(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0137073
(43) 공개일자 2017년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7027032
(22) 출원일자(국제) 2016년04월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년09월25일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2016/061961
(87) 국제공개번호 WO 2016/167306
국제공개일자 2016년10월20일
(30) 우선권주장
62/148,253 2015년04월16일 미국(US)

(71) 출원인
에자이 알앤드디 매니지먼트 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 분쿄쿠 코이시가와 4쵸메 6반 10고
(72) 발명자
사카모토, 요시마사
일본 6500047 효고켄 고베시 츄오쿠 미나토지마미나미마치 6-8-2 가부시키가이샤 간 겐큐쇼 내
아다치, 유스케
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장수길, 이석재

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **항-인간 ＮＯＴＣＨ4 항체**

(57) 요 약

본 발명은 인간 Notch4에 대하여 중화 활성을 가질 수 있는 항-인간 Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편, 및 이들을 활성 성분으로서 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명자들은 인간 Notch4에 대하여 높은 중화 활성 및 결합 친화성을 갖는 마우스 항-인간 Notch4 항체를 수득하였으며, 상기 마우스 항-인간 Notch4 항체의 상보성 결정 영역(CDR) 서열을 결정하였다. 이것은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 상기 마우스 항-인간 Notch4 항체의 CDR 서열을 포함하는 인간화 항체의 생성을 가능하게 하였다.

(52) CPC특허분류
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/21 (2013.01)
C07K 2319/42 (2013.01)

(72) 발명자
마츠이, 준지
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
가토, 유
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
오자와, 요이치
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
아베, 다카노리
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
이토, 겐
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
나카자와, 유야
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
다치노, 쇼
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
스즈키, 가츠히사
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
아가루와라, 기샨
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내
호시노, 가나
일본 6500047 효고켄 고베시 츄오쿠 미나토지마미나미마치 6-8-2 가부시키가이샤 간 겐큐쇼 내
가타야마, 마사히코
일본 3002635 이바라키켄 츠쿠바시 도코다이 5-1-3 에자이 가부시키가이샤 츠쿠바 겐큐쇼 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 하기 (i) 내지 (vii) 중 임의의 것으로부터 선택되는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편:

(i) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

(ii) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

(iii) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

(iv) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

(v) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

(vi) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체, 및

(vii) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄의 불변 영역 및 상기 경쇄의 불변 영역이 인간 항체-유래 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 중쇄의 불변 영역이 인간 IgG의 불변 영역을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 인간 IgG의 불변 영역이 인간 IgG2의 불변 영역인 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 인간 IgG2의 불변 영역이 돌연변이 V234A 및/또는 G237A를 갖는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 중쇄의 불변 영역의 카르복시 말단에서 라이신 잔기가 인공적으로 제거되는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 경쇄의 불변 영역이 인간 Igκ의 불변 영역을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 비-소세포(non-small cell) 폐암의 치료를 위해 사용되는 약제학적 조성물.

청구항 18

제15항 또는 제16항에 있어서, 갑상선암의 치료를 위해 사용되는 약제학적 조성물.

청구항 19

제15항 또는 제16항에 있어서, 전립선암의 치료를 위해 사용되는 약제학적 조성물.

청구항 20

제15항 또는 제16항에 있어서, 간세포 암종의 치료를 위해 사용되는 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간 Notch4에 결합하는 항체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] Notch는 다양한 조직의 세포의 운명 결정에 기여하는 분자이며, 초기 발생기, 배아기 및 출생 후의 각 시기 동안 예를 들어, 분화, 증식 및 생존에 관여하는 것으로 나타나 있다. Notch1, Notch2, Notch3 및 Notch4를 포함하는 4가지 유형의 수용체와 Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL3 및 DLL4를 포함하는 5가지 유형의 리간드가 Notch 과로 보고되어 있다. 인접하는 세포 상에서 발현하는 Notch 수용체가 Notch 리간드와 결합하는 경우, 수용체의 하위의 세포외 도메인에 존재하는 NRR 도메인이 TACE에 의해서 절단되며, 이에 따라 야기되는 세포내 도메인의 구조 변화로 인하여, 세포내 도메인은 γ 세크레타제에 의해 절단된다. 결과적으로 형성되는 Notch 세포내(NIC) 도메인은 핵 내에 이동하고, 전사 인자 CSL과 이종이량체를 형성하고, aHes 과 및 Hey 과와 같은 표적 분자를 유도하고, 발현시킨다. 이들 하류 분자가 다양한 유전자를 추가로 유도하고, 발현시키고, 결과적으로 Notch 신호는 예를 들어, 줄기 세포 또는 전구 세포의 유지, 분화, 세포 주기 정지 및 세포 운명 결정에 기여한다(비-특허 문헌 1).

[0003] Notch는 또한 종양 형성에도 관여하는 것으로 알려졌다. t(7;9) 염색체 전좌로 인한 Notch1 돌연변이가 전구-T 세포 급성 림프모구성 백혈병(T-ALL)의 발병에 관련되는 것이 처음 보고되었다. 더욱이, 자발적 종양 발생 모델인 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV)의 게놈 삽입 부위는 Int3(Notch4 세포내 도메인)인 것으로 보고되었으며, Int3이 강제 발현되는 경우 트랜스제닉 마우스에서 유방암 또는 침샘 암과 같은 상피 세포 암이 유도되는 것이 보고되어 있다(비-특허 문헌 2). Notch4는 또한, 인간에서 유방암(비-특허 문헌 3), 흑색종(비-특허 문헌 4), 위암(비-특허 문헌 5), B-세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL)(비-특허 문헌 6), 만성 림프구성 백혈병(CLL)(비-특허 문헌 7), 신경교종(비-특허 문헌 8), 간세포 암종(비-특허 문헌 9), 폐암(비-특허 문헌 10), 신장 암(비-특허 문헌 11), 카포시 육종(비-특허 문헌 12) 등의 발암, 진행 또는 전이에 관련되는 것으로 보고되고 있다.

[0004] Notch 신호는 또한 종양내 혈관신생에도 기여한다. Notch1 및 Notch4는 혈관 내피 세포에서 Notch 수용체로서 발현되며, DLL4 및 Jagged1의 발현은 리간드로 확인된다. 새로운 혈관의 끝에 존재하는 정단(tip) 세포는 VEGF 자극으로 DLL4를 고도로 발현하며, 인접 Stalk 세포의 Notch 수용체로 신호를 보냄으로써 혈관이 연장된다. 반면, Jagged1은 Notch 수용체에 대하여 DLL4와 경쟁하며, DLL4와 Notch 수용체의 결합을 저해한다. Jagged1로부터의 신호는 DLL4로부터의 신호에 비하여 약하기 때문에, Notch 신호는 Jagged1과의 결합에 의해 억제된다. 이들 2개의 리간드의 공간적으로 상이한 발현 패턴에 의해서 Notch 신호의 세기가 조정되어, 혈관신생을 제어한다(비-특허 문헌 13).

[0005] DLL4 저해 항체의 생성이 보고되어 있으며, DLL4로부터의 신호가 DLL4 저해 항체로 저해되는 경우, 혈류가 없는 미성숙 혈관형성이 종양 내측에서 향상되며, 종양 증식의 저해가 유도된다. 이것은 VEGF 저해제가 혈관 내피 세포의 증식을 저해하여, 혈관형성을 억제하는 현상과는 완전히 상이하며, Notch 신호는 신생혈관 저해제의 신규한 표적으로 주목된다(비-특허 문헌 14).

[0006] 인용 목록

[0007] [비-특허 문헌 1] Radtke et al. (2004), Nature Immunology 5,247-53.

[0008] [비-특허 문헌 2] Jhappan et al. (1992), Genes Dev. 6,345-55

[0009] [비-특허 문헌 3] Nagamatsu et al. (2014), Anticancer Res. 34, 69-80

[0010] [비-특허 문헌 4] Hardy et al. (2010), Cancer Res. 70, 10340-50

[0011] [비-특허 문헌 5] Qian et al. (2015), Mol Cell Biochem. 401, 165-74

[0012] [비-특허 문헌 6] Nwabo Kamdje et al. (2011), Blood 118, 380-9

[0013] [비-특허 문헌 7] Nwabo Kamdje et al. (2012), Blood Cancer Journal 2, e73

[0014] [비-특허 문헌 8] Dell'Albani et al. (2012), Neuro-Oncology 16, 204-16

[0015] [비-특허 문헌 9] Ahn et al. (2013), Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 12, 286-94

[0016] [비-특허 문헌 10] Justilien et al. (2012), PLoS ONE 7, e35040

[0017] [비-특허 문헌 11] Boo et al. (2009), J Pediatr Surg. 44, 2031-6

[0018] [비-특허 문헌 12] Curry et al. (2005), Oncogene 24, 6333-44

[0019] [비-특허 문헌 13] Benedito et al. (2009), Cell 137, 1124-35

[0020] [비-특허 문헌 14] Ridgway et al. (2006), Nature 444, 1083-7

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 발명의 요약

[0022] 본 발명의 목적은 인간 Notch4에 대하여 중화 활성을 가질 수 있는 항-인간 Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편 및 이들을 활성 성분으로서 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위한 대규모 연구의 결과로서, 인간 Notch4에 대하여 높은 중화 활성 및 결합 친화성을 갖는 마우스 항-인간 Notch4 항체를 수득하는 데 성공하였다. 더욱이, 본 발명자들은 상기 마우스 항-인간 Notch4 항체의 상보성 결정 영역(CDR) 서열을 결정함으로써 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 상기 마우스 항-인간 Notch4 항체의 CDR 서열을 포함하는 인간화 항체의 생성을 가능하게 하여, 본 발명을 완성하였다.

[0024] 다시 말하면, 일 구현예에서, 본 발명은 하기의 발명에 관한 것이다.

[0025] (1) (a) SEQ ID NO: 15 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1;

[0026] (b) SEQ ID NO: 17 또는 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2;

[0027] (c) SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3;

[0028] (d) SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1;

[0029] (e) SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2; 및

[0030] (f) SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0031] (2) 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 하기 (i) 내지 (vii) 중 임의의 것으로부터 선택되는 (1)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편:

[0032] (i) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0033] (ii) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0034] (iii) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0035] (iv) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0036] (v) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0037] (vi) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체, 및

[0038] (vii) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항체.

[0039] (3) 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 (2)에 따

른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0040] (4) 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 (2)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0041] (5) 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 (2)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0042] (6) 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 (2)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0043] (7) 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 (2)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0044] (8) 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 (2)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0045] (9) 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 (2)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0046] (10) 상기 중쇄의 불변 영역 및 상기 경쇄의 불변 영역이 인간 항체-유래 서열을 포함하는 (1) 내지 (9) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0047] (11) 중쇄의 불변 영역이 인간 IgG의 불변 영역을 포함하는 (10)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0048] (12) 상기 인간 IgG의 불변 영역이 인간 IgG2의 불변 영역인 (11)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0049] (13) 상기 인간 IgG2의 불변 영역이 돌연변이 V234A 및/또는 G237A를 갖는 (12)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0050] (14) 상기 중쇄의 불변 영역의 카르복시 말단에서 라이신 잔기가 인공적으로 제거되는 (10)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0051] (15) 상기 경쇄의 불변 영역이 인간 Igκ의 불변 영역을 포함하는 (10)에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0052] (16) (1) 내지 (15) 중 어느 하나에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물.

[0053] (17) 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 (16)에 따른 약제학적 조성물.

[0054] (18) 비-소세포 폐암의 치료를 위해 사용되는 (17)에 따른 약제학적 조성물.

[0055] (19) 갑상선암의 치료를 위해 사용되는 (17)에 따른 약제학적 조성물.

[0056] (20) 전립선암의 치료를 위해 사용되는 (17)에 따른 약제학적 조성물.

[0057] (21) 간세포 암종의 치료를 위해 사용되는 (17)에 따른 약제학적 조성물.

[0058] 다른 구현예에서, 본 발명은 또한 하기의 발명에 관한 것이다.

[0059] (1') 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 하기 (i) 내지 (vii) 중 임의의 것으로부터 선택되는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편:

[0060] (i) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0061] (ii) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0062] (iii) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0063] (iv) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0064] (v) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0065] (vi) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항체, 및

[0066] (vii) 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항체.

[0067] (2') 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 (1')에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0068] (3') 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 (1')에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0069] (4') 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 (1')에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0070] (5') 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 (1')에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0071] (6') 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 (1')에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0072] (7') 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 (1')에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0073] (8') 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 (1')에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0074] (9') 상기 중쇄의 불변 영역 및 상기 경쇄의 불변 영역이 인간 항체-유래 서열을 포함하는 (1') 내지 (8') 중 어느 하나에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0075] (10') 중쇄의 불변 영역이 인간 IgG의 불변 영역을 포함하는 (9')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0076] (11') 상기 인간 IgG의 불변 영역이 인간 IgG2의 불변 영역인 (10')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0077] (12') 상기 인간 IgG2의 불변 영역이 돌연변이 V234A 및/또는 G237A를 갖는 (11')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0078] (13') 상기 중쇄의 불변 영역의 카르복시 말단에서 라이신 잔기가 인공적으로 제거되는 (9')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0079] (14') 상기 경쇄의 불변 영역이 인간 Igκ의 불변 영역을 포함하는 (9')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0080] (15') (1') 내지 (14') 중 어느 하나에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물.

[0081] (16') 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 (15')에 따른 약제학적 조성물.

[0082] (17') 비-소세포 폐암의 치료를 위해 사용되는 (16')에 따른 약제학적 조성물.

[0083] (18') 갑상선암의 치료를 위해 사용되는 (16')에 따른 약제학적 조성물.

[0084] (19') 전립선암의 치료를 위해 사용되는 (16')에 따른 약제학적 조성물.

[0085] (20') 간세포 암종의 치료를 위해 사용되는 (16')에 따른 약제학적 조성물.

[0086] 다른 구현예에서, 본 발명은 추가로 하기의 발명에 관한 것이다.

[0087] (1'') 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0088] (2'') 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0089] (3'') 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0090] (4'') 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 49의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0091] (5'') 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 51의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0092] (6'') 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 39의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0093] (7'') 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 중쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄의 가변 영역이 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함하는 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0094] (8'') 상기 중쇄의 불변 영역 및 상기 경쇄의 불변 영역이 인간 항체-유래 서열을 포함하는 (1'') 내지 (7'') 중 어느 하나에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0095] (9'') 중쇄의 불변 영역이 인간 IgG의 불변 영역을 포함하는 (8'')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0096] (10'') 상기 인간 IgG의 불변 영역이 인간 IgG2의 불변 영역인 (9'')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0097] (11'') 상기 인간 IgG2의 불변 영역이 돌연변이 V234A 및/또는 G237A를 갖는 (10'')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0098] (12'') 상기 중쇄의 불변 영역의 카르복시 말단에서 라이신 잔기가 인공적으로 제거되는 (10'')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0099] (13'') 상기 경쇄의 불변 영역이 인간 Igκ의 불변 영역을 포함하는 (8'')에 따른 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편.

[0100] (14'') (1'') 내지 (13'') 중 어느 하나에 따른 항-Notch4 항체 또는 그의 Notch4 결합 단편을 포함하는 약제

학적 조성물.

[0101] (15'') 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 (14'')에 따른 약제학적 조성물.

[0102] (16'') 비-소세포 폐암의 치료를 위해 사용되는 (15'')에 따른 약제학적 조성물.

[0103] (17'') 갑상선암의 치료를 위해 사용되는 (15'')에 따른 약제학적 조성물.

[0104] (18'') 전립선암의 치료를 위해 사용되는 (15'')에 따른 약제학적 조성물.

[0105] (19'') 간세포 암종의 치료를 위해 사용되는 (15'')에 따른 약제학적 조성물.

[0106] 상기 열거된 본 발명의 하나 이상의 특징의 임의의 조합의 발명도 본 발명의 범주에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0107] 도 1은 항체 B의 농도와 상대 발광(%) 값 간의 관계를 보여준다.

도 2는 Calu6 이종이식 모델에서의 항체 B의 항종양 효과 및 혈액 관류 억제 효과를 보여준다. 도 2a는 Calu6 이종이식 모델에서 대조군에 있어서 10 mg/kg의 IgG 또는 1, 3 또는 10 mg/kg의 항체 B를 꼬리 정맥 투여한 각 군에 대한 상대 종양 체적(RTV)의 변화를 보여준다(N = 8, 평균±표준 오차). 도 2b는 투여 시험의 마지막(제8일)에 시료추출된 종양에 대한 훼히스트(Hoechst) 형광 영역의 결정 결과를 보여준다(N=8, 평균±표준 오차)(* 대조군 IgG 투여군에 대하여 P<0.05(던넷(Dunnett) 검정)).

도 3은 Calu6 마우스 피하 이식 모델에서의 항체 B 및 시스플라틴(cisplatin)의 병용으로 인한 항종양 효과를 보여준다. 대조(비처리)군, 항체 B 투여군(주 2회 꼬리 정맥 투여), 시스플라틴 투여군(1회 꼬리 정맥 투여) 및 항체 B(주 2회 꼬리 정맥 투여) + 시스플라틴(1회 꼬리 정맥 투여) 병용군의 상대 종양 체적(RTV)의 변화(N = 4, 평균±표준 오차)(*: 대조군에 대하여 P < 0.05(스튜던츠 t-검정(Student's t-test), 제8일, 제24일), #: 항체 B + 시스플라틴 병용군에 대하여 시스플라틴 10 mg/kg 투여군 P < 0.05(스튜던츠 t-검정, 제36일)).

도 4는 FTC238 인간 갑상선암 세포주 이종이식 모델에서의 항체 B 및 렌바티닙 메실레이트(lenvatinib mesylate)의 병용으로 인한 항종양 효과를 보여준다. 대조(비처리)군, 항체 B 투여군(주 2회 꼬리 정맥 투여), 렌바티닙 메실레이트 투여군(1일 1회 경구 투여) 및 항체 B(주 2회 꼬리 정맥 투여) + 렌바티닙 메실레이트(1일 1회 경구 투여) 병용군의 상대 종양 체적(RTV)의 변화(N = 5, 평균±표준 오차)(*: 대조군에 대하여 P < 0.05 (스튜던츠 t-검정, 제13일), #: 항체 B + 렌바티닙 메실레이트 병용군에 대하여 단일 작용제 투여군 P < 0.05 (스튜던츠 t-검정, 제13일)).

도 5는 DU145 인간 전립선암 세포주 이종이식 모델에서의 항체 B 및 파클리탁셀(paclitaxel)의 병용으로 인한 항종양 효과를 보여준다. 대조(비처리)군, 항체 B 투여군(주 2회 꼬리 정맥 투여), 파클리탁셀 투여군(1일 1회 5일 꼬리 정맥 투여) 및 항체 B(주 2회 꼬리 정맥 투여) + 파클리탁셀(1일 1회 5일 꼬리 정맥 투여) 병용군의 종양 체적(TV)의 변화(N = 4, 평균±표준 오차)(*: 대조군에 대하여 P < 0.05(스튜던츠 t-검정, 제57일), #: 항체 B + 파클리탁셀 병용군에 대하여 단일 작용제 투여군 P < 0.05(스튜던츠 t-검정, 제57일).

