



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월27일

(11) 등록번호 10-2773176

(24) 등록일자 2025년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7009445

(22) 출원일자(국제) 2016년09월06일

심사청구일자 2021년08월06일

(85) 번역문제출일자 2018년04월03일

(65) 공개번호 10-2018-0042431

(43) 공개일자 2018년04월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/050391

(87) 국제공개번호 WO 2017/041092

국제공개일자 2017년03월09일

(30) 우선권주장

62/214,242 2015년09월04일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20140234350 A1*

WO2006014744 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

헬스 리서치 인코포레이티드

미국 뉴욕 14263 버팔로 엘름 앤드 칼턴 스트리트

(72) 발명자

펜스터메이커, 로버트, 에이.

미국 뉴욕 14228 애머스트 노스 로킹엄 웨이 273

치에시엘스키, 마이클, 제이.

미국 뉴욕 14127 오차드 파크 사일런트 미도우 레인 8

(74) 대리인

특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 18 항

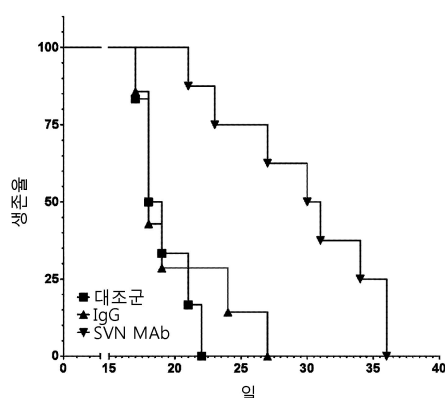
심사관 : 이미경

(54) 발명의 명칭 암 치료용 안티-서비빈 항체

(57) 요약

서비빈 특이적 항체, 항체를 인코딩하는 핵산 및 항체 투여에 의해 서비빈-발현 세포를 포함하는 종양의 치료방법이 제공된다. 항체 조성물은 종양의 성장을 저해하는 데에 효과적인 것을 찾아냈다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서비빈 발현 증양을 갖는 개체에서 서비빈 발현 증양을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물은 서비빈에 특이적인 항체를 포함하고,

이때 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고,

a) 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:7의 VH CDR1, SEQ ID NO:8의 VH CDR2 및 SEQ ID NO:9의 VH CDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:10의 VL CDR1, SEQ ID NO:11의 VL CDR2 및 SEQ ID NO:12의 VL CDR3을 포함하거나; 또는

b) 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:13의 VH CDR1, SEQ ID NO:14의 VH CDR2 및 SEQ ID NO:15의 VH CDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:16의 VL CDR1, SEQ ID NO:17의 VL CDR2 및 SEQ ID NO:18의 VL CDR3을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체는 길이가 9 내지 23개의 아미노산이고 서열 QMFFCF (SEQ ID NO:3)을 포함하는 펩티드에 반응하여 생성된 것인, 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 항체는 서열 DLAQMFFCFKELEGW (SEQ ID NO:4)을 포함하는 펩티드에 반응하여 생성된 것인, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항체는 단클론 또는 다클론 항체인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 단쇄 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항체는 아이소 타입 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 또는 IgE를 갖는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 항체는 아이소 타입 IgG2b 또는 IgG1를 갖는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 19와 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 20와 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 21와 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 22와 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 11

중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 서비빈에 특이적으로 결합하는 단리된 단클론 항체로서,

- a) 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:7의 VH CDR1, SEQ ID NO:8의 VH CDR2 및 SEQ ID NO:9의 VH CDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:10의 VL CDR1, SEQ ID NO:11의 VL CDR2 및 SEQ ID NO:12의 VL CDR3을 포함하거나; 또는
- b) 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:13의 VH CDR1, SEQ ID NO:14의 VH CDR2 및 SEQ ID NO:15의 VH CDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:16의 VL CDR1, SEQ ID NO:17의 VL CDR2 및 SEQ ID NO:18의 VL CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 19와 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 20와 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 21와 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 22와 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 단쇄 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체인 것인, 항체.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 항체는 아이소 타입 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 또는 IgE를 갖는 것인, 항체.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 항체는 아이소 타입 IgG2b 또는 IgG1를 갖는 것인, 항체.

청구항 17

제11항에 기재된 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 단클론 항체는 아이소 타입 IgG2b 또는 IgG1의 것인, 하이브리도마 세포.

청구항 19

제11항에 기재된 단클론 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 도입된 형질전환 세포.

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련출원 상호 참조

[0002] 본 출원은 2015년 9월 4일에 출원된 미국 가 특허출원 제62/214,242호에 대한 우선권을 주장하고, 본원에 참조로 포함되어 있다.

배경 기술

[0003] 서비빈(survivin)은 아포토시스 저해제의 패밀리에 속하는 세포내 단백질이다. 서비빈은 세포 분할을 조절하기 위해 유사분열 방추장치와 함께 작용한다. 이것은 세포 주기의 G2/M 단계 동안 특정 세포에서 발현되고, 이 세포 주기의 단계 동안 방추 미세소관과 관련된다. 서비빈은, 세포 주기를 조절하고 아포토시스 세포 사멸을 저해하기 위해 상이한 다수의 세포 유전자좌에서 중요한 역할을 한다. 이는 많은 상이한 형태의 암세포에서는 빈번하게 발현되지만, 정상 성인 조직에서는 흔하게 발현되지 않는다. 서비빈 펩티드 서열은 백신접종 전략을 개발하기 위해 사용되었다. 일부 암에 걸린 환자의 생존율은 개선되었지만, 특히 진단시 진행된 질병에 걸린 환자에 대해서는 어려움이 있다. 따라서, 암을 퇴치하기 위한 추가의 전략을 개발하는 것이 계속 요구되고 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0004] 본 개시내용은 서비빈 발현 세포를 포함하는 종양을 처리하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 개시내용은 단리된 항체를 제공하고, 이는 단클론 항체 및 다클론 항체 및 이들의 단편 및 변이체, 상기 항체를 포함하는 조성물, 상기 항체 또는 이들의 일부분 또는 변이체를 인코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터, 상기 항체 및/또는 핵산 분자를 포함하는 세포, 하나 이상의 항체 또는 핵산 분자를 포함하는 키트, 및 종양의 성장을 저해하기 위해 항체 또는 핵산 분자를 포함하는 세포, 또는 상기 항체 또는 핵산 분자를 사용하는 방법을 제공한다.

[0005] 일 형태에서, 본 개시내용은 서비빈의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 반응하는 다클론 또는 단클론 항체(mAb)일 수 있는 단리된 항체를 제공한다. 항체는 서비빈의 펩티드 또는 그 개질의 투여에 반응하여 생성될 수 있다. 예를 들면, 항체는 길이가 9 내지 23개 아미노산이고 코어 서열 QMFFCF (SEQ ID NO:3)을 포함하는 펩티드에 반응하여 생성될 수 있다.

[0006] 본 개시내용의 항체는 SEQ ID NO:7에 기재된 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)1, SEQ ID NO:8에 기재된 서열을 갖는 CDR2, SEQ ID NO:9에 기재된 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 SEQ ID NO:10에 기재된 서열을 갖는 CDR1, SEQ ID NO:11에 기재된 서열을 갖는 CDR2 및 SEQ ID NO:12에 기재된 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 단클론 항체; 또는 SEQ ID NO:13에 기재된 서열을 갖는 CDR1, SEQ ID NO:14에 기재된 서열을 갖는 CDR2, SEQ ID NO:5에 기재된 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 VH, 및 SEQ ID NO:16에 기재된 서열을 갖는 CDR1, SEQ ID NO:17에 기재된 서열을 갖는 CDR2, 및 SEQ ID NO:18에 기재된 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 VL을 포함하는 단클론 항체일 수 있다.

[0007] 본 개시내용의 항체는 키메라 항체, 인간 항체, 또는 인간화 항체일 수 있다. 키메라 항체 또는 인간화 항체에서 중쇄 및/또는 경쇄의 몇 개의 부분은 1종으로부터의 서열과 상동이거나 균질할 수 있고, 그 외의 부분은 상이한 종으로부터의 서열과 상동이거나 균질할 수 있다. 예를 들면, 무린 단클론 항체는 단리되거나 생성될 수 있고, 그 후 이들 항체의 일부분(또는 이로부터 유래된 서열 정보)이 키메라 또는 인간화 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 예를 들면, 마우스는 하나 이상의 서비빈 펩티드로 면역화된 후 복수 액체 (ascites fluid) 샘플을 수집할 수 있다. 샘플은 단클론 항체의 패널 및 상응하는 하이브리도마 세포주를 개발하기 위해 스크리닝되고 선택될 수 있다. 그 다음에 단클론 항체로부터의 일부분 또는 서열은 키메라 또는 인간화 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 본 개시내용의 항체는 또한 항체 단편, 단쇄, 이중특이적 또는 다중특이적 항체일 수 있다.

[0008] 본 개시내용은 서열 인코딩 부분 또는 모든 항체(mAb를 포함) 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 본 개시내용은 또한 핵산 분자를 포함하는 세포를 제공한다.

[0009] 본 개시내용은 서비빈(예를 들면, 인간 서비빈)에 특이적인 하나 이상의 항체를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체에서의 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 GL261 신경교종을 갖는 C57BL/6 마우스에서 두개내 신경교종에 대한 안티-서비빈 단클론 항체의 효과를 도시한다. 마우스에 종양 이식 후 안티-서비빈 항체를 7일마다 1회 투여했다. 생존율은 시간에 따라 도시한다. IgG는 정상 마우스 비-특이적 IgG이다. 대조군은 치료되지 않은 종양 이식된 마우스이다.

도 2는 GL261 신경교종을 갖는 C57BL/6 마우스에서 피하종양 모델에 대한 안티-서비빈 다클론 및 단클론 항체의 효과를 도시한다. 마우스에 종양 이식 후 표시된 치료제를 7일마다 1회 투여했다. SurVaxM는 서비빈 백신이고; 안티-서비빈 혈청(항체)는 활성 서비빈 백신 또는 서비빈 펩티드를 받은 비-종양 보유 폴링된 마우스로부터 유래되었다. 대조군은 치료되지 않은 종양 이식된 마우스이다.

도 3은 GL261 신경교종을 갖는 C57BL/6 마우스에서 피하종양 모델에 대한 안티-서비빈 다클론 항체의 효과를 도시한다. 마우스에 종양 이식 후 표시된 치료제를 7일마다 1회 투여했다. SurVaxM는 서비빈 백신이고; 안티-서비빈 혈청(항체)은 활성 SurVaxM를 받은 비-종양 보유 폴링된 마우스로부터 유래되었다. 마우스를 50일까지 추적했다.

도 4는 누드(면역저하된) 마우스에서 B16 무린 흑색종에 대한 2개의 단클론 항체의 효과를 도시한다. 종양 부피는 비특이적 IgG, mAb 2C2 및 mAb H30를 받은 그룹에 대해 도시된다. 각 점은 하나의 동물을 나타낸다.

도 5는 C57BL/6 (면역-경쟁) 마우스에서 B16 무린 흑색종에 대한 2개의 단클론 항체의 효과를 도시한다. 종양 부피는 비특이적 IgG, mAb 2C2 및 mAb H30를 받은 그룹에 대해 도시된다. 각 점은 하나의 동물을 나타낸다.

도 6은 시간에 따라 누드(면역저하된) 마우스에서 B16 무린 흑색종에 대한 2개의 단클론 항체의 효과를 도시한다. 종양 부피는 비특이적 IgG, mAb 2C2 및 mAb H30를 받은 그룹에 대해 도시된다.

도 7은 시간에 따라 C57BL/6 (면역-경쟁) 마우스에서 B16 무린 흑색종에 대한 2개의 단클론 항체의 효과를 도시한다. 종양 부피는 비특이적 IgG, mAb 2C2 및 mAb H30를 받은 그룹에 대해 도시된다.

도 8은 누드(면역저하된) 마우스에서 GL261 무린 신경교종에 대한 2개의 단클론 항체의 효과를 도시한다. 종양 부피는 대조군(처리되지 않음), 비특이적 IgG, mAb 2C2 및 mAb H30를 받은 그룹에 대해 도시된다. 각 점은 하나의 동물을 나타낸다.

도 9는 C57BL/6 (면역-경쟁) 마우스에서 GL261 무린 신경교종에 대한 2개의 단클론 항체의 효과를 도시한다. 종양 부피는 대조군을 받은 그룹, 비특이적 IgG, mAb 2C2 및 mAb H30를 받은 그룹에 대해 도시된다. 각 점은 하나의 동물을 나타낸다.

도 10는 시간에 따라 C57BL/6 (면역-경쟁) 마우스에서 GL261 무린 신경교종에 대한 2개의 단클론 항체의 효과를 도시한다. 종양 부피는 대조군을 받은 그룹, 비특이적 IgG, mAb 2C2 및 mAb H30를 받은 그룹에 대해 도시된다.

도 11은 시간에 따라 누드(면역저하된) 마우스에서 GL261 무린 신경교종에 대한 2개의 단클론 항체의 효과를 도시한다. 종양 부피는 대조군을 받은 그룹, 비특이적 IgG, mAb 2C2 및 mAb H30를 받은 그룹에 대해 도시된다.

도 12는 서비빈 백신(SEQ ID NO:4)을 투여받은 환자에서 총 IgG의 생성을 도시한다. 데이터는 8명의 환자에 대해 도시된다. 혈청 EISA 연구는 야생형 서비빈 펩티드(아미노산 53-67 (SEQ ID NO:27)에 대한 혈청 IgG 반응성의 진행성의 증가를 나타낸다.

