"는 치료제 또는 표지와 같은 비-항체 모이어티(moiety)에 컨쥬게이션되지 않은 분자를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다.
- [0037] 용어 "면역컨쥬게이트", "항체 컨쥬게이트", "항체 약물 컨쥬게이트" 및 "ADC"는 상호교환적으로 사용되며 치료제 또는 표지와 같은 비-항체 모이어티에 컨쥬게이션된 항체를 지칭한다.
- [0038] 용어 "작용제"는 화학적 화합물, 화학적 화합물들의 혼합물, 생물학적 거대분자, 또는 생물학적 물질로부터 제조된 추출물을 나타내기 위해 본원에서 이용된다. 용어 "치료제"는 생물학적 활성을 지니는 작용제를 지칭한다.
- [0039] 용어 "항암제" 또는 "화학요법제"는 인간에서 신생물, 특히 악성 (암성) 병변, 예를 들어 암종, 육종, 림프종 또는 백혈병의 발생 또는 진행을 억제하는 기능적 속성을 지니는 작용제를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 전이 또는 혈관형성의 억제는 종종 항암제 또는 화학요법제의 속성이다. 화학요법제는 세포독성제 또는 세포증식억제제일 수 있다. 용어 "세포증식억제제"는 세포 성장 및/또는 세포의 증식을 억제하는 작용제를 지칭한다.
- [0040] "세포독성제"는 주로 세포의 기능을 직접적으로 방해함에 의해 세포 사멸을 초래하는 화합물을 지칭하며, 비제한적으로 알킬화제, 중양 괴사 인자 억제제, 인터칼레이터(intercalator), 미세관 억제제, 키나제 억제제, 프로테아좀 억제제 및 토포아이스오머라제 억제제가 있다. 본원에서 사용된 "독성 페이로드(payload)"는 세포에 전달 시에 세포 사멸을 초래하는 세포독성제의 충분한 양을 지칭한다. 독성 페이로드의 전달은 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편 및 세포독성제를 포함하는 면역컨쥬게이트의 충분한 양을 투여함에 의해 달성될 수 있다. 독성 페이로드의 전달은 또한 세포독성제를 포함하는 면역컨쥬게이트의 충분한 양을 투여함에 의해 달성될 수 있는데, 이 때 면역컨쥬게이트는 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편을 인지하고 이에 결합하는 두 번째 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0041] 본원에서 사용된 문구로서, "로부터 유래된" 또는 "지정된 서열에 특이적인" 서열은, 예를 들어 지정된 서열의 연속하는 영역에 상응하는, 즉 동일하거나 상보적인 대략 6개 이상의 뉴클레오타이드 또는 2개 이상의 아미노산, 약 9개 이상의 뉴클레오타이드 또는 3개 이상의 아미노산, 약 10-12개 이상의 뉴클레오타이드 또는 4개의 아미노산, 또는 약 15-21개 이상의 뉴클레오타이드 또는 5-7개의 아미노산의 연속하는 서열을 포함하는 서열을 지칭한다. 특정 구체예에서, 서열은 지정된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 전부를 포함한다. 서열은 당 분야에 공지된 기술에 의해 측정할 경우 특정 서열에 대해 유일한 서열 부위와 상보적이거나 (폴리뉴클레오타이드 서열의 경우) 또는 동일할 수 있다. 서열이 유래될 수 있는 영역은 비제한적으로 특수한 에피토프를 엔코딩하는 영역, CDR을 엔코딩하는 영역, 프레임워크 서열을 엔코딩하는 영역, 불변 도메인 영역을 엔코딩하는 영역, 가변 도메인 영역을 엔코딩하는 영역 뿐 아니라 비-번역되고/거나 비-전사된 영역을 포함한다. 유래된 서열이 연구 중인 관심있는 서열로부터 반드시 물리적으로 유래될 필요는 없을 것이나, 화학적 합성, 복제, 역전사 또는 전사를 포함하나 이로 제한되지 않는 어떠한 수단으로 생성될 수 있는데, 이러한 수단은 폴리뉴클레오타이드가 유래된 영역

(들)에 있는 염기 서열에 의해 제공된 정보를 기반으로 한다. 이렇게 하여, 원래 폴리뉴클레오타이드의 센스 또는 안티센스 배향을 나타낼 수 있다. 또한, 지정된 서열에 상응하는 영역들의 조합은 의도하는 용도와 일관된 당 분야에 공지된 방법으로 변형되거나 조합될 수 있다. 예를 들어, 서열은 둘 이상의 연속하는 서열을 포함할 수 있는데, 각각의 서열은 지정된 서열의 일부를 포함하고 지정된 서열과 동일하지는 않지만 지정된 서열로부터 유래된 서열을 나타내도록 의도된 영역으로 중단된다. 항체 분자와 관련하여, "그로부터 유래된"이란 비교 항체와 기능적으로 또는 구조적으로 관련된 항체 분자를 포함하고, 예를 들어 "그로부터 유래된"은 예를 들어 동일하거나 유사한 CDR, 프레임워크 또는 가변 영역을 지니는 유사하거나 실질적으로 동일한 서열 또는 구조를 지니는 항체 분자를 포함한다. 또한 항체의 경우 "그로부터 유래된"은 연속하거나 연속하지 않을 수 있지만 넘버링 계획 또는 비교 서열의 일반적인 항체 구조 또는 3차원 근접성에 대한 상동성에 따라, 즉 CDR 또는 프레임워크 영역 내에서 정의되거나 확인된 예를 들어 하나 이상의 잔기, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 초과 잔기를 포함한다. 용어 "그로부터 유래된"은 그로부터 물리적으로 유래된 것으로 제한되지 않으며, 또 다른 항체를 고안하기 위해 비교 항체로부터의 서열 정보를 이용하는 것과 같은 어떠한 수단에 의한 생성을 포함한다.

[0042] 본원에서 사용된 "의해 엔코딩된"의 문구는 폴리펩티드 서열을 코딩하는 핵산 서열을 지칭하고, 여기서 폴리펩티드 서열 또는 이의 부분은 핵산 서열에 의해 엔코딩된 폴리펩티드로부터의 적어도 3 내지 5개의 아미노산, 적어도 8 내지 10개의 아미노산, 또는 적어도 15개 내지 20개의 아미노산의 아미노산 서열을 함유한다.

[0043] 두 서열간 "상동성"의 계산은 다음과 같이 수행될 수 있다. 서열들은 최적 비교를 위해 정렬된다 (예를 들어, 최적 정렬을 위해 첫 번째 및 두 번째 아미노산 또는 핵산 서열 중의 하나 또는 둘 모두에 갭이 도입될 수 있고 비-상동 서열은 비교를 위해 무시될 수 있다). 비교를 위해 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 30%, 40%, 또는 50%, 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 100%이다. 그 후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 비교한다. 첫 번째 서열의 위치를 두 번째 서열의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 차지한 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다 (본원에서 사용된 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 같다). 두 서열간 동일성 퍼센트는 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입이 필요한 갭의 수, 및 각각의 갭의 길이를 고려한, 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수이다.

[0044] 두 서열간 서열 비교 및 상동성 퍼센트의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 두 아미노산 서열간 상동성 퍼센트는 당 분야에 공지된 어떠한 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 가중치를 이용하여 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램에 도입된 알고리즘을 참고한다 [Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)]. 두 뉴클레오타이드 서열간 상동성 퍼센트는 또한 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70, 또는 80의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 가중치를 이용하여, GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다 (Accelrys, Inc. San Diego, CA). 상동성 결정을 위한 예시적인 파라미터 세트는 갭 페널티 12, 갭 연장 페널티 4, 및 프레임시프트 갭 페널티 5를 갖는 Blossum 62 스코어링 매트릭스이다.

[0045] 본원에서 사용된 용어 "엄격한 조건하에 하이브리드화"는 하이브리드화 및 세척을 위한 조건을 기술한다. 하이브리드화 반응을 수행하기 위한 지침은 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]에서 찾아볼 수 있다. 참조 등으로 이용할 수 있는 수정 및 비수정 방법이 기술되어 있다. 본원에서 언급된 특수한 하이브리드화 조건은 다음과 같다: 1) 약 45°C에서 6X 소듐 클로라이드/소듐 시트레이트 (SSC)에 이어, 0.2X SSC, 0.1% SDS에서 50°C 이상에서 2회 세척하는 엄격성이 낮은 하이브리드화 조건 (세척 온도는 낮은 엄격성 조건에서 55°C로 상승될 수 있다); 2) 약 45°C에서 6X SSC에 이어, 0.2X SSC, 0.1% SDS에서 60°C에서 1회 이상 세척하는 엄격성이 중간인 하이브리드화 조건; 3) 약 45°C에서 6X SSC에 이어, 0.2X SSC, 0.1% SDS에서 65°C에서 1회 이상 세척하는 엄격성이 높은 하이브리드화 조건; 및 4) 65°C에서 0.5M 소듐 포스페이트, 7% SDS에 이어, 0.2X SSC, 1% SDS에서 65°C에서 1회 이상 세척하는 엄격성이 매우 높은 하이브리드화 조건. 매우 높은 엄격성 조건 (4)가 종종 바람직한 조건이며 달리 언급하지 않는 한 이용되어야 하는 조건이다.

[0046] 본 발명의 항체 및 이의 항원 결합 단편은 폴리펩티드 기능에 실질적인 영향을 주지 않는 추가의 보존적 또는 비필수적인 아미노산 치환을 지닐 수 있는 것으로 이해된다. 특정 치환이 관용될지 관용되지 않을지, 즉 결합 활성과 같은 요망되는 생물학적 성질에 불리한 영향을 주지 않을 지는 문헌[Bowie, JU et al. *Science* 247:1306-1310 (1990) or Padlan et al. *FASEB J.* 9:133-139 (1995)]에 기재된 대로 결정될 수 있다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 지니는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 지니

는 아미노산 잔기의 패밀리는 당 분야에 정의되어 있다. 이러한 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄 (예를 들어, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다.

[0047] "비-필수적인" 아미노산 잔기는 생물학적 활성을 폐지하거나 실질적으로 변경시키지 않으며, 결합제, 예를 들어 항체의 야생형 서열로부터 변화될 수 있는 잔기인 한편, "필수적인" 아미노산 잔기는 그러한 변경을 초래한다. 항체에서, 필수적인 아미노산 잔기는 특이성 결정 잔기 (SDR)일 수 있다.

[0048] 본원에서 사용된 용어 "분리된"은 그 원래 환경 (예를 들어, 자연 발생의 경우, 천연 환경)에서 제거된 물질을 지칭한다. 예를 들어, 살아 있는 동물에 존재하는 자연 발생 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 분리된 것이 아니나, 천연계에 공존하는 물질의 일부 또는 전부로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 DNA 또는 폴리펩티드는 분리된 것이다. 그러한 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부일 수 있고/거나 그러한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 조성물, 예를 들어 혼합물, 용액 또는 현탁액의 일부일 수 있거나 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드를 포함하는 분리된 세포 또는 배양된 세포를 구성하는데, 이들은 벡터 또는 조성물이 그 천연 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 분리된 것이다.

[0049] 본원에서 사용된 용어 "레플리콘"은 세포 내에서 폴리뉴클레오타이드 복제의 자율 단위로서 거동하는, 플라스미드, 염색체 또는 바이러스와 같은 어떠한 유전자 엘리먼트를 지칭한다.

[0050] 본원에서 사용된 용어 "작동적으로 연결된"은 개시된 구성요소들이 그 의도된 방식으로 이들을 기능하도록 하는 관계에 있는 상태를 지칭한다. 따라서, 예를 들어 코딩 서열에 "작동적으로 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열에 적합한 조건하에 달성되는 방식으로 라이게이션된다.

[0051] 본원에서 사용된 용어 "벡터"는 예를 들어 부착된 세그먼트의 복제 및/또는 발현이 일어나도록 또 다른 폴리뉴클레오타이드 세그먼트가 부착되어 있는 레플리콘을 지칭한다.

[0052] 본원에서 사용된 용어 "조절 서열"은 라이게이션된 코딩 서열을 발현시키는데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 그러한 조절 서열의 특성은 숙주 유기체에 따라 상이하다. 원핵생물에서, 그러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 터미네이터(terminator), 그리고 일부 예에서 인핸서를 포함한다. 따라서, 용어 "조절 서열"은 발현을 위해 존재해야 할 최소의 모든 구성요소를 포함하고자 하며, 또한 존재하는 것이 유리한, 예를 들어 리더 서열과 같은 추가의 구성요소를 포함할 수 있다.

[0053] 본원에서 사용된 용어 "정제된 생성물"은 생성물이 일반적으로 결합되어 있는 세포의 구성요소들 및/또는 관심 있는 샘플에 존재할 수 있는 다른 유형의 세포들로부터 분리된 생성물의 제조물을 지칭한다.

[0054] 본원에서 사용된 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정인자(determinate)를 지칭한다. 에피토프 결정인자는 일반적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같이 분자의 화학적으로 활성인 표면 군별로 구성되고 일반적으로 특수한 3차원 구조적 특성 뿐 아니라 특수한 전하 특성을 지닌다. 일부 에피토프는 선형 에피토프인 반면, 다른 것들은 입체적 에피토프이다. 선형 에피토프는 연속하는 아미노산 일차 서열이 인지된 에피토프를 포함하는 에피토프이다. 선형 에피토프는 전형적으로 3개 이상, 및 보다 일반적으로 5개 이상, 예를 들어, 약 8개 내지 약 10개의 연속하는 아미노산을 포함한다. 입체적 에피토프는, a) 특정 단백질 입체형태에서, 예를 들어 리간드 결합이나 변형 (예를 들어, 인산화)에 따라, 신호 분자에 의해 단지 항체 결합에만 노출된 선형 서열; 또는 b) 하나를 초과하는 단백질 부분, 또는 다수 서브유닛 단백질에서, 하나를 초과하는 서브유닛으로부터의 구조적 특징의 조합으로서, 상기 특징이 결합에 관여하기 위해 3차원 공간에서 충분히 근접하여 존재하는 조합과 같이 둘 이상의 상황으로부터 초래될 수 있다.

[0055] 본원에서 사용된 "아이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 엔코딩된 항체 부류 (예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다.

[0056] 본원에서 사용된 용어 "검출가능한 작용제", "표지" 또는 "표지된"은 폴리펩티드 또는 당단백질 상에 검출가능한 마커를 혼입시키는 것을 나타내기 위해 사용된다. 폴리펩티드 및 당단백질을 표지하는 다양한 방법이 당 분야에 공지되어 있고 사용될 수 있다. 폴리펩티드용 표지의 예로는 다음과 같은 것들이 있으나 이로 제한되지 않는다: 방사성동위원소 또는 방사성핵종 (예를 들어, 인듐 (¹¹¹In), 아이오딘 (¹³¹I 또는 ¹²⁵I), 이트륨 (⁹⁰Y), 루테튬 (¹⁷⁷Lu), 악티늄 (²²⁵Ac), 비스무트 (²¹²Bi 또는 ²¹³Bi), 황 (³⁵S), 탄소 (¹⁴C), 트리튬 (³H), 로듐 (¹⁸⁸Rh), 테

크네튬 (^{99}Tc), 프라세오디뮴, 또는 인 (^{32}P) 또는 양전자-방출 방사성핵종, 예를 들어, 탄소-11 (^{11}C), 포타슘-40 (^{40}K), 질소-13 (^{13}N), 산소-15 (^{15}O), 플루오린-18 (^{18}F), 및 아이오딘-121 (^{121}I)), 형광성 표지 (예를 들어, FITC, 로다민, 란탄족 인광체), 효소적 표지 (예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 베타-갈락토시다제, 루시페라제, 알칼린 포스파타제), 화학발광, 비오틴닐기 (스트렙타비딘 모이어티 및 형광 마커를 함유하는 분자와 같은 마킹된 아비딘, 및 광학적 또는 열량측정법에 의해 검출될 수 있는 효소적 활성화에 의해 검출될 수 있음), 및 이차 리포터에 의해 인지되는 소정의 폴리펩티드 에피토프 (예를 들어, 류신 지퍼(zipper) 쌍 서열, 이차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그). 일부 구체예에서, 표지는 다양한 길이의 스페이서 아암(spacer arm)에 부착되어 잠재적인 입체 장애를 감소시킨다.

[0057] 본원에서 사용된 "특이적 결합", "특이적으로 결합하는" 또는 "결합 특이성"은 항-GCC 항체 분자의 경우에, 항체 분자가 비-GCC 단백질, 예를 들어 BSA에 결합하는 것보다 큰 친화력으로 GCC, 예를 들어 인간 GCC 단백질에 결합하는 것을 의미한다. 전형적으로 항-GCC 분자는 비-GCC 단백질, 예를 들어 BSA에 대해, GCC, 예를 들어 인간 GCC 단백질에 대한 K_d 보다 2배 더 크거나, 10배 더 크거나, 100배 더 크거나, 1,000배 더 크거나, 10^4 배 더 크거나, 10^5 배 더 크거나, 10^6 배 더 큰 K_d 를 지닐 것이다. K_d 를 결정함에 있어서, GCC 및 비-GCC 단백질, 예를 들어 BSA에 대한 K_d 는 동일한 조건하에 수행되어야 한다.

[0058] 본원에서 사용된 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 항-GCC 항체 분자를 피검체, 예를 들어 환자에게 투여하거나, 피검체로 되돌아가는 피검체로부터 분리된 조직 또는 세포에 투여, 예를 들어 적용시키는 것으로서 정의된다. 항-GCC 항체 분자는 단독으로 또는 제 2의 작용제와 함께 투여될 수 있다. 상기 치료는 암과 같은 질병, 질병의 증상 또는 질병에 대한 소인에 영향을 주거나 치료, 치유, 완화, 경감, 변경, 구제, 개선, 완화, 개선시키는 것일 수 있다. 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 치료는 시험관내 또는 생체내에서 세포의 억제, 제거 또는 사멸을 유도하거나, 본원에 기재된 질병 (예를 들어, 암)과 같은 질병을 매개하는 세포, 예를 들어 비정상적인 세포의 능력을 감소시키는 것으로 여겨진다.

[0059] 본원에서 사용된 용어 "피검체"는 포유동물, 영장류, 인간 및 인간이 아닌 동물을 포함한다. 예를 들어, 피검체는 예를 들어 위창자 기원의 암 (예를 들어, 결장암), 예를 들어 위창자 기원의 암 (예를 들어, 결장암)의 증상을 갖는 환자 (예를 들어, 인간 환자 또는 수의적 환자)일 수 있고, 여기서 세포의 적어도 일부는 GCC를 발현시키거나, 세포의 적어도 일부가 GCC를 발현시키는 예를 들어 위창자 기원의 암 (예를 들어, 결장암)에 대한 소인을 발현시킨다. 본 발명의 "인간이 아닌 동물"이라는 용어는 달리 언급하지 않는 한 인간이 아닌 모든 척추동물, 예를 들어 인간이 아닌 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대 인간이 아닌 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다. 일 구체예에서, 피검체는 마우스, 래트, 토끼 또는 염소 중 하나 이상 또는 전부를 제외한다.

[0060] 본원에서 사용된 질병을 치료하는데 "효과적인" 또는 "충분한" 항-GCC 항체 분자의 양, 또는 "치료적 유효량" 또는 "치료적 충분량"은 피검체에 단일 또는 다중 용량 투여시에, 암 세포 (예를 들어, GCC-발현 종양 세포)와 같은 세포 치료시에, 또는 본원에 기재된 질병을 지닌 피검체를 장기간 치료, 경감, 완화 또는 개선시킴에 있어서 그러한 치료의 부재시에 예상한 것 이상의 효과를 나타내는 항체 분자의 양을 지칭한다. 본원에서 사용된 종양 또는 암의 "성장을 억제하는"이란 그 성장 및/또는 전이를 늦추거나, 방해하거나, 저지하거나 중단시키는 것을 지칭하며 반드시 종양 성장의 전적인 제거를 나타내는 것은 아니다.

[0061] "STAR", "GUC2C", "GUCY2C" 또는 "ST 수용체" 단백질로도 알려진 본원에서 사용된 "GCC"는 포유동물 GCC, 바람직하게는 인간 GCC 단백질을 지칭한다. 인간 GCC는 SEQ ID NO:228로 제시된 단백질 및 이의 자연 발생 대립유전자 단백질 변이체를 지칭한다. SEQ ID NO: 228의 대립유전자는 SEQ ID NO:227에 제시된 GCC의 핵산 서열에 의해 엔코딩될 수 있다. 그 밖의 변이체가 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, [수탁 번호 Ensp0000261170, Ensembl Database, European Bioinformatics Institute and Wellcome Trust Sanger Institute, 잔기 281에 류신을 지님; 공개된 US 특허 출원 번호 US 20060035852호의 SEQ ID NO: 14; 또는 GenBank 수탁 번호 AAB19934]을 참조한다. 전형적으로, 자연 발생 대립유전자 변이체는 SEQ ID NO:228의 GCC 서열과 적어도 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 지닌다. 전사물은 1073개 아미노산의 단백질 생성물을 엔코딩하며, GenBank 수탁 번호 NM_004963으로 기재되어 있다. GCC 단백질은 막횡단 세포 표면 수용체 단백질로서 규정되며, 장보액의 유지, 전해질 항상성 및 세포 증식에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.

[0062] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "알킬"은 약 1 내지 약 20개의 탄소 원자 (및 그 안에 있는 탄소 원자의 범위 및

특정 수의 모든 조합 및 서브조합)를 지니는 포화된 선형 또는 분지형 탄화수소를 지칭하며, 약 1 내지 약 8개의 탄소 원자가 바람직하다. 알킬기의 예는 메틸, 에틸, *n*-프로필, *iso*-프로필, *n*-부틸, *iso*-부틸, *sec*-부틸, *tert*-부틸, *n*-펜틸, 2-펜틸, 3-펜틸, 2-메틸-2-부틸, *n*-헥실, *n*-헵틸, *n*-옥틸, *n*-노닐, *n*-데실, 3-메틸-2-부틸, 3-메틸-1-부틸, 2-메틸-1-부틸, 1-헥실, 2-헥실, 3-헥실, 2-메틸-2-펜틸, 3-메틸-2-펜틸, 4-메틸-2-펜틸, 3-메틸-3-펜틸, 2-메틸-3-펜틸, 2,3-디메틸-2-부틸, 및 3,3-디메틸-2-부틸이다.

[0063] 알킬기는 단독이든 또 다른 기의 부분이든 간에 "치환된다"고 언급될 수 있다. 치환된 알킬기는 -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 기, 바람직하게는 1 내지 3개의 기 (및 할로젠으로부터 선택된 어떠한 추가의 치환기)로 치환된 알킬기이며, 여기서 각각의 R'은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택되고, 상기 -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, 및 -C₂-C₈ 알키닐기는 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 기로 추가로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 각각의 R"은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택된다.

[0064] 달리 언급하지 않는 한 용어 "알케닐" 및 "알키닐"은 약 2 내지 약 20개의 탄소 원자 (및 그 안에 있는 탄소 원자의 범위 및 특정 수의 모든 조합 및 서브조합)를 지니는 선형 및 분지형 탄소 사슬을 지칭하며, 약 2 내지 약 8개의 탄소 원자가 바람직하다. 알케닐 사슬은 사슬에 하나 이상의 이중 결합을 지니고 알키닐 사슬은 사슬에 하나 이상의 삼중 결합을 지닌다. 알케닐기의 예로는 에틸렌 또는 비닐, 알릴, -1-부테닐, -2-부테닐, -이소부틸레닐, -1-펜테닐, -2-펜테닐, -3-메틸-1-부테닐, -2-메틸-2-부테닐, 및 -2,3-디메틸-2-부테닐이 있으나 이로 제한되지 않는다. 알키닐기의 예로는 아세틸레닉, 프로파길, 아세틸레닐, 프로피닐, -1-부티닐, -2-부티닐, -1-펜티닐, -2-펜티닐, 및 -3-메틸-1 부티닐이 있으나 이로 제한되지 않는다.

[0065] 알킬기와 같이, 알케닐 및 알키닐기는 치환될 수 있다. "치환된" 알케닐 또는 알키닐기는 -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 기, 바람직하게는 1 내지 3개의 기 (및 할로젠으로부터 선택된 어떠한 추가의 치환기)로 치환된 것이며, 여기서 각각의 R'은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택되고, 상기 -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, 및 -C₂-C₈ 알키닐기는 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 치환기로 추가로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 각각의 R"은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택된다.

[0066] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "알킬렌"은 약 1 내지 약 20개의 탄소 원자 (및 그 안에 있는 탄소 원자의 범위 및 특정 수의 모든 조합 및 서브조합)를 지니는 포화된 분지쇄 또는 직쇄 탄화수소 라디칼을 지칭하며, 약 1 내지 약 8개의 탄소 원자가 바람직하고 부모 알칸의 동일하거나 두 개의 상이한 탄소 원자로부터의 두 개의 수소 원자를 제거함으로써 유도된 두 개의 일가 라디칼 중심을 지닌다. 전형적인 알킬렌은 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌, 펜틸렌, 헥실렌, 헵틸렌, 옥틸렌, 노닐렌, 데칼렌, 1,4-시클로헥실렌 등을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 알킬렌기는 단독이든 또 다른 기의 부분이든 간에 -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 기, 바람직하게는 1 내지 3개의 기 (및 할로젠으로부터 선택된 어떠한 추가의 치환기)로 치환되거나

치환되지 않을 수 있고, 여기서 각각의 R'은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택되고, 상기 -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, 및 -C₂-C₈ 알키닐기는 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 치환기로 추가로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 각각의 R"는 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택된다.

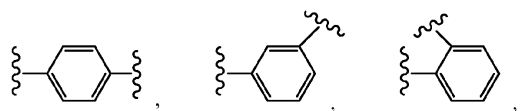
[0067] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "알케닐렌"은 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하는 치환되거나 치환되지 않은 알킬렌기를 지칭한다. 예시적인 알케닐렌기는 예를 들어 에테닐렌 (-CH=CH-) 및 프로페닐렌 (-CH=CHCH₂-)을 포함한다.

[0068] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "알키닐렌"은 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 함유하는 치환되거나 치환되지 않은 알킬렌기를 지칭한다. 예시적인 알키닐렌기는 예를 들어 아세틸렌(-C≡C-), 프로파길 (-CH₂C≡C-), 및 4-펜티닐 (-CH₂CH₂CH₂C≡CH-)을 포함한다.

[0069] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "아릴"은 부모 방향족 고리계의 단일 탄소 원자로부터 하나의 수소 원자를 제거시킴에 의해 유도된 6-20개의 탄소 원자 (및 그 안에 있는 탄소 원자의 범위 및 특정 수의 모든 조합 및 서브조합)의 일가 방향족 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 일부 아릴기는 예시적인 구조에서 "Ar"로서 표시된다. 전형적인 아릴기는 벤젠, 치환된 벤젠, 페닐, 나프탈렌, 안트라센, 바이페닐 등으로부터 유도된 라디칼을 포함하나 이로 제한되지 않는다.

[0070] 아릴기는 단독이든 또 다른 기의 부분이든 간에 -할로젠, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 기, 바람직하게는 1 내지 5개, 또는 심지어 1 또는 2개의 기로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 여기서 각각의 R'은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택되고, 상기 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), 및 -아릴기는 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 치환기로 추가로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 각각의 R"는 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택된다.

[0071] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "아릴렌"은 예시적인 아릴기로서 페닐을 지니며 하기 구조식에서 제시된 대로 오르토, 메타, 또는 파라 배치일 수 있는 이가인 (즉, 부모 방향족 고리계의 동일하거나 두 개의 상이한 탄소 원자로부터 두 개의 수소 원자를 제거함에 의해 유도됨) 치환되거나 치환되지 않은 아릴기를 지칭한다:



[0072] 전형적인 "(C₁-C₈ 알킬렌)아릴", "(C₂-C₈ 알케닐렌)아릴" 및 "-(C₂-C₈ 알키닐렌)아릴"기로는 벤질, 2-페닐에탄-1-일, 2-페닐에탄-1-일, 나프틸메틸, 2-나프틸에탄-1-일, 2-나프틸에탄-1-일, 나프토펜질, 2-나프토펜에탄-1-일 등이 있으나 이로 제한되지 않는다.

[0074] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "헤테로사이클"은 3 내지 14개의 고리 원자 (고리원으로도 지칭됨)를 지니는 모노시클릭, 바이시클릭 또는 폴리시클릭 고리계를 지칭하며, 여기서 하나 이상의 고리에 있는 하나 이상의 고리 원자는 N, O, P, 또는 S (및 그 안에 있는 탄소 원자와 헤테로원자의 범위 및 특정 수의 모든 조합 및 서브조합)

로부터 선택된 헤테로원자이다. 헤테로사이클은 N, O, P, 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 고리 헤테로원자를 지닐 수 있다. 헤테로사이클에 있는 하나 이상의 N, C, 또는 S 원자는 산화될 수 있다. 모노시클릭 헤테로사이클은 바람직하게는 3 내지 7개의 고리원 (예를 들어, 2 내지 6개의 탄소 원자 및 N, O, P, 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자)을 지니고, 바이시클릭 헤테로사이클은 바람직하게는 5 내지 10개의 고리원 (예를 들어, 4 내지 9개의 탄소 원자 및 N, O, P, 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자)을 지닌다. 헤테로원자를 포함하는 고리는 방향족 또는 비방향족일 수 있다. 달리 언급하지 않는 한, 헤테로사이클은 어떠한 헤테로원자 또는 탄소 원자에서 이의 펜던트기에 부착되어 안정한 구조를 생성한다.

[0075] 헤테로사이클은 문헌[Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), in particular Volumes 13, 14, 16, 19, and 28; and *J. Am. Chem. Soc.* 82:5566 (1960)]에 기재되어 있다.

[0076] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "헤테로시클로"는 이가인 (즉, 부모 헤테로시클릭 고리계의 동일하거나 두 개의 상이한 탄소 원자로부터 두 개의 수소 원자를 제거함에 의해 유도됨) 상기 정의된 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클기를 지칭한다.

[0077] "헤테로사이클" 기의 예는 제한하는 것이 아니라 예로서 피리딘, 디히드로피리딘, 테트라히드로피리딘 (피페리딘), 티아졸릴, 피리미디닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 테트라졸릴, 벤조푸라닐, 티아나프탈레닐, 인돌릴, 인돌레닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 2-피롤리도닐, 피롤리닐, 테트라히드로푸라닐, 비스-테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 비스-테트라히드로피라닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 데카히드로퀴놀리닐, 옥타히드로이소퀴놀리닐, 아조시닐, 트리아지닐, 6H-1,2,5-티아디아지닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐, 티에닐, 티안트레닐, 피라닐, 이소벤조푸라닐, 크로메닐, 크산테닐, 페녹사티닐, 2H-피롤릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 1H-인다졸릴, 푸리닐, 4H-퀴놀리지닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 신놀리닐, 프테리디닐, 4H-카르바졸릴, 카르바졸릴, β-카르볼리닐, 페난트리디닐, 아크리디닐, 피리미디닐, 페난트롤리닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 푸라자닐, 페녹사지닐, 이소크로마닐, 크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피페라지닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 퀴누클리디닐, 모르폴리닐, 옥사졸리디닐, 벤조트리아졸릴, 벤즈이속사졸릴, 옥스인돌릴, 벤즈옥사졸리닐, 및 이사티노일을 포함한다. 바람직한 "헤테로사이클" 기로는 벤조푸라닐, 벤조티오펜, 인돌릴, 벤조피라졸릴, 코우마리닐, 이소퀴놀리닐, 피롤릴, 티오펜, 푸라닐, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 퀴놀리닐, 피리미디닐, 피리디닐, 피리도닐, 피라지닐, 피리다지닐, 이소티아졸릴, 이속사졸릴 및 테트라졸릴이 있으나 이로 제한되지 않는다.

[0078] 헤테로사이클기는 단독이든 또 다른 기의 부분이든 간에 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 기, 바람직하게는 1 또는 2개의 기로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 여기서 각각의 R'은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택되고, 상기 -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 및 -아릴기는 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 치환기로 추가로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 각각의 R"은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택된다.

[0079] 제한하지 않고 예로서, 탄소-결합된 헤테로사이클은 하기 위치에서 결합될 수 있다: 피리딘의 위치 2, 3, 4, 5, 또는 6; 피리다진의 위치 3, 4, 5, 또는 6; 피리미딘의 위치 2, 4, 5, 또는 6; 피라진의 위치 2, 3, 5, 또는 6; 푸란, 테트라히드로푸란, 티오프란, 티오펜, 피롤 또는 테트라히드로피롤의 위치 2, 3, 4, 또는 5; 옥사졸, 이미다졸 또는 티아졸의 위치 2, 4, 또는 5; 이속사졸, 피라졸 또는 이소티아졸의 위치 3, 4, 또는 5; 아지리딘

의 위치 2 또는 3; 아제티딘의 위치 2, 3, 또는 4; 퀴놀린의 위치 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8; 또는 이소퀴놀린의 위치 1, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8. 여전히 보다 통상적으로, 탄소 결합된 헤테로사이클은 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 5-피리딜, 6-피리딜, 3-피리다지닐, 4-피리다지닐, 5-피리다지닐, 6-피리다지닐, 2-피리미디닐, 4-피리미디닐, 5-피리미디닐, 6-피리미디닐, 2-피라지닐, 3-피라지닐, 5-피라지닐, 6-피라지닐, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 또는 5-티아졸릴을 포함한다.

[0080] 제한하지 않고 예로서, 질소 결합된 헤테로사이클은 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린, 또는 1H-인다졸의 위치 1; 이소인돌 또는 이소인돌린의 위치 2; 모르폴린의 위치 4; 및 카르바졸 또는 β-카르볼린의 위치 9에 결합할 수 있다. 여전히 보다 통상적으로, 질소 결합된 헤테로사이클은 1-아지리딘, 1-아제테딜, 1-피롤릴, 1-이미다졸릴, 1-피라졸릴, 및 1-피페리디닐을 포함한다.

[0081] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "카르보사이클"은 3 내지 14개의 고리 원자 (및 그 안에 있는 탄소 원자의 범위 및 특정 수의 모든 조합 및 서브조합)를 지니는 포화되거나 불포화된 비-방향족 모노시클릭, 바이시클릭, 또는 폴리시클릭 고리계를 지칭하고, 여기서 모든 고리 원자는 탄소 원자이다. 모노시클릭 카르보사이클은 바람직하게는 3 내지 6개의 고리 원자, 여전히 보다 바람직하게는 5 또는 6개의 고리 원자를 지닌다. 바이시클릭 카르보사이클은 바람직하게는 예를 들어 바이시클로 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로서 정렬된 7 내지 12개의 고리 원자, 또는 바이시클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로서 정렬된 9 또는 10개의 고리 원자를 지닌다. 용어 "카르보사이클"은 예를 들어 아릴 고리에 융합된 모노시클릭 카르보사이클 고리 (예를 들어, 벤젠 고리에 융합된 모노시클릭 카르보사이클 고리)를 포함한다. 카르보사이클은 바람직하게는 3 내지 8개의 탄소 고리 원자를 지닌다.

[0082] 카르보사이클기는 단독이든 또 다른 기의 부분이든 간에 -할로젠, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 기, 바람직하게는 1 또는 2개의 기(및 할로젠으로부터 선택된 어떠한 추가의 치환기)로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 여기서 각각의 R'은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택되고, 상기 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), 및 -아릴기는 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -할로젠, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ 및 -CN을 포함하나 이로 제한되지 않는 하나 이상의 치환기로 추가로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 각각의 R"은 -H, -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, 또는 -아릴로부터 독립적으로 선택된다.

[0083] 모노시클릭 카르보시클릭 치환기의 예로는 -시클로프로필, -시클로부틸, -시클로펜틸, -1-시클로펜트-1-에닐, -1-시클로펜트-2-에닐, -1-시클로펜트-3-에닐, 시클로헥실, -1-시클로헥스-1-에닐, -1-시클로헥스-2-에닐, -1-시클로헥스-3-에닐, -시클로헥틸, -시클로옥틸, -1,3-시클로헥사디에닐, -1,4-시클로헥사디에닐, -1,3-시클로헥타디에닐, -1,3,5-시클로헥타트리에닐, 및 -시클로옥타디에닐이 있다.

[0084] "카르보시클로"는 단독이든 또 다른 기의 부분이든 간에 이가인 (즉, 부모 카르보시클릭 고리계의 동일하거나 두 개의 상이한 탄소 원자로부터 두 개의 수소 원자를 제거함에 의해 유도됨) 상기 정의된 치환되거나 치환되지 않은 카르보사이클기를 지칭한다.

[0085] 문맥에서 달리 지적하지 않는 한, 하이픈 (-)은 펜던트 분자로서의 부착점을 표시한다. 따라서, 용어 "-(C₁-C₈ 알킬렌)아릴" 또는 "-C₁-C₈ 알킬렌(아릴)"은 본원에서 정의된 C₁-C₈ 알킬렌 라디칼을 지칭하고, 여기서 알킬렌 라디칼은 알킬렌 라디칼의 탄소 원자들 중 어느 것에서 펜던트 분자에 부착되고 알킬렌 라디칼의 탄소 원자에 결합된 수소 원자들 중 하나는 본원에 정의된 아릴 라디칼로 대체된다.

[0086] 특정 기가 "치환될" 때, 그 기는 치환기의 목록으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기, 바람직하게는 하나 내지 5개의 치환기, 보다 바람직하게는 하나 내지 3개의 치환기, 가장 바람직하게는 하나 내지 2개의 치환기를 지닐 수 있다. 그러나, 상기 기는 일반적으로 할로젠으로부터 선택된 어떠한 수의 치환기를 지닌다. 치

환된 기들은 그렇게 표시된다.

[0087] 분자에서 임의의 치환기의 정의 또는 특정 위치에서의 변수는 그 분자의 다른 곳에서의 정의와는 관련이 없다. 본 발명의 화합물 상의 치환기 및 치환 패턴은 화학적으로 안정하고 당 분야에 공지된 기술 뿐 아니라 본원에 제시된 방법들에 의해 용이하게 합성될 수 있는 화합물을 제공하도록 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0088] 본원에서 사용된 보호기는 다작용성 화합물의 하나의 반응성 부위를 일시적으로나 영구적으로 선택적으로 차단하는 기를 지칭한다. 본 발명에 사용되는 적합한 히드록시-보호기는 약학적으로 허용되며 화합물이 활성이 되기 위해 피검체에게 투여한 후에 부모 화합물로부터 절단될 필요가 있거나 절단될 필요가 없을 수 있다. 절단은 신체 내에서 정상적인 대사 과정을 통해 수행된다. 히드록시 보호기는 당 분야에 널리 공지되어 있고 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된 문헌[Protective Groups in Organic Synthesis by T. W. Greene and P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3rd Edition)]을 참조하며, 예를 들어 에테르 (예를 들어, 알킬 에테르 및 실릴 에테르, 예컨대 디알킬실릴에테르, 트리알킬실릴에테르, 디알킬알콕시실릴에테르 포함), 에스테르, 카르보네이트, 카르바메이트, 설포네이트, 및 포스페이트 보호기를 포함한다. 히드록시 보호기의 예로는 메틸 에테르; 메톡시메틸 에테르, 메틸티오메틸 에테르, (페닐디메틸실릴)메톡시메틸 에테르, 벤질옥시메틸 에테르, p-메톡시벤질옥시메틸 에테르, p-니트로벤질옥시메틸 에테르, o-니트로벤질옥시메틸 에테르, (4-메톡시페녹시)메틸 에테르, 구아니아콜메틸 에테르, t-부톡시메틸 에테르, 4-펜테닐옥시메틸 에테르, 실록시메틸 에테르, 2-메톡시에톡시메틸 에테르, 2,2,2-트리클로로에톡시메틸 에테르, 비스(2-클로로에톡시)메틸 에테르, 2-(트리메틸실릴)에톡시메틸 에테르, 메톡시메틸 에테르, 테트라히드로피라닐 에테르, 1-메톡시시클로헥실 에테르, 4-메톡시테트라히드로티오피라닐 에테르, 4-메톡시테트라히드로티오피라닐 에테르 S,S-디옥사이드, 1-[2-(2-클로로-4-메틸)페닐]-4-메톡시피페리딘-4-일 에테르, 1-(2-플루오로페닐)-4-메톡시피페리딘-4-일 에테르, 1,4-디옥산-2-일 에테르, 테트라히드로푸라닐 에테르, 테트라히드로티오피라닐 에테르; 치환된 에틸 에테르, 예컨대 1-에톡시에틸 에테르, 1-(2-클로로에톡시)에틸 에테르, 1-[2-(트리메틸실릴)에톡시]에틸 에테르, 1-메틸-1-메톡시에틸 에테르, 1-메틸-1-벤질옥시에틸 에테르, 1-메틸-1-벤질옥시-2-플루오로에틸 에테르, 1-메틸-1-페녹시에틸 에테르, 2-트리메틸실릴 에테르, t-부틸 에테르, 알릴 에테르, 프로파길 에테르, p-클로로페닐 에테르, p-메톡시페닐 에테르, 벤질 에테르, p-메톡시벤질 에테르 3,4-디메톡시벤질 에테르, 트리메틸실릴 에테르, 트리메틸실릴 에테르, 트리프로필실릴에테르, 디메틸이소프로필실릴 에테르, 디에틸이소프로필실릴 에테르, 디메틸헥실실릴 에테르, t-부틸디메틸실릴 에테르, 디페닐메틸실릴 에테르, 벤조일포르메이트 에스테르, 아세테이트 에스테르, 클로로아세테이트 에스테르, 디클로로아세테이트 에스테르, 트리클로로아세테이트 에스테르, 트리플루오로아세테이트 에스테르, 메톡시아세테이트 에스테르, 트리페닐메톡시아세테이트 에스테르, 페닐아세테이트 에스테르, 벤조에이트 에스테르, 알킬 메틸 카르보네이트, 알킬 9-플루오레닐메틸 카르보네이트, 알킬 에틸 카르보네이트, 알킬 2,2,2-트리클로로에틸 카르보네이트, 1,1-디메틸-2,2,2-트리클로로에틸 카르보네이트, 알킬 설포네이트, 메탄설포네이트, 벤질설포네이트, 토실레이트, 메틸렌 아세탈, 에틸리렌 아세탈, 및 t-부틸메틸리텐 케탈이 있으나 이로 제한되지 않는다. 바람직한 보호기는 화학식 -R, -Si(R)(R)(R), -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NH(R), -S(O)₂R, -S(O)₂OH, P(O)(OH)₂, 및 -P(O)(OH)OR로 표시되고, 여기서 R은 C₁-C₂₀ 알킬, C₂-C₂₀ 알케닐, C₂-C₂₀ 알키닐, -C₁-C₂₀ 알킬렌(카르보사이클), -C₂-C₂₀ 알케닐렌(카르보사이클), -C₂-C₂₀ 알키닐렌(카르보사이클), -C₆-C₁₀ 아릴, -C₁-C₂₀ 알킬렌(아릴), -C₂-C₂₀ 알케닐렌(아릴), -C₂-C₂₀ 알키닐렌(아릴), -C₁-C₂₀ 알킬렌(헤테로사이클), -C₂-C₂₀ 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 -C₂-C₂₀ 알키닐렌(헤테로사이클)이고, 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카르보사이클, 및 헤테로사이클 라디칼은 단독이든 또 다른 기의 일부이든 간에 치환되거나 치환되지 않는다.

[0089] 약어 "AFP"는 디메틸발린-발린-돌라이소류신-돌라프로인-페닐알라닌-p-페닐렌디아민을 지칭한다 (아래 화학식 (XVIII) 참조).

[0090] 약어 "'MMAE"는 모노메틸 아우리스타틴 E를 지칭한다 (아래 화학식 (XIII) 참조).

[0091] 약어 "AEB"는 아우리스타틴 E를 파라아세틸 벤조산과 반응시킴에 의해 생산된 에스테르를 지칭한다 (아래 화학식 (XXII) 참조).

[0092] 약어 "AEVB"는 아우리스타틴 E를 벤조일발레르산과 반응시킴에 의해 생산된 에스테르를 지칭한다 (아래 화학식 (XXIII) 참조).

[0093] 약어 "MMAF"는 모노메틸 아우리스타틴 F를 지칭한다 (아래 화학식 (XXI) 참조).

- [0094] 항체
- [0095] 특정 측면에서, 본 발명은 표 1 및 2에 요약된 것들과 같은 특징을 지니는 항-GCC 항체 분자에 관한 것이다. 다른 측면에서, 본 발명은 표 3, 4, 5 및/또는 6에 요약된 것들과 같은 특징을 지니는 항-GCC 항체 분자에 관한 것이다.
- [0096] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 인간 하이브리도마 항체이고 항체 5F9, 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3 및 1D3 중의 하나이다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 항체 5F9, 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3, 또는 1D3으로부터 유래된다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 하이브리도마 5F9에 의해 생산된다 (PTA-8132).
- [0097] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 선택된 림프구 항체이고 항체 Abx-12, Abx-020, Abx-106, Abx-198, Abx-221, Abx-229, Abx-338, 및 Abx-393 중의 하나이다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 항체 Abx-12, Abx-020, Abx-106, Abx-198, Abx-221, Abx-229, Abx-338, 및 Abx-393로부터 유래된다.
- [0098] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 무린 항체이고 항체 mAb 3G1, mAb 8E12, mAb10B8, 및 mAb 8F1 중의 하나이다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 항체 mAb 3G1, mAb 8E12, 및 mAb 8F1로부터 유래된다.
- [0099] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 예컨대 직접 결합 또는 경쟁 결합 검정에 의해 측정된 바와 같이 GCC에 대하여 본원 기재된 범위의 친화력을 지닐 것이다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 1×10^{-6} M 미만, 1×10^{-7} M 미만, 1×10^{-8} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 1×10^{-10} M 미만, 1×10^{-11} M 미만, 1×10^{-12} M 미만, 또는 1×10^{-13} M 미만의 K_d 를 지닌다. 일 구체예에서, 항체 분자는 IgG 또는 이의 항원-결합 단편이고, 1×10^{-6} M 미만, 1×10^{-7} M 미만, 1×10^{-8} M 미만, 또는 1×10^{-9} M 미만의 K_d 를 지닌다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자, 예컨대 5F9 항체 또는 그로부터 유래된 항체는 약 80 내지 약 200 pM, 바람직하게는 약 100 내지 약 150 pM 또는 약 120 pM의 K_d 를 지닌다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자, 예컨대 5F9 항체 또는 그로부터 유래된 항체는 약 0.9 내지 약 $1.25 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 바람직하게는 약 $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 의 k_a 를 지닌다. 일 구체예에서, 항체 분자는 ScFv이고 1×10^{-6} M 미만, 1×10^{-7} M 미만, 1×10^{-8} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 1×10^{-10} M 미만, 1×10^{-11} M 미만, 1×10^{-12} M 미만, 또는 1×10^{-13} M 미만의 K_d 를 지닌다.
- [0100] 일 구체예에서, 항체 분자는 면역원성단백질이 아니고, 즉 "네이키드"이며, 구체예에서 GCC에 결합시에 세포 반응을 일으킨다. 관련 구체예에서, 세포 반응은 항체가 결합된 GCC-발현 세포에 의해 수행된다. 그러한 세포 반응은, 예를 들어 항체 분자가 GCC의 효능제인 경우, GCC에 의해 매개된 신호전달일 수 있다 (예를 들어, US Patent Application publication no. US20040258687호 참조). 다른 구체예에서, 세포 반응은 첫 번째 세포 상의 GCC에 결합된 항체 분자를 인지하는 면역 이펙터 세포 (예를 들어, 천연 킬러 세포)와 같은 두 번째 세포에 의해 수행된다. 일부 구체예에서, 보체 분자와 같은 감시 분자는 세포 반응에 앞서 GCC-결합된 항체 분자와 접촉한다. 이러한 구체예에서의 세포 반응은 GCC-발현 세포의 사멸을 초래할 수 있다.
- [0101] 추가의 구체예에서, 면역원성단백질인 항체 분자는 GCC에 결합시 세포 반응을 야기하는 것과 작용제가 결합된 GCC-발현 세포에 작용제를 전달하기 위해 내재화되는 것 둘 모두가 가능하다.
- [0102] 일부 구체예에서, 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 GCC에 결합하는 블록 리간드일 수 있다.
- [0103] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 래트 GCC와 마우스 GCC 중 하나 또는 둘 모두와 실질적인 교차 반응을 나타내지 못한다.
- [0104] 일 구체예에서, 항체 분자는 GCC:B10, GCC:4D7 또는 GCC:C8이 아니다. 또 다른 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 SEQ ID NO:228의 대략 아미노산 잔기 455 내지 1073인 GCC의 세포내 도메인에 결합하지 않는다. 예를 들어, 이러한 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 GCC의 키나제 상동성 도메인 또는 구아닐릴 시클라제 도메인에 결합하지 않는다.
- [0105] 천연 발생 포유동물 항체 구조 단위는 테트라머의 유형이다. 각각의 테트라머는 두 쌍의 폴리펩티드 사슬을 포함하며, 각 쌍은 하나의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄" (약 50-70 kDa)를 지닌다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 본래 항원 인지의 책임이 있는 약 100개 내지 110개 또는 그 초과 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각 사슬의 카르복시-말단 부분은 본래 이펙터 기능의 책임이 있는 불변 영역을 정의한다. 인간 경쇄는 카

과 및 램다 경쇄로 분류될 수 있다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 엡실론으로서 분류될 수 있고, IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE와 같은 항체의 아이소형을 각각 정의한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결되고, 중쇄는 또한 약 10개 더 많은 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 일반적으로, 문헌[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. 항-GCC 항체 분자에 대한 바람직한 아이소형은 IgG 면역글로불린인데, 이것은 상이한 감마 중쇄를 지니는 네 개의 서브부류인 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 분류될 수 있다. 가장 치료적인 항체는 IgG1 유형의 인간, 키메라, 또는 인간화된 항체이다. 특정 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 IgG1 아이소형을 지닌다.

[0106] 각각의 중쇄 및 경쇄 쌍의 가변 영역은 항원 결합 부위를 형성한다. 따라서, 온전한 IgG 항체는 동일한 두 개의 결합 부위를 지닌다. 그러나, 이작용성 또는 이특이적 항체는 두 개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍을 지니는 인공적인 하이브리드 작제물로서, 두 개의 상이한 결합 부위를 생성한다.

[0107] 사슬들은 모두 상보성 결정 영역 또는 CDR로도 불리는, 세 개의 고가변 영역에 의해 연결된 비교적 보존된 프레임워크 영역 (FR)의 전반적으로 동일한 구조를 나타낸다. 각 쌍의 두 개의 사슬로부터의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 정렬되는데, 이는 특이적 에피토프로의 결합을 가능하게 한다. N-말단에서 C-말단으로, 경쇄 및 중쇄 둘 모두는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각 도메인으로의 아미노산의 할당은 면역학적 관심 단백질의 케이뱃 (Kabat) 서열의 정의 (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 또는 Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989)에 따른다. 본원에서 사용된 대로, CDR은 중쇄 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) 및 경쇄 (LCDR1, LCDR2, LCDR3)의 각각에 대해 지칭된다.

[0108] 항-GCC 항체 분자는 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 무린 항체 중 하나의 중쇄 및 경쇄 중 하나 또는 둘 모두의 CDR의 항원 결합 서브세트 또는 이들 전부를 포함할 수 있다. 가변 영역 및 CDR을 포함하는, 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 무린 항체 부분의 아미노산 서열은 표 3 및 표 5에서 찾아볼 수 있다.

[0109] 따라서, 일 구체예에서, 항체 분자는 하기 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다:

[0110] (a) 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 무린 항체 중 하나의 1개, 2개, 3개 또는 항원 결합 수의 경쇄 CDR (LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3). 일 구체예에서, CDR(들)은 LCDR1-3 중의 하나 이상 또는 이들 모두의 아미노산 서열을 포함할 수 있다: LCDR1, 또는 하나 내지 7개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 LCDR1; LCDR2, 또는 하나 또는 2개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 LCDR2; 또는 LCDR3, 또는 하나 또는 2개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 LCDR3; 및

[0111] (b) 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 무린 항체 중 하나의 1개, 2개, 3개 또는 항원 결합 수의 중쇄 CDR (HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3). 일 구체예에서, CDR(들)은 HCDR1-3 중의 하나 이상 또는 이들 모두의 아미노산 서열을 포함할 수 있다: HCDR1, 또는 하나 또는 2개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 HCDR1; HCDR2, 또는 하나 내지 4개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 HCDR2; 또는 HCDR3, 또는 하나 또는 2개의 아미노산이 보존적으로 치환된 변형된 HCDR3.

[0112] 항-GCC 항체의 생산을 위해 유용한 면역원은 GCC, 예컨대 인간 GCC-발현 세포 (예를 들어, 종양 세포주, 예컨대 T84 세포, 또는 신선하거나 동결된 결장 종양 세포, GCC를 발현시키는 재조합 세포); GCC-발현 세포의 막 분획 (예를 들어, 결장 종양 세포주, 예컨대 T84 세포, 또는 신선하거나 동결된 결장 종양 세포, GCC를 발현시키는 재조합 세포, 예컨대 전장 GCC 또는 이의 일부를 발현시키는 HT-29-GCC#2 세포, 예컨대 GCC 세포의 도메인, 예를 들어 SEQ ID NO:318을 포함하는 부분을 발현시키는 CHO GCC #27 세포); 분리되거나 정제된 GCC, 예를 들어, 인간 GCC 단백질 (예컨대, 생화학적으로 분리된 GCC, 예를 들어 GCC를 발현시키는 위창자 종양 세포 또는 재조합 세포 또는 이의 변이체로부터 분리됨), 또는 이의 부분 (예를 들어, GCC의 세포외 도메인, GCC의 키나제 상동성 도메인 또는 GCC의 구아닐릴 시클라제 촉매 도메인, 또는 예를 들어 SEQ ID NO:228의 적어도 약 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28 또는 32개의 아미노산 잔기를 포함하는, 이의 일부에 상응하는 펩티드); 또는 SEQ ID NO:229를 포함하거나 신호 서열 없이 (즉, SEQ ID NO:229의 아미노산 잔기 1 내지 약 21 또는 23 없이) 이의 성숙 부분을 포함하는 면역원, 예를 들어 성숙 TOK107-hIgG 단백질, SEQ ID NO:317를 포함한다.

[0113] 면역원은 이중 서열에 융합되어 생화학적 조작, 정제, 면역화 또는 항체 역가 측정을 도울 수 있다. 그러한 면역원은 GCC의 일부, 예를 들어 세포외 도메인, 및 비-GCC 폴리펩티드를 포함하는 부분을 포함할 수 있다. 정제

또는 친화력 컬럼 또는 미세역가 플레이트와 같은 고체 지지체 또는 다른 적합한 검정 기질/칩 상에 고정화가 용이하도록 융합 단백질을 작제하기 위한 다수의 옵션이 존재한다. 예를 들어, 융합 모이어티는 글루타티온에 결합할 수 있는 도메인, 예를 들어 글루타티온-S-트랜스퍼라제/키나제 (GST); 단백질 A 또는 단백질 G에 결합할 수 있는 면역글로불린의 Fc 영역; 친화력 컬럼 상에서 니켈 또는 코발트에 결합할 수 있는 아미노산 잔기, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 바람직하게는 6개의 히스티딘 잔기; 태그-특이적 항체에 결합할 수 있는 에피토프 태그, 예컨대 c-myc 종양유전자의 일부 (myc-태그), FLAG 태그 (U.S. Patent No. 4,703,004), 헤마글루티닌 (HA) 태그, T7 유전자 10 태그, V5 태그, HSV 태그, 또는 VSV-G 태그; 또는 스트렙타비딘에 결합할 수 있는 보조인자, 예를 들어 비오틴을 부가할 수 있다.

[0114] 면역글로불린의 Fc 부분을 포함하는 면역원은 효율적인 항체 생성을 위해 숙주 면역 감시 구성요소가 GCC 에피토프에 구조적으로 접근할 수 있는 배치에서, 용해 상태로 또는 세포에 부착된 채로 GCC를 유지할 수 있다. Fc 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄가 사슬간 이황화 결합을 통해 이합체에 결합되므로, Fc 영역과의 융합으로부터 생성된 면역원은 이합체이다. 융합 단백질의 결합가는 Fc 영역을 제공하는 면역글로불린의 유형을 반영할 수 있다. 예를 들어, IgG 단백질을 지니는 융합체는 이합체일 수 있고, IgA 융합체는 테트라머 면역원을 만들 수 있으며, IgM 융합체는 데카머 면역원을 만들 수 있는데, 나중 두 개는 J 사슬의 공동-트랜스펙션으로 촉진된다. Fc 융합 단백질에 대한 예시적인 면역글로불린은 IgG1이다. 사용된 부분은 전형적으로 단일 엑손에 의해 인코딩된 CH3, CH2 도메인 및 IgG1 힌지를 지닌다. 이러한 엑손은 또한 경쇄로부터의 시스테인을 지니는 이황화 결합으로 배향된 시스테인을 지니는 CH1 영역의 부분을 지니기 때문에, 유용한 변형은, 융합 단백질에서 페어링되지 않은 시스테인이 확실히 없도록 하기 위해 CH1 시스테인을 예를 들어 세린으로 돌연변이시키는 것이다. 그러한 돌연변이는 또한 힌지의 가요성을 증가시킨다.

[0115] 마우스, 래트, 토끼, 염소와 같은 숙주 종의 면역화를 위해 면역원에 융합되는 비-숙주 종으로부터 유래된 Fc 부분, 예컨대 인간 Ig Fc 영역은 애쥬번트로서 작용한다. 이러한 애쥬번트 기능은 Fc 및 GCC 에피토프 둘 모두에 대해 특이적 항체를 촉발시킬 수 있다. Fc-반응성 항체는 스크리닝 동안 확인되고 폐기될 수 있다. Fc 부분은 야생형 서열 또는 이펙터 기능을 변형시키기 위해 돌연변이된 서열을 지닐 수 있다. 예를 들어, 돌연변이된 불변 영역 (변이체)이 융합 단백질에 혼입되어 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 보체를 고정하는 능력을 최소화할 수 있다 (예를 들어, Winter et al., GB 2,209,757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351호 참조). 바람직한 예에서, Fc 영역 표준에 따라 넘버링된 리신 235 및 글리신 237이 예를 들어 알라닌으로 돌연변이된다. Fc-돌연변이된 IgG를 지니는 면역원/융합 단백질은 숙주에서 Fc 수용체와의 감소된 상호작용을 지닐 수 있다. 바람직한 가용성 면역원 융합 단백질 (신호 펩티드를 절단하기 위한 돌연변이 및 분비 후)은 TOK-107-hIgG (alt. name hGCC-ECD/hIgG1 Fc)인데, 이것은 돌연변이된 인간 IgG1 면역글로불린 Fc (SEQ ID NO:317)에 융합된 SEQ ID NO:228의 아미노산 잔기 24 내지 430으로 구성된다.