도 6은 인간 환자 유래의 간세포 암종 이종이식 모델에서의 항체 B 및 렌바티닙 메실레이트의 병용으로 인한 항종양 효과를 보여준다. 대조군(3 mM HCl), 렌바티닙 메실레이트(10 mg/kg) 군, 소라페닙 토실레이트(sorafenib tosylate)(30 mg/kg) 군 및 렌바티닙 메실레이트(10 mg/kg) + 항체 B(0.5 mg/마우스) 군의 종양 체적(TV)의 변화(N = 10, 평균±표준 오차)(*: 대조군에 대하여 P < 0.05, 독립(unpaired) t-검정, 제13일).

도 7은 항체 B의 농도와 상대 발광(%) 값 간의 관계를 보여준다. 그래프는 3가지 독립적인 시험 결과의 평균값을 보여주며, 오차 막내는 그의 표준 편차를 보여준다.

도 8은 항체 B와 인간 Notch NRR 도메인 간의 상호작용의 오버레이 센서그램을 보여준다. (a) 인간 Notch1-NRR-SEAP-His, (b) 인간 Notch2-NRR-SEAP-His, (c) 인간 Notch3-NRR-SEAP-His 및 (d) 인간 Notch4-NRR-SEAP-His.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0108] 구현예의 설명

[0109] 본원에서 항체는 면역글로불린 분자의 가변 영역상에 위치한 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통하여 표적, 예를 들어, 당, 폴리뉴클레오티드, 지질, 폴리펩티드 및 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자를 지칭할 수 있다. 항체는 완전 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 지칭할 수 있다.

[0110] 항체는 임의의 부류, 예를 들어, IgG, IgA 또는 IgM(또는 그의 하위부류) 등의 것일 수 있으며, 특정 부류에 제한되지 않는다. 면역글로불린은 중쇄(때때로 H 사슬로 지칭됨)의 불변 영역의 항체 아미노산 서열에 따라 상이한 부류로 분류된다. 5가지 주요 면역글로불린 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하며, 일부가 하위부류(아이소형), 예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 및 IgA_2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린에 상응하는 중쇄의 불변 영역은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 지칭된다. 더욱이, 항체의 경쇄(때때로 L 사슬로 지칭됨)의 유형은 λ 및 κ 사슬을 포함한다.

[0111] 일 양태에서, 본 발명의 항-인간 Notch4 항체는 IgG 항체, 예를 들어, IgG_1 항체 또는 IgG_2 항체 등일 수 있다. 더욱이, 일부 경우에, 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 단량체, 이량체 또는 다량체의 형태로 존재할 수 있다.

[0112] 본원의 항체의 항원 결합 단편은 그것이 상기 항체의 기능적 및 구조적 단편이고, 상기 항체에 의해 결합될 수 있는 항원에 대한 결합능을 보유하는 한, 특별히 제한되지 않는다. 항체의 항원 결합 단편의 예에는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, 단쇄(ScFv), 그의 변이체, 항체 일부를 포함하는 융합 단백질, 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 다른 변형된 구조 등이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0113] 항체의 항원 결합 단편은 예를 들어, 완전 항체의 단백질 분해를 통해 수득될 수 있거나, 재조합 숙주 세포(예를 들어, 진핵생물, 예를 들어, 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포 또는 원핵생물, 예를 들어, 에스케리키아 콜라이(E. coli))에 의해 직접 생성될 수 있다. 예를 들어, $F(ab')_2$ 단편은 에스케리키아 콜라이로부터 Fab'-SH 단편을 직접 수집하고, 그들을 화학적 결합으로 처리함으로써 형성될 수 있다. $F(ab')_2$는 또한 $F(ab')_2$ 분자의 어셈블리를 촉진시키는 류신 지퍼 GCN4를 사용함으로써 형성될 수 있다. 더욱이, 화학적 합성 기술로 scFv를 생성하는 경우, 자동 합성기가 사용될 수 있다. 유전학적 재조합 기술로 scFv를 생성하는 경우, scFv를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 적절한 플라스미드를 적절한 숙주 세포(예를 들어, 진핵생물, 예를 들어, 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포 또는 원핵생물, 예를 들어, 에스케리키아 콜라이)로 도입할 수 있다. 관심있는 scFv를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 널리 알려져 있는 조작, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드의 라이게이션에 의해 생성될 수 있다. 결과적으로 생성되는 scFv를 해당 분야에 널리 알려져 있는 표준 단백질 정제 기술을 사용하여 단리할 수 있다.

[0114] 항체의 가변 영역은 항체 경쇄의 가변 영역 및/또는 항체 중쇄의 가변 영역을 의미할 수 있으며, 항체의 불변 영역은 항체 경쇄의 불변 영역 및/또는 항체 중쇄의 불변 영역을 의미할 수 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 초가변 영역으로도 알려져 있는 3개의 CDR에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역(FR)으로 이루어져 있다. 각 사슬 내의 CDR은 FR 근처로 유지되며, 다른 사슬 내의 CDR과 함께, 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 기술은 예를 들어, (1) 교차-종 서열 가변성에 기초한 접근법(예를 들어, 문헌[Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD]); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정 구조 연구에 기초한 접근법(문헌[Al-lazikani et al., 1997 J. Molec. Biol. 273:927-948])을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 이들 및 다른 접근법은 병용될 수 있다.

[0115] 용어 "특이적으로 결합하는"은 당업자에게 널리 알려져 있는 용어이며, 항체 등과 항원 또는 에피토프의 특이적인 결합을 결정하기 위한 방법도 또한 널리 알려져 있다. 예를 들어, Notch4의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 다른 에피토프 또는 비-에피토프 부위에 대해서보다 더 높은 친화성 및 결합 활성으로, 더욱 신속하게 및/또는 더 긴 기간 동안 상기 Notch4 에피토프에 결합할 수 있는 것이 이해된다. 그러나, 제1 표적에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 제2 표적에 특이적으로 결합하는 것으로부터 배제되지 않는다.

[0116] 모노클로날 항체는 실질적으로 균일한 항체의 모집단으로부터 수득되는 항체를 의미할 수 있다. 다시 말하면, 이러한 모집단에 포함되는 개별 항체는 존재할 수 있는 약간의 양의 천연적으로 존재하는 돌연변이체를 제외하고 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 지향되며, 매우 특이적이다. 추가로, 상이한 항원 또는 상이한 에피토프를 표적으로 하는 전형적인 폴리클로날 항체와 대조적으로, 각 모노클로날 항체는 항원의 단일 에피토프를 표적으로 한다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 균일한 항체 모집단으로부터 수득되는 항체의 특성을

나타내며, 특정 방법에 의한 항체 생성을 필요로 하는 것으로 한정적으로 해석되어서는 안된다.

[0117] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 비-인간 포유동물(예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 소, 말 및 염소) 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다. 키메라 항체는 예를 들어, 인간 항체의 불변 영역 내로 도입되는 비-인간(예를 들어, 마우스 또는 랫트) 항체의 가변 영역을 갖는 항체이며, 예를 들어, 가변 영역이 비-인간 항체로부터 유래되고, 불변 영역이 인간 항체로부터 유래되는 항체를 지칭할 수 있다. 인간화 항체는 예를 들어, 인간 항체 내로 도입되는 비-인간 항체의 초가변 영역(상보성 결정 영역(CDR)으로도 지칭됨)을 갖는 항체이며, 예를 들어, CDR이 비-인간 항체로부터 유래되고, 다른 항체 영역이 인간 항체로부터 유래되는 항체를 지칭할 수 있다. 본 발명에서, 키메라 항체와 인간화 항체 사이의 경계는 본질적으로 명확할 필요가 없으며, 항체는 키메라 항체 및 인간화 항체 둘 모두로 지칭될 수 있는 상태로 존재할 수 있음을 주의한다.

[0118] 말할 필요도 없이, 상기 항체의 기능을 유지하면서(또는 상기 항체의 기능을 부가 또는 향상시키기 위하여) (예를 들어, 항체의 변형, 또는 항체의 아미노산 서열의 부분 치환, 부가 또는 결실에 의해) 적절하게 변형된 상기 예시된 키메라 또는 인간화 항체도 또한 본 발명의 항체에 포함된다. 더욱 구체적으로, 표적에 결합된 항체의 항체-의존적 세포성 세포독성((ADCC) 활성)을 증가시키기 위하여 POTELLIGENT™ 기술에 의해 변형된 항체, 항체의 보체-의존적 세포독성((CDC) 활성)을 증가시키기 위하여 COMPLEGENT™ 기술에 의해 변형된 항체, 또는 이들 기술의 병용에 의해 변형되는 항체도 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다. 더욱이, 항체-생성 세포에 의해 생성되는 항체의 불균일성을 감소시키기 위한 인공 방법, 예를 들어, 유전적 변형에 의해 결실되는 중쇄의 카르복시 말단(C-말단)에 위치한 라이신(Lys)을 갖는 항체도 본 발명의 범주에 포함된다. 추가로, 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위와 함께 본 발명의 항체의 CDR 서열을 갖는 항체 결합 부위를 지니는 이중특이적 항체(문헌 [Kontermann (2012), mAbs 4, 182-97])도 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0119] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 원하는 대로 변형될 수 있다. 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 변형은 (a) 변형된 영역에서의 아미노산 서열의 3차원 구조, 예를 들어, 시트 또는 헬릭스 형태; (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성 상태; 또는 (c) 측쇄 부피에서의 변형의 효과를 변경시키는 변형 또는 이들 변경이 명백하게 관찰되지 않는 변형일 수 있다.

[0120] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 변형은 예를 들어, 구성하는 아미노산 잔기의 치환, 결실 및 부가 등에 의해 달성될 수 있다.

[0121] 본원에서 아미노산은 그의 가장 넓은 의미에서 이용되며, 천연 아미노산, 예를 들면, 세린(Ser), 아스파라긴(Asn), 발린(Val), 류신(Leu), 이소류신(Ile), 알라닌(Ala), 티로신(Tyr), 글리신(Gly), 라이신(Lys), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 아스파르트산(Asp), 글루탐산(Glu), 글루타민(Gln), 트레오닌(Thr), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 트립토판(Trp) 및 프롤린(Pro)뿐 아니라, 비천연 아미노산, 예를 들어, 아미노산 변이체 및 유도체도 포함한다. 당업자는 이러한 넓은 정의를 고려하여 본원에서 아미노산의 예가 L-아미노산; D-아미노산; 아미노산 변이체 및 유도체와 같은 화학적으로 변형된 아미노산; 노르류신, β-알라닌 및 오르니틴과 같은 생체 내에서 단백질의 구성 물질이 아닌 아미노산; 및 당업자에게 널리 알려져 있는 아미노산의 특성을 갖는 화학적으로 합성된 화합물을 포함하는 것을 당연하게 인식해야 한다. 비-천연 아미노산의 예에는 α-메틸아미노산(예를 들어, α-메틸알라닌), D-아미노산(예를 들어, D-아스파르트산 및 D-글루탐산), 히스티딘-유사 아미노산(예를 들어, 2-아미노-히스티딘, β-하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α-플루오로메틸-히스티딘 및 α-메틸-히스티딘), 측쇄에 과잉의 메틸렌을 갖는 아미노산("호모" 아미노산) 및 측쇄에 카르복실레이트 작용기 아미노산이 설포네이트 기로 치환되는 아미노산(예를 들어, 시스테산)이 포함된다.

[0122] 천연 발생 아미노산 잔기는 예를 들어, 공통의 측쇄 특성에 기초하여 하기의 군으로 분류될 수 있다:

[0123] (1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu 및 Ile;

[0124] (2) 중성 친수성: Cys, Ser 및 Thr;

[0125] (3) 산성: Asp 및 Glu;

[0126] (4) 염기성: Asn, Gln, His, Lys 및 Arg;

[0127] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly 및 Pro; 및

[0128] (6) 방향족: Trp, Tyr 및 Phe.

[0129] 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 구성하는 아미노산 서열의 비보존적 치환은 이들 군 중 하나에 속하는 아미노산을 다른 군에 속하는 아미노산으로 대체함으로써 수행될 수 있다. 더욱 보존적인 치환은 이들 군 중 하나에 속하는 아미노산을 동일한 군에 속하는 다른 아미노산으로 대체함으로써 수행될 수 있다. 유사하게, 아미노산 서열의 결실 또는 치환이 적절하게 수행될 수 있다.

[0130] 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 구성하는 아미노산의 변형은 예를 들어, 번역후 변형, 예를 들어, 당에 의한 글리코실화, 아세틸화 또는 인산화일 수 있다. 항체는 그의 불변 영역 내의 보존된 위치에서 글리코실화될 수 있다. 항체의 글리코실화는 통상 N-연결 또는 O-연결 중 어느 하나이다. N-연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄로의 당 모이어티의 연결을 의미한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린, 아스파라긴-X-트레오닌 및 아스파라긴-X-시스테인(여기서, X는 프롤린 외의 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 당 모이어티를 효소적으로 부가하기 위한 인식 서열이다. 이들 트리펩티드 서열 중 하나가 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 존재하는 경우 잠재적인 글리코실화 부위가 존재한다. O-연결 글리코실화는 하이드록시 아미노산(예를 들어, 세린 또는 트레오닌)으로의 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 어느 하나의 연결일 수 있으며, 일부 예에서, 5-하이드록시 프롤린 또는 5-하이드록시 라이신으로의 연결일 수 있다. 글리코실화 조건(예를 들어, 글리코실화가 생물학적 수단을 사용하여 수행되는 경우, 숙주 세포 또는 세포 배지의 유형, pH 등)은 목적에 따라 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0131] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 단독으로 또는 병용하여 다른 변형 방법에 의해 당업자에게 널리 알려져 있는 통상적인 기술적 상식에 기초하여 추가로 변형될 수 있다.

[0132] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 당업자에게 널리 알려져 있는 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 항체는 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 생성하는 하이브리도마를 사용하여, 또는 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 인코딩하는 유전자를 발현 벡터 내로 통합시키고, 상기 발현 벡터를 예를 들어, 에스케리키아 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 등 내로 도입함으로써 생성될 수 있다.

[0133] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 당업자에게 널리 알려져 있는 방법에 따라 분리되거나 정제되는 것들일 수 있다. 본원에서, "분리된" 또는 "정제된"은 그것이 인공적으로 분리되거나, 천연 상태로부터 정제된 것을 의미한다. 분자 또는 조성물이 천연 발생하는 경우, 그것이 변경되거나, 그의 원래의 환경으로부터 제거되거나, 둘 모두인 때, 그것은 "분리"되거나 "정제"된다. 분리 또는 정제 방법의 예에는 전기영동, 분자 생물학, 면역학 또는 크로마토그래피 수단, 구체적으로, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피 또는 역상 HPLC 크로마토그래피 또는 등전점 전기영동이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0134] 항원으로의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 결합 특성(예를 들어, 결합 친화성 및 교차-반응성)을 측정하기 위해 사용되는 방법은 해당 분야에서 당업자에게 널리 알려져 있는 방법일 수 있다. 예를 들어, 결합 친화성은 비제한적으로 비아코어(Biacore)™ 바이오센서, KinExA 바이오센서, 섬광 근접 분석법, ELISA, ORIGEN 면역분석법(IGEN 사), 유세포측정법, 형광 켄칭, 형광 전이, 효모 디스플레이 및/또는 면역염색으로 측정될 수 있다. Notch4의 리간드로의 Notch4의 결합에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중화 활성은 비제한적으로 비아코어™ 바이오센서, ELISA 및/또는 유세포측정법으로 측정될 수 있다. Notch4의 리간드로의 Notch4의 결합으로 인하여 인간 신체 내에서 유도되는 신호 전달, 또는 세포의 분자 발현 반응 또는 기능성 변화에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중화 활성은 비제한적으로 예를 들어, 하기의 방법을 사용하여 측정될 수 있다: (i) Notch 신호의 하류 분자의 발현의 변이를 검출하는 리포터 분석법, (ii) TNF-α 전환 효소(TACE) 또는 γ 세크레타제에 의한 Notch4 절단을 검출하는 웨스턴 블롯, (iii) Notch 세포내 도메인(NIC)의 핵 유입을 검출하는 면역 세포 염색, 및 (iv) Notch4를 발현하는 정상 세포, 예를 들어, 혈관 내피 세포 또는 암 세포를 사용하는 세포 기능성 평가.

[0135] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물일 수 있다.

[0136] 수성 또는 건조 제제 형태 중 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 및/또는 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제의 예에는 식염수; 완충제, 예를 들어, 인산, 시트르산 및 기타 유기산; 아스코르브산을 포함하는 산화방지제; 저분자량 폴리펩티드; 단백질(예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린); 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리비닐 피롤리돈; 아미노산; 글루코스, 만노오스 또는 덱스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이터, 예를 들어, EDTA; 당 알코올, 예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨; 나트륨과 같

은 염을 형성하는 반대 이온; 또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어, TWEEN™, PLURONICS™ 또는 PEG가 포함된다.

[0137] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은 예를 들어 마이크로캡슐내, 콜로이드성 약물 전달계(예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구체, 마이크로에멀젼, 나노입자 또는 나노캡슐) 내 또는 마크로에멀젼 내에 봉입될 수 있다. 항체의 투여를 필요로 하는 임의의 질환에 적합한 방출 특성을 갖는 제제에서 항체의 지속 방출형 투여가 요망되는 경우에, 항체의 마이크로캡슐화가 의도될 수 있다. 지속 방출형 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 하이드로겔(예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐 알코올)), 폴리락트산, L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어, LUPRON DEPOT™(락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구체) 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시 부티르산이 포함된다.

[0138] 생체내 투여를 위해 사용되는 제제는 무균이어야 한다. 이것은 멸균 여과 멤브레인을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

[0139] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은 비-소세포 폐암, 갑상선암, 전립선암 또는 간세포 암종의 치료에 유용할 가능성을 갖는다. 다시 말하면, 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 대상체에게 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 비-소세포 폐암, 갑상선암, 전립선암 또는 간세포 암종의 치료 방법일 수 있다. 더욱이, 본 발명의 다른 양태는 비-소세포 폐암, 갑상선암, 전립선암 또는 간세포 암종을 위한 치료적 약물의 제조를 위한 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 용도일 수 있다.

[0140] 비-소세포 폐암, 갑상선암, 전립선암 또는 간세포 암종의 치료를 위해 사용되는 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 바람직하게는 Notch4의 세포외 도메인을 인식하는 항체이다. 예를 들어, 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 1에 나타낸 인간 Notch4의 아미노산 서열에서 위치 24 내지 1447 중 임의의 부위에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다. SEQ ID NO: 1에 나타낸 인간 Notch4의 아미노산 서열에서, 위치 1 내지 23은 신호 서열이며, 위치 1448 내지 2003은 막횡단 도메인 및 세포내 도메인이다.

[0141] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 단독으로 또는 다른 작용제 또는 조성물과 병용하여 치료 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 다른 항암제와 동일하거나 상이한 시간에 투여될 수 있다. 이러한 병용 요법은 병용 투여(둘 이상의 작용제가 동일한 또는 개별 제제에 함유됨) 및 개별 투여(예를 들어, 동시에 또는 지속적으로)를 포함한다. 둘 이상의 작용제가 개별적으로 투여되는 경우, 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 투여는 동반 치료 방법 이전에 또는 이후에 이루어질 수 있다. 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 병용될 수 있는 항암제는 예를 들어, 비-소세포 폐암, 갑상선암, 전립선암 또는 간세포 암종을 치료하는데 효율적인 항암제일 수 있다. 이러한 항암제의 예에는 비제한적으로 시스플라틴, 렌바티닙 및 파클리탁셀이 포함될 수 있다. 이러한 병용 요법을 위한 약제학적 조성물의 예에는 비제한적으로 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 시스플라틴을 포함하는 약제학적 조성물, 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 렌바티닙을 포함하는 약제학적 조성물 및 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 파클리탁셀을 포함하는 약제학적 조성물이 포함될 수 있다.