도 13는 서비빈 백신(SEQ ID NO:4)을 투여받은 환자에서 서비빈 특이적 IgG의 생성을 도시한다. 데이터는 8명의 환자에 대해 도시된다. 혈청 EISA 연구는 개질된 서비빈 펩티드(아미노산 53-67/M57 - SEQ ID NO:4)에 대한 혈청 IgG 반응성의 진행성의 증가를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 개시내용은, 서비빈 펩티드 백신 접종된 마우스로부터의 항혈청, 및 서비빈에 대한 정제된 무린 단클론 항체가 동물 모델에서 종양 성장을 저해하는 관찰에 기초한다. 이는, 놀랍게도 서비빈이, MHC 부류 I 프리젠테이션의 문맥을 제외하고 세포에 의해 분비되거나 세포 표면에 보이지 않는 것으로 고려되는 세포내 단백질이기 때문이다. 따라서, 항체-매개(수동적인) 서비빈 면역요법은 효과적이지 않을 것으로 예상된다. 그러나, 본 발명자들은 효과적인 요법을 찾아냈다.
- [0012] 이러한 개시내용은 단리된 항체 및 그 단편, 항체 또는 그 단편을 인코딩하는 단리된 핵산분자, 항체 또는 그 단편을 생성하는 세포, 항체 또는 그 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터 또는 세포, 상기 중 어느 하나를 포함하는 조성물, 상기 중 어느 하나의 제조 방법, 및 수반하는 서비빈-발현 종양과 같은 암의 치료에서 핵산분자 또는 항체 및 그 단편을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0013] 이 적용을 이용한 서열목록의 설명은 다음과 같다;
- [0014] SEQ ID NO:1은 인간 서비빈의 23개의 아미노산 길이 단편을 나타내는 아미노산 서열이다.
- [0015] SEQ ID NO:2은 단일 아미노산 변화에 의한 SEQ ID NO:1의 변이체이다.
- [0016] SEQ ID NO:3은 SEQ ID NO:2의 6개 아미노산 길이의 단편이다.
- [0017] SEQ ID NO:4는 SEQ ID NO:2의 15개의 아미노산 길이 단편이고 SEQ ID NO:3의 서열을 포함한다.
- [0018] SEQ ID NO:5는 SEQ ID NO:2의 10개의 아미노산 길이 단편이고 SEQ ID NO:3의 서열을 포함한다.
- [0019] SEQ ID NO:6은 SEQ ID NO:2의 9개의 아미노산 길이 단편이고 SEQ ID NO:3의 서열을 포함한다.
- [0020] SEQ ID NO:7은 mAb 2C2E7의 VH CDR1에 대한 아미노산 서열이다.
- [0021] SEQ ID NO:8은 mAb 2C2E7의 VH CDR2에 대한 아미노산 서열이다.
- [0022] SEQ ID NO:9은 mAb 2C2E7의 VH CDR3에 대한 아미노산 서열이다.
- [0023] SEQ ID NO:10은 mAb 2C2E7의 VL CDR1에 대한 아미노산 서열이다.
- [0024] SEQ ID NO:11은 mAb 2C2E7의 VL CDR2에 대한 아미노산 서열이다.
- [0025] SEQ ID NO:12은 mAb 2C2E7의 VL CDR3에 대한 아미노산 서열이다.
- [0026] SEQ ID NO:13은 mAb 30H3D2의 VH CDR1에 대한 아미노산 서열이다.
- [0027] SEQ ID NO:14은 mAb 30H3D2의 VH CDR2에 대한 아미노산 서열이다.
- [0028] SEQ ID NO:15은 mAb 30H3D2의 VH CDR3에 대한 아미노산 서열이다.
- [0029] SEQ ID NO:16은 mAb 30H3D2의 VL CDR1에 대한 아미노산 서열이다.
- [0030] SEQ ID NO:17은 mAb 30H3D2의 VL CDR2에 대한 아미노산 서열이다.
- [0031] SEQ ID NO:18은 mAb 30H3D2의 VL CDR3에 대한 아미노산 서열이다.
- [0032] SEQ ID NO:19은 mAb 2C2E7로부터 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열이다.
- [0033] SEQ ID NO:20은 mAb 2C2E7로부터 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열이다.
- [0034] SEQ ID NO:21은 mAb 30H3D2로부터 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열이다.
- [0035] SEQ ID NO:22은 mAb 30H3D2로부터 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열이다.

- [0036] SEQ ID NO:23은 2C2E7의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다 (SEQ ID NO:19의 아미노산 서열을 인코딩한다).
- [0037] SEQ ID NO:24은 2C2E7의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다 (SEQ ID NO:20의 아미노산 서열을 인코딩한다).
- [0038] SEQ ID NO:25은 30H3D2의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다 (SEQ ID NO:21의 아미노산 서열을 인코딩한다).
- [0039] SEQ ID NO:26은 30H3D2의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다 (SEQ ID NO:22의 아미노산 서열을 인코딩한다).
- [0040] SEQ ID NO:27은 인간 서비빈의 15개 아미노산 길이의 단편이다.
- [0041] 백신은 안티-서비빈 암 면역요법에서 한가지 방법을 제공하고, 항체에 의한 수동적인 면역요법을 사용하는 몇 개의 이점이 있다. 예를 들면, 인간화 단클론 항체는 1) (펩티드 백신과 달리) HLA가 제한되지 않고, 2) 종양에 의해 심각하게 면역저하된 환자 내의 암세포에 대해 잠재적으로 즉시 작용할 수 있고, 3) 투여 가능하고, 및 4) 또 다른 또는 상보적인 작용 메커니즘을 이용하기 위해 예를 들면 방사선 치료와 같은 백신 또는 그 외의 약물 또는 요법과 함께 사용될 수 있다. 상기 이점 중 하나 이상은 키메라 항체, 인간 항체 및 인간화 항체를 포함하는 일반적으로 mAb에 적용 가능하다.
- [0042] 본원에서 사용되는 "서비빈 펩티드" 또는 "서비빈 펩티드들"는 완전 길이의 서비빈의 단편을 의미하고, 야생형 서비빈, 예를 들면 인간 서비빈과 반응하는 항체를 생성할 수 있는 펩티드의 변이체를 포함한다. 본원에서 사용되는 "안티-서비빈 항체"는 서비빈 또는 하나 이상의 서비빈 펩티드(그 변이체 포함)와 반응하여 생성되는 항체를 의미한다.
- [0043] 일 형태에서, 본 개시내용은 서비빈의 하나 이상의 에피토프에 대해 반응성이 있는 항체 또는 그 단편을 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 항체는 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체를 포함한다. 적합한 서비빈 에피토프 또는 그 변이체의 예로는, 미국 특허 제7,943,138호, 및 제8,580,269호에서 제공되고, 본원에 참조로 포함되어 있다. 본 개시내용의 조성물은 인간 서비빈 내의 서열과 상동이거나 그 변이체인(예를 들면 적어도 95% 상동) 펩티드를 투여하는 것에 반응하여 생성되는 항체를 포함한다. 예를 들면, 항체는, 서비빈 서열 ENEPDLAQCFFCFKKELEGWEPDD (SEQ ID NO:1)의 다음 부분의 변이체인 펩티드의 투여 후 개체에서 생성되고 개체로부터 단리될 수 있다. 변이체는 ENEPDLAQMFFCFKKELEGWEPDD (SEQ ID NO:2 - SEQ ID NO:1의 9 위치에서 C가 M으로 변화한다)일 수 있다. 투여된 펩티드는 SEQ ID NO:2의 9 개 내지 23개(그 사이의 모든 정수 포함)의 인접한 아미노산일 수 있고, 펩티드는 QMFFCF의 코어 서열(SEQ ID NO:3)을 포함한다. 예시의 서비빈 펩티드는 DLAQMFFCFKKELEGW (SEQ ID NO:4), AQMFFCFKEL (SEQ ID NO:5), 및 QMFFCFKEL (SEQ ID NO:6)를 포함한다. 단리된 항체 또는 그 단편은 개질없이 사용되거나 이들은, 예를 들면 키메라 항체 또는 인간화 항체 또는 본원에 기재된 다양한 단편을 생성하기 위해 조작될 수 있다. 일 실시형태에서, 인간화 항체 또는 그 단편은 펩티드 DLAQMFFCFKKELEGW (SEQ ID NO:4)에 대한 반응성이 있는 것이 생성된다.
- [0044] 본원에서 사용되는 "항체"는 전체 항체 분자, 완전 길이 면역글로불린 분자, 예를 들면 자연 발생 완전 길이 면역글로불린 분자 또는 항체 단편뿐 아니라 면역글로불린 유전자 단편 재조합 공정에 의해 형성된 완전 길이 면역글로불린 분자를 포함할 수 있다. 항체 단편은 적어도 하나의 항체-항원 결합 부위를 포함하는 단편일 수 있다. 항체 단편은, 예를 들면 모티브 DLAQCFFCFKKELEGW (SEQ ID NO:27)를 포함하는 서비빈 또는 그 단편에 특이적으로 결합할 수 있다. "항체"는, 예를 들면 단클론, 다클론, 다중 특이적(예를 들면, 이중특이적), 재조합, 인간, 키메라 및 인간화 항체를 포함할 수 있다. "항체"는 재조합으로 발현하는, 항원 결합 단백질 및 항원 결합 합성 펩티드를 포함할 수 있다. 또한, "항체"는 미니바디 및 디아바디를 포함하고, 모두 바람직하게 그 단편의 서비빈(특히 인간 서비빈)에의 특이적 결합을 나타낸다. 본원에 사용되는 "항체"는 또한 생체 내에서 생성된 면역글로불린, 및 예를 들면 하이브리도마에 의해 시험관 내에서 생성된 것을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 항체는, 예를 들면, 아세틸화, 포르밀화, 아미드화, 포스포릴화, 또는 폴리에틸렌 글리콜화(PEGylation) 및 글리코실화에 의해 개질될 수 있다. 본원에 사용되는 "하나의 항체"는 본원에 기재된 모든 항체를 커버하는 것으로 의도된다. 예를 들면, "하나의 항체"는 단클론, 다클론, 키메라, 인간 또는 인간화 항체 또는 항원(즉 서비빈) 결합 단편을 의미할 수 있다.
- [0045] 다클론 항체의 생성을 위해 서비빈 펩티드의 투여가 사용될 수 있다. 예를 들면, 적합한 동물에는 하나 이상의 서비빈 펩티드가 투여될 수 있고, 혈청이 수집될 수 있다. 또한, 인간 안티-서비빈 항체-발현 세포는, 서비빈

또는 서비빈 펩티드로 백신 접종된 인간화 동물 또는 환자로부터, 예를 들면 임상 시험에 참석할 수 있는 개체로부터 분리될 수 있다. 환자 샘플로부터 IgG+ 기억 B 세포는 증식(expand)될 수 있고 IgG-분비 세포로 분화되도록 유도되고, 높은 친화성 표적(서비빈 펩티드) 결합에 스크리닝될 수 있다. 세포는 하이브리도마의 생성을 위해 사용될 수 있다. 항체 유전자의 가변 영역은 PIPE 방법을 사용하여 RT-PCR에 의해 분리된 세포로부터 클로닝될 수 있다(Dodev TS et al. (2014) Scientific Reports 4, 5885. doi:10.1038/srep058853). 재조합 인간, 인간화 또는 키메라 mAb가 이들 분자로부터 구축될 수 있고 기능성 및 결합 친화도 분석에서 안티-종양 활성을 위해 발현되고 스크리닝될 수 있다. 이 점에서, 본 발명자들은 임상 연구에서 몇 명의 환자에서 ELISA에 의해 특이적 항체를 검출할 수 있었다. 샘플은 기억 B 세포를 분리하는 데 추후 이용하기 위해 동결될 수 있다.

[0046] 본 개시내용의 항체는 전체 면역글로불린 분자, 예를 들면 다클론 또는 단클론 항체일 수 있거나 그 항원-결합 단편일 수 있고, 예를 들면 Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, CDR 단편, 단쇄 항체(scFv), 2가 단쇄 항체, 단쇄 파지 항체, 디아바디, 나노바디 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 항체의 단편은 합성적으로 또는 완전한 면역글로불린 효소 또는 화학 절단에 의해서 생성되거나 재조합 DNA 기술에 의해서 일반적으로 조작될 수 있다. 이러한 기술은 당해 기술분야에서 알려져 있다.

[0047] 일 실시형태에서 본 개시내용은 분리된 항체를 제공한다. "분리된"이란 항체 또는 그 단편이 자연 환경으로부터 분리되고 및/또는 회수되는 것을 의미한다. 자연 환경으로부터 항체 단리는 항체가 자연 환경에 일반적으로 존재하는 그 외의 활성제(예를 들면 그 외의 단백질)로부터 방해없이 사용될 수 있다.

[0048] 일 실시형태에서, 본 개시내용은 낙타에 서비빈 또는 서비빈 펩티드를 도입하는 것에 반응하여 낙타에 의해서 생성된 단일 도메인 항체 또는 나노바디를 생성하고 분리하는 것을 제공한다. 나노바디는 일반적으로 중쇄 항체이므로 중쇄 동종이량체를 포함하고 항체 경쇄를 포함하지 않는다. 이들 항체는 일반적으로 단일 가변 도메인 및 2개의 불변 도메인을 포함한다(CH2 및 CH3).

[0049] 본 개시내용의 항체는 인간 또는 비-인간 동물로부터 얻어질 수 있다. 다수 동물에서 완전 면역글로불린은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 갖는다. 각각의 경쇄는 디설파이트 결합에 의해 중쇄에 공유 결합된다. 2개의 중쇄는 추가의 디설파이트 결합에 의해 서로 결합된다. 경쇄는 일반적으로 1개의 가변 도메인(VL) 및 1개의 불변 도메인(CL)을 갖는다. 중쇄는 또한 1개의 가변 도메인(VH)을 가질 수 있다. 가변 도메인은 상보적으로 결정 영역(CDR)을 포함한다. 중쇄는 3개 또는 4개의 불변 도메인(CH1, CH2, CH3 및 CH4)을 더 가질 수 있다. 불변 도메인의 가변성에 의해 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM 등의 다양한 아이소 타입을 형성한다.

[0050] CDR은 주로 항원의 에피토프에 결합하는 것에 기인한다. 각각의 사슬의 CDR은 일반적으로 CDR1, CDR2, 및 CDR3로 지칭하고, N-말단으로부터 출발해서 연속적으로 넘버링하고, 일반적으로 특정한 CDR이 위치한 사슬에 의해 확인된다. 따라서, V_H CDR3 (또는 VH-CDR3)은 발견되는 항체의 중쇄의 가변 도메인에 위치하는 반면, V_L CDR1 (또는 VL-CDR1)은 발견되는 항체의 경쇄의 가변 도메인으로부터의 CDR1이다. 서비빈 또는 서비빈 펩티드에 결합하는 항체는, 예를 들면 특이적 V_H 영역 및 V_L 영역 서열을 가지므로 특이적 CDR 서열을 갖는다. 상이한 특이성(즉 상이한 항원에 상이한 결합 부위)를 갖는 항체는 상이한 CDR을 갖는다.

[0051] 본원에 사용되는 V_H 또는 VH는 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 의미하고, 이는 Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 중쇄를 포함하고, V_L 또는 VL의 용어는 면역들로 불린 경쇄의 가변 영역을 의미하고, Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 경쇄를 포함한다.