[0116] 세포-발현된 면역원을 제조하기 위해, 면역글로불린 부분을 구조화하여 B 세포 수용체의 면역글로불린 부분을 모방할 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역은 Fc γ 수용체, Fc α 수용체, Fc α /m 수용체 또는 Fc ϵ 수용체와 같은 면역 수용체로부터의 트랜스멤브레인 영역을 포함하는 폴리펩티드에 추가로 융합될 수 있다. 세포 표면 상에 적절히 노출된 그러한 Fc 수용체 세포-결합된 면역원의 적절한 배향은 면역원 융합 단백질을 발현시키는 세포가 항원 수용체 복합체의 추가 구성요소, 예를 들어 B 세포 IgM 수용체 또는 IgD 수용체를 추가로 포함하는 경우, 개선될 수 있다. 복합체의 적합한 구성요소는 헤테로이합체를 형성하는 면역글로불린 (Ig) 시에 (sheath) 단백질, 예컨대 MB-1 및 B29 (CD79A and CD79B; Hombach et al. *Eur. J. Immunol.* 20:2795-2799 (1990) for IgM receptor)을 포함한다. Ig 시에 단백질은, 예를 들어 B 세포 림프종 세포주를 트랜스펙션하는 경우, 트랜스펙션된 세포에 의해; 또는 예를 들어 분리된 백터나 동일한 백터에서, 시에 단백질을 이용한 면역원의 공동-트랜스펙션에 의해 내생적으로 제공될 수 있다. 마우스에서 면역화에 바람직한 IgG 시에 단백질은 마우스 CD79a 및 CD79b이다 (각각 GenBank 수탁 번호 NM_007655 및 NM_008339). 바람직한 세포-결합된 면역원 융합 단백질은 (신호 펩티드를 절단하기 위한 성숙화 및 세포 표면으로의 전위 후) 마우스 IgG2a (예를 들어, GenPept 수탁 번호 AAB59661) 트랜스멤브레인 및 세포내 도메인 (SEQ ID NO:318)에 융합된 TOK-107hIgG (hGCC-ECD/hIgG1 Fc)로 구성된 TOK111 생성물이다.

[0117] 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자, 예를 들어 모노클로날 항체, 인간 항체 또는 인간화된 항체가 결합할 수 있는 GCC 분자로부터의 유용한 에피토프, 예를 들어 참조 에피토프는 GCC의 세포외 부분에서 발견될 수 있다. 그러한 GCC 에피토프는 세포 표면 상에서, 예를 들어 세포 외부에서 항체 분자에 결합할 수 있다.

[0118] 예를 들어, 항-GCC 항체 분자에 대한 에피토프는 SEQ ID NO:228의 잔기 1-50, 또는 본 발명의 항-GCC 항체 분자에 결합하는 이의 단편, 예를 들어 이의 5F9-결합 단편 내에 있거나, 이로부터의 잔기(들)를 포함할 수 있다.

그러한 단편은 SEQ ID NO:228의 잔기 1-25, 5-30, 10-35, 15-40, 20-45, 25-50, 5-45, 10-40, 15-35, 20-30 또는 33-50을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 항-GCC 항체 분자, 예를 들어 5F9 항체에 대한 에피토프는 SEQ ID NO:228의 잔기 50을 넘어서, 즉 대략 잔기 50 내지 1073으로부터 선택된 GCC 아미노산 서열에 있는 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기를 추가로 포함하는 입체형태적 에피토프이다.

[0119] 또 다른 예에서, 항-GCC 항체 분자에 대한 에피토프는 SEQ ID NO:225, 또는 SEQ ID NO:228의 잔기 271-300, 또는 본 발명의 항-GCC 항체 분자에 결합하는 이의 단편, 예를 들어 이의 ABX-198-, 3G1-, 8F1-, 또는 10B8-결합 단편 내에 있거나, 이로부터의 잔기(들)를 포함할 수 있다. 그러한 단편은 SEQ ID NO:228의 잔기 281-290, 또는 잔기 281이 류신인 SEQ ID NO:228의 잔기 281-290, 또는 SEQ ID NO:228의 잔기 281-300 또는 잔기 271-290을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, ABX-198-, 3G1-, 8F1-, 또는 10B8 항체와 같은 항-GCC 항체 분자에 대한 에피토프는 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기, 즉 예를 들어, SEQ ID NO:228의 대략 잔기 1 내지 270 및/또는 대략 301 내지 1073으로부터 선택된, GCC 아미노산 서열의 비-SEQ ID NO:225 잔기를 추가로 포함하는 입체 형태적 에피토프이다.

[0120] 또 다른 예에서, 항-GCC 항체 분자에 대한 에피토프는 SEQ ID NO:226, 또는 SEQ ID NO:228의 잔기 351-375, 또는 본 발명의 항-GCC 항체 분자에 결합하는 이의 단편, 예를 들어 이의 ABX-012-, ABX-338-, 또는 ABX-106-결합 단편 내에 있거나, 이로부터의 잔기(들)를 포함할 수 있다. 그러한 단편은 SEQ ID NO:228의 356-370, 또는 SEQ ID NO:228의 잔기 351-370, 또는 SEQ ID NO:228의 잔기 356-375를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, ABX-012-, ABX-338-, 또는 ABX-106 항체와 같은 항-GCC 항체 분자에 대한 에피토프는 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기, 즉 예를 들어 SEQ ID NO:228의 대략 잔기 1 내지 350 및/또는 대략 376 내지 1073으로부터 선택된, GCC 아미노산 서열의 비-SEQ ID NO:226 잔기를 추가로 포함하는 입체형태적 에피토프이다.

[0121] 그러한 에피토프 또는 세포의 도메인, 예를 들어 SEQ ID NO:228의 아미노산 잔기 24 내지 420, 또는 이의 참조 부분, 예컨대 GCC의 잔기 24 내지 75, 75 내지 150, 150 내지 225, 225 내지 300, 300 내지 375 또는 375 내지 420 내에 있거나 이로부터의 잔기(들)를 포함하는 에피토프에 대해 생성된 항체, 또는 그로부터 유래된 항체 분자는 본원에 기재된 치료적 또는 진단적 항체로서 유용할 수 있다.

[0122] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 하기 성질 중 하나 이상을 지닌다:

[0123] a) 상기 분자는 결합, 예를 들어 세포 표면 GCC 또는 정제된 GCC와의 결합에 대해 표 1 및 2에 요약된 상기 언급된 항-GCC 항체 분자 중 하나, 예를 들어 인간 하이브리도마 항체 (예컨대, 5F9), 선택된 림프구 항체 (예컨대, Abx-229), 또는 무린 항체 (예컨대, 3G1)와 경쟁한다.;

[0124] b) 상기 분자는 표 1 및 2에 요약된 상기 언급된 항-GCC 항체 분자, 예를 들어 인간 하이브리도마 항체 (예컨대, 5F9), 선택된 림프구 항체 (예컨대, Abx-229), 또는 무린 항체 (예컨대, 3G1) 중 하나로서 GCC 상의 동일하거나 실질적으로 동일한 에피토프에 결합한다. 일 구체예에서, 항체는 펩티드 어레이 검정 중 하나 이상에 의해 또는 세포 표면이나 막 제조물 상에서 발현된 트렁케이션 돌연변이체, 키메라 또는 점 돌연변이체로의 결합에 의해 측정된 바와 같이, 동일한 에피토프에 결합하며, 예를 들어, 그러한 검정은 본원에 기재된 바와 같다;

[0125] c) 상기 분자는 표 1 및 2에 요약된 상기 언급된 항-GCC 항체 분자, 예를 들어 인간 하이브리도마 항체 (예컨대, 5F9), 선택된 림프구 항체 (예컨대, Abx-229), 또는 무린 항체 (예컨대, 3G1) 중 하나의 에피토프와 공통된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 또는 20개의 연속하는 아미노산 잔기를 지니는 에피토프에 결합한다;

[0126] d) 상기 분자는 본 발명의 항-GCC 항체에 의해 결합된 인간 GCC의 영역에 결합하는데, 상기 영역, 예를 들어 세포의 또는 세포질 영역의 길이는 10-15, 10-20, 20-30, 또는 20-40개 잔기이고, 결합은 예를 들어 트렁케이션 돌연변이체와의 결합에 의해 측정된다; 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 인간 GCC의 세포외 영역에 결합한다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 SEQ ID NO:228의 아미노산 잔기 24 내지 420에 의해 정의된 세포외 도메인의 인간 GCC 부분에 결합할 수 있다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 SEQ ID NO:228의 아미노산 잔기 931 내지 954에 있는 구아닐레이트 시클라제 서명 부위에 결합할 수 있다; 또는

[0127] e) 상기 분자는 본원에 기재된 참조 에피토프에 결합한다.

[0128] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 GCC 서열 ILVDFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLS (SEQ ID NO:225)에 결합한다.

[0129] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 GCC 서열 FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (SEQ ID NO:226)에 결합한다.

[0130] 일 구체예에서, 항체 분자는 입체형태적 에피토프에 결합한다. 다른 구체예에서, 항체 분자는 선형 에피토프에

결합한다.

- [0131] 항-GCC 항체 분자는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 일특이적 항체, 키메라 항체 (U.S. Pat. No. 6,020,153 참조) 또는 인간 또는 인간화된 항체 또는 이의 항체 단편 또는 유도체일 수 있다. 상기 중 어느 것의 합성 및 유전적으로 공학처리된 변이체 (U.S. Pat. No. 6,331,415 참조)가 또한 본 발명에서 고려된다. 모노클로날 항체는 통상적인 무린 모노클로날 항체 방법, 예를 들어 문헌[Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975)]의 표준 체세포 하이브리드화 기술을 포함하는 다양한 기술에 의해 생산될 수 있다. 일반적으로, 문헌[Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]을 참조한다.
- [0132] 단백질, 예를 들어 GCC 또는 가용성 부분, 또는 GCC의 부분을 포함하는 융합 단백질 (예컨대, TOK107-hIg), 또는 세포 또는 그로부터의 막 분획, 예컨대 표면-노출된 GCC를 발현시키는 세포 또는 이의 부분 (예컨대, pLKTOK4 생성물 또는 pLKTOK111 생성물)으로의 면역화는 예를 들어 완전 프로인트 애주번트와 같은 애주번트를 함께 반응을 유도하는 방식으로 주입을 위해 제조된 면역원을 이용하여 수행될 수 있다. 다른 적합한 애주번트로는 TITERMAX GOLD® 애주번트 (CYTRX Corporation, Los Angeles, CA) 및 알룸이 있다. 소형 펩티드 면역원은 키홀 림펫 헤모시아닌과 같은 더 큰 분자에 결합될 수 있다. 예컨대 피하, 정맥내 또는 근내의 다수 부위에서, 예를 들어 복막 (i.p.), 꼬리 아래, 또는 발바닥(foot pad), 또는 iP 및 꼬리 아래 (BIP)와 같이 조합된 부위에서 다수의 방식으로 마우스에게 주입할 수 있다. 부스터 주입은 동일하거나 상이한 면역원을 포함할 수 있고, 불완전 프로인트 애주번트와 같은 애주번트를 추가로 포함할 수 있다. DNA, 예를 들어 GCC를 엔코딩하는 DNA 또는 이의 일부 또는 GCC를 포함하는 융합 단백질 또는 이의 일부 (예를 들어, TOK107-hIg를 엔코딩하는)로의 면역화는 유전자 총 기술을 이용하여 주입될 수 있다. 예를 들어, DNA를 현미경 금 입자 상에 로딩하고, 짧은 기간 동안 빈번한 간격으로 마우스에게 주입하다.
- [0133] 일반적으로, 모노클로날 항체가 요망되는 경우, 무한증식 세포주 (예를 들어, 골수종 세포주, 예컨대 SP2/0, P3X63Ag8.653 또는 헤테로골수종)로부터의 적합한 세포를 항체-생산 세포와 융합시킴에 의해 하이브리도마를 생산한다. 항체-생산 세포는 인간, 인간-항체 유전자이식 동물 또는 관심있는 항원으로 면역된 다른 적합한 동물의 말초혈 또는, 바람직하게는 비장 또는 림프절로부터 수득할 수 있다. 인간 기원의 항체 (예를 들어, 인간 항체)를 생산하는 세포는 적합한 방법을 이용하여, 예를 들어 인간 항체-생산 세포와 헤테로골수종 또는 트리오마의 융합, 또는 엡스타인 바 바이러스로의 감염에 의한 활성화된 인간 B 세포의 무한증식화를 이용하여 생산될 수 있다 (예컨대, U.S. Patent No. 6,197,582 (Trakht); Niedbala *et al.*, *Hybridoma*, 17:299-304 (1998); Zanella *et al.*, *J Immunol Methods*, 156:205-215 (1992); Gustafsson *et al.*, *Hum Antibodies Hybridomas*, 2:26-32 (1991) 참조). 융합되거나 무한증식된 항체-생산 세포 (하이브리도마)는 선택적인 배양 조건을 이용하여 분리될 수 있고, 제한 희석에 의해 클로닝될 수 있다. 요망되는 특이성을 지니는 항체를 생산하는 세포를 적합한 검정을 이용하여 (예를 들어, ELISA (예컨대, 미세역가 웰에 고정된 TOK107-hIgG와 같은 면역원 이용) 또는 GCC 또는 이의 일부를 발현하는 세포, 예를 들어 pLKTOK111 생성물을 발현시키는 세포 상에서의 FACS에 의해) 확인할 수 있다. 예를 들어, GCC-면역원이 친화력 시약인 융합 모이어티를 포함하는 경우, 이러한 모이어티는 단백질 G-코팅되거나, 스트렙타비딘-코팅되거나, 글루타티온-유도체화되거나 항체-코팅된 미세역가 플레이트 또는 검정 칩과 같은 매트릭스에 GCC 또는 이의 일부를 포함하는 융합 단백질을 결합시킬 수 있고, 그 후 플레이트 및 칩은 하이브리도마 또는 항체-발현 재조합 세포로부터의 조건화된 배지 또는 면역 혈청과 조합되고, 혼합물은 복합체 형성을 유도하는 조건하에 (예컨대, 염 및 pH에 대한 생리적 조건에서) 인큐베이션된다. 인큐베이션 후에, 미세역가 플레이트 웰 또는 칩 세포를 세척하여 어떠한 결합되지 않은 구성요소를 제거하고 항-GCC 항체에 의한 결합을 측정한다.
- [0134] 구체예에서, 치료적 용도를 위해, 본 발명의 항체는 인간 또는 인간화된 항체이다. 인간 또는 인간화된 항체의 이점은 이들이 숙주 수용체에서 항체의 면역원성을 잠재적으로 감소시키거나 제거함으로써 생체이용률을 증가시키고 불리한 면역 반응의 가능성을 감소시켜, 잠재적으로 다수의 항체 투여를 가능하게 한다는 것이다.
- [0135] 변형된 항체는 인간화된, 키메라 또는 CDR-그래프트된 항체를 포함한다. 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 반응은 키메라 또는 다른 인간화된 항체를 발생시켰다. 키메라 항체는 인간 불변 영역 및 무린 가변 영역을 지니지만, 특정 인간 항-키메라 항체 (HACA) 반응은 특히 항체의 상습 또는 다수-용량 사용시에 관찰될 것으로 예상된다. 그러한 무린 또는 래트 유래 단백질의 존재는 항체의 신속한 청소를 일으킬 수 있거나 환자에 의한 항체에 대한 면역 반응의 생성을 일으킬 수 있다. 무린 또는 래트 유래 항체의 사용을 막기 위해, 서열들을 항체 서열에 도입시켜 서열들이 인간 항체 서열에 더 근접해진 인간화된 항체, 또는 설치류가 완전한 인간 서열을 지니는 항체를 생산하도록 인간 항체 기능을 설치류에 도입시킴에 의해 생성된 완전한 인간 항체가 개발되어 왔다. 인간

항체는 무린, 토끼, 또는 래트 가변 및/또는 불변 영역을 소유하는 항체와 관련된 특정 문제들을 일으키지 않는다.

[0136] 인간 항체

[0137] 완전한 인간 항체 분자는 마우스 또는 마우스-유도체화된 mAb에 본질적인 면역원성 및 알레르기 반응을 최소화 하므로 투여된 항체의 효능 및 안전성을 증가시킬 수 있다. 완전한 인간 항체 분자의 이용으로 염증, 자가면역 성 및 암과 같은 반복된 항체 투여를 필요로 하는 만성 및 재발성 인간 질환의 치료에서 실질적인 이점을 제공할 수 있다. 또한, 인간 항체 분자는 동물의 항체 유전자 발현이 억제되거나 인간 항체 분자 유전자 발현으로 기능적으로 대체된 유전학적으로 공학처리된 동물의 스트레인을 이용하여 생산될 수 있다.

[0138] 인간 항체를 제조하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 인간 항체를 제조하는 한 가지 방법은 유전자이식 마우스와 같은 유전자이식 동물을 사용한다. 이러한 유전자이식 동물은 자신의 유전체로 삽입된, 기능적 재배열을 수행할 수 있는 인간 항체 생산 유전체의 실질적인 부분, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자좌를 함유하고, 항체의 생산에 있어서 동물 자신의 내인성 항체 생산은 불충분하게 된다. 그러한 유전자이식 동물을 제조하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 그러한 유전자이식 동물은 XENOMOUSE™ 기술을 이용하거나 "미니유전자좌(minilocus)" 접근법을 이용함에 의해 제조될 수 있다. XENOMICE™을 제조하는 방법은 본원에 참조로서 포함된 U.S. Pat. Nos. 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598 및 6,075,181에 기재되어 있다. "미니유전자좌" 접근법을 이용하여 유전자이식 동물을 제조하는 방법은 각각이 본원에 참조로서 포함된 U.S. Pat. Nos. 5,545,807, 5,545,806 및 5,625,825; 또한 International Publication No. WO93/12227에 기재되어 있다. 다른 유전자이식 인간 항체-생산 마우스는 HUMAB-MOUSE®, KIRIN TC MOUSE® 트랜스크로모솜 마우스, KM-MOUSE®(MEDAREX, Princeton, NJ)을 포함한다.

[0139] 인간 항체 유전자이식 동물 기술, 예를 들어 XENOMOUSE™ 기술을 이용하여, XENOMOUSE™ 마우스 (Abgenix, Fremont, Calif.)를 관심있는 항원으로 면역시킴에 의해 인간 항체를 수득할 수 있다. 림프 세포 (예컨대, B-세포)를 항체를 발현하는 마우스로부터 회수한다 (예컨대, 비장 조직으로부터 분리됨). 이렇게 회수된 세포를 골수-형 세포주와 융합시켜, 표준 방법을 이용하여 무한증식 하이브리도마 세포주를 제조할 수 있다. 이러한 하이브리도마 세포주를 스크리닝하고 선택하여, 관심있는 항원에 특이적인 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 확인할 수 있다.

[0140] 인간-항체 유전자이식 동물은 요망되는 성질, 예컨대 특이성 및 친화력을 지니는 항체를 엔코딩하는 핵산이 풍부할 수 있는 핵산의 공급원을 제공한다. 예를 들어, 항체 또는 항체 가변 영역을 엔코딩하는 핵산은 GCC 단백질 또는 이의 변이체 또는 부분으로 면역된 인간-항체 유전자이식 마우스로부터 분리될 수 있다. 분리된 핵산 또는 이의 일부는 (예를 들어, 가변 영역, CDR, 프레임워크 영역을 엔코딩하는 부분) 임의의 적합한 방법 (예를 들어, 파지 디스플레이)을 이용하여 발현되어 GCC 단백질에 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편이 풍부한 항체 또는 항체의 항원-결합 단편 (예컨대, 단쇄 항원-결합 단편, 이중쇄 항원-결합 단편)의 라이브러리를 생산할 수 있다. 그러한 라이브러리는 면역된 인간-항체 유전자이식 동물에서 생산된 항체의 레퍼토리에 비해 개선된 다양성 (예컨대, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 페어링을 통한 조합적인 다양성)을 나타낼 수 있다. 라이브러리를 임의의 적합한 검정 (예컨대, GCC 단백질 결합 검정)을 이용하여 스크리닝하여 요망되는 성질 (예를 들어, 특이성, 친화력)을 지니는 항체 또는 항원-결합 단편을 확인할 수 있다. 요망되는 성질을 지니는 항체 또는 항원-결합 단편을 엔코딩하는 핵산은 임의의 적합한 방법을 이용하여 회수될 수 있다 (예를 들어, U.S. Patent No. 5,871,907 (Winter et al.) and U.S. Patent No. 6,057,098 (Buechler et al.) 참조).

[0141] 대안적으로, 항체는 하이브리도마 세포주 이외의 세포주에서 발현될 수 있다. 보다 구체적으로, 특정 항체를 엔코딩하는 서열들을 항체를 생산하는 세포로부터 클로닝하고 적합한 포유동물 숙주 세포의 형질전환에 이용할 수 있다. 바람직한 방법에서, 면역된 마우스로부터의 비장 및/또는 림프절 림프구를 본원에 참조로서 포함된 문헌[Babcock et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 7843-8 (1996)]에 이전에 기재된 바와 같이 마우스로부터 분리하고 플라크 검정으로 플레이팅한다. 간단히 말하면, 세포를 GCC 항원으로 코팅된, 양 적혈구를 지니는 아가에 플레이팅하고, GCC 항원에 대해 mAb를 분비하는 세포를 보체로 정하고 mAb 생산 세포의 바로 주위에 있는 적혈구를 용해시킨다. 제거된 플라크 내에 있는 세포를 면역글로불린 서열의 서열화 및 발현 벡터로의 서브클로닝을 위해 취한다. GCC 특이적 mAb를 함유하는 일시적으로 트랜스펙션된 세포로부터의 상청액을 후속하여 ELISA에 의해 그리고 세포와의 결합에 대해서는 흐름 세포측정법에 의해 스크리닝하였다. 특정 에피토프에 결합하는 CDR을 포함하는 생산된 인간 항체의 가변 서열 또는 이의 일부는 변형된 항체의 생산을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 작제물의 이동 용이성, 작제물의 증가된 발현, 및/또는 전장 항체를 발현시킬 수 있는 벡터

로의 작제물 혼입을 위해 생산된 항체의 가변 영역을 발현 카세트에 스플라이싱할 수 있다, 예컨대 US20060147445호 참조. 특정 구체예에서, 발현 카세트는 IgG1 아이소형의 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[0142] 선택된 림프구 항체 방법 (SLAM, U.S. Pat. No. 5,627,052, Babcook et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7843-7848 (1996) 참조)을 또한 이용하여 관심있는 항체를 제공할 수 있는 세포를 확인할 수 있다. SLAM에서, B-세포를 직접 배양하여, 전형적으로 마우스에 의해 본래 생성된 단지 적은 비율의 항체만을 포획하는 하이브리도마 기술을 회피한다. 마이크로플레이트-기반 검정을 이용하여, B-세포를 수 일의 기간에 걸쳐 신속하게 검정한다. 전형적으로 수 천개의 개개의 항원-특이적, 예를 들어 GCC-특이적 모노클로날 항체를 나타내는, 수 천개의 항원-반응성 세포-클론이 확인된다. 단일 실험에서 확인된 상이한 항원-반응성 모노클로날 항체의 수는 전형적으로 다수 배로 증가한다. 친화성 및 기능에 의해 항체를 측정하고 랭킹하는 추가의 신속한 마이크로플레이트-기반 검정을 적용시킨 후에, 극히 고품질의 항체를 생산하는 개개의 B-세포 클론을 선택할 수 있다. 또한, 하이브리도마 생성 단계를 우회함에 의해, 생산은 재조합 제조 세포주로 신속하게 이동할 수 있다. 기술을 이용하여 선택된 개개의 B 세포를 분리하고, 항체 유전자를 제조용 세포주에 직접 도입시킬 수 있다. 그 후, 생성된 세포주를 하이브리도마 세포주 개발에 요구되는 것과 본질적으로 동일한 타임라인에 걸쳐서 임상 시험 테스트를 위해 개발할 수 있다.

[0143] 인간 mAb 5F9 (IgG2, 카파)는 하이브리도마 46.5F9.8.2로도 지칭되는 하이브리도마 5F9에 의해 생산될 수 있는데, 상기 하이브리도마는 2007년 1월 10일에 Millennium Pharmaceuticals Inc. (40 Landsdowne Street, Cambridge, MA, 02139, USA)을 위해 American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, U.S.A.)에 수탁 번호 PTA-8132하에 기탁되었다 (기탁물은 특허 절차를 위한 미생물 기탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약의 요건에 따라 이를 만족하도록 제조되었다). 본 발명은 하이브리도마 5F9, 이것이 생산하는 항체, 이의 항원-결합 단편, 및 항체 및 이의 부분을 엔코딩하는 핵산에 관한 것이다 (예를 들어, 중쇄, 중쇄 가변 영역, 경쇄, 경쇄 가변 영역, CDR). 본원에 기재된 대로, 하이브리도마 5F9는 IgG2, 카파 항체를 생산한다.

[0144] 인간화 및 디스플레이 기술 및 항체에 대한 변형

[0145] 상기 논의된 대로, 감소된 면역원성을 갖는 항체를 생산하는 것이 유리하다. 이것은 적절한 라이브러리를 이용한 디스플레이 기술 및 인간화의 기술과 관련하여 달성될 수 있다. 무린 항체 또는 다른 종으로부터의 항체는 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 인간화될 수 있거나 영장류화될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 문헌[Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) and Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992)]을 참조한다. 관심있는 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 공학처리되어 CH1, CH2, CH3, 힌지 도메인, 및/또는 프레임워크 도메인을 상응하는 인간 서열로 대체할 수 있다 (WO 92/02190 and U.S. Pat. Nos. 5,530,101, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,792, 5,714,350, and 5,777,085 참조). 또한, 키메라 면역글로불린 유전자의 작제를 위한 Ig cDNA의 이용이 당 분야에 공지되어 있다 (Liu et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:3439 (1987) and *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). mRNA를 하이브리도마 또는 항체를 생산하는 다른 세포로부터 분리하여 cDNA를 생산하기 위해 이용한다: 관심있는 cDNA는 특수한 프라이머를 이용하여 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 증폭될 수 있다 (U.S. Pat. Nos. 4,683,195 and 4,683,202).

[0146] 대안적으로, 파지 디스플레이 기술 (예를 들어, McCafferty et al, *Nature*, 348:552-553 (1990) 참조)을 이용하여 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자, 예컨대 면역화되지 않은 공여체의 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관내에서 생산할 수 있다. 이러한 기술에 따라서, 항체 V 도메인 유전자를 M13 또는 fd와 같은 필라멘트형 박테리오파지의 메이저 또는 마이너 코트 단백질 유전자로 인-프레임 (in-frame) 클로닝하고, 파지 입자의 표면 상에서 작용성 항체 단편으로서 디스플레이한다. 필라멘트형 입자가 파지 유전체의 단일 가닥 DNA 복사체(copy)를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 성질에 기반한 선택이 또한 그러한 성질을 나타내는 항체를 엔코딩하는 유전자의 선택을 야기한다. 따라서, 파지는 B 세포의 성질들 중 일부를 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행될 수 있다; 리뷰를 위해, 예를 들어 [Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology*, 3:564-571 (1993)] 참조. V-유전자 세그먼트의 여러 공급원이 파지 디스플레이를 위해 이용될 수 있다. 문헌[Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]에서는 면역된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자들의 소형 랜덤 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 분리시켰다. 탈면역된 인간 공여체로부터의 V 유전자들의 레퍼토리를 작제할 수 있고 항원 (자가-항원 포함)의 다양한 어레이에 대한 항체를 본질적으로 문헌[Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), or Griffith et al, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993)]에 개시된 기술에 따라 분리시킬 수 있다. 또한, 문헌[U.S. Patent Nos. 5,565,332 and 5,573,905] 참조. 디스플레이 라이브러리는 인공적인 아미노산 서열을 함유하는 항체 또는 항체의 항원-결

합 단편을 함유할 수 있다. 예를 들어, 라이브러리는 인공적인 CDR (예컨대, 랜덤 아미노산 서열) 및 인간 프레임워크 영역을 함유하는 Fab 단편을 함유할 수 있다 (참조, 예를 들어 U.S. Patent No. 6,300,064 (Knappik, et al.) 참조).

[0147] 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (U.S. 5,567,610 및 5,229,275 참조).

[0148] 인간 불변 영역 유전자의 서열은 문헌[Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.I.H. publication no. 91-3242]에서 찾아볼 수 있다. 인간 C 영역 유전자는 공지된 클론으로부터 용이하게 이용가능하다. 아이소형의 선택은 요망되는 이펙터 기능, 예컨대 보체 고정, 또는 항체-의존성 세포의 세포독성에서의 활성화에 의해 좌우될 것이다. 아이소형은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4일 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항체 분자는 IgG1 및 IgG2이다. 인간 경쇄 불변 영역, 카파 또는 람다 중 어느 쪽도 이용할 수 있다. 그 후, 키메라 인간화된 항체를 통상적인 방법에 의해 발현시킨다.

[0149] 일부 구체예에서, 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 GCC를 발현시키는 세포, 예컨대 종양 세포에 대해 항체-의존성 세포의 세포독성 (ADCC)을 초래할 수 있다. IgG1 및 IgG3 아이소형을 지니는 항체는 Fc 수용체에 결합하는 능력으로 인해 항체-의존성 세포독성 능력에서 이펙터 기능을 유도하는데 유용하다. IgG2 및 IgG4 아이소형을 지니는 항체는 Fc 수용체에 결합하는 능력이 낮기 때문에 ADCC 반응을 최소화하는데 유용하다. 관련 구체예에서, 예를 들어 변형된 진핵생물 세포주에서 성장에 의하여, Fc 영역에서의 치환 또는 항체의 글리코실화 조성이 변화되어 항-GCC 항체가 결합하는 세포를 인지, 결합, 및/또는 그 세포독성을 매개하는 Fc 수용체의 능력을 개선시킬 수 있다 (예를 들어, U.S. Pat No. 7,317,091, 5,624,821 and publications including WO 00/42072, Shields, et al. *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001), Lazar et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:4005-4010 (2006), Satoh et al. *Expert Opin Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006) 참조). 특정 구체예에서, 항체 또는 항원-결합 단편 (예컨대, 인간 기원의 항체, 인간 항체)는 기능 (예컨대, 이펙터 기능)을 변경시키거나 재단하는 아미노산 치환 또는 교체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 기원의 불변 영역 (예컨대, γ 1 불변 영역, γ 2 불변 영역)은 보체 활성화 및/또는 Fc 수용체 결합을 감소시키도록 설계될 수 있다 (예를 들어, U.S. Patent Nos. 5,648,260 (Winter et al.), 5,624,821 (Winter et al.) and 5,834,597 (Tso et al.) 참조, 이들의 전체 교시는 본원에 참조로서 포함된다). 바람직하게는, 그러한 아미노산 치환 또는 교체를 포함하는 인간 기원의 불변 영역의 아미노산 서열은 인간 기원의 변경되지 않은 불변 영역의 아미노산 서열과 전장에 걸쳐 적어도 약 95% 동일하고, 보다 바람직하게는 인간 기원의 변경되지 않은 불변 영역의 아미노산 서열과 전장에 걸쳐 적어도 약 99% 동일하다.

[0150] 여전히 또 다른 구체예에서, 이펙터 기능은 또한 항체의 글리코실화 패턴을 조절함에 의해 변경될 수 있다. 변경이라 함은 항체에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 결실, 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 첨가를 의미한다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 결여된 성숙한 탄수화물 구조를 지니는 개선된 ADCC 활성을 지니는 항체가 문헌[U.S. Patent Application Publication No. 2003/0157108 (Presta). See also U.S. Patent Application Publication No. 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)]에 개시되어 있다. 글리코파이(Glycofi)가 또한 항체의 특이적 글리코폼(glycoform)을 생산할 수 있는 효모 세포주를 발생시켰다.

[0151] 추가로 또는 대안적으로, 변경된 유형의 글리코실화를 지니는 항체, 예를 들어 감소된 양의 푸코실 잔기를 지니는 저푸코실화된 항체 또는 증가된 양분된 GlcNac 구조를 지니는 항체가 제조될 수 있다. 그러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 나타났다. 그러한 탄수화물 변형은, 예를 들어 변경된 글리코실화 기구를 지니는 숙주 세포에서 항체를 발현시킴에 의해 달성될 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 지니는 세포가 당 분야에 개시되어 있고 본 발명의 재조합 항체를 발현시키기 위해 공학처리된 숙주 세포로서 이용되어 변경된 글리코실화를 지니는 항체를 생산할 수 있다. 예를 들어, 문헌[EP 1,176,195 by Hang et al.]은 푸코실 트랜스퍼라제를 엔코딩하는 기능적으로 붕괴된 FUT8 유전자를 지니는 세포주를 기술하고 있는데, 이로써 그러한 세포주에서 발현된 항체는 저푸코실화를 나타낸다. 문헌[PCT Publication WO 03/035835 by Presta]은 푸코스를 Asn(297)-결합된 탄수화물에 부착시키는 능력이 감소된 변이체 CHO 세포주, Lec13 세포를 기술하고 있는데, 이 또한 숙주 세포에서 발현되는 항체의 저푸코실화를 초래한다 (또한 Shields, R. L. et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 참조). 문헌[PCT Publication WO 99/54342 by Umana et al.]은 공학처리된 세포주에서 발현된 항체가 증가된 항체의 ADCC 활성을 초래하는 증가된 양분된 GlcNac 구조를 나타내도록 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제 (예컨대, 베타(1,4)-N 아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 공학처리된 세포주를 기술한다 (또한 Umana et al., 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180

참조).

- [0152] 인간화된 항체는 또한 CDR-그래프트된 접근법을 이용하여 제조될 수 있다. 그러한 인간화된 항체의 생성 기술은 당 분야에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 가변 중쇄 및 경쇄 서열에서 상보성 결정 영역 또는 "CDR"을 확인하고 인간 프레임워크 핵산 서열 상에 CDR 핵산 서열을 그래프팅하는, GCC에 결합하는 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 엔코딩하는 핵산 서열을 수득함에 의해 생산된다 (예를 들어, U.S. Pat. Nos. 4,816,567 and 5,225,539 참조). CDR 및 프레임워크 잔기의 위치는 결정될 수 있다 (Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. *et al.* *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) 참조). 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자는 표 5 및 6에 나열된 CDR을 엔코딩하는 CDR 아미노산 서열 및 핵산 서열을 지닌다. 일부 구체예에서, 표 5 및 6으로부터의 서열은 본원에 기재된 치료 또는 진단 방법에 사용되는 GCC를 인지하는 분자로 혼입될 수 있다. 선택된 인간 프레임워크는 생체내 투여에 적합한 것인데, 이것은 상기 프레임워크가 면역원성을 나타내지 않음을 의미한다. 예를 들어, 그러한 결정은 상기 항체의 생체내 사용 및 아미노산 유사성의 연구를 경험하기 전에 이루어질 수 있다. 적합한 프레임워크 영역은 공여체 항체, 예를 들어 항-GCC 항체 분자 (예컨대, 3G1)의 동등한 부분 (예컨대, 프레임워크 영역)의 아미노산 서열 내에서 프레임워크 영역의 길이에 걸쳐 적어도 약 65%의 아미노산 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 약 70%, 80%, 90% 또는 95%의 아미노산 서열 동일성을 지니는 인간 기원의 항체로부터 선택될 수 있다. 아미노산 서열 동일성은 디폴트 파라미터를 이용한 CLUSTAL W와 같은 적합한 아미노산 서열 정렬 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다 (Thompson J.D. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994)).
- [0153] 인간화되어야 하는 클로닝된 항체의 CDR 및 FR이 일단 확인되면, CDR을 엔코딩하는 아미노산 서열을 확인하고 상응하는 아미노산 서열을 선택된 인간 FR 상에 그래프팅한다. 이것은 공지된 프라이머 및 링커를 사용하여 수행될 수 있고, 그 선택은 당 분야에 공지되어 있다. 특정 인간 항체의 CDR은 모두 비-인간 CDR의 적어도 일부로 교체될 수 있거나 CDR의 단지 일부가 비-인간 CDR로 교체될 수 있다. 인간화된 항체를 소정의 항원에 결합시키는 데 필요한 수의 CDR을 교체하는 것만이 필요하다. CDR을 선택된 인간 FR에 그래프팅한 후에, 생성된 "인간화된" 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 발현시켜 GCC에 결합하는 인간화된 Fv 또는 인간화된 항체를 생산한다. 바람직하게는, CDR-그래프트된 (예컨대, 인간화된) 항체는 공여체 항체의 유사하거나, 실질적으로 동일하거나, 보다 양호한 친화력으로 GCC 단백질에 결합한다. 전형적으로, 인간화된 가변 중쇄 및 경쇄 서열을 인간 불변 도메인 서열과의 융합 단백질로서 발현시켜 GCC에 결합하는 온전한 항체를 수득한다. 그러나, 불변 서열을 함유하지 않는 인간화된 Fv 항체를 생산할 수 있다.
- [0154] 특수한 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가된 인간화된 항체가 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 구체적으로, 인간화된 항체는, 예컨대 항원으로서의 결합을 향상시킬 수 있도록 프레임워크 영역에 아미노산 치환을 지닐 수 있다. 예를 들어, 인간화된 면역글로불린 사슬의 선택된 소수의 엑셉터 프레임워크 잔기를 상응하는 공여체 아미노산으로 교체할 수 있다. 치환 위치는 CDR에 인접한 아미노산 잔기, 또는 CDR과 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기를 포함한다 (예를 들어, U.S. Patent Nos. 5,585,089 또는 5,859,205 참조). 엑셉터 프레임워크는 성숙한 인간 항체 프레임워크 서열 또는 콘센서스 서열일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "콘센서스 서열 (consensus sequence)"은 관련 패밀리에 구성원 사이의 영역에 있는 서열 중 각 위치에서 가장 빈번하게 발견되거나, 가장 일반적인 잔기로부터 고안된 서열을 지칭한다. 다수의 인간 항체 콘센서스 서열을 이용할 수 있으며, 인간 가변 영역의 상이한 서브그룹에 대한 콘센서스 서열을 포함한다 (Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991) 참조). 케이벳 데이터베이스 및 이의 적용은, 예컨대 National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD의 IgBLAST를 통해 온라인으로 자유롭게 이용가능하다 (또한, Johnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids Research* 29:205-206 (2001) 참조).
- [0155] 항체를 인간화하기 위한 다른 기술은 문헌[Padlan *et al.* EP 519596 A1, published on December 23, 1992]에 기재되어 있다.
- [0156] 항-GCC 항체 분자는 인간 T 세포 에피토프 또는 문헌[PCT Publication Nos. WO 98/52976 and WO 00/34317, 이의 내용이 본원에 참조로서 포함된다]에 기재된 방법에 의한 "탈면역화"에 의해 또한 변형될 수 있는 다른 인간화된 항체를 포함한다. 간단히 말해, 항-GCC 항체의 무린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 MHC 클래스 II에 결합하는 펩티드에 대해 분석할 수 있고; 이러한 펩티드는 잠재적인 T-세포 에피토프를 나타낸다. 잠재적인 T-세포 에피토프의 검출을 위해, "펩티드 스레딩 (peptide threading)"이라 명명된 컴퓨터 모델링 접근법을 적용시킬 수 있고, 또한 인간 MHC 클래스 II 결합 펩티드의 데이터베이스를 문헌[PCT Publication Nos. WO 98/52976 and WO

00/34317]에 개시된 대로, 뮤린 VH 및 VL 서열에 존재하는 모티프에 대해 검색할 수 있다. 이러한 모티프는 18 개의 주요 MHC 클래스 II DR 동종이형 중 어느 것에 결합하므로, 잠재적인 T 세포 에피토프를 구성한다. 검출된 잠재적인 T-세포 에피토프는 가변 영역에서 소수의 아미노산 잔기를 치환시킴에 의해, 또는 바람직하게는 단일 아미노산 치환에 의해 제거될 수 있다. 가능한 한, 보존적 치환이 수행되나, 종종 그러나 배타적이지 않게, 인간 생식세포계열 항체 서열에서 이러한 위치에 일반적인 아미노산을 이용할 수 있다. 인간 생식세포계열 서열은 문헌[Tomlinson, I.A. et al., *J. Mol. Biol.* 227:776-798(1992); Cook, G. P. et al., *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242(1995); Chothia, D. et al., *J. Mol. Bio.* 227:799-817(1992)]에 기재되어 있다. V 베이스(BASE) 디렉토리는 인간 면역글로불린 가변 영역 서열의 포괄적인 디렉토리를 제공한다 (Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). 항-GCC 항체의 탈면역된 VH 및 VL이 뮤린 VH 및 VL 유전자의 돌연변이발생에 의해 작제된 후에, 돌연변이된 가변 서열을 임의로 인간 불변 영역, 예컨대 인간 IgG1 또는 κ 불변 영역에 융합시킬 수 있다.

[0157] 다른 구체예에서, CDR-그래프트된 항체에 의한 면역원성 반응의 감소는, CDR에서 아미노산 잔기의 결실, 치환과 같은 변화에 의해 달성될 수 있다 (Kashmiri et al. *Methods* 36:25-34 (2005), U.S. Pat. No. 6,818,749, Tan et al. *J. Immunol.* 169:1119-1125 (2006)). 예를 들어, 항원과의 접촉에 관여하는 위치에 있는 잔기는 바람직하게는 변화되지 않을 것이다. 전형적으로, 그러한 잔기, SDR은 항체들 간에 높은 수준의 가변성을 나타내는 위치에 존재한다. 항-GCC 항체 분자, 예를 들어 본원에 기재된 항체로부터, 예컨대 클루스탈(Clustal) 방법 (Higgins D. G. et al., *Meth. Enzymol.* 266:383-402 (1996))에 의해 유래된 콘센서스 서열 (예컨대, SEQ ID NO:302-307, 표 5)은 SDR을 확인하는 것을 돕는다. 본원에 기재된 인간 항-GCC 항체 분자에서, SDR은 하기, 적어도 첫 번째 잔기 또는 일부 구체예에서 중쇄 CDR1의 처음 네 개의 잔기; 적어도 N-말단 부분, 예컨대 중쇄 CDR2의 처음 7개, 10개 또는 13개 잔기; 중쇄 CDR3의 거의 전부; C-말단 부분, 예컨대 경쇄 CDR1의 잔기 6개, 8개 또는 9개 뒤; 경쇄 CDR2의 대략 처음, 중간 및/또는 마지막 잔기; 및 경쇄 CDR3의 대부분, 또는 적어도 잔기 2개 또는 3개 뒤이다. 따라서, 항-GCC 항체 분자의 인간화 또는 변형 후에 GCC 단백질에 대한 결합을 유지하기 위해서, 항-GCC 항체 분자의 CDR에 있는 그러한 SDR 잔기는, CDR 또는 프레임워크 영역의 다른 잔기들에 있는 잔기보다 예컨대 뮤린 잔기에서 인간 공통 잔기로 덜 변화될 수 있다. 역으로, 비-인간, 예컨대 뮤린 CDR의 잔기를 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자의 CDR (예컨대, 표 5에 나열된 서열)과 같은 인간 CDR에서 공통인 것으로 확인된 잔기로 변화시키는 것이 이로우 수 있다. 예를 들어, 세린은 중쇄 CDR1의 C-말단에 대해 인간 잔기를 나타낼 수 있고/거나 티로신은 중쇄 CDR1의 두 번째 및/또는 세 번째 잔기에 대해 인간 잔기를 나타낼 수 있으며; 중쇄 CDR2는 S-(L/V)-K-(S/G) (SEQ ID NO:312)에서 끝나서 인간 CDR을 나타낼 수 있고; 인간 CDR3을 나타내기 위해서, 중쇄 CDR3의 4개 내지 6개 잔기 이후에 글리신 및/또는 6개 내지 9개 잔기 이후에 아스파르테이트가 존재할 수 있으며; 경쇄 CDR1은 (K/R)-(A/S)-SQS-(V/L)-(S/L) (SEQ ID NO:313)으로 시작하여 인간 CDR을 나타낼 수 있고; 경쇄 CDR2는 세 번째 잔기에 세린을 지닐 수 있고/거나 다섯 번째 잔기의 아르기닌은 인간 CDR을 나타내며; 및/또는 경쇄 CDR3은 두 번째 잔기에 글루타민을 지닐 수 있고/거나 세 번째 잔기의 티로신 또는 세린은 인간 CDR을 나타낸다.

[0158] 온전한 항체가 아닌 항-GCC 항체가 또한 본 발명에서 유용하다. 그러한 항체는 상기 기재된 어떠한 항체로부터 유래될 수 있다. 이러한 유형의 유용한 항체 분자로는 (i) Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 일가 단편; (ii) F(ab')₂ 단편, 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편 (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)); (vii) VHH 도메인으로 구성된 단일 도메인 작용성 중쇄 항체 (나노보디(nanobody)로서 공지됨), 예를 들어 문헌[Cortez-Retamozo, et al., *Cancer Res.* 64: 2853-2857(2004)]과 본원에 인용된 참고문헌들 참조; 및 (vii) 분리된 CDR, 예를 들어 항원 결합 단편을 제공하기에 충분한 프레임워크를 지니는 하나 이상의 분리된 CDR이 있다. 더욱이, Fv 단편의 두 개의 도메인인 VL 및 VH는 분리된 유전자에 의해 코딩되나, 이들은 재조합 방법을 이용하여, VL 및 VH 영역이 한 쌍이 되어 일가 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬이 되게 할 수 있는 합성 링커에 의해 결합될 수 있다 (단일 사슬 Fv (scFv)로서 공지됨; 예를 들어, Bird et al. *Science* 242:423-426 (1988); and Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988) 참조). 그러한 단일 사슬 항체가 또한 항체의 "항원-결합 단편"이라는 용어 내에 포함된다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 수득되고, 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다. 항체 단편, 예를 들어 Fv, F(ab')₂ 및 Fab는 예컨대 프로테아제 또는 화학적 절단에 의한 온전한 단백질의 절단에 의해 제조될 수 있다.

[0159] 구체예에서, 하나 또는 둘 모두의 중쇄 및 경쇄의 CDR 서열의 일부 또는 전부를 또 다른 항체 분자, 예를 들어

CDR-그래프트된, 인간화된, 또는 키메라 항체 분자에 이용할 수 있다.

- [0160] 구체예는, 세포 표면 GCC로의 결합을 가능하게 하는 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 무린 항체 중 하나로부터의 모든 6개 CDR과 같은 충분한 CDR을 포함하는 항체 분자를 포함한다.
- [0161] 일 구체예에서, CDR, 예컨대 HCDR 전부, 또는 LCDR 전부, 또는 모든 6개 CDR은 인간 또는 인간 유래된 프레임워크 영역(들)에 합침된다. 인간 프레임워크 영역의 예는 인간 생식세포계열 프레임워크 서열, 친화력 성숙된 인간 생식세포계열 서열 (생체내 또는 시험관내에서), 또는 콘센서스 서열과 같은 합성 인간 서열을 포함한다. 일 구체예에서, 중쇄 프레임워크는 IgG1 또는 IgG2 프레임워크이다. 일 구체예에서, 경쇄 프레임워크는 카파 프레임워크이다.
- [0162] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자, 예컨대 CDR-그래프트된 또는 인간화된 항체 분자는 GCC로의 결합을 허용하는 충분한 CDR, 예를 들어 본원에 기재된 항체들 중 하나로부터의 모든 6개 CDR, 예컨대 표 5에 나열된 서열을 포함한다. (본원의 표 6에서, 표 5에 나열된 CDR 아미노산 서열을 엔코딩할 수 있는 예시적인 핵산이 제공된다). 특정 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 5F9 또는 Abx-229로부터의 CDR을 포함할 수 있다.
- [0163] 생체내 치료적 또는 진단적 용도를 위한 항체 단편은 이들의 혈청 반감기를 개선시키는 변형으로부터 이익을 얻을 수 있다. 항체의 생체내 혈청 반감기를 증가시키기 위해 적합한 유기 모이어티는 친수성 고분자기 (예컨대, 선형 또는 분지형 폴리머 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 폴리알칸 글리콜), 탄수화물 (예를 들어, 텍스트란, 셀룰로스, 폴리사카라이드 등), 친수성 아미노산의 폴리머 (예를 들어, 폴리아민, 폴리아스파르테이트 등), 폴리알칸 옥사이드 및 폴리비닐 피롤리돈), 지방산기 (예를 들어, 모노-카르복실산 또는 디-카르복실산), 지방산 에스테르기, 지질기 (예를 들어, 디아실글리세롤기, 스펅고지질기 (예를 들어, 세라미드)) 또는 인지질기 (예를 들어, 포스파티딜 에탄올아민기)로부터 선택된 하나, 두 개 또는 두 개 초과의 선형 또는 분지형 모이어티를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 유기 모이어티는, 유기 모이어티가 컨쥬게이션되지 않은 항체 모이어티에 비해 생성된 면역컨쥬게이트의 기능을 손상 (예를 들어, 항원 결합 친화력 감소)시키지 않는 소정의 부위에 결합한다. 유기 모이어티는 약 500 Da 내지 약 50,000 Da, 바람직하게는 약 2000, 5000, 10,000 또는 20,000 Da의 분자량을 지닐 수 있다. 항체와 같은 폴리펩티드를 유기 모이어티로 변형시키는 예 및 방법은, 예를 들어 문헌[U.S. Patent Nos. 4,179,337 and 5,612,460, PCT Publication Nos. WO 95/06058 and WO 00/26256, and U.S. Patent Application Publication No. 20030026805]에서 찾아볼 수 있다.
- [0164] 항-GCC 항체 분자는 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구 또는 무린 항체 중 하나의 중쇄 및 경쇄 중 하나 또는 둘 모두의 가변 영역을 모두 포함하거나 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.
- [0165] 일 구체예에서, (a)의 경쇄 아미노산 서열은 하기 (a)(i-ii)에 언급된 참조 아미노산 서열(들) 중 하나와 1, 2, 3, 4, 5, 10, 또는 15개의 잔기만큼 상이할 수 있다. 구체예에서, 차이는 보존적 치환이다. 구체예에서, 차이는 프레임워크 영역에서의 차이이다. 구체예에서, (b)의 중쇄 아미노산 서열은 하기 (b)(i-ii)에 언급된 참조 아미노산 서열(들) 중 하나와 1, 2, 3, 4, 5, 10, 또는 15개의 잔기만큼 상이할 수 있다. 구체예에서, 차이는 보존적 치환이다. 구체예에서, 차이는 프레임워크 영역에서의 차이이다.
- [0166] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 하기 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다:
- [0167] (a) (i) 표 3으로부터의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열, 예컨대 SEQ ID NO:20, 또는 (ii) 표 4로부터의 뉴클레오타이드 서열에 의해 엔코딩된 경쇄 가변 영역 아미노산, 예컨대 SEQ ID NO:19 중 어느 쪽의 전체, 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 아미노산 서열; 및
- [0168] (b) (i) 표 3으로부터의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 예컨대 SEQ ID NO:18, 또는 (ii) 표 4로부터의 뉴클레오타이드 서열에 의해 엔코딩된 중쇄 아미노산 서열, 예컨대 SEQ ID NO:17 중 어느 쪽의 전체, 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 아미노산 서열.
- [0169] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 하기 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다:
- [0170] a) 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 무린 항체 중 하나와 같은 본 발명의 항-GCC 항체 분자의 경쇄 가변 영역과 적어도 85, 90, 95, 97 또는 99%의 상동성을 지니는 경쇄 가변 영역 또는 이의 항원 결합 단편; 및
- [0171] b) 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 무린 항체 중 하나와 같은 본 발명의 항-GCC 항체 분자의 중쇄 가변 영역과 적어도 85, 90, 95, 97 또는 99%의 상동성을 지니는 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 결

합 단편.

- [0172] 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 유린 항체의 가변 영역의 아미노산 서열은 표 3에서 찾아볼 수 있다.
- [0173] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 5F9 항체 분자이며, 하기 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다: a) SEQ ID NO: 231로부터의 중쇄 불변 영역의 전체 또는 단편; 및 b) SEQ ID NO: 233으로부터의 경쇄 불변 영역의 전체 또는 단편.
- [0174] 또 다른 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 Abx-229 항체 분자이며, 하기 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다: a) SEQ ID NO: 46으로부터의 중쇄 가변 영역의 전체 또는 GCC-결합 단편; 및 b) SEQ ID NO: 48로부터의 경쇄 가변 영역의 전체 또는 GCC-결합 단편.
- [0175] 한 접근법에서, 중쇄 및 경쇄 J 영역을 엔코딩하는 콘센서스 서열을 이용하여 인간 C 영역 세그먼트로의 V 영역 세그먼트의 후속적인 결합을 위해 J 영역에 유용한 제한 부위를 도입하기 위한 프라이머로서 사용되는 올리고뉴클레오타이드를 설계할 수 있다. 인간 서열에서의 유사한 위치에 제한 부위를 정위시키기 위해 C 영역 cDNA를 부위 유도된 돌연변이발생에 의해 변형시킬 수 있다.
- [0176] 발현 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 코스미드, YAC, EBV 유래 에피솟 등을 포함한다. 편리한 벡터는, 임의의 VH 또는 VL 서열이 용이하게 삽입되고 발현될 수 있도록 공학처리된 적합한 제한 부위를 지니는, 기능적으로 완전한 인간 CH 또는 CL 번역글로불린 서열을 엔코딩하는 벡터이다. 그러한 벡터에서, 스플라이싱(splicing)은 일반적으로, 삽입된 J 영역에 있는 스플라이스 공여체 부위와 인간 C 영역에 선행하는 스플라이스 역선택 부위 사이에서, 및 또한 인간 CH 엑손 내에 발생하는 스플라이스 영역에서 일어난다. 적합한 발현 벡터는 다수의 구성요소들, 예를 들어 복제 기점, 선택가능한 마커 유전자, 하나 이상의 발현 조절 엘리먼트, 예를 들어 전사 조절 엘리먼트(예컨대, 프로모터, 인핸서, 터미네이터) 및/또는 하나 이상의 번역 신호, 신호 서열 또는 리더 서열 등을 함유할 수 있다. 폴리아데닐화 및 전사 종료는 코딩 영역의 천연 염색체 부위 다운스트림에서 일어난다. 생성된 키메라 항체를 임의의 강한 프로모터에 결합시킬 수 있다. 이용될 수 있는 적합한 벡터는 포유동물 숙주에 적합하고 바이러스 복제 시스템에 기반한 것들, 예를 들어 원숭이 바이러스 40 (SV40), 로우스(Rous) 육종 바이러스 (RSV), 아데노바이러스 2, 소 파필로마 바이러스 (BPV), 파포마바이러스 BK 돌연변이체 (BKV), 또는 마우스 및 인간 시토크로마바이러스 (CMV), 및 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV), 천연 Ig 프로모터 등을 포함한다. 다양한 적합한 벡터가 당 분야에 공지되어 있고, 단일 복사체 또는 다중 복사체에서 유지되는 벡터, 또는 숙주 세포 염색체로, 예를 들어 LTR 또는 다수의 통합 부위를 지니도록 공학처리된 인공적인 염색체를 통해 통합되어 지는 벡터를 포함한다 (Lindenbaum et al. *Nucleic Acids Res.* 32:e172 (2004), Kennard et al. *Biotechnol. Bioeng.* Online May 20, 2009). 적합한 벡터의 추가의 예가 아래 섹션에 나열되어 있다.
- [0177] 따라서, 본 발명은 GCC 단백질에 결합하는 항체, 항체의 항원 결합 단편 (예컨대, 인간, 인간화된, 키메라 항체 또는 상기 중 임의의 것의 항원-결합 단편), 항체 사슬 (예컨대, 중쇄, 경쇄) 또는 항체 사슬의 항원-결합 부분을 엔코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0178] 진핵생물 숙주 세포에서의 발현이 유용한데, 그 이유는 이러한 세포가 적절하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체를 원핵생물 세포보다 더 어셈블링하고 분비할 것 같기 때문이다. 그러나, 부적절한 폴딩으로 인해 비활성으로 생산된 임의의 항체를 공지된 방법에 따라 재천연화(renaturable)시킬 수 있다 (Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, pp. 459-89 (1982)). 숙주 세포가 본 발명에 따른 항체 동종체(homolog)이기도 한, 경쇄 이합체 또는 중쇄 이합체와 같은, 온전한 항체의 일부를 생산하는 것이 가능하다.
- [0179] 추가로, 본원의 다른 부분에 기재된 대로, 인간 항체 또는 다른 종으로부터의 항체가, 비제한적으로 파지 디스플레이, 레트로바이러스 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 및 당 분야에 널리 공지된 기술을 이용하는 다른 기술을 포함하는 디스플레이-형 기술을 통해 생산될 수 있고, 생성된 분자는 친화력 성숙화와 같은 추가의 성숙화를 거칠 수 있으며, 그러한 기술은 당 분야에 공지되어 있다 [Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) and Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992), Hanes and Plutchau *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (ribosomal display), Parmley and Smith *Gene* 73:305-318 (1988) (phage display), Scott *TIBS* 17:241-245 (1992), Cwirla et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6378-6382 (1990), Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty *TIBTECH* 10:80-84 (1992), and U.S. Pat. No. 5,733,743]. 디스플레이 기술을 이용하여 인간이 아

닌 항체를 생산하는 경우, 그러한 항체는 상기 기재된 대로 인간화될 수 있다.

[0180] 생성된 항체가 초기에 특정 요망되는 아이소형을 지닐 필요는 없으며, 오히려 생성된 항체는 임의의 아이소형을 지닐 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 5F9 하이브리도마 (ATCC 기탁 번호 PTA-8132)에 의해 생산된 항체는 IgG2 아이소형을 지닌다. 항체의 아이소형은 이후 당 분야에 공지된 통상적인 기술을 이용하여, 예컨대 IgG1 또는 IgG3으로 바뀌어, 항체가 세포 상의 GCC에 결합할 때 ADCC 반응을 유도할 수 있다. 그러한 기술은 특히 직접 재조합 기술 (예를 들어, U.S. Pat. No. 4,816,397 참조), 세포-세포 융합 기술 (예를 들어, U.S. Pat No 5,916,771 참조)의 이용을 포함한다. 세포-세포 융합 기술에서, 임의의 요망되는 아이소형을 지니는 중쇄를 소유하는 골수종 또는 그 밖의 세포주 또는 경쇄를 소유하는 또 다른 골수종 또는 그 밖의 세포주가 제조된다. 그 후, 이러한 세포들은 융합될 수 있고 온전한 항체를 발현시키는 세포주가 분리될 수 있다.

[0181] 특정 구체예에서, GCC 항체 분자는 인간 항-GCC IgG1 항체이다. 이러한 항체들이 GCC 분자에 대한 요망되는 결합을 지니므로, 이러한 항체들 중 어느 하나는, 예를 들어 여전히 동일한 가변 영역 (항체의 특이성 및 친화력을 특정 한도로 정의한다)을 지니면서, 인간 IgG4 아이소형을 생성하도록 용이하게 아이소형-전환될 수 있다. 따라서, 상기 논의된 대로 요망되는 "구조적" 속성을 충족하는 항체 후보가 생성되므로, 일반적으로 이들 후보에 아이소형-전환을 통해 요망되는 적어도 특정한 추가의 "기능적" 속성이 제공될 수 있다.

[0182] 일 구체예에서, 가변 영역 또는 이의 항원 결합 단편은, 예컨대 또 다른 항체로부터의 불변 영역 (또는 이의 단편)으로 생성된 불변 영역 이외의 불변 영역 (또는 이의 단편) 또는 합성 불변 영역 (또는 이의 단편)에 커플링될 수 있다. 구체예에서, 불변 영역은 IgG1 또는 IgG2 불변 영역 (또는 이의 단편)이다. 가변 또는 불변 영역에 서열 변화가 있을 수 있어서 항체 분자의 이펙터 활성을 변경시킨다.

[0183] 다른 치료제의 설계 및 생성

[0184] GCC에 관해 본원에서 생산되고 특성규명된 항체는 다른 항체, 다른 길항제, 또는 촉진된 항체 이외의 화학적 모이어티를 포함하는 다른 치료 종류의 설계를 제공한다. 이러한 종류는 비제한적으로 유사한 결합 활성 또는 기능성을 지니는 항체, 진보된 항체 치료제, 예컨대 이특이적 항체, 면역컨쥬게이트, 및 방사선표지된 치료제, 펩티드 치료제, 특히 인트라바디(intrabody) 및 소분자의 생성을 포함한다. 추가로, 상기 논의된 대로, 본 발명의 항체의 이펙터 기능은 다양한 치료 용도를 위해 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE, 또는 IgM으로의 아이소형 전환에 의해 변화될 수 있다.