[0142] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 대상체는 한정되지 않고, 본 발명은 포유동물(예를 들어, 인간, 돼지, 소, 원숭이, 개코원숭이, 개, 고양이, 랫트 및 마우스)을 위해 사용될 수 있다. 그러나, 인간은 바람직하지 않은 경우 대상체로부터 배제될 수 있다.

[0143] 본 발명의 항-Notch4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물의 대상체로의 투여 방법(예를 들어, 투여 경로, 투여량, 하루 투여 빈도 및 투여 시기)은 한정되지 않으며, 대상체의 건강 상태, 질환의 정도, 병용에 사용되는 작용제의 유형 등에 따라 당업자(예를 들어, 의사)에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0144] 기술적으로 모순되지 않는 한, 본원에 기재된 임의의 및 모든 양태 중 임의의 하나 이상을 적절하게 조합하여, 본 발명을 실시할 수 있음은 당업자에 의해 이해된다. 또한, 기술적으로 모순되지 않는 한, 본원에 기재된 임의의 및 모든 바람직한 또는 유리한 양태를 적절하게 조합하여, 본 발명을 수행하는 것이 바람직한 것은 당업자에 의해 이해된다.

[0145] 본원에 인용되는 문헌의 모든 개시내용은 명백하게 본원에 참조로 인용되는 것으로 간주되어야 하며, 당업자는

본 발명의 목적과 범주로부터 벗어나지 않고, 본원의 문맥에 따라 본 명세서의 일부로서 이들 문헌과 관련된 개시 내용을 인용하고 이해할 수 있을 것이다.

[0146] 본원에 인용된 문헌은 본 출원의 출원일 전의 관련 기술을 개시하는 목적으로만 제공되며, 본 발명자들이 선행 발명의 이유 또는 임의의 다른 이유로 상기 개시내용에 우선권을 갖지 않음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 이들 문헌의 모든 설명은 본 출원인이 입수 가능한 정보에 기초하며, 이들 설명이 정확하다는 확인을 부여하지 않는다.

[0147] 본원에 사용되는 용어는 특정 구현예를 설명하기 위해 사용되며, 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다.

[0148] 본원에 사용되는 용어 "포함한다"는 문맥에서 명백하게 다르게 이해되는 것으로 나타나지 않는 한, 기재된 항목(예를 들어, 성분, 단계, 요소 또는 수)이 존재하는 것을 의도하며, 다른 항목(예를 들어, 성분, 단계, 요소 또는 수)의 존재를 배제하지 않는다. 용어 "로 이루어진"은 용어 "로 이루어진" 및/또는 "로 본질적으로 이루어진"과 함께 기재되는 양태를 포함한다.

[0149] 본원에 사용되는 용어 "중화 활성"은 Notch4의 리간드로의 Notch4의 결합을 저해하는 활성 및/또는 Notch4의 리간드로의 Notch4의 결합에 의해 인간 신체 내에서 유도되는 신호 전달, 또는 세포의 분자 발현 반응 또는 기능성 변화를 저해하는 활성을 의미한다.

[0150] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 용어(기술 및 과학 용어 포함)는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 널리 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 사용되는 용어는 명백하게 다르게 정의되지 않는 한, 본원 및 관련 기술 분야의 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 간주되어야 하며, 이상화되거나, 과도하게 형식적인 의미를 갖는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0151] 제1 및 제2와 같은 용어를 사용하여, 다양한 요소를 표현하며, 이들 요소가 이들 용어 그들 자체에 의해 제한되지 않아야 함이 이해된다. 이들 용어는 하나의 요소를 다른 요소로부터 구별하는 목적을 위해서만 이용되고, 예를 들어, 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않고, 제1 요소를 제2 요소로 기술하는 것, 및 유사하게 제2 요소를 제1 요소로 기술하는 것이 가능하다.

[0152] 성분 함량 또는 수치 범위 등을 나타내기 위하여 본원에 사용되는 수치는 명시적으로 나타내지 않는 한, 용어 "약"으로 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 명시적으로 나타내지 않는 한, "4℃"는 "약 4℃"를 의미하는 것으로 이해되며, 당업자는 통상의 기술적 상식과 본 명세서의 문맥에 따라 당연히 그의 정도를 합리적으로 이해할 수 있다.

[0153] 문맥에서 다르게 의미하는 것으로 명백하게 나타내지 않는 한, 본원의 명세서 및 청구범위에서 사용되는 경우, 단수형으로 표현되는 각 양태가 또한 그것이 기술적으로 모순되지 않는 한 복수형일 수 있으며, 그 역도 그러한 것을 이해해야 한다.

[0154] 본 발명은 이제 실시예를 참조로 더욱 상세히 기술될 것이다. 그러나, 본 발명은 다양한 양태에 의해 구현될 수 있으며, 본원에 기재된 실시예에 제한되는 것으로 간주되어서는 안된다. 관련 기술 분야의 당업자는 본 발명의 목적 또는 범주의 변경 없이, 다양한 변형, 부가, 결실, 치환 등을 사용하여 본 발명을 수행할 수 있을 것이다.

[0155] 실시예

[0156] 실시예 1: 항-인간 Notch4 모노클로날 항체의 생성

[0157] 마우스 항-인간 Notch4 모노클로날 항체의 생성

[0158] 인간 Notch4(Genbank 수탁 번호 NP_004548.3)(SEQ ID NO: 1)에 대한 모노클로날 항체를 생성하기 위하여, Balb/c 마우스를 분비성 알칼리성 포스파타제(SEAP) 및 히스티딘 태그와 융합된 인간 Notch4의 3개의 EGF 반복부 및 음성 조절 영역(NRR)(SEQ ID NO: 1의 위치 1046 내지 1445)(본원에 하기에 "인간 Notch4 3EGF-NRR-SEAP-His"로 지칭)으로 면역화시켰다.

[0159] 인간 Notch4 3EGF-NRR-SEAP-His 단백질을 하기의 단계에 의해 제조하였다: 먼저, 발현 벡터 pcDNA3.1-인간 Notch4 3EGF-NRR-SEAP-His를 작제하였다. 인간 Notch4의 3개의 EGF 반복부 및 NRR을 PCR에 의해 증폭시키고, Igκ 신호 서열, SEAP 및 히스티딘 태그를 인코딩하는 DNA 서열을 갖는 pcDNA3.1(인비트로겐(Invitrogen)/라이프테크놀로지즈(LifeTechnologies))의 SfiI/NotI 부위로 서브클로닝하였다. 다음으로, 발현 벡터 pcDNA3.1-인간 Notch4 3EGF-NRR-SEAP-His를 TransIT-LT1(다카라(TAKARA))에 의해 HEK293 EBNA 세포(인비트로겐/라이프테크놀로지즈) 내로 트랜스펙션시켰다. 6일의 인큐베이션(5% CO2, 37℃) 후에, 배양 상층액을 수집하였다. 인간

Notch4 3EGF-NRR-SEAP-His 단백질을 프로티노(Protino) 컬럼(마슈레이-나겔(MACHEREY-NAGEL))으로 정제하였다.

[0160] 20 ㎍의 상기 인간 Notch4 3EGF-NRR-SEAP-His 단백질을 동량의 GERBU 애쥬번트(adjuvant)(게부 바이오테크닉 게엠베하(GERBU Biotechnik GmbH))와 혼합하고, Balb/c 마우스 족척 내로 피하 주사하였다. 3회의 추가의 주사를 제3일, 제7일 및 제10일에 투여하였다. 마우스를 다음날 희생시키고, 말초 림프절을 수집하였다. 각 말초 림프절의 절반을 SCID 마우스 내로 이식하였다. 림프절 세포를 각 림프절의 나머지 절반으로부터 제조하고, GenomeONE-CF(이시하라 산교 카이샤, 리미티드(Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.))의 존재하에 5:1의 비로 P3U1 골수종 세포에 융합시켰다. 상기 융합된 세포를 96-웰 플라스틱 플레이트에서 배양하였다. 7일의 인큐베이션(5% CO2, 37℃) 후에, 배양 상층액을 수집하였다.

[0161] 10 ㎍의 인간 Notch4 3EGF-NRR-SEAP-His 단백질을 이식 당일 및 이식 6일 후에 이식 SCID 마우스의 상기 림프절에 정맥내 투여하였다. 최종 면역화 3일 후에, 말초 림프절 세포를 수집하고, 상기 기재된 바와 같이 융합시키고, 배양하였다.

[0162] 8개의 클론의 마우스 모노클로날 항체를 상기 단계에 의해 수득하였다. 이들로부터, 가장 바람직한 선도 항체(6-3-A6)를 마우스 Notch4 및 인간 Notch4에 대한 Notch4-특이적 신호 저해 활성 및 결합 활성에 기초하여 선택하였다.

[0163] 마우스 항-인간 Notch4 모노클로날 항체(6-3-A6)의 서열 분석

[0164] 클론 6-3-A6의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 DNA 서열을 5'-RACE(cDNA 말단의 5'-신속 증폭)에 의해 증폭시켰다. 전체 RNA를 TRIZOL(인비트로겐/라이프테크놀로지즈)을 사용하여 상기 하이브리도마로부터 제조하고, DNase(퀴아젠(QIAGEN), RNase 부재 DNase 세트)로 처리하였다. 이중-가닥 cDNA를 cDNA 합성 키트(다카라)를 사용하여 상기 전체 RNA로부터 제조하였다. ad29S(ACATCACTCCGT(SEQ ID NO: 2)) 및 ad29AS(ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT(SEQ ID NO: 3))의 어닐링에 의해 수득되는 5' 어댑터를 상기 cDNA에 부가하였다. 수득되는 cDNA를 5' 정방향 프라이머(5'-PCR4 프라이머, AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG(SEQ ID NO: 4)) 및 3' 역방향 프라이머(GCCAGTGGATAGACTGATGG(SEQ ID NO: 5)를 마우스 IgG1 중쇄를 증폭시키기 위해 사용하고, GATGGATACAGTTGGTGCAGC(SEQ ID NO: 6)를 마우스 Igκ 경쇄를 증폭시키기 위하여 사용하였음)에 의해 증폭시켰다. 상기 증폭된 cDNA를 pCR2.1 벡터(인비트로겐/라이프테크놀로지즈) 내로 삽입하였다. 유전자 서열을 ABI3130XL로 분석하였다. 이러한 분석에 의해 확인된 유전자 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열은 하기 표에 나타나 있다.

[0165] 표 1

마우스 항-인간 Notch4 항체(6-3-A6)의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 가변 영역 (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPD KRLELVATINSNGGRTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS SLKSEDTAMYYCARDQGFAYWGQGTLVTVSA
경쇄 가변 영역 (SEQ ID NO: 8)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQ SPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLA DYFCQQYSSYPWTFGGGTKLEIK

표 2

마우스 항-인간 Notch4 항체(6-3-A6)의 핵산 서열

명칭	서열
중쇄 가변 영역 (SEQ ID NO: 9)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCT GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACT TTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAC AAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAATAGTAATGGTGGT AGAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATC TCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGC AGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA GACCAGGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACT GTCTCTGCA
경쇄 가변 영역 (SEQ ID NO: 10)	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCA GTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGAT GTGGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAA TCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACT GGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCA GATTATTTCTGTCAGCAATATAGCAGCTATCCGTGGACGTTC GGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0166]

[0167] 키메라 항-인간 Notch4 항체 및 인간화 항-인간 Notch4 항체의 제조

[0168] 중첩 연장 PCR을 사용하여, 6-3-A6의 중쇄 가변 영역의 유전자 서열을 중쇄로서 돌연변이 V234A 및 G237A를 갖는 인간 IgG2의 불변 영역의 유전자 서열에 결합시키고, 6-3-A6의 경쇄 가변 영역의 유전자 서열을 경쇄로서 인간 Igκ의 불변 영역의 유전자 서열에 결합시켜, 키메라 항체를 인코딩하는 DNA 서열을 제조하였다. 본원에 사용되는 "V234A"는 위치 234에서 발린이 알라닌으로 치환되는 돌연변이를 나타내고, "G237A"는 위치 237에서 글리신이 알라닌으로 치환되는 돌연변이를 나타낸다. 결과적으로 수득되는 서열을 발현 벡터(중쇄에 있어서 pEE6.4 및 경쇄에 있어서 pEE12.4, 론자(Lonza)) 내로 삽입하였다. 키메라 항체의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열은 하기 표에 나타나 있다.

표 3

키메라 항-인간 Notch4 항체의 아미노산 서열

명칭	서열(가변 영역은 **볼드체**로 나타나 있으며, 가변 영역에서 카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR은 밑줄로 표시된다.)
중쇄 (SEQ ID NO: 11)	**EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPD KRLELVATINSNGGRTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS SLKSEDTAMYYCARDQGFAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KTVERKCCVECPPCPAPPAAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
경쇄 (SEQ ID NO: 12)	**DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQ SPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLA DYFCQQYSSYPWTFGGGTKLEIK**RTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC

[0169]

표 4

키메라 항-인간 Notch4 항체의 핵산 서열

명칭	서열(가변 영역은 **볼드체**로 나타나 있다.)
중쇄 (SEQ ID NO: 13)	**GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCT** **GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACT** **TTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAC** **AAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAATAGTAATGGTGGT** **AGAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATC** **TCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGC** **AGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA** **GACCAGGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACT** **GTCTCTGCA**GCTAGCACAAAAGGCCCCTCTGTCTTCCCTCTG GCTCCCTGCTCCCGCTCCACCTCCGAGTCCACTGCCGCTCTG GGCTGTCTGGTCAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTCACTGTG AGTTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGAGTCCACACATTT CCCGCTGTGCTGCAGAGCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTAGT GTGGTCACCGTGCCTTCAAGCAATTTCGGGACTCAGACCTAT ACATGCAACGTGGACCATAAGCCATCTAATACTAAGGTCGAT AAAACCGTGGAGCGAAAATGCTGCGTGGAATGCCCACCTTGT CCTGCTCCACCAGCCGCTGCACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCT CCAAAGCCCAAAGACACACTGATGATCAGCAGAACTCCTGAG GTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGATCCCGAA GTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGGGTCGAAGTGCATAAT GCAAAGACTAAACCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCTACCTTT AGAGTCGTGAGTGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGACTGGCTG AACGGAAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGGCCTG CCCGCCCCTATCGAGAAAACAATTAGTAAGACTAAAGGCCAG CCAAGGGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGTCGCGAG GAAATGACAAAGAACCAGGTCTCACTGACTTGTCTGGTGAAA GGGTTCTATCCATCCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAAT GGACAGCCCGAAAACAATTACAAGACCACACCACCCATGCTG GACAGCGATGGATCCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTG GATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCCTGCTCT GTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACTCAGAAGTCC CTGTCCCTGTCTCCTGGCAAATGA
경쇄 (SEQ ID NO: 14)	**GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCA** **GTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGAT** **GTGGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAA** **TCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACT** **GGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT** **TTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCA** **GATTATTTCTGTCAGCAATATAGCAGCTATCCGTGGACGTTC** **GGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA**CGTACGGTCGCCGCC CCCTCCGTGTTTATTTTTCCTCCATCTGACGAACAGCTGAAG AGTGGGACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTTCTAC CCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTCGACAACGCTCTG CAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAGTGACTGAACAGGACAGC AAGGATTCCACCTATTCTCTGAGCTCCACCCTGACACTGAGC AAAGCAGATTACGAAAAGCACAAAGTCTATGCCTGCGAAGTG ACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTGACCAAGTCCTTTAAC AGGGGAGAGTGTTGA

[0170]

[0171] 마우스 항체 6-3-A6 CDR을 인간 항체의 가변 영역 내로 이식시킴으로써 항체를 인간화시켰다. 마우스 항체 6-3-A6의 아미노산 서열을 아비시스(Abysis) 소프트웨어(UCL로부터 허가)를 사용하여 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링하고, 이러한 넘버링에 기초하여, CDR을 확인하기 위한 카바트 정의 또는 AbM 정의 방법에 따라 상기 CDR을 결정하였다. 6-3-A6 CDR의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열은 하기 표에 나타나 있다.

표 5

6-3-A6 CDR의 아미노산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR 1 (카바트 정의) (SEQ ID NO: 15)	SYGMS
중쇄 CDR 1 (AbM 정의) (SEQ ID NO: 16)	GFTFSSYGMS
중쇄 CDR 2 (카바트 정의) (SEQ ID NO: 17)	TINSNGGRTYYPDSVKG
중쇄 CDR 2 (AbM 정의) (SEQ ID NO: 18)	TINSNGGRTY
중쇄 CDR 3 (SEQ ID NO: 19)	DQGFAY
경쇄 CDR 1 (SEQ ID NO: 20)	KASQDVGTAVA
경쇄 CDR 2 (SEQ ID NO: 21)	WASTRHT
경쇄 CDR 3 (SEQ ID NO: 22)	QQYSSYPWT

[0172]

표 6

6-3-A6 CDR의 핵산 서열

명칭	서열
중쇄 CDR 1 (카바트 정의) (SEQ ID NO: 23)	AGCTATGGCATGTCT
중쇄 CDR 1 (AbM 정의) (SEQ ID NO: 24)	GGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCT
중쇄 CDR 2 (카바트 정의) (SEQ ID NO: 25)	ACCATTAATAGTAATGGTGGTAGAACCTATTATCCAGACA GTGTGAAGGGC
중쇄 CDR 2 (AbM 정의) (SEQ ID NO: 26)	ACCATTAATAGTAATGGTGGTAGAACCTAT
중쇄 CDR 3 (SEQ ID NO: 27)	GACCAGGGTTTTGCTTAC
경쇄 CDR 1 (SEQ ID NO: 28)	AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGCC
경쇄 CDR 2 (SEQ ID NO: 29)	TGGGCATCCACCCGGCACACT
경쇄 CDR 3 (SEQ ID NO: 30)	CAGCAATATAGCAGCTATCCGTGGACG

[0173]

[0174] 6-3-A6의 프레임워크 영역(FR)에 대한 높은 상동성에 기초하여, 인간 항체의 FR, 경쇄에 있어서 IGKV1-27*1 또는 IGKV3-15*1 및 JK1, 및 중쇄에 있어서 IGHV3-64*01 및 JH4를 인간화 항체의 FR로서 선택하였다. 그 다음, 마우스 6-3-A6의 3D 구조 예측 모델을 사용하여, CDR의 아미노산과 상호작용하는 FR 내의 아미노산을 예측하고, CDR과 함께 이식하였다. C-말단 라이신 잔기와 함께 또는 이것 없이, 돌연변이 V234A 및 G237A가 있는 인간 IgG2 및 인간 Igκ의 불변 영역을 각각 중쇄 및 경쇄의 불변 영역으로 사용하였다. HK1, HK2 및 HK3을 카바트 정의 방법에 의해 결정되는 CDR이 이식되는 인간화 항체의 중쇄로서 설계하였으며, HA1 및 HA2를 AbM 정의 방법에 의해 결정되는 CDR이 이식되는 인간화 항체의 중쇄로서 설계하였으며, L1, L2 및 L5를 IGKV1-27*1 및 JK1을 사용하는 인간화 항체의 경쇄로서 설계하였으며, L3, L4 및 L6을 IGKV3-15*1 및 JK1을 사용하는 인간화 항체의 경쇄로서 설계하였다. 하기의 표는 인간화 항체의 가변 영역, 돌연변이 V234A 및 G237A가 있고, C-말단 라이신 잔기가 존재하거나 존재하지 않는 인간 IgG2 및 인간 Igκ의 불변 영역의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열을 보여준다.