[0052] "단클론 항체"의 용어는 B-림프구의 단클론 또는 단항체의 경쇄 및/또는 중쇄 유전자가 트랜스펙션된 세포에 의해 생성된 항체를 의미한다. 단클론 항체는 예를 들면 면역 비장 세포와 골수종 세포의 융합으로부터 하이브리드 항체 형성 세포 제조에 의해 당업자에게 공지된 방법에 의해서 생성된다. 예를 들면, 마우스(또는 그 외의 적합한 동물)은 하나 이상의 서비빈 펩티드로 면역화된 후 복수 액체 샘플이 수집될 수 있다. 샘플이 단클론 항체의 패널 및 상응하는 하이브리도마 세포주를 개발하기 위해 스크리닝되고 선택될 수 있다. 무린(또는 그 외의) 단클론 항체는 분리되거나 생성된 후 필요에 따라 인간화될 수 있다.

[0053] 본 개시내용의 항체는 임의 부류의 항체일 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체는 항체 아이소 타입 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 또는 IgE일 수 있다. 예를 들면, 항체는 IgG2b일 수 있다. 본원에서 사용되는 "아이소 타입"은 특히 중쇄 불변 영역 유전자에 의해서 인코딩되는 항체 부류(예를 들면 IgG)를 의미할 수 있다. 인간 면역글로불린 불변 영역의 서열은 해당 기술분야에서 공지되고 National Center for Biotechnology

Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine 등의 공공 데이터베이스에서 이용 가능하다.

[0054] "키메라 항체"의 용어는 서비빈에 특이하게 결합하는 무린 항체 등의 또 다른 종으로부터의 (일반적으로 항원 결합을 제공하는) CDR 및 인간 등의 1종으로부터 프레임워크 잔기를 갖는 항체를 의미한다. 키메라 항체에서, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정한 종으로부터의 서열과 상동이거나 균질할 수 있고 그 외의 부분은 상이한 종으로부터의 서열과 상동이거나 균질할 수 있다. 키메라 항체는 일반적으로 면역원성을 감소시키고 안정성을 증가시킨다. 해당 기술분야에서 공지된 무린 면역글로불린 가변 도메인을 클로닝하기 위한 기술 - 예를 들면 Orlandi et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989), 및 Leung et al., Hybridoma 13:469 (1994) 참조. 키메라 항체의 일례로는, 인간 외의 동물(예를 들면, 마우스, 래트 또는 닭)으로부터 유래된 항체의 경쇄 또는 중쇄의 가변 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가, 키메라 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(예를 들면 DNA)를 생성하기 위해 인간 항체로부터 유래된 경쇄 또는 중쇄의 불변 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 결합될 수 있다. 키메라 항체의 예로는 SEQ ID NOs:19 및 20을 포함하는 것 및 SEQ ID NOs:20 및 21을 포함하는 것을 포함한다.

[0055] "인간" 항체(또한 "완전 인간" 항체 라고 함)는 단일 또는 상이한 인간 면역글로불린으로부터 모든 CDR 및 인간 프레임워크 영역을 포함하는 항체이다. 따라서, 하나의 인간 항체로부터 프레임워크는 상이한 인간 항체로부터 CDR을 포함하도록 조작될 수 있다. 인간 항체를 생성하기 위한 방법은 해당 기술분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, Mancini et al., 2004, New Microbiol. 27:315-28; Conrad 및 Scheller, 2005, Comb. Chem. High Throughput Screen. 8:117-26 참조.

[0056] "인간화 항체"는 일반적으로 비-인간인 공급원으로부터 항체에 제공된(즉, 이것에 도입된) 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는 인간 항체이다. 예를 들면, 인간화 항체는 설치류, 토끼, 개, 염소 또는 말 등의 일종으로부터의 항체의 CDR이 인간 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인에 제공되는 재조합 단백질이다. 항체 분자의 불변 도메인(또한, 프레임워크 영역으로 지칭)은 일반적으로 인간 항체의 것과 동일하다. CDR을 제공하는 비-인간 면역글로불린은 "도너"라고 하고 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린은 "어셉터"라고 한다. 예를 들면, 모든 CDR은 인간화 면역글로불린에서 도너 면역글로불린으로부터 일 수 있다. 불변 영역은 항상 존재할 필요는 없지만, 이들이 있는 경우 실질적으로 인간 면역글로불린 불변 영역과 상동일 수 있고, 즉 적어도 약 85~90%, 예를 들면 약 90% 이상 상동이다. 인간화 항체는 CDR을 제공하는 도너 항체와 동일한 항원에 결합한다. 인간화 면역글로불린 또는 항체의 어셉터 프레임워크는 도너 프레임워크로부터 취해진 아미노산으로 치환된 제한된 수를 가질 수 있다. 인간화 또는 그 외의 단클론 항체는 항원 결합 또는 그 외의 면역글로불린 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 추가의 보존 아미노산 치환을 가질 수 있다. 인간화 면역글로불린은 유전자 조작에 의해서 구축될 수 있다(예를 들면, U.S. Pat. No. 5,585,089, 및 U.S. Publication No. 2010/0196266 참조). 예를 들면, 무린 단클론 항체는 단리되거나 생성된 후 인간화될 수 있다. 인간화 항체의 예로는 SEQ ID NOs:7 ~ 12의 서열을 갖는 CDR을 포함하는 것 및 SEQ ID NOs:13 ~ 18의 서열을 갖는 CDR을 포함하는 것을 포함한다.

[0057] 항체 단편은 효소 소화에 의해서 생성될 수 있다. 예를 들면, 항체의 파파인 소화는 2개의 상동인 항원 결합 단편을 생성하고 이는 "Fab" 단편 및 "Fc" 단편이라고 한다. Fab 단편은 전체 L 쇄 및 H 쇄의 가변 영역 도메인(VH) 및 중쇄의 제1 불변 도메인을 포함한다. 각각 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이고, 즉 단일 항원-결합 부위이다. 항체의 펩신처리는 단일의 큰 F(ab')₂ 단편을 생성하고, 이는 2가의 항원-결합 활성을 갖는 2개의 디설파이드 결합된 Fab 단편에 대략 상응하고 항원에 가교될 수 있다. "FV"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이고, 또한 "sFv" 또는 "scFv" 라고 약칭하는 단쇄 Fv는 단일 폴리펩티드쇄에 연결된 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. "디아바디"의 용어는 VH와 VL 도메인 사이의 짧은 링커로 sFv 단편을 구축함으로써 제조된 작은 항체 단편을 의미하고, V 도메인의 사슬내(intrachain) 쌍을 형성하는 것이 아니라 사슬간(interchain) 형성하는 것이 달성되고, 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 형성한다. 단일 도메인 항체(sdAb)는 단일 1가 가변 항체 도메인을 갖는 항체 단편이다. ScAb는 낙타에서 발견된 중쇄 항체로부터 제조될 수 있다. 항체 단편은 단일 CDR로 이루어지는 또는 이를 포함하는 단일 가변 영역 또는 펩티드일 수 있다. 단쇄 항체는 링커에 의해서 서로 선형 결합되는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. 단쇄 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(예를 들면 DNA)는 중쇄 가변 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(일반적으로 10-20 뉴클레오티드), 및 경쇄 가변 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 결합해서 생성될 수 있고, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 인간 항체로부터 유래된다.

- [0058] 본 발명의 항체는 이중 특이적이거나 다중 특이적일 수 있다. 이중특이적 항체(디아바디)는 서비빈의 2개의 상이한 에피토프 등의 항원의 적어도 2개의 상이한 에피토프의 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예를 들면, 이중특이적 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(예를 들면, DNA)는, 중쇄 가변 영역 A 를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 경쇄 가변 영역 B를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 중쇄 가변 도메인 B를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 경쇄 가변 도메인 A를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 순서로 결합함으로써 생성될 수 있다. 바람직하게, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 인간 항체로부터 유래된다.
- [0059] 본 개시내용은 SEQ ID NOs: 1 내지 29에 기재된 서열의 변이체를 제공한다. 예를 들면, 변이체는 SEQ ID NOs:1-27에 개시된 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 가질 수 있다.
- [0060] 본 개시내용은 키메릭 항원 리셉터(CAR)를 발현하도록 형질도입된 T 세포를 제공한다. 본 개시내용의 CAR 분자는 서비빈의 항체-기반 특이성을 T 세포 리셉터 활성 세포간 도메인과 결합하고, 특이적 안티-서비빈을 나타내므로, 항종양 세포 면역 활성을 나타내는 키메릭 단백질을 생성한다. CAR 분자는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 본 개시내용은 안정하게 CAR을 발현하도록 유전자 개질된 T 세포를 제공한다. CAR을 발현하는 T 세포는 본원에서 CAR T 세포 또는 CAR 개질 T 세포로서 지칭된다. 예를 들면, T 세포는 본원에 기재된 단클론 등의 특이적 항체의 서비빈 인식 도메인을, 단일 키메릭 단백질에 CDR-제타쇄의 세포간 도메인과 결합하는 CAR을 안정하게 발현하도록 유전자 개질될 수 있다.
- [0061] 일례로, 본 개시내용은 단클론 항체를 제공하고, 단리된 단클론 항체일 수 있고, 특이적으로 서비빈에 결합하고, 인간 서비빈일 수 있다. 일례로서, mAb 지정된 2C2 및 mAb 지정된 H30 (또는 30H3)이 제공된다. 최종 항체 서열 결정 및 IgG 정제에 사용된 mAb 2C2의 서브클론은 2C2E7로 지정되고, 최종 항체 서열 결정 및 IgG 정제에 사용된 mAb H30의 서브클론은 30H3D2로 지정되었다. 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 중쇄 가변 영역은 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함한다. 일례로서, VH CDR1은 아미노산 서열 TYGMS (SEQ ID NO:7)을 갖고, VH CDR2은 아미노산 서열 WINPYSGVPTYAVDFKG (SEQ ID NO:8)을 갖고, VH CDR3은 아미노산 서열 GRRGDFGY (SEQ ID NO:9)을 갖고, VL CDR1은 아미노산 서열 SASSISYMH (SEQ ID NO:10)을 갖고, VL CDR2은 아미노산 서열 DTSKLAS (SEQ ID NO:11)을 갖고, VL CDR3은 아미노산 서열 HQRSSHHT (SEQ ID NO:12)을 갖는다. 또 다른 예로서, VH CDR1은 아미노산 서열 SYGMS (SEQ ID NO:13)을 갖고, VH CDR2은 아미노산 서열 TISSGGSHTYYPDSVRG (SEQ ID NO:14)을 갖고, VH CDR3은 아미노산 서열 HPIYYYISSYAMDY (SEQ ID NO:15)을 갖고, VL CDR1은 아미노산 서열 RSSQLVHSTGNTYLH (SEQ ID NO:16)을 갖고, VL CDR2은 아미노산 서열 KVSNRFS (SEQ ID NO:17)을 갖고, VL CDR3은 아미노산 서열 SQSTHPPT (SEQ ID NO:18)을 갖는다.
- [0062] 본 개시내용의 항체는 SEQ ID Nos:7, 8, 9에 기재된 서열과 상이한 1개 또는 2개의 아미노산을 갖는 VH CDR을 갖고 및/또는 SEQ ID NOs:10, 11, 12에 기재된 서열과 상이한 1개 또는 2개의 아미노산을 갖는 VL CDR을 갖는 항체일 수 있다. 본 개시내용의 항체는 SEQ ID Nos:13, 14, 15에 기재된 서열과 상이한 1개 또는 2개의 아미노산을 갖는 VH CDR을 갖고 및/또는 SEQ ID NOs:16, 17, 18에 기재된 서열과 상이한 1개 또는 2개의 아미노산을 갖는 VL CDR을 갖는 항체일 수 있다.
- [0063] 본 개시내용의 항체는, 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 19의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 20의 서열을 포함하는 항체일 수 있다. SEQ ID NO:19의 서열에서, 아미노산 1~19는 리더 서열을 나타내고, 아미노산 20 내지 49는 프레임워크 영역(FR) 1을 나타내고, 아미노산 50 내지 54는 CDR1을 나타내고, 아미노산 55 내지 68은 FR2를 나타내고, 아미노산 69 내지 85는 CDR2를 나타내고, 아미노산 86 내지 117은 FR3를 나타내고, 아미노산 118 내지 126은 CDR3을 나타내고, 아미노산 127 내지 137은 FR4를 나타낸다. SEQ ID NO: 20의 서열에서, 아미노산 1 내지 22는 리더 서열을 나타내고, 아미노산 23 내지 45는 FR1을 나타내고, 아미노산 46 내지 55는 CDR1을 나타내고, 아미노산 56 내지 70은 FR2를 나타내고, 아미노산 71 내지 77는 CDR2를 나타내고, 아미노산 78 내지 109은 FR3를 나타내고, 아미노산 110 내지 117은 CDR3을 나타내고, 아미노산 118 내지 127은 FR4를 나타낸다.
- [0064] 본 개시내용의 항체는 SEQ ID NO:21의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:22의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체일 수 있다. SEQ ID NO:21의 서열에서, 아미노산 1 내지 19는 리더 서열을 나타내고, 아미노산 20 내지 49는 FR1을 나타내고, 아미노산 50 내지 54는 CDR1을 나타내고, 아미노산 55 내지 68은 FR2를 나타내고, 아미노산 69 내지 85는 CDR2를 나타내고, 아미노산 86내지 117은 FR3를 나타내고, 아미노산 118 내지 131은 CDR3을 나타내고, 아미노산 132 내지 142은 FR4를 나타낸다. SEQ ID NO:22의 서열에서, 아미노산 1 내지 19는 리더 서열을 나타내고, 아미노산 20 내지 42는 FR1을 나타내고, 아미노산 43 내지 58는 CDR1을

나타내고, 아미노산 59 내지 73은 FR2을 나타내고, 아미노산 74 내지 80는 CDR2을 나타내고, 아미노산 81내지 112은 FR3을 나타내고, 아미노산 113 내지 121은 CDR3을 나타내고, 아미노산 122 내지 131은 FR4을 나타낸다.

[0065] 본 개시내용의 항체는 SEQ ID NO:19 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:20의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 90% 내지 99% 서열 상동성을 갖는 그 변이체를 포함하는 항체일 수 있다. 본 개시내용의 항체는 SEQ ID NO:21 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:22의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 90% 내지 99% 서열 상동성을 갖는 그 변이체를 포함하는 항체일 수 있다. 항체는 리더 서열을 제외(즉 아미노산 1 내지 19를 제외)한 SEQ ID NO:19의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 리더 서열을 제외(즉 아미노산 1 내지 22를 제외)한 SEQ ID NO:20의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 90% 내지 99% 서열 상동성을 갖는 변이체를 포함하는 항체일 수 있다. 본 개시내용의 항체는 리더 서열을 제외(즉 아미노산 1 내지 19를 제외)한 SEQ ID NO:21의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 리더 서열을 제외(즉 아미노산 1 내지 19를 제외)한 SEQ ID NO:22의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 90% 내지 99% 서열 상동성을 갖는 변이체를 포함하는 항체일 수 있다.