[0185] 이특이적 항체와 관련하여, (i) 함께 컨쥬게이션된, GCC에 특이성을 지니는 하나의 항체 및 두 번째 분자에 대한 또 다른 항체의 두 항체, (ii) GCC에 특이적인 하나의 사슬 및 두 번째 분자에 특이적인 두 번째 사슬을 지니는 단일 항체, 또는 (iii) GCC 및 다른 분자에 특이성을 지니는 단쇄 항체를 포함하는 이특이적 항체가 생성될 수 있다. 그러한 이특이적 항체는 공지된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 이특이적 항체는 (동일한 유형 또는 상이한 유형의) 두 개 이상의 항체를 가교시킴에 의해 생산될 수 있다. 적합한 가교는 적합한 스페이서 (예를 들어, m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르) 또는 호모이작용성 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트)에 의해 분리된 두 별개의 반응성기를 지니는, 헤테로이작용성인 것들을 포함한다. 그러한 링커는 Pierce Chemical Company (Rockford, IL)로부터 이용가능하다. 또한, 예를 들어 문헌[Fanger et al. *Immunomethods* 4:72-81 (1994) and Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) and Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992)]을 참조하고, (iii)에 관해서는 예를 들어, 문헌[Traunecker et al. *Int. J. Cancer* (Suppl.) 7:51-52 (1992). Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)]을 참조한다.

[0186] 또한 "카파바디(Kappabody)" (Ill. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), "미니바디(Minibody)" (Martin et al. *EMBO J* 13:5303-9 (1994), US Patent No. 5,837,821), "디아바디(Diabody)"(Holliger et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448 (1993)), 또는 "제누신(Janusin)" (Traunecker et al. *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) and Traunecker et al. *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992))을 또한 제조할 수 있다.

[0187] 핵산 및 폴리펩티드

[0188] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에 기재된 항체 분자를 나타내거나 이를 엔코딩하는 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열에 관한 것이다. 본원에 기재된 조성물에 따라 다른 조합들이 또한 본 발명에서 고려되나, 상기 폴리뉴클레오티드는 경쇄 및 중쇄 각각의 가변 영역과 불변 영역 둘 모두를 엔코딩한다. 본 발명은 또한 기재

된 폴리뉴클레오티드로부터 유래된 올리고뉴클레오티드 단편 및 이러한 폴리뉴클레오티드에 상보적인 핵산 서열을 고려한다.

- [0189] 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA의 형태일 수 있다. DNA, cDNA, 유전체 DNA, 핵산 유사체 및 합성 DNA 형태의 폴리뉴클레오티드가 본 발명의 범위 내에 있다. DNA는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있으며, 단일 가닥인 경우, 코딩 (센스) 가닥 또는 비-코딩 (안티-센스) 가닥일 수 있다. 폴리펩티드를 엔코딩하는 코딩 서열은 본원에서 제공된 코딩 서열과 동일할 수 있거나 유전 부호의 중복성 또는 퇴화의 결과로서 코딩 서열이 본원에 제공된 DNA와 동일한 폴리펩티드를 엔코딩하는 상이한 코딩 서열일 수 있다.
- [0190] 제공된 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 예컨대 표 4에 요약된 본 발명의 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 엔코딩한다.
- [0191] 본 발명은 또한 폴리뉴클레오티드 결실, 치환 또는 첨가와 같은 변형을 포함하는 변이체 폴리뉴클레오티드, 및 변이체 폴리뉴클레오티드 서열로부터 초래된 임의의 폴리펩티드 변형을 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 본원에서 제공된 코딩 서열에서 변형된 코딩 서열을 지닐 수 있다. 예를 들어, 변이체 폴리뉴클레오티드는 표 4에 나열된 폴리뉴클레오티드와 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97%의 동일성을 지닐 수 있다. 구체예에서, 변이체 폴리뉴클레오티드는 항-GCC 항체 분자를 엔코딩한다.
- [0192] 본 발명은 추가로 본 발명의 항체를 나타내는 폴리펩티드 뿐 아니라 그러한 폴리펩티드의 단편, 유사체 및 유도체에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드, 천연 생산된 폴리펩티드 또는 합성 폴리펩티드일 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 단편, 유도체 또는 유사체는 아미노산 잔기 중 하나 이상이 보존되거나 비-보존된 아미노산 잔기 (바람직하게는 보존된 아미노산 잔기)로 치환된 것일 수 있거나 (그렇게 치환된 아미노산 잔기는 유전 부호에 의해 엔코딩된 것이거나 아닐 수 있다); 아미노산 잔기 중 하나 이상이 치환기를 포함하는 것일 수 있거나; 폴리펩티드가 또 다른 화합물, 예컨대 폴리펩티드의 반감기를 증가시키는 화합물 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜)에 융합된 것일 수 있거나; 추가의 아미노산 잔기가 리더 서열 또는 분비 서열 또는 폴리펩티드 또는 프로단백질 서열의 정제에 이용된 서열과 같은 폴리펩티드에 융합된 것일 수 있다. 상기 단편, 유도체 및 유사체가 본 발명의 범위 내에 있다. 다양한 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 부분 정제되거나 정제된 생성물일 수 있다.
- [0193] 본 발명의 폴리펩티드는 예컨대 표 2 또는 3에 요약된 본원에 기재된 항체와 동일한 아미노산 서열, 또는 하나 이상의 아미노산 치환으로 인해 약간의 변형만큼 상이해진 아미노산 서열을 지닐 수 있다. 변형은 전형적으로 약 1 내지 5개 아미노산 범위의 "보존적 변화"일 수 있고, 이 때 치환된 아미노산은 류신을 이소류신으로 또는 트레오닌을 세린으로 대체; 리신을 아르기닌 또는 히스티딘으로 대체하는 것과 같은 유사한 구조적 또는 화학적 속성을 지닌다. 대조적으로, 변형은 글리신을 트립토판으로 대체하는 것과 같은 비보존적 변화를 포함할 수 있다. 유사한 약간의 변형으로는 또한 아미노산 결실 또는 삽입 또는 둘 모두가 있을 수 있다. 생물학적 또는 면역학적 활성을 변화시키지 않으며 어떠한 아미노산 잔기 그리고 얼마나 많은 아미노산 잔기를 치환, 삽입 또는 결실시킬 수 있을지를 결정하기 위한 지침은 예를 들어 DNASTAR 소프트웨어 (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.)와 같이 당 분야에 공지된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 찾아볼 수 있다.
- [0194] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-GCC 항체 분자를 엔코딩하는 분리된 및/또는 재조합 핵산을 특징으로 한다. 구체예에서, 핵산은 항체 분자, 중쇄, 경쇄, 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역, 본원에 기재된 항체 분자의 중쇄와 경쇄의 일부 (예컨대, 전장 중쇄 가변 영역과 페어링될 때 항원 결합성인 경쇄 가변 영역 단편, 또는 전장 경쇄 가변 영역과 페어링될 때, 항원 결합성인 중쇄 가변 영역 단편), 및 CDR 중 하나 이상을 엔코딩한다. 구체예는 발현 벡터와 같은 벡터에 배치된 그러한 핵산을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 플라스미드 pTOK58D-5F9LC 및 pTOK58D-5F9HC를 포함한다. 여전히 추가로, 본 발명은, 예를 들어, 플라스미드 pTOK58D-5F9LC 및 pTOK58D-5F9HC에 의해 엔코딩된 항체 분자를 발현시키는, 숙주 세포에 의해 생산된 항체 분자를 포함한다.
- [0195] 일 구체예에서, 하기 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 벡터, 예를 들어 발현 벡터가 제공된다:
- [0196] 경쇄 가변 영역을 엔코딩하는 서열, 예컨대 표 4에 나열된 서열, 이의 항원 결합 단편, 또는 본원의 예컨대 표 6에 기재된 경쇄 (및 임의로 프레임워크 영역)로부터의 1, 2 또는 3개의 CDR; 및
- [0197] 중쇄 가변 영역을 엔코딩하는 서열, 예컨대 표 4에 나열된 서열, 이의 항원 결합 단편, 또는 본원의 예컨대 표 6에 기재된 중쇄 (및 임의로 프레임워크 영역)로부터의 1, 2 또는 3개의 CDR.
- [0198] 제공된 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체의 하나 이상의 중쇄 가변 영역 또는 하나 이상의 경쇄

가변 영역을 엔코딩한다. 제공된 구체예에서, 폴리펩티드는 본 발명의 항체의 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나의 경쇄 가변 영역을 엔코딩할 수 있다.

- [0199] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 하기 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다:
- [0200] (a) (i) 본원의 예컨대 표 4에 기재된 항-GCC 항체 분자-엔코딩-핵산 서열의 보체, 또는 (ii) 표 1 및 2에 요약된 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 무린 항체 중 하나와 같은 본 발명의 항-GCC 항체 분자의 경쇄를 엔코딩하는 임의의 핵산 서열과 선택된 엄격성 조건하에 하이브리드화되는 핵산에 의해 엔코딩된 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 결합 단편; 및
- [0201] b) (i) 본원의 예컨대 표 4에 기재된 항-GCC 항체 분자-엔코딩-핵산 서열의 보체, 또는 (ii) 표 1 및 2에 요약된 상기 언급된 인간 하이브리도마, 선택된 림프구, 또는 무린 항체 중 하나와 같은 본 발명의 항-GCC 항체 분자의 중쇄를 엔코딩하는 임의의 핵산 서열과 선택된 엄격성 조건하에 하이브리드화되는 핵산에 의해 엔코딩된 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0202] 일 구체예에서, 선택된 엄격성 조건은 높거나 매우 높은 엄격성 조건이고, 예를 들어 이러한 조건들은 본원에 기재되어 있다.
- [0203] 추가의 측면에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁 번호 PTA-8132를 지니는 DNA에 엔코딩된 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 추가의 측면에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 ATCC 수탁 번호 PTA-8132를 지니는 DNA에 의해 엔코딩된 항체의 중쇄 가변 영역 서열의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0204] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 본 발명의 벡터로 유전학적으로 공학처리된 숙주 세포 및 재조합 기술에 의한 본 발명의 항체의 생산을 제공한다.
- [0205] 적합한 DNA 서열을 다양한 절차에 의해 벡터에 삽입할 수 있다. 일반적으로, DNA 서열은 당 분야에 공지된 절차에 의해 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위에 삽입된다. 발현 벡터의 폴리뉴클레오티드 서열은 적절한 발현 조절 서열 (즉, 프로모터)에 작동적으로 연결되어 mRNA 합성을 유도한다. 그러한 프로모터의 예로는 로우스 육종 바이러스 LTR 또는 조기 또는 후기 SV40 프로모터, 이. 콜라이(E. coli) lac 또는 trp, 파지 람다 PL 프로모터 및 원핵생물 (예컨대, 이. 콜라이(E. coli)에 대한 tac, T3, T7 프로모터) 또는 진핵생물 (예컨대, 시토메갈로바이러스 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, EF-1a 프로모터) 세포 또는 이들의 바이러스에서 유전자의 발현을 조절하는 것으로 공지된 그 밖의 프로모터가 있으나 이로 제한되지 않는다. 발현 벡터는 또한 번역 개시 및 전사 터미네이터에 대한 리보솜 결합 부위를 함유한다. 벡터는 또한 발현을 증폭시키기 위한 적절한 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 SV40과 같은 원숭이 바이러스, 폴리오마 바이러스, 시토메갈로바이러스, 소 파필로마 바이러스 또는 모로니 육종 바이러스, 또는 유전체 기원으로부터 유래된 것들과 같은, 바이러스 기원의 전사-자극 DNA 서열인, 인핸서를 함유할 수 있다. 벡터는 또한 바람직하게는 복제 기점을 포함한다. 벡터는 복제의 외인성 기점을 함유하도록 작제될 수 있거나, 그러한 복제 기점은 SV40 또는 또 다른 바이러스원으로부터, 또는 숙주 세포 염색체 복제 메커니즘에 의해 유래될 수 있다.
- [0206] 또한, 벡터는 트랜스펙션된 숙주 세포의 선택을 위한 마커 유전자, 예를 들어 다양한 숙주에서 메토크세이트로 선택되게 하는 디히드로폴레이트 환원효소 마커 유전자, 또는 항생제, 예컨대 β -락타마제 유전자 (암피실린 내성), 원핵생물 세포에서 이용된 Tet 유전자 (테트라사이클린 내성을 위해) 또는 네오마이신, GA418 (제네티신, 네오마이신-유도체) gpt (마이코페놀산), 암피실린, 또는 하이그로마이신 내성 유전자, 또는 예컨대 티미딘 키나제, 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제, 디히드로폴레이트 환원효소의 부재하에 숙주 세포의 유전적 병변을 보충하는 유전자 등을 임의로 함유한다. 숙주의 영양요구 마커의 유전자 생성물을 엔코딩하는 유전자 (예를 들어, LEU2, URA3, HIS3)가 효모에서 선택가능한 마커로서 종종 이용된다.
- [0207] 본 발명의 항체를 수득하기 위해, 본 발명의 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역 그리고 경쇄 및 중쇄 불변 영역을 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열이 벡터로 혼입되어야 한다. 본 발명의 항체의 경쇄 및 중쇄를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 하나 또는 다수의 벡터로 혼입된 후 숙주 세포로 도입될 수 있다.
- [0208] 포유동물 세포에서의 발현에 적합한 발현 벡터로는, 예를 들어 pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, CA), pCDEF3 (Goldman, L.A., et al., Biotechniques, 21:1013-1015 (1996)), pSVSPORT (GIBCO division of Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), pEF-Bos (Mizushima, S., et al., Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990)), Bicistronic GPEX® Retrovector (Gala Biotech, Middleton, WI) 등이 있다. 원핵생물 세포 (이. 콜라이(E. coli)), 곤충 세포 (드로소필라 슈나이더(Drosophila Schneider) S2 세포, Sf9) 및 효모 (피.

메타놀리카(*P. methanolica*), 피. 파스토리스(*P. pastoris*), 에스. 세레비지애(*S. cerevisiae*))와 같은 다양한 발현 숙주에 이용하기에 적합한 발현 벡터를 또한 이용할 수 있다. 예시적인 벡터는 pLKTOK58 (야생형 IgG1 Fc 서열) 및 pLKTOK59 (돌연변이된 IgG1 Fc 서열)이다 (U.S. Patent Application publication no. 20060147445 참조).

[0209] 인지되는 바와 같이, 본 발명에 따른 항체는 하이브리도마 세포주 이외의 세포주에서 발현될 수 있다. cDNA를 엔코딩하는 서열 또는 특정 항체에 대한 유전체 클론은 적합한 포유동물 또는 비포유동물 숙주 세포에서 이용될 수 있다. 형질전환은, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드를 바이러스에서 (또는 바이러스 벡터로) 패키징하고 숙주 세포를 바이러스 (또는 벡터)로 형질도입시키는 것을 포함하는, 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 어떠한 공지된 방법에 의해, 또는 이중성 폴리뉴클레오티드를 포유동물 세포에 도입시키는 당 분야에 공지된 트랜스펙션 절차에 의해, 예컨대 텍스트란-매개 트랜스펙션, 칼슘 포스페이트 침전, 폴리브렌 매개 트랜스펙션, 원형질체 융합, 일렉트로포레이션, 폴리뉴클레오티드(들)의 리포솜으로의 캡슐화 및 DNA 분자의 직접 미세주입에 의해 수행될 수 있다. 사용된 형질전환 절차는 형질전환되는 숙주에 의해 좌우된다. 이중성 폴리뉴클레오티드를 포유동물 세포에 도입하는 방법은 당 분야에 공지되어 있고, 텍스트란-매개 트랜스펙션, 칼슘 포스페이트 침전, 폴리브렌 매개 트랜스펙션, 원형질체 융합, 일렉트로포레이션, 입자 충격, 리포솜에서 폴리뉴클레오티드(들)의 캡슐화, 펩티드 컨쥬게이트, 덴드리머(dendrimer), 및 DNA의 핵으로의 직접 미세주입을 포함하나 이로 제한되지 않는다.

[0210] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 특징으로 한다. 구체예에서, 세포는 본원에 기재된 항체 분자, 또는 이의 구성요소를 발현시킨다. 여전히 추가의 구체예는 숙주 세포를 발현에 적합한 조건하에 유지함으로써 면역글로불린 사슬(들)을 발현시키고, 항체 분자를 생산하는 것을 포함하는, 항체 분자, 예컨대, 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자, 예컨대 인간 또는 인간화된 항체 분자를 생산하는 방법을 제공한다. 추가의 구체예는 중쇄 및 경쇄 항체 서열을 엔코딩하는 상기 발현 벡터들 중 어느 것을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 진핵생물 세포, 예컨대 포유동물 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 또는 원핵생물 세포, 예컨대 이. 콜라이(*E. coli*)일 수 있다. 예를 들어, 포유동물 세포는 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다. 예시적인 포유동물 세포는 림프구 세포주 (예컨대, NS0), 차이나이즈 햄스터 난소 세포 (CHO), COS 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 배양된 숙주 세포는 5F9 항체 분자를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 COS 세포이다. 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 하이브리도마 5F9 (PTA-8132)이다. 추가로 세포는 난모 세포, 및 유방 상피 세포와 같은 유전자이식 동물로부터의 세포를 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 항체 분자를 엔코딩하는 핵산은 유전자이식 비인간 동물에서 발현될 수 있다.

[0211] 발현을 위해 숙주로서 이용가능한 포유동물 세포주는 당 분야에 공지되어 있고, American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 이용가능한 수많은 무한증식 세포주를 포함하며, 비제한적으로 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, NSO 세포, HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장 (BHK) 세포, 원숭이 신장 세포 (COS), 인간 간세포 암종 세포 (예컨대, Hep G2), 및 다수의 다른 세포주를 포함한다. 박테리아, 효모, 곤충 및 식물을 포함하나 이로 제한되지 않는 비-포유동물 세포를 또한 재조합 항체를 발현시키는데 이용할 수 있다. 면역원성, 약물동력학, 및/또는 비-인간 글리코실화에서 초래된 이펙터 기능에서의 변화를 막기 위해, 글리코실화를 제거하는 항체 CH2 도메인의 부위 유도된 돌연변이발생이 바람직할 수 있다. 발현 방법은 가장 높은 발현 수준을 생성하고 항시적인 GCC 결합 속성을 지니는 항체를 생산하는 시스템을 결정함에 의해 선택된다.

[0212] 여전히 추가의 구체예는 본원에 기재된 핵산, 예를 들어 표 4 또는 6에 나열된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 숙주 세포를 면역글로불린의 발현에 적합한 조건하에 유지함으로써, 면역글로불린 사슬이 발현되고, 항체 분자, 예를 들어 GCC에 결합하는 인간 또는 인간화된 항체 분자, 또는 이의 단편 또는 변이체가 생산되는 것을 포함하는, 항-GCC 항체 분자, 예를 들어 인간 또는 인간화된 항체 분자를 생산하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 항체 분자의 발현 방법은 숙주 세포의 이용을 포함하며, 여기서 항체 분자, 예컨대 인간 또는 인간화된 항체 경쇄를 엔코딩하는 첫 번째 재조합 핵산 분자, 및 항체 분자, 예컨대 인간 또는 인간화된 항체 중쇄를 엔코딩하는 두 번째 재조합 핵산 분자가 단일 발현 벡터에 포함된다. 다른 구체예에서, 이들은 분리된 벡터에 존재한다. 상기 방법은, 요망되는 경우, 항체, 항체의 항원-결합 단편, 항체 사슬 또는 항체 사슬의 항원-결합 단편을 분리하거나 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0213] 예를 들어, GCC 단백질에 결합하는 인간 항체의 중쇄 및 경쇄를 엔코딩하는 핵산 분자 (즉, 하나 이상의 핵산 분자) 또는 그러한 핵산 분자(들)를 포함하는 발현 작제물 (즉, 하나 이상의 작제물)을 적합한 숙주 세포에 도입하여 선택된 숙주 세포에 적절한 어떠한 방법 (예를 들어, 형질전환, 트랜스펙션, 일렉트로포레이션, 감염)을 이용하여 재조합 숙주 세포를 생성할 수 있어서, 핵산 분자(들)가 하나 이상의 발현 조절 엘리먼트에 작동적으

로 결합하도록 한다 (예컨대, 숙주 세포 유전체로 통합된, 세포의 공정에 의해 생성된 작제물에서, 벡터에서). 생성된 재조합 숙주 세포를 발현에 적합한 조건하에 (예를 들어, 인두서의 존재하에, 적합한 비-인간 동물에서, 적합한 염, 성장 인자, 항생제, 영양 보충물 등이 보충된 적합한 배양 배지에서) 유지함으로써, 엔코딩된 폴리펩티드(들)를 생산한다. 요망되는 경우, 엔코딩된 단백질은 분리 또는 회수할 수 있다 (예컨대, 동물, 숙주 세포, 배지, 유제로부터). 이러한 공정은 유전자이식 비-인간 동물 (예를 들어, WO 92/03918, GenPharm International 참조) 또는 식물의 숙주 세포에서의 발현을 포함한다.

[0214] 추가로, 생산 세포주로부터 본 발명의 항체 (또는 그로부터의 다른 모이어티)의 발현은 공지된 다수의 기술을 이용하여 개선될 수 있다. 예를 들어, 글루타민 합성효소 및 DHFR 유전자 발현 시스템은 특정 조건하에 발현을 개선시키는 일반적인 접근법이다. 제한 회색 클로닝, 마이크로드롭(Microdrop) 기술, 또는 당 분야에 공지된 임의의 다른 방법과 같은 통상적인 기술을 이용하여 고 발현성 세포 클론을 확인할 수 있다. 문헌[European Patent Nos. 0 216 846, 0 256 055, and 0 323 997 and European Patent Application No. 89303964.4]에 관한 GS 시스템이 전체로서 또는 부분적으로 논의된다.

[0215] 본 발명의 변형된 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 재조합 발현을 위한 예시적인 시스템에서, 항체 중쇄 및 항체 경쇄 둘 모두를 엔코딩하는 재조합 발현 벡터가 칼슘 포스페이트-매개 트랜스펙션에 의해 dhfr-CHO 세포에 도입된다. 재조합 발현 벡터 내에서, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 인헨서/프로모터 조절 엘리먼트 (예컨대, SV40, CMV, 아데노바이러스 등으로부터 유래됨, 예를 들어 CMV 인헨서/AdMLP 프로모터 조절 엘리먼트 또는 SV40 인헨서/AdMLP 프로모터 조절 서열)에 각각 작동적으로 연결되어 높은 수준의 유전자 전사를 유도한다. 재조합 발현 벡터는 또한 DHFR 유전자를 지니는데, 상기 유전자는 메토타렉세이트 선택/증폭을 이용하여 벡터로 트랜스펙션된 CHO 세포의 선택을 가능하게 한다. 선택된 형질전환체 숙주 세포를 항체 중쇄 및 경쇄의 발현이 가능하도록 배양하고, 배양 배지로부터 온전한 항체를 회수한다. 표준 분자생물학 기술을 이용하여 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 트랜스펙션하고, 형질전환체를 선택하고, 숙주 세포를 배양하고, 배양 배지로부터 항체를 회수한다.

[0216] 본 발명의 항체는 또한 관심있는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열에 대해 유전자이식된 포유동물 또는 식물의 생성 및 그로부터 회수가 가능한 형태로 항체의 생산에 의해 유전자이식에 의해 생산될 수 있다. 포유동물에서 유전자이식 생산과 관련하여, 항체는 염소, 암소, 또는 다른 포유동물에서 생산되고 이로부터 회수될 수 있다. 예를 들어, 문헌[U.S. Pat. Nos. 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172, and 5,741,957]을 참조한다.

[0217] 본원에 기재된 항체, 항원-결합 단편, 항체 사슬 및 이의 항원-결합 부분은 또한 적합한 시험관내 발현 시스템에서 화학적 합성에 의해 또는 임의의 다른 적합한 방법에 의해 생산될 수 있다.

[0218] 융합 단백질 및 면역친구제이트

[0219] 본원에 기재된 항-GCC 항체는 임의의 적합한 방법 (예를 들어, 화학적 커플링, 유전자 융합, 비공유 회합 또는 기타)에 의해 하나 이상의 비-항체 분자 실체에 기능적으로 연결될 수 있다.

[0220] 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 및 비-항체 모이어티가 단일 연속 폴리펩티드 사슬의 구성요소인 융합 단백질을 생산할 수 있다. 비-항체 모이어티는 항체 모이어티와 관련하여 N-말단, C-말단, 또는 내부에 위치할 수 있다. 예를 들어, 일부 구체에는 면역글로불린 서열을 엔코딩하는 핵산을 적합한 발현 벡터, 예컨대 pET 벡터 (예를 들어, pET-15b, Novagen), 파지 벡터 (예를 들어, pCNATAB 5 E, Pharmacia), 또는 그 밖의 벡터 (예를 들어, pRIT2T 단백질 A 융합 벡터, Pharmacia)에 삽입시킴에 의해 생산될 수 있다. 생성된 작제물을 발현시켜 비-항체 모이어티 (예컨대, 히스티딘 태그, E 태그, 또는 단백질 A IgG 결합 도메인)을 포함하는 항체 사슬을 생산할 수 있다. 적합한 친화력 매트릭스를 이용한 크로마토그래피와 같은 임의의 적합한 기술을 이용하여 융합 단백질을 분리하거나 회수할 수 있다 (예를 들어, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M et al., eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8 (1991) 참조).

[0221] 본 발명은 세포로 유도되고, 구체예에서, 내재화된 항-GCC 항체 분자를 제공한다. 이들은 GCC를 발현시키는 세포에 또는 세포 내로 치료제 또는 검출가능한 작용제를 전달할 수 있으나, 표적이 발현되지 않은 세포에 또는 세포 내로는 전달할 수 없다. 따라서, 본 발명은 또한 치료제 또는 검출가능한 작용제에 친구제이션된 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자를 포함하는 항-GCC 면역친구제이트를 제공한다. 구체예에서, 항-GCC 면역친구제이트의 GCC에 대한 친화력은 친구제이션되지 않은 항체의 친화력의 적어도 10, 25, 50, 75, 80, 90, 또는 95%이다. 친화력은 세포 표면 GCC 또는 분리된 GCC를 이용하여 결정될 수 있다. 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자, 예컨대 면역친구제이트는, 본원에 기재된 검정에 의해 측정하는 경우, 1,000, 500, 250, 100, 또는 50 pM 미만의

LD50을 지닌다.

[0222] 항-GCC 항체 분자는 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 면역컨쥬게이트로서 기능하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993). See also U.S. Pat. No. 5,194,594]을 참조한다. 방사선표지된 항체의 제조는 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 또한 용이하게 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Junghans et al. in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))]을 참조한다. 또한, 문헌[U.S. Pat. Nos. 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990 (U.S. Re. Pat. No. 35,500), 5,648,471, and 5,697,902]을 참조한다.

[0223] 일부 구체예에서, 항체 분자 및 비-항체 모이어티는 링커에 의해 연결된다. 그러한 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 하기 화학식 (I)로 표시된다:



[0224]

[0225] 상기 식에서,

[0226] Ab는 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자이고;

[0227] X는 Ab를 Z에 연결시키는 모이어티, 예컨대 Ab 및 Z 중 하나 또는 둘 모두로의 공유 결합 후에 본원에 기재된 링커의 잔기이며;

[0228] Z는 치료제 또는 표지이고;

[0229] m은 약 1 내지 약 15의 범위이다.

[0230] 변수 m은 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트에서 항체 분자당 -X-Z 모이어티의 수를 나타낸다. 다양한 구체예에서, m은 1 내지 15, 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 또는 1 내지 2의 범위이다. 일부 구체예에서, m은 2 내지 10, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4 또는 2 내지 3의 범위이다. 다른 구체예에서, m은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 화학식 (I)의 다수의 면역컨쥬게이트를 포함하는 조성물에서, m은 Ab당 -X-Z 모이어티의 평균 수이고, 이것은 또한 평균 약물 로딩으로서 지칭된다. 평균 약물 로딩은 Ab당 1 내지 약 15개 -X-Z 모이어티일 수 있다. 일부 구체예에서, m이 평균 약물 로딩을 나타낼 때, m은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 또는 약 8이다. 예시적인 구체예에서, m은 약 2 내지 약 8이다. 일 구체예에서, m은 약 8이다. 또 다른 구체예에서, m은 약 4이다. 또 다른 구체예에서, m은 약 2이다.

[0231] Ab 당 -X-Z 모이어티의 평균 수는 질량 분광법, ELISA 검정, 및 HPLC와 같은 통상적인 수단에 의해 규정될 수 있다. m에 관하여 면역컨쥬게이트의 정량적인 분포가 또한 결정될 수 있다. 일부 예에서, 다른 약물 로딩의 면역컨쥬게이트와 구별되는, m이 특정 값인 균일한 면역컨쥬게이트의 분리, 정제 및 규정은 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다.

[0232] 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 혼합물로서 존재할 수 있고, 여기서 혼합물의 각 구성요소는 상이한 m 값을 갖는다. 예를 들어, 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 두 개의 분리된 면역컨쥬게이트의 구성요소, 즉 m이 7인 하나의 면역컨쥬게이트 구성요소와 m이 8인 다른 면역컨쥬게이트 구성요소의 혼합물로서 존재할 수 있다.

[0233] 일 구체예에서, 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트의 혼합물로서 존재하는데, 이때 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트에 대한 m은 각각 1, 2, 및 3이다.

[0234] 일 구체예에서, 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트의 혼합물로서 존재하는데, 이때 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트에 대한 m은 각각 3, 4, 및 5이다.

[0235] 일 구체예에서, 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트의 혼합물로서 존재하는데, 이때 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트에 대한 m은 각각 5, 6, 및 7이다.

[0236] 일 구체예에서, 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트의 혼합물로서 존재하는데, 이때 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트에 대한 m은 각각 7, 8, 및 9이다.

[0237] 일 구체예에서, 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트의 혼합물로서 존재하는데, 이때 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트에 대한 m은 각각 9, 10, 및 11이다.

- [0238] 일 구체예에서, 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트의 혼합물로서 존재하는데, 이때 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트에 대한 m 은 각각 11, 12, 및 13이다.
- [0239] 일 구체예에서, 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트의 혼합물로서 존재하는데, 이때 세 개의 분리된 면역컨쥬게이트에 대한 m 은 각각 13, 14, 및 15이다.
- [0240] 면역컨쥬게이트를 제조하기에 적합한 다양한 링커 (예를 들어, 항체 분자를 치료제 또는 표지에 연결하기 위한 헤테로이작용성 시약) 및 방법이 당 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)참조). 링커는, 예를 들어 생리학적 조건, 예컨대 세포내 조건하에 절단될 수 있어서, 링커의 절단은 세포내 환경에서 약물 (치료제 또는 표지)를 방출시킨다. 다른 구체예에서, 링커는 절단될 수 없고, 약물은, 예를 들어 항체 분해에 의해 방출된다.
- [0241] 링커를 항체 모이어티 상에서 화학적 반응기, 예컨대 유리 아미노, 이미노, 히드록실, 티올 또는 카르복실기 (예컨대, N- 또는 C- 말단, 하나 이상의 리신 잔기의 엡실론 아미노기, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 유리 카르복실산기, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 설프히드릴기)에 결합시킬 수 있다. 링커가 결합된 부위는 항체 모이어티의 아미노산 서열의 천연 잔기일 수 있거나, 링커는, 예를 들어, DNA 재조합 기술에 의해 (예를 들어, 아미노산 서열에 시스테인 또는 프로테아제 절단 부위를 도입시킴에 의해) 또는 단백질 생화학에 의해 (예를 들어, 환원, pH 조절 또는 단백질분해) 항체 모이어티에 도입될 수 있다.
- [0242] 가장 일반적으로 사용되는 공유 부착의 비-특이적 방법 중 하나는 화합물의 카르복시 (또는 아미노)기를 항체 분자의 아미노 (또는 카르복시)기에 결합시키는 카르보디이미드 반응이다. 추가로, 디알데히드 또는 이미도에 스테르와 같은 이작용성제를 이용하여 화합물의 아미노기를 항체 분자의 아미노기에 결합시킬 수 있다. 또한 항체 분자로의 약물의 부착을 위해 시프(Schiff) 염기 반응을 이용할 수 있다. 상기 방법은 글리콜 또는 히드록시기를 함유하는 약물을 피아이오테이트 산화시켜 알데히드를 형성하고, 그 후 알데히드를 항체 분자와 반응시키는 것을 포함한다. 부착은 항체 분자의 아미노기를 지니는 시프 염기의 형성을 통해 일어난다. 이소티오시아네이트가 또한 항체 분자에 약물을 공유적으로 부착시키는 커플링제로서 이용될 수 있다. 그 밖의 기술이 당업자에게 공지되어 있고 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0243] 특정 구체예에서, 링커 (X)의 전구체인 중간체를 적합한 조건하에 약물 (Z)와 반응시킨다. 특정 구체예에서, 약물 및/또는 중간체 상에 있는 반응기를 이용한다. 약물과 중간체, 또는 유도된 약물간 반응의 생성물을 후속하여 적합한 조건하에 항체 분자와 반응시킨다.
- [0244] 면역컨쥬게이트는 당업자에게 널리 공지된 방법, 예를 들어, 컬럼 크로마토그래피 (예컨대, 친화력 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과, 소수성 상호작용 크로마토그래피), 투석, 정용여과(diafiltration) 또는 침전을 사용하여 반응물로부터 정제될 수 있다. SDS-PAGE, 질량 분광법, 또는 모세관 전기영동과 같은 당업자에게 널리 공지된 방법을 이용하여 면역컨쥬게이트를 평가할 수 있다.
- [0245] 일부 구체예에서, 링커는 세포내 환경 (예컨대, 리소솜 또는 엔도솜 또는 소포 내)에 존재하는 절단제에 의해 절단될 수 있다. 링커는, 예를 들어 리소솜 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하나 이로 제한되지 않는 프로테아제 효소 또는 세포내 펩티다제에 의해 절단된 펩티딜 링커일 수 있다. 일부 구체예에서, 펩티딜 링커는 2개 이상의 아미노산 길이 또는 세 개 이상의 아미노산 길이이다. 절단제는 카텝신 B 및 D 그리고 플라스민을 포함할 수 있고, 이들 모두는 디펩티드 약물 유도체를 가수분해시켜 표적 세포 내부에서 활성 약물을 방출시키는 것으로 공지되어 있다 (예를 들어, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123 참조). 가장 전형적인 것이 GCC-발현 세포에 존재하는 효소에 의해 절단될 수 있는 펩티딜 링커이다. 예를 들어, 암성 조직에서 고도로 발현되는 티올-의존성 프로테아제 카텝신-B에 의해 절단될 수 있는 펩티딜 링커를 이용할 수 있다 (예컨대, Phe-Leu 또는 Gly-Phe-Leu-Gly 링커 (SEQ ID NO:319)). 그러한 링커의 다른 예가, 예컨대 U.S. Patent No. 6,214,345호 (그 전문이 참조로서 그리고 모든 목적을 위해 본원에 포함된다)에 기재되어 있다. 특정 구체예에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 펩티딜 링커는 Val-Cit 링커 또는 Phe-Lys 링커이다 (예를 들어, val-cit 링커를 지니는 독소루비신의 합성을 기재하는 U.S. patent 6,214,345호 참조). 치료제의 세포내 단백질분해 방출을 이용하는 한 가지 이점은 작용제가 컨쥬게이션될 때 통상적으로 약독화되고 컨쥬게이트의 혈청 안정성이 통상적으로 높다는 것이다.
- [0246] 다른 구체예에서, 절단가능한 링커는 pH-민감성이고, 즉, 특정 pH 값에서의 가수분해에 민감하다. 전형적으로, pH-민감성 링커는 산성 조건하에 가수분해될 수 있다. 예를 들어, 리소솜에서 가수분해될 수 있는 산-불안정 링커를 (예를 들어, 히드라존, 세미카르바존, 티오세미카르바존, 시스-아코니트산 아미드, 오르토에스테르, 아

세탈, 케탈 등) 이용할 수 있다 (예를 들어, U.S. Patent Nos. 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661 참조). 혈액에 있는 것들과 같은 그러한 링커는 중성 pH 조건하에 비교적으로 안정하나, 대략 리소솜의 pH인 pH 5.5 또는 5.0 이하에서는 불안정하다. 특정 구체예에서, 가수분해될 수 있는 링커는 티오에테르 링커 (예컨대, 아실히드라존 결합을 통해 치료제에 부착된 티오에테르)이다 (예를 들어, U.S. Patent No. 5,622,929 참조).

[0247] 여전히 다른 구체예에서, 링커는 환원 조건하에 절단될 수 있다 (예컨대, 디설파이드 링커). 다양한 디설파이드 링커가 당 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 SATA (N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트), SPDP (N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트), SPDB (N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)부티레이트) 및 SMPT (N-숙신이미딜-옥시카르보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)톨루엔), SPDB 및 SMPT를 이용하여 형성될 수 있는 것들을 포함한다 (예를 들어, Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987 참조. 또한 U.S. Patent No. 4,880,935 참조).

[0248] 여전히 다른 특수한 구체예에서, 링커는 말로네이트 링커 (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), 말레이미도벤조일 링커 (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg Med Chem.* 3(10):1299-1304), 또는 3'-N-아미드 유사체 (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12)이다.

[0249] 여전히 다른 구체예에서, 링커 단위는 절단될 수 없고 약물은 항체 분해에 의해 방출된다 (예를 들어 그 전문이 참조로서 그리고 모든 목적을 위해 본원에 포함된 U.S. Publication No. 20050238649 참조).

[0250] 전형적으로 링커는 세포의 환경에 실질적으로 민감하지 않다. 링커에 관해 본원에서 사용된 "세포의 환경에 실질적으로 민감하지 않다"는 것은, 면역결핍제이트가 세포의 환경 (예를 들어, 혈장)에 존재할 때, 면역결핍제이트의 샘플 중 링커의 약 20% 이하, 전형적으로 약 15% 이하, 보다 전형적으로 약 10% 이하, 및 심지어 더욱 전형적으로 약 5% 이하, 약 3% 이하, 또는 약 1% 이하가 절단됨을 의미한다. 예를 들어, 혈장과 면역결핍제이트를 소정 시간의 기간 동안 (예컨대, 2, 4, 8, 16, 또는 24 시간) 인큐베이션한 후 혈장에 존재하는 유리 약물의 양을 정량함에 의해 링커가 세포의 환경에 실질적으로 민감하지 않은 지를 결정할 수 있다.

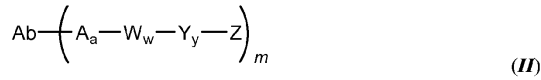
[0251] 그 밖의 상호 배타적이지 않은 구체예에서, 링커는 세포의 내재화를 촉진한다. 특정 구체예에서, 링커는 치료제 또는 표지 (Z)에 컨쥬게이션될 때 세포의 내재화를 촉진한다. 여전히 다른 구체예에서, 링커는 Z 모이어티 및 항-GCC 항체 분자 둘 모두에 컨쥬게이션될 때 세포의 내재화를 촉진한다.

[0252] 본 조성물 및 방법에서 이용될 수 있는 다양한 예시적인 링커가 WO 2004-010957, U.S. Publication No. 20060074008, U.S. Publication No. 20050238649, 및 U.S. Publication No. 20060024317에 기재되어 있따 (각각은 그 전문이 참조로서 그리고 모든 목적을 위해 본원에 포함된다).

[0253] 항체 분자를 치료제 또는 표지에 커플링하는데 이용될 수 있는 링커의 예는, 예를 들어 말레이미도카프로일 (mc); 말레이미도카프로일-*p*-아미노벤질카르바메이트; 말레이미도카프로일-캡티드-아미노벤질카르바메이트 링커, 예컨대 말레이미도카프로일-L-페닐알라닌-L-리신-*p*-아미노벤질카르바메이트 및 말레이미도카프로일-L-발린-L-시트룰린-*p*-아미노벤질카르바메이트 (vc); N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 또는 SPP로도 알려짐); 4-숙신이미딜-옥시카르보닐-2-메틸-2-(2-피리딜디티오)-톨루엔 (SMPT); N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP); N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부티레이트 (SPDB); 2-이미노티올란; S-아세틸숙신산 안하이드라이드; 디설파이드 벤질 카르바메이트; 카르보네이트; 히드라존 링커; N-(α -말레이미도아세톡시) 숙신이미드 에스테르; *N*-[4-(*p*-아지도살리실아미도)부틸]-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드 (AMAS); *N*-[β -말레이미도프로필옥시]숙신이미드 에스테르 (BMPS); [N- ϵ -말레이미도카프로일옥시]-숙신이미드 에스테르 (EMCS); N-[γ -말레이미도부틸옥시]숙신이미드 에스테르 (GMBS); 숙신이미딜-4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복시-[6-아미도카프로에이트] (LC-SMCC); 숙신이미딜 6-(3-[2-피리딜디티오]-프로피온아미도)헥사노에이트 (LC-SPDP); *m*-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르 (MBS); *N*-숙신이미딜[4-아이오도아세틸]아미노벤조에이트 (SIAB); 숙신이미딜 4-[*N*-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC); *N*-숙신이미딜 3-[2-피리딜디티오]-프로피온아미도 (SPDP); [N- ϵ -말레이미도카프로일옥시]설포숙신이미드 에스테르 (Sulfo-EMCS); N-[γ -말레이미도부틸옥시]-설포숙신이미드 에스테르 (Sulfo-GMBS); 4-설포숙신이미딜-6-메틸- α -(2-피리딜디티오)톨루아미도헥사노에이트 (Sulfo-LC-SMPT); 설포숙신이미딜 6-(3'-(2-피리딜디티오)-프로피온아미도)헥사노에이트 (Sulfo-LC-SPDP); *m*-말레이미도벤조일-N-히드록시설포숙신이미드 에스테르 (Sulfo-MBS); *N*-설포숙신이미딜[4-아이오도아세틸]아미노벤조에이트 (Sulfo-SIAB); 설포숙신이미딜 4-[*N*-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트 (Sulfo-SMCC); 설포숙신이미딜 4-[*p*-

말레이미도페닐]부티레이트 (Sulfo-SMPB); 에틸렌 글리콜-비스(숙신산 N-히드록시숙신이미드 에스테르) (EGS); 디숙신이미딜 타르트레이트 (DST); 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 (DOTA); 디에틸렌트리아민-펜타아세트산 (DTPA); 및 티오우레아 링커를 포함한다.

[0254] 일부 구체예에서, 링커 -X-는 화학식 -A_a-W_w-Y_y-를 지니고, 화학식 (I)의 번역컨쥬게이트는 하기 화학식 (II)를 특징으로 한다:



[0255]

[0256] 상기 식에서,

[0257] Ab는 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자이고;

[0258] -A-는 스트레처(Stretcher) 단위이며;

[0259] a 는 0 또는 1이고;

[0260] 각각의 -W-는 독립적으로 아미노산 단위이고;

[0261] w 는 0 내지 12의 정수이며;

[0262] -Y-는 자가-희생적(self-immolative) 스페이서 단위이고;

[0263] y 는 0, 1, 또는 2이고;

[0264] Z는 치료제 또는 표지이며;

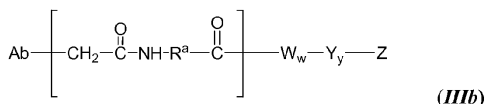
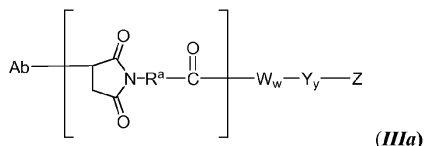
[0265] m 은 약 1 내지 약 15이다.

[0266] 존재할 경우 스트레처 단위 (A)는 Ab 단위를, 존재할 경우 아미노산 단위 (-W-), 존재할 경우 스페이서 단위 (-Y-)에 결합시키거나; 치료제 또는 표지 (Z)에 결합시킬 수 있다. 자연적으로 또는 화학적 조작을 통해, 항-GCC 항체 분자 상에 존재할 수 있는 유용한 작용기는 설프히드릴, 아미노, 히드록실, 탄수화물의 아노머 히드록실기, 및 카르복실을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 적합한 작용기는 설프히드릴 및 아미노이다. 일례에서, 설프히드릴기는 항-GCC 항체 분자의 분자내 디설파이드 결합의 환원에 의해 생성될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 설프히드릴기는 항-GCC 항체 분자의 리신 모이어티의 아미노기와 2-이미노티올란 (트라우트(Traut) 시약) 또는 다른 설프히드릴 발생 시약의 반응에 의해 생성될 수 있다. 특정 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 재조합 항체이고 하나 이상의 리신을 지니도록 공학처리된다. 다른 특정 구체예에서, 재조합 항-GCC 항체 분자는 추가의 시스템과 같은 추가의 설프히드릴기를 지니도록 공학처리된다.

[0267] 일 구체예에서, 스트레처 단위는 Ab 단위의 황 원자와 결합을 형성한다. 황 원자는 Ab의 설프하이드릴기로부터 유래될 수 있다. 이러한 구체예의 대표적인 스트레처 단위는 화학식 (*IIIa*) 및 (*IIIb*)의 사각 괄호 안에 도시되며, 이 때 Ab-, -W-, -Y-, -Z, w 및 y는 상기 정의된 바와 같고, R^a는 -C₁-C₁₀ 알킬렌-, -C₂-C₁₀ 알케닐렌-, -C₂-C₁₀ 알키닐렌-, -카르보시클로-, -O-(C₁-C₈ 알킬렌)-, O-(C₂-C₈ 알케닐렌)-, -O-(C₂-C₈ 알키닐렌)-, -아릴렌-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-아릴렌-, -C₂-C₁₀ 알케닐렌-아릴렌, -C₂-C₁₀ 알키닐렌-아릴렌, -아릴렌-C₁-C₁₀ 알킬렌-, -아릴렌-C₂-C₁₀ 알케닐렌-, -아릴렌-C₂-C₁₀ 알키닐렌-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-(카르보시클로)-, -C₂-C₁₀ 알케닐렌-(카르보시클로)-, -C₂-C₁₀ 알키닐렌-(카르보시클로)-, -(카르보시클로)-C₁-C₁₀ 알킬렌-, -(카르보시클로)-C₂-C₁₀ 알케닐렌-, -(카르보시클로)-C₂-C₁₀ 알키닐렌, 헤테로시클로-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-(헤테로시클로)-, -C₂-C₁₀ 알케닐렌-(헤테로시클로)-, -C₂-C₁₀ 알키닐렌-(헤테로시클로)-, -(헤테로시클로)-C₁-C₁₀ 알킬렌-, -(헤테로시클로)-C₂-C₁₀ 알케닐렌-, -(헤테로시클로)-C₂-C₁₀ 알키닐렌-, -(CH₂CH₂O)_r-, 또는 -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-로부터 선택되며, r은 1-10의 정수이고, 여기서 상기 알킬, 알키닐, 알케닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카르보사이클, 카르보시클로, 헤테로시클로, 및 아릴렌 라디칼은, 단독이든 다른 기의 일부이든 간에, 치환되거나 치환되지 않는다. 일부 구체예에서, 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카르보사이클, 카르보시클로, 헤테로시클로, 및 아릴렌 라디칼은, 단독이든 다른 기의 일부이든 간에, 치환되지 않는다. 일부 구체예에서, R^a는

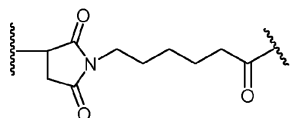
-C₁-C₁₀ 알킬렌-, -카르보시클로-, -O-(C₁-C₈ 알킬렌)-, -아릴렌-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-아릴렌-, -아릴렌-C₁-C₁₀ 알킬렌-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-(카르보시클로)-, -(카르보시클로)-C₁-C₁₀ 알킬렌-, -C₃-C₈ 헤테로시클로-, -C₁-C₁₀ 알킬렌-(헤테로시클로)-, -(헤테로시클로)-C₁-C₁₀ 알킬렌-, -(CH₂CH₂O)_r-, 및 -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-로부터 선택되고; r은 1-10의 정수이며, 여기서 상기 알킬렌기는 치환되지 않고, 나머지 기들은 치환되거나 치환되지 않는다.

[0268] 명백히 언급되지 않을 때조차, 1 내지 15개의 약물 모이어티가 Ab ($m = 1-15$)에 결합될 수 있음이 모든 예시적인 구체예로부터 이해되어야 한다.



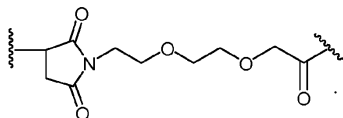
[0269]

[0270] 실례가 되는 스트레처 단위는 화학식 (IIIa)의 하기 단위이고, 여기서 R^a는 -(CH₂)₅-이다:



[0271]

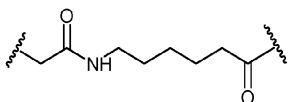
[0272] 또 다른 실례가 되는 스트레처 단위는 화학식 (IIIa)의 하기 단위이고, 여기서 R^a는 is -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-이고; r은 2이다:



[0273]

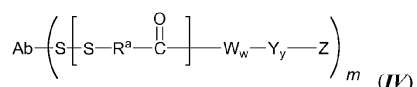
[0274] 또 다른 실례가 되는 스트레처 단위는 화학식 (IIIa)의 단위이고, 여기서 R^a는 -아릴렌- 또는 아릴렌-C₁-C₁₀ 알킬렌-이다. 일부 구체예에서, 아릴기는 치환되지 않은 페닐기이다.

[0275] 여전히 또 다른 실례가 되는 스트레처 단위는 화학식 (IIIb)의 하기 단위이고, 여기서 R^a는 -(CH₂)₅-이다:



[0276]

[0277] 특정 구체예에서, 스트레처 단위는 Ab 단위의 황 원자 및 스트레처 단위의 황 원자 사이에 있는 디설파이드 결합을 통해 Ab 단위에 결합된다. 상기 구체예의 대표적인 스트레처 단위가 하기 화학식 (IV)의 사각 괄호 안에 도시되며, 여기서 R^a, Ab-, -W-, -Y-, -Z, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다.



[0278]

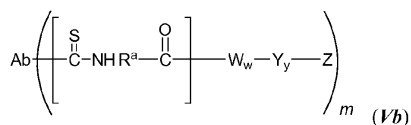
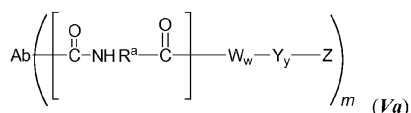
[0279] 본 명세서의 전체에 걸쳐서, 하기 화학식의 S 모이어티는 문맥에서 달리 언급하지 않는 한 Ab 단위의 황 원자를 지칭하는 것임이 인지되어야 한다.



[0280]

[0281]

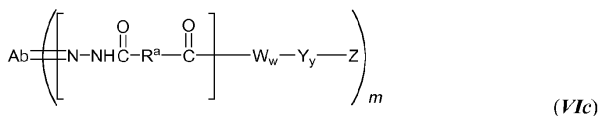
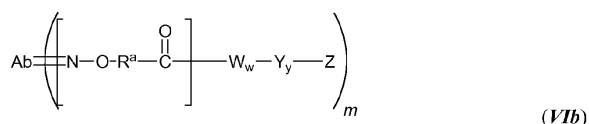
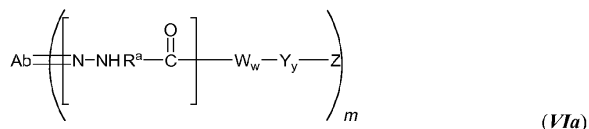
여전히 다른 구체예에서, 스트레처는 Ab로의 부착에 앞서 Ab의 일차 또는 이차 아미노기와 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위를 함유한다. 이러한 반응성 부위의 예로는 활성화된 에스테르, 에컨대 숙신이미드 에스테르, 4-니트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 안하이드라이드, 산 클로라이드, 설포닐 클로라이드, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트가 있으나 이로 제한되지 않는다. 이러한 구체예의 대표적인 스트레처 단위가 하기 화학식 (Va) 및 (Vb)의 사각 괄호 안에 도시되며, 여기서 $-R^a$, Ab-, $-W$ -, $-Y$ -, $-Z$, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다:



[0282]

[0283]

일부 구체예에서, 스트레처는 Ab 상에 존재할 수 있는 변형된 탄수화물의 ($-\text{CHO}$) 기에 반응하는 반응성 부위를 함유한다. 예를 들어, 탄수화물을 소듐 퍼아यो테이트와 같은 시약을 이용하여 가볍게 산화시킬 수 있고, 산화된 탄수화물의 생성된 ($-\text{CHO}$) 단위를 히드라지드, 옥심, 일차 또는 이차 아민, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카복실레이트, 및 문헌[Kaneko *et al.*, 1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41]에 기재된 것과 같은 아릴히드라지드와 같은 작용기를 함유하는 스트레처와 축합시킬 수 있다. 상기 구체예의 대표적인 스트레처 단위가 하기 화학식 (VIa), (VIb), 및 (VIc)의 사각 괄호 안에 도시되며, 여기서 $-R^a$, Ab-, $-W$ -, $-Y$ -, $-Z$, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다.



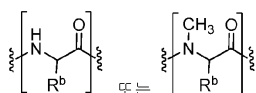
[0284]

[0285]

존재할 경우 아미노산 단위 ($-W$)는, 스페이서 단위가 존재하는 경우 스트레처 단위를 스페이서 단위에 결합시키고, 스페이서 단위가 부재하는 경우 스트레처 단위를 약물 모이어티에 결합시키며, 스트레처 단위 및 스페이서 단위가 부재하는 경우 Ab 단위를 치료제 또는 표지 모이어티에 결합시킨다.

[0286]

W_w 는 예를 들어 모노펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 펜타펩티드, 헥사펩티드, 헵타펩티드, 옥타펩티드, 노나펩티드, 데카펩티드, 운데카펩티드 또는 도데카펩티드 단위일 수 있다. 각각의 $-W$ 단위는 독립적으로 사각 괄호로 하기 표시된 화학식을 지니고, w는 0 내지 12의 정수이다.

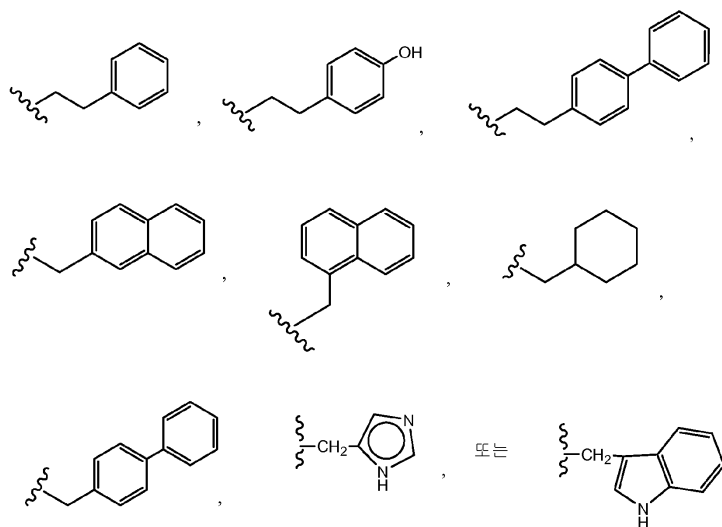


[0287]

[0288]

상기 식에서, R^b 는 수소, 메틸, 이소프로필, 이소부틸, *sec*-부틸, 벤질, *p*-히드록시벤질, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$,

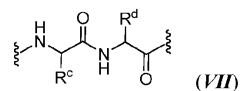
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-피리딜메틸-, 3-피리딜메틸-, 4-피리딜메틸-, 페닐, 시클로헥실,



[0289] 이다.

[0290] 일부 구체예에서, 아미노산 단위는 암 또는 종양-관련 프로테아제를 포함하는 하나 이상의 효소에 의해 효소적으로 절단되어 치료제 또는 표지 모이어티(-Z)를 유리시킬 수 있고, 치료제 또는 표지 모이어티는 일 구체예에서 방출시에 생체내에서 양자화되어 치료제 또는 표지 (Z)를 제공한다.

[0291] 특정 구체예에서, 아미노산 단위는 천연 아미노산을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 아미노산 단위는 비-천연 아미노산을 포함할 수 있다. 예시적인 W_n 단위는 하기 화학식 (VII)-(IX)로 표시된다:

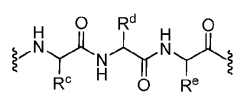


[0292]

[0293] 상기 식에서, R^c 및 R^d 는 하기와 같다:

R^c	R^d
벤질	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
메틸	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
이소프로필	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
이소프로필	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
벤질	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
이소부틸	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
2차-부틸	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
벤질	메틸;
벤질	$(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$;

[0294]



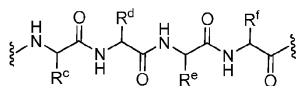
[0295]

(VIII)

[0296] 상기 식에서, R^c , R^d 및 R^e 는 하기와 같다:

R^c	R^d	R^e
벤질	벤질	$(CH_2)_4NH_2$;
이소프로필	벤질	$(CH_2)_4NH_2$; 및
H	벤질	$(CH_2)_4NH_2$;

[0297]



(IX)

[0298]

[0299] 상기 식에서, R^c , R^d , R^e 및 R^f 는 하기와 같다:

R^c	R^d	R^e	R^f
H	벤질	이소부틸	H; 및
메틸	이소부틸	메틸	이소부틸

[0300]

[0301] 예시적인 아미노산 단위는 화학식 (VII)의 단위를 포함하나 이로 제한되지 않으며, 여기서 R^c 는 벤질이고, R^d 는 $-(CH_2)_4NH_2$ 이거나; R^c 는 이소프로필이고, R^d 는 $-(CH_2)_4NH_2$ 이거나; R^c 는 이소프로필이고, R^d 는 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 이다. 또 다른 예시적인 아미노산 단위는 화학식 (VIII)의 단위이고, 여기서 R^c 는 벤질이고, R^d 는 벤질이며, R^e 는 $-(CH_2)_4NH_2$ 이다.

[0302] 유용한 $-W-$ 단위는 특정 효소, 예를 들어 종양-관련된 프로테아제에 의한 효소적 절단을 위해 선택성에 있어서 최적화되거나 설계될 수 있다. 일 구체예에서, $-W-$ 단위는 절단이 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의해 촉매화되는 것이다.

[0303] 일 구체예에서, $-W-$ 는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펩타펩티드이다. R^b , R^c , R^d , R^e 또는 R^f 가 수소가 아닐 때, R^b , R^c , R^d , R^e 또는 R^f 가 부착된 탄소 원자는 카이랄이다.

[0304] R^b , R^c , R^d , R^e 또는 R^f 가 부착된 각각의 탄소 원자는 독립적으로 (S) 또는 (R) 배열이다.

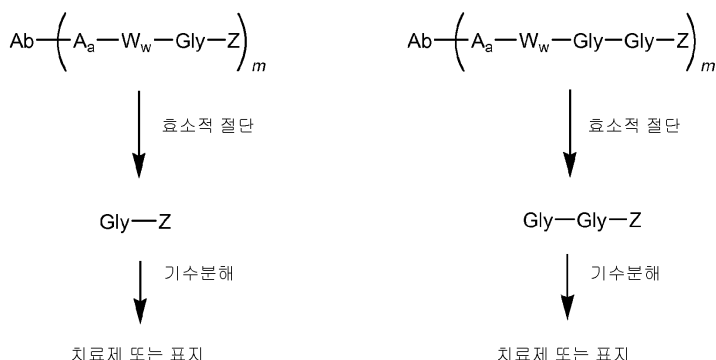
[0305] 아미노산 단위의 일 측면에서, 아미노산 단위는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit)이다. 또 다른 측면에서, 아미노산 단위는 페닐알라닌-리신 (즉, fk)이다. 아미노산 단위의 여전히 또 다른 측면에서, 아미노산 단위는 N-메틸발린-시트룰린이다. 여전히 또 다른 측면에서, 아미노산 단위는 5-아미노발레르산, 호모 페닐알라닌 리신, 테트라하이드로퀴놀린카르복실레이트 리신, 시클로헥실알라닌 리신, 이소네페코트산 리신, 베타-알라닌 리신, 글리신 세린 발린 글루타민 및 이소네페코트산이다.