표 7

인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄(HK1)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열(카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 31)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPG KGLEYVSTINSNGGRTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMG SLRAEDMAVYYCARDQGFAYWGQGTLVTVSS
핵산 서열 (SEQ ID NO: 32)	GAGGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGGGGGGCTGGTGCAGCCA GGAGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACC TTCAGCTCCTACGGGATGTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGACTGGAGTATGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGC CGAACATACTATCCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACTATC TCTAGAGATAACAGTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGGGC AGCCTGAGAGCAGAAGACATGGCCGTCTACTATTGTGCAAGG GATCAGGGATTCGCATACTGGGGACAGGGAACTCTGGTGACC GTCTCAAGC

[0175]

표 8

인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄(HK2)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열(카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 33)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPG KGLELVSTINSNGGRTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMG SLRAEDMAVYYCARDQGFAYWGQGTLVTVSS
핵산 서열 (SEQ ID NO: 34)	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCA GGAGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACC TTCAGCTCCTACGGGATGTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGACTGGAGCTGGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGC CGAACATACTATCCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACTATC TCTAGAGATAACAGTAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGGGC AGCCTGAGAGCAGAAGACATGGCCGTCTACTATTGTGCCCGA GATCAGGGGTTCGCTTATTGGGGACAGGGGACACTGGTGACC GTGAGCAGC

[0176]

표 9

인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄(HK3)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열(카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 35)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPG KGLELVATINSNGGRTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMG SLKAEDMAVYYCARDQGFAYWGQGTLVTVSS
핵산 서열 (SEQ ID NO: 36)	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGTGGGGGAGGCCTGGTGCAGCCA GGAGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACC TTCAGCTCCTACGGGATGTCCTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGG AAAGGACTGGAGCTGGTCGCCACCATCAACTCTAATGGAGGC CGAACATACTATCCTGACAGTGTGAAGGGCCGGTTCACTATT AGCAGAGATAACTCCAAAAATACCCTGTATCTGCAGATGGGC AGCCTGAAGGCAGAAGACATGGCCGTCTACTATTGTGCTCGG GATCAGGGGTTCGCCTATTGGGGGCAGGGGACTCTGGTCACT GTCTCTTCC

[0177]

표 10

인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄(HA1)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

[0178]

명칭	서열(AbM 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 37)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPG KGLEYVSTINSNGGRTYYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMG SLRAEDMAVYYCARDQGFAYWGQGTLVTVSS
핵산 서열 (SEQ ID NO: 38)	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGGGGGGGACTGGTGCAGCCA GGAGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACC TTCAGCTCCTACGGGATGTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGG AAGGGACTGGAGTATGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGC CGAACATACTATGCCAACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACTATC TCTAGAGACAACAGTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGGGC AGCCTGAGAGCAGAAGATATGGCCGTCTACTATTGTGCTCGG GATCAGGGCTTTGCTTATTGGGGACAGGGGACACTGGTCACC GTCTCCTCC

[0179]

표 11

인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄(HA2)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열(AbM 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 39)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPG KGLELVSTINSNGGRTYYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMG SLRAEDMAVYYCARDQGFAYWGQGTLVTVSS
핵산 서열 (SEQ ID NO: 40)	GAGGTGCAGCTGGTCGAATCCGGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCA GGAGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACC TTCAGCTCCTACGGGATGTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGG AAGGGACTGGAGCTGGTCAGCACCATCAACTCCAATGGAGGC CGAACATACTATGCCAACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACTATC TCTAGAGACAACAGTAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGGGC AGCCTGAGAGCAGAAGATATGGCCGTCTACTATTGTGCTCGG GATCAGGGCTTCGCCTACTGGGGGCAGGGAACACTGGTCACC GTCTCCTCA

[0180]

표 12

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄(L1)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열(카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 41)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGK VPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVA TYYCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
핵산 서열 (SEQ ID NO: 42)	GACATTCAGATGACACAGAGCCCTTCATCTCTGAGTGCATCA GTGGGAGACAGGGTCACCATCACATGCAAAGCCAGCCAGGAT GTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGAAA GTGCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCTAGTACACGGCACACT GGCGTCCCATCCAGATTCAGCGGCTCCGGGTCTGGAACCGAC TTTACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGATGTGGCC ACATACTATTGCCAGCAGTATTCATCTTATCCTTGGACCTTC GGACAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA

표 13

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄(L2)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

[0181]

명칭	서열(카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 43)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGK VPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVA TYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
핵산 서열 (SEQ ID NO: 44)	GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCTCTGAGTGCATCA GTGGGAGACAGGGTCACCATCACATGCAAAGCCAGCCAGGAT GTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGAAA GTGCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCTAGTACACGGCACACT GGCGTCCCATCCAGATTCAGCGGCTCCGGGTCTGGAACCGAC TTTACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGATGTGGCC ACATACTTCTGCCAGCAGTATTCATCCTATCCTTGGACCTTC GGACAGGGAACTAAAGTGGAGATTAAG

표 14

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄(L3)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

[0182]

명칭	서열(카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 45)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVGTAVAWYQQKPGQ APRLLIYWASTRHTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFA VYYCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
핵산 서열 (SEQ ID NO: 46)	GAAATTGTGATGACCCAGTCTCCCGCCACACTGTCTGTGAGT CCAGGAGAGAGGGCAACTCTGTCTTGCAAGGCCAGTCAGGAC GTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAG GCTCCTCGGCTGCTGATCTATTGGGCATCCACTCGGCACACC GGCATTCCCGCCAGATTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACAGAG TTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGAGCGAAGATTTCGCT GTCTACTATTGCCAGCAGTATTCTAGTTATCCTTGGACATTC GGCCAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA

표 15

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄(L4)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

[0183]

명칭	서열(카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 47)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVGTAVAWYQQKPGQ APRLLIYWASTRHTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFA VYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
핵산 서열 (SEQ ID NO: 48)	GAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCAACACTGTCTGTGAGT CCAGGAGAGAGGGCAACTCTGTCTTGCAAGGCCAGTCAGGAC GTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAG GCTCCTCGGCTGCTGATCTATTGGGCATCCACTCGGCACACC GGCATTCCCGCCAGATTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACAGAG TTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGAGCGAAGATTTCGCT GTCTACTTTTGCCAGCAGTATTCATCCTATCCTTGGACCTTC GGACAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA

표 16

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄(L5)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열(카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 49)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGK SPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVA TYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
핵산 서열 (SEQ ID NO: 50)	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGTCCGCATCT GTGGGCGACCGGGTCACCATTACATGTAAAGCCAGTCAGGAT GTGGGAACAGCCGTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAA TCTCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCTTCCACACGGCACACT GGCGTGCCCTCTAGATTCAGTGGCTCAGGGAGCGGAACAGAC TTTACTCTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCAGAGGATGTGGCA ACTTACTTCTGCCAGCAGTACTCAAGCTATCCCTGGACCTTT GGCCAGGGGACAAAAGTCGAAATCAAG

[0184]

표 17

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄(L6)의 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열(카바트 정의 방법으로 결정되는 CDR 은 밑줄로 표시된다.)
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 51)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVGTAVAWYQQKPGQ SPRLLIYWASTRHTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFA VYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
핵산 서열 (SEQ ID NO: 52)	GAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCAACACTGTCTGTGAGT CCAGGAGAGAGGGCAACTCTGTCTTGCAAGGCCAGTCAGGAC GTGGGAACCGCAGTCGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAG TCTCCTCGGCTGCTGATCTATTGGGCATCCACTCGGCACACC GGCATTCCCGCCAGATTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACAGAG TTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGAGCGAAGATTTCGCT GTCTACTTTTGCCAGCAGTATTCATCCTATCCTTGGACCTTC GGACAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAA

[0185]

표 18

돌연변이 V234A 및 G237A, 및 C-말단 라이신이 있는 인간 IgG2 의 불변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 53)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPAAAPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
핵산 서열 (SEQ ID NO: 54)	GCTAGCACAAAAGGCCCCTCTGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGC TCCCGCTCCACCTCCGAGTCCACTGCCGCTCTGGGCTGTCTG GTCAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTCACTGTGAGTTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGAGTCCACACATTTCCCGCTGTG CTGCAGAGCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTAGTGTGGTCACC GTGCCTTCAAGCAATTTCGGGACTCAGACCTATACATGCAAC GTGGACCATAAGCCATCTAATACTAAGGTCGATAAAACCGTG GAGCGAAAATGCTGCGTGGAATGCCCACCTTGTCCTGCTCCA CCAGCCGCTGCACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCC AAAGACACACTGATGATCAGCAGAACTCCTGAGGTCACCTGC GTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTCCAGTTT AACTGGTACGTGGATGGGGTCGAAGTGCATAATGCAAAGACT AAACCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCTACCTTTAGAGTCGTG AGTGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAG GAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGGCCTGCCCGCCCCT ATCGAGAAAACAATTAGTAAGACTAAAGGCCAGCCAAGGGAA CCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGTCGCGAGGAAATGACA AAGAACCAGGTCTCACTGACTTGTCTGGTGAAAGGGTTCTAT CCATCCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGACAGCCC GAAAACAATTACAAGACCACACCACCCATGCTGGACAGCGAT GGATCCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTGGATAAAAGC CGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCCTGCTCTGTGATGCAC GAAGCCCTGCACAACCACTACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTG TCTCCTGGCAAATGA

[0186]

표 19

돌연변이 V234A 및 G237A가 있고 C-말단 라이신이 없는 인간 IgG2의 불변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 55)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPAAAPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
핵산 서열 (SEQ ID NO: 56)	GCTAGCACAAAAGGCCCCTCTGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGC TCCCGCTCCACCTCCGAGTCCACTGCCGCTCTGGGCTGTCTG GTCAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTCACTGTGAGTTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGAGTCCACACATTTCCCGCTGTG CTGCAGAGCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTAGTGTGGTCACC GTGCCTTCAAGCAATTTCGGGACTCAGACCTATACATGCAAC GTGGACCATAAGCCATCTAATACTAAGGTCGATAAAACCGTG GAGCGAAAATGCTGCGTGGAATGCCCACCTTGTCCTGCTCCA CCAGCCGCTGCACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCC AAAGACACACTGATGATCAGCAGAACTCCTGAGGTCACCTGC GTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTCCAGTTT AACTGGTACGTGGATGGGGTCGAAGTGCATAATGCAAAGACT AAACCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCTACCTTTAGAGTCGTG AGTGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAG GAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGGCCTGCCCGCCCCT ATCGAGAAAACAATTAGTAAGACTAAAGGCCAGCCAAGGGAA CCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGTCGCGAGGAAATGACA AAGAACCAGGTCTCACTGACTTGTCTGGTGAAAGGGTTCTAT CCATCCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGACAGCCC GAAAACAATTACAAGACCACACCACCCATGCTGGACAGCGAT GGATCCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTGGATAAAAGC CGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCCTGCTCTGTGATGCAC GAAGCCCTGCACAACCACTACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTG TCTCCTGGCTGA

[0187]

표 20

인간 Igκ의 불변 영역의 아미노산 및 핵산 서열

명칭	서열
아미노산 서열 (SEQ ID NO: 57)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
핵산 서열 (SEQ ID NO: 58)	CGTACGGTCGCCGCCCCCTCCGTGTTTATTTTTCCTCCATCT GACGAACAGCTGAAGAGTGGGACCGCCTCCGTGGTGTGCCTG CTGAACAATTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAA GTCGACAACGCTCTGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAGTG ACTGAACAGGACAGCAAGGATTCCACCTATTCTCTGAGCTCC ACCCTGACACTGAGCAAAGCAGATTACGAAAAGCACAAAGTC TATGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTG ACCAAGTCCTTTAACAGGGGAGAGTGTTGA

[0188]

[0189] 이들 인간화 항체의 가변 영역의 유전자 서열을 진스크립트 유에스에이 인코포레이티드(GenScript USA Inc.)에 의해 합성하고, C-말단 라이신이 있거나, 이것이 없는 인간 IgG2의 불변 영역 또는 인간 Igκ의 불변 영역을 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 pcDNA3.3(인비트로겐) 내로 삽입하였다. 상기 발현 벡터를 프리스타일(FreeStyle) 293 발현 시스템(인비트로겐)을 사용하여 프리스타일 293-F 세포(인비트로겐) 내로 트랜스펙션시켜, 항체를 생성하였다. 상층액을 수집하고, 단백질 A(지이 헬쓰케어)로 정제하였다.

[0190] 인간화 항체의 전장(가변 영역 + 불변 영역) 유전자 서열을 유사하게 최적화시키고, 진스크립트 유에스에이 인코포레이티드에 의해 완전히 합성하고, 중쇄를 pEE6.4 내로 삽입하고, 경쇄를 pEE12.4(론자) 내로 삽입하였다. 이들 발현 벡터를 상기와 같이 사용하여, 항체를 생성하였다. 인간화 항체의 최적화된 뉴클레오티드 서열은 하

기 표에 나타나 있다.

표 21

인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄의 최적화된 핵산 서열(돌연변이 V234A 및 G237A가 있고, C-말단 라이신이 없는 HK2 가변 영역 + 인간 IgG2 불변 영역)

명칭	서열
핵산 서열 (SEQ ID NO: 59)	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGGGGGGGTCTGGTGCAGCCA GGCGGATCCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTTCTGGGTTCACA TTTTCCAGCTACGGCATGTCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGC AAGGGACTGGAGCTGGTGAGTACAATCAACTCAAATGGGGGT CGAACTTACTATCCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTCACTATT TCCCGGGATAACAGCAAAAATACCCTGTACCTGCAGATGGGG TCCCTGCGAGCTGAAGACATGGCAGTGTACTATTGTGCCCGT GATCAGGGTTTCGCTTATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTCACC GTGTCTAGTGCTTCTACCAAGGGACCATCCGTGTTCCCACTG GCACCATGCTCCCGGAGCACATCTGAGAGTACTGCAGCCCTG GGCTGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAACCAGTCACAGTG AGCTGGAACTCTGGCGCACTGACAAGCGGAGTCCACACTTTT CCTGCCGTGCTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCTCTGAGCTCT GTGGTCACTGTCCCCAGTTCAAATTTCGGAACTCAGACCTAT ACATGCAACGTGGACCATAAGCCTAGCAATACCAAGGTCGAT AAAACAGTGGAGCGTAAATGCTGCGTGGAATGCCCACCTTGT CCAGCACCACCAGCTGCAGCCCCTTCCGTGTTCCTGTTTCCT CCAAAGCCAAAAGACACCCTGATGATCTCTAGAACCCCCGAG GTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGTCACGAGGATCCTGAA GTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAAGTGCATAAT GCCAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTTCAACTCAACCTTT CGCGTCGTGTCCGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGGACTG CCCGCTCCTATCGAGAAAACTATTTCCAAGACCAAAGGACAG CCTAGGGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCCTTCCCGGGAG GAAATGACTAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGTCTGGTGAAA GGGTTCTATCCTAGTGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCAAAT GGTCAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCACCCATGCTG GACAGTGATGGCTCATTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTC GATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCTCC GTGATGCACGAAGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAATCC CTGAGCCTGTCCCCCGGCTGA

[0191]

표 22

인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄의 최적화된 핵산 서열(돌연변이 V234A 및 G237A가 있고, C-말단 라이신이 없는 HK3 가변 영역 + 인간 IgG2 불변 영역)

명칭	서열
핵산 서열 (SEQ ID NO: 60)	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGTCTGGTGCAGCCA GGAGGATCCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCTTCTGGGTTCACA TTTTCCAGCTACGGCATGTCCTGGGTCCGGCAGGCACCAGGC AAGGGACTGGAGCTGGTGGCCACAATCAACAGTAATGGGGGT AGAACTTACTATCCCGACTCAGTGAAGGGCAGGTTCACTATT AGTCGGGATAACTCAAAAAATACCCTGTACCTGCAGATGGGG TCCCTGAAGGCTGAAGACATGGCAGTGTACTATTGTGCCCGC GATCAGGGTTTCGCTTATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTCACC GTGTCTAGTGCCTCCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCACTG GCTCCCTGCTCCCGAAGCACATCTGAGAGTACTGCAGCCCTG GGCTGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAACCAGTCACAGTG AGCTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGAGTCCACACTTTT CCTGCAGTGCTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCCCTGAGCTCT GTGGTCACTGTCCCCAGTTCAAATTTCGGAACTCAGACCTAT ACATGCAACGTGGACCATAAACCTAGCAATACCAAGGTCGAT AAAACAGTGGAGCGGAAGTGCTGTGTGGAATGCCCACCTTGT CCAGCTCCACCAGCTGCAGCCCCTTCTGTGTTCCTGTTTCCT CCAAAGCCAAAAGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAG GTCACATGTGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGATCCTGAA GTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAAGTGCATAAT GCAAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTTCAACTCTACCTTT CGCGTCGTGAGTGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGGACTG CCCGCCCCTATCGAGAAAACTATTAGCAAGACCAAAGGACAG CCTCGAGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCCTAGTCGTGAG GAAATGACTAAGAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAA GGGTTCTATCCTAGCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAAT GGTCAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCACCCATGCTG GACAGTGATGGCTCATTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTC GATAAATCCAGGTGGCAGCAGGGAAATGTGTTTTCATGCTCC GTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCATTACACCCAGAAGAGC CTGTCCCTGAGCCCCGGCTGA

[0192]

표 23

인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄의 최적화된 핵산 서열(돌연변이 V234A 및 G237A가 있고, C-말단 라이신이 없는 HA2 가변 영역 + 인간 IgG2 불변 영역)