[0066] 본 개시내용의 항체는 SEQ ID NO:19과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성인 서열을 갖고 SEQ ID NO:7의 서열을 갖는 CDR1, SEQ ID NO:8의 서열을 갖는 CDR2, 및 SEQ ID NO:9의 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 SEQ ID NO:20과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동인 서열로서 SEQ ID NO:10의 서열을 갖는 CDR1, SEQ ID NO:11의 서열을 갖는 CDR2, 및 SEQ ID NO:12의 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체일 수 있다.

[0067] 본 개시내용의 항체는 SEQ ID NO:21과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성인 서열을 갖고, SEQ ID NO:13의 서열을 갖는 CDR1, SEQ ID NO:14의 서열을 갖는 CDR2, 및 SEQ ID NO:15의 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 SEQ ID NO:20과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동인 서열로서 SEQ ID NO:16의 서열을 갖는 CDR1, SEQ ID NO:17의 서열을 갖는 CDR2, 및 SEQ ID NO:18의 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체일 수 있다.

[0068] 본 개시내용의 항체는 SEQ ID NOs: 7, 8 및 9의 서열을 갖는 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NOs: 10, 11 및 12의 서열을 갖는 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하거나 SEQ ID NOs: 13, 14 및 15의 서열을 갖는 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NOs: 16, 17 및 18의 서열을 갖는 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 키메릭, 인간 또는 인간화 항체일 수 있다.

[0069] 본 개시내용은 또한 서비빈 특이적 항체에 중쇄 가변 영역의 모두 또는 일부를 인코딩하는 단리된 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 예를 들면, 본 개시내용은 SEQ ID NOs: 23 또는 25의 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 본 개시내용의 단리된 뉴클레오티드 분자는 서비빈 특이적 항체의 경쇄 가변 영역의 모두 또는 일부를 인코딩할 수 있다. 예를 들면, 단리된 핵산 분자는 SEQ ID NOs: 24 또는 26의 서열을 포함할 수 있다. 핵산 분자의 변이체는 중쇄 가변 영역에 SEQ ID NOs: 23 또는 25의 서열 또는 경쇄 가변 영역에 SEQ ID NOs: 24 또는 26의 서열과 적어도 90% 내지 적어도 99% 상동성을 가질 수 있다.

[0070] 본 개시내용은 또한 서비빈 에피토프를 인식하는 하나 이상의 CDR을 인코딩하는 서열(예를 들면 SEQ ID NOs: 7 내지 18을 인코딩하는 서열이다)을 포함하거나 이들로 이루어진 단리된 핵산 분자를 제공한다. 핵산 분자는 SEQ ID NOs: 7 내지 18의 서열의 어느 하나로 이루어지거나 핵산 분자는 SEQ ID NOs: 7 내지 18의 하나 이상의 서열을 포함하고 일반적으로 서열에 인접한 추가의 1개 내지 50개의 뉴클레오티드를 더 포함한다

[0071] 본 개시내용은 본원에서 제공된 항체(mAbs) 또는 그 서비빈 결합 단편을 인코딩하는 발현 벡터 또는 그 외의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 세포를 제공한다. mAbs 또는 그 서비빈 결합 단편을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 임의의 적합한 발현 벡터를 사용하여 발현되고, 그 대부분은 해당 기술분야에서 공지되어 있고 및/또는 시판되고 있다. 벡터는 일반적으로 핵산 서열을 포함하고, 예를 들면 숙주 세포에 복제할 수 있는 기원 또는 복제이다. 벡터는 또한 선택 가능한 마커 유전자를 포함할 수 있다. 중쇄 및 경쇄는 단일 발현 벡터 상에서 발현되고 예를 들면 플라스미드 또는 중쇄 및 경쇄는 동일한 세포에서 원거리 플라스미드 상에서 발현되고, 그 후 발현 중쇄 및 경쇄는 종래의 mAb 아키텍처를 형성할 수 있다. mAb 또는 서비빈 결합 단편은 본 개시내용의 이익을 제공하는 것이면 종래의 기술을 사용하여 단리되고 및/또는 정제될 수 있다.

[0072] 단리된 단클론 항체 또는 그 단편은 예를 들면 효소, 형광체 또는 방사성 태그로 표지될 수 있거나 예를 들면 독소와 같은 이펙터 분자에 컨쥬게이트될 수 있다.

- [0073] 본 개시내용은 항체 또는 그 단편 및 약학적으로 적합한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 적합한 담체는 사용되는 농도 및 투여량에서 수령자에게 비독성인 부형제 또는 안정제를 포함하고, 아세테이트, Tris, 포스페이트, 시트레이트, 및 그 외의 유기산 등의 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌 등의 항산화제; 옥타데실 디메틸벤질 암모늄 클로라이드 등의 방부제; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤 등의 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알기닌 또는 리신 등의 아미노산; 글루코오스, 만노스 또는 텍스트린 등의 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 그 외의 카르보하이드레이트; EDTA 등의 킬레이팅제; 트레할로스 및 소듐 클로라이드 등의 강장제; 수크로오스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨 등의 당; 폴리스อร์베이트 등의 계면활성제; 소듐 등의 염형성 대이온; 및/또는 Tween 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등의 비이온성 계면활성제이다. 약학적 조성물은 그 외의 치료제를 포함할 수 있다.
- [0074] 본 개시내용의 조성물은 2개 이상의 형태의 단클론 항체의 또는 1개의 형태의 단클론 항체를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 조성물은 항체 또는 그 단편 또는 변이체의 하나 이상을 가질 수 있다. 조성물은 단클론 및 다클론 항체를 가질 수 있다. 조성물은 항체의 하나 이상의 아형을 포함할 수 있다. 예를 들면, 조성물은 IgG 또는 IgM의 혼합물 또는 IgG1, IgG2, 및 IgG2b의 하나 이상의 혼합물을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 조성물은 단지 활성 성분으로서 항체를 포함할 수 있고, 항체는 단클론, 다클론, 키메라, 인간, 인간화 항체 또는 이들의 조합일 수 있다. "활성 성분"은 종양 성장을 저해함으로써 항종양 효과를 갖는 것을 의미한다.
- [0075] 본 개시내용의 약학적 조성물은 각각의 항체 또는 전체 항체의 0.1 mg/ml 내지 100 mg/ml의 농도 범위, 1 mg/ml 내지 10 mg/ml, 1 mg/ml 내지 50 mg/ml, 1 mg/ml 내지 100 mg/ml, 10 mg/ml 내지 100 mg/ml, 또는 50 mg/ml 내지 100 mg/ml의 농도 범위로 하나 이상의 항체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 개시내용의 약학적 조성물은 항체의 적어도 또는 약 0.1 mg/ml, 적어도 또는 약 1 mg/ml, 적어도 또는 약 5 mg/ml, 적어도 또는 약 10 mg/ml, 적어도 또는 약 50 mg/ml, 적어도 또는 약 100 mg/ml을 포함할 수 있다.
- [0076] 본 개시내용의 조성물은 해당 기술분야에서 공지된 일상적인 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 항체 또는 그 단편을 포함하는 조성물은 정맥내, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 두개내, 활액내(intrasynovial), 뇌척수액, 경구, 국소, 또는 흡입 경로 또는 뇌내 또는 척수내 대류 확장 송달 또는 직접 종양내 주사를 통해 투여될 수 있다. 항체는 표적 부위(종양에 또는 종양내)에서 직접 비경구 투여될 수 있다. 조성물은 단회 투여 또는 다회 투여로 도입될 수 있고 시간 경과에 따라 연속적인 방법으로 도입될 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 적어도 2일 예를 들면 2~30일 동안(그 사이 정수를 포함) 매일 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 7~10일 동안 매일 투여된다. 또한 소량의 간격(예를 들면, 2, 3, 4, 5 일 마다)으로 투여될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 방법에서 사용되는 특정한 투여 계획의 형태 및 특성은 투여경로 및 그 외의 공지된 변수, 예를 들면 개체의 크기 및 질병의 단계인 것이 당업자에게 인식된다. 또한, 조성물은 치료를 필요로 하는 개체에 투여하기 위한 단위 투여 형태로 제공될 수 있다. 항체는 투여 전에 재구성하기 위한 동결건조형태로 제공될 수 있다. 재구성 배지는 멸균 0.9% 식염수 또는 적합한 생리학적 완충액 또는 물, 또는 투여 전에 단백질을 재구성하기 위한 해당 기술분야에서 공지된 임의의 그 외의 용액일 수 있다.
- [0078] 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 개체에 투여하기 위해 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 예를 들면 키트는 동결건조 형태일 수 있는 1개 이상의 항체, 선택적으로 재구성 배지, 및 투여 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 단회 투여 또는 다회 투여를 포함할 수 있다.
- [0079] 본 개시내용은 서비빈 발현 세포를 포함하는 종양 등의 종양을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 종양은 "서비빈-발현 종양"으로 지칭될 수 있다. "치료"의 용어는 치료될 특정한 질환의 존재와 관련된 하나 이상의 징후 또는 특성의 감소를 의미한다. 치료는 반드시 완전한 제거를 의미하지 않고 재현이나 재발을 막는 것을 의미하지 않는다. 예를 들면, 본 개시내용은 종양의 크기를 감소하거나 종양 성장을 저지하거나 종양(예를 들면 서비빈-발현 세포를 포함하는 종양) 성장속도를 감소하거나, 종양에 가해진 개체와 관련된 임의의 다른 징후를 감소시키기 위한 방법을 제공하고 - 모두 치료로 고려되고 - 본원에 기재된 치료 유효량의 항체 또는 그 단편을 포함하는 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 수동 면역화의 방법이다.
- [0080] 본 조성물에 의해 치료될 수 있는 종양의 예로는, 신경교종, 교모세포종, 수모세포종, 다발성골수종, 흑색종, 수막종, 유방선암, 난소암, 전립선 암종, 백혈병, 림프종, 대장암종, 췌장암, 간암, 신장암, 육종을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0081] 본 발명의 방법은 서비빈 펩티드를 백신으로서 사용하는 것과 함께 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물은 그 외의 치료제 전에, 동시에, 그 후에 투여될 수 있다.
- [0082] 일 형태에서 본 개시내용은 서비빈의 하나 이상의 에피토프에 반응성인 단리된 항체를 포함하는 조성물을 제공하고, 단리된 항체 또는 그 항원 결합 단편은 서비빈의 하나 이상의 에피토프에 결합한다. 서열 ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD (SEQ ID NO:2), 또는 그 단편 (예를 들면 SEQ ID NO:4)을 갖는 펩티드의 투여에 반응하여 생성될 수 있고, 단편은 SEQ ID NO:2의 9 내지 23 (그 사이의 모든 정수를 포함) 연속적인 아미노산을 갖고, 펩티드는 QMFFCF (SEQ ID NO:3)의 코어 서열을 포함한다. 조성물은, 단지 항체 또는 항체들이 서비빈 펩티드의 투여에 반응하여 생성된 단리된 항체/항체들일 수 있다. 조성물은 담체 단백질 등의 그 외의 단백질을 가질 수 있다. 항체는 키메라, 인간 또는 인간화 항체일 수 있다. 항체는 단클론 또는 다클론 항체 또는 단쇄 또는 다중특이적 항체일 수 있다.
- [0083] 특이적 항원에 대한 항체의 반응성은 예를 들면 ELISA의 일상적인 방법에 의해서 측정될 수 있다. 반응성은 결합 친화성을 나타낸다. 결합 친화성은 또한 항원/항체 해리 속도 또는 경쟁 방사면역법에 의해서 측정될 수 있다. 항원-항체 특이적 결합은 높은 친화성으로 항원을 결합하고 관련되지 않은 항원에 특이적으로 결합하지 않는 것을 의미한다.
- [0084] 일 형태에서, 본 개시내용은 서열 ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD (SEQ ID NO:2) 또는 그 단편(예를 들면 SEQ ID NO:4)을 갖는 펩티드의 투여에 반응하여 생성되는 하나 이상의 항체를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 수동 면역화 방법을 제공하고, 상기 단편은 SEQ ID NO:2의 9 내지 23 (모든 정수 포함) 연속한 아미노산을 갖고, 펩티드는 QMFFCF (SEQ ID NO:3)의 코어 서열을 포함하고, 항체는 피험체(인간 또는 비인간)로부터 단리되고, 하이브리도마 상정액에서 증가시키거나(raise) 또는 이로부터 얻어지거나 단리된 항체로부터 서열을 사용하여 조작된 항체일 수 있다.
- [0085] 다음의 실시예는 설명을 위한 것으로 제한하는 것을 의도하지 않는다.
- [0086] 실시예 1
- [0087] 이 실시예는 종양 성장에 대한 안티-서비빈 항체의 효과를 입증하는 동물 연구가 기재되어 있다.
- [0088] 마우스는 DLAQMFFCFKELEGW-키홀-림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin, KLH) (SurVaxM) (SVN53-67/M57-KLH) (SEQ ID NO:4)를 면역화로서 투여했다. 마우스에는 100 μ g의 펩티드를 피하 주사했다. 마우스는 28일 동안 7일마다 1회 반복 면역화했다. 최종 면역화 후 2주에 마우스를 CO₂ 질식에 의해 안락사시키고 심장에 구멍을 뚫어서 혈액을 수집했다. 혈액을 응고시키고 10,000 x g 원심분리해서 청정화된 혈청을 생성했다. 서비빈 항혈청을 사용하여 종양 이식 모델에서 수동면역화했다.
- [0089] 두개내 피하종양 모델을 사용하여 종양 성장에 대한 안티-서비빈 항체의 효능을 나타냈다. 두개내 연구에서는 해부학적 기준점으로서 브레그마 두개 봉합선에 1mm 전, 2mm 횡 및 3mm 깊이로 배치된 두개내 버 홀을 통해 26 게이지 바늘을 통해 진행되고, 1 x 10⁵ GL261 신경교종 세포를 이식한, 마취된 C57BL/6 마우스를 사용했다. 3일 후 마우스를 무작위로 그룹에 나누고 대조군으로 10 μ g의 안티-서비빈 항체 또는 10 μ g의 일반적인 IgG를 주사했다. 항체는 20일 동안 5일마다 총 4회로 투여했다. 마우스는 종양 성장의 지표로서 신경학적 결함의 징후로 추적하고 확립된 기준에 따라 희생시켰다. 데이터는 생존율을 나타내고 카플란 마이어(Kaplan-Meier) 플롯에 표시되고, p<0.0001이다.
- [0090] 피하 종양 모델은 23 게이지 피내 바늘을 통해 1x10⁶ GL261 신경교종 세포를 우측 옆구리에 피하주사하여 확립했다. 종양은 약 2 mm 직경에 도달할 때까지 7일동안 성장했다. 그 다음에 7일에 마우스에 100 μ g SurVaxM (SVN53-67/M57-KLH) 서비빈 백신을 투여하거나 서비빈에 대해 반응성인 단클론 항체 또는 SurVaxM 서비빈 백신을 받은 비종양 보유 풀링된 마우스로부터 유래된 10 μ g mAb (항체) 또는 SurVaxM을 이전에 투여된 마우스로부터 마우스 혈청의 형태로 50 μ l 안티-서비빈 항체를 투여했다. 치료는 28일 동안 7일마다 4회 투여로 재투여했다. 종양은 매일 측정하고 식 V=XY²/2을 사용하여 부피를 산출하였다. 마우스는 60일 동안 추적했다. 데이터는 결합된 종양 부피(도 1)로 표시하고, 개별 종양 진행(도 2)로서 표시되고, p<0.0001이다. SurVaxM 백신은 펩티드가 서열 DLAQMFFCFKELEGW (SEQ ID NO: 4)을 갖는 백신을 의미한다.
- [0091] 이들 연구 결과는 다음과 같다. 도 1에 도시된 바와 같이 종양 이식 후 7일에 1회로 안티-서비빈 항체를 투여한 GL261 신경 교종을 갖는 두개내 신경교종 모델 C57BL/6 마우스에서, 안티-서비빈 항체를 받은 마우스는 대조