[0306] 존재할 경우 스페이서 단위 ($-Y-$)는, 아미노산 단위가 존재하는 경우, 아미노산 단위를 치료제 또는 표지 모이어티 ($-Z-$)에 결합시킨다. 대안적으로, 스페이서 단위는 아미노산 단위가 부재하는 경우, 스트레처 단위를 치료제 또는 표지 모이어티에 결합시킨다. 스페이서 단위는 또한, 아미노산 단위 및 스트레처 단위 둘 모두가 부재할 때, 치료제 또는 표지 모이어티를 Ab 단위에 결합시킨다.

[0307] 스페이서 단위는 두 일반적인 유형을 지닌다: 비 자가-희생적 또는 자가 희생적. 비 자가-희생적 스페이서 단위는, 스페이서 단위의 일부 또는 전부가 항체-약물 컨쥬게이트로부터 아미노산 단위의, 특히 효소적 절단 후에, 치료제 또는 표지 모이어티에 결합된 채로 남아 있는 것이다. 비 자가-희생적 스페이서 단위의 예로는 (글리신-글리신) 스페이서 단위 및 글리신 스페이서 단위 (둘 모두가 반응식 1에 도시되어 있음)(하기)가 있으나 이로 제한되지 않는다. 글리신-글리신 스페이서 단위 또는 글리신 스페이서 단위를 함유하는 컨쥬게이트가 효소 (예를 들어, 종양-세포 관련-프로테아제, 암-세포-관련 프로테아제 또는 림프구-관련 프로테아제)를 통해 효소적 절단을 겪을 때, 글리신-글리신-Z 모이어티 또는 글리신-Z 모이어티는 Ab-Aa-Ww-로부터 절단된다. 일 구체예에서, 독립적인 가수분해 반응이 표적 세포 내에서 일어나서, 글리신-Z 모이어티 결합을 절단하고 치료제

또는 표지를 유리시킨다.

반응식 1



일부 구체예에서, 비 자가-희생적 스페이스 단위 (-Y-)는 -Gly-이다. 일부 구체예에서, 비 자가-희생적 스페이스 단위 (-Y-)는 -Gly-Gly-이다.

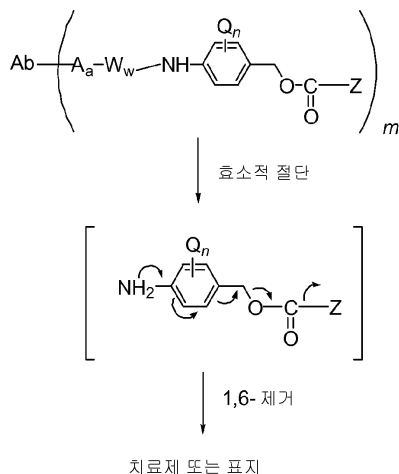
일 구체예에서, 본 발명은 스페이스 단위가 존재하지 않는 ($y = 0$) 화학식 (II)의 번역컨쥬게이트 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.

대안적으로, 자가-희생적 스페이스 단위를 함유하는 컨쥬게이트는 -Z를 방출할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "자가-희생적 스페이스"는 두 개의 이격된 화학적 모이어티를 안정한 3벌(tripartite) 분자로 공유적으로 결합시킬 수 있는 이작용성 화학적 모이어티를 지칭한다. 첫 번째 모이어티에 대한 결합이 절단될 때, 이것은 두 번째 화학적 모이어티로부터 자발적으로 분리될 것이다.

일부 구체예에서, -Y_y-는 p-아미노벤질 알코올 (PAB) 단위 (반응식 2 및 3 참조)이고 이의 페닐렌 부분은 Q_n으로 치환되는데, 여기서 Q는 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; n 은 0-4의 정수이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 단독이든 다른 기의 일부이든 간에 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

일부 구체예에서, -Y-는 PAB 기의 아미노 질소 원자를 통해 -W_w-에 결합하고, 카르보네이트, 카르바메이트 또는 에테르기를 통해 -Z에 직접 연결된 PAB기이다. 임의의 특정 이론 또는 메커니즘에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 반응식 2는 문헌[Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872]에 개시된 대로 카르바메이트 또는 카르보네이트기를 통해 -Z에 직접 부착된 PAB 기로부터 치료제 또는 표지 (-Z)를 방출시키는 가능한 메커니즘을 도시한다.

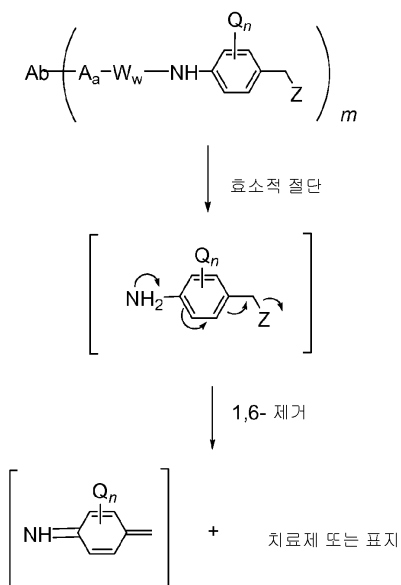
반응식 2



[0317] **반응식 2**에서, Q는 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이고; m은 1 내지 약 20의 범위이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 단독이든 다른 기의 일부이든 간에 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0318] 임의의 특정 이론 또는 메커니즘에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, **반응식 3**은 에테르 또는 아민 결합을 통해 -Z에 직접 부착된 PAB 기로부터 치료제 또는 표지 모이어티(-Z)를 방출시키는 가능한 메커니즘을 도시하고, 여기서 -Z는 치료제 또는 표지 모이어티의 일부인 산소 또는 질소기를 포함한다.

[0319] 반응식 3



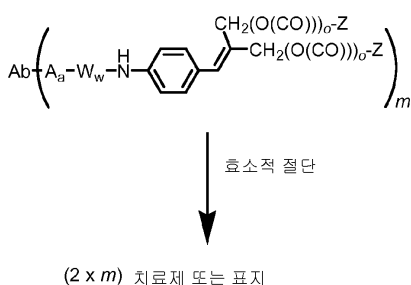
[0320]

[0321] **반응식 3**에서, Q는 -C₁-C₈ 알킬, -C₂-C₈ 알케닐, -C₂-C₈ 알키닐, -O-(C₁-C₈ 알킬), -O-(C₂-C₈ 알케닐), -O-(C₂-C₈ 알키닐), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; n은 0-4의 정수이고; m은 1 내지 약 20의 범위이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 단독이든 다른 기의 일부이든 간에 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0322] 자가-희생적 스페이서의 다른 예는 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) 및 오르토 또는 파라-아미노벤질아세탈과 같은 PAB 기와 전자적으로 유사한 방향족 화합물을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 치환되거나 치환되지 않은 4-아미노부티르산 아마이드 (Rodrigues *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223), 적합하게 치환된 바이시클로[2.2.1] 및 바이시클로[2.2.2] 고리계 (Storm *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) 및 2-아미노페닐프로피온산 아마이드 (Amsberry *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867)와 같이, 아마이드 결합 가수분해시에 고리화되는 스페이서를 이용할 수 있다. 글리신의 α-위치에서 치환된 아민-함유 약물의 제거가 (Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447) 또한 자가-희생적 스페이서의 예이다.

[0323] 일 구체예에서, 스페이서 단위는 다수의 약물을 혼입시키고 방출시키는데 이용될 수 있는, **반응식 4**에 도시된 분지형 비스(히드록시메틸)-스티렌 (BHMS) 단위이다.

[0324] 반응식 4

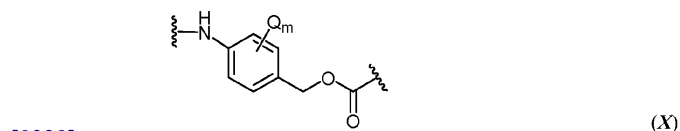


[0325]

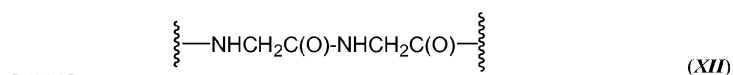
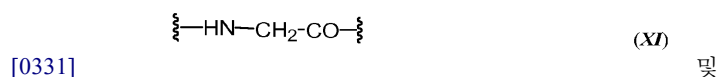
[0326] **반응식 4**에서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐, $-C_2-C_8$ 알키닐, $-O-(C_1-C_8)$ 알킬, $-O-(C_2-C_8)$ 알케닐, $-O-(C_2-C_8)$ 알키닐, -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; n 은 0-4의 정수이고; o 는 0 또는 1이고; m 은 1 내지 약 20의 범위이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 단독이든 다른 기의 일부이든 간에 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0327] 일부 구체예에서, -Z 모이어티는 동일하다. 여전히 또 다른 구체예에서, -Z 모이어티는 상이하다.

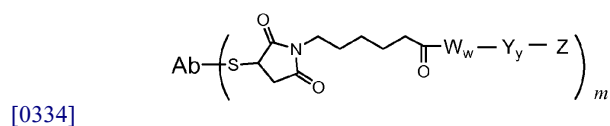
[0328] 일 측면에서, 스페이서 단위 ($-Y_y-$)는 하기 화학식 (X)-(XII)에 의해 표시된다:



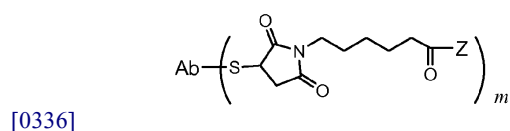
[0330] 상기 식에서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐, $-C_2-C_8$ 알키닐, $-O-(C_1-C_8)$ 알킬, $-O-(C_2-C_8)$ 알케닐, $-O-(C_2-C_8)$ 알키닐, -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m 은 0-4의 정수이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 단독이든 다른 기의 일부이든 간에 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.



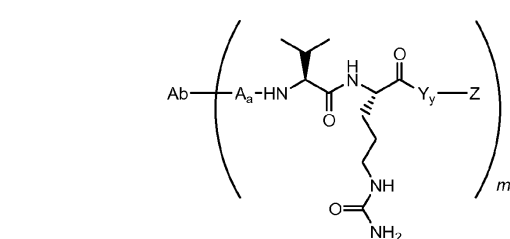
[0333] 선택된 구체예의 그룹에서, 화학식 (I) 및 (II)의 컨쥬게이트는 다음과 같다:

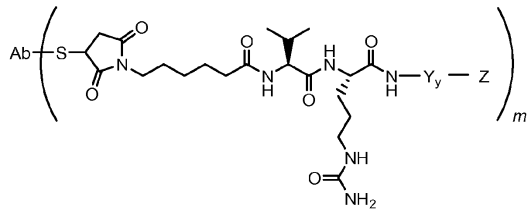
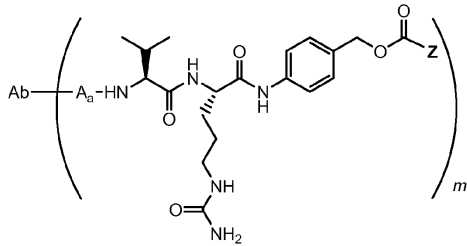


[0335] 상기 식에서, w 및 y 는 각각 0, 1 또는 2이다:

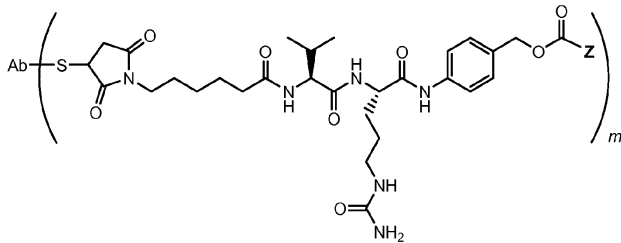


[0337] 상기 식에서, w 및 y 는 각각 0이다:





, 및



[0339]

[0340]

상기 식에서, A_a , W_w , Y_y , Z 및 Ab 는 상기 제공된 의미를 지닌다.

[0341]

화학식 (I)의 변수 Z 는 치료제 또는 표지이다. 치료제는 요망되는 생물학적 효과를 발휘할 수 있는 임의의 작용제일 수 있다. 일부 구체예에서, 치료제는 세포를 제2 치료 요법, 예컨대 화학요법제, 방사선 치료, 면역치료를 위해 감작시킨다.

[0342]

일부 구체예에서, 치료제는 세포증식억제제 또는 세포독성제이다. 예로는 비제한적으로 항대사물질 (예를 들어, 아자티오프린, 6-머캅토프린, 6-티오구아닌, 플루다라빈, 펜토스타틴, 클라드리빈, 5-플루오로우라실 (5FU), 플록수리딘 (FUDR), 시토신 아라비노시드 (시타라빈), 메토트렉세이트, 트리메토프림, 피리메타민, 페메트렉시드); 알킬화제 (예를 들어, 시클로포스파미드, 메클로르에타민, 우라무스틴, 멜팔란, 클로르암부실, 티오테파/클로르암부실, 이포스파미드, 카르무스틴, 로무스틴, 스트렙토조신, 부술판, 디브로모만니톨, 시스플라틴, 카르보플라틴, 네다플라틴, 옥살리플라틴, 사트라플라틴, 트리플라틴 테트라니트레이트, 프로카르바진, 알트레타민, 다카르바진, 미토졸로미드, 데모졸로미드); 안트라시클린 (예를 들어, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 발루비신); 항생제 (예를 들어, 닥티노마이신, 블레오마이신, 미트라마이신, 안트라마이신, 스트렙토도토신, 그라미시딘 D, 미토마이신 (예를 들어, 미토마이신 C), 듀오카르마이신 (예컨대, CC-1065), 칼리케아미신); 항유사분열제 (예를 들어, 마이탄시노이드, 아우리스타틴, 도라스타틴, 크립토피신, 빈카 알칼로이드 (예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 비노렐빈), 탁산 (예를 들어, 파클리탁셀, 도세탁셀, 또는 신규한 탁산 (예를 들어 International Patent Publication No. WO 01/38318, published May 31, 2001 참조)), 및 콜치킨(colchicine); 토포아이스오머라제 억제제 (예를 들어, 이리노테칸, 토포테칸, 암사크린, 에토포시드, 테니포시드, 미토크산트론); 및 프로테아좀 억제제 (예를 들어, 캡티딜 보론산)가 있다.

[0343]

마이탄시노이드 면역컨쥬게이트

[0344]

일부 구체예에서, 치료제는 마이탄시노이드이다. 마이탄시노이드 화합물 및 항체에 대한 이들의 컨쥬게이션 방법은, 예를 들어 문헌[Chari et al., *Cancer Res.*, 52: 127-131 (1992); Widdison et al., *J. Med. Chem.* 49: 4392-4408 (2006); and U.S. Patent Nos. 5,208,020 and 6,333,410]에 기재되어 있다. 마이탄시노이드의 예는 변형된 방향족 고리 (예컨대, C-19-테클로로, C-20-테메톡시, C-20-아실옥시)를 지니는 마이탄신 유사체 및 다른 위치에 변형을 지니는 것들 (예컨대, C-9-CH, C-14-알콕시메틸, C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸, C-15-히드록시/아실옥시, C-15-메톡시, C-18-N-테메틸, 4,5-테옥시)을 포함한다. 특정 구체예에서, 마이탄시노이

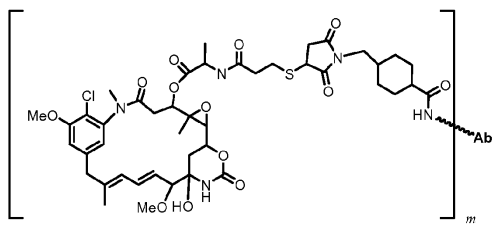
드는 $N^{2'}$ -데아세틸- $N^{2'}$ -(4-머캅토-1-옥소펜틸)마이탄신 (DM3), $N^{2'}$ -데아세틸- $N^{2'}$ -(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신 (DM1), 또는 $N^{2'}$ -데아세틸- $N^{2'}$ -(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)마이탄신 (DM4)이다.

[0345]

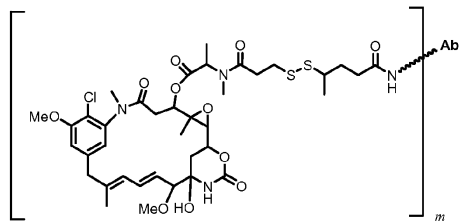
실프히드릴기를 포함하는 마이탄시노이드 화합물은 티오에테르 또는 디설파이드 결합에 의해 마이탄시노이드 화합물에 결합된 헤테로이작용성 링커를 이용하여 항체에 커플링될 수 있다. 그러한 일부 구체예에서, 링커는 항체의 아미노기 (예를 들어 리신 잔기의 엡실론 아미노기 또는 말단 아미노기)에 커플링된다. 일부 구체예에서, 마이탄시노이드 화합물을 항체에 커플링하기 위해 이용되는 헤테로이작용성 링커는 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트, 또는 SPP로도 알려짐), 4-숙신이미딜-옥시카르보닐-2-메틸-2-(2-피리딜디티오)-톨루엔 (SMPT), N-숙신이미딜 4-[*N*-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP); N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부티레이트 (SPDB), 2-이미노티올란, 또는 S-아세틸숙신산 안하이드라이드이다.

[0346]

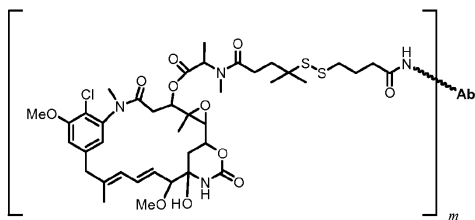
특정 구체예에서, 화학식 (I)의 번역컨쥬게이트는 화학식 Ab-(SMCC-DM1)_m (화학식 (I-1); Ab-(SPP-DM1)_m (화학식 (I-2); 또는 Ab-(SPDB-DM4)_m (화학식 (I-3)을 특징으로 하고, 여기서 Ab는 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자이고, m은 화학식 (I)에 대해 상기 기재된 값 및 바람직한 값을 지닌다.



(I-1)



(I-2)



(I-3)

[0348]

[0349]

일부 구체예에서, 화학식 (I-1), (I-2), 또는 (I-3)의 변수 Ab는 표 1 내지 6에 요약된 특징을 지니는 항체 분자이다. 특정 구체예에서, 변수 Ab는 5F9 항체 분자 또는 Abx-229 항체 분자이다.

[0350]

일부 구체예에서, 화학식 (I-1), (I-2), 또는 (I-3)의 변수 m은 약 1 내지 약 10, 약 3 내지 약 7, 또는 약 3 내지 약 5의 범위이다.

[0351]

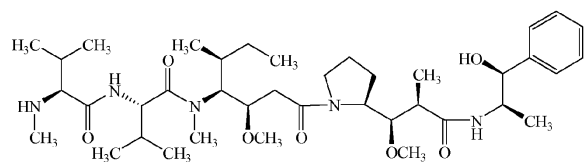
특정 구체예에서, 본 발명은 화학식 (I-1), (I-2), 또는 (I-3)의 번역컨쥬게이트에 관한 것이고, 여기서 Ab는 5F9 항체 분자이고 m은 약 4이다.

[0352]

돌라스타틴 및 아우리스타틴 번역컨쥬게이트

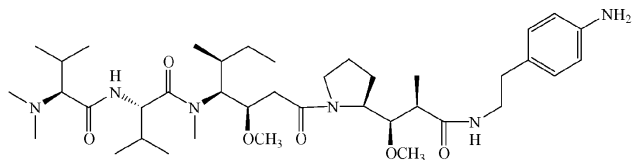
[0353]

그 밖의 일부 구체예에서, 치료제는 돌라스타틴이다. 일부 구체예에서, 치료제는 아우리스타틴, 예컨대 아우리스타틴 E (당 분야에서 돌라스타틴-10의 유도체로도 알려짐) 또는 이의 유도체이다. 일부 구체예에서, 치료제는 하기 화학식 (XIII)-(XXIII)의 화합물로부터 선택된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

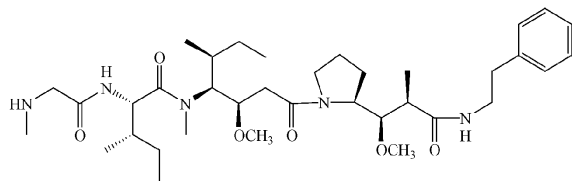


(XIII)

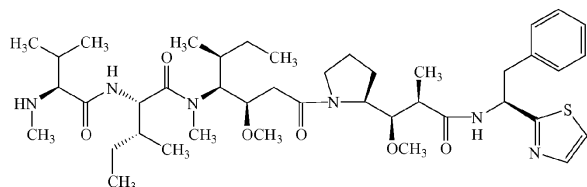
[0354]



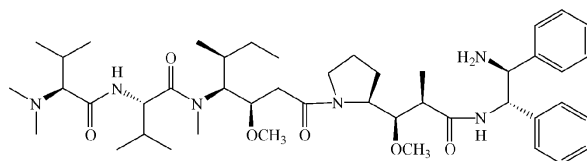
(XIV)



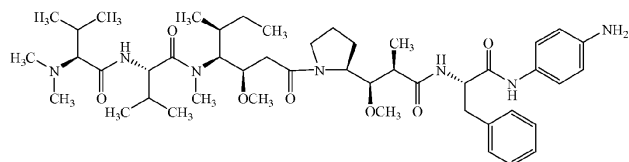
(XV)



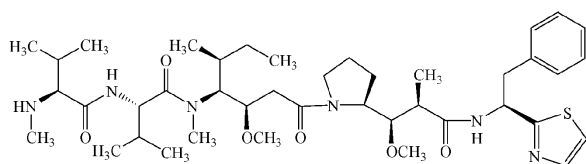
(XVI)



(XVII)

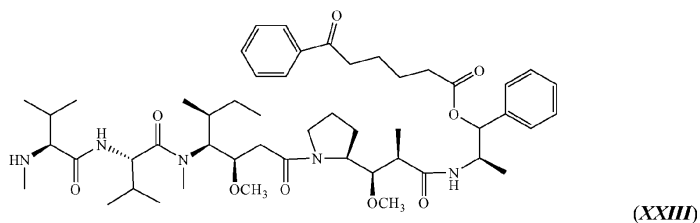
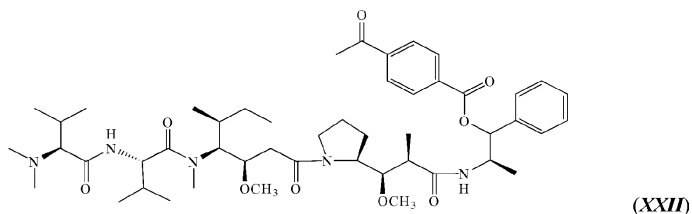
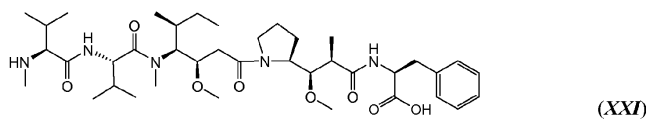
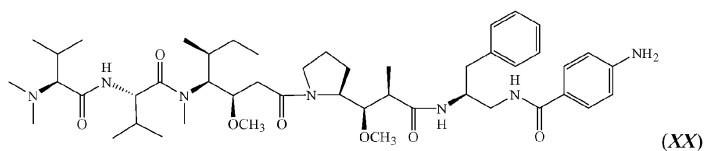


(XVIII)



(XIX)

[0355]



[0356]

[0357]

아우리스타틴 화합물 및 항체에 대한 이들의 컨쥬게이션 방법은, 예를 들어 문헌[Doronina et al., *Nature Biotech.*, 21: 778-784 (2003); Hamblett et al, *Clin. Cancer Res.*, 10: 7063-7070 (2004); Carter and Senter, *Cancer J.*, 14 154-169 (2008); U.S. Patent Nos. 7,498,298, 7,091,186, 6,884,869; 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; and 4,486,414; U.S. Patent Publication Nos. 20090010945, 20060074008, 20080300192, 20050009751, 20050238649, and 20030083236; and International Patent Publication Nos. WO 04/010957 and WO 02/088172]에 기재되어 있고, 문헌들 각각은 그 전문이 참조로서 그리고 모든 목적을 위해 본원에 포함된다.

[0358]

아우리스타틴은, 예를 들어 아우리스타틴 E 및 케토산 사이에 형성된 에스테르일 수 있다. 예를 들어, 아우리스타틴 E를 파라아세틸 벤조산 또는 벤조일발레르산과 반응시켜 각각 AEB 및 AEVB를 생산할 수 있다. 다른 전형적인 아우리스타틴으로는 아우리스타틴 페닐알라닌 페닐렌디아민 (AFP; (XVIII)), 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE; (XIII)), 및 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF; (XXI))가 있다.

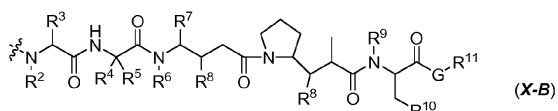
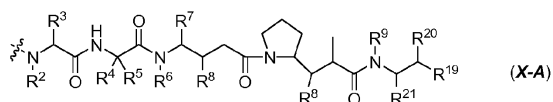
[0359]

아우리스타틴은 미세관 동력학 및 핵과 세포의 분열을 방해하고 항암 활성을 지니는 것으로 나타났다. 본 발명에 사용되는 아우리스타틴은 튜불린에 결합하여 GCC-발현 세포주에 세포독성 또는 세포증식억제 효과를 발휘할 수 있다. 화합물이 튜불린에 결합할 지를 결정하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Muller et al., *Anal. Chem* 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., *Molecular Pharmacology*, 1995 47: 965-976; and Hamel et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1990 265:28, 17141-17149] 참조. 본 발명을 위해, 튜불린에 대한 화합물의 상대 친화력을 결정할 수 있다. 본 발명의 일부 바람직한 아우리스타틴은 튜불린에 대한 MMAE의 결합 친화력보다 10배 낮은 (보다 약한 친화력) 친화력에서부터 튜불린에 대한 MMAE의 결합 친화력보다 10배, 20배 또는 심지어 100배 높은 (보다 높은 친화력) 친화력으로 튜불린에 결합한다.

[0360]

아우리스타틴 또는 생성된 면역컨쥬게이트가 요망되는 세포주에 세포독성 또는 세포증식억제 효과를 발휘할 지를 결정하는데 이용할 수 있는, 당 분야에 공지된, 다수의 상이한 검정들이 존재한다. 예를 들어, 면역컨쥬게이트의 세포독성 또는 세포증식억제 활성은, 세포 배양 배지에서 면역컨쥬게이트의 표적 단백질을 발현시키는 포유동물 세포를 노출시키고; 약 6시간 내지 약 5일간 세포를 배양하고; 세포 생활력을 측정함에 의해 결정될 수 있다. 세포-기반 시험관내 검정을 이용하여 면역컨쥬게이트의 생활력 (증식), 세포독성, 및 아포토시스의 유도 (카스파제 활성화)를 측정할 수 있다.

- [0361] 면역컨쥬게이트가 세포증식억제 효과를 나타내는 지를 결정하기 위해, 티미딘 혼입 검정을 이용할 수 있다. 예를 들어, 96-웰 플레이트팅된 5,000개 세포/웰의 밀도로 표적 항원을 발현시키는 암 세포를 72시간의 기간 동안 배양시키고 72시간의 기간 중 마지막 8시간 동안 0.5 μ Ci의 3 H-티미딘에 노출시켰다. 배양된 세포로의 3 H-티미딘의 혼입을 면역컨쥬게이트의 존재 및 부재하에 측정하였다.
- [0362] 세포독성을 결정하기 위해, 피사 또는 아포토시스(프로그램화된 세포 사멸)가 측정될 수 있다. 피사는 전형적으로 형질막 투과성 증가, 세포의 팽화, 및 형질막의 파열을 수반한다. 아포토시스는 전형적으로 막 기포형성(membrane blebbing), 세포질의 응축, 및 내생 엔도뉴클레아제의 활성화를 특징으로 한다. 암세포에서의 상기 효과 중 임의의 효과의 결정은 면역컨쥬게이트가 암의 치료에 유용한 것을 나타낸다.
- [0363] 세포 생활력은 세포에서의 뉴트럴 레드(neutral red), 트립판 블루 또는 ALAMAR™ 블루와 같은 염료의 흡수를 결정함으로써 측정될 수 있다(예를 들어, Page *et al.*, 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476 참조). 이러한 결정에서, 세포는 염료를 함유하는 배지에서 인큐베이션되고, 상기 세포는 세척되고, 염료의 세포 흡수를 반영하는 잔존 염료가 분광광도로 측정된다. 단백질 결합 염료 설포로다민 B(sulforhodamine B, SRB)가 세포독성을 측정하는데 사용될 수 있다(Skehan *et al.*, 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).
- [0364] 대안적으로, 테트라졸륨염, 예를 들어, MTT 또는 WST가 살아 있으며 사멸되지 않은 세포의 검출에 의한 포유동물 세포 생존 및 증식에 대한 정량적 비색 검정에 사용된다(예를 들어, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63 참조).
- [0365] 아포토시스는, 예를 들어, DNA 단편화를 측정함으로써 정량화될 수 있다. DNA 단편화의 정량적 시험관내 결정을 위한 상업적인 광도측정 방법이 이용가능하다. TUNEL(단편화된 DNA 중의 표지된 뉴클레오티드의 혼입을 검출함) 및 ELISA-기반 검정을 포함하는 이러한 검정의 예가 문헌[Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37(Roche Molecular Biochemicals)]에 기재되어 있다.
- [0366] 아포토시스는 또한 세포에서의 형태적 변화를 측정함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 피사에서의 같이, 형질막 온전성의 상실은 특정 염료(예를 들어, 아크리딘 오렌지 또는 에티디움 브로마이드와 같은 형광 염료)의 흡수를 측정함으로써 결정될 수 있다. 아포토시스 세포 수를 측정하는 방법은 문헌[Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan *et al.* eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16)]에 기재되어 있다. 세포는 또한 DNA 염료(예를 들어, 아크리딘 오렌지, 에티디움 브로마이드, 또는 프로피디움 아이오다이드)로 표지될 수 있고, 이러한 세포는 염색질 응축 및 핵내막에 따른 이동에 대해 관찰된다. 아포토시스를 결정하기 위해 측정될 수 있는 다른 형태 변화는, 예를 들어, 세포질 응축, 증가된 막 기포형성, 및 세포 수축을 포함한다.
- [0367] 아포토시스 세포의 존재는 배양물의 부착된 구획 및 "유동(floating)" 구획 둘 모두에서 측정될 수 있다. 예를 들어, 둘 모두의 구획은 상층액을 제거하고, 부착된 세포에 트립신 처리하고, 원심분리 세척 단계(예를 들어, 2000 rpm에서 10분) 후의 제조물을 조합시키고, 아포토시스를 검출(예를 들어, DNA 단편화를 측정함)함으로써 수거될 수 있다(예를 들어, Piazza *et al.*, 1995, *Cancer Research* 55:3110-16 참조).
- [0368] 면역컨쥬게이트의 효과는 동물 모델에서 시험되거나 확인될 수 있다. 다수의 확립된 암의 동물 모델이 당업자에게 공지되어 있으며, 이중 임의의 것이 면역컨쥬게이트의 효능을 검정하는데 사용될 수 있다. 각각의 모델의 비제한적인 예가 하기에 기재된다. 또한, 면역컨쥬게이트의 생체내 효능을 시험하기 위한 작은 동물 모델이, 적절한 면역결핍 설치류 계통, 예를 들어, 무흉선 누드 마우스 또는 SCID 마우스에 인간 종양 세포주를 이식함으로써 생성될 수 있다.
- [0369] 일부 구체예에서, 화학식 (I)의 변수 -Z는 하기 화학식 (X-A) 또는 화학식 (X-B)의 아우리스타틴 모이어티이다:



[0370]

- [0371] 상기 식에서, 각 위치에서 독립적으로,
- [0372] 물결선은 결합을 나타내고;
- [0373] R^2 는 $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고;
- [0374] R^3 는 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, 카르보사이클, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(카르보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(카르보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(카르보사이클), $-아릴$, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(아릴), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(아릴), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(아릴), $-헤테로사이클$, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(헤테로사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(헤테로사이클)이고;
- [0375] R^4 는 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, 카르보사이클, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(카르보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(카르보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(카르보사이클), $-아릴$, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(아릴), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(아릴), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(아릴), $-헤테로사이클$, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(헤테로사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(헤테로사이클)이고;
- [0376] R^5 는 $-H$ 또는 $-C_1-C_8$ 알킬이거나,
- [0377] R^4 및 R^5 는 카르보사이클릭 고리를 공동으로 형성하고, 화학식 $-(CR^aR^b)_s-$ 를 갖고, 여기서 R^a 및 R^b 는 독립적으로 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, 또는 $-카르보사이클$ 이고, s 는 2, 3, 4, 5 또는 6이고,
- [0378] R^6 는 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고;
- [0379] R^7 은 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, $-카르보사이클$, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(카르보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(카르보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(카르보사이클), $-아릴$, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(아릴), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(아릴), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(아릴), $-헤테로사이클$, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(헤테로사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(헤테로사이클)이고;
- [0380] 각각의 R^8 은 독립적으로 $-H$, $-OH$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, $-O-(C_1-C_{20}$ 알킬), $-O-(C_2-C_{20}$ 알케닐), $-O-(C_1-C_{20}$ 알키닐), 또는 $-카르보사이클$ 이고;
- [0381] R^9 은 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고;
- [0382] R^{19} 은 $-아릴$, $-헤테로사이클$, 또는 $-카르보사이클$ 이고;
- [0383] R^{20} 는 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, $-카르보사이클$, $-O-(C_1-C_{20}$ 알킬), $-O-(C_2-C_{20}$ 알케닐), $-O-(C_2-C_{20}$ 알키닐), 또는 OR^{18} 이고, 여기서 R^{18} 은 $-H$, 히드록실 보호기, 또는 직접 결합이고, 여기서 OR^{18} 은 $=O$ 이고;
- [0384] R^{21} 은 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐, $-아릴$, $-헤테로사이클$, 또는 $-카르보사이클$ 이고;
- [0385] R^{10} 은 $-아릴$ 또는 $-헤테로사이클$ 이고;
- [0386] G 는 $-O-$, $-S-$, $-NH-$, 또는 $-NR^{12}-$ 이고, 여기서 R^{12} 는 $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고;
- [0387] R^{11} 은 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, $-아릴$, $-헤테로사이클$, $-(R^{13}O)_sR^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_s-$

$\text{CH}(\text{R}^{15})_2$ 이고;

[0388] s 는 0 내지 1000 범위의 정수이고;

[0389] R^{13} 은 $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알킬렌, $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐렌, 또는 $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐렌이고;

[0390] R^{14} 은 $-\text{H}$, $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 알킬, $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐, 또는 $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐이고;

[0391] R^{15} 의 각각의 존재는 독립적으로 $-\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_t-\text{N}(\text{R}^{16})_2$, $-(\text{CH}_2)_t-\text{SO}_3\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_t-\text{SO}_3-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 알킬, $-(\text{CH}_2)_t-\text{SO}_3-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐, 또는 $-(\text{CH}_2)_t-\text{SO}_3-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐이고;

[0392] R^{16} 의 각각의 존재는 독립적으로 $-\text{H}$, $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 알킬, $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐, $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐 또는 $-(\text{CH}_2)_t-\text{COOH}$ 이고;

[0393] t 는 0 내지 6 범위의 정수이고;

[0394] 단독이거나 또 다른 기의 일부인 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카르보사이클, 및 헤테로사이클 라디칼은 치환되거나 비치환된다.

[0395] 화학식 ($X-A$)의 아우리스타틴은, 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카르보사이클, 및 헤테로사이클 라디칼이 비치환된 아우리스타틴을 포함한다.

[0396] 화학식 ($X-A$)의 아우리스타틴은, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , 및 R^9 의 기가 비치환되고, R^{19} , R^{20} 및 R^{21} 의 기가 본원에 기재된 바와 같이 치환되거나 비치환된 아우리스타틴을 포함한다.

[0397] 화학식 ($X-A$)의 아우리스타틴은,

[0398] R^2 가 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 알킬이고;

[0399] R^3 , R^4 및 R^7 이 독립적으로 $-\text{H}$, $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 알킬, $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐, $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐, 모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클, $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 알킬렌(모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클), $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클), $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클), $-\text{C}_6-\text{C}_{10}$ 아릴, $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 알킬렌(C_6-C_{10} 아릴), $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐렌(C_6-C_{10} 아릴), $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐렌(C_6-C_{10} 아릴), -헤테로사이클, $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 알킬렌(헤테로사이클), $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐렌(헤테로사이클)로부터 선택되고; 여기서, 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 카르보사이클, 아릴, 및 헤테로사이클 라디칼이 치환되거나 비치환되고;

[0400] R^5 가 -수소이고;

[0401] R^6 가 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 알킬이고;

[0402] 각각의 R^8 가 독립적으로 $-\text{OH}$, $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 알킬), $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐), 또는 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐)로부터 선택되고; 여기서, 상기 알킬, 알케닐, 및 알키닐 라디칼이 치환되거나 비치환되고;

[0403] R^9 이 -수소 또는 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 알킬이고;

[0404] R^{19} 이 치환되거나 비치환된 페닐이고;

[0405] R^{20} 가 OR^{18} 이고; 여기서, R^{18} 이 H , 히드록실 보호기, 또는 직접 결합이고, 여기서 OR^{18} 이 $=\text{O}$ 이고;

[0406] R^{21} 이 $-\text{H}$, $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 알킬, $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알케닐, $-\text{C}_2-\text{C}_{20}$ 알키닐, 또는 -카르보사이클로부터 선택되고; 여기서, 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 및 카르보사이클 라디칼이 치환되거나 비치환되는 아우리스타틴 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 형태를 포함한다.

- [0407] 화학식 (X-A)의 아우리스타틴은,
- [0408] R^2 가 메틸이고;
- [0409] R^3 가 -H, $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_8$ 알키닐이고, 여기서, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 라디칼이 치환되거나 비치환되고;
- [0410] R^4 가 -H, $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐, $-C_2-C_8$ 알키닐, 모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클, $-C_6-C_{10}$ 아릴, $-C_1-C_8$ 알킬렌(C_6-C_{10} 아릴), $-C_2-C_8$ 알케닐렌(C_6-C_{10} 아릴), $-C_2-C_8$ 알키닐렌(C_6-C_{10} 아릴), $-C_1-C_8$ 알킬렌 (모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클), $-C_2-C_8$ 알케닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클), $-C_2-C_8$ 알키닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클)이고; 여기서, 단독이거나 또 다른 기의 일부인 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 및 카르보사이클 라디칼이 치환되거나 비치환되고;
- [0411] R^5 가 H이고;
- [0412] R^6 가 메틸이고;
- [0413] R^7 이 $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐 또는 $-C_2-C_8$ 알키닐이고;
- [0414] 각각의 R^8 이 메톡시이고;
- [0415] R^9 이 -수소 또는 $-C_1-C_8$ 알킬이고;
- [0416] R^{19} 이 페닐이고;
- [0417] R^{20} 이 OR^{18} 이고; 여기서, R^{18} 가 -H, 히드록실 보호기, 또는 직접 결합이고, 여기서, OR^{18} 은 =O이고;
- [0418] R^{21} 은 메틸인 아우리스타틴 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 형태를 포함한다.
- [0419] 화학식 (X-A)의 아우리스타틴은, R^2 가 메틸이고; R^3 가 H 또는 C_1-C_3 알킬이고; R^4 가 C_1-C_5 알킬이고; R^5 가 H이고; R^6 가 메틸이고; R^7 이 이소프로필 또는 세크-부틸이고; R^8 이 메톡시이고; R^9 이 수소 또는 C_1-C_8 알킬이고; R^{19} 이 페닐이고; R^{20} 가 OR^{18} 이고; 여기서, R^{18} 이 H, 히드록실 보호기, 또는 직접 결합이고, 여기서 OR^{18} 이 =O이고; R^{21} 이 메틸인 아우리스타틴 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 형태를 포함한다.
- [0420] 화학식 (X-A)의 아우리스타틴은, R^2 가 메틸 또는 C_1-C_3 알킬이고; R^3 가 H 또는 C_1-C_3 알킬이고; R^4 가 C_1-C_5 알킬이고; R^5 가 H이고; R^6 가 C_1-C_3 알킬이고; R^7 이 C_1-C_5 알킬이고; R^8 이 C_1-C_3 알콕시이고; R^9 이 수소 또는 C_1-C_8 알킬이고; R^{19} 이 페닐이고; R^{20} 가 OR^{18} 이고; 여기서, R^{18} 이 H, 히드록실 보호기, 또는 직접 결합이고, 여기서, OR^{18} 가 =O 이고; R^{21} 이 C_1-C_3 알킬인 아우리스타틴 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.
- [0421] 화학식 (X-B)의 아우리스타틴은,
- [0422] R^2 가 메틸이고;
- [0423] R^3 , R^4 , 및 R^7 이 독립적으로 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, 모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카르보사이클), $-C_6-C_{10}$ 아릴, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(C_6-C_{10} 아릴), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(C_6-C_{10} 아릴), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(C_6-C_{10} 아릴), -헤테로사이클, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(헤테로사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(헤테로사이클)로부터 선택되고; 여기서, 단독이거나 또 다른 기의 일부인 상기 알

킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 카르보사이클, 아릴, 및 헤테로시클릭 라디칼이 치환되거나 비치환되고;

- [0424] R^5 가 -H이고;
- [0425] R^6 가 메틸이고;
- [0426] 각각의 R^8 이 메톡시이고;
- [0427] R^9 이 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고; 여기서, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 라디칼이 치환되거나 비치환되고;
- [0428] R^{10} 이 치환되거나 비치환된 아릴 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클이고;
- [0429] G 가 -O-, -S-, -NH-, 또는 $-NR^{12}$ -이고, 여기서, R^{12} 가 각각이 치환되거나 비치환되는 $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고;
- [0430] R^{11} 이 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, -아릴, -헤테로사이클, $-(R^{13}O)_s-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$ 이고, 여기서, 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 및 헤테로사이클 라디칼이 치환되거나 비치환되고;
- [0431] s 가 0 내지 1000 범위의 정수이고;
- [0432] R^{13} 이 각각이 치환되거나 비치환되는 $-C_2-C_{20}$ 알킬렌, $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌이고;
- [0433] R^{14} 이 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고, 여기서, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 라디칼이 치환되거나 비치환되고;
- [0434] R^{15} 의 각각의 존재가 독립적으로 -H, $-COOH$, $-(CH_2)_t-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_t-SO_3H$, $-(CH_2)_t-SO_3-C_1-C_{20}$ 알킬, $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ 알키닐이고, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 라디칼이 치환되거나 비치환되고;
- [0435] R^{16} 의 각각의 존재가 독립적으로 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐 또는 $-(CH_2)_t-COOH$ 이고, 여기서, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 라디칼이 치환되거나 비치환되고;
- [0436] t 가 0 내지 6의 범위의 정수인 아우리스타틴 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 형태를 포함한다.
- [0437] 상기 구체예 중 특정 구체예에서, R^{10} 은 치환되거나 비치환된 페닐이다.
- [0438] 화학식 ($X-B$)의 아우리스타틴은, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , 및 R^9 의 기가 비치환되고, R^{10} 및 R^{11} 의 기가 본원에 기재된 바와 같은 아우리스타틴을 포함한다.
- [0439] 화학식 ($X-B$)의 아우리스타틴은, 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카르보사이클, 및 헤테로사이클 라디칼이 비치환된 아우리스타틴을 포함한다.
- [0440] 화학식 ($X-B$)의 아우리스타틴은, R^2 가 C_1-C_3 알킬이고; R^3 가 H 또는 C_1-C_3 알킬이고; R^4 가 C_1-C_5 알킬이고; R^5 가 H이고; R^6 가 C_1-C_3 알킬이고; R^7 이 C_1-C_5 알킬이고; R^8 이 C_1-C_3 알콕시이고; R^9 이 수소 또는 C_1-C_8 알킬이고; R^{10} 이 치환되거나 비치환된 페닐이고; G 가 O, S, 또는 NH이고; R^{11} 이 본원에 정의된 바와 같은 아우리스타틴 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 형태를 포함한다.
- [0441] 화학식 ($X-B$)의 아우리스타틴은, R^2 가 메틸이고; R^3 가 H 또는 C_1-C_3 알킬이고; R^4 가 C_1-C_5 알킬이고; R^5 가 H이고;

R^6 가 메틸이고; R^7 이 이소프로필 또는 세크-부틸이고; R^8 이 메톡시이고; R^9 이 수소 또는 C_1-C_8 알킬이고; R^{10} 이 치환되거나 비치환된 페닐이고; G 가 O, S, 또는 NH이고; R^{11} 이 본원에 정의된 바와 같은 아우리스타틴 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 형태를 포함한다.

[0442] 화학식 (X-B)의 아우리스타틴은, R^2 가 메틸이고; R^3 가 H 또는 C_1-C_3 알킬이고; R^4 가 C_1-C_5 알킬이고; R^5 가 H이고; R^6 가 메틸이고; R^7 이 이소프로필 또는 세크-부틸이고; R^8 이 메톡시이고; R^9 이 수소 또는 C_1-C_8 알킬이고; R^{10} 이 페닐이고; G 가 O 또는 NH이고, R^{11} 이 본원에 정의된 바와 같고, 바람직하게는 수소인 아우리스타틴 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 형태를 포함한다.

[0443] 화학식 (X-B)의 아우리스타틴은, R^2 가 C_1-C_3 알킬이고; R^3 가 H 또는 C_1-C_3 알킬이고; R^4 가 C_1-C_5 알킬이고; R^5 가 H이고; R^6 가 C_1-C_3 알킬이고; R^7 이 C_1-C_5 알킬이고; R^8 이 C_1-C_3 알콕시이고; R^9 이 수소 또는 C_1-C_8 알킬이고; R^{10} 이 페닐이고; G 가 O 또는 NH이고, R^{11} 이 본원에 정의된 바와 같고, 바람직하게는 수소인 아우리스타틴 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 형태를 포함한다.

[0444] 화학식 (X-A) 또는 (X-B)의 아우리스타틴은, R^3 , R^4 및 R^7 이 독립적으로 이소프로필 또는 세크-부틸이고, R^5 가 -H인 아우리스타틴을 포함한다. 한 예시적 구체예에서, R^3 및 R^4 는 각각 이소프로필이고, R^5 는 H이고, R^7 은 세크-부틸이다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

[0445] 화학식 (X-A) 또는 (X-B)의 아우리스타틴은, R^2 및 R^6 가 각각 메틸이고, R^9 이 H인 아우리스타틴을 포함한다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

[0446] 화학식 (X-A) 또는 (X-B)의 아우리스타틴은, R^8 의 각각의 존재가 $-OCH_3$ 인 아우리스타틴을 포함한다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

[0447] 화학식 (X-A) 또는 (X-B)의 아우리스타틴은, R^3 및 R^4 가 각각 이소프로필이고, R^2 및 R^6 가 각각 메틸이고, R^5 가 H이고, R^7 이 세크-부틸이고, R^8 의 각각의 존재가 $-OCH_3$ 이고, R^9 가 H인 아우리스타틴을 포함한다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

[0448] 화학식 (X-B)의 아우리스타틴은, G 가 -O- 또는 -NH-인 아우리스타틴을 포함한다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

[0449] 화학식 (X-B)의 아우리스타틴은, R^{10} 이 아릴인 아우리스타틴을 포함한다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

[0450] 화학식 (X-B)의 아우리스타틴은, R^{10} 이 -페닐인 아우리스타틴을 포함한다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

[0451] 화학식 (X-B)의 아우리스타틴은, G 가 -O-이고, R^{11} 이 H, 메틸 또는 t-부틸인 아우리스타틴을 포함한다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

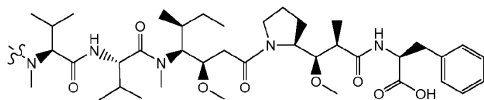
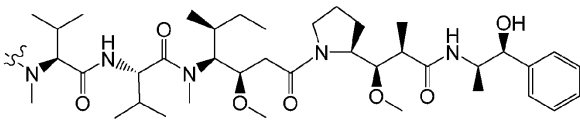
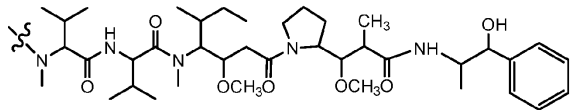
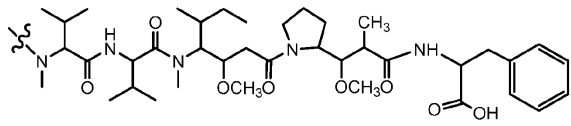
[0452] 화학식 (X-B)의 아우리스타틴은, G 가 -NH이고, R^{11} 이 $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$ 인 경우, R^{15} 이 $-(CH_2)_t-N(R^{16})_2$ 이고, R^{16} 이 $-C_1-C_8$ 알킬 또는 $-(CH_2)_t-COOH$ 인 아우리스타틴을 포함한다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

[0453] 화학식 (X-B)의 아우리스타틴은, G 가 -NH이고, R^{11} 이 $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$ 인 경우, R^{15} 이 H 또는 $-(CH_2)_t-SO_3H$ 인 아우리스타틴을 포함한다. 나머지 치환기는 본원에 정의된 바와 같다.

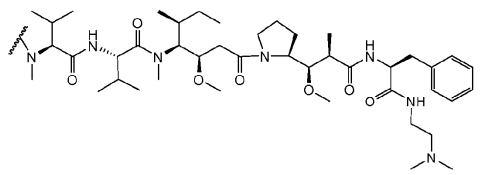
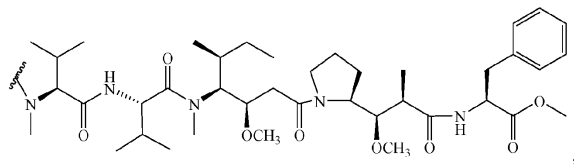
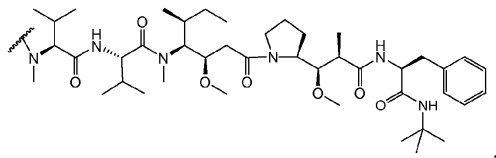
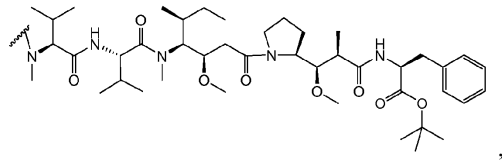
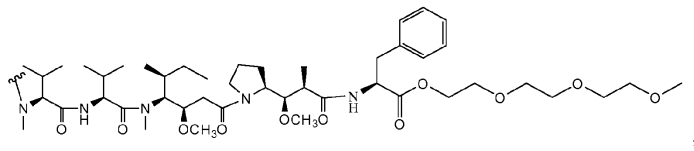
[0454] 화학식 (II)의 면역컨쥬게이트의 바람직한 구체예에서, Z 가 화학식 (X-A)의 아우리스타틴 분자인 경우, w 는 1 내지 12, 바람직하게는 2 내지 12의 범위의 정수이고, y 는 1 또는 2이고, a 는 바람직하게는 1이다.

[0455] 화학식 (II)의 면역컨쥬게이트의 일부 구체예에서, Z가 화학식 (II)의 아우리스타틴 분자인 경우, a는 1이고, w 및 y는 0이다.

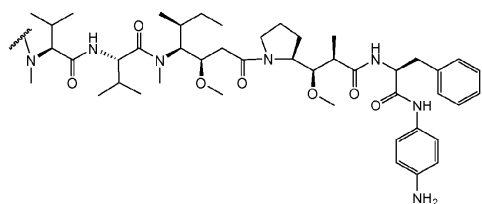
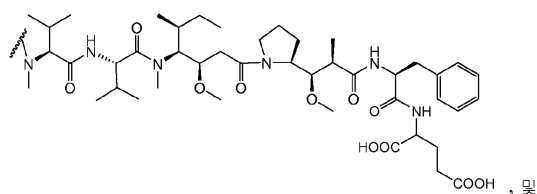
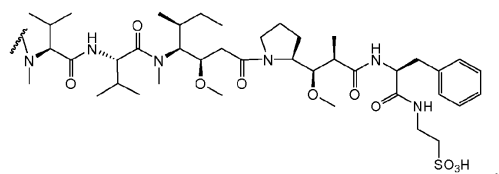
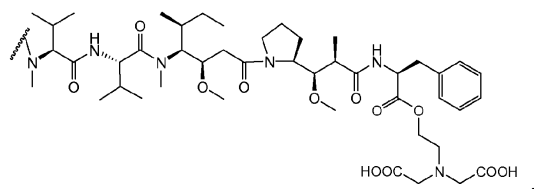
[0456] 예시적 치료제 (-Z)는 하기 구조를 갖는 것을 포함한다:



[0457]



[0458]



[0459]

[0460]

일 측면에서, 친수성 기, 비제한적인 예로, 트리에틸렌 글리콜 에스테르(TEG)가 R¹¹에서 화학식 (X-B)의 아우리스타틴 분자에 부착될 수 있다. 이론으로 한정하고자 하는 바는 아니지만, 친수성 기는 치료제의 내제화 및 비-응집을 돕는다.

[0461]

일부 구체예에서, 치료제는 TZT-1027이 아니다. 일부 구체예에서, 치료제는 아우리스타틴 E, 돌라스타틴 (dolastatin) 10, 또는 아우리스타틴 PE가 아니다.

[0462]

일부 구체예에서, 아우리스타틴 분자는 말레이미드 모이어티, 예를 들어, 말레이미도카프로일 모이어티를 함유하는 링커에 의해 항체 분자 상의 시스테인 모이어티에 연결된다.

[0463]

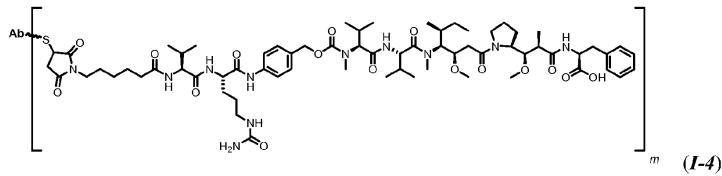
일부 구체예에서, 아우리스타틴 분자는 아우리스타틴 분자 상의 히드록실 기에 연결되는 헤테로이작용성 링커를 이용하여 항체 분자에 커플링된다. 일부 상기 구체예에서, 링커는 히드라존을 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 말레이미도카프로일히드라지드 및 케토카르복실산, 예를 들어, 5-벤조일발레르산의 반응에 의해 형성된 히드라존 화합물이다. 특정 구체예에서, 링커는 (Z)-6-(2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)-헥사노일)-히드라조노)-6-페닐헥산산이다.

[0464]

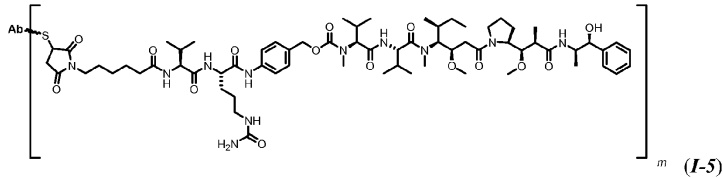
일부 다른 구체예에서, 아우리스타틴 분자는 아우리스타틴 분자 상의 모노메틸 아미노 기에 연결되는 헤테로이작용성 링커를 이용하여 항체에 커플링된다. 일부 구체예에서, 링커는 절단가능한 모이어티, 예를 들어, 펩티드 모이어티, 및 자가-희생적(self-immolative) *p*-아미노벤질카르바메이트 스페이서를 포함한다. 예시적 링커는 말레이미도카프로일(mc), 말레이미도카프로일-L-페닐알라닌-L-리신-*p*-아미노-벤질-카르바메이트, 및 말레이미도카프로일-L-발린-L-시트룰린-*p*-아미노벤질-카르바메이트(vc)를 포함한다.

[0465]

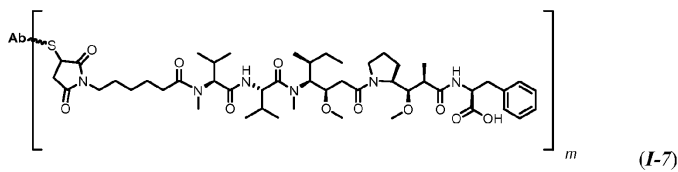
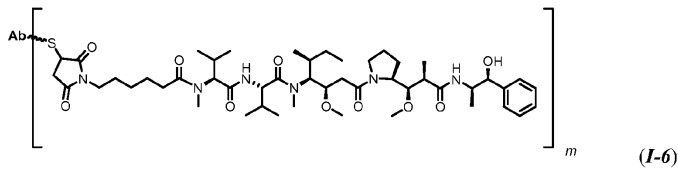
특정 구체예에서, 화학식 (I)의 면역컨쥬게이트는 화학식 Ab-(vc-MMAF)_m(화학식 (I-4)); Ab-(vc-MMAE)_m(화학식 (I-5)); Ab-(mc-MMAE)_m(화학식 (I-6)); 또는 Ab-(mc-MMAF)_m(화학식 (I-7))을 특징으로 하며, 여기서, Ab는 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항체 분자이고, S는 항체의 항 원자이고, *m*은 화학식 (I)에 대해 상기 기재된 값 및 바람직한 값을 갖는다. 특정 구체예에서, *m*은 1 내지 약 5의 정수이다.



[0466]



[0467]



[0468] 일부 구체예에서, 화학식 (I-4), (I-5), (I-6), 또는 (I-7)의 변수 Ab는 표 1 내지 6에 요약된 특징을 갖는 항체 분자이다. 특정 구체예에서, 변수 Ab는 5F9 항체 분자 또는 Abx-229 항체 분자이다.

[0469] 일부 구체예에서, 화학식 (I-4), (I-5), (I-6), 또는 (I-7)의 변수 m은 약 2 내지 약 10, 약 6 내지 약 8, 또는 약 4 내지 약 6 범위이다.

[0470] 특정 구체예에서, 본 발명은 화학식 (I-4), (I-5), (I-6), 또는 (I-7)의 면역컨쥬게이트에 관한 것으로, Ab는 5F9 항체 분자이고, m은 약 4이다.

[0471] 본원에 개시된 면역컨쥬게이트는 제공된 생물학적 반응을 변경시키는데 사용될 수 있다. 치료제는 전통적인 화학 치료제로 제한되는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 치료제는 요망되는 생물학적 활성을 갖는 핵산, 단백질, 또는 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들어, 항체 분자는 유전자의 발현을 방해하여, 요망되는 생물학적 효과를 발생시킬 수 있는 안티센스 분자, siRNA 분자, shRNA 분자 또는 miRNA 분자에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0472] 본 발명의 항체 분자에 컨쥬게이션될 수 있는 단백질 및 폴리펩티드는, 예를 들어, 독소 및 이의 성분, 예를 들어, 아브린, 아브린 A 사슬, 리신, 리신 A 사슬, 모데신, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 외독소 A(슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의 외독소 A), PE38(트렁케이션된 슈도모나스 외독소), 겔로닌(gelonin), 디프테리아 독소, 디프테리아 독소 A 단편, 특정 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 특정 디안투스 카리오필루스(*Dianthus caryophyllus*) 단백질(예를 들어, 디안틴(dianthin) 30 및 디안틴 32), 특정 파이토라카 아메리카나(*Phytolacca Americana*) 단백질(예를 들어, PAP, PAPII, 및 PAP-S), 특정 사포나리아 오피신리스(*Saponaria officinalis*) 단백질(예를 들어, 사포린 6), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신(curcumin), 크로틴(crotonin), 미토길린(mitogillin), 레스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 및 에노마이신(enomycin); 종양에서 면역계와 관련되거나, 종양에서 효과기 기능을 유도하는 단백질, 예를 들어, 종양 괴사 인자, 인터페론, 신경성장인자, 혈소판 유래 성장 인자, 및 조직 플라스미노겐 활성화인자; 및 생물학적 반응 개질제, 예를 들어, 사이토카인 및 림포카인(예를 들어, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 대식세포 집락 자극 인자("GM-CSF"), 및 과립구 집락 자극 인자("G-CSF")), 및 다른 성장인자를 포함한다.