명칭	서열
핵산 서열 (SEQ ID NO: 61)	GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCT GGCGGATCCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTTCTGGGTTCACA TTTTCCAGCTACGGCATGTCCTGGGTCCGCCAGGCACCAGGC AAGGGACTGGAGCTGGTGAGTACAATCAACTCAAATGGGGGT CGAACTTACTATGCTAACTCCGTGAAGGGCAGGTTCACTATT TCCCGGGACAACAGCAAAAATACCCTGTACCTGCAGATGGGG TCCCTGCGAGCTGAAGACATGGCAGTGTACTATTGTGCCCGT GATCAGGGTTTCGCTTATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTCACC GTGTCTAGTGCTTCTACCAAGGGGCCCAGTGTGTTTCCACTG GCACCCTGCTCCCGGAGCACATCTGAGAGTACTGCAGCCCTG GGCTGTCTGGTGAAGGATTATTTCCCTGAACCAGTCACAGTG AGCTGGAACTCTGGCGCACTGACAAGCGGAGTCCACACTTTT CCTGCCGTGCTGCAGTCATCCGGCCTGTACTCTCTGAGCTCT GTGGTCACTGTCCCCAGTTCAAATTTCGGAACTCAGACCTAT ACATGCAACGTGGACCATAAGCCTAGCAATACCAAGGTCGAT AAAACAGTGGAGCGTAAATGCTGTGTGGAATGCCCACCTTGT CCAGCTCCACCAGCTGCAGCCCCTTCTGTGTTCCTGTTTCCT CCAAAGCCAAAAGACACCCTGATGATCTCTAGAACCCCCGAG GTCACATGTGTGGTCGTGGACGTCAGTCACGAGGATCCAGAA GTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAAGTGCATAAT GCAAAGACAAAACCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCAACCTTT CGCGTCGTGTCCGTGCTGACAGTCGTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGGACTG CCCGCCCCTATCGAGAAAACTATTTCCAAGACCAAAGGACAG CCTAGGGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCCTTCCCGGGAG GAAATGACTAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGTCTGGTGAAA GGGTTCTATCCTAGTGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCAAAT GGTCAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCACCCATGCTG GACAGTGATGGCTCATTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTC GATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGAAATGTGTTTTCATGCTCC GTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACACAGAAAAGC CTGAGCCTGAGCCCCGGCTGA

[0193]

표 24

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄의 최적화 핵산 서열(L3 가변 영역 + 인간 Igκ 불변 영역)

명칭	서열
핵산 서열 (SEQ ID NO: 62)	GAAATCGTGATGACTCAGTCCCCCGCTACACTGAGCGTGTCT CCCGGAGAGAGAGCTACTCTGTCTTGCAAGGCAAGTCAGGAC GTGGGAACTGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAG GCACCACGACTGCTGATCTATTGGGCTAGTACAAGGCACACT GGCATTCCTGCCCGGTTCAGTGGCTCAGGATCCGGGACAGAG TTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAGTCCGAAGATTTCGCT GTGTACTATTGCCAGCAGTACTCTAGTTATCCTTGGACCTTT GGTCAGGGCACAAAGGTCGAGATCAAACGAACCGTGGCCGCT CCAAGCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAG TCAGGTACAGCCTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTAC CCAAGGGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTG CAGAGCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCA AAGGATTCCACCTATAGCCTGTCATCCACTCTGACCCTGAGC AAAGCTGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAAGTC ACACACCAGGGTCTGAGTTCTCCAGTCACCAAATCTTTTAAT AGAGGCGAGTGCTGA

[0194]

표 25

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄의 최적화된 핵산 서열(L4 가변 영역 + 인간 Igκ 불변 영역)

명칭	서열
핵산 서열 (SEQ ID NO: 63)	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTACACTGAGCGTGTCT CCCGGGAGAGAGAGCTACTCTGTCTTGCAAGGCAAGTCAGGAC GTGGGAACTGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAG GCACCACGACTGCTGATCTATTGGGCTAGTACAAGGCACACT GGCATTCCTGCCCGGTTCAGTGGCTCAGGATCCGGGACAGAG TTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAGTCCGAAGATTTCGCT GTGTACTTTTGCCAGCAGTACTCTAGTTATCCTTGGACCTTC GGTCAGGGCACAAAGGTCGAGATCAAACGAACCGTGGCCGCT CCAAGCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAG TCAGGTACAGCCTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTTAC CCAAGGGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTG CAGAGCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCA AAGGATTCCACCTATAGCCTGTCATCCACTCTGACCCTGAGC AAAGCTGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAAGTC ACACACCAGGGTCTGTCCAGTCCAGTCACCAAATCCTTTAAT CGGGGAGAGTGCTGA

[0195]

표 26

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄의 최적화된 핵산 서열(L5 가변 영역 + 인간 Igκ 불변 영역)

명칭	서열
핵산 서열 (SEQ ID NO: 64)	GATATTCAGATGACCCAGTCTCCTTCCAGCCTGTCTGCAAGT GTGGGAGACAGGGTCACCATCACATGCAAAGCCTCCCAGGAT GTGGGAACCGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAA AGCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTTCTACCAGGCACACA GGCGTGCCAAGTCGGTTCTCAGGCTCCGGAAGCGGGACCGAC TTTACTCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGATGTGGCA ACATACTTCTGCCAGCAGTACTCTAGTTATCCATGGACTTTT GGTCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGAGAACTGTGGCCGCT CCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAG AGTGGTACAGCCTCAGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTAC CCTAGGGAGGCTAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCACTG CAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAGTGACAGAACAGGACTCC AAAGATAGCACTTATTCTCTGTCATCCACACTGACTCTGTCT AAGGCCGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAGGTC ACACACCAGGGTCTGAGCAGTCCAGTCACCAAGAGCTTTAAC CGAGGAGAGTGCTGA

[0196]

표 27

인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄의 최적화된 핵산 서열(L6 가변 영역 + 인간 Igκ 불변 영역)

명칭	서열
핵산 서열 (SEQ ID NO: 65)	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTACACTGAGCGTGTCT CCCGGGAGAGAGAGCTACTCTGTCTTGCAAGGCAAGTCAGGAC GTGGGAACTGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAG AGTCCCCGCCTGCTGATCTATTGGGCCTCCACAAGGCACACT GGCATTCCTGCTCGGTTCAGTGGCTCAGGATCCGGGACAGAG TTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAGAGCGAAGATTTCGCC GTGTACTTTTGCCAGCAGTACTCTAGTTATCCTTGGACCTTC GGTCAGGGCACAAAGGTCGAGATCAAACGAACCGTGGCCGCT CCAAGCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAG TCAGGTACAGCTTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTTAC CCAAGGGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTG CAGAGCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCA AAGGATTCCACCTATAGCCTGTCATCCACTCTGACCCTGTCT AAAGCTGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAAGTC ACCCACCAGGGGCTGAGTAGTCCAGTCACCAAGAGTTTTAAT CGGGGCGAGTGTTGA

[0197]

[0198] 하기의 실시예에서, 실시예 1에서 결정된 항체 6-3-A6의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 항체를 사용하여 실험을 수행하였다.

[0199] 편의를 위하여, 하기의 실시예에 사용되는 특정 항체는 "항체 A", "항체 B", "항체 C", "항체 D", "항체 E", "항체 F" 및 "항체 G"로 지칭될 것이다.

[0200] 항체 A에서, 중쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 HK2의 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 L3의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0201] 항체 B에서, 중쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 HK3의 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 L3의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0202] 항체 C에서, 중쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 HK2의 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 L4의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0203] 항체 D에서, 중쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 HK3의 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 L5의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0204] 항체 E에서, 중쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 HK2의 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 L6의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0205] 항체 F에서, 중쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 HA2의 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 L3의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0206] 항체 G에서, 중쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 HK3의 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄 가변 영역은 실시예 1에 기재된 L4의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0207] 항체 A 내지 G에서, 공통의 인간 항체의 중쇄의 C-말단에 위치한 라이신(Lys)이 결실되는 것을 주의한다.

[0208] 실시예 2: 항-인간 Notch4 항체의 중화 활성

[0209] 항-인간 Notch4 항체(항체 B)의 중화 활성을 Notch4-GAL4 루시퍼라제 리포터 분석법으로 평가하였다. 이러한 실험은 Notch4 세포내 도메인의 일부가 GAL4 DNA 결합 도메인으로 치환된 변형된 유전자 및 GAL4 UAS와 루시퍼라제 2CP 사이의 융합된 유전자 발현 벡터가 도입된 b.end3 세포 주(이하 "리포터 세포"로 지칭)가 Notch 리간드인 DLL4로 자극되는 경우 루시퍼라제 활성을 평가함으로써 Notch4에 특이적인 신호 전달을 평가하는 실험 시스템이다.

[0210] 재조합 인간 DLL4(알앤디 시스템즈(R&D Systems), 1506-D4-050/CF)를 PBS 중에 용해시켜, 10 ㎍/㎖ 용액(이하 DLL4 용액)을 제조하였다. 평편-바닥 96-웰 백색 플레이트(그레이너(Greiner), 655083)에, 50 ㎕/웰(500

ng/웰)의 DLL4 용액 및 비-자극된 웰에 대하여 50 ㎕/웰의 PBS를 각각 분배하고, 이를 4℃에서 하룻밤 놔두어, 96-웰 백색 플레이트에 DLL4가 고체화되게 하였다. 리포터 세포를 10% 우태아혈청(FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 D-MEM 배양 배지에 현탁화시켜, 1 x 10^5개/㎖의 세포 현탁액을 제조하였다. 고체화된 DLL4가 있는 각 웰을 PBS로 3회 세척하고, 50 ㎕/웰(5,000개 세포/웰)의 세포 현탁액을 씨딩하였다. 항-인간 Notch4 항체 희석액(최종 농도: 0, 0.00064, 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2 및 10 ㎍/㎖) 또는 인간 IgG2 κ(시그마(SIGMA), I5404, 최종 농도: 10 ㎍/㎖)를 각각 50 ㎕로 첨가하였으며, 이것을 37℃에서 22시간 동안 배양하였다. 리포터 세포의 루시퍼라제 활성을 하기와 같이 스테디-글로(Steady-Glo) 분석 시스템(프로메가, E2510)으로 평가하였다.

[0211] 100 마이크로리터의 스테디-글로 용액을 배양 후에 각 웰에 첨가하고, 교반한 다음, 실온에 30분 동안 두었다. 발광을 멀티라벨(Multilabel) 플레이트 판독기(엔비젼(Envision) 2102-0020, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer))로 측정하였다. 상대 발광(%)을 하기의 식에 의해 측정된 발광 값으로부터 계산하였다.

[0212] 상대 발광(%) = (시편 웰의 발광 세기 - 비-자극된 웰의 평균 발광 세기) / (대조군 웰의 평균 발광 세기 - 비-자극된 웰의 평균 발광 세기)

[0213] 항체 B의 농도와 상대 발광(%) 값 간의 관계는 도 1에 나타나 있다. 도 1의 그래프는 3가지 독립적인 시험 결과의 평균값을 보여주며, 오차 막대는 그의 표준 편차를 보여준다. IC50은 0.011 ㎍/㎖(95%CI; 0.0036 - 0.034)이었다.

[0214] 다음으로, 항체 B를 포함하는 복수의 항-인간 Notch4 항체(항체 A, 항체 B, 항체 C, 항체 D, 항체 E, 항체 F 및 항체 G)에 대하여 유사한 실험을 수행하였으며, 항체의 중화 활성을 측정하였다.

[0215] 재조합 인간 DLL4(알앤디 시스템즈, 1506-D4-050/CF)를 PBS 중에 용해시켜, 10 ㎍/㎖ 용액(이하 DLL4 용액)을 제조하였다. 평편-바닥 96-웰 백색 플레이트(그레이너, 655083)에, 50 ㎕/웰(500 ng/웰)의 DLL4 용액 및 비-자극된 웰에 대하여 50 ㎕/웰의 PBS를 각각 분배하고, 이를 4℃에서 하룻밤 놔두어, 96-웰 백색 플레이트에 DLL4가 고체화되게 하였다. 리포터 세포를 10% 우태아혈청(FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 D-MEM 배양 배지에 현탁화시켜, 1 x 10^5개/㎖의 세포 현탁액을 제조하였다. 고체화된 DLL4가 있는 각 웰을 PBS로 3회 세척하고, 50 ㎕/웰(5,000개 세포/웰)의 세포 현탁액을 씨딩하였다. 각각의 항-인간 Notch4 항체 희석액(최종 농도: 0 및 10 ㎍/㎖) 또는 인간 IgG2 κ(시그마, I5404, 최종 농도: 10 ㎍/㎖)를 각각 50 ㎕로 첨가하였으며, 이것을 37℃에서 22시간 동안 배양하였다. 리포터 세포의 루시퍼라제 활성을 하기와 같이 듀얼(Dual) luc-글로(Glo) 분석 시스템(프로메가, E2940)으로 평가하였다.

[0216] 100 마이크로리터의 듀얼-글로 루시퍼라제 기질 용액을 배양 후에 각 웰에 첨가하고, 교반한 다음, 실온에 20분 동안 두었다. 반딧불이 루시퍼라제의 발광을 멀티라벨 플레이트 판독기(엔비젼 2102-0020, 퍼킨 엘머)로 측정하였다. 다음으로, 100 ㎕의 듀얼-글로 스탑 앤드 글로(Stop & Glo) 기질 용액을 각 웰에 첨가하고, 교반한 다음, 실온에 20분 동안 두었다. 레닐라(Renilla) 루시퍼라제의 발광을 멀티라벨 플레이트 판독기(엔비젼 2102-0020, 퍼킨 엘머)로 측정하였다. 각 웰의 상대 발광(반딧불이 루시퍼라제/레닐라 루시퍼라제)을 발광 값의 비로부터 계산하였다. 추가로, 상대 발광(%)을 하기의 식을 사용하여 각각의 계산된 값으로부터 계산하였으며, 각 항체의 Notch4 신호 저해 활성을 평가하였다.

[0217] 상대 발광(%) = (시편 웰의 평균 상대 발광 - 비-자극된 웰의 평균 상대 발광) / (대조군 웰의 평균 상대 발광 - 비-자극된 웰의 평균 상대 발광)

[0218] 각 항체의 Notch4 신호 저해 활성(10 ㎍/㎖ 농도로 수행되는 시험)은 하기 표 28에 기재되어 있다.

[0219] 하기 표에서, 예를 들어, 설명 "HK2L3(Lys-)"은 실험에 사용되는 인간화 항-인간 Notch4 항체의 중쇄 가변 영역이 실시예 1에서 인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄 HK2의 중쇄 가변 영역이며, 경쇄 가변 영역이 실시예 1에서 인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄 L3의 경쇄 가변 영역이며, 공통의 인간 항체의 중쇄의 C-말단에 위치한 라이신(Lys)이 이러한 항체에서 결실되는 것을 의미한다.

표 28

[0220]

시료	H/L 사슬	대조군의 %	S.D.	p 값
항체 A	HK2L3 (Lys-)	0.1	3.2	5.9E-11
항체 B	HK3L3 (Lys-)	10.8	11.4	8.3E-07
항체 C	HK2L4 (Lys-)	-9.9	14.0	8.0E-07
항체 D	HK3L5 (Lys-)	21	8	1.8E-07
항체 E	HK2L6 (Lys-)	5	3	1.7E-11
항체 F	HA2L3 (Lys-)	17	5	3.5E-09
항체 G	HK3L4 (Lys-)	13	9	2.4E-07

[0221] 실시예 3: 재조합 Notch4-NRR 도메인 단백질로의 인간화 항-Notch4 항체의 결합의 동태 분석

[0222] 인간, 사이노몰거스 원숭이, 마우스 및 랫트 Notch4-NRR 도메인과 항체 B의 상호작용의 동태 분석을 비아코어로 수행하였다. 항체 B를 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 항체 B로 트랜스펙션된 안정한 CHO 세포주의 배양 상층액으로부터 정제하였다. 인간, 원숭이, 마우스 및 랫트 Notch4-NRR 도메인을 분비성 알칼리성 포스파타제(SEAP) 및 10 x 히스티딘 태그를 사용하여 융합 단백질로서 제조하였다. 이들 단백질에 대한 유전자를 엑스피펙타민(ExpiFectamine) 293을 사용하여 Opti-MEM(인비트로겐)에서 Expi293F 세포 내로 트랜스펙션시켰다. 이들 세포를 Expi293 발현 배지(인비트로겐)에서 배양하였다. 약술하면, 세포를 7.5 x 10^7개 세포/25.5 ㎖로 희석하고, 제0일에 엑스피펙타민 293 시약에 의해 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 약 16시간에, 150 ㎕의 엑스피펙타민 293 트랜스펙션 인핸서 1 및 1.5 ㎖의 엑스피펙타민 293 트랜스펙션 인핸서 2를 각 플라스크에 첨가하였다. 상층액을 제4일에 수집하였다. 이들 항원을 Ni-NTA 슈퍼플로우(Superflow) 컬럼(퀴아젠)으로 정제하였다. 상호작용을 하기와 같이 분석하였다. 정제된 항체 B를 CM5 센서 칩(지이 헬쓰케어) 상에 고정된 항-인간 IgG Fc 항체에 의해 포획하였다. 정제된 Notch4-NRR 융합 단백질을 8가지의 상이한 농도로 센서 칩 상으로 주입하였으며, 제조처의 지침에 따라 상호작용 및 그의 해리를 관찰하였다.

표 29

[0223]

항체 B의 계산된 동태 파라미터

단백질	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
인간 Notch4-NRR	3.17E+05	1.18E-03	3.74E-09
사이노몰거스 원숭이 Notch4-NRR	2.95E+05	1.06E-03	3.62E-09
마우스 Notch4-NRR	6.01E+05	7.27E-03	1.12E-08
랫트 Notch4-NRR	ND	ND	ND

[0224] 추가의 항-Notch4 저해성 인간화 항체의 동태 분석을 하기와 같이 수행하였다. 인간 Notch4-NRR 도메인 Fc 융합 단백질을 CHO 세포주를 사용하여 발현하였다. 배양 상층액 중 항원을 인간 Notch4의 상이한 에피토프를 인식하는 CM5 센서 칩 상에 고정된 항-인간 Notch4 항체에 의해 포획하였다. 그 다음, 인간화된 항-인간 Notch4 항체를 다양한 농도로 센서 칩 상에 주입하였다. 상호작용 및 그의 해리 상수를 제조처의 지침에 따라 계산하였다. 결과는 표 30에 나타나 있다.

[0225] 하기 표에서, 예를 들어, 설명 "HK2L3(Lys-)"은 실험에 사용되는 인간화 항-인간 Notch4 항체의 중쇄 가변 영역이 실시예 1에서 인간화 항-인간 Notch4 항체 중쇄 HK2의 중쇄 가변 영역이며, 경쇄 가변 영역이 실시예 1에서 인간화 항-인간 Notch4 항체 경쇄 L3의 경쇄 가변 영역이며, 공통의 인간 항체의 중쇄의 C-말단에 위치한 라이신(Lys)이 이러한 항체에서 결실되는 것을 의미한다. 설명 "(Lys-)"이 없는 것들은 인간 항체의 중쇄의 C-말단에 위치한 Lys이 결실되지 않은 것을 의미한다.

표 30

인간 Notch4-NRR 융합 단백질에 대한 인간화 항- Notch4 저해 항체의 계산된 동태 파라미터

시료	H/L 사슬	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax1 (RU)
항체 A	HK2L3(Lys-)	1.62E+06	8.89E-04	5.55E-10	33.4
항체 B	HK3L3(Lys-)	1.66E+06	7.10E-04	4.41E-10	26.2
항체 C	HK2L4(Lys-)	1.91E+06	1.06E-03	5.56E-10	35.9
항체 D	HK3L5(Lys-)	1.82E+06	8.63E-04	4.75E-10	37
항체 E	HK2L6(Lys-)	2.23E+06	1.15E-03	5.19E-10	28.9
항체 F	HA2L3(Lys-)	1.55E+06	1.36E-03	9.82E-10	20.2
항체 G	HK3L4(Lys-)	1.78E+06	1.11E-03	6.33E-10	29.2

[0226]

[0227] 추가의 더 많은 항체로 수행되는 상기 표 30과 유사한 실험의 실험 결과는 표 31에 나타나 있다.