군에 비해 상당히 길게 생존했다. 사용된 IgG는 정상적인 마우스 비-특이적 IgG이다. 도 2는 GL261 신경교종을 갖는 C57BL/6 마우스에서 피하 종양 모델을 나타낸다. 마우스는 종양 이식 후 7일마다 1회 표시된 치료제를 투여했다. 두개내 연구와 마찬가지로, 정제된 mAb 또는 항혈청을 받은 마우스는 대조군에 비해 상당히 작은 종양을 갖고 활성 백신 자체에 의해 관찰된 항종양 효과를 상반된다. 도 3은 GL261 신경교종을 갖는 C57BL/6 마우스에서 피하 종양 모델을 나타낸다. 마우스는 종양 이식 후 7일마다 1회 표시된 치료제를 투여했다. SurVaxM는 서비빈 백신이고; 안티-서비빈 혈청(항체)는 활성 SurVaxM 백신을 받은 비종양 보유 플러딩된 마우스로부터 유래되었다. 데이터는 50일에 걸쳐 개별 종양 성장을 나타낸다 (그룹당 n=4)

[0092] 서비빈 항체의 투여는 종양 부피를 감소시키고 생존을 연장시키는 데 효과적인 것을 입증한다.

[0093] 실시예 2

[0094] 본 실시예는 종양 성장을 저해하기 위한 항체의 유효성 및 단클론 항체의 제조를 기재한다.

[0095] 방법

[0096] 세포주 및 배양 조건

[0097] GL261 무린 신경교종 세포 및 B16f1 무린 흑색종 세포주는 10% 소 태아 혈청, 5000 유닛 페니실린/스트렙토마이신, 50 mM 2-메르캅토에탄올, 25mM HEPES, 및 1x 비필수적인 아미노산을 포함하는 완전한 둘베코 개질 이글스 배지(DMEM)에서 5% CO₂ 중 37°C에서 100-mm 조직 배양 플레이트 상에서 성장하고, 1주당 2 내지 3회의 배지를 변경한다.

[0098] 펩티드

[0099] 펩티드 합성은 Fmoc 화학 및 고체 지지체 수지 (Genscript, Piscataway, NJ)를 사용하여 수행했다. 각각의 펩티드는 사용시까지 -20°C에서 저장하고 DMSO에 희석했다. 항원 서열 1: DLAQMFFCFKELEGW (SEQ ID NO:4); 항원 서열 2: DLAQCFFCFKELEGW (SEQ ID NO:27); 면역원: 펩티드 (Lot: 614429-1)-KLH 컨쥬게이트.

[0100] 항체 생성을 위한 마우스의 면역화

[0101] 항체 생성의 1라운드당 10마리의 마우스를 사용했다. 5 Balb/c 마우스 및 5 C57B1/6 마우스를 사용해서 항원 1(SVN53-67/M57)과 반응하는 항혈청을 생성했다. 마우스를 면역원: 펩티드 -KLH 컨쥬게이트 (SVN53-67/M57-KLH)으로 면역화했다. 혈청 샘플은 면역화 4라운드 후 얻어졌다. 간접적인 ELISA 분석을 통해 서비빈 반응 항혈청의 확인 후, 양성 시험 마우스는 하이브리도마 생성을 위해 선택했다. 몇 개의 하이브리도마 세포주를 SP2/0 골수종 세포에 융합된 각각의 반응성 마우스로부터 세포로 생성했다. 이들 중 세포주 2개 서브클론은 분리되고 특성화했다.

[0102] 항체 반응성에 대한 간접적인 ELISA

[0103] 96 웰 ELISA 플레이트에는, 인산 완충액 식염수 pH 7.4에서 코팅 항원 A (SVN53-67/M57) DLAQMFFCFKELEGW (SEQ ID NO:4) 또는 B (야생형 SVN53-67) DLAQCFFCFKELEGW (SEQ ID NO:27)의 100 μ l/웰을 1 μ g/ml로 코팅했다. 무린 항혈청 또는 하이브리도마 세포배양 상청액을 코팅된 플레이트에 100 μ l/웰로 적용하고 배양했다. 그 다음에 제2항체: Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc γ 를 첨가하고 표준 검출을 행했다.

[0104] 하이브리도마 서열 결정

[0105] TRIzol® Reagent (Ambion, Cat. No. : 15596-026)의 기술 매뉴얼에 따라 하이브리도마 세포로부터 전체 RNA를 분리했다. 전체 RNA를 아가로스 겔 전기영동에 의해서 분석했다. 전체 RNA를 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Cat. No. : 6110A)의 기술적 매뉴얼에 따라 아이소 타입 특이적 안티센스 프라이머 또는 유니버설 프라이머를 사용하여 cDNA에 역전사시켰다. VH 및 VL의 항체 단편은 GenScript의 RACE의 표준 작동 절차에 따라 증폭했다. 증폭된 항체 단편은 표준 분자 클로닝 절차를 사용하여 표준 클로닝 벡터에 별개로 클로닝했다. 콜로니 PCR 스크리닝은 정확한 크기의 삽입에 의해 클론을 확인하기 위해 수행했다. 각각의 항체 단편에 대해 정확한 크기의 삽입을 갖는 5개 이상의 단일 콜로니를 서열 결정했다. 정확한 VH 및 VL 삽입 크기를 갖는 5개의 단일 콜로니는 서열 결정을 위해 보냈다. 5개의 상이한 콜로니의 VH 및 VL 유전자는 거의 상동인 것을 판명했다. 컨센서스 서열은 생성된 항체의 서열인 것으로 고려된다.

[0106] 환자 혈청 항체 측정

[0107] 환자 혈청을 수집하고 -80°C에서 저장했다. 청징화된 혈청의 연속 희석을 예비 코팅된 ELISA 플레이트 (Flat

Bottom, Nunc) 상에서 콘쥬게이트되지 않은 서비빈 펩티드, 프리 KLH 및 랜덤 펩티드(20 µg/ml, 1 µg/웰)에 3회 적용한다. 샘플을 4℃에서 1일밤 배양하고 세척했다(PBS, 1% BSA). HRP 켜쥬게이팅된 항인간 IgG 검출 항체(Bio-Rad)를 25℃에서 1시간 동안 첨가했다. 플레이트를 4회 세척하고 TMB 비색 용액(Biolegend)을 실온에서 첨가하고 15분간 발색시키고 Bio-Rad 자동 플레이트 리더로 450 nm에서 판독했다.

[0108] 종양 성장 연구를 위해 마우스의 면역화

[0109] 100 µl의 항 SVN53-67/M57 하이브리도마 상청액 또는 10 µg의 정제된 단클론 항체로 마우스 내의 원발성 시험의 증명을 수행했다. 마우스는 먼저 무린 GL261 신경교종 세포 또는 B16f1 무린 흑색종 세포를 두개내 또는 피하 이식했다. 종양 이식 후 4일에 마우스에 항체를 복강 주사해서 최대 5주간 매주 1회 반복한 후 종양을 성장시켰다.

[0110] 대뇌 GL261 종양 세포주사 및 생존 분석

[0111] 수컷 C57BL/6 수컷(Charles River, Horsham, PA)은 기체 이소플루오란으로 마취하고 스테레오타틱 헤드 프레임(stereotactic head frame)(David Kopf Instruments, Tujunga, CA)에 고정했다. 정중선 두피 절개를 행하고 브레그마를 확인했다. 스테레오타틱 좌표는 전두엽 심부백질에 세포를 이식하기 위해 측정했다(횡 2.0 mm, 브레그마 앞 1.2 mm). 이 시점에 버 홀을 뚫고 2.5 µl의 DMEM에 현탁된 1×10^5 GL261 세포를 경질막에 대해 3.0mm 깊이로 고정된 25 게이지 바늘을 갖는 Hamilton 시린지를 통해 주사했다. 주사는 1 µl/min으로 행했다. 바늘은 빼고 절개를 봉합했다. 카플란-마이어 생존 플롯을 작성하고 모든 그룹에 대해 중간 생존 시간을 결정했다. 그룹당 n=8

[0112] 피하종양 성장 연구:

[0113] 100 µl의 PBS 중에 2×10^7 GL261 세포 또는 1×10^6 B16f1 세포의 현탁액을, 수컷 C57BL/6 (면역경쟁된) 마우스(Charles River, Horsham, PA)뿐 아니라 누드(면역저하된) NCr -nu/nu 마우스(Charles River, Horsham, PA)의 면도한 우측 옆구리 피하 피부에 주사했다. 종양 성장은 칼리퍼로 매일 측정하고 부피는 $V = (a \cdot b^2) / 2$ 에 따라 산출하고, 여기서 V는 부피이고 a 및 b는 종양의 수직 직경이다. 데이터는 시간에 따른 종양 성장 및 비교 평균 종양 부피로서 존재한다. n은 표시된 대로 나타낸 다양한 연구에서 그룹마다 4, 5, 또는 10 마리의 마우스이다.

[0114] 결과

[0115] SEQ ID NO: 4의 개질된 서비빈 펩티드는 하이브리도마를 생성하기 위해 사용되었다. 10마리의 마우스는 SEQ ID NO:4의 펩티드를 포함하는 15 µg/ml 펩티드 백신을 투여했다. 이들 중 9마리 마우스는 안티-서비빈 타이터를 발현했다. 7마리의 하이브리도마 라인을 생성하고, SEQ ID NO:4의 펩티드에 및 서비빈 펩티드 DLAQCFFCFKELEGW (SEQ ID NO:27)(이 서열은 인간 서비빈의 부분과 상동이다)에 대해 반응성인 항체를 생성한다. 하이브리도마 중, 특히 특성화를 위해 2마리가 선택되었다. 이들은 2C2 및 30H3라고 한다. 이들 하이브리도마로부터, 하나의 클론을 각각 특성화했다. 이들은 각각 2C2E7 및 30H3D2라고 한다. 2C2E7는 아이소 타입 IgG2b을 갖는 것을 알 수 있고 30H3D2는 아이소 타입 IgG1를 갖는 것을 알 수 있다. 따라서, 정확한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 삽입 크기를 갖는 몇 개의 단일 콜로니가 서열 결정되었다. 서열은 거의 상동이고 컨센서스 서열이 생성되었다. mAb 2C2E7로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 컨센서스 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NOs:19 및 20에 제공된다. mAb 30H3D2로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 컨센서스 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NOs:21 및 22에 제공된다. SEQ ID NOs:19, 20, 21 및 22의 아미노산 서열의 상응하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 SEQ ID NOs:23, 24, 25 및 26에 제공된다.

[0116] 항체 2C2E7으로부터의 중쇄 가변 영역의 컨센서스 아미노산은 다음과 같이 표시된다:

MGWLWNLLFLMAAAQSAQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSW
VKQAPGRGLKWMGWINPYSGVPTYAVDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIKNE
DYFCARGGRRGDFGYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:19).

[0117]

[0118] 항체 2C2E7으로부터의 경쇄 가변 영역의 컨센서스 아미노산은 다음과 같이 표시된다:

MDFQVQIFSLLISASVILSSGQIGLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSISYMHWYQQ
KPGTSPKTIWYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSHHT
FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:20).

[0119]

[0120] 항체 30H3D2로부터의 중쇄 가변 영역의 컨센서스 아미노산은 다음과 같이 표시된다:

MNFGLSLIFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVR
LTPDKRLEWVATISSGGSHTYYPDSVRGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYY
CARHPIYYYISSYAMDYWGQGSVTVSS (SEQ ID NO:21).

[0121]

[0122] 항체 30H3D2으로부터의 경쇄 가변 영역의 컨센서스 아미노산은 다음과 같이 표시된다:

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLH
WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPRFRGGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQST
HVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:22).

[0123]

[0124] mAb 2C2E7 의 SEQ ID NO:19에 기재된 중쇄 가변 도메인의 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같이 표시된다:

ATGGGTTGGCTGTGGAACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGCCCAAG
CACAGATCCAGTTGGTACAATCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAG
TCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACCTATGGAATGAGCTG
GGTGAAACAGGCTCCAGGAAGGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACCCTA
CTCTGGAGTGCCAACATATGCTGTTGACTTCAAGGGACGTTTTGCCTTCTCTTTGG
AAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACA
CGGCTACATATTTCTGTGCAAGAGGAGGGCGGAGGGGGGACTTTGGCTACTGGG
GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:23).

[0125]

[0126] mAb 2C2E7 의 SEQ ID NO:20에 기재된 경쇄 가변 도메인의 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같이 표시된다:

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATACT
GTCCAGCGGACAAATTGGTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCA
GGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAGTTACATGCAT
TGGTACCAGCAGAAGCCAGGCACCTCCCCCAAACATGGATTTATGACACATCC
AACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTT
ATTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
TCAGCGGAGTAGTCACCACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
(SEQ ID NO:24).