[0473] 본 발명의 항체는 또한 바이러스 입자에 존재하는 바이러스 표면 단백질에 컨쥬게이션되거나 융합될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 단쇄 항-GCC 항체는 바이러스 표면 단백질에 융합(예를 들어, 융합 단백질을 형성함)될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 전체 항-GCC 항체 또는 이의 단편은 바이러스 표면 단백질에 화학적으로 컨쥬

게이션(예를 들어, 화학적 링커를 포함)될 수 있다. 바람직하게는, 바이러스는 세포내이입 막(endocytic membrane), 예를 들어, 인플루엔자 바이러스와 융합하여, 이러한 바이러스가 항-GCC 항체와 함께 내재화됨으로써 GCC-발현 세포를 감염시키는 바이러스이다. 바이러스는 세포 독소로서 유전공학 처리될 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 세포에 독성인 유전자, 예를 들어, 세포 사멸 촉진 유전자를 발현시키거나 이의 발현을 유도할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 바이러스는 바이러스 복제 능력이 없을 것이다.

[0474] 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자는 또한 프로드러그 또는 프로드러그 활성제에 컨쥬게이션될 수 있다. 종양 세포를 사멸시키거나 억제하는 방법에서, 본 발명의 첫번째 항-GCC 항체 분자는 프로드러그 활성제에 근접하는 경우에만 활성화되는 프로드러그에 컨쥬게이션된다. 프로드러그 활성제는 두번째 항체 분자, 바람직하게는 GCC 분자 상의 비-경쟁 부위에 결합하는 항체 분자와 컨쥬게이션된다. 2개의 항체가 경쟁 또는 비-경쟁 결합 부위에 결합하는지의 여부는 통상적인 경쟁 결합 검정에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 실시예에 사용하기에 적합한 약물-프로드러그 쌍은 문헌[Blakely et al., "ZD2767, an Improved System for Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy That Results in Tumor Regressions in Colorectal Tumor Xenografts," (1996) *Cancer Research*, 56:3287-3292]에 기재되어 있다.

[0475] 치료적으로 활성인 방사성 동위원소가 또한 항-GCC 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 유도체에 커플링될 수 있다. 방사성 동위원소는 진단 또는 치료 응용분야에 사용될 수 있다. 항-GCC 항체에 커플링될 수 있는 방사성 동위원소는 α -방출체, β -방출체, 또는 γ -방출체, 또는 β -방출체 및 γ -방출체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 문헌[S.E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al. (eds.), pp 303-316 (Academic Press 1985)]을 참조하라. 이러한 방사성 동위원소는 구리(^{64}Cu), 요오드(^{131}I 또는 ^{125}I), 이트륨(^{90}Y), 루테튬(^{177}Lu), 악티늄(^{225}Ac), 프라세오디뮴, 아스타틴(^{211}At), 레늄(^{186}Re), 비스무트(^{212}Bi 또는 ^{213}Bi), 인듐(^{111}In), 테크네튬(^{99}Tc), 인(^{32}P), 로듐(^{188}Rh), 황(^{35}S), 탄소(^{14}C), 트리튬(^3H), 크롬(^{51}Cr), 염소(^{36}Cl), 코발트(^{57}Co 또는 ^{58}Co), 철(^{59}Fe), 셀레늄(^{75}Se), 또는 갈륨(^{67}Ga)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료제로서 유용한 방사성 동위원소는 이트륨(^{90}Y), 루테튬(^{177}Lu), 악티늄(^{225}Ac), 프라세오디뮴, 아스타틴(^{211}At), 레늄(^{186}Re), 비스무트(^{212}Bi 또는 ^{213}Bi), 및 로듐(^{188}Rh)을 포함한다. 예를 들어, 진단에 사용하기 위한 표지로 유용한 방사성 동위원소는 요오드(^{131}I 또는 ^{125}I), 인듐(^{111}In), 테크네튬(^{99}Tc), 인(^{32}P), 탄소(^{14}C), 및 트리튬(^3H), 또는 상기 나열된 치료 동위원소 중 하나 이상을 포함한다.

[0476] ^{131}I , ^{90}Y , 및 ^{177}Lu 로 표지된 항체를 이용한 방사선면역치료법(RIT)이 집중적으로 임상 연구중이다. 상기 3개의 핵종의 물리적 특징은 현저한 차이가 있으며, 결과적으로 방사선 핵종의 선택은 종양에 최대 방사선량을 전달하는데 중요할 수 있다. ^{90}Y 의 높은 베타 에너지 입자는 부피가 큰 종양에 우수할 수 있으나, 이는 작은 종양, 특히 골 전이에는 필요하지 않을 수 있다. ^{131}I 의 상대적으로 낮은 에너지 베타 입자가 이상적이거나, 방사성요오드화된 분자의 생체내 탈할로젠화가 내재화 항체의 주요 단점이다. 대조적으로, ^{177}Lu 은 단지 0.2-0.3 mm 범위를 갖는 낮은 에너지 베타 입자를 가지며, ^{90}Y 에 비해 훨씬 낮은 방사선량을 골수에 전달한다. 또한, 보다 긴 물리적 반감기(^{90}Y 에 비함)로 인해, 종양 체류 시간이 더 길다. 결과로서, ^{177}Lu 표지된 작용제의 보다 높은 활성(보다 많은 mCi 양)이 비교적 적은 방사선량과 함께 골수에 전달될 수 있다. 다양한 암의 치료에서의 ^{177}Lu 표지된 항체의 사용을 연구하는 여러 임상 연구가 있다(Mulligan T et al. *Clin Cancer Res*. 1: 1447-1454(1995); Meredith RF, et al. *J Nucl Med* 37:1491-1496(1996); Alvarez RD, et al. *Gynecologic Oncology* 65: 94-101(1997)).

[0477] 본 발명의 항체 또는 항체 부분이 유도체화(또는 표지)될 수 있는 유용한 검출가능한 작용제는 형광 화합물, 다양한 효소, 보조분자족(prosthetic group), 발광 물질, 생물발광 물질, 형광 방출 금속 원자, 예를 들어, 유로퓸(Eu), 및 다른 안타니드(anthanide), 및 방사성 물질(상기 기재됨)을 포함한다. 예시적 형광 검출 작용제는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 피코에리트린 등을 포함한다. 항체는 또한 검출가능한 효소, 예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 호스라디쉬 퍼옥시다제, β -갈락토시다제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코오스 옥시다제 등으로 유도체화될 수 있다. 항체가 검출가

능한 효소로 유도체화되는 경우, 이는 효소가 검출가능한 반응 생성물을 생성시키는데 사용하는 추가 시약을 첨가함으로써 검출된다. 예를 들어, 검출가능한 시약 호스라디쉬 퍼옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘의 첨가는 검출가능한 착색된 반응 생성물을 발생시킨다. 항체는 또한 보조분자(예를 들어, 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴)으로 유도체화될 수 있다. 예를 들어, 항체는 비오틴으로 유도체화될 수 있고, 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접 측정을 통해 검출될 수 있다. 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 예는 루시페라제, 루시페린, 및 애큐오린을 포함한다.

[0478] 약학적 조성물

[0479] 또 다른 측면에서, 본 발명은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 제형화된 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항체 분자 또는 이의 면역원유계이트를 포함하는 조성물, 예를 들어, 약학적으로 허용되는 조성물을 특징으로 한다. 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 표 1 및 2에 요약된 예시적 특징을 갖는 것이다.

[0480] 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 양립되는 임의 및 모든 용매, 분산 매질, 등장성 및 흡수 지연 작용제 등을 포함한다. 담체는 정맥내, 근내, 피하, 비경구, 직장, 척수 또는 표피 투여(예를 들어, 주사 또는 주입에 의함)에 적합할 수 있다. 약학적 조성물은 하나 이상의 추가 부형제, 예를 들어, 염, 완충제, 긴장성 개질제, 리오포텍턴트(lyoprotectant), 비이온성 세제, 계면활성제, 및 보존제를 포함할 수 있다.

[0481] 조성물은 다양한 형태를 취할 수 있다. 이는, 예를 들어, 액체, 반고체 및 고체 투여 형태, 예를 들어, 액체 용액(예를 들어, 주사용 및 주입용 용액), 분산액 또는 현탁액, 리포솜 및 좌약을 포함한다. 바람직한 형태는 소기의 투여 방식 및 치료 응용분야에 좌우된다. 일부 전형적 조성물은 비경구 투여(예를 들어, 정맥내, 피하, 복막내, 근내)를 위한 주사용 또는 주입용 용액의 형태이다. 일부 구체예에서, 항체는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 다른 구체예에서, 항체는 근내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.

[0482] 본원에서 사용되는 구 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여되는"은 보통 주사에 의한 소화관내 및 국소 투여가 아닌 투여 방식을 의미하고, 이는 정맥내, 근내, 동맥내, 수막강내, 낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복막내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0483] 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 제조 및 저장 조건하에서 멸균 상태이며 안정적이다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 분산액, 리포솜, 미세구, 또는 높은 항체 농도에 적합한 다른 정돈된 구조로 제형화될 수 있다. 멸균 주사 용액은 활성 화합물(즉, 항체 또는 항체 부분)을 필요시 상기 열거된 성분의 하나 이상의 조합물을 갖는 적절한 용매 중에 필요량으로 혼입시킨 후, 예를 들어, 여과에 의한 멸균에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 성분으로부터의 다른 필요한 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제공되는 제조 방법은 이전의 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가의 요망되는 성분의 분말을 발생시키는 동결-건조 및 진공 건조이다. 용액의 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 겔라틴을 포함시킴으로써 발생될 수 있다.

[0484] 많은 치료적 적용에 대해, 투여 경로/방식은 정맥내 주사 또는 주입이나, 본 발명의 항체 및 항원 결합 단편은 당 분야에 공지된 여러 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 인지되어지는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 요망되는 결과에 따라 상이할 것이다. 특정 구체예에서, 활성 화합물은 임플란트, 경피 패치 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 조절 방출 제형과 같이 신속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 폴라젠, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산과 같은 생물분해성의 생물학적 적합성의 중합체가 사용될 수 있다. 상기 제형의 제조를 위한 많은 방법이 특허권을 가지고 있거나, 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조하라.

[0485] 특정 구체예에서, 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 또는 면역원유계이트는, 예를 들어, 비활성 희석제 또는 동

화가능한 음용성 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 화합물(및 요망시 다른 성분)이 또한 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 동봉될 수 있거나, 정제, 협측 정제, 트로키(troche), 캡슐, 엘릭서, 현탁액, 시럽, 웨이퍼(wafer) 등으로 압착될 수 있다. 비경구 투여가 아닌 투여에 의해 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 투여하기 위해, 화합물을 이의 비활성화를 방지하는 물질로 코팅하거나, 이러한 물질과 화합물을 공동 투여하는 것이 필요할 수 있다.

[0486] 치료 조성물은 당 분야에 공지된 의학 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 약학적 제조물이 하나 이상의 투여량을 함유하는 장치, 예를 들어, 기밀 또는 액밀 용기 내에 배치될 수 있다. 전달 장치의 예는 바이알, 캐놀라, 니들, 드립 백(drip bag), 및 라인(line)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 항체 분자 또는 면역결핍제이트를 상기 장치에 배치하는 방법을 제공한다.

[0487] 일부 구체예에서, 본 발명은 리포솜 조성물 중에서 제형화되는 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 또는 면역결핍제이트를 제공한다. 일부 구체예에서, 리포솜은 항체 분자로 코팅된다. 일부 이러한 구체예에서, 리포솜은 치료제로 충전된다. 리포솜 전달은 항체에 연결되지 않은 작용제, 예를 들어, 치료제의 전달을 가능케 할 수 있다. 이러한 방법은 항체 분자 또는 작용제, 예를 들어, 치료제와 가교될 수 없거나, 격리되어야 하거나, 비-표적 세포와의 접촉이 최소화되어야 하는 작용제, 예를 들어, 치료제를 전달하는데 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 리포솜은 세포증식 억제제 또는 세포독성제로 충전된다. 특정 구체예에서, 치료제는 마이탄시노이드(maytansinoid), 아우리스타틴, 돌라스타틴(dolastatin), 듀오카르마이신(duocarmycin), 크립토파이신(cryptophycin), 탁산(taxane), DNA 알킬화제 칼리케아미신(calicheamicin), 및 이의 유도체로 구성된 군으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 리포솜은 GCC를 발현하는 세포에서 GCC 발현 또는 또 다른 유전자, 예를 들어, 종양유전자의 발현을 감소시킬 수 있는 RNA 간섭 분자, 예를 들어, 안티센스 분자, siRNA, hsRNA 또는 miRNA 분자를 포함하는 핵산 서열로 충전된다. 일부 다른 구체예에서, 리포솜은 항-GCC 항체 분자 및 치료제 또는 표지를 포함하는 면역결핍제이트로 코팅되거나 충전된다.

[0488] 투여 요법은 최적의 요망되는 반응(예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 여러 나뉘어진 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 치료 상황의 긴급성에 따라 용량이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 용어 "투여 단위 형태"는 치료되는 피검체를 위한 단위 투여량으로 적합화된 물리적으로 분리된 단위를 의미하며; 각각의 단위는 필요한 약학적 담체와 회합된, 요망되는 치료 효과를 발생시키도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 명세는, (a) 활성 화합물의 독특한 특징 및 달성되는 특정 치료 효과, 및 (b) 개체에서의 민감성의 치료를 위해 상기 활성 화합물을 배합하는 당 분야에서 고유적인 규제에 의해 기재되며, 이에 직접적으로 좌우된다.

[0489] 치료적 또는 예방적 유효량의 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편에 대한 예시적인 비제한적 범위는 0.1-20 mg/kg, 또는 1-10 mg/kg이다. 투여량 값은 경감되는 질환의 유형 및 중증도에 따라 다양할 수 있음이 인지되어야 한다. 임의의 특정 피검체에 대해, 특정 투여 요법이 개체의 필요, 및 조성물을 투여하거나 조성물의 투여를 관리하는 사람의 전문적 판단에 따라 시간 경과에 걸쳐 조정되어야 하고, 본원에 기재된 투여량 범위는 단지 예시이며, 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하고자 하는 것이 아님이 추가로 이해되어야 한다.

[0490] 본 발명의 약학적 조성물은 "치료적으로 유효한" 양의 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. "치료적으로 유효한" 양은 투여량에 있어서 필요한 기간 동안 요망되는 치료 결과를 달성하는데 효과적인 양을 의미한다. 치료적으로 유효한 양의 변형된 항체 또는 항체 단편은 질병 상태, 개체의 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 요망되는 반응을 유도하는 항체 또는 항체 부분의 능력과 같은 요인에 따라 다양할 수 있다. 치료적으로 유효한 양은 또한 변형된 항체 또는 항체 단편의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 치료적으로 이로운 효과가 가치가 있는 양을 의미한다. "치료적으로 유효한 투여량"은 바람직하게는 치료되는 피검체에서 측정가능한 파라미터(예를 들어, 종양 성장 속도)를 치료되지 않은 피검체에 비해 약 20% 이상, 약 40% 이상, 약 60% 이상, 및 일부 구체예에서, 약 80% 이상 억제한다. 측정가능한 파라미터, 예를 들어, 암을 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 조성물의 이러한 특성은 당업자에게 공지된 검정에 의한 시험관내 억제와 같이 억제하는 화합물의 능력을 시험함으로써 평가될 수 있다.

[0491] 또한, 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항체 분자 또는 면역결핍제이트를 포함하는 키트가 본 발명의 범위에 포함된다. 항-GCC 항체 분자 또는 면역결핍제이트를 포함하는 리포솜 조성물을 포함하는 키트가 추가로

포함된다. 키트는 사용 설명서; 다른 시약, 예를 들어, 표지, 치료제, 또는 킬레이트화 또는 다른 커플링에 유용한 작용제, 표지 또는 치료제에 대한 항체, 또는 방사선방호 조성물; 투여용 항체를 제조하기 위한 장치 또는 다른 물질; 약학적으로 허용되는 담체; 및 피검체로의 투여를 위한 장치 또는 다른 물질을 포함하는 하나 이상의 다른 구성요소를 포함할 수 있다. 사용설명서는, 예를 들어, 샘플, 예를 들어, 암을 가진 환자로부터의 생검 또는 세포에서 시험관내에서, 또는 생체내에서 GCC를 검출하기 위한 항-GCC 항체 분자 또는 면역결핍제이트의 진단 적용을 위한 설명서를 포함할 수 있다. 설명서는, 예를 들어, 암(예를 들어, 위장 기원의 암, 예를 들어, 결장암, 위암, 식도암)을 가진 환자에서의 제시된 투여량 및/또는 투여 방식을 포함하는 치료 적용을 위한 지침을 포함할 수 있다. 다른 설명서는 킬레이터, 표지 또는 치료제로의 항체의 커플링, 또는, 예를 들어, 반응되지 않은 컨쥬게이션 성분으로부터 컨쥬게이션 항체의 정제를 위한 설명서를 포함할 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 키트는 표지, 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 표지를 포함할 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 키트는 치료제, 예를 들어, 본원에 기재된 치료제를 포함할 수 있다. 일부 적용에서, 항체는 다른 성분, 예를 들어, 킬레이터 또는 표지 또는 치료제, 예를 들어, 방사성 동위원소, 예를 들어, 이트륨 또는 루테튬과 반응될 것이다. 이러한 경우에서, 키트는 반응을 수행하기 위한 반응 용기, 또는 시작 물질 또는 반응 중간물로부터 최종 생성물을 분리하는데 사용하기 위한 분리 장치, 예를 들어, 크로마토그래피 컬럼 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0492] 키트는 하나 이상의 분리된 약학적 제조물에 하나 이상의 추가 시약, 예를 들어, 진단제 또는 치료제, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 진단제 또는 치료제, 및/또는 하나 이상의 추가 항-GCC 항체 분자 또는 면역결핍제이트를 추가로 함유할 수 있다.

[0493] 키트는 방사선방호제(radioprotectant)를 추가로 함유할 수 있다. 동위원소, 예를 들어, 90 이트륨(^{90}Y)의 방사선분해 특성이 공지되어 있다. 이러한 방사선분해를 극복하기 위해, 방사선방호제가 양성(benign)인 한, 즉 방사선방호제가 항체에 대한, 예를 들어, 동위원소, 예를 들어, ^{90}Y 의 표지 반응을 억제하지 않거나 달리 유해하게 영향을 미치지 않는 한 상기 방사선방호제가, 예를 들어, 반응 완충액에 포함될 수 있다. 본 발명의 제형 완충액은 이트륨 또는 다른 강한 방사성핵종으로 인한 방사선분해를 최소화시키는 방사선방호제, 예를 들어, 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 아스코르베이트를 포함할 수 있다. 다른 방사선방호제가 당 분야에 공지되어 있고, 이는 또한 자유 라디칼 제거제로서 본 발명의 제형 완충액에서 사용될 수 있다(페놀, 설파이트, 글루타티온, 시스테인, 겐티신산, 니코틴산, 아스코르빌 팔미테이트, $\text{HOP}(:\text{O})\text{H}_2\text{I}$ 글리세롤, 소듐 포름알데히드 설폭실레이트, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 및 SO_2 등).

[0494] 제공된 키트는 환자로의 투여를 위한 치료용 방사선 동위원소를 갖는 킬레이터-컨쥬게이션된 단백질 또는 펩티드를 방사선표지시키는데 유용한 키트이다. 키트는 (i) 킬레이터-컨쥬게이션된 항체를 함유하는 바이얼, (ii) 방사선표지된 항체를 안정화시키고, 이를 환자에게 투여하기 위한 제형 완충제를 함유하는 바이얼, 및 (iii) 방사선표지 절차를 수행하기 위한 설명서를 포함한다. 키트는, 예를 들어, 설명서에서 권고된 바에 따라 우호적(amicable) 조건하에서 충분한 기간 동안 방사선동위원소 또는 이의 염에 킬레이터-컨쥬게이션된 항체를 노출시키는 것을 제공한다. 충분한 온도, 특정 활성 및 결합 특성을 갖는 방사선표지된 항체가 생성된다. 방사선표지된 항체는, 예를 들어, 제형 완충액 중에서 적절한 농도로 희석될 수 있고, 추가 정제와 함께 또는 추가 정제 없이 환자에게 직접 투여될 수 있다. 킬레이터-컨쥬게이션된 항체는 동결건조된 형태로 공급될 수 있다.

[0495] 용도

[0496] 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자는 시험관내 및 생체내 진단, 예후, 영상진찰, 치료 및 예방적 유용성을 갖는다. 예를 들어, 이러한 항체 분자는 다양한 장애를 치료하고/하거나, 예방하고/하거나, 진단하기 위해 배양 중, 예를 들어, 시험관내 또는 생체외의 세포에 투여될 수 있거나, 피검체에, 예를 들어, 생체내로 투여될 수 있다.

[0497] 본원에 기재된 항체 분자, 면역결핍제이트, 및 융합 단백질은 GCC 단백질의 활성 또는 기능, 예를 들어, 리간드 결합(예를 들어, ST 또는 구아닐린의 결합), GCC-매개 신호전달, 장애의 유지, 전해질 항상성, 세포내 칼슘 방출(칼슘 유출), 세포 분화, 세포 증식, 또는 세포 활성화를 조절하는데 사용될 수 있다.

[0498] 일 측면에서, 본 발명은 GCC-발현 세포를 사멸시키거나, GCC-발현 세포의 성장을 억제하거나 조절하거나, GCC-발현 세포의 대사를 방해하는 것을 특징으로 한다. 일 구체예에서, 본 발명은 GCC-매개 세포 신호전달을 억제하는 방법, 또는 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 GCC를 발현하는 임의의 세포 또는 조직, 예를 들어, 암성 세포(예를 들어, 위장관계의 암, 예를 들어, 결장, 위, 또는 식도, 또는 췌장 세포의 암)로부터

의 세포), 또는 전이성 병변에 사용될 수 있다. GCC-발현 세포의 비제한적 예는 T84 인간 결장 샘암종 세포, 신선하거나 동결된 결장 종양 세포, 및 GCC를 엔코딩하는 재조합 핵산 또는 이의 일부를 포함하는 세포를 포함한다.

[0499] 본 발명의 방법은 유효량, 즉, GCC-매개 세포 신호전달을 억제하는데 충분한 양 또는 세포를 사멸시키는데 충분한 양의 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 또는 이의 면역원주게이트에 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 방법은 배양 중의 세포에서, 예를 들어, 시험관내, 생체내, 생체외, 또는 원위(*in situ*)로 사용될 수 있다. 예를 들어, GCC를 발현하는 세포(예를 들어, 종양 또는 전이성 병변의 생검에 의해 수집된 세포; 확립된 암 세포주로부터의 세포; 또는 재조합 세포)는 배지에서 시험관내로 배양될 수 있고, 접촉 단계는 배지에 항-GCC 항체 분자 또는 면역원주게이트를 첨가함으로써 실행될 수 있다. 세포를 사멸시키는 방법에서, 이러한 방법은 네이키드(naked) 항-GCC 항체 분자, 또는 항-GCC 항체 분자 및 세포독성제를 포함하는 면역원주게이트를 이용하는 것을 포함한다. 상기 방법은 GCC를 발현하는 특정 종양 세포(예를 들어, 결장 종양 세포)를 포함하는 GCC를 발현하는 세포를 사멸시킬 것이다.

[0500] 표 7에 대한 참조는 다양한 방법에 사용하기 위한 항체(들)를 선택하기 위한 지침으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 표 7은 어떠한 항체가 GCC에 결합한 후 내재화시키는지 확인하는 것을 나타낸다. 이러한 항체는 세포독성 모이어티 또는 세포 영상진찰을 위한 모이어티에 결합되는 경우에 유용할 것이다. 내재화시키지 않는 항체는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 반응을 유발하도록 설계된 네이키드 항체를 이용하여 진단 목적 또는 치료 방법에 사용될 수 있거나, 리포솜 전달 방법에도 아마 사용될 수 있다.

[0501] 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 항원을 발현하는 세포에서 GCC의 세포외 도메인 또는 이의 일부에 결합한다. 결과로서, 암성 세포를 사멸시키거나, 억제하거나, 검출하기 위한 본 발명의 방법을 실시하는 경우, 항체 또는 항원 결합 단편은 상기 모든 세포에 결합하지만, 고정된 세포 또는 세포내 항원 도메인이 세포외 환경에 달리 노출되지 않은 세포에는 결합하지 않는다. 결과로서, 항체 또는 항원 결합 단편의 결합은 GCC 발현 세포가 고정되거나 고정되지 않거나, 살아있거나 피사되었는지의 여부와는 관계없이 GCC를 발현하는 세포가 존재하는 영역에 집중된다. 추가로 또는 대안적으로, 항-GCC 항체 분자는 GCC를 발현하는 세포에 결합하고, 상기 항원을 발현하는 세포로의 결합 후 GCC와 함께 내재화된다.

[0502] 상기 방법은 또한 생체내 프로토콜의 일부로서 피검체에 존재하는 세포에서 수행될 수 있다. 일 구체예에서, 피검체는 인간 피검체이다. 대안적으로, 피검체는 본원에 개시된 항-GCC 항체 분자가 교차반응하는 GCC 항원을 발현하는 포유동물일 수 있다. 항-GCC 항체 분자 또는 이의 면역원주게이트는 치료 목적을 위해 인간 피검체에 투여될 수 있다. 항-GCC 항체 분자 또는 면역원주게이트는 또한 수의학적 목적을 위해 또는 인간 질병의 동물 모델로서 항체가 교차반응하는 GCC-유사 항원을 발현하는 비-인간 포유동물(예를 들어, 영장류, 돼지 또는 마우스)에 투여될 수 있다. 동물 모델은 본 발명의 항체의 치료 효능을 평가(예를 들어, 투여량 및 투여의 시간 경과와 시험)하는데 유용할 수 있다. 생체내 구체예를 위해, 접촉 단계가 피검체에서 실행되며, 이는 세포에서 발현되는 GCC의 세포외 도메인으로의 항체 분자의 결합 및 세포의 치료 둘 모두를 가능케 하기에 효과적인 조건 하에서 항-GCC 항체 분자 또는 이의 면역원주게이트를 피검체에 투여하는 것을 포함한다.

[0503] 일 구체예에서, 본 발명은 항-GCC 항체 분자 또는 항-GCC 항체 분자 및 세포독성제를 포함하는 면역원주게이트를 암을 치료할 필요가 있는 환자에 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 GCC 항원을 발현하는 일부 또는 전부의 세포를 포함하는 임의의 암성 장애의 치료에 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "암"은 조직병리학적 유형 또는 침습성 단계와 관계없이 암성 성장 또는 종양발생 과정의 전이성 조직 또는 악성 형질전환된 세포, 조직 또는 기관의 모든 유형을 포함하는 것을 의미한다. 용어 "암" 및 "종양"은 상호교환적으로 사용될 수 있다(예를 들어, 치료 방법의 상황에서 사용되는 경우, "암의 치료" 및 "종양의 치료"는 동일한 의미를 갖는다).

[0504] 구체예에서, 치료는 피검체의 종양의 성장을 감소시키거나 억제하거나, 전이성 병변의 수 또는 크기를 감소시키거나, 종양 하중을 감소시키거나, 원발성 종양 하중을 감소시키거나, 침습성을 감소시키거나, 생존 시간을 연장시키거나, 삶의 질을 유지시키거나 개선시키는데 충분하다.

[0505] 암성 장애의 예는 고형 종양, 연조직 종양, 및 전이성 병변을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 고형 종양의 예는 다양한 기관계의 악성종양, 예를 들어, 육종, 샘암종 및 암종, 예를 들어, 결장 및 췌장에 악영향을 미치는 악성종양을 포함한다. 샘암종은 악성종양, 예를 들어, 폐의 비소세포 암종을 포함한다. 상기 언급된 암의 전이성 병변은 또한 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 치료되거나 예방될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료되는 암은 위장관계의 암(예를 들어, 결장직장암, 식도암 또는 위암)이다. 일부 구체예에서, 치료되는 암은 췌

장암이다.

- [0506] 일 구체예에서, 암은 결장직장암, 예를 들어, 결장직장 샘암종, 결장직장 평활근육종, 결장직장 림프종, 결장직장 흑색종, 또는 결장직장 신경내분비 종양이다. 특정 구체예에서, 암은 전이성 결장암이다. 또 다른 구체예에서, 암은 위암(예를 들어, 위 샘암종, 림프종 또는 육종) 또는 이의 전이이다. 또 다른 구체예에서, 암은 식도암(예를 들어, 편평세포암종 또는 식도의 샘암종)이다.
- [0507] 상기 방법은 임의의 단계 또는 하위분류에서 관련 장애를 치료하는데 유용할 수 있다. 예를 들어, 방법은 초기 또는 후기 단계 결장암, 또는 단계 0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, 및 IV 중 임의의 단계의 결장암을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0508] 일부 구체예에서, 암(예를 들어, 결장직장암, 식도암 또는 위암)을 치료하는 방법은 본원에 기재된 네이키드 항-GCC 항체 분자를 상기 암을 치료할 필요가 있는 환자에 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 및 세포독성제를 포함하는 면역컨쥬게이트를 투여하는 것을 포함한다. 일부 상기 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 본원에 기재된 화학식 (I)을 특징으로 한다. 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 본원에 기재된 화학식 (I-1), (I-2), (I-3), (I-4), (I-5), (I-6), 또는 (I-7)을 특징으로 한다. 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 화학식 (I), (I-1), (I-2), (I-3), (I-4), (I-5), (I-6), 또는 (I-7)을 특징으로 하며, 여기서 가변성 Ab는 표 1 내지 6에 요약된 특징을 갖는 항체 분자이다. 특정 구체예에서, 가변성 Ab는 5F9 항체 분자 또는 Abx-229 항체 분자이다. 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 화학식 (I-5) 또는 (I-7)을 특징으로 하며, 여기서 가변 Ab는 5F9 항체 분자이다.
- [0509] 항체 분자 및 면역컨쥬게이트를 투여하는 방법은 상기 기재되어 있다. 사용되는 분자의 적합한 투여량은 피검체의 연령 및 체중 및 사용되는 특정 화합물에 좌우될 것이다.
- [0510] 일부 구체예에서, 항-GCC 항체 분자 또는 면역컨쥬게이트는 치료 주기로 투여된다. "치료 주기"는 치료 기간 후 휴지 기간으로 구성되며, 상기 치료 기간 동안 항-GCC 항체 분자 또는 면역컨쥬게이트는 상기 기재된 바와 같이 투여되고, 상기 휴지 기간 동안 항-GCC 항체 분자 또는 면역컨쥬게이트가 투여되지 않는다. 치료 주기는 요망되는 효과를 달성하기 위해 필요에 따라 반복될 수 있다.
- [0511] 본원에 기재된 항-GCC 항체(예를 들어, 네이키드 항-GCC 항체 분자, 또는 항-GCC 항체 분자 및 치료제를 포함하는 면역컨쥬게이트)는 다른 치료와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 하나 이상의 추가 치료제, 예를 들어, 하나 이상의 항암제, 예를 들어, 세포독성제 또는 세포증식억제제, 호르몬 치료, 백신, 및/또는 다른 면역요법과 함께 공동 제형화되고/되거나 공동 투여되는 본 발명의 조성물을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 항-GCC 항체는 수술, 방사선, 냉동수술, 및/또는 열요법을 포함하는 다른 치료적 치료 양식과 조합하여 투여된다. 이러한 조합 요법은 유리하게는 적은 투여량의 투여되는 치료제를 이용할 수 있고, 이에 따라 다양한 단일요법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증이 회피될 수 있다.
- [0512] 본원에서 사용되는 "조합하여" 투여된다는 것은 둘 (또는 이 이상)의 다양한 치료가 장애를 갖는 피검체의 병의 경과 동안 피검체에 전달되고, 예를 들어, 둘 이상의 치료가 피검체가 장애를 갖는 것으로 진단된 후 및 상기 장애가 치료되거나 제거되기 전에 전달되는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 하나의 치료의 전달은, 두번째 치료의 전달을 시작하는 경우에도 여전히 발생하여, 중첩이 존재한다. 이는 때때로 본원에서 "동시" 또는 "동반 전달"로 언급된다. 다른 구체예에서, 하나의 치료의 전달은 다른 치료의 전달을 시작하기 전에 종료된다. 어느 하나의 경우의 일부 구체예에서, 치료는 조합 투여로 인해 더욱 효과적이다. 예를 들어, 두번째 치료가 더욱 효과적이며, 예를 들어, 보다 덜한 두번째 치료를 이용하여 동등한 효과가 관찰되거나, 첫번째 치료의 부재하에서 두번째 치료가 투여되는 경우에 관찰되는 것 보다 두번째 치료가 보다 큰 범위로 증상을 감소시키거나, 첫번째 치료를 이용한 것과 유사한 상황이 관찰된다. 일부 구체예에서, 증상 또는 장애와 관련된 다른 파라미터의 감소가 다른 치료의 부재하에서 전달된 하나의 치료를 이용하여 관찰되는 것 보다 더 크도록 전달이 이루어진다. 두 파라미터의 효과는 부분적으로 부가적이거나, 완전히 부가적이거나, 부가적인 것 보다 더 클 수 있다. 전달은 전달된 첫번째 치료의 효과가 두번째 치료가 전달되는 경우에도 여전히 검출가능하도록 이루어질 수 있다.
- [0513] 일부 구체예에서, 항-GCC 항체 분자 또는 이의 면역컨쥬게이트는 화학요법제와 조합되어 사용된다. DNA 손상 화학요법제의 비제한적인 예는 토포이소머라제(topoisomerase) I 억제제(예를 들어, 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 캄프토테신(camptothecin) 및 이의 유사체 또는 대사물, 및 독소루비신(doxorubicin)); 토포이소머라제 II 억제제(예를 들어, 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 및 다우노루비신

(daunorubicin)); 알킬화 작용제(예를 들어, 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 부숄판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 세무스틴(semustine), 스트렙토조신(streptozocin), 데카르바진(decarbazine), 메토티렉세이트(methotrexate), 미토마이신 C(mitomycin C), 및 시클로포스파미드); DNA 인터칼레이터(intercalator)(예를 들어, 시스플라틴(cisplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 및 카르보플라틴(carboplatin)); DNA 인터칼레이터 및 자유 라디칼 발생기, 예를 들어, 블레오마이신(bleomycin); 및 누클레오시드 모방체(mimetic)(예를 들어, 5-플루오로우라실, 카페시타빈(capecitabine), 겐시타빈(gemcitabine), 플루다라빈(fludarabine), 시타라빈(cytarabine), 머캅토피린, 티오구아닌, 펜토스타틴(pentostatin), 및 히드록시우레아)를 포함한다.

[0514] 세포 복제를 분열시키는 화학요법제는 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 및 관련 유사체; 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastin), 및 관련 유사체; 탈리도미드(thalidomide), 레날리도미드(lenalidomide), 및 관련 유사체(예를 들어, CC-5013 및 CC-4047); 단백질 티로신 키나제 억제제(예를 들어, 이마티니브 메실레이트(imatinib mesylate) 및 게피티니브(gefitinib)); 프로테아좀(proteasome) 억제제(예를 들어, 보르테조미브(bortezomib)); NF- κ B 억제제, 예를 들어, I κ B 키나제의 억제제; 암에서 과다발현되는 단백질에 결합함으로써 세포 복제를 하향조절하는 항체(예를 들어, 트라스투주맙(trastuzumab), 리툭시맙(rituximab), 세툭시맙(cetuximab), 및 베바시주맙(bevacizumab)); 및 암에서 상향조절되거나, 과다발현되거나, 활성화되는 것으로 공지된 단백질 또는 효소, 및 이의 억제제가 세포 복제를 하향조절하는 단백질 또는 효소의 다른 억제제를 포함한다.

[0515] 본 발명의 항-GCC 항체 분자 또는 면역컨쥬게이트와 조합되는 치료제(들) 또는 치료 양식의 선택은 치료되는 장애에 좌우될 것이다. 추가 작용제(들) 또는 치료 양식은, 예를 들어, 치료되는 적응증에 대한 승인된 표준 요법을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항-GCC 항체 분자 또는 이의 면역컨쥬게이트가 결장암을 치료하는데 사용되는 경우, 이는, 예를 들어, 수술; 방사선 요법; 5-플루오로우리실(5-FU), 카페시타빈, 류코보린(leucovorin), 이리노테칸, 옥살리플라틴, 베바시주맙, 세툭시맙, 파니투뮴(panitumum), 또는 이의 조합물(예를 들어, 옥살리플라틴/카페시타빈(XELOX), 5-플루오로우리실/류코보린/옥살리플라틴(FOLFOX), 5-플루오로우리실/류코보린/이리노테칸(FOLFIRI), FOLFOX + 베바시주맙, 또는 FOLFIRI + 베바시주맙)과 조합하여 사용될 수 있다.

[0516] 또 다른 측면에서, 본 발명은 약제의 제조에서의 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 또는 면역컨쥬게이트의 용도를 특징으로 한다. 일 구체예에서, 약제는 암, 예를 들어, 위장관암을 치료하기 위한 것이다. 일부 구체예에서, 약제는 표 1-6에 요약된 특징을 갖는 항-GCC 항체 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 약제는 5F9 항체 분자 또는 Abx-229 항체 분자를 포함한다.

[0517] 본원에 기재된 항-GCC 항체 및 면역컨쥬게이트는 GCC의 존재를 검출하는데 사용될 수 있고, 예를 들어, 생물학적 샘플에서 GCC의 존재를 검출하거나, 피검체에서 GCC의 존재 또는 분포를 검출하는데 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "검출하는"은 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같은 GCC 또는 GCC 단백질을 검출하는 것은 온전한 GCC 단백질을 검출하거나, 항-GCC 항체 분자가 결합하는 에피토프를 포함하는 GCC 단백질의 일부를 검출하는 것을 의미한다.

[0518] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 GCC 단백질을 검출하는 방법, 예를 들어, GCC 발현 세포 또는 조직, 예를 들어, 종양 세포 또는 GCC를 발현하는 세포를 갖는 종양을 검출하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 항-GCC 항체 분자와 GCC 단백질 사이의 복합체의 형성을 가능케 하는 조건하에서 물질, 예를 들어, 세포 또는 조직, 예를 들어, GCC를 발현하는 종양의 샘플과 항-GCC 항체 분자, 예를 들어, 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자를 접촉시키고; 항체 분자와 GCC 단백질 사이의 복합체의 형성을 검출함으로써, GCC 단백질의 존재를 검출하고, 예를 들어, GCC 발현 세포 또는 종양을 검출하는 것을 포함한다.

[0519] 일 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 검출가능한 표지를 포함하는 면역컨쥬게이트이다.

[0520] 특정 구체예에서, 조직은 정상 및/또는 다른 조직, 예를 들어, B 세포 및/또는 B 세포 관련 조직과 같은 다른 조직에 비해 높은 수준으로 GCC를 발현하는 암성 조직을 포함한다.

[0521] 시험관내이거나 생체이전 간에 본원에 기재된 검출 방법은 피검체를 평가하는데 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 방법은 생체내로 수행되며, 이는, 예를 들어, 환자의 영상진찰, 스테이징(staging), 평가 또는 진단에 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 장애는 세포 증식 장애, 예를 들어, 암 또는 종양, 예를 들어, 결장암이다.

[0522] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 시험관내(예를 들어, 생물학적 샘플, 예를 들어, 피검체로부터의 종양 조직으로부터의 조직 생검) 또는 생체내(예를 들어, 피검체에서의 생체내 영상진찰)에서 GCC 단백질의 존재를 검

출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 샘플과 항-GCC 항체 분자 또는 이의 면역결합체를 접촉시키거나, 피검체에 항-GCC 항체 분자 또는 이의 면역결합체를 투여하고; (ii) 항-GCC 항체 분자와 GCC 단백질 사이의 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함한다. 복합체 형성은 GCC의 존재 또는 수준을 나타낸다.

[0523] 구체예에서, 샘플 또는 피검체에서 검출된 복합체의 수준은 참조 값, 예를 들어, GCC의 복합체 형성 또는 수준에 대한 값과 비교된다. 일 구체예에서, 참조 값을 초과하는 GCC의 수준은 GCC 매개 장애를 나타낸다.

[0524] 일 구체예에서, 상기 방법은 참조 샘플, 예를 들어, 대조군 샘플(예를 들어, 대조군 생물학적 샘플, 예를 들어, 혈장, 조직, 생검) 또는 대조군 피검체와 항-GCC 항체 분자 또는 이의 면역결합체를 접촉시키고, 여기에서 검출된 복합체의 수준과 샘플 또는 피검체에서 검출되는 수준을 비교하는 것을 포함한다.

[0525] 특정 구체예에서, 시험 세포 또는 조직은 GCC의 증가된 발현과 관련된 장애를 가질 것으로 여겨지는 개체로부터 취득된다.

[0526] 일 구체예에서, 피검체로부터의 샘플 또는 피검체 내의 샘플에서의 GCC의 수준은 참조 수준, 예를 들어, 대조 물질, 예를 들어, 피검체의 세포 또는 정상 세포와 동등한 수준의 GCC를 갖는 세포와 동일한 조직 기원의 정상 세포에서의 GCC의 수준과 비교된다. 상기 방법은, 예를 들어, GCC의 검출된 수준에 대응하여 진단, 예후, 치료 효능의 평가, 또는 장애의 스테이징(staging)을 제공하는 것을 포함할 수 있다. 대조 물질에 비한 샘플 또는 피검체에서의 GCC의 보다 높은 수준은 GCC의 증가된 발현과 관련된 장애의 존재를 나타낸다. 대조 물질에 비한 샘플 또는 피검체에서의 GCC의 보다 높은 수준은 또한 치료 효능의 상대적 결핍, 비교적 불량한 예후, 또는 질병의 보다 후기의 단계를 나타낼 수 있다. GCC의 수준은 또한 이후의 치료, 예를 들어, 보다 공격적이거나 덜 공격적인 치료의 필요, 또는 하나의 치료 요법으로부터 다른 치료 요법으로 전환시킬 필요를 평가하거나 선택하는데 사용될 수 있다.

[0527] GCC의 수준은 또한 환자를 선택하거나 평가하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 구체예에서, 종양 세포가 이의 표면에서 많은 양의 GCC를 발현하는 환자는 독소-결합제이션된 항-GCC 항체 분자를 이용한 치료에 대한 우수한 후보자로 간주될 것이다. 구체예에서, 종양 세포가 이의 표면에서 적은 양의 GCC를 발현하는 환자는 독소-결합제이션된 항-GCC 항체 분자를 이용한 치료에 대한 우수한 후보자가 아닐 것이거나, 항-GCC 항체 분자와 추가 치료 방법을 조합시키기 위한 후보자 또는 네이키드 항체 요법을 위한 후보자일 수 있다. 또 다른 예에서, 독소-결합제이션된 항-GCC 항체 분자의 용량은 종양 세포의 표면에서 발현되는 GCC 분자의 수를 반영하도록 조정될 수 있다. 종양 세포 표면에 많은 수의 GCC 분자를 갖는 환자는 적은 수의 GCC 분자를 갖는 환자보다 적은 용량으로 치료될 수 있다. 생체내에서 GCC-발현 종양 세포의 존재를 검출하는 것은 원발성의 GCC-발현 종양으로 전이되는 조직의 확인을 가능케 할 수 있다. 조직이 전이를 갖는지의 지식은 종양 요법의 표적화된 적용을 발생시킬 것이다.

[0528] 상기 논의된 바와 같이, 본원에 기재된 항체 분자는 신생물 조직에 비한 정상 조직에서의 GCC 단백질의 존재의 평가를 가능케 하며, 이를 통해 질병의 존재 또는 중증도, 질병 진행 및/또는 요법의 효능이 평가될 수 있다. 예를 들어, 요법은 모니터링될 수 있고, 효능이 평가될 수 있다. 일 예에서, GCC 단백질은 염증 질병을 갖는 피검체로부터 취득된 첫번째 샘플에서 검출되고/되거나 측정될 수 있고, 요법이 개시될 수 있다. 이후, 두번째 샘플이 피검체로부터 취득될 수 있고, 샘플 내의 GCC 단백질이 검출되고/되거나 측정될 수 있다. 두번째 샘플 내에서 검출되거나 측정된 GCC 단백질의 양에서의 감소는 치료 효능을 나타낼 수 있다.

[0529] 본원에 개시된 항체를 이용하여 평가, 예를 들어, 진단될 수 있는 예시적인 세포 증식 장애는 결장암, 위암, 식도암을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 증식성 장애를 포함한다.

[0530] 특정 구체예에서, 상기 기재된 것과 같은 방법은 세포의 표면 상 또는 표면에서 GCC를 발현하는 세포로부터 취득된 막 제조물 내에서 발현된 GCC로의 항-GCC 항체의 결합을 검출하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 GCC로의 항-GCC 항체의 결합을 허용하는 조건하에서 세포와 항-GCC 항체를 접촉시키고, 복합체가 항-GCC 항체와 세포 표면 상의 GCC 사이에 형성되는지의 여부를 검출하는 것을 포함한다. 세포의 표면 상에서 발현된 GCC로의 항-GCC 항체의 결합을 검출하기 위한 예시적 검정은 "FACS" 검정이다.

[0531] 본원에 기재된 방법을 위한 예시적 샘플은 조직 또는 체액, 예를 들어, 염증 삼출물, 혈액, 혈청, 장액, 대변 샘플, 또는 생검을 포함한다. 일 예에서, 샘플(예를 들어, 조직 및/또는 체액)은 개체로부터 취득될 수 있고, 적합한 면역학적 방법이 GCC 단백질 발현을 검출하고/하거나 측정하는데 사용될 수 있다. GCC 단백질 발현을 검출하거나 측정하기에 적합한 면역학적 방법은 효소결합면역흡착측정법(ELISA), 방사면역측정법, 면역조직화, 유세포측정 등을 포함한다.

- [0532] 본원에 기재된 방법, 예를 들어, 생체내 및 시험관내 검정, 예를 들어, 진단, 스테이징 또는 영상진찰 방법에서 사용되는 항-GCC 항체 분자는 결합되거나 결합되지 않은 결합 작용제의 검출을 촉진하기 위한 검출가능한 물질로 직접 또는 간접적으로 표시될 수 있다. 적합한 검출가능한 물질은 다양한 생물학적 활성 효소, 리간드, 보조분자족, 형광 물질, 발광 물질, 화학발광 물질, 생물발광 물질, 발색단 물질, 전자 밀도 물질, 상자성(예를 들어, 핵 자기 공명 활성) 물질, 및 방사성 물질을 포함한다. 일부 구체예에서, 항-GCC 항체 분자는 방사성 이온, 예를 들어, 인듐(^{111}In), 요오드(^{131}I 또는 ^{125}I), 이트륨(^{90}Y), 루테튬(^{177}Lu), 악티늄(^{225}Ac), 비스무트(^{212}Bi 또는 ^{213}Bi), 황(^{35}S), 탄소(^{14}C), 트리튬(^3H), 로듐(^{188}Rh), 테크네튬($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 프라세오디뮴, 또는 인(^{32}P); 또는 양전자-방출 방사성핵종, 예를 들어, 탄소-11(^{11}C), 칼륨-40(^{40}K), 질소-13(^{13}N), 산소-15(^{15}O), 플루오르-18(^{18}F), 및 요오드-121(^{121}I)에 커플링된다.
- [0533] 예시적 표지는 형광단, 예를 들어, 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 단실, 옴벨리페론, 루시페라제, 예를 들어, 개뿔벌레 루시페라제 및 박테리아 루시페라제(U.S. Pat. No. 4,737,456), 루시페린, 및 2,3-디히드로프탈라진디온을 포함한다. 다른 예시적 표지는 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP), 알칼리성 포스파타제, 갈락토시다제, 글루코아밀라제, 라이소자임, 당류 옥시다제, 예를 들어, 글루코오스 옥시다제, 갈락토오스 옥시다제, 및 글루코오스 6-포스페이트 데히드로게나제, 헤테로시클릭 옥시다제, 예를 들어, HRP와 같은 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 이용하는 효소와 커플링된 유리카제(uricase) 및 크산틴 옥시다제, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정적인 자유 라디칼 등을 포함한다.
- [0534] 형광단 및 발색단 표지된 항체 분자는 당 분야에 공지된 표준 모이어티로부터 제조될 수 있다. 항체 및 다른 단백질은 약 310 nm 이하의 파장을 갖는 광을 흡수하므로, 형광 모이어티는 310 nm 초과, 바람직하게는 400 nm를 초과하는 파장에서 실질적인 흡수를 갖도록 선택되어야 한다. 다양한 적합한 형광 화합물 및 발색단이 문헌[Stryer Science, 162:526 (1968) and Brand, L. et al. *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868 (1972)]에 기재되어 있다. 항체는 미국 특허 제3,940,475호, 제4,289,747호, 및 제4,376,110호에 개시된 것과 같은 통상적인 절차에 의해 형광 발색단으로 표시될 수 있다.
- [0535] 상기 기재된 다수의 요망되는 특성을 갖는 형광물질의 한 군은 3,6-디히드록시-9-페닐잔티드롤로부터 유래된 플루오레세인 및 3,6-디아미노-9-페닐잔티드롤로부터 유래된 로다민 및 레스아민(resamine) 및 리스아닌(lissanine) 로다민 B를 포함하는 잔틴 염료이다. 9-o-카르복시페닐잔티드롤의 플루오레세인 유도체 및 로다민은 9-o-카르복시페닐기를 갖는다. 반응성 커플링기, 예를 들어, 아미노 및 이소티오시아네이트기, 예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트 및 플루오레스카민을 갖는 플루오레세인 화합물이 용이하게 이용가능하다. 형광 화합물의 또 다른 기는 α 또는 β 위치에 아미노기를 갖는 나프틸아민이다.
- [0536] 표시된 항체 분자가, 예를 들어, (i) 친화성 크로마토그래피 또는 면역침강과 같은 표준 기술에 의해 소정의 항원을 분리시키거나; (ii) 단백질 발현의 풍부함(abundance) 및 패턴을 평가하기 위해 소정의 항원을 검출(예를 들어, 세포 용해질 또는 세포 상층액 중에서 검출)하거나; (iii) 임상 시험 절차의 일부로서 조직 내의 단백질 수준을 모니터, 예를 들어, 제공된 치료 요법의 효능을 결정하는 것을 포함하는 다수의 상황에서 진단적 및/또는 실험적으로 사용될 수 있다.
- [0537] 특정한 다른 방법이 GCC로의 항-GCC 항체의 결합을 검출하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 당 분야에 공지된 항원 결합 검정, 예를 들어, 웨스턴 블롯, 방사면역측정법, ELISA(효소결합면역흡착측정법), "샌드위치" 면역검정법, 면역침강 검정, 형광 면역검정법, 단백질 A 면역검정법, 및 면역조직화학(IHC)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0538] 항-GCC 항체 분자와 GCC 사이의 복합체 형성은 GCC 항원에 결합된 항체(또는 항체 단편) 또는 결합되지 않은 항체 분자를 측정하거나 시각화시킴으로써 검출될 수 있다. 통상적인 검출 검정, 예를 들어, 웨스턴 블롯, 방사면역측정법, ELISA(효소결합면역흡착측정법), "샌드위치" 면역검정법, 면역침강 검정, 형광 면역검정법, 단백질 A 면역검정법, 및 면역조직화학(IHC) 또는 방사면역측정법(RIA)이 사용될 수 있다.
- [0539] 항-GCC 항체 분자를 표시하는 것에 대한 대안으로, GCC의 존재는 검출가능한 물질로 표시된 표준 및 표시되지 않은 항-GCC 항체 분자를 이용한 경쟁 면역검정에 의해 샘플에서 검정될 수 있다. 이러한 검정에서, 생물학적 샘플, 표시된 표준 및 GCC 결합 작용제가 조합되고, 표시되지 않은 항체에 결합된 표시된 표준의 양이 결정된다. 샘플 내의 GCC의 양은 GCC 결합 작용제에 결합된 표시된 표준의 양에 반비례한다.

- [0540] 예를 들어, 형광 에너지 전달의 기술(FET, 예를 들어, Lakowicz *et al.*, U.S. Patent No. 5,631,169; Stavrianopoulos, *et al.*, U.S. Patent No. 4,868,103 참조)을 이용함으로써 어느 하나의 성분(GCC 또는 항체 분자)의 표지 또는 추가 조작 없이 항-GCC 항체 분자 복합체 형성에 대해 GCC를 직접 검출하는 것이 또한 가능하다. 첫번째 '공여체' 분자에서의 형광단 표지는 적절한 파장의 입사 광선을 이용한 여기 후에 이의 방출된 형광 에너지가 두번째 '수용체' 분자 상의 형광 표지에 의해 흡수되고, 차례로 흡수된 에너지로 인해 형광을 발할 수 있도록 선택된다. 대안적으로, '공여체' 단백질 분자는 단순히 트립토판 잔기의 자연 형광 에너지를 이용할 수 있다. 표지는 다양한 파장의 광을 방출하여, '수용체' 분자 표지가 '공여체'의 분자 표지와 식별될 수 있도록 선택된다. 표지 사이의 에너지 전달의 효율이 분자 사이에 떨어진 거리와 관련이 있으므로, 분자 사이의 공간적 관계가 평가될 수 있다. 분자 사이에 결합이 발생하는 상황에서, 검정에서의 '수용체' 분자 표지의 형광 방출은 최대가 되어야 한다. FET 결합 사건은 당 분야에 널리 공지된 표준 형광분광학적 검출 수단을 통해 편리하게 측정될 수 있다(예를 들어, 형광분석기를 이용함).
- [0541] 또 다른 예에서, GCC를 인지하는 항체 분자의 능력의 결정은 실시간 생체분자 상호작용 분석(Biomolecular Interaction Analysis, BIA)과 같은 기술을 이용함으로써 검정 성분 중 어느 하나(GCC 또는 항체 분자)를 표지하지 않고 달성될 수 있다(예를 들어, Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345 and Szabo *et al.*, 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705 참조). 본원에서 사용되는 "BIA" 또는 "표면 플라즈몬 공명"은 반응물 중 임의의 반응물을 표지하지 않고 실시간으로 생체특이적 상호작용을 연구하는 기술이다(예를 들어, BIACORE™). 결합 표면에서의 질량의 변화(결합 사건을 나타냄)는 표면 근처의 광의 굴절률을 변경시켜(표면 플라즈몬 공명(SPR)의 광학 현상), 생물학적 분자 사이의 실시간 반응의 지표로 사용될 수 있는 검출가능한 신호를 발생시킨다.
- [0542] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 생체내에서 GCC-발현 종양 조직의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 항-GCC 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게는 검출가능한 표지 또는 마커에 컨쥬게이션된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 피검체(예를 들어, 암을 갖는 환자)에 투여하고; (ii) GCC-발현 조직 또는 세포에 대한 상기 검출가능한 표지 또는 마커를 검출하기 위한 수단에 피검체를 노출시키는 것을 포함한다.
- [0543] 본 발명에 따라 진단 영상진찰에 유용한 표지의 예는 방사선표지, 예를 들어, ¹³¹I, ¹¹¹In, ⁶⁸Ga, ¹²³I, ^{99m}Tc, ³²P, ¹²⁵I, ³H, ¹⁴C, 및 ¹⁸⁸Rh, 형광 표지, 예를 들어, 플루오레세인 및 로다민, 핵 자기 공명 활성 표지, 단일 광자 방출 전산화 단층촬영술(single photon emission computed tomography, "SPECT") 검출기 또는 양전자 방출 단층촬영술(positron emission tomography, "PET") 스캐너에 의해 검출가능한 양전자 방출 동위원소, 화학발광, 예를 들어, 케미루미네서(chemiluminescer), 예를 들어, 루시페린, 및 효소 마커, 예를 들어, 퍼옥시다제 또는 포스파타제이다. 짧은-범위의 방사선 방출기, 예를 들어, 짧은-범위의 검출기 프로브, 예를 들어, 경직장 프로브에 의해 검출가능한 동위원소가 또한 사용될 수 있다. 항체는 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 상기 시약으로 표지될 수 있다. 예를 들어, 항체의 방사선표지와 관련한 기술에 대해 문헌[Wensel and Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York]을 참조하라. 또한, 문헌[D. Colcher *et al. Meth. Enzymol.* 121: 802-816 (1986)]을 참조하라.
- [0544] 방사선표지된 항체의 경우, 항체가 환자에 투여되고, 항체가 반응하는 항원을 갖는 종양에 국소화되고, 예를 들어, 감마 카메라 또는 방출 단층촬영술 또는 전산화된 단층촬영술을 이용하는 방사능핵(radionuclear) 스캐닝과 같은 공지된 기술을 이용하여 검출되거나 생체내 "영상화"된다. 예를 들어, 문헌[A.R. Bradwell *et al.*, "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin *et al.*, (eds.), pp 65-85 (Academic Press 1985)]을 참조하라. 대안적으로, 방사선표지가 양전자(예를 들어, ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, 및 ¹³N)를 방출하는 브룩하벤 국립 연구소(Brookhaven National Laboratory)에 위치한 Pet VI로 명명된 것과 같은 양전자 방출 트랜스엑슬 단층촬영술 스캐너가 사용될 수 있다.
- [0545] 다른 구체예에서, 본 발명은 피검체, 예를 들어, 인간 피검체에 방사성 동위원소에 컨쥬게이션된 항-GCC 항체 분자가 투여되는 경우에 다양한 조직에 노출되는 용량, 예를 들어, 방사선량을 결정하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자, 예를 들어, 방사성 동위원소로 표지된 항-GCC 항체 분자를 피검체에 투여하고; (ii) 방사성 동위원소 중 일부 또는 전부가 피검체의 신체로부터 제거될때까지 다양한 시점에서 다양한 조직, 예를 들어, 종양 또는 혈액에 위치한 방사성 동위원소의 양을 측정하고; (iii) 분석되는 각각의 조직에 의해 수용되는 전체 방사선량을 계산하는 것을 포함한다. 측정은 피검체로의 방사성 표지된 항-GCC 항체 분자의 투여(0일) 후 예정된 시점, 예를 들어, 1일, 2일, 3일, 5일, 7일 및 12일에 수행될 수 있다. 시간

경과에 따라 통합되고, 방사성동위원소의 특정 활성화에 의해 증가되는 제공된 조직에 존재하는 방사성동위원소는 제공된 조직이 수용하는 용량을 계산하는데 사용될 수 있다. 하나의 방사성 동위원소, 예를 들어, 감마선 방출체, 예를 들어, ^{111}In 으로 표지된 항-GCC 항체 분자를 이용하여 생성된 약리학적 정보는 동일 조직이 용이하게 측정될 수 없는 다양한 방사성 동위원소, 예를 들어, 베타선 방출체, 예를 들어, ^{90}Y 로부터 수용하는 예상 용량을 계산하는데 사용될 수 있다.