표 31

번호	HL 작제물	ka (평균)	kd (평균)	KD (평균)	N
6-3-A6	원래	2.35E+06	7.42E-04	3.21E-10	9
37	HK3L3(Lys-)	2.48E+06	8.22E-04	3.31E-10	2
34	HK2L3(Lys-)	5.05E+06	1.24E-03	3.95E-10	2
31	HA2L3(Lys-)	3.50E+06	8.94E-04	4.34E-10	2
39	HK3L5(Lys-)	2.10E+06	1.09E-03	5.29E-10	5
15	HK2L5	2.07E+06	1.12E-03	5.49E-10	6
20	HK3L5	1.72E+06	1.02E-03	6.01E-10	6
30	HA2L5	2.49E+06	1.36E-03	6.12E-10	6
36	HK2L5(Lys-)	1.93E+06	1.13E-03	6.17E-10	5
41	HK2L6(Lys-)	1.87E+06	1.15E-03	6.20E-10	3
14	HK2L4	1.89E+06	1.17E-03	6.34E-10	6
13	HK2L3	1.62E+06	1.09E-03	6.82E-10	6
35	HK2L4(Lys-)	1.81E+06	1.27E-03	7.15E-10	5
28	HA2L3	1.95E+06	1.37E-03	7.27E-10	6
29	HA2L4	2.33E+06	1.69E-03	7.38E-10	6
19	HK3L4	1.61E+06	1.20E-03	7.55E-10	6
38	HK3L4(Lys-)	1.86E+06	1.24E-03	7.60E-10	5
42	HK3L6(Lys-)	1.51E+06	1.14E-03	7.66E-10	3
33	HA2L5(Lys-)	2.01E+06	1.50E-03	7.76E-10	3
32	HA2L4(Lys-)	2.43E+06	1.62E-03	8.30E-10	5
40	HA2L6(Lys-)	1.83E+06	1.51E-03	8.38E-10	3
18	HK3L3	1.22E+06	1.04E-03	8.97E-10	6
17	HK3L2	1.13E+06	1.45E-03	1.29E-09	4
12	HK2L2	1.23E+06	1.57E-03	1.38E-09	4
27	HA2L2	1.63E+06	2.22E-03	1.41E-09	4
16	HK3L1	7.83E+05	1.33E-03	1.76E-09	4
26	HA2L1	9.49E+05	1.66E-03	1.76E-09	4
10	HK1L5	2.72E+06	4.89E-03	1.78E-09	3
11	HK2L1	8.75E+05	1.60E-03	1.84E-09	4
9	HK1L4	2.78E+06	1.18E-02	4.34E-09	2
8	HK1L3	3.71E+06	1.96E-02	4.87E-09	2
25	HA1L5	6.36E+06	4.52E-02	7.20E-09	2
24	HA1L4	1.18E+07	1.13E-01	9.54E-09	1
23	HA1L3	3.57E+07	5.24E-01	1.47E-08	1
22	HA1L2	6.49E+05	1.22E-02	1.86E-08	2
21	HA1L1	6.15E+04	2.79E-02	4.53E-07	1

[0228]

[0229] 실시예 4: 항-인간 Notch4 항체를 사용하는 생체내 약리학적 시험(Calu6 이종이식 모델에서의 항체 B의 항종양

효과 및 혈액 관류 억제 효과)

[0230] 10% FBS, MEM 비필수 아미노산, 피루브산나트륨 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 EMEM 배양 배지에서 배양되는 인간 비-소세포 폐암 세포주 Calu6(ATCC 번호 HTB-56)을 EMEM 배양 배지를 사용하여 1.6 x 10^8개 세포/㎖의 농도로 제조하고, 매트리겔(Matrigel)™(코닝(CORNING) 카탈로그 번호 354234)과 1:1로 혼합하여, 8.0 x 10^7개 세포/㎖의 세포 현탁액을 제조하였다. 0.1 ㎖의 용량을 6주령 누드 마우스(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 암컷, 찰스 리버 래보러터리즈 저팬, 인코포레이티드(CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.))의 우측 뒤등쪽 영역으로 피하 이식하였다. 이식 후 28일에, 종양의 단축 및 장축을 전자 디지털 캘리퍼(디지매틱(DIGIMATIC)™ 캘리퍼, 미츠토요 코포레이션(Mitsutoyo Corporation))로 측정하고, 종양 체적 TV를 하기의 계산 식으로 계산하였다.

[0231] TV(㎣) = 장축(mm) x 단축(mm) x 단축(mm) / 2

[0232] 종양 체적의 평균값이 그룹 간에 대략적으로 동일하도록 제1 투여 일에 종양 체적에 기초하여 무작위화를 수행하였다. 비히클 용액(25 mM 히스티딘, 250 mM 수크로스 및 0.05% Tween80(pH 5.3)) 및 염수가 1:9이도록 항체 B를 투여 직전에 희석하여, 0.1, 0.3 및 1.0 ㎎/㎖ 평가 시편(각각 1, 3 및 10 ㎎/㎏의 투여군)을 수득하였다. 평가 시편을 0.2 ㎖/20 g(마우스 체중)의 투여량으로 주 2회(그룹화 일을 제1일로 계수하는 경우 제1일 및 제4일) 꼬리 정맥 주사에 의해 투여하였다. 대조군을 위하여, 11.6 ㎎/㎖의 대조군 IgG(크롬퓨어(ChromPure) 인간 IgG, 전체 분자, 잭슨 이뮤노리서치 래보러터리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories), 카탈로그 번호 009-000-003)를 PBS로 1.0 ㎎/㎖로 희석하고, 0.2 ㎖/20 g(마우스 체중)으로 꼬리 정맥 주사에 의해 투여하였다(투여 부피 10 ㎎/㎏). 실험을 그룹마다 8마리의 마우스로 수행하였다. 상대 종양 체적 RTV를 하기의 식을 사용하여 대조군 IgG 그룹 및 항체 B 투여 그룹의 각각에 대하여 계산하였으며, 이는 도 2a에 나타나 있다.

[0233] RTV = 측정 일의 종양 체적 / 투여 시작 시의 종양 체적

[0234] 항체 B는 Calu6 이종이식 모델에서 모든 투여량에서 유의미한 항종양 효과를 보였다.

[0235] 꼬리 정맥에 주입된 형광 염료(훼히스트)로 인한 혈관 주위의 세포의 핵 염색에 의해 형광을 결정함으로써 종양 혈액 관류를 평가하였다(문헌[Funahashi et al. (2014), Cancer Sci., 105(10), 1334-42]). 최종 시험일에 종양 직경을 측정한 후에, 10 ㎎/㎖의 훼히스트 33342(라이프 테크놀로지즈 카탈로그 번호 H3570)를 PBS를 사용하여 2 x로 희석하고, 5.0 ㎎/㎖의 희석된 훼히스트 33342를 꼬리 정맥에서 0.1 ㎖/헤드(head)로 주사하였다. 마우스를 훼히스트의 주사 5분 후에 경추 탈골에 의해 안락사시켰으며, 수집된 종양을 OCT 화합물(사쿠라 피네테크 저팬 컴퍼니, 리미티드(Sakura Finetek Japan Co., Ltd). 카탈로그 번호 4583) 내에 매립시켜, 동결 블록을 생성하였다.

[0236] 동결된 섹션의 종양 혈관을 항-CD31 항체(FITC 컨쥬게이트, 비디 파민젠 카탈로그 번호 553372)로의 면역형광 염색으로 처리하고, 종양 혈관 핫스팟(hotspot)(종양마다 5개)의 훼히스트 형광을 BIOREVO 형광 현미경(KEYENCE, BZ-9000)으로 촬영하였다. 훼히스트-양성 영역을 영상 분석 소프트웨어(루미나 비젼(Lumina Vision) 버젼 2.2.2, 미타니 코포레이션(MITANI CORPORATION))로 결정하고, 각 종양 섹션의 평균을 계산하였으며, 이는 도 2b에 나타나 있다.

[0237] 항체 B는 Calu6 이종이식 모델에서 모든 투여량에서 유의미한 혈액 관류 억제 효과를 보였다.

[0238] 실시예 5: Calu6 이종이식 모델에서의 항체 B 및 시스플라틴의 병용

[0239] 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 EMEM 배양 배지에서 배양되는 인간 비-소세포 폐암 세포주 Calu6(ATCC 번호 HTB-56)을 EMEM 배양 배지를 사용하여 1.2 x 10^8개 세포/㎖의 농도로 제조하고, 매트리겔™(코닝 카탈로그 번호 354234)과 1:1로 혼합하여, 6.0 x 10^7개 세포/㎖의 세포 현탁액을 제조하였다. 0.1 ㎖의 용량을 7주령 누드 마우스(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 암컷, 찰스 리버 래보러터리즈 저팬, 인코포레이티드)의 우측 뒤등쪽 영역으로 피하 이식하였다. 이식 후 27일에, 종양의 단축 및 장축을 전자 디지털 캘리퍼(디지매틱™ 캘리퍼, 미츠토요 코포레이션)로 측정하고, 종양 체적 TV를 하기의 계산식으로 계산하였다.

[0240] 종양 체적 TV(㎣) = 장축(mm) x 단축(mm) x 단축(mm) / 2

[0241] 종양 체적의 평균값이 그룹 간에 대략적으로 동일하도록 제1 투여 일에 종양 체적에 기초하여 무작위화를 수행하였다. 항체 B에 있어서, 10.34 ㎎/㎖ 용액(비히클: 25 mM 인산염, 200 mM 트레할로스 및 0.05% Tween80(pH

5.5))을 투여 직전에 PBS로 희석하여, 용액을 2.5 ㎎/㎖로 제조하고, 이를 0.2 ㎖(500 ㎍)/헤드의 투여량으로 5주 동안 주 2회 정맥내 주사에 의해 투여하였다. 시스플라틴을 제1 투여 일에 10 ㎎/㎏의 용량으로 꼬리 정맥 투여에 의해 1회 투여하였다. 실험을 그룹마다 4마리의 마우스로 수행하였다. 상대 종양 체적 RTV를 하기의 식을 사용하여 대조(비처리)군, 항체 B 투여군, 시스플라틴 투여군 및 항체 B + 시스플라틴 병용군의 각각에 대하여 계산하였으며, 이는 도 3에 나타나 있다.

[0242] RTV = 측정 일의 종양 체적 / 투여 시작시의 종양 체적

[0243] 항체 B 및 시스플라틴의 병용은 Calu6 이종이식 모델에서 단독의 시스플라틴에 비하여 유의미하게 뛰어난 항종양 효과를 보였다.

[0244] 실시예 6: FTC238 이종이식 모델에서의 항체 B 및 렌바티닙 메실레이트의 병용

[0245] 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM/HAM의 F12(1:1) 배양 배지 중에 배양된 인간 갑상선암 세포주 FTC238(수미토모 다이니폰 파마 컴퍼니, 리미티드(Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.)로부터 구입)을 DMEM/HAM의 F12(1:1) 배양 배지를 사용하여 1.2 x 10^8개 세포/㎖의 농도로 제조하고, 매트리겔™(코닝 카탈로그 번호 354234)와 1:1로 혼합하여, 6.0 x 10^7개 세포/㎖의 세포 현탁액을 제조하였다. 0.1 ㎖의 용량을 7주령 누드 마우스(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 암컷, 찰스 리버 래보러터리즈 저팬, 인코포레이티드)의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 이식 후 8일에, 종양의 단축 및 장축을 전자 디지털 캘리퍼(디지매틱™ 캘리퍼, 미츠토요 코포레이션)로 측정하고, 종양 체적 TV를 하기의 계산식으로 계산하였다.

[0246] 종양 체적 TV(㎣) = 장축(㎜) x 단축(㎜) x 단축(㎜) / 2

[0247] 종양 체적의 평균값이 그룹 간에 대략적으로 동일하도록 제1 투여 일에 종양 체적에 기초하여 무작위화를 수행하였다. 항체 B에 있어서, 10.8 ㎎/㎖의 항체 B(비히클: 25 ㎜ 히스티딘 및 250 ㎜ 수크로스(pH 5.3))를 투여 직전에 비히클 용액으로 희석하여, 2.5 ㎎/㎖의 항체 B를 제조하고, 이를 0.2 ㎖(500 ㎍)/헤드의 투여량으로 2주 동안 주 2회 꼬리 정맥 주사에 의해 투여하였다. 렌바티닙 메실레이트를 12일 동안 1일 1회 10 ㎎/㎏의 용량으로 경구 투여하였다. 실험을 그룹마다 5마리의 마우스로 수행하였다. 상대 종양 체적 RTV를 하기의 식을 사용하여 대조(비처리)군, 항체 B 투여군, 렌바티닙 메실레이트 투여군 및 항체 B + 렌바티닙 메실레이트 병용군의 각각에 대하여 계산하였으며, 이는 도 4에 나타나 있다.

[0248] RTV = 측정 일의 종양 체적 / 투여 시작 시의 종양 체적

[0249] 항체 B 및 렌바티닙 메실레이트의 병용은 FTC238 이종이식 모델에서 단독으로 투여되는 항체 B 또는 단독의 렌바티닙 메실레이트에 비하여 유의미하게 뛰어난 항종양 효과를 보였다.

[0250] 실시예 7: DU145 이종이식 모델에서의 마우스 항체 6-3-A6 및 파클리탁셀의 병용

[0251] 10% FBS, 피루브산나트륨, 2-머캅토에탄올 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 RPMI1640 배양 배지에서 배양되는 인간 전립선암 세포주 DU145(ATCC 번호 HTB-81)를 RPMI1640 배양 배지를 사용하여 6.0 x 10^7개 세포/㎖의 농도로 제조하였다. 0.1 ㎖의 용량을 6주령 누드 마우스(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 암컷, 찰스 리버 래보러터리즈 저팬, 인코포레이티드)의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 이식 24일 후에, 종양의 단축 및 장축을 전자 디지털 캘리퍼(디지매틱™ 캘리퍼, 미츠토요 코포레이션)로 측정하고, 종양 체적 TV를 하기의 계산식으로 계산하였다.

[0252] 종양 체적 TV(㎣) = 장축(㎜) x 단축(㎜) x 단축(㎜) / 2

[0253] 종양 체적의 평균값이 그룹 간에 대략적으로 동일하도록 제1 투여 일의 종양 체적에 기초하여 무작위화를 수행하였다. 6-3-A6에 있어서, 5.11 ㎎/㎖의 6-3-A6(비히클: PBS)을 투여 직전에 PBS로 희석하여, 2.5 ㎎/㎖의 6-3-A6을 제조하고, 이를 0.2 ㎖(500 ㎍)/헤드의 투여량으로 4주 동안 주 2회 꼬리 정맥 주사에 의해 투여하였다. 파클리탁셀을 5일 동안 1일 1회 20 ㎎/㎏의 용량으로 꼬리 정맥 투여에 의해 투여하였다. 실험을 그룹마다 4마리의 마우스로 수행하였다. 대조(비처리)군, 6-3-A6 투여군, 파클리탁셀 투여군 및 6-3-A6 + 파클리탁셀 병용군의 각각의 종양 체적 TV는 도 5에 나타나 있다.

[0254] 6-3-A6 및 파클리탁셀의 병용은 DU145 이종이식 모델에서 단독의 6-3-A6 또는 단독의 파클리탁셀에 비하여 유의미하게 뛰어난 항종양 효과를 보였다.

[0255] 실시예 8: 간세포 암종 환자 유래 이종이식 모델에서의 항체 B와 렌바티닙 메실레이트의 병용

[0256] 간세포 암종(HCC)에서의 항체 B에서의 항종양 효과를 시험하기 위하여, LI0050, HuPrime® 환자 유래 이종이식 모델(크라운 바이오사이언스 인코포레이티드(Crown Bioscience Inc.))을 사용하였다. LI0050은 소라페닙 저항성이 보고된 여성 HCC 환자 유래의 일차 종양 조직을 주입한 모델 마우스이다(국제 특허 팜플렛 WO2015/031604호).

[0257] LI0050 스톡 마우스로부터 종양 단편을 수집하고, 종양 발생을 위하여 2 내지 4 ㎜ 직경의 단편을 BALB/c 누드 마우스의 우측 옆구리에 피하 주입하였다. 종양 크기를 캘리퍼를 사용하여 2가지 치수로 측정하고, 종양 체적 TV를 하기의 계산식으로 계산하였다.

[0258] 종양 체적 TV(㎣) = 장축(㎜) x 단축(㎜) x 단축(㎜) / 2

[0259] 평균 종양 크기가 약 192 ㎣에 도달하는 경우, 처리를 시작하였다. 종양 체적의 평균값이 그룹 간에 대략적으로 동일하도록 제1 투여 일에 종양 체적에 기초하여 무작위화를 수행하였다. 각각의 군은 10마리의 마우스로 이루어졌다. 무작위화일을 제0일로 표기하였다. 제0일부터 제13일까지, 각 그룹의 마우스를 (i) 대조군(3 mM HCl), (ii) 렌바티닙 메실레이트(10 mg/kg), (iii) 소라페닙 토실레이트(30 mg/kg) 또는 (iv) 렌바티닙 메실레이트(10 mg/kg) + 항체 B(0.5 mg/마우스)의 각각으로 1일 1회 처리하였다.

[0260] 2개의 그룹 간의 비교를 위하여, 독립적인 시료 t-검정을 사용하였다.

[0261] 항체 B 및 렌바티닙 메실레이트의 병용은 대조군에 비하여 유의미하게 뛰어난 항종양 효과를 보였다.

[0262] 실시예 9: 항-인간 Notch4 폴리클로날 항체와 항체 B 간의 신호 저해 활성의 비교

[0263] 다음으로, 폴리클로날 항-인간 Notch4 항체(산타 크루즈(Santa Cruz), SC8643, 이하 N-17) 및 항체 B의 신호 저해 활성을 Notch4-GAL4 루시퍼라제 리포터 분석 시스템을 사용하여 비교하였다.

[0264] 슬라이드-에이-라이저(Slide-A-Lyzer)(써모 사이언티픽(Thermo scientific), 66333)를 사용하여, 4℃에서 8시간 동안 PBS에서 투석을 수행하여, N-17에 함유된 아지드화나트륨을 제거하였다. 아미콘 울트라(Amicon Ultra)(밀리포어(Millipore), UFC503096)를 사용하여 투석된 N-17 용액을 농축시킨 후에, 현미 분광 광도계(나노 드롭(Nano Drop), 써모(Thermo))를 사용하여 농도를 측정하였다.

[0265] 재조합 인간 DLL4(알앤디 시스템즈, 1506-D4-050/CF)를 PBS 중에 용해시켜, 10 ㎍/㎖ 용액(이하 DLL4 용액)을 제조하였다. 평편-바닥 96-웰 백색 플레이트(그레이너, 655083)에, 50 ㎕/웰(500 ng/웰)의 DLL4 용액 및 비-자극된 웰에 대하여 50 ㎕/웰의 PBS를 각각 분배하고, 이를 4℃에서 하룻밤 놔두어, 96-웰 백색 플레이트에 DLL4가 고체화되게 하였다. 리포터 세포를 10% 우태아혈청(FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 D-MEM 배양 배지에 현탁화시켜, 1 x 10^5개/㎖의 세포 현탁액을 제조하였다. 고체화된 DLL4가 있는 각 웰을 PBS로 3회 세척하고, 50 ㎕/웰(5,000개 세포/웰)의 세포 현탁액을 씨딩하였다. 투석/농축 후에, 배양 배지로 희석된 N-17 희석액 또는 항체 B 희석액(최종 농도: 0, 0.01, 0.1, 1 및 10 ㎍/㎖)을 각각 50 ㎕로 첨가하였으며, 이것을 37℃에서 22시간 동안 배양하였다. 리포터 세포의 루시퍼라제 활성을 하기와 같이 스테디-글로 분석 시스템(프로메가, E2510)으로 평가하였다.