[0127]

[0128] mAb 30H3D2의 SEQ ID NO:21에 기재된 중쇄 가변 도메인의 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같이 표시된다:

ATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGCCCTTATTTTAAAAGGTGTCCAGTG
TGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCT
GAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGG
GTTTCGCTGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGCAGTGGT
GGTAGTCACACCTACTATCCAGACAGTGTGAGGGGGCGATTACCATCTCCAGA
GACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGAC
ACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACACCCAATTTATTACTACATTAGTAGCTATG
CTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO:25).

[0129]

[0130]

mAb 30H3D2의 SEQ ID NO:22에 기재된 경쇄 가변 도메인의 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같이 표시된다:

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAG
TGATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA

[0131]

GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTACTGGAAACACCT
ATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAA
AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCGGTGGCAGTGGATCAGGG
ACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTAT
TTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGG
AAATCAAA (SEQ ID NO:26).

[0132]

[0133]

항체는 동물을 면역하기 위해 사용된 펩티드(SEQ ID NO:4)에 대해 및 인간 서비빈으로부터의 서열 (SEQ ID NO:27)에 대해 결합하기 위해 항체를 시험하였다. 2C2E7의 15 ng/ml 항체 농도는 OD 1.019에서 SEQ ID NO:4의 개질된 서비빈 펩티드를 결합하고, OD 0.891에서 SEQ ID NO:27의 야생형 서비빈 펩티드를 결합하는 데에 충분했다. 2:1 초과인 블랭크 비율로 신호를 갖는 가장 높은 희석에서 2C2E7의 타이터는 높은 친화성 항체에 대해 기대되는 것과 일치된 1:512,000이다. 또한 30H3D2의 31 ng/mL 항체 농도는 OD 1.021에서 SEQ ID NO:4의 개질된 서비빈 펩티드를 결합하고 OD 0.874에서 SEQ ID NO:27의 야생형 서비빈 펩티드를 결합하는 데 충분했다. 2:1 초과인 블랭크 비율로 신호를 갖는 가장 높은 희석에서 30H3의 타이터는 높은 친화성 항체에 대해 기대되는 것과 일치된 1:512,000이다.

[0134]

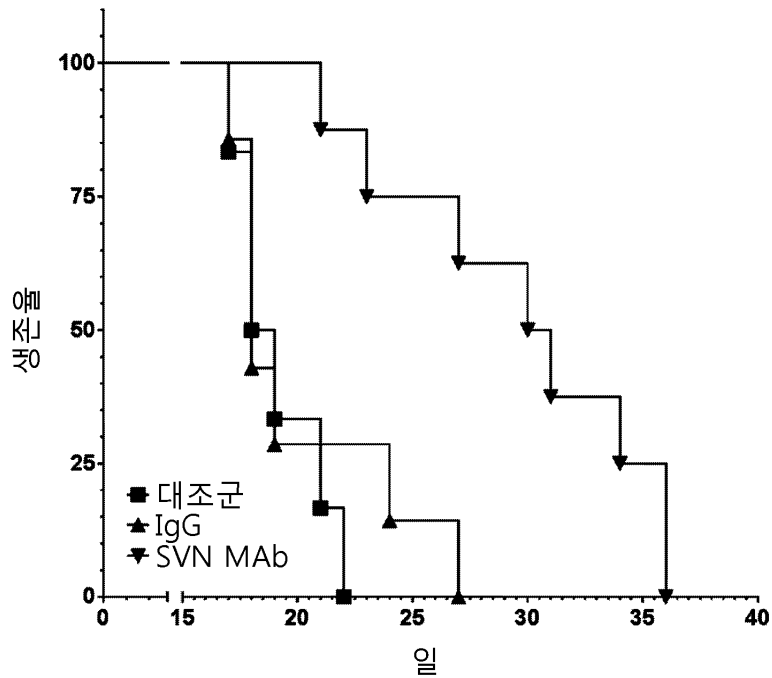
항체는 종양의 성장에 미치는 영향을 결정하기 위해 동물 모델에서 사용되었다. 동물 모델은 실시예 1에서 사용되는 것과 동일했다. 결과는 도 4 내지 11에 도시된다. 2C2 및 H30 안티-서비빈 항체의 연구는 피하 무균 종양 모델에서 수행되었다. 마우스는 이식 가능한 종양을 확립한 후 30일 동안 5-7일 마다 2C2, H30 또는 비-특이적 IgG로 처리하였다. 2개의 숙주 마우스 군으로는 도 5, 7, 9, 11에서 C57Bl/6마우스 및 도 4, 6, 8, 10에서 NCr-nu/nu (누드)가 사용되었다. 누드 마우스는 면역계 지지없이 특이적으로 표적에 직접 항체에 결합하는 것에 의존하는 것으로 예측된다. C57Bl/6 마우스는 면역 적합성 모델을 나타내고 이 모델은 대식세포, 수지상 세포 및 T 세포 등의 면역학의 지지체 메카니즘의 추가의 참여로부터 유익할 수 있다. B16 흑색종 도 4-7 및 GL261 신경교종 세포 도 8-11은 C57Bl/6(면역 경쟁) 모델(도 5, 7)에서 성장 저해되는 것을 나타내고 누드(면역 저하)모델(도 4,6)에서 2C2 또는 H30 항체로 처리되었을 때 적은 정도로 성장 저해된 것을 나타냈다. 이 관찰은 누드 마우스 (도 4, 6, 8, 10)에서 면역 지지 부재에 의해서 완전하게 제거되지 않은 C57Bl/6(도 5, 7, 9, 11)에서 강한 면역 매개 항체 의존 반응을 나타낸다. 면역 저하된 모델(도 4, 6, 8, 10)에서, 항체-의존 성장 저해의 지속성은 자체의 항체의 직접적인 성장 저해 성분 또는 추가의 독립적인 면역계를 제안한다. Roswell Park Cancer Institute of SurVaxM (SVN53-67/M57-KLH) SEQ. ID NO:4 (FDA approved/I171010)에서 단계 I 임상 시험에 등록된 신경교종 환자는 임상 시험 프로토콜 기간 동안 SurVaxM 펩티드에 예기치 않은 항체 반응을 생성하는 것이 관찰되었다. 본원에 도시된 8명의 환자는, 펩티드 서열을 면역화한 15개의 아미노산에 포함된 SEQ ID NO:4의 아미노산으로 구성된 개질된 서비빈 펩티드뿐 아니라 SEQ ID NO:27의 아미노산으로 구성된 야생형 서비빈 펩티드에 크로스 반응하는 반응 항혈청을 생성한다. 이들 항체는 치료목적으로 사용될 수 있다.

[0135]

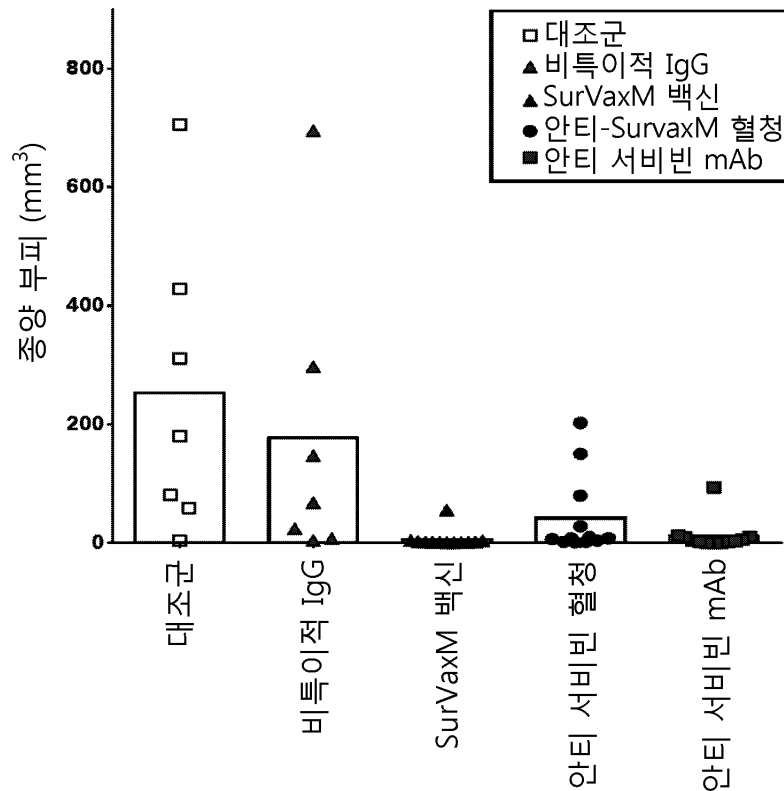
본 개시내용은 특정한 실시형태 및 실시예를 사용하여 개시했지만, 당업자에게 일상적인 변경이 명백하고 이러한 변경은 본 개시내용 및 청구항의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