[0546] 항-GCC 항체 서열

[0547] 항-GCC 항체는 여러 방법에 의해 생성되었으며, 이는 실시예에 보다 상세히 논의되어 있다. 간단히, 마우스 모노클로날 항체 3G1 8F1 및 10B8이 통상적인 마우스에서의 전통적인 면역화 기술에 의해 생성되었다. 인간 모노클로날 항체 1D2, 5F9, 5H3, 6H8, 8C2, 및 10C10이 Abgenix XENOMOUSE 트랜스제닉 기술을 이용하여 완전한 인간 IgG2 항체를 생성하는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 생성되었고, 하이브리도마 기술을 이용하여 분리되었다. 인간 mAb Abx-012, mAb Abx-020, mAb Abx-106, mAb Abx-198, mAb Abx-221, mAb Abx-229, mAb Abx-338 및 mAb Abx-393이 완전한 인간 IgG2 항체를 생성하는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 생성되었다. 단일 항체가 Abgenix SLAM 기술을 이용하여 분리되었다. 이들은 완전한 인간 IgG1 항체를 제조하는데 사용되었다. GCC에 대한 항체의 특이성은 ELISA 및 유세포분석(FCM)에 의해 시험되었다. 생성된 항체의 서브셋이 추가 특성 규명에 대해 선택되었다.

[0548] 하기 표 1에는 여러 항-GCC 항체에 대해 항체 명칭, 항체를 생성시키는데 사용된 면역원, 사용되는 동물, 공급원, 중 및 아이소형 분리물이 요약되어 있다.

[0549] 표 1

Ab	면역원	동물	공급원	중	아이소형
3G1	TOK107-hIg	C57 통상적인 마우스	하이브리도마	마우스	IgG1,k
8F1	TOK107-hIg	C57 통상적인 마우스	하이브리도마	마우스	IgG1,k
10B8	TOK107-hIg	C57 통상적인 마우스	하이브리도마	마우스	IgG1,k
1D3	TOK107-hIg	C57 통상적인 마우스	하이브리도마	마우스	IgG1,k
8E12	TOK107-hIg	C57 통상적인 마우스	하이브리도마	마우스	IgG1,k
5F9	TOK107-hIg	제노마우스	하이브리도마	인간	IgG2,k
1D2	TOK107-hIg	제노마우스	하이브리도마	인간	IgG2,k
5H3	CHO-GC-C#27 세포	제노마우스	하이브리도마	인간	IgG2,k
6H8	CHO-GC-C#27 세포	제노마우스	하이브리도마	인간	IgG2,k
8C2	CHO-GC-C#27 세포	제노마우스	하이브리도마	인간	IgG2,k
10C10	CHO-GC-C#27 세포	제노마우스	하이브리도마	인간	IgG2,k
10D3	CHO-GC-C#27 세포	제노마우스	하이브리도마	인간	IgG2,k
1C9	CHO-GC-C#27 세포	제노마우스	하이브리도마	인간	IgG2,k
229	TOK107-hIg	제노마우스	SLAM	인간	IgG1,k
012	TOK107-hIg	제노마우스	SLAM	인간	IgG1,k
221	TOK107-hIg	제노마우스	SLAM	인간	IgG1,k
020	TOK107-hIg	제노마우스	SLAM	인간	IgG1,k
338	TOK107-hIg	제노마우스	SLAM	인간	IgG1,k

[0550]

106	TOK107-hIg	제노마우스	SLAM	인간	IgG1,k
198	TOK107-hIg	제노마우스	SLAM	인간	IgG1,k
393	TOK107-hIg	제노마우스	SLAM	인간	IgG1,k

[0551]

[0552] 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 서열이 결정되었다. 하기 표 2는 여러 항체의 가변 영역에 대한 SEQ ID NO의 요약이

다. 류린 및 인간 항-GCC 항체에 대한 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역에 대한 아미노산 및 핵산 서열이 각각 표 3 및 4에 제시되어 있다.

[0553] 항-GCC 항체에 대한 중쇄 및 경쇄의 CDR 각각에 대한 아미노산 및 핵산 서열이 각각 표 5 및 6에 제시되어 있다.

[0554] 예를 들어, 표 3의 9열은 mAb 5F9의 성숙 중쇄 가변 영역의 엔코딩된 아미노산 서열(SEQ ID NO:18)의 예시이며; mAb 5F9의 성숙 중쇄 가변 영역을 엔코딩하는 핵산 서열(SEQ ID NO:17)이 표 4의 9열에 기재되어 있다. mAb 5F9 중쇄 CDR(CDR) 1(SEQ ID NO:106), CDR2(SEQ ID NO:108) 및 CDR3(SEQ ID NO:110)의 엔코딩된 아미노산 서열이 각각 표 5의 25-27에 기재되어 있고; mAb 5F9 중쇄 CDR1(SEQ ID NO:105), CDR2(SEQ ID NO:107) 및 CDR3(SEQ ID NO:109)의 핵산 서열이 각각 표 6의 25-27열에 제시되어 있다.

[0555] 표 3의 10열은 mAb 5F9의 성숙 경쇄 가변 영역의 엔코딩된 아미노산 서열(SEQ ID NO:20)의 예시이며; mAb 5F9의 성숙 카파 경쇄 가변 영역을 엔코딩하는 핵산 서열(SEQ ID NO:19)이 표 4의 10열에 기재되어 있다. mAb 5F9 경쇄 CDR(CDR) 1(SEQ ID NO:112), CDR2(SEQ ID NO:114) 및 CDR3(SEQ ID NO:116)의 엔코딩된 아미노산 서열이 각각 표 5의 28-30열에 기재되어 있으며; mAb 5F9 경쇄 CDR1(SEQ ID NO:111), CDR2(SEQ ID NO:113) 및 CDR3(SEQ ID NO:115)의 핵산 서열이 각각 표 6의 28-30열에 제시되어 있다.

[0556] CDR의 서열분석은 독소 컨쥬게이션된 부위로 제공될 수 있는 잔기의 풍부함의 결정을 가능케 한다. 항원 결합 영역 내의 쌍을 이루지 않은 자유 시스테인이 아우리스타틴 컨쥬게이션을 위한 부위일 수 있고, 리신이 마이탄신(maytansine) 컨쥬게이션을 위한 부위일 수 있다. CDR의 아미노산으로의 독소 컨쥬게이션은 GCC에 대한 항체의 결합 친화성을 변경시킬 우려를 발생시킨다. 따라서, 구체예에서, CDR은 치료제에 컨쥬게이션될 수 있는 아미노산이 결핍되어 있다.

[0557] 표 2. 모노클로날 항체의 가변 영역에 대한 SEQ ID NO의 요약.

mAb	IgG 사슬	NA SEQ ID	AA SEQ ID
3G1	중쇄	1	2
	경쇄	3	4
8E12	중쇄	5	6
	경쇄	7	8
8F1	중쇄	9	10
	경쇄	11	12
1D3	중쇄	13	14
	경쇄	15	16
5F9	중쇄	17	18
	경쇄	19	20
5H3	중쇄	21	22
	경쇄	23	24
6H8	중쇄	25	26
	경쇄	27	28
8C2	중쇄	29	30
	경쇄	31	32
10C10	중쇄	33	34
	경쇄	35	36
10D3	중쇄	286	287
	경쇄	288	289
Abx-012	중쇄	238	239

[0558]

	경쇄	240	241
Abx-020	중쇄	37	38
	경쇄	39	40
Abx-106	중쇄	242	243
	경쇄	244	245
Abx-198	중쇄	41	42
	경쇄	43	44
Abx-221	중쇄	246	247
	경쇄	248	249
Abx-229	중쇄	45	46
	경쇄	47	48
Abx-338	중쇄	49	50
	경쇄	51	52
Abx-393	중쇄	53	54
	경쇄	55	56

[0559]

[0560]

표 3. mAb 가변 영역의 아미노산 서열

	mAb	IgG 사슬	SEQ ID NO:	아미노산 서열
1	3G1	중쇄	2	QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRNAISWVRQP PGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSALKSRLSIRKENSQSQVF LKMNSLQTEDTARYFCARSGYDGF Y WGQGT L TVSA
2	3G1	경쇄	4	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMH W YQOK SGTSPKRWIYDTSKL A SGVPARFSGSGSGTSYSLTITSME AEDAATYYCQ Q WSGNPYTFGGG T KLEIK
3	8E12	중쇄	6	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVK QRPGQGLEWIGKIGPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSS TAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGT L TVS
4	8E12	경쇄	8	DVVMQTPTLSLSTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLN WLQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTL KISRVEADLG V YYC L QGTYYPYTFGGG T KLEIK
5	8F1	중쇄	10	QVQLQPGAELVKPGASVQMSCKASGYIFTGYW M YWV KQRPGQGLEWIGRIHPSDSNTN Y NQKFKGKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCTHALAYWGQGT L TVS
6	8F1	경쇄	12	DVVLTTPTLSTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLSWL LQRPGQSPKRLIYLVSQLD S GVDPDRFTGSGSGTDFTLKIS RVEADLG V YYCVQGT H LFTFGSG T KLEIK
7	1D3	중쇄	14	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYINWV KQRPGQGLEWIGKIGPRSGSTYYNEKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGT L TVSA

[0561]

8	1D3	경쇄	16	DVVMQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLN WLQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTL KISRVEAEDLGVYYCLQGTYYPYTFGGGKLEIK
9	5F9	중쇄	18	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQF ALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQGLTV TVSS
10	5F9	경쇄	20	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQS EDFAVYYCQYKTPRTFGQGTNVEIK
11	5H3	중쇄	22	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDCYMSWIR QSPGKGLEWVSYITTSNGTIYYADSVKGRFTISRDNKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGWFGMDVWGQGT TVTVSS
12	5H3	경쇄	24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHNDGKTYLY WYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFGVDPDRFSSSGSXTDFTLK ISRVEAEDVGYYCMQSIQLPRTFGQGTKEIK
13	6H8	중쇄	26	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAWIWDGSKNYAASVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGT VTVSS
14	6H8	경쇄	28	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLIYKTSNRFGVDPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGYYCMQATQFPTFGQGTREIK
15	8C2	중쇄	30	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVGAIWDGSKNYAASVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVFYCARGRSSSYFDYWGQGLV TVSS

[0562]

16	8C2	경쇄	32	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNRFSGVPDFRSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVIYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
17	10C10	중쇄	34	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAIIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGT LTVSS
18	10C10	경쇄	36	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASFSRSCSSQSLVHSDGNTYLS WLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDFRSGSGAGTDFTLK ISRVEAEDVGVIYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
35	10D3	중쇄	287	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKS VTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYG NFDHWGQGT LTVSS
36	10D3	경쇄	289	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGTPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQYERSFTFGPGTKVD
19	Abx-012	중쇄	239	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRTVSVSDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTG YFDYWGQGT LTVSS
20	Abx-012	경쇄	241	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYFCQYGSSTFGGGTKVEIK
21	Abx-020	중쇄	38	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWISYITSSGSTIYYASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARD FSGWFGVHFDYWGQGT LTVSS

[0563]

22	Abx-020	경쇄	40	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYW YLQKPGQPPQLLIYEVSNRFGVFNRFSGSGSGDFTLKI SRVEAEDVGVIYCMQSIQLTWTFGQGKTKLEIK
23	Abx-106	중쇄	243	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRTVTVSDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGDFYWGQGLTVTVSS
24	Abx-106	경쇄	245	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFSGSGSGDFTLTISRLEP EDFAVYYCQYGSMPMSFGQGKTKLEIK
25	Abx-198	중쇄	42	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSYAMSWVR QAPGKGLDWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMHSLSAEDTAIYYCAKRRWQGYFDLWGRGTLV TVSS
26	Abx-198	경쇄	44	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRARQRVDSRYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYGSPLTFGGGKTKLEIK
27	Abx-221	중쇄	247	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSPFDYWGQGT LTVTVSS
28	Abx-221	경쇄	249	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRSLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQS EDVAVYYCQYNNWMCSFGQGKTKLEIK
29	Abx-229	중쇄	46	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSPFDYWGQGT LTVTVSS
30	Abx-229	경쇄	48	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCHQYSNWMCSFGQGKTKLEIK

[0564]

31	Abx-338	중쇄	50	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWIRQP AGKGLEWIGRIYISGRITFNPSLKSRTVTVSDTSKNQFSK LSSVTAADTAVYFCARDRYGYLDYWGQGLTVTVSS
32	Abx-338	경쇄	52	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYGSSTFGQGTRLEIK
33	Abx-393	중쇄	54	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRHYYSWIRQ PPGKGLEWIGYIYSGSTNYNLSLKSRTISRDTSKNQVS LKLSSVTAADTAVYYCAAGMGFDYWGQGLTVTVSS
34	Abx-393	경쇄	56	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITTCRASQAIRNDLGWYQLKP GKAPKRLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPE DSATYYCLQHNSFPPTFGQGKTKLEIK

[0565]

[0566]

표 4. mAb가변 영역의 핵산 서열

	mAb	IgG 사슬	SEQ ID NO:	핵산 서열
1	3G1	중쇄	1	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTG GCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGTC TCTGGGTTCTCATTAAAGCAGAAATGCTATAAGCTGG GTTTCGCCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTT GGAGTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTATAAT TCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCCGCAAAGAG AACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGT CTACAAACTGAAGACACAGCCAGGTACTTCTGTGCC AGAAGTGGTTACGACGGGTTTGATTACTGGGGCCAA GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
2	3G1	경쇄	3	CAGATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTG CATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTG CCAGCTCAAGTGTAATTACATGCACTGGTACCAGC AGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATG ACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTTACTCTCTCAC AATCACCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTA TTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACCAAACTGGAAATAAAA

[0567]

3	8E12	중쇄	5	CAGGTCCAGTTGAAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACTACTATATAAACTGGG TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTG GAAAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACTACA ATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCA GACAAATCGTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTG CAAGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGG TCACTGTCTCT
4	8E12	중쇄	7	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCGG TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATA TTTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCC AAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAACTGGACCC TGGCATCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGA AACAGATTTTCACTTAAATCAGCAGAGTGGAGGC TGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAAGGTAC ATATTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCT GGAAATAAAG
5	8F1	중쇄	9	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGCAGATGTCCTGTAAGGCT TCTGGCTATATTTTACCGGCTACTGGATGTACTGGG TGAAGCAGAGGCCTGGCCAAGGCCTTGAGTGGATTG GAAGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAACTACA ATCAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAG ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCA GCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTAC CCATGCCCTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT CACTGTCTCT

[0568]

6	8F1	경쇄	11	GATGTTGTGTTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGA TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAACCTA TTTGAGTTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCC AAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTCAACTGGACTCT GGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGA ACAGATTTTACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATTTGGGAGTGTATTACTGCGTGCAAGGTACA CATTTATTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAA ATAAAA
7	1D3	중쇄	13	CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACAGACTACTATATAAACTGG GTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATT GGAAAGATTGGTCCTAGAAGTGGTAGTACTTACTAC AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGC AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGT GCAAGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTG GTCAGTGTCTCTGCA
8	1D3	경쇄	15	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCGG TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATA TTTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCC AAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAAACTGGACCC TGGCATCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGA AACAGATTTTACACTTAAAAATCAGCAGAGTGGAGGC TGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAAGGTAC ATATTATCCGTACACGTTTCGAGGGGGGACCAAGCT GGAAATAAAA

[0569]

9	5F9	중쇄	17	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCT TTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGAT CCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTG GGGAAATCAATCATCTGTGAAACACCAACGACAAC CCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCT GTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCG AGAGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCAC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
10	5F9	경쇄	19	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCT GTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTAGCCTGGTAT CAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCT CTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGG ACGTTTCGGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAA
11	5H3	중쇄	21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTACCTTCAGTGACTGCTACATGAGCTGG ATCCGCCAGTCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTT TCATACATTACTACTAGTGGTAATACCATTTACTACG CAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGG ACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG CGAGAGACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTCT GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0570]

12	5H3	경쇄	23	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGT CTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATGGAAAACCT ATTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTC CACAACCTCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGTTCTC TGGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTAGCAGCGGGTCNNG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGC TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTAT ACAGCTTCCTCGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGT GGAAATCAAA
13	6H8	중쇄	25	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
14	6H8	경쇄	27	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGAAAACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC GCAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATTAAA

[0571]

15	8C2	중쇄	29	caggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtccagcctgggaggTCCCT GAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGT AGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGC AAGGGGCTGGAGTGGGTGGGAGCTATATGGTATGAT GGAAGTAATAAAATACTATGCAGCCTCCGTGAAGGGC CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTATTTTACTGTGCGAGAGGGAGGAGCAGC TCGTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
16	8C2	경쇄	31	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC GCAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATTAAT
17	10C10	중쇄	33	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0572]

18	10C10	경쇄	35	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCTTCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACGTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGATTTCTAACCGTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC ACAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATTAAT
35	10D3	중쇄	286	CAGGTGCA GCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC GGAGACCCTGTCCC TCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTA CTACTGGAGCTGG ATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGGGAAATCAATCA TCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAG TCGAGTCACCATAT CAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGC TGAGTTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAA CGTGGATACACCTA TGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCA

[0573]

36	10D3	경쇄	288	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCAGGTACT TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTAT GGTGCCATCCAGCAGGGCCACTGGCACCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT GGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTATTTCTGTGTCAGCAGTATGAAAGGTCATT CACTTTCGGCCCT GGGACCAAAGTGGAT
19	Abx-012	중쇄	238	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCA GCCCCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCGTAT CTATATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTC GAGTCACCGTGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGT TCTCCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACTTT GACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

[0574]

20	Abx-012	경쇄	240	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTGCAGGG CCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGG TGCATCCA GCAGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCA GACTGGAG CCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATG GTAGCTCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG AGATCAA AC
21	Abx-020	중쇄	37	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGG ATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT TCATACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACT CAGCCTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGG ACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG CGAGAGATTTCAGTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTGT ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CG

[0575]

22	Abx-020	경쇄	39	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGTAAGTC TAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATGGAAAGACCTA TTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCC ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTCTCT GGAGTGCCAAATAGGTTCAGTGGCAGCGGTCAGG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGC TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTAT ACAACTTACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGT GGAAATCAAA
23	Abx-106	중쇄	242	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCA GCCCCGCCGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCGTAT CTATATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTC GAGTCACCGTGTCACTAGACACGTCCAAGAACCAGT TCTCCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACTTT GACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC

[0576]

24	Abx-106	경쇄	244	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTGCAGGG CCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGG TACATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GACTGGAG CCTGAAGACTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTAT GGTAGCTCACCCATGTGCAGTTTGGCCAGGGGACC AAGCTGGA GATCAAACG
25	Abx-198	중쇄	41	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGACTGGGTCT TCAGATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGCAC AGCCTGAGCGCCGAGGACACGGCCATATATTACTGT GCGAAACGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTCTGG GGCCGTGGCACCCTGGTCACTGTCTCTCA

[0577]

26	Abx-198	경쇄	43	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTGCAGGG CCAGGCAGCGTGTGACAGCAGGTACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTG CAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGC TCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
27	Abx-221	중쇄	246	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATT CACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTAT TAGTGGTA GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA CGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC CGTATATTACTGTGCGAAAGATCGCGATTTTGGAG TGGTCCATT TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCAGC

[0578]

28	Abx-221	경쇄	248	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCT GTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGG GCCAGTCA GAGTGTTAGTAGAAGCTTAGCCTGGTACCAGCAGAA ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGTGC ATCCACCA GGGCCACTGGGATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTG GGTCTGGGACAGAATTCACCTCTACCATCAGCAGCC TGCAGTCT GAAGATGTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAT AACTGGATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG GAGATCAA ACG
29	Abx-229	중쇄	45	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CAGGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACACTATATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTG CGAAAGATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0579]

30	Abx-229	경쇄	47	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCT GTGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAACTTAGCCTGGTAC CAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCC AGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAATTCAC CTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCACCACTATAGTAACTGGATGTGCA GTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
31	Abx-338	중쇄	49	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGGCTCCATCAGAAGTTACTACTGGAGCTGGA TCCGGCAGCCCCGCCGGAAGGGACTGGAGTGGATTG GACGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCAACC CCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTGGACA CGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTCTGTGCGA GAGATAGATATTATGGCTACCTTGACTACTGGGGCC AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
32	Abx-338	경쇄	51	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCCGAGTTACTTAGCCTGGT ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTG CAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGTTCACCGA GCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA

[0580]

33	Abx-393	중쇄	53	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGCGGCTCCATCCGTCATTACTACTGGAGCTGGA TCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTG GGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCACTACAACC TCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAAGAGACA CGTCCAAGAATCAGGTCTCCCTG AAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTG TATTATTGTGCGGCGGGTATGGGCTTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
34	Abx-393	경쇄	55	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCCTCCCTGTCTG CATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG CAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATC AGCTGAAACCGGGGAAAGCCCTAAGCGCCTGATCT ATTCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAA GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCAC TCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTCTGCAA CTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGAC GTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

[0581]

[0582] 표 5: CDR의 아미노산 서열

	mAb	IgG 사슬	SEQ ID NO:	아미노산 서열
1	3G1	VH CDR1	58	RNAIS
2	3G1	VH CDR2	60	VIWTGGGTNYNSALKS
3	3G1	VH CDR3	62	SGYDGFYD
4	3G1	VL CDR1	64	SASSSVNYMH
5	3G1	VL CDR2	66	DTSKLS
6	3G1	VL CDR3	68	QQWSGNPYT
7	8E12	VH CDR1	70	DYYIN
8	8E12	VH CDR2	72	KIGPRSGNTYYNEKFKG
9	8E12	VH CDR3	74	WDAY
10	8E12	VL CDR1	76	KSSQSLLYSNGKTYLN

[0583]

11	8E12	VL CDR2	78	QVSKLDP
12	8E12	VL CDR3	80	LQGTYYPYT
13	8F1	VH CDR1	82	GYWMY
14	8F1	VH CDR2	84	RIHPSDSNTNYNQKFKG
15	8F1	VH CDR3	86	ALAY
16	8F1	VL CDR1	88	KSSQSLLYSNGKTYLS
17	8F1	VL CDR2	90	LVSQ LDS
18	8F1	VL CDR3	92	VQGTHLFT
19	1D3	VH CDR1	94	DYYIN
20	1D3	VH CDR2	96	KIGPRSGSTYYNEKFKG
21	1D3	VH CDR3	98	WDAY
22	1D3	VL CDR1	100	KSSQSLLYSNGKTYL

[0584]

23	1D3	VL CDR2	102	QVSKLDP
24	1D3	VL CDR3	104	LQGTYYPYT
25	5F9	VH CDR1	106	GYYS
26	5F9	VH CDR2	108	EINHRGNTNDNPSLKS
27	5F9	VH CDR3	110	ERGYTYGNFDH
28	5F9	VL CDR1	112	RASQSVSRNLA
29	5F9	VL CDR2	114	GASTRAT
30	5F9	VL CDR3	116	QQYKTWPRT
31	5H3	VH CDR1	118	DCYMS
32	5H3	VH CDR2	120	YITTSGNTIYYADSVKG
33	5H3	VH CDR3	122	DWGWFGMDV
34	5H3	VL CDR1	124	KSSQSLHNDGKTYLY

[0585]

35	5H3	VL CDR2	126	EVSNRFS
36	5H3	VL CDR3	128	MQSIQLPRT
37	6H8	VH CDR1	130	SYGMH
38	6H8	VH CDR2	132	AIWYDGSNKYYADSVKG
39	6H8	VH CDR3	134	GRSSSYFDY
40	6H8	VL CDR1	136	RSSQSLVHSDGNTYLS
41	6H8	VL CDR2	138	KTSNRFS
42	6H8	VL CDR3	140	MQATQFPT
43	8C2	VH CDR1	142	SYGMH
44	8C2	VH CDR2	144	AIWYDGSNKYYAASVKG
45	8C2	VH CDR3	146	GRSSSYFDY
46	8C2	VL CDR1	148	RSSQSLVHSDGNTYLS

[0586]

47	8C2	VL CDR2	150	KTSNRFS
48	8C2	VL CDR3	152	MQATQFPT
49	10C10	VH CDR1	154	SYGMH
50	10C10	VH CDR2	156	AIWYDGSNKYYADSVKG
51	10C10	VH CDR3	158	GRSSSYFDY
52	10C10	VL CDR1	160	RSSQSLVHSDGNTYLS
53	10C10	VL CDR2	162	KISNRFS
54	10C10	VL CDR3	164	MQATQFPT
103	10D3	VH CDR1	291	GYYS
104	10D3	VH CDR2	293	EINHRGNTNDNPSLKS
105	10D3	VH CDR3	295	ERGYTYGNFDH
106	10D3	VL CDR1	297	RASQSVSSRYLA

[0587]

107	10D3	VL CDR2	299	GASSRAT
108	10D3	VL CDR3	301	QQYERSFT
55	Abx-012	VH CDR1	251	HYYWS
56	Abx-012	VH CDR2	253	RIYISGRTSYNPSLKS
57	Abx-012	VH CDR3	255	DRLTGYFDY
58	Abx-012	VL CDR1	257	RASQSVSSSYLA
59	Abx-012	VL CDR2	259	GASSRAA
60	Abx-012	VL CDR3	261	QQYGSSLT
61	Abx-020	VH CDR1	166	DYYMS
62	Abx-020	VH CDR2	168	YITSSGSTIYYSASVKG
63	Abx-020	VH CDR3	170	DFSGWFGVHFDY
64	Abx-020	VL CDR1	172	KSSQSLHSDGKTYLY

[0588]

65	Abx-020	VL CDR2	174	EVSNRFS
66	Abx-020	VL CDR3	176	MQSIQLTWT
67	Abx-0106	VH CDR1	263	HYYWS
68	Abx-106	VH CDR2	265	RIYISGRTSYNPSLKS
69	Abx-106	VH CDR3	267	DRLTGYFDY
70	Abx-106	VL CDR1	269	RASQSVSSSYLA
71	Abx-106	VL CDR2	271	GTSSRAT
72	Abx-106	VL CDR3	273	QQYGSSPMCS
73	Abx-198	VH CDR1	178	SYAMS
74	Abx-198	VH CDR2	180	DISGSGGSTYYADSVKG
75	Abx-198	VH CDR3	182	RRWQGYFDL
76	Abx-198	VL CDR1	184	RARQRVDSRYLA

[0589]

77	Abx-198	VL CDR2	186	GASSRAT
78	Abx-198	VL CDR3	188	QQYGSSPLT
79	Abx-221	VH CDR1	275	RYAMN
80	Abx-221	VH CDR2	277	GISGSGGSTYYADSVKG
81	Abx-221	VH CDR3	279	DRDFWSGPFDY
82	Abx-221	VL CDR1	281	RASQSVSRSLA
83	Abx-221	VL CDR2	283	GASTRAT
84	Abx-221	VL CDR3	285	QQYNNWMCS
85	Abx-229	VH CDR1	190	RYAMN
86	Abx-229	VH CDR2	192	GISGSGGRTYYADSVKG
87	Abx-229	VH CDR3	194	DRDFWSGPFDY
88	Abx-229	VL CDR1	196	RASQSVSRNLA

[0590]

89	Abx-229	VL CDR2	198	GASTRAT
90	Abx-229	VL CDR3	200	HQYSNWMCS
91	Abx-338	VH CDR1	202	SYAWS
92	Abx-338	VH CDR2	204	RIYISGRITFNPSLKS
93	Abx-338	VH CDR3	206	DRYYGYLDY
94	Abx-338	VL CDR1	208	RASQSVRSYLA
95	Abx-338	VL CDR2	210	DASSRAT
96	Abx-338	VL CDR3	212	QQYGSSPST
97	Abx-393	VH CDR1	214	HYYWS
98	Abx-393	VH CDR2	216	YIYYSGSTNYNLSLKS
99	Abx-393	VH CDR3	218	GMGFDY
100	Abx-393	VL CDR1	220	RASQAIRNDLG

[0591]

101	Abx-393	VL CDR2	222	SASSLQS
102	Abx-393	VL CDR3	224	LQHNSFPPT
109	콘센서스	VH CDR1	302	x-x/Y-x/Y-M/W-S/N
110	콘센서스	VH CDR2	303	x-I-x-x-SG-[x 또는없음]-x-T/I-[y/T/S]-x-x-L/V-K-s/G
111	콘센서스	VH CDR3	304	[4-6x]-G-[2-3x]-D-Y
112	콘센서스	VL CDR1	305	R/K-A/S-SQS-V/L-S/L-[5-9x]
113	콘센서스	VL CDR2	306	x-x-S-x-R-x-x
114	콘센서스	VL CDR3	307	Q/H/M-Q-Y/S-[5-7x]

[0592]

[0593]

표 6. CDR의 핵산 서열

	mAb	IgG 사슬	SEQ ID NO:	핵산 서열
1	3G1	VH CDR1	57	AGAAATGCTATAAGC

[0594]

2	3G1	VH CDR2	59	GTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTAT AATTCAGCTCTCAAATCC
3	3G1	VH CDR3	61	AGTGGTTACGACGGGTTTGATTAC
4	3G1	VL CDR1	63	AGTGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGCAC
5	3G1	VL CDR2	65	GACACATCCAAACTGGCTTCT
6	3G1	VL CDR3	67	<u>CAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACG</u>
7	8E12	VH CDR1	69	GACTACTATATAAAC
8	8E12	VH CDR2	71	AAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC
9	8E12	VH CDR3	73	TGGGATGCTTAC
10	8E12	VL CDR1	75	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT
11	8E12	VL CDR2	77	CAGGTGTCCAAACTGGACCT
12	8E12	VL CDR3	79	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
13	8F1	VH CDR1	81	<u>GGCTACTGGATGTAC</u>

[0595]

14	8F1	VH CDR2	83	<u>AGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAACT</u> <u>ACAATCAAAAGTTCAAGGGC</u>
15	8F1	VH CDR3	85	<u>GCCCTTGCTTAC</u>
16	8F1	VL CDR1	87	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAAACCTATTTGAGT
17	8F1	VL CDR2	89	CTGGTGTCTCAACTGGACTCT
18	8F1	VL CDR3	91	GTGCAAGGTACACATTTATTCACG
19	1D3	VH CDR1	93	GACTACTATATAAAC
20	1D3	VH CDR2	95	AAGATTGGTCCTAGAAGTGGTAGTACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC
21	1D3	VH CDR3	97	TGGGATGCTTAC
22	1D3	VL CDR1	99	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT
23	1D3	VL CDR2	101	CAGGTGTCCAACTGGACCCT
24	1D3	VL CDR3	103	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
25	5F9	VH CDR1	105	GGTTACTACTGGAGC

[0596]

26	5F9	VH CDR2	107	GAAATCAATCATCGTGAAACACCAACGAC AACCCGTCCTCAAG
27	5F9	VH CDR3	109	GAACGTGGATACACCTATGGTAACCTTGACC AC
28	5F9	VL CDR1	111	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTA GCC
29	5F9	VL CDR2	113	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
30	5F9	VL CDR3	115	CAGCAGTATAAACCTGGCCTCGGACG
31	5H3	VH CDR1	117	GACTGCTACATGAGC
32	5H3	VH CDR2	119	TACATTACTACTAGTGGTAATACCATTACT ACGCAGACTCTGTGAAGGGC
33	5H3	VH CDR3	121	GACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTC
34	5H3	VL CDR1	123	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATG GAAAGACCTATTTG
35	5H3	VL CDR2	125	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
36	5H3	VL CDR3	127	ATGCAAAGTATACAGCTTCCTCGGACG
37	6H8	VH CDR1	129	AGCTATGGCATGCAC

[0597]

38	6H8	VH CDR2	131	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC
39	6H8	VH CDR3	133	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT
40	6H8	VL CDR1	135	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
41	6H8	VL CDR2	137	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
42	6H8	VL CDR3	139	ATGCAAGCTACGCAATTTCACACC
43	8C2	VH CDR1	141	AGCTATGGCATGCAC
44	8C2	VH CDR2	143	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGCCTCCGTGAAGGGC
45	8C2	VH CDR3	145	GGGAGGAGCAGCTCGTATTTTGACTAC
46	8C2	VL CDR1	147	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
47	8C2	VL CDR2	149	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
48	8C2	VL CDR3	151	ATGCAAGCTACGCAATTTCAC
49	10C10	VH CDR1	153	AGCTATGGCATGCAC

[0598]

50	10C10	VH CDR2	155	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC
51	10C10	VH CDR3	157	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT
52	10C10	VL CDR1	159	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACGTACTTGAGT
53	10C10	VL CDR2	161	AAGATTTCTAACCGGTTCTCT
54	10C10	VL CDR3	163	ATGCAAGCTACACAATTCCAACC
103	10D3	VH CDR1	290	GGTTACTACTGGAGC
104	10D3	VH CDR2	292	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC AACCCGTCCCTCAAG
105	10D3	VH CDR3	294	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTGACC AC
106	10D3	VL CDR1	296	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGGTAC TTAGCCT
107	10D3	VL CDR2	298	GGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
108	10D3	VL CDR3	300	CAGCAGTATGAAAGGTCATTCACTT
55	Abx-012	VH CDR1	250	CATTACTACTGGAGC
56	Abx-012	VH CDR2	252	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT

[0599]

57	Abx-012	VH CDR3	254	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC
58	Abx-012	VL CDR1	256	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCC
59	Abx-012	VL CDR2	258	GGTGCATCCAGCAGGGCCGCT
60	Abx-012	VL CDR3	260	CAGCAGTATGGTAGCTCCCTCACT
61	Abx-020	VH CDR1	165	GACTACTACATGAGC
62	Abx-020	VH CDR2	167	TACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACT ACTCAGCCTCTGTGAAGGGC
63	Abx-020	VH CDR3	169	GATTTTCAGTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTG ACTAC
64	Abx-020	VL CDR1	171	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATG GAAAGACCTATTGTAT
65	Abx-020	VL CDR2	173	GAAGTTTCCAACCGTTCTCT
66	Abx-020	VL CDR3	175	ATGCAAAGTATACAACCTACGTGGACG
67	Abx-106	VH CDR1	262	CATTACTACTGGAGC
68	Abx-106	VH CDR2	264	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT

[0600]

69	Abx-106	VH CDR3	266	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC
70	Abx-106	VL CDR1	268	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCC
71	Abx-106	VL CDR2	270	GGTACATCCAGCAGGGCCACT
72	Abx-106	VL CDR3	272	CAGCAGTATGGTAGCTACCCATGTGCAGT
73	Abx-198	VH CDR1	177	AGCTATGCCATGAGC
74	Abx-198	VH CDR2	179	GATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC
75	Abx-198	VH CDR3	181	CGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTC
76	Abx-198	VL CDR1	183	AGGGCCAGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTAC TTAGCC
77	Abx-198	VL CDR2	185	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT
78	Abx-198	VL CDR3	187	CAGCAGTATGGTAGCTACCGCTCACT
79	Abx-221	VH CDR1	274	CGCTATGCCATGAAC
80	Abx-221	VH CDR2	276	GGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC

[0601]

81	Abx-221	VH CDR3	278	GATCGCGATTTTGGAGTGGTCCATTGACT AC
82	Abx-221	VL CDR1	280	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAGCTTA GCC
83	Abx-221	VL CDR2	282	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
84	Abx-221	VL CDR3	284	CAGCAGTATAATAACTGGATGTGCAGT
85	Abx-229	VH CDR1	189	CGCTATGCCATGAAC
86	Abx-229	VH CDR2	191	GGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGC
87	Abx-229	VH CDR3	193	GATCGCGATTTTGGAGTGGTCCATTGACT AC
88	Abx-229	VL CDR1	195	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAACTTA GCC
89	Abx-229	VL CDR2	197	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
90	Abx-229	VL CDR3	199	CACCAGTATAGTAACTGGATGTGCAGT
91	Abx-338	VH CDR1	201	AGTTACTACTGGAGC
92	Abx-338	VH CDR2	203	CGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCA ACCCCTCCCTCAAGAGT

[0602]

93	Abx-338	VH CDR3	205	GATAGATATTATGGCTACCTTGACTAC
94	Abx-338	VL CDR1	207	AGGGCCAGTCAGAGTGTAGCCGAGTTACT TAGCC
95	Abx-338	VL CDR2	209	GATGCATCCAGCAGGGCCACT
96	Abx-338	VL CDR3	211	CAGCAGTATGGTAGTTCACCGAGCACC
97	Abx-393	VH CDR1	213	CATTACTACTGGAGC
98	Abx-393	VH CDR2	215	TATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACA ACCTCTCCCTCAAGAGT
99	Abx-393	VH CDR3	217	GGTATGGGCTTTGACTAC
100	Abx-393	VL CDR1	219	CGGGCAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTA GGC
101	Abx-393	VL CDR2	221	TCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
102	Abx-393	VL CDR3	223	CTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGACG

[0603]

[0604]

mAb 5F9 및 Abx-229의 각각의 중쇄 및 경쇄 둘 모두에 대한 코딩 서열을 함유하는 발현 벡터가 상기 기재된 바와 같이 생성되었다.

[0605]

본 발명은 추가로 제한하는 것으로 간주되지 않아야 되는 하기 실시예에 의해 예시된다.

[0606]

실시예

[0607]

실시예 1: 항-GCC 항체의 생성 및 특성규명

[0608]

면역화 및 스크리닝을 위한 GCC 단백질의 생성을 하기와 같이 수행하였다. 하기 GCC 서열(신호 서열 및 세포외도메인)을 포함하는 서열을 엔코딩하는 GCC 유전자의 일부를 발현 벡터에 서브클로닝하여 GCC 항원을 제조하였다.

MKTLALLDALWSLLFQPGWLSFSSQVSNCHNGSYEISVLMGMNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVR
GRLQNAGLNVTNATFMYSGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCITYSTFQMY
LDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKTNLDPFKTYSWSTSYVYKNGTE
TEDCFWYLNALASVSYSFSGELGFKVVLQRQDKEFDILMDHNRKSNVIMCGGPEFLYKLKGDRAV
AEDIVILVDLNFQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLF
GHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFFGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLITY
DTHVNKTYPVDMSPFTTWKNSKL (SEQ ID NO:229)

[0609]

[0610]

상기 발현 벡터(pLKTOK107)는 GCC 서열과 융합시키기 위한 C-말단 IgG1Fc 영역을 제공하였다. 이러한 벡터는 엑손 내의 CH1 단편으로부터 쌍을 이루지 않는 시스테인을 제거하도록 돌연변이된 IgG1 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 갖는 엑손을 포함하였다. 이러한 IgG1Fc 영역은 리신 235 및 글리신 237에서 알라닌으로 추가로 돌연변이되었다. 작제물을 C-말단 인간 IgG1Fc에 융합된 분비되는 GCC 서열(SEQ ID NO:228의 아미노산 잔기 24 내지 430)로서 SV40 T-항원에 대한 유전자로 트랜스펙션된 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에서 재조합적으로 발현시켰다. TOK107-hIg(alt. name hGCC-ECD/hIgG1 Fc, SEQ ID NO:317)로 명명된 단백질을 단백질 A 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다.

- [0611] 상기 융합 단백질을 C-말단으로의 류린 IgG2a 막형단 영역의 융합을 가능케 하는 pLKTOK111과 같은 발현 벡터로 서브클로닝하여 GCC 항원을 또한 제조하였다. 이러한 작제물이 CHO 세포에서 재조합적으로 발현되는 경우, GCC 세포의 도메인은 세포 표면 상에서 검출된다. GCC-Ig 융합 단백질(SEQ ID NO:318)의 높은 세포 표면 발현은, pLKTOK111 벡터가 류린 CD79a(MB-1) 및 CD79b(B29)를 포함하는 pLKTOK123과 함께 공동 트랜스펙션되는 경우에 달성된다. 이러한 트랜스펙션으로부터의 클론 #27(CHO-GCC#27)을 면역원으로 사용하였다. HT-29-GCC#2 세포를 또한 면역원으로 사용하였다.
- [0612] ELISA에 의한 하이브리도마 상층액 및 정제된 mAb의 스크리닝을 위해, GCC 융합 작제물을 엔코딩하는 핵산을 pCMV1 발현 벡터(Sigma)로 클로닝시켰다. 정제 태그: FLAG-태그(N-말단내) 및 His-태그(C-말단내)를 또한 작제물에 클로닝시켰다. 융합 단백질 작제물을 293 세포로 트랜스펙션시키고, 발현시키고, 재조합 단백질을 항-FLAG® M2-아가로오스 친화성 컬럼(Sigma) 상에서 정제하였다.
- [0613] **시약 및 세포주.** HEK293 세포, CHO, 및 T84 인간 결장암 세포를 ATCC로부터 획득하였고, ATCC 프로토콜에 따라 유지시켰다.
- [0614] **마우스:** 류린 하이브리도마의 생성을 위해 4-6주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 타코닉 팜스, 인코퍼레이티드(Taconic Farms, Inc., Germantown, NY)사에서 구입하였다. 인간 IgG2 항체를 생성하는, 4-6주령까지 사내에서 사육된 제노마우스(Xenomice)를 인간 하이브리도마의 생성을 위해 아브게닉스, 인코퍼레이티드(Abgenix, Inc., Fremont, CA)사에서 구입하였다. 모든 동물을 밀레니엄 파마슈티컬스, 인코퍼레이티드(Millennium Pharmaceuticals, Inc)사의 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 지침에 따라 획득하고 유지시켰다.
- [0615] **세포주:** 기능 검정에 사용된 세포주는 GCC 트랜스펙션된 세포 및 벡터 대조군 HEK293 또는 HT29세포의 세포쌍이었다. HT29 세포를 EF-1a 프로모터의 조절 하에서 전장 GCC 또는 빈 벡터(pLKTOK4)로 트랜스펙션시키고, G418에서 선택하였다. 상기 세포에서의 GCC는, ST 펩티드(1-18 또는 5-18)와 접촉되는 경우에 cGMP 반응을 갖는 것으로 확인되었다. HEK293 세포를 CMV 프로모터의 조절 하에서 전장 GCC 또는 빈 벡터(pN8mycSV40)로 트랜스펙션시키고, 블라스티시딘(blasticidin)에서 선택하였다. 이러한 세포에서의 GCC는 myc 태그를 갖는다. 가장 높은 GCC 발현에 대해 선택된 클론은 293-GCC#2, HT29-GCC#2 및 HT29-GCC#5였다. HT29-GCC#2는 또한 항-GCC 항체 분자를 생성시키기 위한 면역원으로 사용하였다. 추가 GCC 발현 세포는 CT26 세포이다. GCC 발현 CT26 세포주를 개발하기 위해, pTOK58D 벡터를 사용하였다. 전장 GCC를 중쇄 클로닝에 보통 이용되는 부위에 클로닝시키고, 루시퍼라제를 경쇄 클로닝에 보통 이용되는 부위에 클로닝시켰다. CT26 세포로의 트랜스펙션 후, GCC 및 루시퍼라제 둘 모두의 독립적 발현이 확인되었다. GCC의 표면 발현을 5F9 항체를 이용한 유세포측정으로 확인하였다. 클론 #32를 추가 연구를 위해 선택하였다.
- [0616] T84 결장암 세포주는 GCC를 내생적으로 발현한다. 광범위한 세포주 패널에서의 GCC의 Taqman 분석은 T84가 GCC에 대한 mRNA를 발현하는 유일한 세포주인 것을 나타내었다. T84 세포의 세포 펠렛에서의 GCC 선택적 mAb를 이용한 GCC에 대한 염색은 유의한 GCC 단백질 발현을 나타내었다.
- [0617] 방사선 표지된 리간드(ST-독소)를 이용한 GCC 수용체 수준의 정량은 293-GCC#2 세포가 T84 세포보다 많은 GCC를 발현한 반면, HT29-GCC#2 또는 #5는 세포당 가장 적은 GCC 분자를 발현한 것을 나타내었다.
- [0618] **세포주전체 세포 결합 검정(수용체/세포)**
- [0619] HT-29-GCC#2/#5 100,000
- [0620] T84 내생 GCC 300,000
- [0621] 293-GCC 600,000
- [0622] **단백질 면역화에 의해 류린 mAb의 생성:** 인간 GCC 세포의 도메인/인간 Ig 융합 단백질(TOK107-hIg, 50 μ g)을 돌베코(Dulbecco) 인산염 완충 염수(PBS; GIBCO, Grand Island, NY)에 현탁시키고, 동등량의 완전 프로인트 애주번트(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)로 유화시켰다. C57BL/6 마우스를 세 피하 부위 및 하나의 복막내(i.p.) 부위에서의 에멀전의 주사에 의해 면역화시켰다. 최초 면역화 2주 후, 마우스에 불완전 프로인트 애주번트 중의 25 μ g TOK107-hIg를 이용하여 복막내로 부스터 면역화를 제공하였다. 1주 후, 소량의 혈액을 꼬리 정맥으로부터 수거하고, TOK107-Ig에 대한 혈청 결합 활성을 ELISA에 의해 측정하였다. 마우스를, 이의 역가가 ELISA에 의해 1:24,300을 초과하거나, FACS에 의해 1:500을 초과하는 경우에 융합체에 대해 선택하였다. 선택된 마우스를 PBS 중의 25 μ g TOK107-hIg의 주사로 부스팅(boosting)시켰다. 4일 후, 한 마리의 마우스를 안락

사시키고, 비장 세포 현탁액을 제조하고, P3 세포와의 융합을 위해 PBS로 세척하였다. 1개월 후, 또 다른 마우스로부터의 비장 세포를 P3 세포와의 융합을 위해 제조하였다. 융합된 세포를 비GCC 항원 또는 IgG의 Fc 영역에 비한 TOK107-hIg로의 결합에 대해 ELISA에 의해, 그리고 벡터 대조군 및 비-GCC-발현 MCF-7 세포에 비한 T84 세포, 또는 Caco-2 세포 또는 HT-29 클론 #2 세포로의 결합에 대해 FACS에 의해 GCC로 특이적으로 결합되는 항체의 생성을 시험하였다. ISOSTRIP® 마우스 모노클로날 항체 아이소타이핑(isotyping) 키트(Roche Diagnostics Mannheim Germany)를 이용하여 아이소형을 결정하였다. 이러한 면역화 계획 및 하이브리도마 융합체는 1D3, 8E12, 3G1 및 10B8 무린 항-GCC 항체 분자를 생성시켰다.

[0623] **인간 mAb의 생성.** 유전 공학적으로 만들어진 마우스인 제노마우스(XENOMOUSE)(Abgenix, Fremont, CA)(8 내지 10주령)를 인간 모노클로날 항체의 생성을 위해 면역화시켰다. 문헌[Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998)]을 참조하라. 여러 면역화 계획을 이용하였다. 한 계획에서, 100 마이크로그램의 인간 GC-C 세포의 도메인/인간 Ig 융합 단백질(TOK107-hIg)을 둘베코 인산염 완충 염수(PBS; GIBCO, Grand Island, NY)에 현탁시키고, 동등량의 완전 프로인트 애쥬번트(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)로 유화시켰다. 꼬리를 기반으로 세 피하 부위 및 하나의 복막내(i.p.) 부위에 에멀전을 주사하여 제노마우스(XENOMOUSE™)를 면역화시켰다. 최초 면역화 14일 후, 마우스에 불완전 프로인트 애쥬번트 중의 50 µg TOK107-hIg를 이용한 부스터 면역화를 제공하였다. 혈청 시험은 수주의 휴지 후에 불충분한 역가를 나타내었고, 50 µg 인간 TOK107-hIg의 두번째 부스터를 제공하였다. 2주 후, 소량의 혈액을 꼬리 정맥으로부터 수집하고, TOK107-Ig에 대한 혈청 활성을 ELISA에 의해 적정하고, HT29-GCC#2 세포에 대한 혈청 활성을 FACS에 의해 적정하였다. 마우스의 역가가 ELISA에 의해 1:24,300을 초과하거나, FACS에 의해 1:500을 초과하는 경우에 융합에 대해 마우스를 선택하였다. 부스트 후 거의 3개월 후, 마우스를 불완전 프로인트 애쥬번트 중의 10⁷ HT-29 #2 세포를 이용하여 부스팅시키고, 다음날 불완전 프로인트 애쥬번트 중의 50 µg TOK107-hIg를 이용하여 부스팅시켰다. 상기 계획을 이용하여 면역화된 마우스는 5F9 및 1D2 인간 항-GCC 항체 분자를 생성하였다.

[0624] 4일 후, 마우스를 안락사시키고, 비장 세포 현탁액을 제조하고, 융합을 위해 PBS로 세척하였다. 융합된 세포를 비GCC 항원 또는 IgG의 Fc 영역에 비한 TOK107-hIg로의 결합에 대해 ELISA에 의해, 그리고 벡터 대조군 및 비-GCC-발현 MCF-7 세포에 비한 T84 세포 또는 HT-29 클론 #2 세포로의 결합에 대해 FACS에 의해 GCC로 특이적으로 결합되는 항체의 생성을 시험하였다. IgG 또는 IgM 특이적 이차 항체를 이용한 ELISA 또는 FACS에 의해 아이소형을 결정하였다. 이러한 계획으로 면역화된 마우스는 5F9 및 1D2 인간 항-GCC 항체 분자를 생성시켰다.

[0625] 또 다른 계획에서, pkTOK111 벡터를 포함하고, 표면에서 GCC 세포의 도메인을 발현하는 CHO-GCC#27 세포(5 x 10⁶)를 BIP(꼬리 + 복막내 기반) 면역화 사이에 2주 동안 2회로 면역원으로 사용하였다. TOK107-hIg에 대한 ELISA에 의한 항-GCC 반응성을 확인하기 위해 혈액을 수집한 후, 마우스를 HT-29 GCC #2 세포로 부스팅(첫번째 부스트 3주 후 또는 2개월 이상 후)시켰다. 마지막 부스트 4일 후, 세포 융합을 위해 각각의 비장을 수거하였다. 융합된 세포를 비GCC 항원 또는 IgG의 Fc 영역에 비한 TOK107-hIg로의 결합에 대해 ELISA에 의해, 그리고 벡터 대조군에 비한 HT-29 클론 #2 세포, T84 세포 또는 비-GCC-발현 MCF-7 세포로의 결합에 대해 FACS에 의해 GCC로 특이적으로 결합되는 항체의 생성을 시험하였다. 아이소형을 ELISA를 이용하여 결정하였다. 이러한 면역화 계획 및 하이브리도마 융합체는 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3 및 1C9 인간 항-GCC 항체 분자를 생성시켰다.

[0626] **인간 mAb를 생성하는 하이브리도마:** 비장 세포를 계수하고, 2:1의 비장:골수종 비에서 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린을 분리할 수 없는 SP 2/0 골수종 세포(ATCC No. CRL8-006, Rockville, MD)와 혼합하였다. 세포를 표준 절차에 따라 HAT 선택 배지에서 12개의 96-웰 조직 배양 플레이트에서 폴리에틸렌 글리콜 1450(ATCC)과 융합시켰다. 융합 10 내지 21일 후, 하이브리도마 콜로니가 보이게 되었고, 배양 상층액을 수거한 후, ELISA 및 FACS에 의해 스크리닝하였다.

[0627] **SLAM 기술 기반의 항체 생성:** 아브게닉스(Abgenix)의 SLAM 기술(Babcock et al PNAS 93:7843-7848 (1996))에 의해 모노클로날 항체를 또한 분리시켰다. 이러한 방법에서의 최초 단계는 하기 기재되는 계획 중 한 계획에 의해 GCC 항원으로 면역화된 제노마우스(XENOMOUSE) 마우스를 면역화시키는 것이었다. 이후, SLAM(선택된 림프구 항체 방법) 단계는 먼저 큰 집단의 림프계세포 내에서 요망되는 특이성 또는 기능을 갖는 항체를 생성시키는 단일 림프구를 확인하는 단계, 및 상기 림프구로부터 항체의 특이성을 엔코딩하는 유전 정보를 구하는 단계를 포함한다. 이러한 림프구(IgG2 또는 IgG4 항체를 처음 생성함)의 가변 영역이 증폭되고, IgG1 아이소형을 갖는

백터로 옮겨진다.

- [0628] SLAM 항체(예를 들어, Abx-229, -012, -221, -020, -338, -106, -198 또는 -393)에 대한 면역화 설계는 TOK-hIg 또는 키펀 림프 헤토시아닌에 컨쥬게이션된 TOK-hIg를 이용하는 것을 포함하였다. 면역화는 풋 패드(foot pad) 또는 꼬리 및 복막내 기반의 조합을 통해 이루어졌다. 10 μ g 면역원의 최초 면역화는 TITERMAX® 골드 애쥬번트 또는 완전 프로인트 애쥬번트를 포함하였다. 백반, TITERMAX® 골드 애쥬번트 또는 불완전 프로인트 애쥬번트를 이용하여 5 μ g의 면역원으로 6 내지 8회로 부스트를 수행하였다. TITERMAX 골드가 최초 애쥬번트인 경우, 백반이 부스트 애쥬번트이며, 부스트를 3 내지 4일 간격으로 수행하였다. 최초 면역화 및 부스트가 완전 프로인트 애쥬번트, 이후 불완전 프로인트 애쥬번트를 이용하는 경우, 부스트 사이의 간격은 약 2주 간격으로 수행하였다. 때때로, 4 내지 6번째 부스트에서의 역가의 혈청 시험 후에 추가 부스트를 수행하였다. 수거하기 4일 전의 최종 부스트는 PBS 중 면역원을 이용하였다.
- [0629] **ELISA에 의한 mAb의 분석.** 높은-단백질 결합 96-웰 EIA 플레이트(Costar/Corning, Inc. Corning, NY)를 50 μ l/웰의 2 μ g/ml 용액(0.1 μ g/웰)의 TOK107-hIg로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 과량의 용액을 흡출시키고, 플레이트를 PBS/0.05% Tween-20로 세척(3회)한 후, 실온(RT)에서 1시간 동안 1% 우혈청 알부민(BSA, fraction V, Sigma Chemical Co., MO)으로 블로킹시켜, 비특이적 결합을 억제시켰다. BSA 용액을 제거하고, 각각의 용합 플레이트 웰로부터의 50 μ l/웰의 하이브리도마 상층액을 첨가하였다. 이후, 플레이트를 37°C에서 45분 동안 인큐베이션시키고, PBS/0.05% Tween-20으로 3회 세척하였다. 1% BSA/PBS 중에 1:4000으로 희석된 호스라다쉬 퍼옥시다제(HRP)-컨쥬게이션된 염소 항-마우스 또는 항-인간 IgG F(ab)2(H&L)(Jackson Research Laboratories, Inc., West Grove, PA)를 각각의 웰에 첨가한 후, 플레이트를 37°C에서 45분 동안 인큐베이션시켰다. 세척 후, 50 μ l/웰의 ABTS 용액(Zymed, South San Francisco, CA)을 첨가하였다. 405 nm에서의 양성 웰의 녹색의 강도를 Vmax 미세역가 플레이트 판독기(Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA)에서 평가하였다. 이후, 양성 반응을 발생시키는 모든 하이브리도마 웰을 24-웰 배양으로 확장시키고, 제한 희석에 의해 서브클로닝시키고, ELISA 및 FACS에 의해 분석하였다. 3개의 최적 생성 서브클론을 추가로 확장시켰다.
- [0630] **유세포측정에 의한 mAb의 분석.** 유세포측정(FACS) 스크리닝을 ELISA 스크리닝과 함께 모든 용합 플레이트 상층액에서 수행하였다. HT-29 클론 #2 또는 트랜스펙션되지 않은 HT-29 세포를 10% 우태아 혈청(GIBCO)이 보충된 DMEM(GIBCO) 중에서 T225 플라스크(Costar/Corning, Inc., Corning, NY) 중에서 성장시켰다. 세포를 베르센(Versene)(GIBCO)을 이용하여 플라스크 표면으로부터 분리시키고, 이를 수거하고, DMEM으로 2회 세척한 후, 1% BSA/PBS 용액으로 1회 세척하였다. 세포를 1% BSA/PBS에 재현탁시키고, 2×10^6 세포를 V-바닥 96-웰 플레이트(Costar)의 각각의 웰에 첨가하고, 2500 RPM에서 5분 동안 원심분리(세척)하였다. 세척 용액을 폐기하고, 각각의 용합 플레이트 웰로부터의 50 μ l/웰의 상층액을 첨가하였다. 플레이트 밀봉기(Linbro/MP Biomedicals, LLC, Solon, OH)를 적용한 후, 플레이트를 가법계 진탕시켜 세포와 상층액을 재현 및 혼합시키고, 30분 동안 4°C(얼음 상)에서 인큐베이션시켰다. 이후, 플레이트를 저온 1% BSA/PBS로 세척(3회)하고, 1:50으로 희석된 50 μ l/웰의 FITC-컨쥬게이션된 당나귀 항-마우스 IgG F(ab)2(H&L) 또는 FITC-컨쥬게이션된 염소 항-인간 IgG F(ab)2(H&L)(Jackson)를 4°C(어두운 곳의 얼음 상)에서 30분 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 다시 저온 1% BSA/PBS에서 3회 세척하고, 저온 1% 파라포름알데히드(Sigma)/PBS 중에서 고정시켰다. 세포를 클러스터 튜브(cluster tube)(Costar)로 옮기고, FACScalibur 유세포측정기(Becton Dickinson, San Jose, CA)에서 분석하였다. 이후, 양성 전환을 나타내는 임의의 하이브리도마 웰을 24-웰 배양으로 확장시키고, 제한 희석에 의해 서브클로닝시켰다.
- [0631] **내재화 검정.** 항-GCC 항체 분자의 내재화를 면역형광 현미경검사를 이용하여 GCC 발현 세포 및 백터 대조군 세포 둘 모두에서 시험하였다. 세포를 덮개 유리에서 성장시키고, 10분 동안 얼음에 둔 후, 얼음 상에서 20분 동안 저온 배지 중에서 10 μ g/ml 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 내재화를 위해, 항체 함유 배지를 새로운 배지로 대체하고, 세포를 2-3시간 동안 37°C로 전환시키거나, 얼음 상에서 유지시켰다. PBS에서의 행균 및 실온에서의 4% 파라포름알데히드에서의 간단한 고정 후, 세포를 0/5% TRITON X-100 중에서 15분 동안 투과화시켰다. 시험 항체의 국소화를 레이저 스캐닝 공초점 현미경검사에 의해 형광 표지된 항-IgG 항체를 이용하여 결정하였다. 항체 분자는 얼음 상에 존재하는 경우 GCC-발현 세포의 세포 표면에 국소화되었다. 37°C에서의 인큐베이션시, 5F9는 내재화를 나타내는 세포막 내의 점상 착색을 나타내었다. 백터 세포를 이용해서는 내재화가 검출되지 않았다.
- [0632] **항-GCC 항체 분자 특성의 요약.** 본원에서 생성된 항체 대부분을 상기 기재된 다수의 검정으로 시험하였다. 표 7에는 각각에 대한 시험관내 특성이 요약되어 있다(T84=인간 결장 종양 세포, MCF7=인간 유방 종양 세포, WB=웨

스텐 블롯, IP=면역침강, IHC=면역조직화학; 내재화는 MCF-7 세포에 비해 T84 세포를 사용하였다).

표 7. 항-GCC 항체 분자의 특성

Ab	ELISA		FACS							
	TOK1 07-hIg	TOK8 2-hIg	HT- 29#2	HT- 29	T84	MCF7	WB	IP	IHC	내재화
8F1	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+		+	
3G1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10B8	+	-	+	-	+	-	-	+	+	
5H3	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
6H8	+	-	+	-	+	-	-	+		+
8C2	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10C10	-	-	+	-	+	-	-	+		
10D3	+	-	+	-	+	-	+	+		
1D2	+	-	+	-	+	-	-	+		
4A12	+	-	+	-	+	-	-	+		
5F9	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1C9	+	-	+	-	+	-	-	+		
Abx-012	+		+				-	+	+	+
Abx-015	+		-				+	+		
Abx-020	+		+				-	+		+
Abx-106	+		+					+		-
Abx-198	+		+					+		+
Abx-221	+		+					+		+

Abx-229	+		+					+		+
Abx-252	+		+					+		+
Abx-338	+		+					+		+
Abx-393	+		+					-		+

또한, 일부 항체를 GCC-발현 세포에서 ST 펩티드-유도 칼슘 이온 유출을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. cGMP 검정을 항-GCC 항체 분자의 존재 또는 부재하에서 50 nM ST의 존재하에서 HT29-GCC#18 세포에서 수행하였다. 5F9에 의해 칼슘 이온 유출의 용량 의존적 억제가 있었다. 다른 항체 5H3 및 Abx-338이 또한 ST에 의해 유도된 칼슘 이온 유출을 억제하였다.