[0266] 100 마이크로리터의 스테디-글로 용액을 배양 후에 각 웰에 첨가하고, 교반한 다음, 실온에 30분 동안 두었다. 발광을 멀티라벨 플레이트 판독기(엔비젼 2102-0020, 퍼킨 엘머)로 측정하였다. 상대 발광을 하기의 식에 의해 측정된 발광 값으로부터 계산하였다.

[0267] 상대 발광(%) = (시편 웰의 발광 세기 - 비-자극된 웰의 평균 발광 세기) / (대조군 웰의 평균 발광 세기 - 비-자극된 웰의 평균 발광 세기)

[0268] 항체 B의 농도와 상대 발광(%) 값 간의 관계는 도 7에 나타나 있다. 도 7의 그래프는 3가지 독립적인 시험 결과의 평균값을 보여주며, 오차 막대는 그의 표준 편차를 보여준다. 신호 저해 활성이 항체 B에 대하여 확인되었지만, N-17에 있어서, N-17의 Notch4 신호 저해 활성이 조사되는 농도 범위에서 관찰되지 않았다.

[0269] 실시예 10: 항체 B와 재조합 용해성 인간 Notch NRR 도메인 간의 결합의 동태 분석

[0270] 인간 Notch 아이소형(Notch1, Notch2, Notch3 및 Notch4)의 NRR 도메인과 항체 B 간의 상호작용에 대하여 비아코어 T100을 사용한 동태 분석을 수행하였다. 항체 B를 단백질 A 친화성 크로마토그래피, 캡토(Capto) Q 음이온 교환 크로마토그래피 및 UNOsphere S 양이온 교환 크로마토그래피를 순차적으로 이용하여, 항체 B의 안정한 발현 CHO 세포주의 배양 상층액으로부터 정제하였다. 인간 Notch1 NRR 도메인(Genbank 수탁 번호 017617; 서열 위

치 1307 내지 1733), 인간 Notch2 NRR 도메인(Genbank 수탁 번호 024408; 서열 위치 1239 내지 1650), 인간 Notch3 NRR 도메인(Genbank 수탁 번호 000435; 서열 위치 1246 내지 1641) 및 인간 Notch4 NRR 도메인(Genbank 수탁 번호 NP_004548.3; 서열 위치 1046 내지 1445)과 분비성 알칼리성 포스파타제 (SEAP), 헤마글루티닌(HA) 태그 및 히스티딘 태그(x 10)의 융합 단백질을 생성하고, 이들을 HisTrap™ 패스트 플로우(Fast Flow) 컬럼(지이 헬쓰케어)으로 정제하였다. 항체 B와 각각의 인간 Notch 아이소형의 NRR 도메인 간의 상호작용을 하기의 방법으로 측정하였다. 정제된 항체 B를 CM5 센서 칩(지이 헬쓰케어) 상에 고정된 항-인간 IgG Fc 항체에 의해 포획하였다. 각각의 인간 Notch 아이소형의 정제된 NRR 도메인을 6가지 상이한 농도에서 센서 칩 상으로 주입하고, 항체와의 상호작용 및 해리를 사용 설명서에 따라 관찰하였다.

[0271] 오버레이 상호작용 센서그램 및 계산된 동태 파라미터는 각각 도 8 및 표 32에 나타나 있다.

표 32

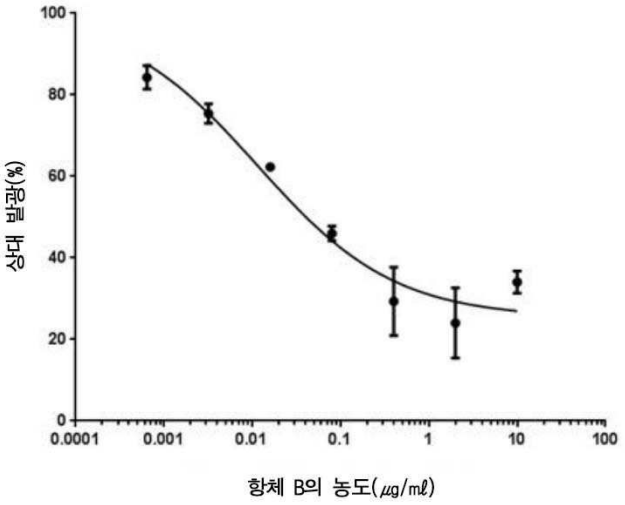
항체 B와 인간 Notch4-NRR 융합 단백질 간의 상호작용의 계산된 동태 파라미터

시료	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
인간 Notch1-NRR-SEAP-HA-His	ND	ND	ND
인간 Notch2-NRR-SEAP-HA-His	ND	ND	ND
인간 Notch3-NRR-SEAP-HA-His	ND	ND	ND
인간 Notch4-NRR-SEAP-HA-His	2.72E+04	8.31E-04	3.05E-08

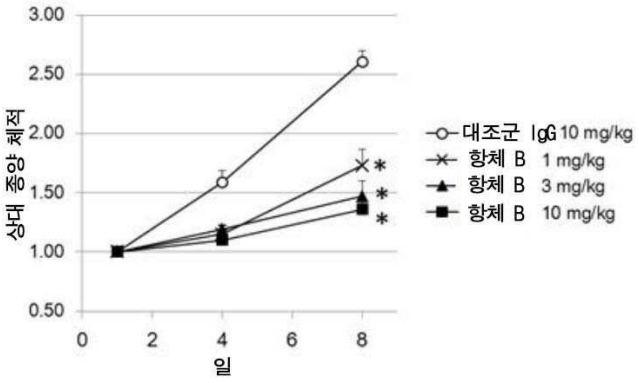
[0272]

도면

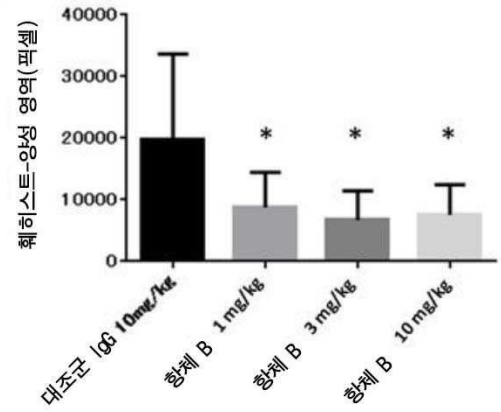
도면1



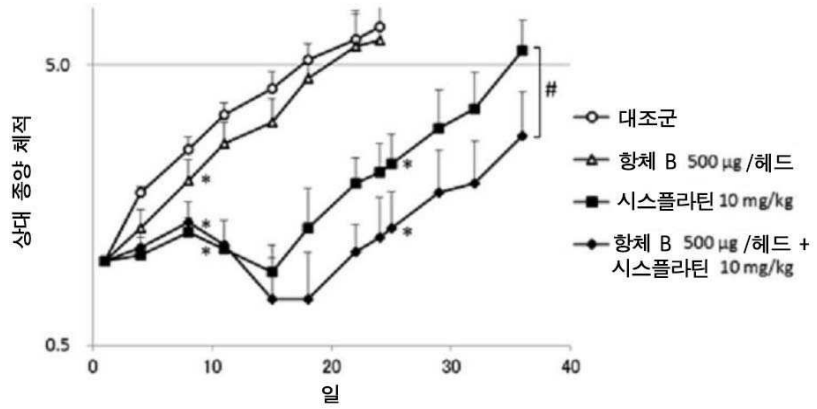
도면2a



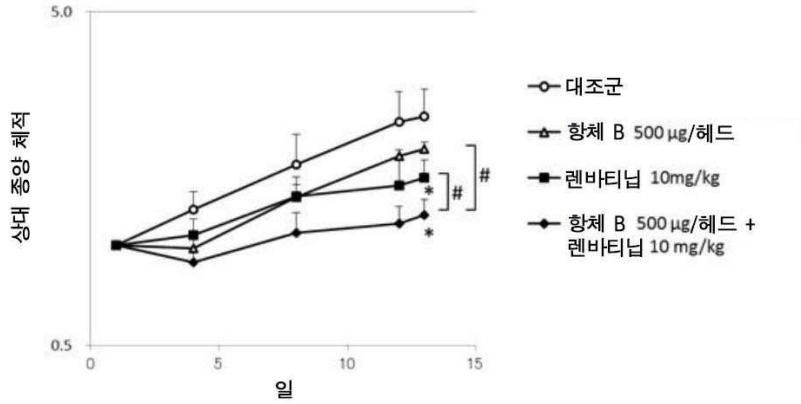
도면2b



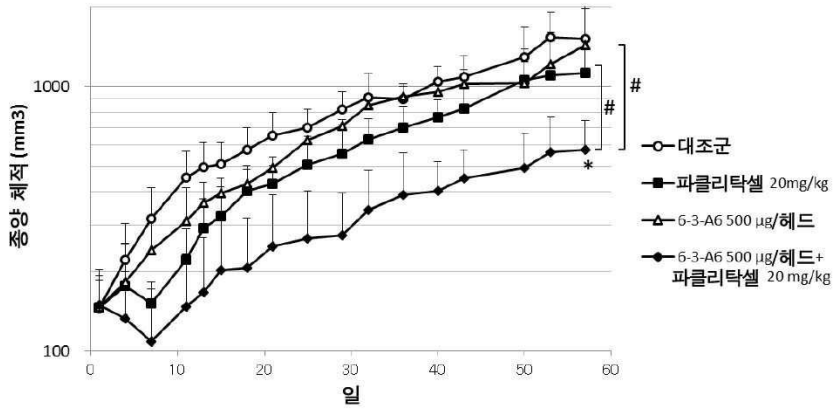
도면3



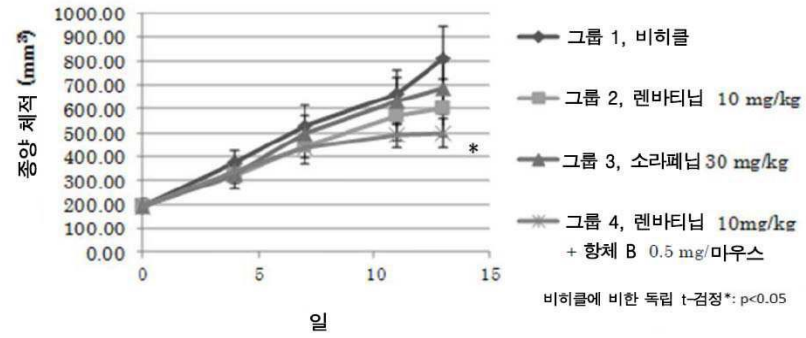
도면4


5.0
0.5
상대 종양 체적
0
5
10
15
일
#
#
*
*
대조군
항체 B 500 μg/헤드
렌바티닙 10mg/kg
항체 B 500 μg/헤드 +
렌바티닙 10 mg/kg

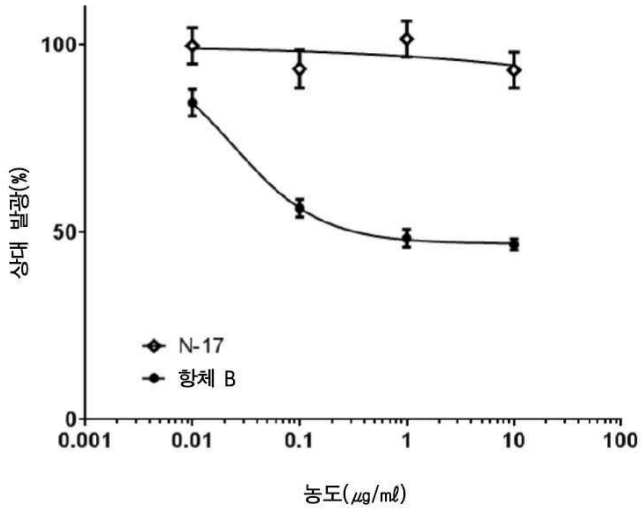
도면5


1000
100
종양 체적 (mm3)
0
10
20
30
40
50
60
일
#
#
*
대조군
파클리탁셀 20mg/kg
6-3-A6 500 μg/헤드
6-3-A6 500 μg/헤드+
파클리탁셀 20 mg/kg

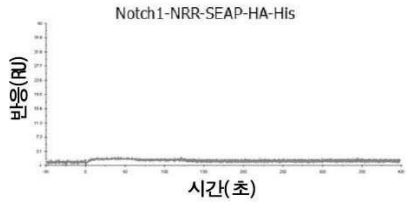
도면6


1000.00
900.00
800.00
700.00
600.00
500.00
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
종양 체적 (mm³)
0
5
10
15
일
*
그룹 1, 비히클
그룹 2, 렌바티닙 10 mg/kg
그룹 3, 소라페닙 30 mg/kg
그룹 4, 렌바티닙 10mg/kg
+ 항체 B 0.5 mg/마우스
비히클에 비한 독립 t-검정*: p<0.05

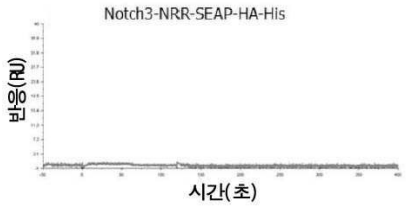
도면7



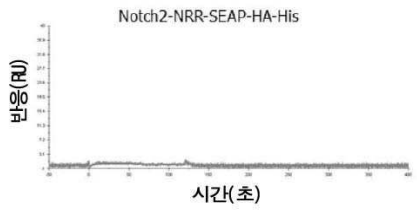
도면8a



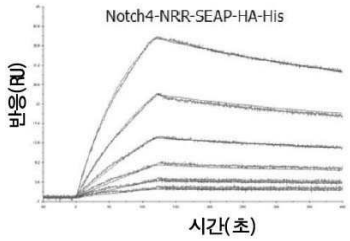
도면8b



도면8c



도면8d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.

<120> ANTI HUMAN NOTCH4 ANTIBODY

<130> ESAP1402F

<150> US 62/148,253

<151> 2015-04-16

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2003

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Cys Val Ser Val Val Arg Pro Arg Gly Leu Leu Cys Gly Ser Phe Pro
20 25 30

Glu Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gln
35 40 45

Gly Thr Cys Gln Cys Ala Pro Gly Phe Leu Gly Glu Thr Cys Gln Phe
50 55 60

Pro Asp Pro Cys Gln Asn Ala Gln Leu Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys
65 70 75 80

Gln Ala Leu Leu Pro Ala Pro Leu Gly Leu Pro Ser Ser Pro Ser Pro

85 90 95

Leu Thr Pro Ser Phe Leu Cys Thr Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Glu
100 105 110
Arg Cys Gln Ala Lys Leu Glu Asp Pro Cys Pro Pro Ser Phe Cys Ser
115 120 125
Lys Arg Gly Arg Cys His Ile Gln Ala Ser Gly Arg Pro Gln Cys Ser
130 135 140
Cys Met Pro Gly Trp Thr Gly Glu Gln Cys Gln Leu Arg Asp Phe Cys
145 150 155 160

Ser Ala Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Leu Ala Thr Tyr Pro
165 170 175
Gln Ile Gln Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Glu Gly His Ala Cys Glu
180 185 190
Arg Asp Val Asn Glu Cys Phe Gln Asp Pro Gly Pro Cys Pro Lys Gly
195 200 205
Thr Ser Cys His Asn Thr Leu Gly Ser Phe Gln Cys Leu Cys Pro Val
210 215 220

Gly Gln Glu Gly Pro Arg Cys Glu Leu Arg Ala Gly Pro Cys Pro Pro
225 230 235 240
Arg Gly Cys Ser Asn Gly Gly Thr Cys Gln Leu Met Pro Glu Lys Asp
245 250 255
Ser Thr Phe His Leu Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Ile Gly Pro Asp
260 265 270
Cys Glu Val Asn Pro Asp Asn Cys Val Ser His Gln Cys Gln Asn Gly
275 280 285

Gly Thr Cys Gln Asp Gly Leu Asp Thr Tyr Thr Cys Leu Cys Pro Glu
290 295 300
Thr Trp Thr Gly Trp Asp Cys Ser Glu Asp Val Asp Glu Cys Glu Thr
305 310 315 320
Gln Gly Pro Pro His Cys Arg Asn Gly Gly Thr Cys Gln Asn Ser Ala
325 330 335

Gly Ser Phe His Cys Val Cys Val Ser Gly Trp Gly Gly Thr Ser Cys
340 345 350

Glu Glu Asn Leu Asp Asp Cys Ile Ala Ala Thr Cys Ala Pro Gly Ser
355 360 365
Thr Cys Ile Asp Arg Val Gly Ser Phe Ser Cys Leu Cys Pro Pro Gly
370 375 380
Arg Thr Gly Leu Leu Cys His Leu Glu Asp Met Cys Leu Ser Gln Pro
385 390 395 400
Cys His Gly Asp Ala Gln Cys Ser Thr Asn Pro Leu Thr Gly Ser Thr
405 410 415

Leu Cys Leu Cys Gln Pro Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Cys His Gln Asp
420 425 430
Leu Asp Glu Cys Leu Met Ala Gln Gln Gly Pro Ser Pro Cys Glu His
435 440 445
Gly Gly Ser Cys Leu Asn Thr Pro Gly Ser Phe Asn Cys Leu Cys Pro
450 455 460
Pro Gly Tyr Thr Gly Ser Arg Cys Glu Ala Asp His Asn Glu Cys Leu
465 470 475 480

Ser Gln Pro Cys His Pro Gly Ser Thr Cys Leu Asp Leu Leu Ala Thr
485 490 495
Phe His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly Gln Leu Cys Glu Val
500 505 510
Glu Thr Asn Glu Cys Ala Ser Ala Pro Cys Leu Asn His Ala Asp Cys
515 520 525
His Asp Leu Leu Asn Gly Phe Gln Cys Ile Cys Leu Pro Gly Phe Ser
530 535 540

Gly Thr Arg Cys Glu Glu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Ser Ser Pro Cys
545 550 555 560
Ala Asn Gly Gly Gln Cys Gln Asp Gln Pro Gly Ala Phe His Cys Lys
565 570 575
Cys Leu Pro Gly Phe Glu Gly Pro Arg Cys Gln Thr Glu Val Asp Glu

580 585 590

Cys Leu Ser Asp Pro Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys Leu Asp Leu Pro

595 600 605

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

610 615 620

Glu Val Pro Leu Cys Ala Pro Asn Leu Cys Gln Pro Lys Gln Ile Cys

625 630 635 640

Lys Asp Gln Lys Asp Lys Ala Asn Cys Leu Cys Pro Asp Gly Ser Pro

645 650 655

Gly Cys Ala Pro Pro Glu Asp Asn Cys Thr Cys His His Gly His Cys

660 665 670

Gln Arg Ser Ser Cys Val Cys Asp Val Gly Trp Thr Gly Pro Glu Cys

675 680 685

Glu Ala Glu Leu Gly Gly Cys Ile Ser Ala Pro Cys Ala His Gly Gly

690 695 700

Thr Cys Tyr Pro Gln Pro Ser Gly Tyr Asn Cys Thr Cys Pro Thr Gly

705 710 715 720

Tyr Thr Gly Pro Thr Cys Ser Glu Glu Met Thr Ala Cys His Ser Gly

725 730 735

Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Asn Pro Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr