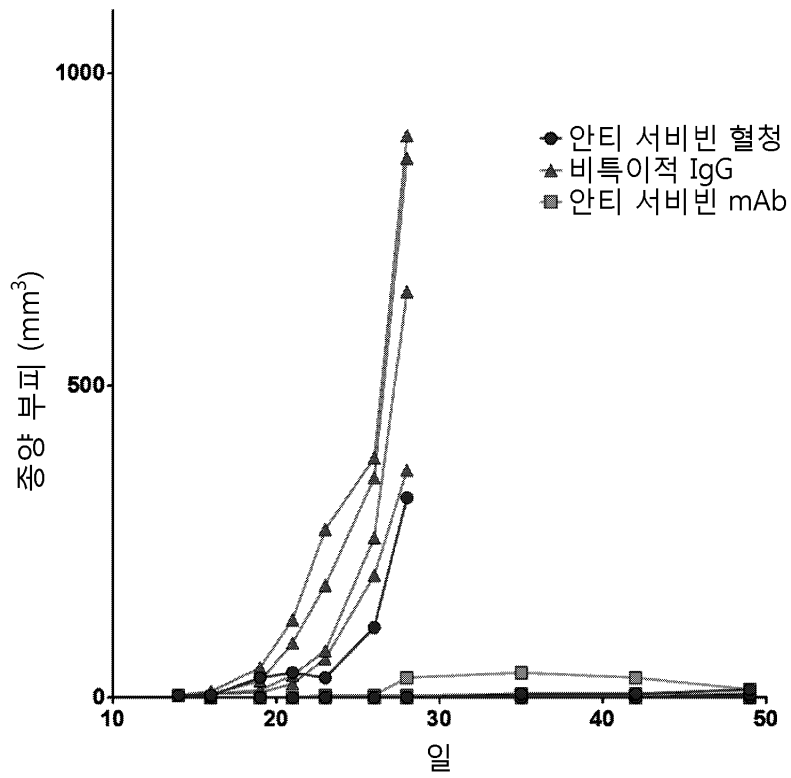
도면1



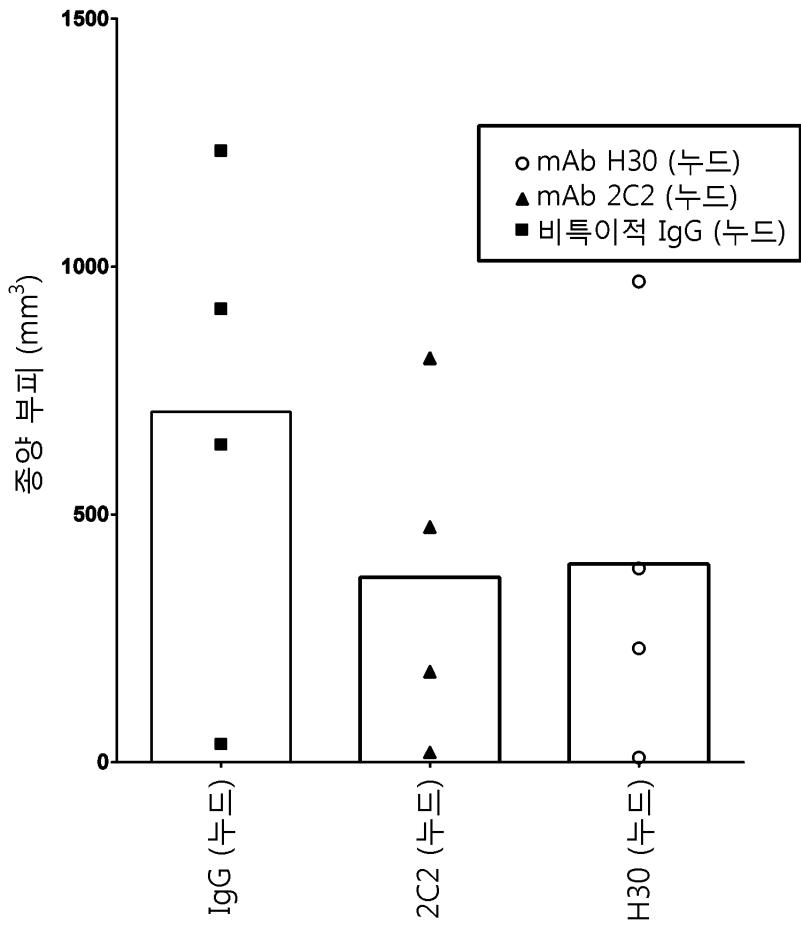
도면2



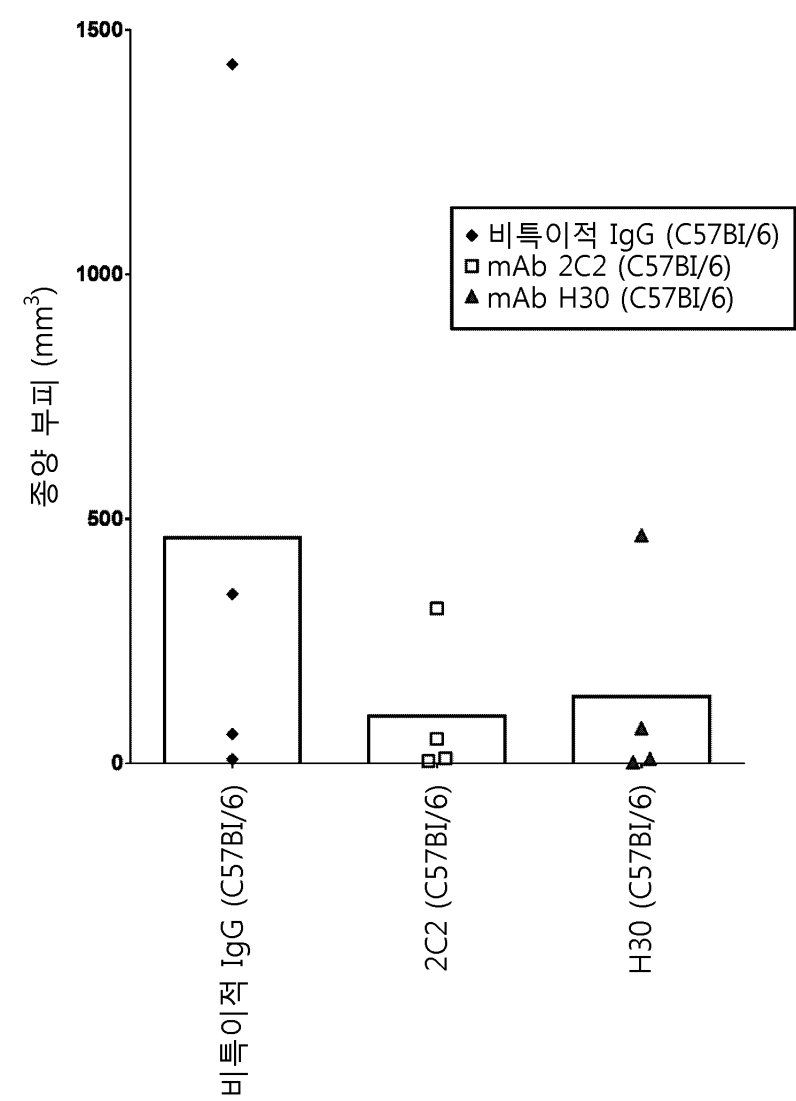
도면3



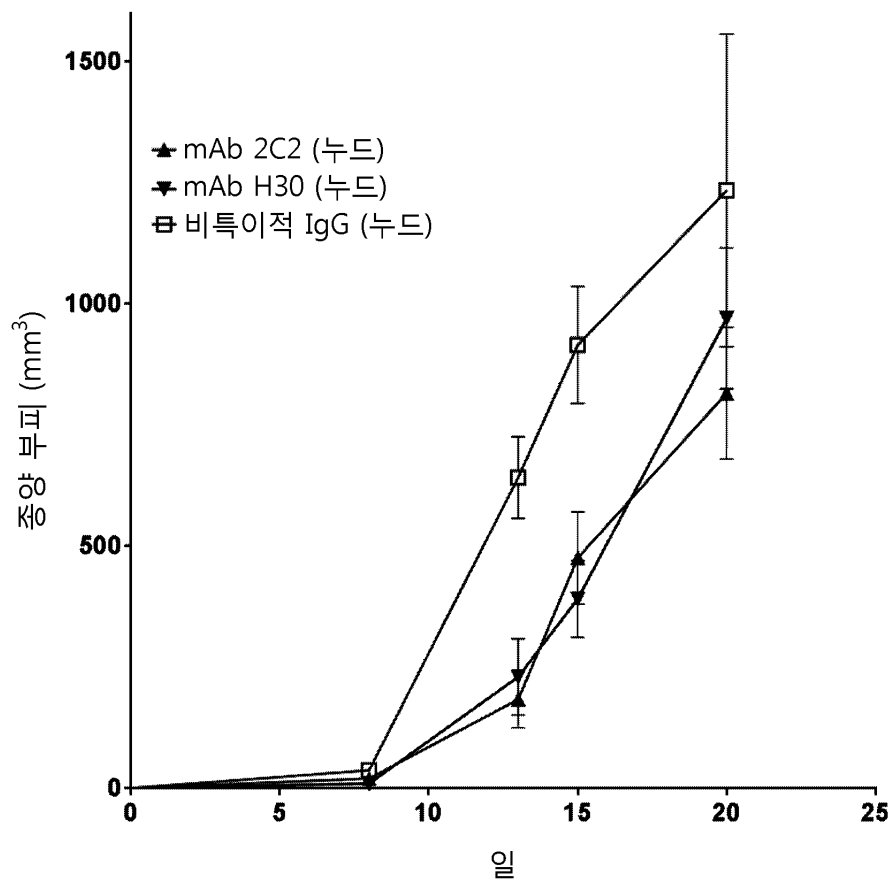
도면4



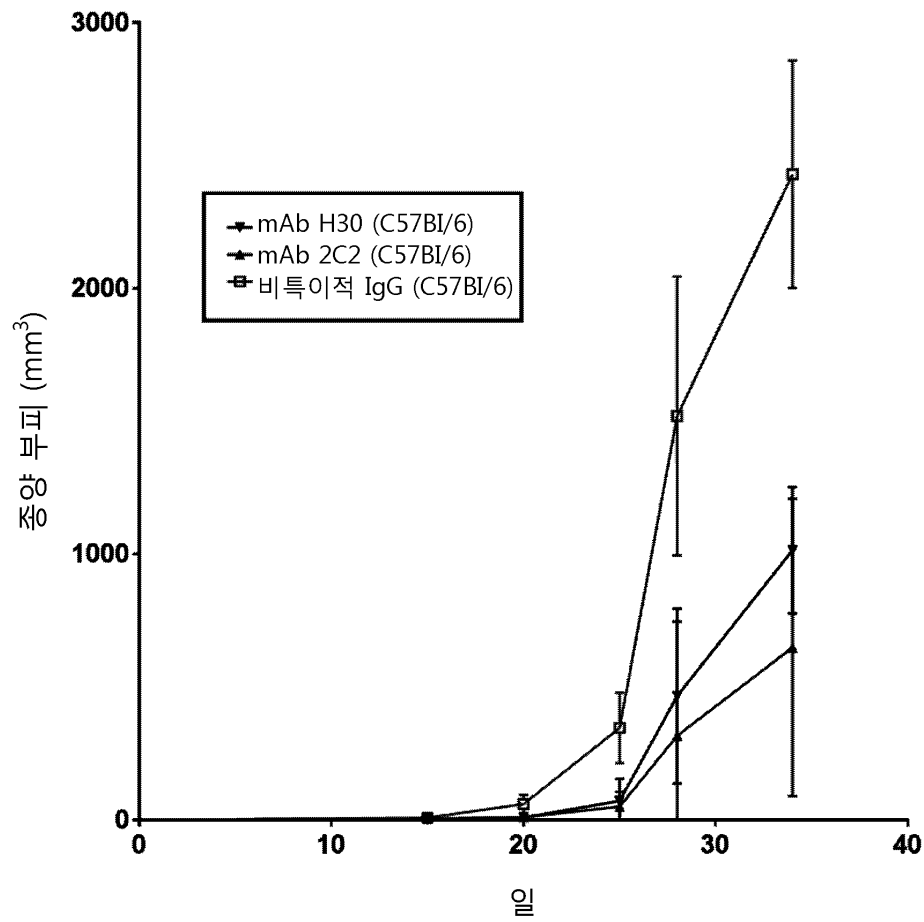
도면5



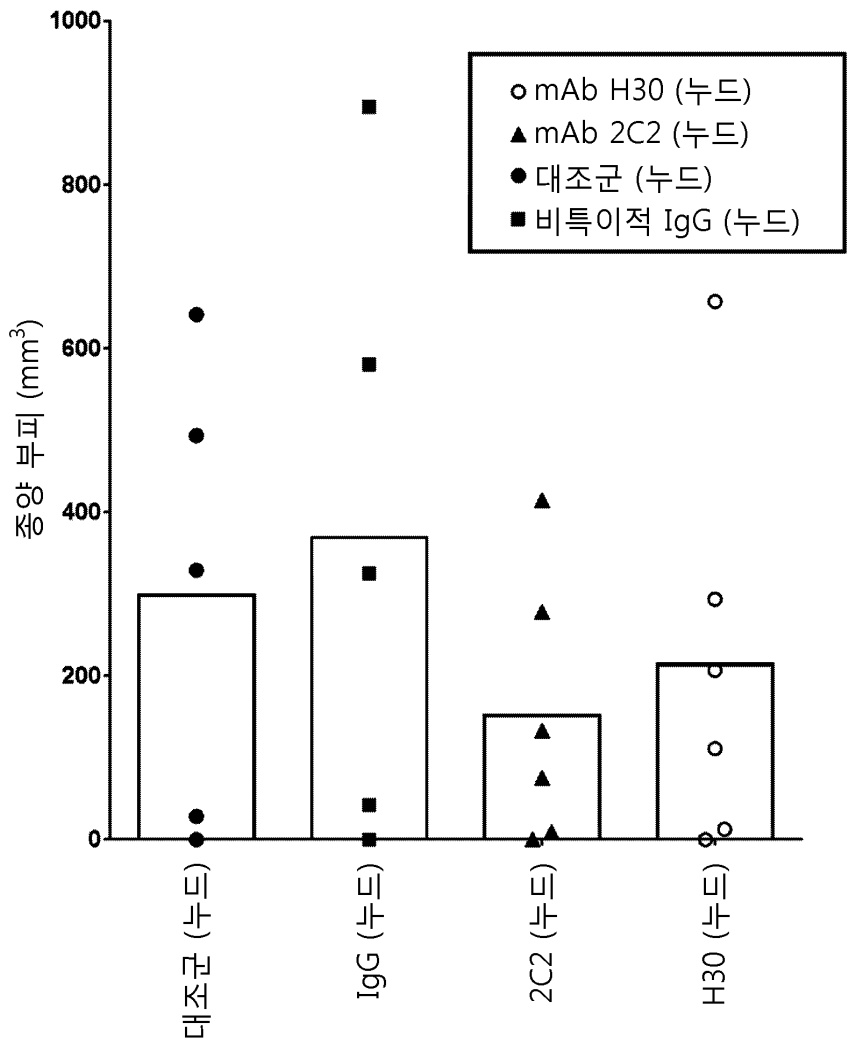
도면6



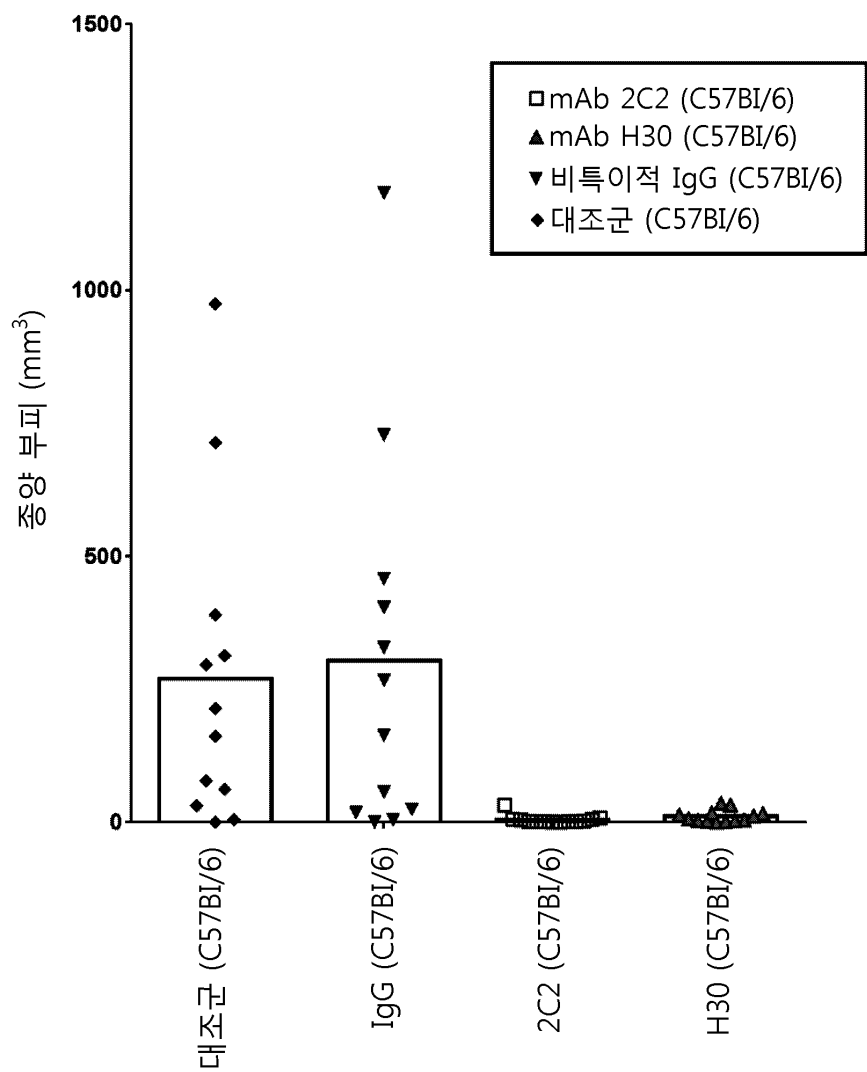
도면7



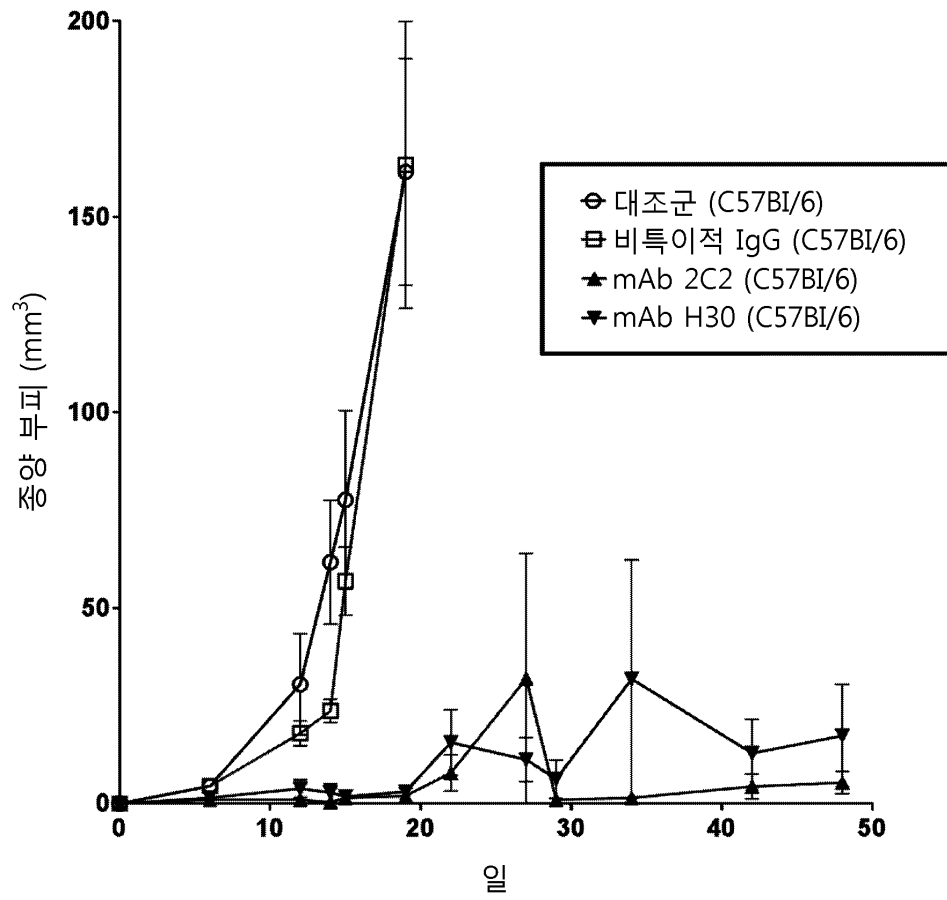
도면8



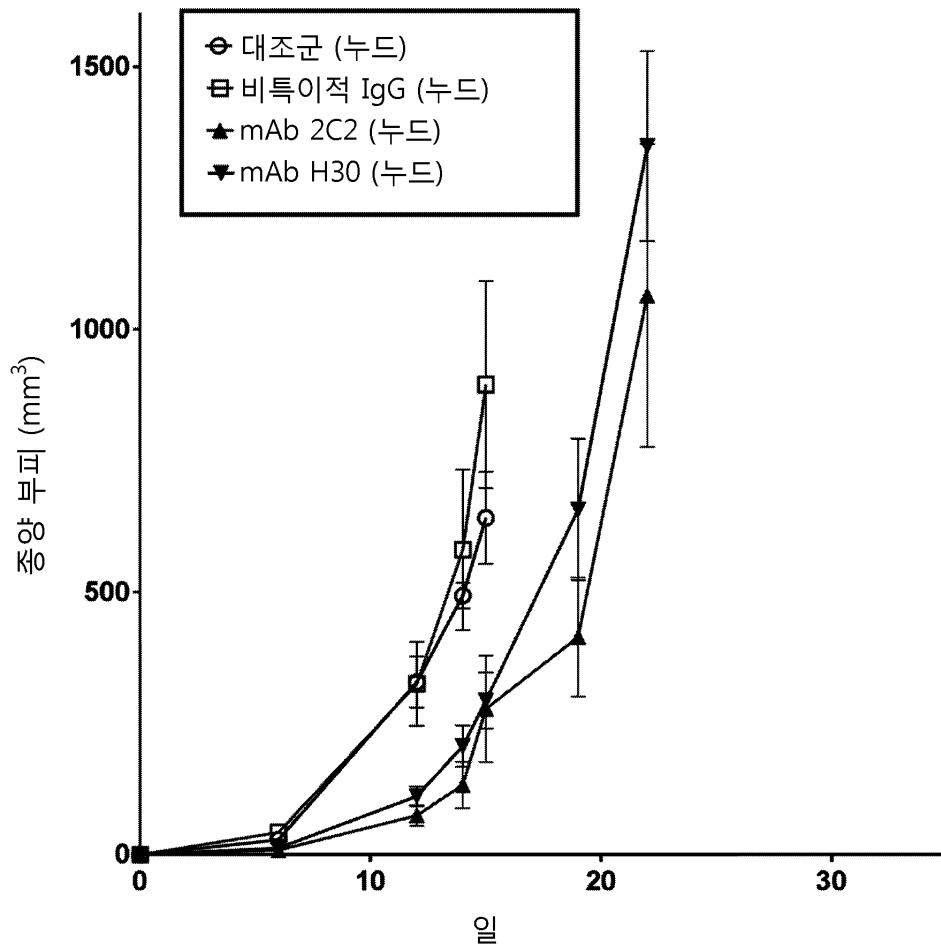
도면9



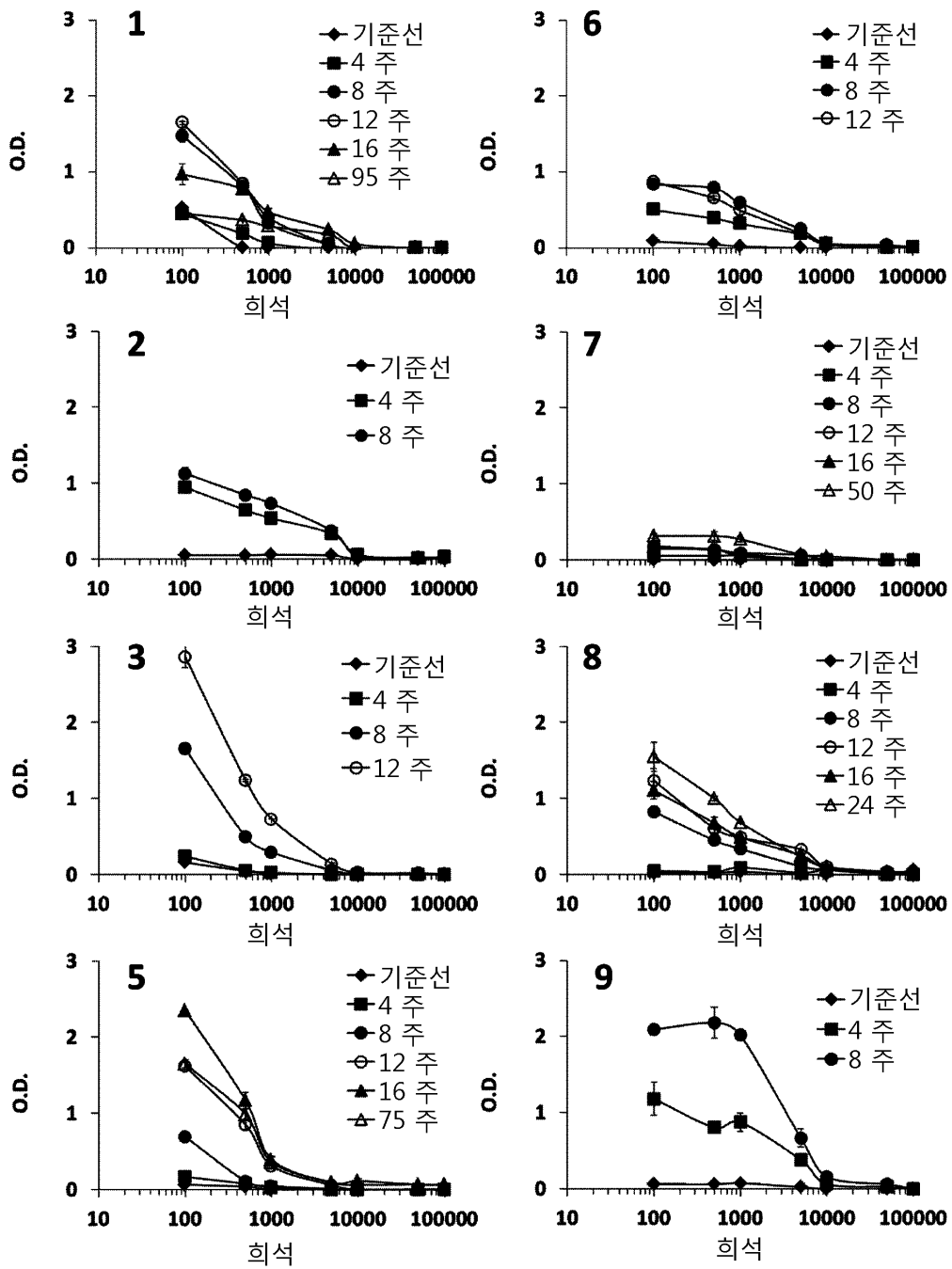
도면10



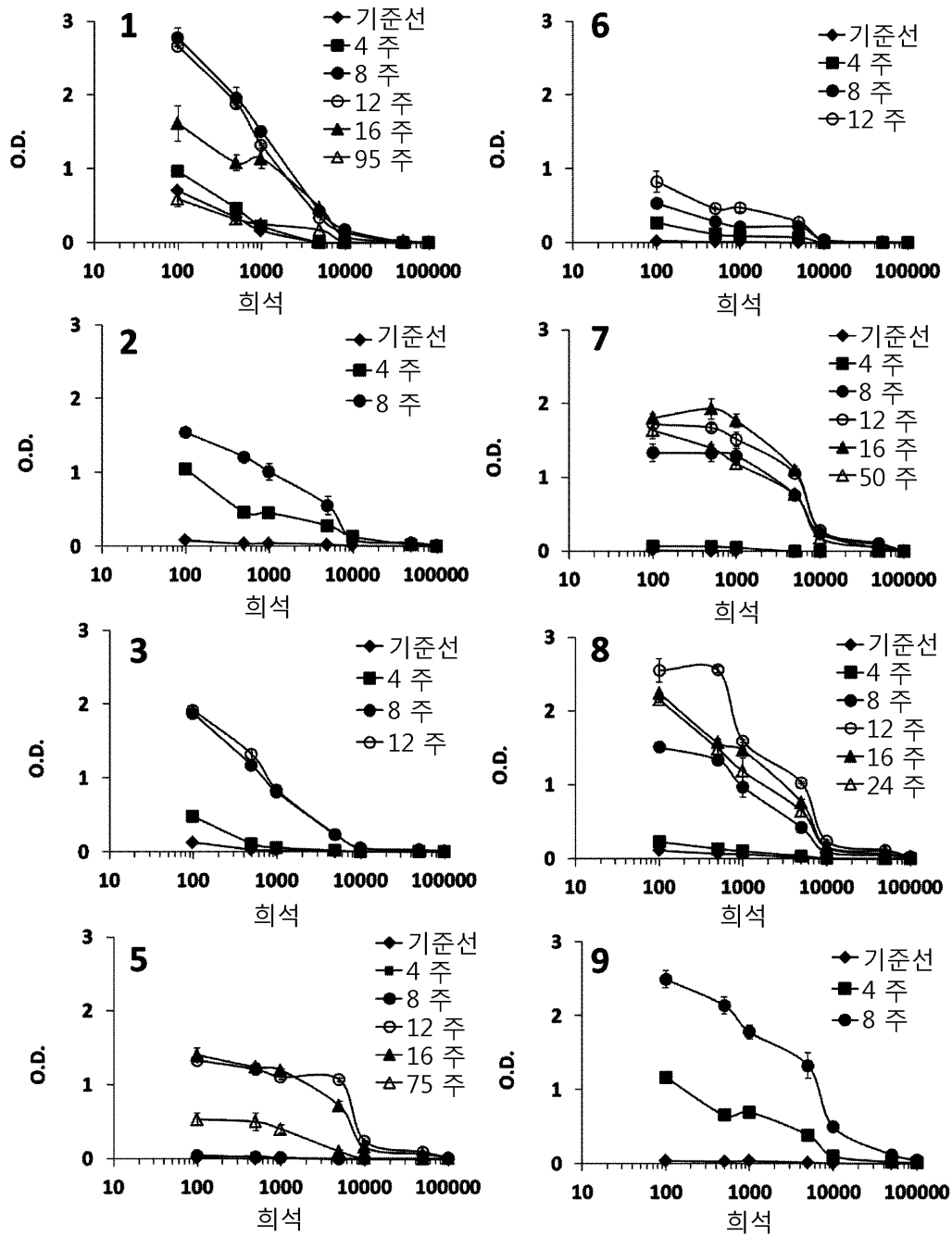
도면11



도면12



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Health Research, Inc.

<120> ANTI-SURVIVIN ANTIBODIES FOR CANCER THERAPY

<130> 003551.00664

<150> 62/214,242

<151> 2015-09-04

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5 10 15

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp

20

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Mutant protein

<400> 2

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5 10 15

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp

20

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Protein fragment

<400> 3

Gln Met Phe Phe Cys Phe

1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Protein fragment

<400> 4

Asp Leu Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp

1 5 10 15

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Protein fragment

<400> 5

Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Protein fragment

<400> 6

Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 7

Thr Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 8

Trp Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Val Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 9

Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Gly Tyr

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 10

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 11

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 12

His Gln Arg Ser Ser His His Thr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 13

Ser Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 14

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

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400>

15

His Pro Ile Tyr Tyr Tyr Ile Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 18

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 19

<211> 137

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 19

Met Gly Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

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

50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala

65 70 75 80
Val Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Gly Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 20

<211> 127

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 20

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

1 5 10 15
Val Ile Leu Ser Ser Gly Gln Ile Gly Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
50 55 60

Pro Lys Thr Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro

65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg
100 105 110

Ser Ser His His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 21

<211> 142

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 21