항-GCC 항체 분자의 상대적 친화성의 평가. 일부 항-GCC 항체 분자의 상대적 친화성(EC50; 최대 절반 결합(half maximal binding)에 대한 항체 농도)을 TOK107-hIg에 대한 ELISA 측정 및 GCC-발현 세포를 이용한 FACS 측정으로부터 평가하였다. 하기 표는 일부 결과를 나타낸다.

표 8. 항-GCC 항체 분자의 EC50

항체	EC50, TOK107-hIg, M	EC50, 세포, M
5F9	3.65×10^{-8}	1.24×10^{-9}
5H3	4.16×10^{-9}	4.7×10^{-7}
Abx-338	4.9×10^{-12}	9.0×10^{-8}
3G1	2.28×10^{-8}	5.8×10^{-10}
Abx-229	2.95×10^{-8}	
Abx-221	6.55×10^{-9}	
Abx-020	4.58×10^{-9}	
Abx-012	5.55×10^{-10}	
Abx-198	4.77×10^{-8}	

항-GCC 항체 분자의 친화성의 측정. BIACORE™ T100 시스템(GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 22℃에서 항-GCC 5F9 항체의 친화성을 측정하는데 사용하였다.

단계 1: MAb 5F9(Prep A)를 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.0 중에서 20 µg/mL로 희석시키고, 참조 5F9 MAb(Prep B)를 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.0 중에서 10 µg/mL로 희석시켰다. 각각의 mAb를 표준 아민 커플링을 이용하여 여러 CM4 BIACORE 칩에 공유적으로 고정시켰다. 제조된 각각의 CM4 칩에 대해, Prep A 5F9를 약 75-100 RU에서 두 유세포 상에 고정시킨 반면, Prep B 5F9를 약 70-80 RU에서 한 유세포에 고정시켰다. 각각의 CM4 칩의 나머지 네번째 유세포를 참조 유세포로 사용하였다.

단계 2: GCC-ECD-Fc(TOK107-hIg)의 스톡(stock) 농도를 문헌[Pace et al. in *Protein Science*, 4:2411 (1995)], 및 문헌[Pace and Grimsley in *Current Protocols in Protein Science* 3.1.1-3.1.9 (2003)]에 상술된 방법을 이용하여 결정하였다.

단계 3: 단계 1에 기재된 각각의 제조된 CM4 칩에 대해, GCC-ECD-Fc를 202 nM - 1.6 nM(2x 연속 희석)의 농도 범위에서 2분 동안 주입한 후, 7분간 해리시켰다. 샘플을 이중 참조를 위해 삽입된 여러 완충액 주입 주기를 이용하여 삼중으로 무작위로 주입하였다. 보다 유의한 분리속도 감쇠 데이터를 취득하기 위해, 3개의 추가 101 nM GCC-ECD-Fc 주입 및 3개의 추가 완충액 주입을 2분의 주입 및 4시간의 해리 시간으로 수행하였다. 모든 실험에 대해 100 µl/분의 유속을 사용하였고, 모든 표면을 10mM 글리신-HCl(pH 2.0)의 20초 펄스를 이용하여 재생시켰다. 모든 샘플을 HEPES-완충 염수인 런닝(running) 완충액에서 제조하였고, 100 µg/mL의 BSA를 갖는 0.005% 폴리소르베이트 20, pH 7.4(HBS-P)를 첨가하였다.

단계 4: 모든 센소그램(sensorgram)(표면 플라즈몬 공명 대 시간의 플롯) 데이터를 스크러버(Scrubber) 2.0 소프트웨어(BioLogic Software, Campbell, Australia)를 이용하여 처리하고, CLAMP™ 소프트웨어(Myszka and Morton *Trends Biochem. Sci.* 23:149-150 (1998))를 이용하여 물질 전달 상수 k_m 에 대한 항을 포함하는 1:1 상호작용 모델에 전반적으로 적합화시켰다.

상기 1:1 모델은 센소그램 데이터의 전반적 분석으로부터 발생하는 R_{max} 가 각 표면에 대해 적어도 12 RU 아래가 되도록 mAb 고정 수준이 충분히 낮게 유지되는 한 데이터에 대해 매우 우수한 적합도를 제공하였다. 대부분의 경우, 2개의 Prep A 5F9 표면 중 하나는 확실한 동역학 측정에 대해 너무 낮은(2 RU 아래) R_{max} 를 가졌다. 그러나, 언제든지 가능한 경우, 동일 CM4 칩으로부터의 Prep A 5F9로의 GCC-ECD-Fc 결합의 2개의 유세포로부터의 데이터를 동시에 적합화시켰다. mAb 표면이 보다 높은 R_{max} (> 12 RU)를 발생시키도록 제조하는 경우, 센소그램은 복잡한 동역학을 명백히 나타내었고, 따라서 1:1 모델은 데이터를 불량하게 적합화된다. 이는 GCC-ECD-Fc가 2가 작제물이고, 고정된 mAb의 높은 표면 밀도가 GCC-ECD-Fc가 표면에 강하게 결합할 가능성을 증가시킬 가능성이 높다는 사실로 인해 놀라운 것이 아니다. 이러한 연구에 대해 보고된 반복(Replicate)은 1:1 상호작용 모델에 대해 잘 적합된 데이터만을 포함한다. Prep A 5F9 및 Prep B 참조 mAb에 대한 모든 반복의 발생된 K_D 및 속도 상수는 각각 하기 표 9 및 10에 제시되어 있다.

[0646] 표 9: 고정된 Prep A 5F9 mAb로의 GCC-Fc 결합

반복	R _{max} (RU)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (pM)
A	11	1.06 X 10 ⁵	1.19 X 10 ⁻⁵	112
B	8	1.20 X 10 ⁵	1.10 X 10 ⁻⁵	91.7
C	5	1.07 X 10 ⁵	2.15 X 10 ⁻⁵	201
D	9	1.22 X 10 ⁵	1.11 X 10 ⁻⁵	91.0
E	6,4	9.64 X 10 ⁴	1.77 X 10 ⁻⁵	184
평균(95% 신뢰구간)		1.10 (0.13) X 10 ⁵	1.46 (0.59) X 10 ⁻⁵	136 (65)

[0647]

[0648] 표 10: 고정된 Prep B 5F9 mAb로의 GCC-Fc 결합

반복	R _{max} (RU)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (pM)
F	9	9.68 X 10 ⁴	7.64 X 10 ⁻⁶	78.9
G	8	1.20 X 10 ⁵	1.24 X 10 ⁻⁵	103
H	7	9.09 X 10 ⁴	9.57 X 10 ⁻⁶	105
I	12	1.21 X 10 ⁵	1.54 X 10 ⁻⁵	127
Avg. (95% Conf. Int.)		1.07 (0.25) X 10 ⁵	1.13 (0.54) X 10 ⁻⁵	103 (31)

[0649]

[0650] 항체로의 독소의 컨쥬게이션

[0651] **마이탄신.** 마우스 항-인간 (MAH)-IgG-DM1, 및 항-GCC-DM1을 미국 특허 제 6,441,163호에 기재된 바와 같은 마이탄시노이드의 세포독성 컨쥬게이트의 생성을 위한 1-단계 방법에 따라 생성시켰다.

[0652] 간단히, 마이탄시노이드를 공개된 절차를 이용하여 항체에 컨쥬게이션시켰다. DM1을 SMCC 헤테로이작용성 가교제 (숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트를 이용하여 항체에 컨쥬게이션시켰다(Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992)). DM4를 SPDB 헤테로이작용성 가교제를 이용하여 항체에 컨쥬게이션시켰다(Widdison et al. *J. Med. Chem.* 49:4392-4408 (2006)). 컨쥬게이션된 항체는 SEPHADEX™ G-25 컬럼을 이용하여 겔 여과 크로마토그래피에 의해 원치않는 반응 부산물로부터 분리된다.

[0653] **아우리스타틴.** 아우리스타틴에 의한 컨쥬게이션은 공개된 절차를 이용하여 수행될 수 있다(예를 들어, Doronina et al., *Nature Biotech.*, 21: 778-784 (2003)). 일반적으로, 아우리스타틴은 항체 사슬의 시스테인에 연결된다. 시스테인으로의 연결은 먼저 항체 분자에서의 이황화 결합의 감소에 의해 달성된다. 감소 과정의 조절은 일부이나 반드시 전부는 아닌 인터체인 이황화 결합의 감소를 제한하고자 하는 것이다. 결과로서, 아우리스타틴은 자유 시스테인에서 결합할 수 있다. 컨쥬게이션 반응의 쉼팅 후, 반응 부산물이 제거되고, 요망되는 제형으로 완충액이 교환된다.

[0654] 간단히, 7.6 mg/mL의 항-GCC 항체 분자는 37°C에서 예비-평형화된 후, 15% 부피의 500 mM 붕산나트륨, pH 8.0 이 첨가되어, 7.5-8.0으로 pH가 상승된다. 용액은 또한 1 mM DTPA를 함유한다. 항체는 항-GCC 항체 분자의 몰(mole) 당 2.6 당량의 트리(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)을 첨가하고, 37°C에서 교반함으로써 부분적으로 감소된다. 28분 후, 감소된 항-GCC 항체 분자의 용액이 얼음 상에 놓여진 후, 4.8-4.9 몰당량(항-GCC 항체 분자에 비함)의 약물 링커(예를 들어, mc-vc-MMAF 또는 mc-vc-MMAE 또는 mc-MMAF)가 DMSO 중의 20.5 mM 용액으로서 즉시 처리된다. 추가 DMSO가 도입되어, 혼합물이 10 부피% DMSO가 된다. 반응 혼합물은 ~90분 동안 얼음 상에서 교반되고, 5배 몰 과량의 N-아세틸 시스테인(mc-vc-MMAF에 비함)이 처리된다. 컨쥬게이트는 접선 유동 여과(tangential flow filtration)에 의해 분리되고, 먼저 ~10 mg/mL로 농축된 후, ~10 정용부피(diavolume)의 PBS로 정용여과된다. 생성된 항체 약물 컨쥬게이트는 항체 당 약 4개의 약물-링커 단위의 평균 약물 로딩을 갖는다. 편의를 위해, 하기 실시예 및 첨부되는 도면에서, 아우리스타틴 면역컨쥬게이트는 약물 로딩에 상관 없이

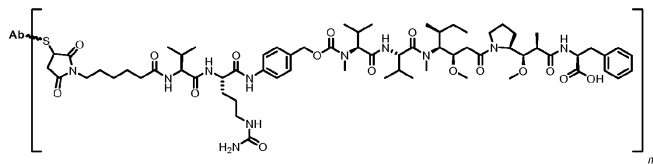
하기 약어화된 형식으로 언급된다: "Ab-vc-MMAF"는 mc-vc-MMAF로 컨쥬게이션된 항-GCC 항체 분자를 의미하고; "Ab-vc-MMAE"는 mc-vc-MMAE로 컨쥬게이션된 항-GCC 항체 분자를 의미하고; "Ab-mc-MMAF"는 mc-MMAF로 컨쥬게이션된 항-GCC 항체 분자를 의미한다. 특정 항-GCC 항체 분자를 포함하는 면역컨쥬게이트는 동일 형식, 예를 들어, 5F9-vc-MMAF, 5F9-vc-MMAE, 및 5F9-mc-MMAF로 언급된다.

[0655] 항체 당 약 2개의 약물-링커 단위의 평균 약물 로딩을 갖는 항체 약물 컨쥬게이트를 제조하기 위해, TCEP의 양을 50%까지 감소시킴으로써 상기 프로토콜(상기)이 변형된다. 약물 링커의 양이 또한 50%까지 감소된다. 해당 항체 약물 컨쥬게이트는 Ab-vc-MMAF(2)로 약어화된다.

[0656] 5F9 vcMMAE의 제조

[0657] 상기 기재된 일반 방법과 유사한 방법을 이용하여, 5F9 mAb를 본원에 기재된 vc (Val-Cit) 링커를 이용하여 MMAE로 명명된 아우리스타틴 유도체(화학식 (XIII))에 컨쥬게이션시켜, 5F9 vcMMAE로 명명된 면역컨쥬게이트를 생성시켰다. MMAE(Seattle Genetics, Inc., Bothell, WA)로의 vc 링커의 컨쥬게이션을 상기 이전에 기재된 바와 같이 완료시켰다(예를 들어, US 2006/0074008 참조).

[0658] 간단히, 100 mM 아세트이트 pH 5.8 중의 5F9 mAb의 17.8 mg/mL 용액을 0.3 M 제2인산나트륨을 이용하여 pH8로 조정하여, 11.3 mg/ml의 최종 mAb 농도를 발생시켰다. 이후, DTPA를 반응 혼합물 중에서 1 mM 최종 농도가 되도록 첨가하였다. mAb를 2.28 몰당량의 TCEP(mAb의 몰에 비함)를 첨가함으로써 부분적으로 감소시킨 후, 1.5시간 동안 37°C에서 교반하였다. 이후, 부분적으로 감소된 mAb 용액을 4°C로 냉각시키고, 4.4 몰당량의 vcMMAE (항체의 몰에 비함)를 DMSO 중의 20.3 mM 용액으로서 첨가하였다. 혼합물을 22°C에서 30분 동안 교반한 후, 5 몰당량의 N-아세틸시스테인(vcMMAE의 몰에 비함)의 첨가 후에 추가 15분 동안 교반하였다. 과량의 켄칭된 vcMMAE 및 다른 반응 성분을 10 정용부피의 PBS, pH 7.4를 이용한 면역컨쥬게이트의 초여과/정용여과에 의해 제거하였다. 생성된 면역컨쥬게이트를 5F9 vcMMAE로 명명하였고, 이는 하기 화학식을 갖는다:



[0659]

[0660] 상기 식에서, Ab는 5F9 mAb이고, m 은 1 내지 8이다. 평균 약물 로딩(m)은 약 3.6이었다.

[0661] **세포독성 검정.** 표적 발현 세포에 결합하고, 이를 내재화시키고, 사멸시키는 각각의 항체의 능력을 측정하기 위해, 세포독성 검정을 수행하였다. 이러한 검정에서, 세포를 다양한 농도의 컨쥬게이션되지 않은 일차 항-GCC 항체 및 고정된 비-독성 농도의 DM1-컨쥬게이션된 항-인간 Fc 이차 항체 (간접 세포독성) 또는 다양한 농도의 독소 컨쥬게이션된 항-GCC mAb (직접 세포독성)와 함께 인큐베이션하였다. 세포 생활력을 인큐베이션 4일 후에 WST 검정으로 측정하였다. 293-GCC#2 세포에서의 인간 항-GCC 항체의 상대 역가는 표 8에 제시되어 있으며, 이는 DM1 컨쥬게이션된 마우스 항-인간 IgG mAb를 이용하여 결정하였다(MAH-IgG를 클론 HP607(CRL1753, ATCC)로부터 정제하였다). 5F9 및 229는 26 및 78 pM의 LD50을 갖는 가장 효능 있는 항-GCC mAb이다. 여기서 나타내지는 않았지만, 반복 범위 또는 > 2 반복의 표준 편차에 의해 측정시 오차는 일반적으로 상기 평균의 20% 이내이다.

[0662] 표 11. 293-GCC#2 세포에서의 항-GCC 항체에 대한 세포독성 검정 결과

항 -GCC Ab	LD50 (pM)
5F9	26
229	78
106	166

[0663]

221	207
338	267
12	279
20	569
5H3	722
10D3	1596
8C2	2038
10C10	2443
1D2	>3055
6H8	>4818
393	>5400
198	>5400

[0664]

[0665]

세포 표면 결합. 컨쥬게이션되지 않은 5F9 또는 아우리스타틴에 컨쥬게이션된 5F9의 결합을 유세포측정을 이용한 간접 면역형광 검정으로 평가하였다. 1×10^6 세포/웰을 V-바닥 96 웰 플레이트에 플레이팅하고, 1-0.001 $\mu\text{g/ml}$ 의 연속 항체 희석액과 함께 1시간 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 세포를 얼음 냉각 PBS 중의 3% FBS로 2회 세척하고, 얼음 상에서 1시간 동안 1:200 마우스 항-인간 PE IgG(Southern Biotech 2043-09)와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 다시 세척하고, BD FACS Canto II 유세포측정기에서의 유세포측정에 의해 분석하였다. 데이터를 FACS Canto II 시스템 소프트웨어를 이용하여 분석하고, 평균 형광 강도를 결정하였다.

[0666]

에피토프 맵핑(mapping). 에피토프를 확인하기 위해 다수의 방법을 개시하였다. 펩티드 어레이. GCC의 세포외 도메인(ECD)에서 막횡단 도메인까지 포함하는(aa 1-440), 15 aa 중첩을 갖는 20-머 펩티드를 생성시켰다. 펩티드를 합성하고, 어레이에 제공하고, 유리 슬라이드 상에 고정시켰다. 어레이를 항-GCC 항체 각각과 하이브리드 화시켜, 선형 펩티드가 결합에 대해 충분한지 결정하였다. Abx-198은 펩티드 55 및 56에 결합한 반면, 3G1, 8F1 및 10B8 항체는 펩티드 55, 56 및 57에 결합하였다. 서열, ILVDLFNDQYLEDNVTAPDYMKNVLVLTLS(SEQ ID NO:225)는 상기 펩티드에 의해 스패닝된다. 펩티드에서의 중첩의 영역은 LEDNVTAPDY(SEQ ID NO:314)이다. Abx-012, Abx-338 및 Abx-106은 펩티드 71 및 72에 결합하였다. 서열, FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV(SEQ ID NO:226), 및 서열 RNLTFEGYDGPVTL(SEQ ID NO:315)은 두 펩티드와 중첩한다.

[0667]

GCC 트렁케이션 돌연변이로 세포 표면 결합.

[0668]

GCC ECD의 트렁케이션 돌연변이를 FLAG 태깅된 작제물(pFLAG-CMV-3)로서 생성시켰고(FL 성숙 펩티드 및 8 트렁케이션($\Delta 1-32$, $\Delta 1-49$, $\Delta 1-94$, $\Delta 1-128$, $\Delta 1-177$, $\Delta 1-226$, $\Delta 1-279$, $\Delta 1-229$ 및 $\Delta 1-379$)), 이는 약 50 aa 결실 증분(increment)을 나타낸다. 작제물을 293 세포에서 발현시킨 후, 항-GCC 항체 분자에 의해 면역침강시켰고, GCC ECD 돌연변이로 트랜스펙션된 293 세포의 용해질에서의 FLAG 에피토프에 대해 웨스턴 블로팅을 하였다. 항체 5F9는 $\Delta 1-32$ 돌연변이를 갖는 세포에 결합하나, $\Delta 1-49$ 돌연변이를 갖는 세포에는 결합하지 않는다. 단백질이 aa 33-50 사이에서 트렁케이션되는 경우에 GCC로의 5F9의 결합이 상실되었고, 이는 상기 영역이 GCC 상의 결합 에피토프에 대한 5F9의 인지와 관련이 있는 것을 암시한다. 그러나, 래트 및 마우스 GCC 서열은 상기 영역에서 인간 GCC와 동일하므로, 5F9는 마우스 또는 래트 GCC에 결합하지 않으며, 5F9 항체는 인간 GCC의 아미노산 33 내지 50의 존재에 의해 형성되는 입체형태적 에피토프에 결합할 가능성이 크다.

[0669]

실시예 2. 독소-링커 선택 / ADC 특성규명

[0670]

항체 약물 컨쥬게이트(ADC) 방법에서, 항체로의 매우 효능 있는 독소의 컨쥬게이션, 독소의 세포독성은 정상 조직에서 항원 음성 세포에 영향을 미치지 않고 항원 발현 종양 세포로 독소를 전달함으로써 전신 독성을 감소시키는 표적 특이적 방식으로 종양에 특정화될 수 있다. 아우리스타틴(돌라스타틴 10의 유사체) 및 마이탄신 부류 독소는 항-GCC mAb를 갖는 ADC로 평가되었다. 이러한 독소는 모두 항-유사분열로서 작용하는 미세소관 중합 반응의 억제제이다. 세포가 자유 독소와 접촉한 시험은, 자유 독소의 세포독성이 GCC 발현을 갖는 세포와 GCC가 없는 대조군 세포를 구별하지 않은 것을 나타내었다. 이러한 자유 독소는 표 9에 제시된 바와 같이 293-백터, 293-GCC#2 세포, HT29-백터 대 HT29-GCC#5 세포에 대해 효능이 있었다.

표 12. 자유 독소의 세포독성

세포주	MMAE		MMAF		DM1		DM4	
	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD
293 벡터	0.07	6	3.37	2.34	2.83	2.00	0.79	0.79
293 GCC#2	4	3	2.07	1.48	2.96	2.23	0.83	1.03
HT29	4	1	5.21	1.91	2.69	1.09	0.57	0.27
HT29 GCC#5	7	4	7.65	3.32	1.00	0.14	0.40	0.17

다양한 독소가 항체에 컨쥬게이션되는 화학작용은 다양하며, 링커 안정성에 영향을 준다. 링커 안정성은 혈액 또는 비표적 조직에서의 약물 방출 대 종양에서의 약물 방출에 영향을 줌으로써 치료 윈도우(window)에 영향을 미친다. 이상적인 ADC 링커는 혈액에서 높은 안정성을 갖지만, 표적 매개 세포 유입 후에는 효과적으로 방출된다.

아우리스타틴

3개의 아우리스타틴-링커 쌍을 평가하였다. 시험관내에서 먼저 상기 컨쥬게이트를 평가한 후, 생체내 연구에서의 대규모를 위한 독소-링커를 결정하기 위해, 5F9를 vcMMAE, vcMMAF 및 mcMMAF에 컨쥬게이션시켰다(컨쥬게이트 당 20mg).

아우리스타틴은 천연 생성물 돌라스타틴 10과 관련된 합성 독소이다. MMAE 및 MMAF는 미묘하게 상이하며, MMAF 형태는 R2 위치에 카복실산기를 가져, 세포 투과성 및 자유 독소로서의 효능이 감소된다. MMAE는 Pgp 약물 펌프 기질인 반면, MMAF는 그렇지 않다.

아우리스타틴은 부분적 항체 감소 과정, 말레이미도 약물 유도체와의 반응, 과량의 시스테인을 이용한 켄칭, 농축 및 PBS로의 완충액 교환을 통해 인터체인에 컨쥬게이션된다. 아우리스타틴은 세포 흡수 후에 분해되는 카텝신 B 민감성 디펩티드 링커, 또는 분해되지 않는 링커를 이용하여 부착될 수 있다.

vc모노메틸아우리스타틴(vcMonoMethylAuristatin)에서, 발린 시트룰린 디펩티드 연결은 p-아미노 벤질 카바메이트(PAB)기를 통해 약물에 부착되고, 말레이미도 카프로일 컨쥬게이션기를 통해 항체에 부착된다. 내재화 후, 디펩티드 링커는 라이소좀 프로테아제 카텝신 B에 의해 분해되고, PAB 기 자체가 파괴되고, 자유 독소가 방출된다. 이러한 링커는 카텝신 B에 의한 세포내 약물 방출을 최대화시키면서 혈청 안정성을 유지시키도록 설계하였다.

아우리스타틴은 또한 펩티드분해효소 민감성 링커를 갖지 않는 말레이미도 컨쥬게이션기에 직접 부착된 MMAF와 같은 분해가능하지 않은 링커를 통해 항체에 연결될 수 있다. MC 컨쥬게이션된 ADC가 또한 표적 매개 세포 사멸에서 효과적이다.

분해가능하지 않은 아우리스타틴 컨쥬게이트에 대한 약물 방출의 메커니즘은 라이소좀에서의 일반적인 항체 분해를 통해 이루어지는 것으로 생각된다. LC/MS 연구를 통해, Ab-mcMMAF 컨쥬게이트가 단일 시스테인-부가물의 형태로 독소를 방출한다.

항체 약물 컨쥬게이트의 결합

5F9 항체 약물 컨쥬게이트 모두는 293-GCC#2 세포에 동등하게 잘 결합하였다. 표 10은 증가하는 농도의 293-GCC#2 세포에서의 5F9 컨쥬게이트의 평균 형광 강도를 나타낸다. 다른 연구에서 5F9-SPDB-DM4 컨쥬게이트가 농도 의존 방식으로 293-GCC#2 세포에 결합하는 반면, 209-SPDB-DM4 항체는 결합하지 않는 것으로 결정되었다.

[0683] 표 13. 293 GCC #2 세포에서의 5F9 및 5F9 컨쥬게이트의 결합 검정으로부터의 MFI의 도표:

	5F9 또는 5F9 컨쥬게이트의 $\mu\text{g/ml}$					
	0.001	0.004	0.016	0.063	0.25	1
5F9	500	937	2465	6615	7816	8026
vcMMAE	445	696	1787	4854	7296	7416
vcMMAF	440	707	1502	4830	7563	7779
mcMMAF	483	776	2106	5353	7398	7585

[0684]

[0685] 5F9-아우리스타틴 독소 컨쥬게이트를 GCC 핵산으로 트랜스펙션되고, GCC의 발현에 대해 선택된 다양한 세포의 직접 세포독성 검정으로 시험하였다. GCC의 표면 발현의 수준의 조사로 293 GCC#2 세포가 많은 양의 GCC를 발현하고; HT 29 #2 및 CT 26 #2.5 세포가 중간 내지 낮은 수준으로 GCC를 발현하고; CT 26 #32 세포가 높은 수준으로 GCC를 발현하고; HT 29 GCC #5 및 HT 29 GCC #18이 적은 양의 GCC를 발현하는 것을 발견하였다. 표 11은 표적을 발현하는 세포, 또는 야생형 세포 또는 벡터 대조군 세포에서 3개의 아우리스타틴 컨쥬게이트에 대한 세포독성 데이터를 발생시키는 다수의 연구의 편집을 나타낸다. 표적 향상 사멸이 293 GCC #2 세포에서의 5F9-컨쥬게이션된 독소의 모든 경우에 관찰되며, MMAE에 비해 MMAF를 이용하는 경우에 윈도우가 크게 증가된다. MMAF의 분해가능 형태 및 분해가 가능하지 않은 형태 둘 모두는 유사하게 효능이 있었다. 음성 대조군으로서, 항체 약물 컨쥬게이트를 또한 GCC에 대해 반응성이 없는 관련되지 않은 표적에 대해 발생된 인간 IgG1 모노클로날 항체인 sc209 항체를 이용하여 제조하였다. 209 ADC 대 5F9 vcMMAF ADC를 이용한 직접 세포독성 검정은 293 세포 모델 및 HT29 세포 모델에서 표적 향상 세포 사멸을 나타내었다. 세포주에서의 5F9-컨쥬게이션된 독소 활성의 비교는 세포독성의 수준이 세포에 의해 발현된 GCC의 양과 일부 상관관계를 갖는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는 대부분의 GCC를 발현하는 일부 또는 전부의 세포주가 적은 양의 GCC를 발현하는 세포에서 보다 컨쥬게이트의 세포독성 활성에 더욱 민감한 것을 암시한다. 세포 당 상대 GCC 수에 대해 실시예 1을 참조하라. 세포독성 수준의 차이에서의 또 다른 요인은 야생형 세포주에서 다양할 수 있는 컨쥬게이트의 내재화 또는 세포내 처리에서의 차이일 수 있다.

[0686] 표 14. 항-GCC 아우리스타틴 ADC의 세포독성

	5F9 컨쥬게이트의 LD 50 (nM)			209 컨쥬게이트의 LD50 (nM)
세포주	vcMMAE	vcMMAF	mcMMAF	
293 벡터	128	> 10	> 10	
293 GCC # 2	0.37	0.001	0.002	
293 벡터	1.8	>10	>10	
293 GCC # 2	0.13	0.005	0.007	

[0687]

293 벡터		>10		>10
293 GCC #2		0.0004		>10
HT 29 WT	84	> 10	> 10	
HT 29 GCC #2	24.1	0.127	3.1	
CT 26 WT	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #2.5	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #32	267	0.004	0.064	
HT 29 벡터	520.6	> 10,000	> 10,000	
HT 29 GCC #5	653.5	563.2	> 10,000	
HT 29 GCC #18	554.6	> 10,000	> 10,000	
HT29	0.93	>10	>10	
HT29 GCC#5	0.59	0.32	>10	
HT29		>10		>10
HT29 GCC#5		0.035		>10

[0688]

[0689]

mc와 vcMMAF 사이에 동등한 효능을 갖는 이러한 역가를 생체내에서 해석하는 경우, mcMMAF에 대한 보다 높은 예측 MTD는 상기 컨쥬게이트에 대해 보다 큰 치료 윈도우를 암시할 것이다.

[0690]

마이탄신

[0691]

5F9-마이탄신 ADC는 293-GCC#2 세포에서의 효능 있는 표적 향상 사멸을 나타내었다(표 12). 흥미롭게도, 5F9-마이탄신 컨쥬게이트 둘 모두는 293 모델에서 표적 향상 사멸을 나타내었으나, HT29 모델에서는 표적 향상 사멸이 관찰되지 않았고, 이는 마이탄신 컨쥬게이트의 생체내 평가를 위한 상기 모델의 유용성에 관한 우려를 발생시켰다. 또한, 상기 차이에 대한 이유는 용이하게 설명할 수 없으나, 다양한 수용체 밀도 및/또는 세포 내의 컨쥬게이트의 내재화 또는 처리에서의 차이로 인한 것일 수 있다. 음성 대조군으로서, 항체 약물 컨쥬게이트를 또한 GCC에 대해 반응성이 없는 관련되지 않은 표적에 대한 인간 IgG1 모노클로날 항체인 sc209 항체를 이용하여 제조하였다. 209 ADC 대 5F9 ADC를 이용한 직접 세포독성 검정은 5F9 컨쥬게이트를 갖는 293 세포 모델에서 표적 향상 세포 사멸을 나타낸다. HT29 세포 모델에서, 5F9-DMx 컨쥬게이트 및 209-DMx 컨쥬게이트는 동등하게 잘 사멸시키며, 이는 상기 세포에서의 사멸의 비-표적 특이적 메커니즘을 나타낸다.

[0692]

표 15. 항-GCC 마이탄신 ADC의 세포독성

세포주	LD50 (nM)			
	5F9-SMCC-DM1	209-SMCC-DM1	5F9-SPDB-DM4	209-SPDB-DM4
293 벡터	25.3		10.4	
293 GCC#2	<0.004		<0.004	
293 벡터	32	11	13	7.4
293 GCC#2	<0.000004	6.7	<0.000004	4.8
HT29	22.4		7.7	
HT29 GCC#5	20.8		9.1	
HT29	22	12	4.8	2.1
HT29 GCC#5	30	22	5.8	4.2

[0693]

[0694]

실시예 3: 생체내 평가

- [0695] 종양 모델:
- [0696] 5F9 ADC의 생체내 세포독성을 마우스 이종이식 모델에서 평가하였다. 최초 생체내 작업을 HT29-GCC#5 및 #18 세포주로 수행하였다. 293-GCC#2 세포주를 또한 생체내 성장에 대해 시험하였고, 연속적으로 이식가능한 트로카(trocar) 모델로 개발하였다.
- [0697] 이종이식 모델에서의 GCC 발현 수준이 전이성 결장암을 가진 환자에서의 GCC 발현의 수준과 관련이 있는지의 의문을 다루기 위해, GCC 발현 수준을 이종이식 조직, 인간 원발성 결장 종양 및 전이의 IHC 분석으로 비교하였다. 신선한 동결된 세포주 및 조직의 패널을 GCC 3G1에 대한 마우스 mAb를 이용한 rIHC에 의한 GCC 정량에 이용하였다. IHC 정량을 위해, 반-정량 0-3 스코어 시스템을 이용하여 스코어링을 수행하였다. 종양 모델 GCC 수준이 임상 GCC 수준 이하인 경우, 모델링은 정확하거나, 임상적으로 필요한 노출을 높게 평가할 가능성이 클 것이다. 종양 모델 GCC 수준이 임상 GCC 수준을 초과하는 경우, 모델링은 임상적으로 필요한 노출을 적게 평가할 수 있다.
- [0698] 전이성 샘플에서의 GCC의 발현에서의 약간의 변동성이 존재하였으나, HT29-GCC#5 및 #18 세포에 의한 발현은 많은 전이성 샘플의 범위 내였다. IHC에 의해, HT29-GCC#5 및 #18 세포에서의 GCC의 염색은 전이성 세포와 동등하거나 적었다. 이러한 데이터는 본 발명자의 종양 모델이 metCRC의 임상 샘플에서 발견되는 수준과 동등한 수준으로 GCC를 발현하는 것을 암시한다.
- [0699] 표 16은 제공된 3마리의 동물에 대한 평균으로, 192시간의 시점에서 수거된 다양한 조직에 대한 신틸레이션 수를 나타낸다. 5F9는 HT29-벡터 종양에 비해 HT29-GCC#5 종양에 우선적으로 축적된 반면, 209는 많은 차이의 축적을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 5F9 항체 약물 컨쥬게이트가 GCC 발현 종양에서 축적되는 것이 예상될 수 있다는 것을 뒷받침한다. 평가된 모든 다른 조직에서, 5F9 대 mAb 209 항체 축적의 수준에서 거의 차이가 없었다.
- [0700] *HT29-GCC#5 & HT29-벡터 종양 함유 마우스에서의 방사선 표지된 5F9의 생체내 분포*
- [0701] 종양 함유 마우스에서의 방사선촬영(radioimaging) 연구를 항-GCC 항체 5F9 및 음성 대조군 항체 sc209(관련이 없는 세포 표면 표적을 표적으로 하는 인간 IgG1 모노클로날 항체)의 종양 표적화 및 생체내 생체분포(biodistribution)를 평가하기 위해 수행하였다. 항체를 이작용성 킬레이터로서 DTPA를 이용하여 ¹¹¹In으로 방사선 표지하였다. 종양 표적화 및 시간에 따른 정상 조직에서의 생체분포를 포함하는 생체내 거동을 GCC(-) 및 GCC(+) 종양 둘 모두를 갖는 무인 이종-종양 모델을 이용하여 연구하였다. 생체내 이미지(SPECT/CT)를 획득하였고, 조직 방사능 계산을 공간적 해상도를 보충하는데 사용하였다.
- [0702] 피하 종양을 nude 마우스에서 성장시켰고, HT29-벡터 종양을 우측에, HT29-GCC#5 종양을 좌측에서 성장시켰다. 항체를 동물 당 0.3 mCi = 15 μ g으로 투여하였다. 그룹 당 3마리의 동물이 있었고, 그룹을 1h, 24h, 48h, 72h, 120h 및 192h에서 수거하였다.
- [0703] 192h 그룹의 동물로부터의 조직의 조사는 5F9 및 209 둘 모두가 대부분의 정상 조직(예를 들어, 혈액, 심장, 위, 소장, 대장, 근육 및 피부) 및 HT29-벡터 대조군 조직에서 유사한 정도로 축적된 것을 나타내었다. Ab 209는 간에서 5F9보다 약간 더 높은 수준을 축적되었고, 5F9는 폐, 비장 및 신장에서 209보다 약간 더 높은 수준으로 축적되었다. HT29-GCC#5 종양에서, 5F9는 209 수준보다 2배 이상 더 높은 수준으로 우선적으로 축적되었다. 이러한 결과는 5F9 항체 약물 컨쥬게이트가 GCC 발현 종양에서 축적되는 것으로 예상될 수 있는 것을 뒷받침한다.
- [0704] 종양에서의 항체 축적의 동역학을 이해하기 위해, 각각의 항체에 대한 종양 데이터를 연구 전체에 걸쳐 모든 시점에서 획득하였다. 축적을 나타낸 유일한 조직은 GCC 발현 종양에서 5F9 항체이다. 모든 다른 조직에서의 방사능 수준은 비교적 편평한 채로 유지되었고, 5F9 수준과 209 수준 사이에 약간의 차이가 있었다. 5F9는 HT29-GCC#5 종양에서 우선적으로 축적된 반면, 209는 임의의 축적을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 5F9 항체 약물 컨쥬게이트가 GCC 발현 종양에서 축적되는 것이 예상될 수 있는 것을 뒷받침한다.

[0705] 표 16. mAb에 특이적이거나, GCC 발현 종양에 대해 mAb를 조절하지 않는 ¹¹¹In-표지된 GCC의 추적.

	평균 % ID 5F9	평균 % ID ctr IgG
1hr	2.816+/-0.133	2.494+/-0.167
24hr	3.057+/-0.107	3.010+/-0.630
72hr	4.485+/-1.029	3.564+/-0.152
120hr	5.162+/-1.012	3.412+/-0.048
192hr	6.550+/-1.015	2.782+/-0.085

[0706]

[0707] 7일에 걸친 GCC 발현 종양에서의 방사선 표지된 5F9의 추적은 1주일의 1회 투여 스케줄을 뒷받침하였다.

[0708]

HT29-GCC#5 s.c. 종양에서의 파일럿 효능 연구

[0709]

HT29-GCC#5 종양을 함유하는 마우스에서 효능이 있는 컨쥬게이트 및 투여량 요법을 결정하기 위한 연구를 수행하였다. 마우스에 1회 또는 다수 용량을 투여하였다. 이러한 연구에서 높은 수준의 독소 컨쥬게이트(예를 들어, q3d x 5 스케줄에서의 150 µg/kg 5F9vcMMAF)의 너무 빈번한 투여에서 독성이 존재한 것으로 결정되었다. 또 다른 연구에서 q14d x 5 스케줄이 일부 독소 컨쥬게이트가 대조군에 비해 유의한 효능을 나타내는 것을 가능케 하는 상기 모델에서 너무 드문 것으로 결정되었다. 또한, 상기 모델에서의 마이탄시노이드-항체 컨쥬게이트를 이용한 PD 연구는 DM4 독소를 이용해서만 용량-의존적 포스포히스톤 추적을 나타내었고, DM1 독소는 그렇지 않았다. 이러한 모델에서의 또 다른 연구는 비-특이적 209-독소 컨쥬게이트에 의한 일부 종양 성장 억제를 나타내었다. 이러한 결과는 다른 생체내 모델이 평가될 필요를 암시하였다.

[0710]

293-GCC#2 종양을 갖는 마우스에서의 5F9 ADC를 이용한 PK/PD 연구.

[0711]

대안적 종양 모델은 293-GCC#2 세포를 사용하였다. 293-GCC#2 종양 함유 마우스에서의 5F9 ADC에 대한 PD 연구를 수행하였다. 마우스에 75ug/kg 또는 150ug/kg의 5F9vcMMAF의 단일 용량을 투여하고, 종양 세포에서의 독소의 항유사분열 효과를 시험하기 위한 포스포히스톤 H3의 PD 분석을 위해 혈청을 1시간으로부터 4일까지의 시점에서 수집하였다. 포스포-히스톤 H3를 종양의 파라핀 포매된 섹션의 항체(Upstate Biotechnology, now Millipore, Billerica, MA) 염색으로 검출하였다. 표 17의 데이터는 ADC 각각이 종양의 pH3 양성 세포 집단에서 유의한 증가를 야기시킨 것을 나타내며, 이는 75 및 150 µg/kg 독소 용량 당량에서 ADC 각각이 종양에 도달할 수 있었으며, 종양 세포에 대한 요망되는 항-유사분열 효과를 갖는 것을 나타낸다.

[0712]

표 17. 5F9 ADC의 단일 iv 투여 후의 유사분열에서의 세포의 정지에 의해 평가되는 PD 반응(% pH3 양성 종양 세포).

	평균% 종양 세포 pH3 포지티브	SD
비히클 대조군	2.556801	2.37707
5F9-vcMMAE 75 µg/kg 1hr	4.525187	0.178882
4hr	2.551616	1.688255
8hr	4.243988	0.352938
24hr	9.8199	4.82057
48hr	8.692061	4.756786
96hr	8.628345	1.065456
5F9-vcMMAE 150 µg/kg 1hr	3.334943	1.351667
4hr	2.78543	1.690216
8hr	4.575611	1.130484
24hr	13.78776	3.343155

[0713]

48hr	14.26067	5.448921
96hr	14.67942	1.827724
5F9-vcMMAF 75 µg/kg 1hr	4.235245	0.617585
4hr	4.18364	0.846752
8hr	4.930098	0.54746
24hr	20.22484	2.453935
48hr	9.920771	3.788795
96hr	10.38187	1.896461
5F9-vcMMAF 150 µg/kg 1hr	3.465674	1.341187
4hr	4.416646	0.807636
8hr	8.594385	4.005021
24hr	21.53718	7.25212
48hr	15.15814	4.28407
96hr	11.12288	2.150476
5F9-mcMMAF 75 µg/kg 1hr	5.365582	1.14198
4hr	4.044478	0.992449
8hr	8.228597	3.098222
24hr	14.10734	1.611093

[0714]

48hr	19.37223	8.146504
96hr	7.749388	1.180759
5F9-mcMMAF 150 µg/kg 1hr	3.212482	0.509604
4hr	4.722554	1.577531
8hr	9.105349	5.963128
24hr	27.51416	10.96057
48hr	13.34043	3.414961
96hr	15.60917	3.386154

[0715]

[0716]

유사한 연구는 5F9vcMMAF, 5F9-SPDB-DM4 및 5F9-SMCC-DM1으로 처리된 293-GCC#2 종양 함유 마우스에서 포스포히스톤 수준을 측정하였다. 마우스에 150ug/kg의 단일 용량을 투여하였고, 전체 항체 및 독소 컨쥬게이션된 항체 둘 모두의 PK 분석을 위해 1시간으로부터 21일까지의 시점에서 혈청을 수집하였다. 293-GCC#2 종양에서의

포스포히스톤 H3 양성 세포의 핵분율은 5F9vcMMAF, 5F9-SMCC-DM1 및 5F9-SPDB-DM4의 모든 3개의 ADC에 의하여 증가하였다. 최대 포스포히스톤 H3 수준은 기준선에 비해 3 내지 5배 증가하였고, 주사 24시간 후에 피크였다.

[0717] 293-GCC#2 s.c. 종양에서의 5F9vcMMAF 및 5F9-DMx를 이용한 효능 연구

[0718] 5F9-SPDB-DM4, 5F9-SMCC-DM1 및 5F9vcMMAF를 q14d x 5 스케줄로 2 용량(75 μ g/kg 및 150 μ g/kg 독소)으로 293-GCC#2 종양 모델에서 효능에 대해 시험하였다. 특히, 본 연구는 비히클 처리 대조군, Sc209-DM1(150 μ g/kg DM1 eq), Sc209-DM4(150 μ g/kg DM4 eq), Sc209-vcMMAF(150 μ g/kg MMAF eq), 5F9-DM1(150 μ g/kg DM1 eq), 5F9-DM1(75 μ g/kg DM1 eq), 5F9-DM4(150 μ g/kg DM4 eq), 5F9-DM4(75 μ g/kg DM4 eq), 5F9-vcMMAF(150 μ g/kg MMAF eq), 및 5F9-vcMMAF(75 μ g/kg MMAF eq)를 포함하였다. 293-GCC#2 세포를 함유한 타코닉(Taconic) 암컷 마우스 (그룹 당 10마리의 마우스)를 이용하였다.

[0719] 도 1은 q14d 스케줄로 5F9vc-MMAF, -DM1, 및 -DM4로 처리된 293-GCC#2 함유 SCID 마우스에서의 종양 성장을 도시한다. 293-GCC#2 모델에서 5F9-SPDB-DM4를 이용하여 용량 의존적 효능이 관찰된 반면, 209-SPDB-DM4 대조군은 효과가 없었다. 5F9-SMCC-DM1이 또한 효능이 있었으나, 150ug/kg의 5F9-SPDB-DM4보다 적었다. 5F9vcMMAF(75ug/kg 및 150ug/kg)가 가장 효능이 있었으나, 209vcMMAF 또한 약간의 활성을 가졌다. 따라서, 상기 용량 및 스케줄에서, 5F9-SPDB-DM4는 이의 대조군 컨쥬게이트와 차별되는 가장 큰 효능을 가졌다.

[0720] 293-GCC#2 s.c. 종양에서의 5F9vcMMAF 및 5F9-DMx를 이용한 효능 연구

[0721] 5F9-SPDB-DM4 및 5F9-SMCC-DM1을 q7d x 5 스케줄로 2 용량(75ug/kg 및 150ug/kg 독소)으로 293-GCC#2 종양 모델에서 효능에 대해 시험하였다. 특히, 본 연구는 비히클 처리된 대조군, 5F9 단독 (15 mg/kg), DM1 (300 μ g/kg), DM4 (300 μ g/kg), Sc209-DM1 (150 μ g/kg DM1 eq), Sc209-DM4 (150 μ g/kg DM4 eq), Sc209-vcMMAF (150 μ g/kg MMAF eq), 5F9-DM1 (150 μ g/kg DM1 eq), 5F9-DM1 (75 μ g/kg DM1 eq), 5F9-DM4 (150 μ g/kg DM4 eq), 및 5F9-DM4 (75 μ g/kg DM4 eq)를 포함하였다. 293-GCC#2 세포를 함유한 타코닉 암컷 마우스(그룹 당 10마리의 마우스)를 이용하였다.

[0722] 293 GCC#2 종양에서의 아우리스타틴 컨쥬게이트를 이용한 효능 연구

[0723] 293 GCC#2 종양 함유 SCID 마우스에 3 용량의 vcMMAE, vcMMAF 또는 mcMMAF를 갖는 5F9 컨쥬게이트를 처리하였고, 상기 독소의 209 컨쥬게이트 또는 자유 독소 또는 비히클 대조군과 비교하였다. 용량을 q7d x 4 스케줄로 iv 투여하였다. 종양을 3, 7, 10, 13 및 17일에 수거하였다. 대조군 시약으로 처리된 마우스의 종양은 지속적 부피 증가를 나타내었다. 5F9 아우리스타틴 컨쥬게이트로 처리된 종양은 상기 종양 성장의 용량 및 시간 의존적 억제력을 나타내었다. 표 18은 결과의 요약(TGI=종양 성장 억제, T/C=처리/대조군, TGD=종양 성장 지연, CR/PR=완전한 반응/부분적 반응; p 값=통계적 유의성을 판단하기 위한 척도, NS=유의하지 않음)을 제공한다.

[0724] 표 18. 293 GCC#2 종양 함유 마우스에서의 아우리스타틴 ADC의 분석.

그룹	TGI	T/C	TGD	CR/PR	P 값
209-vcMMAE 300 µg/kg	24.5	0.76	0.9	0	0.38>0.05 NS
209-vcMMAF 150 µg/kg	29.4	0.71	1.4	0	0.27>0.05 NS
209-mcMMAE 150 µg/kg	36.5	0.63	1.4	0	0.15>0.05 NS
Free MMAE 300 µg/kg	35.6	0.64	2	0	0.18>0.05 NS
Free mcMMAF 150 µg/kg	-3.4	1.03	-1.3	0	0.73>0.05 NS
5F9-vcMMAE 300 µg/kg	96.9	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-vcMMAE 150 µg/kg	83.5	0.17		2/10 PR	<0.01
5F9-vcMMAF 150 µg/kg	97	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-mcMMAF 150 µg/kg	97	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-vcMMAE 75 µg/kg	54.5	0.45	4.4		0.01<p<0.05
5F9-vcMMAF 75 µg/kg	88.5	0.12		6/10 PR	<0.001
5F9-mcMMAF 75 µg/kg	87.5	0.13		7/10 PR	=0.001
5F9-vcMMAF 37.5 µg/kg	65.2	0.35	7.1		=0.01
5F9-mcMMAF 37.5 µg/kg	63.6	0.36	5.8		=0.01

[0725]

[0726] 모든 3개의 상기 ADC는 q7d 스케줄에서 293 GCC#2 모델에서 효능이 있었다. 5F9-vcMMAF 및 5F9-mcMMAF는 5F9-vcMMAE보다 효능이 있으며, 이는 생체내 PD(pHisH3) 및 시험관내 세포독성 데이터와 관계가 있다.

[0727] T84 s.c. 종양에서 5F9vcMMAF 및 5F9-DMx를 이용한 효능 연구

[0728] 5F9-SPDB-DM4 및 5F9-SMCC-DM1을 q7d x 5 스케줄로 2 용량(75ug/kg 및 150ug/kg 독소)으로 T84 종양 모델에서 효능에 대해 시험하였다. 특히, 본 연구는 비히클 처리 대조군, 5F9 단독 (15 mg/kg), DM1 (300 µg/kg), DM4 (300 µg/kg), Sc209-DM1 (150 µg/kg DM1 eq), Sc209-DM4 (150 µg/kg DM4 eq), Sc209-vcMMAF (150 µg/kg MMAF eq), 5F9-DM1 (150 µg/kg DM1 eq), 5F9-DM1 (75 µg/kg DM1 eq), 5F9-DM4 (150 µg/kg DM4 eq), 및 5F9-DM4 (75 µg/kg DM4 eq)를 포함하였다. T84 세포를 함유하는 타코닉 암컷 마우스(그룹 당 10마리의 마우스)를 이용하였다.

[0729] 면역조직화학

[0730] 생검 및 이종이식편과 같은 조직에서의 GCC의 상대량의 검출 및 측정은 면역조직화학에 의해 수행될 수 있다. 동결된 조직 섹션이 실온에서 20분 동안 아세톤 및 메탄올의 1:1 용액에 고정된다. 슬라이드가 5분 동안 1 x PBS에서 세척된다. 슬라이드가 제조업체에 의해 제시된 반응 완충액을 이용하여 벤타나 디스커버리 XT(Ventana Discovery XT) 자동화 염색기(Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)와 같은 자동화 염색 장치로 처리된다. 항-GCC 항체는 5% 염소 혈청 중에 5 µg/ml로 희석된다. 인간 항-GCC 항체, 예를 들어, 5F9에 대해, 이차 항체를 검출하는 것은 다코 프로테인 블록(Dako Protein block)(Dako, Carpinteria, CA) 중의 염소 항-인간 비오틴화 항체의 1:500 용액이다. 자동염색기가 항체 반응을 처리한 후, 슬라이드가 자동염색기로부터 분리되고, 반응 완충액 중에서 행귀지고, 크실렌까지의 표준 시리즈를 통해 탈수되고, 커버유리에 크실렌 기반의 마운팅 매질이 제공된다.

[0731] 일차 종양 모델에서의 ADC의 효능 연구

[0732] 일차 결장직장 암종 및 위암의 모델이 마우스에서 피하 종양으로 개발된다. 5F9-vcMMAE 및 5F9-mcMMAF ADC가 PHTX-11c 일차 종양 함유 마우스에서 시험된다. 용량이 q7d x 4 스케줄로 iv 투여된다. 209를 갖는 독소의 킨 주게이트가 대조군 마우스에 투여된다.

[0733] 일차 종양 모델에서의 ADC의 항종양 활성

[0734] 5F9-vcMMAE의 생체내 항종양 활성을 결정하고, 다양한 용량 및 투여 스케줄로 PHTX-9c 일차 인간 결장 종양 이

종이식편에서 자유 독소 MMAE 및 비-면역 vcMMAE 항체 독소 컨쥬게이트(209-vcMMAE)에 대한 5F9-vcMMAE의 항종양 활성을 비교하고, 처리 후의 재성장 동역학을 결정하기 위해 두 유사한 연구를 수행하였다. 암컷 CB-17 SCID 마우스(8주령)에 PHTX-9c 종양 단편(2 mm x 2 mm)을 옆구리에 피하 접종시켰다. 종양 성장을 베니어 캘리퍼스를 이용하여 1주일 당 2회 모니터하였고, 평균 종양 부피를 식(0.5 × [길이 × 폭]²)을 이용하여 계산하였다. 평균 종양 부피가 약 150 mm³(연구 A) 또는 160 mm³(연구 B)에 도달하는 경우, 동물을 처리군으로 무작위화시켰다(연구 A에 대해 n = 10/그룹 및 연구 B에 대해 n = 9/그룹).

[0735] 마우스에 1주일에 1회(QW) 투여 스케줄(3 용량)로 0.938, 1.875, 3.75, 또는 7.5 mg/kg의 5F9-vcMMAE를 20일 동안 정맥내(IV) 처리하거나 비히클(0.9% 염수)을 포함하는 대조군을 처리하거나, QW 스케줄로 0.075 또는 0.15 mg/kg의 MMAE를 IV 처리하거나, 20일 동안 QW 투여 스케줄로 1.875 또는 3.75 mg/kg의 209-vcMMAE를 IV 처리하였다(연구 A). 두번째 연구(연구 B)에서, 마우스에 20일 동안 QW 스케줄(3 용량)로 0.938, 1.875, 3.75, 7.5, 또는 10.0 mg/kg의 5F9-vcMMAE를 IV로 처리하거나, 1주일에 2회(BIW) 스케줄(6 용량)로 3.75 mg/kg을 IV로 처리하거나, 비히클을 포함하는 대조군, 7.5 또는 10 mg/kg의 209-vcMMAE, 또는 0.135 또는 0.18 mg/kg의 MMAE를 QW 스케줄로 IV 투여하였다. 용량을 QW 스케줄을 위해 1, 8 및 15일에 투여하였고, BIW 스케줄을 위해 1, 4, 8, 11, 15 및 18일에 투여하였다. 자유 MMAE의 용량을 다음과 같은 이론적 근거에 의해 면역컨쥬게이트 용량에서 MMAE의 양을 일치시키기 위해 계산하였다: MMAE의 동등량은 MLN0264 용량의 1.8%이다. 링커 + MMAE의 동등량은 5F9-vcMMAE 용량의 4%이다. 이러한 계산은 항체 당 평균 3.9 MMAE 분자 및 150 kD의 자유 항체 분자량을 기초로 한다. 실제 항체 분자량은 당화의 정도에 따라 약간 다를 것이다.

[0736] 종양 부피 및 중량을 1주일에 2회 측정하고, 재성장 동역학을 측정하기 위해 처리 기간을 지나서까지 지속시켰으며, 이는 종양 성장 지연(TGD)에 의해 입증된다. 종양 부피 측정을, 종양 부피가 처리 그룹 내의 하나의 마우스에서 체중의 10%에 도달할때까지 지속시켰으며, 이 시점에서 상기 그룹이 종결되었다. 종양 성장 억제(TGI)의 백분율([대조군의 평균 종양 부피 - 처리 그룹의 평균 종양 부피] / 대조군의 평균 종양 부피; T/C 비)을 20일에서 결정하였다. 처리 그룹 전체에 걸친 T/C 비를 양측 검정 웰치 t-시험(two-tailed Welch's t-test)을 이용하여 대조군의 T/C 비와 비교하였다. 하나의 종양이 크기 제한(약 1000 mm³)에 도달하는 경우 전체 그룹이 종료되므로, TGD는 평균 재성장 지연이 느려진 그룹에 대해 계산될 수 있다.

[0737] 처리 그룹 쌍 사이의 시간 경과에 따른 종양 성장 경향에서의 차이를 선형 혼합 효과 회귀 모델(linear mixed effects regression model)을 이용하여 평가하였다. 이러한 모델은 각각의 동물이 다수의 시점에서 측정된다는 사실을 설명한다. 별도의 모델을 각각의 비교를 위해 적합화시켰고, 각각의 처리 그룹에 대한 곡선하영역(AUC)을 모델로부터의 예측 값을 이용하여 계산하였다. 이후, 참조 그룹에 비한 AUC(dAUC)에서의 감소 퍼센트를 계산하였다. 통계적으로 유의한 P 값(< 0.05)은 두 처리 그룹에 대한 시간 경과에 따른 경향이 상이한 것을 암시한다. 결과는 하기 표 19 및 20에 요약되어 있다.

[0738] 두 연구에서의 모든 5F9-vcMMAE-처리 그룹에서 항종양 활성을 관찰하고, 이러한 효과는 용량 의존적인 것으로 나타났다. 두 연구의 결과는 동등하였다. QW 스케줄로 0.938 mg/kg의 5F9-vcMMAE로 IV 처리된 마우스에서, 비히클 그룹에 비해 TGI는 20.7-21.4%였고, p 값은 <0.05이었다. QW 스케줄로 IV 투여된 1.875 mg/kg 처리 그룹에서, TGI는 41.3-44.7%였고, p 값은 <0.001이었다. QW 스케줄로 IV 투여된 3.75 mg/kg 처리 그룹에서, TGI는 비히클 그룹에 비해 65.3-65.7%(p <0.001)였다. 7.5 mg/kg IV QW로 투여된 5F9-vcMMAE는 84.1-84.3%(p<0.001)의 TGI를 발생시켰고, 10 mg/kg IV QW(연구 B 단독)는 91.2%(p<0.001)의 TGI를 발생시켰다. 3.75 mg/kg이 BIW 스케줄(S)로 IV 투여되는 경우, 유의한 억제가 84.9%의 TGI(p<0.001)로 관찰되었다.

[0739] 7.5 및 10.0 mg/kg의 209-vcMMAE의 보다 높은 용량에서 중간 항종양 활성이 각각 35.7 및 45.4%의 TGI로 관찰되었으나, 낮은 용량의 209-vcMMAE(1.875 및 3.75 mg/kg)는 억제를 나타내지 않았다(p>0.05). 높은 209-vcMMAE에 의해 관찰된 항종양 활성은 면역컨쥬게이트의 MMAE 부분에 의한 비특이적 활성으로 인한 것일 수 있다.

[0740] 자유 독소 MMAE의 투여는 혼합된 결과를 발생시켰다: IV QW 투여된 0.075, 0.135, 및 0.15 mg/kg은 종양 성장 억제를 발생시키지 않았으나(p>0.05), 0.18 mg/kg IV QW의 투여는 50.4%의 TGI(p<0.001)를 발생시켰다.

[0741] 처리 기간 동안 관찰된 가장 큰 최대 체중 손실은 연구 B의 자유 독소 0.18 mg/kg MMAE 그룹 및 동일 연구의 0.938 mg/kg 5F9-vcMMAE 그룹에서 7일에서의 2.3%였다. 이는 약물이 잘 용인된 것을 나타낸다.

[0742] 종양 부피 측정을 처리 그룹 내의 하나의 마우스에서 종양 부피가 체중의 10%에 도달할때까지 처리 기간을 지나

지속시켰으며, 이후 처리 그룹을 종료하였다. 이러한 연구에서, 종양 재성장은 용량 의존적인 것으로 보였다.

표 19. SCID 마우스에서의 일차 인간 결장 종양 이종이식의 치료의 결과 A.

치료	용량 (mg/kg)	투여 방법/빈도	TGI	BW 변화 (평균 최대 퍼센트)	TGD (일) /(또는 첫번째 종양이 1000 mm ³ 을 초과할 때 까지의 일수)
비히클	0	IV QW × 3회 투여	N/A	-0.2	0
209-vcMMAE	1.875	IV QW × 3회 투여	-2.0 (p>0.05)	8.3	0.6
209-vcMMAE	3.75	IV QW × 3회 투여	4.5 (p>0.05)	6.9	0.4
MMAE	0.075	IV QW × 3회 투여	5.0 (p>0.05)	8.3	1.0
MMAE	0.15	IV QW × 3회 투여	11.1 (p>0.05)	10.8	2.0
5F9-vcMMAE	0.938	IV QW × 3회 투여	21.4 (p>0.05)	9.0	3.3
5F9-vcMMAE	1.875	IV QW × 3회 투여	44.7 (p>0.001)	10.6	8.2
5F9-vcMMAE	3.75	IV QW × 3회 투여	65.3 (p>0.001)	9.0	17.8
5F9-vcMMAE	7.5	IV QW × 3회 투여	84.1 (p>0.001)	7.5	(>58 일 첫 번째 종양)

표 20. SCID 마우스에서의 일차 인간 결장 종양 이종이식의 치료의 결과 B.

치료	용량 (mg/kg)	투여 방법/빈도	TGI	BW 변화 (평균 최대 퍼센트)	TGD (일) /(또는 첫번째 종양이 1000 mm ³ 을 초과할 때 까지의 일수)
비히클	0	IV QW × 3회 투여	N/A	-1.8	0
209-vcMMAE	7.5	IV QW × 3회 투여	35.7 (p>0.001)	4.2	4.2
209-vcMMAE	10.0	IV QW × 3회 투여	45.4 (p>0.001)	2.6	11.3
MMAE	0.135	IV QW × 3회 투여	2.2 (p>0.05)	9.3	0.2
MMAE	0.18	IV QW × 3회 투여	50.4 (p>0.001)	-2.3	8.6
5F9-vcMMAE	0.938	IV QW × 3회 투여	20.7 (p>0.001)	-2.3	3.8

5F9-vcMMAE	1.875	IV QW × 3 doses	41.3 (p>0.001)	5.6	6.6
5F9-vcMMAE	3.75	IV QW × 3 doses	65.7 (p>0.001)	-2.2	16
5F9-vcMMAE	3.75	IV BIW x 6 doses	84.9 (p>0.001)	-1.8	31.9
5F9-vcMMAE	7.5	IV QW × 3 doses	84.3 (p>0.001)	6.5	(>47 days first tumor)
5F9-vcMMAE	10.0	IV QW × 3 doses	91.2 (p>0.001)	7.2	(>56 days first tumor)

CT26 hGCC/luc #32 파종 모델(balb/c 마우스)에서의 네이키드 5F9 항 hGCC 항체를 이용한 파일럿 효능 연구

이러한 모델은 순환에서 GCC 발현 종양 세포에 결합하고, 신규한 종양의 확립을 방지하는 네이키드 항체의 능력을 시험한다. 암컷 balb/c 마우스에 CT26 hGCC/luc #32 세포를 1x10⁵/마우스 및 5x10⁵/마우스로 i.v.로 접종시켰다. 네이키드 5F9의 투여에 대한 비교를 위해 비히클 0.9% NaCl 및 비특이적 항체(naked 209)를 대조군에 투여하였다. 둘 모두의 항체를 IgG1 아이소형을 갖도록 둘 모두의 항체를 고안(pLTK0K58 벡터 내)하여, Fc 영역이 세포 표면 항원(즉, 5F9에 대해 GCC 및 209에 대해 관련되지 않은 표적)으로의 결합 후에 항체 의존성 세포 매개 세포독성 반응을 유발할 수 있었다. 투여를 1회/주 i.v x4(q7d x 4)의 투여 스케줄로 i.v.에 의해 접종 1

일 전에 시작하였다. 종양 성장을 1주일에 2회 제노젠(Xenogen) 이미징 시스템으로 모니터하였다. 체중 및 생존을 또한 1주일에 2회 모니터하였다. 폐 중량 및 MRI 이미지를 포함하는 이미지를 본 연구의 종료시에 수득하였다.

[0750] 도 2에 도시된 바와 같이, 둘 모두의 5F9 그룹(40mg/kg 및 10mg/kg; 1×10^5 /마우스)은 효능을 나타낸다(34일p.i에서: T/C(처리/대조)는 0.04 내지 0.05이다). 5F9 그룹에 대한 T/C는 209 그룹에 비해 34일p.i에서 0.18 내지 0.14이다. 209 40mg/kg 그룹에 대한 T/C는 0.9% NaCl(일반 염수)에 비해 0.64이다. 5×10^5 그룹에서 5F9로 유리한 결과가 관찰되지 않았다.

[0751] 본 연구의 종료시의 각 그룹의 폐 중량이 도 3에 도시되어 있다. T 시험: 비히클 대 209 40mg/kg P=0.4; 비히클 대 5F9 40mg/kg P<0.05; 비히클 대 5F9 10mg/kg P<0.01. 폐의 시각적 검사로 비히클 또는 209-처리 그룹에서 보다 5F9-처리 그룹에서 적은 종양 결절을 확인하였다. 마우스의 생체내 MRI는 비히클 처리된 마우스에서 주위 조직에 대한 부피가 큰 폐 종양 유출 및 심장 환치(heart displacement)를 나타내었다. 5F9 40 mg/kg-처리 마우스에서, 종양의 흔적이 없이 정상 폐 표시가 관찰되었다.

[0752] 생존 곡선이 도 4에 제시되어 있다. 5F9 처리 그룹(1×10^5)을 이용한 생존에서의 유의한 증가가 관찰되었고, 5F9 10과 40 mg/kg 그룹 사이에 차이가 없었다.

[0753] 실시예 4: 항체 생성 세포주의 생성

[0754] >600mg/L의 생산성으로 5F9를 발현하는 안정한 CHO 세포주 클론을 발생시키기 위해, 5F9에 대한 발현 벡터를, 경쇄 가변 영역(SEQ ID NO:19) 및 중쇄 가변 영역(SEQ ID NO:17)을 WT 인간 IgG1 Fc 및 네오마이신 내성 유전자를 함유하는 pLTKOK58 발현 벡터로 서브클로닝하여 생성시켰다. 5F9 가변 영역-IgG1 융합 생성물의 발현은 EF-1a 프로모터의 조절하에 있다.

[0755] 항-GCC 인간 모노클로날 항체 5F9 가변 영역의 클로닝 및 서열분석

[0756] 전체 RNA를 인간 하이브리도마 46.5F9 서브클론 8.2로부터 분리시켰다(Qiagen's RNeasy kit). 이러한 하이브리도마는 경쇄의 "표준" 공개 카파 불변 영역(GenBank accession # AW383625, 또는 BM918539) 및 중쇄의 "표준" 공개 IgG2 불변 영역(GenBank accession # BX640623, 또는 AJ294731)을 갖는다. 5' 레이스-레디(race-ready), 폴리-G 테일드(tailed) cDNA를 전통적인 방법(Nature Methods 2, 629-630 (2005))으로 합성하였다. 경쇄 가변 영역을 카파 불변 영역에 특이적인 역방향 프라이머와 조합된 폴리-C 앵커 올리고를 이용하여 5' 레이스에 의해 cDNA로부터 PCR 증폭시켰다. 중쇄 가변 영역을 공지된 중쇄 선도 서열에 특이적인 정방향 프라이머와 다중 조합된 IgG2 불변 영역에 특이적인 역방향 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. PCR 생성물을 TOPO® 클로닝(Invitrogen™, Life Technologies, Inc.)시키고, M13F 및 M13R 프라이머를 이용하여 서열분석하였다.

[0757] 항-GCC 인간 모노클로날 항체 5F9를 갖는 포유동물 발현 벡터의 작제

[0758] 5F9 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 갖는 포유동물 발현 벡터를 CHO 세포주를 생성시키기 위해 작제하였다. 천연 작제물에 대해, 5F9 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 pLTKOK58D(US Patent Application # 20040033561)에 서브클로닝시켰다. 이러한 벡터는 네오마이신 내성 및 DHFR/메토폭세이트(증폭용)의 2개의 포유동물 선택 마커를 갖는다. 벡터는 벡터의 선도-카파 불변 및 선도-IgG1(야생형 Fc) 불변 영역의 업스트림에 각각 위치한 탠덤(tandem) EF1알과 프로모터로부터의 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 공동 발현을 가능케 한다. 서브클로닝을 위해, 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 벡터의 각각의 선도-카파 및 선도-IgG1 영역의 접합점으로서의 방향적 클로닝을 위한 독특한 제한 부위를 함유하는 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 서열 확인된 TOPO 클론으로부터 PCR 증폭시켰다. 프라이머의 서열은 다음과 같다(진한 글자체의 5F9 가변 영역-특이적 서열):

[0759] 천연 5F9 경쇄 선도-가변 프라이머:

[0760] 정방향 NotI

5' *ataagaatGCGGCCGCGCTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACA*
GCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTG-3'
 (SEQ ID NO: 234)

[0761]

- [0762] 역방향 BsiWI
- 5'-GCCACCGTACGTTTGATTTCACGTTGGTCCCTTGGCCGAACGTC-3' (SEQ ID NO:235)
- [0763]
- [0764] 천연 5F9 중쇄 선도-가변 프라이머:
- [0765] 정방향 EcoRI
- 5'ccgGAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGTCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGAC-3' (SEQ ID NO:236)
- [0766]
- [0767] 역방향 B1p1
- 5'-GGAGGGCTGAGCTGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCCAGTGGTC-3' (SEQ ID NO: 237)
- [0768]
- [0769] 클론을 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 이중 가닥 DNA 서열분석으로 확인하였다.
- [0770] CHO 세포로 작제물을 도입시키기 위해 두 트랜스펙션 방법을 이용하였다: 전통적 MPI 방법 및 크루셀(Crucell) 방법. CHO 세포 트랜스펙션을 전통적 MPI 방법을 이용하여 천연 5F9 작제물로 개시하였다. 선형화된 DNA 및 선형화되지 않은 DNA를 이용하였고, 이들 각각을 전기천공 또는 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 CD 트랜스펙션을 수행하였다. G418, 비 뉴클레오시드 배지 및 5nM 메토티렉세이트에서의 선택을 통해 약 30개의 안정적인 푸울(pool)을 생성시켰다. 항체 생성 수준의 FMAT 분석을 기초로 하여, 클로닝을 위해 3개의 안정적 푸울을 선택하였다. 가장 높은 생성을 갖는 푸울은 12.2ug/ml로 항체를 분비하였다. 이러한 3개의 푸울을 동결 건조시켰다.
- [0771] 크루셀 STAR 구성요소를 STAR 구성요소를 함유하는 5F9 발현 벡터를 제조하기 위해 평가할 수 있다.
- [0772] 5F9/hIgG1 중쇄 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCC
 ACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGAGACCCTGTCCCT
 CACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTTACAGTGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAG
 GGAAGGGGTGGAGTGGATTGGGAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCC
 TCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTTCGCCTGAAGCTGAGTTT
 TGTGACCGCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAAC
 TTTGACCACTGGGGCCAGGAACCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
 TCTTCCCCTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
 CAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGTACCGTG
 CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCCA
 GCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCA
 TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGG
 TCAAGTTCAACTGCTGACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGG
 AGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
 TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
 CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGA
 GCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC
- [0773]
- GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC
 TCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
 CCCTGTCTCCGGTAAATAATAGGGATAACAGGGTAATACTAGAG
- (SEQ ID NO:230)
- [0774]

[0775] 5F9/hIgG1 중쇄 단백질 서열은 다음과 같다:

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVFGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE
WIGENHRGNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKS
LSLSPGK

(SEQ ID NO:231)

[0776]

[0777] 5F9/hKappa 경쇄 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

GCGGCCGCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGT
CCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTG
GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTT
CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT
GCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTCCGCCAAGGGACCAACGTGG
AAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC
AGGGGAGAGTGTTAGTCTAGA

(SEQ ID NO:232)

[0778]

[0779] 5F9/hKappa 경쇄 단백질 서열은 다음과 같다:

MGWSCILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASTRATGIPAREFSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQQYKTPRTEFGGTNVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO:233)

[0780]

[0781] 하기 나열되는 5F9에 대한 중쇄 및 경쇄 핵산 서열을 pTOK58D 벡터에 삽입하였다:

atgggatggagctgtatcatcctctcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgaaatagtatgacgcagctctccagccacctgtctgt
ctccagg
ggaaagagccacctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagaaacttagcctggatcagcagaaacctggccagg
ctccaggctctctcatatgtgtcatccaccaggccactggaaatccagccaggttcagtgagtggtctgggaca
gagttcactctcaccatcggcagcctgcagctgaagattttgcagtttactgtcagcagatataaaacctggcctcg
gacgttcggccaaggaccaacgtggaaatcaaacgtacgggtggctgcacatctgtcttcatcttccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgtgaataacttctatccagagaggccaagtacagtggaag
gtggataacgccctcaatcgggtaactccaggagagtgctacagagcaggacagcaagcagcacctacagcctcag
cagcaccctgaccctgagcaaaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagct
cgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO:308)

atgggatggagctgtatcatcctctcttggtagcaacagct
acagggtgtccactccaggtgcagctacagcagtgggcgccagactgtgaagccttcggagacctgtccctcacctg
cgctgtcttgggtgggtcttgcagtggtactactggagctggatccgagcccccagggaagggtgagtggtgattg
gggaaatcaatcatgtggaacaccaacgacaacccgtccctcaagagtcgagtcacatcatcagtagacacgtccaag
aaccagttcgccctgaagctgagttctgtgaccgcccgcgacacggctgttttactgtgcgagagaacgtggatcac
ctatgtaactttgaccactggggccagggaacctgtgacccgtcagctcagcctccaccaaggggccatcggtctcc

[0782]
ccctgacacctctccaagagcactctgggggcacagcgccctgggctgctgtcaaggactactccccgaaccg
gtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttccggctgtctacagtcctcaggactcta
ctccctcagcagcgtgtgacccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccca
gcaacaccaaggtggacaagaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacatgccaccgtgccagcacctgaa
ctcttggggggacgcgtcagttctcttccccaaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcac
atgcgtggtgtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgaggtgcataatg
ccaagacaaaagccggggagagcagtaacaacagcgtaccgtgtgtgctcctcaccgtcctgaccagagactgg
ctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaacctatccaagccaa
agggcagccccgagaaccaggtgtacacctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct
gcctggtcaaaagcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagacc
acgcctccggtgctggactccgacggtccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggg
gaacgtcttctatgctcctgcatgaggtctgcacaaccactacacgagaagagccttccctgtctccgggta
aataa (SEQ ID NO:309)

[0783]

[0784] 하기 Abx-229 중쇄 및 경쇄 서열을 엔코딩하는 서열을 pTOK58D 벡터에 삽입하였다:

```
atggagtttgggctgagctggcttttctgtggtatt
ttaaagggtgtccagtggtgaggtgcagctgttggagctgggggagggctgtacagcctggggggtccctgagactctc
ctgtgcagcctctggtattcactttagccgctatgccatgaactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgagg
tctcaggtattagtgggagtggtgtaggacatactacgcagactccgtgaaggggccggttaccatctccagagacaat
tccaagaacacatactatctcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaagatcgcga
ttttggagtggtcatttgaacttggggccagggaacccgtgtcaccgtcagctcagctccaccaaggggcccatcgg
tcttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggtgcctgtcgaagactacttccc
gaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttccggctgtcctacagtcctcagg
actctactccctcagcagcgtgtgaccgtgcccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcaca
agcccagcaacaccaagggtggacaagaagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacatgccaccgtgccagca
```

[0785]

```
cctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctga
ggtcacatgctggtgtggtgagcagcagccgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc
ataatgccaaagacaaggccggggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctaccgtctgcaccag
gactggtgtaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgagaaaacctctcaa
agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcc
tgacctgcctggtcaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactac
aagaccacgcctccgtgtggtgactccgacggctccttctctacagaagctcaccgtggacaagagcaggtggca
gcagggggaagcttctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtaataaa (SEQ ID NO:310)
```

[0786]

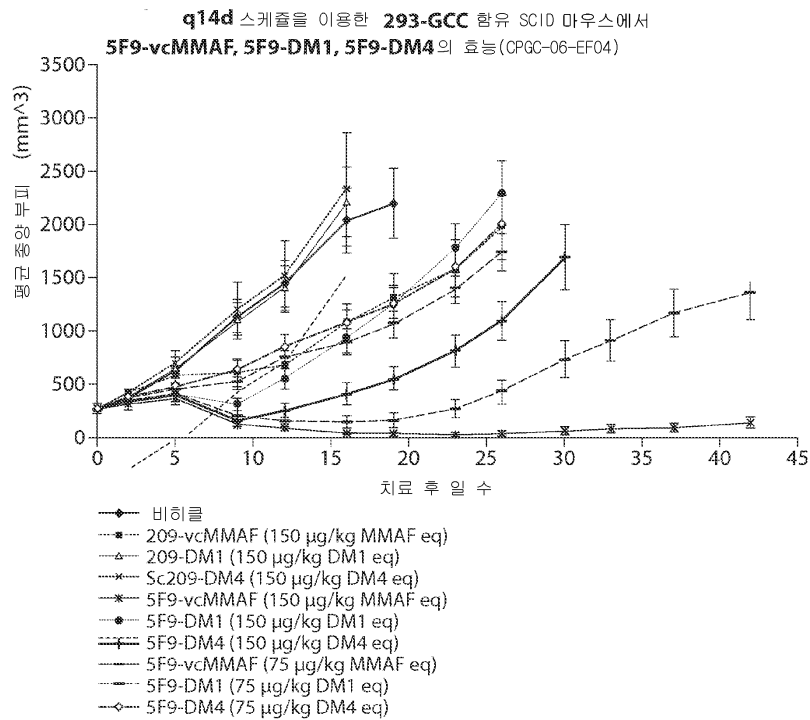
```
atgaggctccctgctcagcttctc
ttctcctgctactctggtcctccagataccactggagaaatagtgatgacgcccgtcttcagccacctgtctgtgtctcc
aggggagagagccacctctcctgcaggggcagtcagagtgtagtagaaacttagcctggtaccagcagaacctggcc
aggctcccaggtcctcatctatgtgtgcatccaccagggccactggtatcccagccaggttcagtggtgagtggtgtggg
acagaattcactctcaccatcagcagcctgcagctgaagatttgcagtttactgtcaccagtagtaactggat
gtgcagttttggcagggggacaagcgtggagatcaaacgtacgggtgctgcacatctgtcttcatcttccgcatctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggtg
aagtggtgataacgccctccaatcggttaactcccaggagagtgacagagcaggacagaaggacagcacctacagcct
cagcagcacctgacctgagcaagcagactacgagaaacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctga
gctcgcctgcacaaaagagcttcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO:311)
```

[0787]

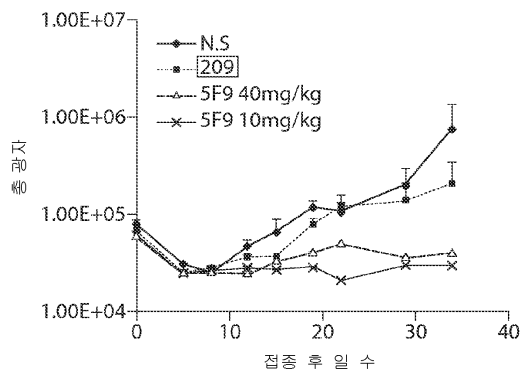
[0788] 본 발명은 상기 제공된 구체예를 참조로 하여 제시되고 기재되었으나, 형태 및 세부사항에서의 다양한 변경이 하기 첨부되는 청구항에 의해 포함되는 본 발명의 범위로부터 벗어남이 없이 이루어질 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.

도면

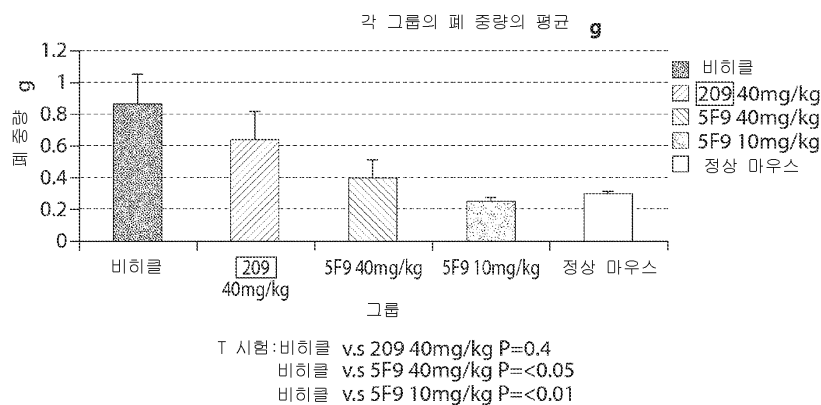
도면1



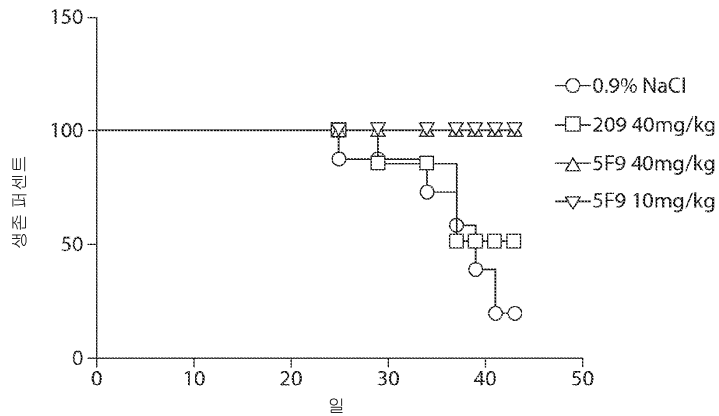
도면2



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

AMGEN BRITISH COLUMBIA

<120> ANTI-GCC ANTIBODY MOLECULES AND RELATED COMPOSITIONS AND METHODS

<130> M2051-7027W0

<140><141><150> 61/254,474

<151> 2009-10-23

<160> 319

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 1

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60

acatgcactg tctctgggtt ctcattaagc agaaatgcta taagctgggt tcgccagcca 120

ccaggaaagg gtctggagtg gcttggagta atatggactg gtggaggcac aaattataat 180

tcagctctca aatccagact gagcatccgc aaagagaact ccaagagtca agttttctta 240

aaaatgaaca gtctacaaac tgaagacaca gccaggtaact tctgtgccag aagtggttac 300

gacgggtttg attactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

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

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Glu Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
Arg Ser Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
Thr Val Ser Ala
 115

<210> 3

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 3

cagattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagtc aagtgtaaat tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccc aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcaccagcat ggaggctgaa 240
 gatgctgcc cttattactg ccagcagtgg agtggttaacc cgtacacgtt cggagggggg 300
 accaaactgg aaataaaa 318

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

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

<210> 5

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

caggtccagt tgaagcagtc tggagctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg ctcttggtca cacccttact gactactata taaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacagg gccttgagtg gattggaaag attggtcctc gaagtggtaa tacttactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcgtccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatgggat 300
 gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctct 336

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 7

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 7

gatgttgtga tgaccagac tccactgtct ttgtcggtta ccattggaca accagcctct	60
atctcttgca agtcaagtca gaggctctta tatagtaatg gaaagacata ttngaattgg	120
ttacaacaga ggcctggcca ggctccaaag cacctaattgt atcaggtgtc caaactggac	180
cctggcatcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcagaaa cagattttac acttaaaatc	240
agcagagtgg aggcgaaga ttgtgggagtt tattactgct tgcaaggta c atattatccg	300

tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaag 336

<210> 8

 $\langle 211 \rangle$ 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 8

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala

35 40 45

Pro Lys His Leu Met Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Ile Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 9

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 9

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgcagatg 60

tcctgtaagg cttctggcta tattttcacc ggctactgga tgtactgggt gaagcagagg 120

cctggccaag gccttgagtg gattggaagg attcatcctt ctgatagtaa tactaactac 180

aatcaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac ccatgccctt 300

gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctct 336

<210> 10

 $\langle 211 \rangle$ 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

 $\langle 400 \rangle$ 10

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 11

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 11

gatgttgtgt tgaccagac tccactcact ttgtcgatta ccattggaca accagcctct	60
atctcttgca agtcaagtc gagcctctta tatagtaatg gaaaaaccta tttagattgg	120
ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactct atctgggtgc tcaactggac	180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga ttggggagtg tattactgcg tgcaaggtag acattttattc	300
acgttcggct cggggacaaa gttggaaata aaa	333

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 12

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

100 105 110

<210> 13

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

caggtccagc tgaagcagtc tggagctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg ctcttggtca caccttcaca gactactata taaactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gccttgagtg gattggaaag attggtccta gaagtggtag tacttactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatgggat 300

gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctctgca 339

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
Ala Arg Trp Asp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ala

<210> 15
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide
<400> 15
gatgttgtga tgaccagac tccactgtct ttgtcgggta ccattggaca accagcctct 60

atctcttgca agtcaagtea gaggctctta tatagtaatg gaaagacata ttgaattgg 120
ttacaacaga ggcttgccca ggctccaaag cacctaattgt atcaggtgtc caaactggac 180
cctggcatcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcagaaa cagattttac acttaaaatc 240
agcagagtgg aggtgaaga ttgtggagtt tattactgct tgcaaggtac atattatccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 16
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
35 40 45
Pro Lys His Leu Met Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Ile Pro

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

<210> 17

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 17

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120

ccaggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcadc gtggaacac caacgacaac 180

ccgtccctca agagtcagtg caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcgccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc cgcgacacg gctgtttatt actgtgcgag agaacgtgga 300

tacacctatg gtaactttga ccaactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 18

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 19

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 19

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agaaacttag cctggatca gcagaaacct	120
ggccaggtc ccaggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg aatcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcggcag cctgcagctc	240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataaaacct ggcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaacg tggaatcaa a 321

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

 $\langle 400 \rangle$ 20

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

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn
 20 25 30

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactgctaca tgagctggat ccgccagtct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attactacta gtggttaatac catttactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagactgg 300
 ggatggttct acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 22

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Trp Gly Trp Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 23

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (216)..(217)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 23

gatatgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtctagta gaggctcctg cataatgatg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gcctccacaa ctctgatct atgaagtffc caaccggttc 180

tctggagtgc cagataggtt cagtagcagc gggtcnnga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tggtggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300

cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa

336

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (73)..(73)

<223> Any amino acid

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Xaa 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 Ser

85 90 95

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

100 105 110

<210> 25

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 25

caggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggagg 300
 agcagctcgt actttgacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 26

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 27

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 27

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca ggtctagtc aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttagattgg	120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagacttc taaccgcttc	180
tctggggctc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc	240

agcagggtgg gagctgagga tgctgggggt tattactgca tgcaagctac gcaatttcca	300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa	333

<210> 28

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 28

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 Thr 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 Gly Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

<210> 29

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 29

caggtgcagc	tggtggagtc	tggtggagtc	gtgttcagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgtag	cgtctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgcactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	gggtgggagct	atatggtatg	atggaagtaa	taaatactat	180
gcagcctccg	tgaagggccg	attecaccatc	tecagagaca	attecaagaa	cacgctgtat	240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtat tt tactgtgc gagagggagg 300
agcagctcgt attttgacta ctggggccag ggaacctggt tcaccgtctc ctca 354

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 30

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 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

Gly Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala 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 Phe Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 31

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg	120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagacttc taaccgcttc	180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agcagggtgg gagctgagga tgtcgggggt tattactgca tgcaagctac gcaatttcca	300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa	333

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 32

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 Thr 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 Gly Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

<210> 33

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 33

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggagg 300

agcagctcgt actttgacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 34

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 34

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

100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 35

gatattgtga tgaccacagac tccactctcc tcacctgtca cccttgagca gccggcctcc	60
ttctcctgca ggtctagta aagcctcgta cacagtgatg gaaacacgta cttgagttgg	120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatit ataagatttc taaccggttc	180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agcagggtgg aagctgagga tgctgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttcca	300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa	333

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

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

<400> 36

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

1 5 10 15

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

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 37

caggtgcagc tggctggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat cgcagggt 120
 ccagggaagg ggctggagtg gatttcatac attactagta gtggtagtag catatactac 180
 tcagcctctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatttc 300
 agtggctggt tcggagtcca ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tcg 363

<210> 38

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 38

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

100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 39

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
atctcctgta agtctagtc gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta ttgtattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc	180
tctggagtgc caaataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agccgggtgg aggtcagga tggtgggtt tattactgca tgcaaagtat acaacttacg	300
tggacgttcg gccaaaggac caagtgga atcaaa	336

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 40

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asn 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 Ser

85 90 95

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

100 105 110

<210> 41

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 41

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggactg ggtctcagat attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatgc acagcctgag cgccaggac acggccatat attactgtgc gaaacggcgg 300

tggcaggggt acttcgatct ctggggccgt ggcaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 42

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 42

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	Asp	Trp	Val
35	40	45	
Ser	Asp	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	His
Ser	Leu	Ser	Ala
Glu	Asp	Thr	Ala
Ile	Tyr	Tyr	Cys
85	90	95	
Ala	Lys	Arg	Arg
Trp	Gln	Gly	Tyr
Phe	Asp	Leu	Trp
Gly	Arg	Gly	Thr
100	105	110	
Leu	Val	Thr	Val
Ser	Ser		
115			

<210> 43

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 43

gaaattgtgt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccaggca	gcgtgttgac	agcagggtact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgcatcca	gcagggccac	tggcatccca	180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 45

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 45

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag ccctctggatt caccttttagc cgctatgccca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagggt attagtggga gtggtggttag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactatat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc 300
gatttttggg gtggtccatt tgactactgg ggccaggga ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 46

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 Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg 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 Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 47

gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga gagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agaaacttag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggtc ccaggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcaccag tatagtaact ggatgtgcag ttttggccag	300
gggaccaagc tggagatcaa a	321

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 48

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

<210> 49

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 49

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcaga agttactact ggagctggat cggcagccc 120

gccgggaagg gactggagtg gattggacgt atttatatca gtgggaggac caccttcaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtggacacgt ccaagaacca gtctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt tctgtgcgag agatagatat 300

tatggtacc ttgactactg gggccaggga accctgttca ccgtctctc a 351

<210> 50

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 50

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Arg Tyr Tyr Gly Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 51

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 51

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc cgcagttact tagcctggta ccaacagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatccca	180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgagtgta ttactgtcag cagtatggta gttaccgag caccttcggc	300
caaggacac gactggagat taaa	324

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 52

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

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

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

85

90

95

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

100

105

<210> 53

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 53

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggcgg ctccatccgt cattactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccaggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ctctccctca agagtcgagt caccatatca agagacacgt ccaagaatca ggtctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcggc gggatatgggc 300

tttgactact ggggccaggg aacctggtc accgtctcct ca 342

<210> 54

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 54

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg His Tyr

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

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

<210> 55

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 55

gacatccaga tgaccagtc tccttctcc ctgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca ggccattaga aatgatttag gctggtatca gctgaaaccg 120

gggaaagccc ctaagcgct gatctattct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240

gaggattctg caacttatta ctgtctacag cataatagtt tccctccgac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Tyr Ser 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 Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 57

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 57

agaaatgcta taagc

15

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 58

Arg Asn Ala Ile Ser

1 5

<210> 59

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 59

gtaatatgga ctggtggagg cacaaattat aattcagctc tcaaatcc

48

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 60

Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 61

agtggttacg acgggtttga ttac

24

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 62

Ser Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 63

agtgccagct caagtgtaaa ttacatgcac

30

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 64

Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His

1 5 10

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 65

gacacatcca aactggettc t

21

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 66

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 67

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 67

cagcagtgga gtggtaaccc gtacacg

27

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 68

Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 69

<211> 15

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 69

gactactata taaac

15

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 70

Asp Tyr Tyr Ile Asn

1 5

<210> 71

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 71

aagattggtc ctggaagtg taatacttac tacaatgaga agttcaaggg c 51

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 72

Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 73

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 73

tgggatgctt ac 12

<210> 74

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 74

Trp Asp Ala Tyr

1

<210> 75

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 75

aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaagacat atttgaat

48

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 76

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 77

caggtgtcca aactggaccc t

21

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 78

Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro

1 5

<210> 79

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 79

ttgcaaggta catattatcc gtacacg

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 80

Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 81

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 81

ggctactgga tgtac

15

<210> 82

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 82

Gly Tyr Trp Met Tyr

1

5

<210> 83

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 83

aggattcatc ctctgatag taatactaac tacaatcaaa agttcaaggg c 51

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 84

Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 85

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 85

gcccttgctt ac 12

<210> 86

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 86

Ala Leu Ala Tyr

1

<210> 87

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 87

aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaaaacct atttgagt 48

<210> 88

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 88

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Ser

1 5 10 15

<210> 89

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 89

ctggtgtctc aactggactc t 21

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 90

Leu Val Ser Gln Leu Asp Ser

1 5

<210> 91

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 91

gtgcaaggta cacatttatt cacg

24

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 92

Val Gln Gly Thr His Leu Phe Thr

1 5

<210> 93

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 93

gactactata taaac

15

<210> 94

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 94

Asp Tyr Tyr Ile Asn

1 5

<210> 95

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 95

aagattggtc ctagaagtgg tagtacttac tacaatgaga agttcaaggg c 51

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 96

Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 97

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 97

tgggatgctt ac 12

<210> 98

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 98

Trp Asp Ala Tyr

1

<210> 99

<211>

48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 99

aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaagacat atttgaat

48

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 100

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu

1

5

10

15

<210> 101

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 101

caggtgtcca aactggaccc t

21

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 102

Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro

1 5

<210> 103

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 103

ttgcaaggta catattatcc gtacacg

27

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 104

Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 105

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 105

ggttactact ggagc

15

<210> 106

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 106

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 107

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 107

gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aaccgcgcc tcaag

45

<210> 108

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 108

Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 109

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 109
gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac 33

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 110
Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His
1 5 10

<210> 111
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 111
agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcc 33

<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 112
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 113
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 113

ggtgcatcca ccaggccac t 21

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 114

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 115

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 115

cagcagtata aaacctggcc tcggacg 27

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 116

Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 117

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 117

gactgctaca tgagc

15

<210> 118

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 118

Asp Cys Tyr Met Ser

1 5

<210> 119

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 119

tacattacta ctagtggtaa taccatttac tacgcagact ctgtgaaggg c

51

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 120

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

1 5 10 15

Gly

<210> 121

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 121

gactggggat ggttctacgg tatggacgtc

30

<210> 122

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 122

Asp Trp Gly Trp Phe Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 123

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 123

aagtctagtc agagcctcct gcataatgat ggaaagacct atttg

45

<210> 124

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 124

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Asn Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 125

gaagtttcca accggttctc t

21

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 126

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 127

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 127

atgcaaagta tacagcttcc tcggacg

27

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 128

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Arg Thr

1 5

<210> 129

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 129

agctatggca tgcac

15

<210> 130

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 130

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 131

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 131

gctatatggg atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c

51

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 132

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

1 5 10 15

Gly

<210> 133

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 133

gggaggagca gctcgactt tgactat 27

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 134

Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 135

<211> 48

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

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

<400> 135

aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaacacct acttgagt 48

<210> 136

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 136

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

1 5 10 15

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 137

aagacttcta accgcttctc t 21

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 138

Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 139

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 139

atgcaagcta cgcaatttcc aacc 24

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 140

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr

1 5

<210> 141

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 141

agctatggca tgcac

15

<210> 142

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 142

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 143

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 143

gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagcct ccgtgaaggg c

51

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 144

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

1 5 10 15

Gly

<210> 145

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 145

gggaggagca gctcgatatt tgactac

27

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 146

Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 147

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 147

aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacct acttgagt

48

<210> 148

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 148

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

1 5 10 15

<210> 149

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 149

aagacttcta accgcttctc t 21

<210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 150

Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<

210> 151

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 151

atgcaagcta cgcaatttcc a 21

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 152

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr

1 5

<210> 153

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 153

agctatggca tgcac

15

<210> 154

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 154

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 155

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<

<400> 155

gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c

51

<210> 156

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 156

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

1 5 10 15

Gly

<210> 157

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 157

gggaggagca gctcgtactt tgactat

27

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 158

Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 159

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 159

aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaacacgt acttgagt 48

<210> 160

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 160

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

1 5 10 15

<210> 161

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 161

aagatttcta accggttctc t 21

<210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 162

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 163

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 163

atgcaagcta cacaatttcc aacc

24

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 164

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr

1 5

<210> 165

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 165

gactactaca tgagc

15

<210> 166

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 166

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 167

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 167

tacattacta gtagtggttag taccatatac tactcagcct ctgtgaaggg c 51

<210> 168

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 168

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

1 5 10 15

Gly

<210> 169

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 169

gatttcagtg gctggttcgg agtccacttt gactac 36

<210> 170

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 170

Asp Phe Ser Gly Trp Phe Gly Val His Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 171

<211

> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 171

aagtctagtc agagcctcct gcatagtgat ggaaagacct attgtat 48

<210> 172

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 172

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 173

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 173

gaagtttcca accggttctc t 21

<210> 174

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 174

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 175

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 175

atgcaaagta tacaacttac gtggacg

27

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 176

Met Gln Ser Ile Gln Leu Thr Trp Thr

1 5

<210> 177

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 177

agctatgccg tgagc

15

<210> 178

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 178

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 179

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 179

gatattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 180

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 180

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

1 5 10 15

Gly

<210> 181

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 181

cggcgggtggc aggggtactt cgatctc 27

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 182

Arg Arg Trp Gln Gly Tyr Phe Asp Leu

1 5

<210> 183

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 183

agggccaggc agcgtgttga cagcaggtac ttagcc 36

<210> 184

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 184

Arg Ala Arg Gln Arg Val Asp Ser Arg Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 185

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 185

ggtgcatcca gcagggccac t 21

<210> 186

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 186

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 187

<211>

27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 187

cagcagtatg gtagctcacc gctcact 27

<210> 188

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 188

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 189

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 189

cgctatgcc a tgaac 15

<210> 190

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 190

Arg Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 191

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 191

ggtattagtg ggagtgggtg taggacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 192

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 192

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

1 5 10 15

Gly

<210> 193

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 193

gatcgcgatt ttggagtgg tccatttgac tac 33

<210> 194

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 194

Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 195

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 195

agggccagtc agagtgttag tagaaactta gcc 33

<210> 196

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 196

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 197

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 197

ggtgcatcca ccaggccac t 21

<210> 198

<211> 7

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

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

<400> 198

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 199

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 199

caccagtata gtaactggat gtgcagt

27

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 200

His Gln Tyr Ser Asn Trp Met Cys Ser

1 5

<210> 201

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 201

agttactact ggagc

15

<210> 202

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 202

Ser Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 203

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 203

cgtatttata tcagtgggag gaccaccttc aaccctctcc tcaagagt 48

<210> 204

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 204

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

1 5 10 15

<210> 205

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 205

gatagatatt atggctacct tgactac

27

<210> 206

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 206

Asp Arg Tyr Tyr Gly Tyr Leu Asp Tyr

1 5

<210> 207

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 207

agggccagtc agagtgttag ccgcagttac ttagcc

36

<210> 208

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 208

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 209

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 209
gatgcatcca gcaggccac t 21
<210> 210
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 210
Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5
<210> 211
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 211
cagcagtatg gtagttcacc gagcacc 27
<210> 212
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 212
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Thr
1 5
<210> 213
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 213

cattactact ggagc

15

<210> 214

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 214

His Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 215

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 215

tatatctatt acagtgggag caccaactac aacctctccc tcaagagt

48

<210> 216

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 216

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

1 5 10 15

<210> 217

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 217

ggtatgggct ttgactac 18

<210> 218

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 218

Gly Met Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 219

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 219

cgggcaagtc aggccattag aaatgattta ggc 33

<210> 220

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 220

Arg Ala Ser Gln Ala Ile Arg Asn Asp Leu Gly

1 5 10

<210> 221

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 221

tctgcatcca gtttgcaaag t

21

<210> 222

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 222

Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 223

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 223

ctacagcata atagtttccc tccgacg

27

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 224

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 225

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 225

Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr

1 5 10 15
Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser
20 25 30

<210> 226

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 226

Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro

1 5 10 15
Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
20 25

<210> 227

<211> 3222

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 227

atgaagacgt tgctgttga cttggctttg tggctactgc tcttcagacc cgggtggctg 60
tccttttagtt cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg 120
atgatgggca actcagcctt tgcagagccc ctgaaaaact tggaagatgc ggtgaatgag 180
gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct 240
actttcatgt attcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcacctgt 300
gaaggcctcg acctactcag gaaaatttca aatgcacaac ggatgggctg tgtcctcata 360
gggcctcat gtacatactc caccttccag atgtaccttg acacagaatt gagctacccc 420

atgatctcag ctggaagttt tggattgtca tgtgactata aagaaacctt aaccaggctg 480
atgtctccag ctagaaagtt gatgtacttc ttggtttaact tttggaaaac caacgatctg 540
cccttcaaaa cttattcctg gagcacttcg tatgtttaca agaatggtac agaaactgag 600
gactgtttct ggtaccttaa tgctctggag gctagcgttt cctattttctc ccacgaactc 660
ggctttaagg tgggtgtaag acaagataag gagtttcagg atatcttaat ggaccacaac 720
aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggtccagagt tcctctacaa gctgaagggt 780

gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atcttttcaa tgaccagtac 840

tttgaggaca atgtcacagc cctgactat atgaaaaatg tccttgttct gacgtgtct 900

cctgggaatt cctttctaaa tagctctttc tccaggaatc tatcaccaac aaaacgagac 960

tttgctcttg cctatttgaa tggaaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatatttctt 1020

gaaaatggag aaaaatttac cacccecaaa ttgctcatg ctttcaggaa tctcactttt 1080

gaagggtatg acggtccagt gaccttggat gactgggggg atgttgacag taccatggtg 1140

cttctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaaggttc ttttgaccta tgataccac 1200

gtaaataaga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca cttggaagaa ctctaaactt 1260

cctaatagata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact 1320

ggagctgtgg tgcgtctcct gctcgtcgtc ctctgatgc tcagaaaata tagaaaagat 1380

tatgaacttc gtcagaaaaa atgggtccac attcctcctg aaaatatctt tcctctggag 1440

accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgatgatg acaaaagacg agatacaatc 1500

cagagactac gacagtgcaa atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaaga tctcaagcac 1560

aatgatggta atttactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac 1620

tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaaacttg ataccatgat cttcggggtg 1680

atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttttaa atgacacaat ttctacacct 1740

gatggcacat tcatggattg ggagttaag atctctgtct tgtatgacat tgctaaggga 1800

atgtcatatc tgcactccag taagacagaa gtccatggtc gtctgaaatc taccaactgc 1860

gtagtggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaatc cattttacct 1920

ccaaaaagg acctgtggac agctccagag cacctccgcc aagccaacat ctctcagaaa 1980

ggagatgtgt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tcctgcggaa agaaaccttc 2040

tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagattttca gagtggaaaa ttccaatgga 2100

atgaaacctt tccgccaga tttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg 2160

tacctacttg taaaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga tttaaaaaa 2220

attgagacta cacttgccaa gatatttgga ctttttcatg accaaaaaaa tgaaagctat 2280

atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag 2340

gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggtg acagacttaa ctttatgttg 2400

cttccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat 2460

gaggaagtta caatctactt cagtgcatt gtaggtttca ctactatctg caaatacagc 2520

accccatgg aagtgggtga catgcttaat gacatctata agagttttga ccacattgtt 2580
gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcggatgatg cgtacatggt ggctagtgg 2640
ttgcctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc ctgggaaatc 2700
ctcagcttca tggggacctt tgagctggag catcttcctg gcctcccaat atggattcgc 2760
attggagttc actctgggcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat 2820
tgtctatttg gagatacggg caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctccctttg 2880
agaattcacg tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt 2940

tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg 3000
actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaaccctc ctactgtgga gaatcaacag 3060
cgtttgcaag cagaattttc agacatgatt gccactctt tacagaaaag acaggcagca 3120
gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac 3180
ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctatTTTT aa 3222

<210> 228

<211> 1073

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 228

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln

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

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

115 120 125
 Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala

 130 135 140
 Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
 145 150 155 160
 Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
 165 170 175
 Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
 180 185 190
 Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala

 195 200 205
 Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
 210 215 220
 Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
 225 230 235 240
 Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
 245 250 255
 Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu

 260 265 270
 Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285
 Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300
 Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320
 Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu

 325 330 335
 Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 340 345 350
 His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
 355 360 365

Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
 370 375 380
 Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His

 385 390 395 400
 Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
 405 410 415
 Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
 420 425 430
 Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu
 435 440 445
 Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg

 450 455 460
 Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu
 465 470 475 480
 Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg
 485 490 495
 Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Asp Lys Lys Arg
 500 505 510
 Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys

 515 520 525
 Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Asn Leu
 530 535 540
 Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val
 545 550 555 560
 Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr
 565 570 575
 Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser

 580 585 590
 Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys
 595 600 605
 Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser

610 615 620
 Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro
 625 630 635 640
 Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn

 645 650 655
 Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu
 660 665 670
 Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg
 675 680 685
 Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe
 690 695 700
 Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val

 705 710 715 720
 Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro
 725 730 735
 Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe
 740 745 750
 His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu
 755 760 765
 Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln

 770 775 780
 Leu Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Arg Ala Asp Arg Leu Asn Phe Met Leu
 785 790 795 800
 Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu
 805 810 815
 Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly
 820 825 830
 Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met

 835 840 845
 Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp
 850 855 860

Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly
865 870 875 880
Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met
885 890 895
Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu
900 905 910
Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys
915 920 925
Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly
930 935 940
Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu
945 950 955 960
Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu
965 970 975
Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg
980 985 990
Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe
995 1000 1005
Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln
1010 1015 1020
Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln
1025 1030 1035
Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr
1040 1045 1050
Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
1055 1060 1065
Glu Ser Thr Tyr Phe
1070
<210> 229
<211> 420
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 229

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln

1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn

20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala

35 40 45

Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile

50 55 60

Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala

65 70 75 80

Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg

85 90 95

Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala

100 105 110

Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr

115 120 125

Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala

130 135 140

Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu

145 150 155 160

Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys

165 170 175

Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val

180 185 190

Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala

195 200 205

Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val

210 215 220

Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
 225 230 235 240
 Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
 245 250 255

Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
 260 265 270
 Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285
 Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300
 Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320

Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
 325 330 335
 Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 340 345 350
 His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
 355 360 365
 Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
 370 375 380

Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
 405 410 415
 Asn Ser Lys Leu
 420

<210> 230

<211> 1444

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 230

gaattcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac agctacaggt	60
gtccactccc aggtgcagct acagcagtgg ggcgcaggac tgttgaagcc ttcggagacc	120
ctgtccctca ccigcgtgt ctttgggtggg tctttcagtg gttactactg gagctggatc	180
cgccaccccc cagggaaggg gctggagtgg attggggaaa tcaatcatcg tggaaacacc	240
aacgacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc accatatcag tagacacgtc caagaaccag	300
ttcgccctga agctgagttc tgtgaccgcc gcggacacgg ctgtttatta ctgtgcgaga	360
gaacgtggat acacctatgg taactttgac cactggggcc agggaaacct ggtcaccgtc	420
agctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc	480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgcaca ccttccggc tgtcctacag	600
tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag ctgggcacc	660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt	720
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactctg	780
gggggaccgt cagtcttct cttccccca aaaccaagg acacctcat gatctccgg	840
acctctgagg tcacatgct ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc	900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgc ggaggagcag	960
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggtgaat	1020
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	1080
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg	1140
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgct	1260
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	1320
aggtggcagc aggggaacct cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtct gcacaaccac	1380
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataat agggataaca gggtataact	1440
agag	1444

<210> 231

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 231

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Phe Gly Gly Ser Phe

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

180 185 190

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

195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

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

 Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 232

<211> 722

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 232

```
gcggccgcct caccatggga tggagctgta tcctcctctt cttggtagca acagctacag      60
gtgtccactc cgaaatagtg atgacgcagt ctccagccac cctgtctgtg tctccagggg      120
aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcctggtatc      180
agcagaaacc tggccagget cccaggtctc tcctctatgg tgcattccac agggccactg      240
gaatcccagc caggttcagt ggcagtgggt ctgggacaga gttcactctc accatcgga      300
```

```
gcctgcagtc tgaagatttt gcagtttatt actgtcagca gtataaaacc tggcctcgga      360
cgttcggcca agggaccaac gtggaaatca aacgtacggt ggctgcacca tctgtcttca      420
tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgtttgtg tgcctgctga      480
ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaggt ggataacgcc ctccaatcg      540
gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca      600
gcacctgac cctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca      660
cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgtagtcta      720
```

ga 722

<210> 233

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 233

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

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

 100 105 110
 Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 234

<211> 112

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 234

ataagaatgc ggccgcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac 60
agctacaggt gtccactccg aaatagtgat gacgcagtct ccagccaccc tg 112
<210> 235
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 235
gccaccgtac gtttgatttc cacgttggtc ccttggccga acgtc 45
<210> 236
<211> 103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 236
ccggaattcc tcacatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc aacagctaca 60
ggtgtccact ccaggtgca gctacagcag tggggcgcag gac 103
<210> 237
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 237
ggaggctgag ctgacggtga ccagggttcc ctggccccag tggtc 45
<210> 238
<211> 352
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 238

caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctctggagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgc tcctcatcagt cattactact ggagctggat ccggcagccc	120
gccgggaagg gactggaatg gattgggcgt atctatatca gtgggaggac cagctacaac	180
ccctccctca agagtcgagt caccgtgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggaacag gccgtgtatt actgtgcgag agatcggtca	300

actgggtact ttgactactg gggccaggga accctggtca cegtctctc ag 352

<210> 239

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 239

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 240

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 240

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccgc tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtc ttactgtcag cagtatggta gctccctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 241

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 241

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 242

<211> 353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 242

caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt cattactact ggagctggat ccggcagccc	120
gccgggaagg gactggaatg gattgggcgt atctatatca gtgggaggac cagctacaac	180
ccctccctca agagtcgagt caccgtgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcggcta	300
actgggtact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctctc agc	353

<210> 243

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 243

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

Arg Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 244

<211> 329

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 244

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggt cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagact ttgcagtga ttactgtcag cagtatggta gctcacccat gtgcagtttt 300

ggccagggga ccaagctgga gatcaaacg 329

<210> 245

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 245

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

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20

25

30

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

35

40

45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Met Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 246

<211> 362

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 246

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttgtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc cgctatgcc tgaactgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg ggttgagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtgtag cacatactac 180

gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc 300

gatttttga gtgtccatt tgactactgg ggccaggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

gc 362

<210> 247

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 247

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 Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly 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 Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 248

<211> 323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 248

gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgta gggccagtca gagtgttagt agaagcttag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctacggt gcatccacca gggccactgg gatcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
gaagatgttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggatgtgcag ttttggccag	300
gggaccaagc tggagatcaa acg	323

<210> 249

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 249

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

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

<210> 250

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 250

cattactact ggagc

15

<210> 251

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 251

His Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 252

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 252

cgtatctata tcagtgggag gaccagctac aaccctccc tcaagagt 48

<210> 253

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 253

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

1 5 10 15

<210> 254

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 254

gatcggctaa ctgggtactt tgactac 27

<210> 255

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 255

Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 256

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 256

agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc

36

<210> 257

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 257

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 258

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 258

ggtgcatcca gcaggccgc t

21

<210> 259

<211> 7

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 259

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala

1 5

<210> 260

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 260

cagcagtatg gtagctccct cact

24

<210> 261

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 261

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 262

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 262

cattactact ggagc

15

<210> 263

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 263

His Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 264

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 264

cgtatctata tcagtgggag gaccagctac aaccctccc tcaagagt 48

<210> 265

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 265

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

1 5 10 15

<210> 266

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 266

gatcggctaa ctgggtactt tgactac 27

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 267

Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 268

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 268

agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc

36

<210> 269

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 269

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 270

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 270

ggtacatcca gcaggccac t

21

<210> 271

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 271

Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 272

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 272

cagcagtatg gtagctcacc catgtgcagt

30

<210> 273

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 273

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Cys Ser

1 5 10

<210> 274

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 274

cgctatgccca tgaac

15

<210> 275

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 275

Arg Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 276

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 276

ggtattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 277

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 277

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

1 5 10 15

Gly

<210> 278

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 278

gatcgcgatt tttggagtgg tccatttgac tac 33

<210> 279

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 279

Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 280

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 280

agggccagtc agagtgttag tagaagctta gcc 33

<210> 281

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 281

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 282

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 282

ggtgcatcca ccagggccac t 21

<210> 283

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 283

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 284

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 284

cagcagtata ataactggat gtgcagt

27

<210> 285

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 285

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Met Cys Ser

1 5

<210> 286

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 286

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120

ccaggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaacac caacgacaac 180

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gtgcgcctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgagag agaacgtgga 300
 tacacctatg gtaactttga ccaactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357
 <210> 287
 <211
 > 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 287
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Phe Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ala Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 288
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide
 <400> 288

gaaatttgtg tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaggtact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcacccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtga tttctgtcag cagtatgaaa ggtcattcac tttcgccct 300
gggaccaaag tggat 315

<210> 289

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 289

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Glu Arg Ser Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp

100 105

<210> 290

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 290

ggttactact ggagc 15

<210> 291

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 291

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 292

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 292

gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aaccgcgcc tcaag 45

<210> 293

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 293

Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 294

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 294

gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac

33

<210> 295

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 295

Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His

1 5 10

<210> 296

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 296

agggccagtc agagtgttag cagcaggtac ttagcct

37

<210> 297

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 297

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 298

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 298

ggtgcatcca gcaggccac tg

22

<210> 299

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 299

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 300

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 300

cagcagtatg aaaggtcatt cactt

25

<210> 301

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 301

Gln Gln Tyr Glu Arg Ser Phe Thr

1 5

<210> 302

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(3)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Met or Trp

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ser or Asn

<400> 302

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 303

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(4)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Any amino acid or not present

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Thr or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Tyr, Thr, or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(12)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Leu or Val

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Ser or Gly

<400> 303

Xaa Ile Xaa Xaa Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa

1 5 10 15

<210> 304

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

consensus sequence

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(6)

<223> Any amino acid and this region may encompass 4 to 6 residues

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(10)

<223> Any amino acid and this region may encompass 2 to 3 residues

<400> 304

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Asp Tyr

1 5 10

<210> 305

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221

> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Arg or Lys

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Ala or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Val or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Ser or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(16)

<223> Any amino acid and this region may encompass 5 to 9 residues

<400> 305

Xaa Xaa Ser Gln Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 306

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(2)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)
 <223> Any amino acid
 <220><221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Any amino acid
 <400> 306
 Xaa Xaa Ser Xaa Arg Xaa Xaa
 1 5
 <210> 307
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 consensus sequence
 <220><221> MOD_RES
 <
 222> (1)..(1)
 <223> Gln, His, or Met
 <220><221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Tyr or Ser
 <220><221> MOD_RES
 <222> (4)..(10)
 <223> Any amino acid and this region may encompass 5 to 7 residues
 <400> 307
 Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 308
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide
 <400> 308

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgaa 60

atagtgatga cgcagtctcc agccaccctg tctgtgtctc caggggaaag agccaccctc 120

tcctgcaggg ccagtcagag tgtagcaga aacttagcct ggtatcagca gaaacctggc 180

caggctccca ggctcctcat ctatggtgca tccaccaggg ccactggaat cccagccagg 240

ttcagtggca gtgggtctgg gacagagttc actctacca tcggcagcct gcagtctgaa 300

gattttgcag tttattactg tcagcagtat aaaacctggc ctgggacgtt cggccaaggg 360

accaactggg aaatcaaacg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgaccctg 600

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 660

agctcggcgc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

<210> 309

<211> 1407

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 309

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag 60

gtgcagctac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120

tgcgctgtct ttggtgggtc tttagctggt tactactgga gctggatccg ccagccccc 180

gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcatcgtg gaaacaccaa cgacaaccgc 240

tcctcaaga gtcagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt cgcctgaag 300

ctgagttctg tgaccgcgc ggacacggct gtttattact gtgcgagaga acgtggatac 360

acctatggta actttgacca ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtcag ctacgcctcc 420

accaagggcc catcggtctt cccctggca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca 480

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtagcgtt gtcgtggaac 540

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgtctg tcctacagtc ctcaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 660

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccacatct 720

tgtagacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	840
acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1020
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga tgagctgacc	1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgttc aaaggcttct atccagcga catgccgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag	1380
agcctctccc tgtctccggg taaataa	1407
<210> 310	
<211> 1410	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
polynucleotide	
<400> 310	
atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtg ccagtgtag	60
gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcct gagactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac ctttagccgc tatgcatga actgggtccg ccaggtcca	180
gggaaggggc tggagtgggt ctcaggtatt agtgggagtg gtgtaggac atactacga	240
gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac actatatctg	300
caaatgaaca gctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcga agatcgcgat	360
ttttggagtg gtccatttga ctactggggc cagggaacct tggtcaccgt cagctcagcc	420
tccaccaagg gccatcgtt cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc	480
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtagc ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtctcagga	600
ctctactccc tcagcagct ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac	660
atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagccaaa	720

tctttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840
 gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa 1080
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctatcccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggtc tgcacaacca ctacacgag 1380
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1410

<210> 311

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 311

atgaggctcc ctgtcagct tctcttcctc ctgtactctt ggctcccaga taccactgga 60
 gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga gagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agaaacttag cctggtacca gcagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 300

gaagattttg cagtttatta ctgtcaccag tatagtaact ggatgtgcag ttttgccag 360
 gggaccaagc tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 312
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Leu or Val
 <220><221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Ser or Gly
 <400> 312
 Ser Xaa Lys Xaa
 1
 <210> 313
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Lys or Arg
 <220><221> MOD_RES

 <222> (2)..(2)
 <223> Ala or Ser
 <220><221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Val or Leu
 <220><221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser or Leu
 <400> 313

Xaa Xaa Ser Gln Ser Xaa Xaa

1 5

<210> 314

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 314

Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 315

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 315

Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 316

<211> 18

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 316

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly

1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 317

<211> 638

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 317

Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val

1 5 10 15

Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu

20 25 30

Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn

35 40 45

Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly

50 55 60

Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu

65 70 75 80

Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala Gln Arg Met Gly Cys Val Leu

85 90 95

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

100 105 110

Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys

115 120 125

Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu

130 135 140

Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys

145 150 155 160

Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr

165 170 175

Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr

180 185 190

Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu

195 200 205

Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile

210 215 220

Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala
225 230 235 240

Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln
245 250 255

Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu
260 265 270

Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser
275 280 285

Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn
290 295 300

Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly
305 310 315 320

Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr
325 330 335

Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
340 345 350

Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr
355 360 365

Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val
370 375 380

Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp
385 390 395 400

Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
405 410 415

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
420 425 430

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
435 440 445

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
450 455 460

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

465 470 475 480
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 485 490 495
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 500 505 510

 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 515 520 525
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 530 535 540
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 545 550 555 560
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 565 570 575

 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 580 585 590
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 595 600 605
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 610 615 620
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 625 630 635

 <210> 318
 <211> 707
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 318
 Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val
 1 5 10 15
 Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu
 20 25 30

Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn
 35 40 45

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

 Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys
 115 120 125
 Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu
 130 135 140
 Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys
 145 150 155 160
 Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr
 165 170 175

 Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr
 180 185 190
 Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu
 195 200 205
 Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile
 210 215 220
 Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala
 225 230 235 240

 Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln
 245 250 255
 Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu
 260 265 270
 Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser

275 280 285
 Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn
 290 295 300

 Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr
 325 330 335
 Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
 340 345 350
 Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr
 355 360 365

 Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val
 370 375 380
 Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp
 385 390 395 400
 Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
 405 410 415
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
 420 425 430

 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 435 440 445
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 450 455 460
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 465 470 475 480
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 485 490 495

 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 500 505 510
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 515 520 525

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 530 535 540
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 545 550 555 560

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 565 570 575
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 580 585 590
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 595 600 605
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 610 615 620

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Leu Asp Leu
 625 630 635 640
 Asp Asp Val Cys Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp
 645 650 655
 Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Ser Leu Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr
 660 665 670
 Ser Ala Ser Val Thr Leu Phe Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val
 675 680 685

Val Glu Leu Lys Gln Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly
 690 695 700

Gln Gly Ala

705

<210> 319

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 319

Gly Phe Leu Gly