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Leu Thr Pro Asp Lys Arg Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Pro

65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ile Tyr Tyr Tyr Ile Ser Ser Tyr Ala

115 120 125

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

130 135 140

<210> 22

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody sequence

<400> 22

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu

35 40 45
Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

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

65 70 75 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys

100 105 110
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

115 120 125
Glu Ile Lys

130

<210> 23

<211> 411

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody gene sequence

<400> 23

atgggttggc tgtggaactt gctattcttg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60

atccagttgg tacaatctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120

tgcaaggctt ctgggtatcac ttccacaacc tatggaatga gctgggtgaa acaggctcca 180

ggaaggggtt taaagtggat gggctggata aaccctact ctggagtgcc aacatatgct 240

gttgacttca agggacgggt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300

cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag aggagggcgg 360

aggggggact ttggctactg gggccaaggc accactctca cagtctctc a 411

<210> 24

<211> 381

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody gene sequence

<400> 24

atggattttc aggtgcagat ttccagcttc ctgctaata gtcctcagt catactgtcc	60
agcggacaaa ttggtctcac ccagctccca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag	120
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt ataagttaca tgcattggta ccagcagaag	180
ccaggcacct cccccaaaac atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtcctt	240
gctcgtttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttattctc tcacaatcag cagcatggag	300
gctgaagatg ctgccactta ttactgcat cagcggagta gtcaccacac gtccggaggg	360
gggaccaagc tggaaataaa a	381

<210> 25

<211> 426

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> Antibody gene sequence

<400> 25

atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gcccttattt taaaaggtgt ccagtgtgag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gaggttcctt gaaactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac ttccagtagc tatggcatgt cttgggttcg cctgactcca	180
gacaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agcagtggtg gtagtcacac ctactatcca	240
gacagtgtga gggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg	300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acaccaatt	360
tattactaca ttagtagcta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc	420
tcctca	426

<210> 26

<211> 393

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> antibody gene sequence

<400> 26

atgaagttagc ctgttaggct gttgtgtctg atgttctgga ttcttgcttc cagcagtgat	60
gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc	120
tcttgcatat ctagtcagag cctgttacac agtactggaa acacctattt acattggtac	180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcgg tggcagtgga tcaggacag attcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttcctccg 360

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 393

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> human

<400> 27

Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp

1 5 10 15