740 745 750

Cys Thr Cys Pro Pro Ser His Thr Gly Pro Gln Cys Gln Thr Ser Thr

755 760 765

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

770 775 780

Arg Pro Gly Thr Phe Ser Cys Leu Cys Ala Met Gly Phe Gln Gly Pro

785 790 795 800

Arg Cys Glu Gly Lys Leu Arg Pro Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Arg

805 810 815

Asn Arg Ala Thr Cys Gln Asp Ser Pro Gln Gly Pro Arg Cys Leu Cys

820 825 830

Pro Thr Gly Tyr Thr Gly Gly Ser Cys Gln Thr Leu Met Asp Leu Cys
835 840 845
Ala Gln Lys Pro Cys Pro Arg Asn Ser His Cys Leu Gln Thr Gly Pro
850 855 860

Ser Phe His Cys Leu Cys Leu Gln Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Asn
865 870 875 880
Leu Pro Leu Ser Ser Cys Gln Lys Ala Ala Leu Ser Gln Gly Ile Asp
885 890 895
Val Ser Ser Leu Cys His Asn Gly Gly Leu Cys Val Asp Ser Gly Pro
900 905 910
Ser Tyr Phe Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Ser Leu Cys Gln
915 920 925

Asp His Val Asn Pro Cys Glu Ser Arg Pro Cys Gln Asn Gly Ala Thr
930 935 940
Cys Met Ala Gln Pro Ser Gly Tyr Leu Cys Gln Cys Ala Pro Gly Tyr
945 950 955 960
Asp Gly Gln Asn Cys Ser Lys Glu Leu Asp Ala Cys Gln Ser Gln Pro
965 970 975
Cys His Asn His Gly Thr Cys Thr Pro Lys Pro Gly Gly Phe His Cys
980 985 990

Ala Cys Pro Pro Gly Phe Val Gly Leu Arg Cys Glu Gly Asp Val Asp
995 1000 1005
Glu Cys Leu Asp Gln Pro Cys His Pro Thr Gly Thr Ala Ala Cys
1010 1015 1020
His Ser Leu Ala Asn Ala Phe Tyr Cys Gln Cys Leu Pro Gly His
1025 1030 1035
Thr Gly Gln Trp Cys Glu Val Glu Ile Asp Pro Cys His Ser Gln
1040 1045 1050

Pro Cys Phe His Gly Gly Thr Cys Glu Ala Thr Ala Gly Ser Pro
1055 1060 1065
Leu Gly Phe Ile Cys His Cys Pro Lys Gly Phe Glu Gly Pro Thr

1070 1075 1080

Cys Ser His Arg Ala Pro Ser Cys Gly Phe His His Cys His His

1085 1090 1095

Gly Gly Leu Cys Leu Pro Ser Pro Lys Pro Gly Phe Pro Pro Arg

1100 1105 1110

Cys Ala Cys Leu Ser Gly Tyr Gly Gly Pro Asp Cys Leu Thr Pro

1115 1120 1125

Pro Ala Pro Lys Gly Cys Gly Pro Pro Ser Pro Cys Leu Tyr Asn

1130 1135 1140

Gly Ser Cys Ser Glu Thr Thr Gly Leu Gly Gly Pro Gly Phe Arg

1145 1150 1155

Cys Ser Cys Pro His Ser Ser Pro Gly Pro Arg Cys Gln Lys Pro

1160 1165 1170

Gly Ala Lys Gly Cys Glu Gly Arg Ser Gly Asp Gly Ala Cys Asp

1175 1180 1185

Ala Gly Cys Ser Gly Pro Gly Gly Asn Trp Asp Gly Gly Asp Cys

1190 1195 1200

Ser Leu Gly Val Pro Asp Pro Trp Lys Gly Cys Pro Ser His Ser

1205 1210 1215

Arg Cys Trp Leu Leu Phe Arg Asp Gly Gln Cys His Pro Gln Cys

1220 1225 1230

Asp Ser Glu Glu Cys Leu Phe Asp Gly Tyr Asp Cys Glu Thr Pro

1235 1240 1245

Pro Ala Cys Thr Pro Ala Tyr Asp Gln Tyr Cys His Asp His Phe

1250 1255 1260

His Asn Gly His Cys Glu Lys Gly Cys Asn Thr Ala Glu Cys Gly

1265 1270 1275

Trp Asp Gly Gly Asp Cys Arg Pro Glu Asp Gly Asp Pro Glu Trp

1280 1285 1290

Gly Pro Ser Leu Ala Leu Leu Val Val Leu Ser Pro Pro Ala Leu

1295 1300 1305

```
Asp Gln  Gln Leu Phe Ala Leu  Ala Arg Val Leu Ser  Leu Thr Leu
    1310                 1315                 1320
Arg Val  Gly Leu Trp Val Arg  Lys Asp Arg Asp Gly  Arg Asp Met
    1325                 1330                 1335
Val Tyr  Pro Tyr Pro Gly Ala  Arg Ala Glu Glu Lys  Leu Gly Gly
    1340                 1345                 1350

Thr Arg  Asp Pro Thr Tyr Gln  Glu Arg Ala Ala Pro  Gln Thr Gln
    1355                 1360                 1365
Pro Leu  Gly Lys Glu Thr Asp  Ser Leu Ser Ala Gly  Phe Val Val
    1370                 1375                 1380
Val Met  Gly Val Asp Leu Ser  Arg Cys Gly Pro Asp  His Pro Ala
    1385                 1390                 1395
Ser Arg  Cys Pro Trp Asp Pro  Gly Leu Leu Leu Arg  Phe Leu Ala
    1400                 1405                 1410

Ala Met  Ala Ala Val Gly Ala  Leu Glu Pro Leu Leu  Pro Gly Pro
    1415                 1420                 1425
Leu Leu  Ala Val His Pro His  Ala Gly Thr Ala Pro  Pro Ala Asn
    1430                 1435                 1440
Gln Leu  Pro Trp Pro Val Leu  Cys Ser Pro Val Ala  Gly Val Ile
    1445                 1450                 1455
Leu Leu  Ala Leu Gly Ala Leu  Leu Val Leu Gln Leu  Ile Arg Arg
    1460                 1465                 1470

Arg Arg  Arg Glu His Gly Ala  Leu Trp Leu Pro Pro  Gly Phe Thr
    1475                 1480                 1485
Arg Arg  Pro Arg Thr Gln Ser  Ala Pro His Arg Arg  Arg Pro Pro
    1490                 1495                 1500
Leu Gly  Glu Asp Ser Ile Gly  Leu Lys Ala Leu Lys  Pro Lys Ala
    1505                 1510                 1515
Glu Val  Asp Glu Asp Gly Val  Val Met Cys Ser Gly  Pro Glu Glu
    1520                 1525                 1530

Gly Glu  Glu Val Gly Gln Ala  Glu Glu Thr Gly Pro  Pro Ser Thr
```

1535 1540 1545

Cys Gln Leu Trp Ser Leu Ser Gly Gly Cys Gly Ala Leu Pro Gln

1550 1555 1560

Ala Ala Met Leu Thr Pro Pro Gln Glu Ser Glu Met Glu Ala Pro

1565 1570 1575

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

1580 1585 1590

Ala Val Cys Cys Gly Glu Val Gln Ser Gly Thr Phe Gln Gly Ala

1595 1600 1605

Trp Leu Gly Cys Pro Glu Pro Trp Glu Pro Leu Leu Asp Gly Gly

1610 1615 1620

Ala Cys Pro Gln Ala His Thr Val Gly Thr Gly Glu Thr Pro Leu

1625 1630 1635

His Leu Ala Ala Arg Phe Ser Arg Pro Thr Ala Ala Arg Arg Leu

1640 1645 1650

Leu Glu Ala Gly Ala Asn Pro Asn Gln Pro Asp Arg Ala Gly Arg

1655 1660 1665

Thr Pro Leu His Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Arg Glu Val Cys

1670 1675 1680

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

1685 1690 1695

Glu Asp Gly Thr Thr Pro Leu Met Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val

1700 1705 1710

Glu Asp Leu Val Glu Glu Leu Ile Ala Ala Gln Ala Asp Val Gly

1715 1720 1725

Ala Arg Asp Lys Trp Gly Lys Thr Ala Leu His Trp Ala Ala Ala

1730 1735 1740

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

1745 1750 1755

Asp Lys Asp Ala Gln Asp Asn Arg Glu Gln Thr Pro Leu Phe Leu

1760 1765 1770

Ala Ala Arg Glu Gly Ala Val Glu Val Ala Gln Leu Leu Leu Gly
1775 1780 1785
Leu Gly Ala Ala Arg Glu Leu Arg Asp Gln Ala Gly Leu Ala Pro
1790 1795 1800
Ala Asp Val Ala His Gln Arg Asn His Trp Asp Leu Leu Thr Leu
1805 1810 1815
Leu Glu Gly Ala Gly Pro Pro Glu Ala Arg His Lys Ala Thr Pro
1820 1825 1830

Gly Arg Glu Ala Gly Pro Phe Pro Arg Ala Arg Thr Val Ser Val
1835 1840 1845
Ser Val Pro Pro His Gly Gly Gly Ala Leu Pro Arg Cys Arg Thr
1850 1855 1860
Leu Ser Ala Gly Ala Gly Pro Arg Gly Gly Gly Ala Cys Leu Gln
1865 1870 1875
Ala Arg Thr Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala Arg Gly Gly Gly Ala
1880 1885 1890

Tyr Ser His Cys Arg Ser Leu Ser Gly Val Gly Ala Gly Gly Gly
1895 1900 1905
Pro Thr Pro Arg Gly Arg Arg Phe Ser Ala Gly Met Arg Gly Pro
1910 1915 1920
Arg Pro Asn Pro Ala Ile Met Arg Gly Arg Tyr Gly Val Ala Ala
1925 1930 1935
Gly Arg Gly Gly Arg Val Ser Thr Asp Asp Trp Pro Cys Asp Trp
1940 1945 1950

Val Ala Leu Gly Ala Cys Gly Ser Ala Ser Asn Ile Pro Ile Pro
1955 1960 1965
Pro Pro Cys Leu Thr Pro Ser Pro Glu Arg Gly Ser Pro Gln Leu
1970 1975 1980
Asp Cys Gly Pro Pro Ala Leu Gln Glu Met Pro Ile Asn Gln Gly
1985 1990 1995
Gly Glu Gly Lys Lys
2000

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 2

acatcactcc gt 12

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

acggagtgat gtccgtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct 50

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

agctacgctg aagtatcaac gcagag 26

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

gccagtggat agactgatgg 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

gatggataca gttggtgcag c 21

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

<210> 9

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 9

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggctggagtt ggtcgcaacc attaatagta atggtggtag aacctattat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagaccag 300

ggttttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120

gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagattattt ctgtcagcaa tatagcagct atccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 11

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly

180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys

195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys

210 215 220

Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His

290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

305 310 315 320

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

325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 1326
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide
<400> 13
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacaaga ggctggagtt ggtcgcaacc attaatagta atggtggtag aacctattat 180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagaccag 300

ggttttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgcagctag cacaaaaggc 360
ccctctgtct tccctctggc tccctgctcc cgctccacct ccgagtccac tgccgctctg 420
ggctgtctgg tcaaggatta cttccctgag ccagtcactg tgagttggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gagtccacac atttcccgct gtgctgcaga gctccggcct gtactccctg 540
tctagtgtgg tcaccgtgcc ttcaagcaat ttcgggactc agacctatac atgcaacgtg 600
gaccataagc catctaatac taaggtcgat aaaaccgtgg agcgaaaatg ctgcgtggaa 660
tgcccacctt gtcctgctcc accagccgct gcaccaagcg tgttcctgtt tcctccaaag 720

cccaaagaca cactgatgat cagcagaact cctgaggtca cctgcgtggt cgtggacgtg 780
tcccacgagg atcccgaagt ccagtttaac tggtacgtgg atggggtcga agtgcataat 840
gcaaagacta aacctcggga ggaacagttc aactctacct ttagagtcgt gagtgtgctg 900
acagtcgtgc accaggactg gctgaacgga aaggagtata agtgcaaagt gtctaataag 960
ggcctgcccg cccctatcga gaaaacaatt agtaagacta aaggccagcc aagggaaccc 1020
caggtgtaca cactgccccc tagtcgcgag gaaatgacaa agaaccaggt ctcactgact 1080
tgtctggtga aagggttcta tccatccgac attgccgtgg agtgggaatc taatggacag 1140

cccgaaaaca attacaagac cacaccaccc atgctggaca gcgatggatc cttctttctg 1200

tattcaaagc tgaccgtgga taaaagccgg tggcagcagg gcaatgtctt ttcctgctct 1260

gtgatgcacg aagccctgca caaccactac actcagaagt ccctgtccct gtctcctggc 1320

aaatga 1326

<210> 14

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120

gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagattattt ctgtcagcaa tatagcagct atccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa acgtacggtc gccgcccccc ccgtgtttat ttttcctcca 360

tctgacgaac agctgaagag tgggaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caatttctac 420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaagtc gacaacgctc tgcagtctgg caatagtcag 480

gagtcagtga ctgaacagga cagcaaggat tccacctatt ctctgagctc caccctgaca 540

ctgagcaaag cagattacga aaagcacaaa gtctatgcct gcgaagtgac ccaccagggg 600

ctgagcagtc cagtgaccaa gtcctttaac aggggagagt gttga 645

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

Ser Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

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

1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 18

Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 19

Asp Gln Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 23

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 23

agctatggca tgtct 15

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 24

ggattcactt tcagtagcta tggcatgtct 30

<210> 25

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

accattaata gtaatggtgg tagaacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 26

accattaata gtaatggtgg tagaacctat 30

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 27

gaccagggtt ttgcttac 18

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

aaggccagtc aggatgtggg tactgctgta gcc 33

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 29

tgggcatcca cccggcacac t 21

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 30

cagcaatata gcagctatcc gtggacg 27

<210> 31

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val 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

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

Ser Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro 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 Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 32

gaggtgcagc tggtcgagag cggaggggggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60

agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120

ccagggaagg gactggagta tgtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180

cctgactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagata acagtaagaa caccctgtac 240

ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagac atggccgtct actattgtgc aagggatcag 300

ggattcgcat actggggaca gggaactctg gtgaccgtct caagc 345

<210> 33

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val 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

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

35 40 45

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 34

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 34

gaagtgcagc tggtcgagag cgggggaggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60

agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120

ccagggaagg gactggagct ggtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180

cctgactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagata acagtaagaa caccctgtat 240

ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagac atggccgtct actattgtgc ccgagatcag 300

gggttcgctt attggggaca ggggacactg gtgaccgtga gcagc 345

<210> 35

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val 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

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

35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro 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 Gly Ser Leu Lys Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 36

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

gaagtgcagc tggtcgagag tgggggaggc ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60

agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcctgggt gcgccaggct 120

ccagggaaag gactggagct ggtcgccacc atcaactcta atggaggccg aacatactat 180

cctgacagtg tgaagggccg gttcactatt agcagagata actccaaaaa taccctgtat 240

ctgcagatgg gcagcctgaa ggcagaagac atggccgtct actattgtgc tcgggatcag 300

gggttcgcct attgggggca ggggactctg gtcactgtct cttcc 345

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val 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

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

35 40 45

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 38

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 38

gaagtgcagc tggtcgaatc tgggggggga ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60

agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120

cctgggaagg gactggagta tgtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180

gccaactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagaca acagtaagaa caccctgtac 240

ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagat atggccgtct actattgtgc tcgggatcag 300

ggctttgctt attggggaca ggggacactg gtcaccgtct cctcc 345

<210> 39

<211> 115

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

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

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val 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

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

35 40 45

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

Ala Arg Asp Gln Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 345

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide
<400> 40
gaggtgcagc tggtcgaatc cgggggggg ctggtgcagc caggagggtc tctgaggctg 60
agttgcgccg cttcaggctt caccttcagc tcctacggga tgtcttgggt gcgccaggct 120
cctgggaagg gactggagct ggtcagcacc atcaactcca atggaggccg aacatactat 180
gccaactccg tgaagggccg gttcactatc tctagagaca acagtaagaa caccctgtat 240
ctgcagatgg gcagcctgag agcagaagat atggccgtct actattgtgc tcgggatcag 300

ggcttcgcct actgggggca gggaacactg gtcaccgtct cctca 345

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 41
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 42

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 42

gacattcaga tgacacagag cccttcatct ctgagtgcat cagtgggaga cagggtcacc 60

atcacatgca aagccagcca ggatgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaagccc 120

gggaaagtgc ctaagctgct gatctactgg gctagtacac ggcacactgg cgtcccatcc 180

agattcagcg gctccgggtc tggaaccgac tttactctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggatgtgg ccacatacta ttgccagcag tattcatctt atccttggac cttcggacag 300

ggaacaaaag tggaaatcaa a 321

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 44

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 44

gatattcaga tgactcagag cccctcctct ctgagtgcat cagtgggaga cagggtcacc 60

atcacatgca aagccagcca ggatgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaagccc 120

gggaaagtgc ctaagctgct gatctactgg gctagtacac ggcacactgg cgtcccatcc 180

agattcagcg gctccgggtc tggaaccgac tttactctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggatgtgg ccacatactt ctgccagcag tattcatcct atccttggac cttcggacag 300

ggaactaaag tggagattaa g 321

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His 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 Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 46

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 46

gaaattgtga tgacccagtc tcccgccaca ctgtctgtga gtccaggaga gagggcaact 60

ctgtcttgca aggccagtca ggacgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaaaccc 120

gggcaggctc ctcggctgct gatctattgg gcatccactc ggcacaccgg cattcccgcc 180

agattctcag gcagcgggtc cggaacagag tttaccctga caatcagctc cctgcagagc 240

gaagatttcg ctgtctacta ttgccagcag tattctagtt atccttggac attcggccag 300

ggaacaaaag tggaaatcaa a 321

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 47

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His 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 Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 48

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 48

gaaatcgtga tgacccagag ccccgcaaca ctgtctgtga gtccaggaga gagggcaact 60

ctgtcttgca aggccagtca ggacgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaaaccc 120

gggcaggctc ctcggctgct gatctattgg gcatccactc ggcacaccgg cattcccgcc 180

agattctcag gcagcgggtc cggaacagag tttaccctga caatcagctc cctgcagagc 240

gaagatttcg ctgtctactt ttgccagcag tattcatcct atccttggac cttcggacag 300

ggaacaaaag tggaaatcaa a 321

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 50

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 50

gatatccaga tgacccagtc cccaagctcc ctgtccgcat ctgtgggcga ccgggtcacc 60

attacatgta aagccagtca ggatgtggga acagccgtcg cttggtacca gcagaagccc 120

ggcaaatctc ctaagctgct gatctattgg gcttccacac ggcacactgg cgtgccctct 180

agattcagtg gctcagggag cggaacagac tttactctga ccatttctag tctgcagcca 240

gaggatgtgg caacttactt ctgccagcag tactcaagct atccctggac ctttggccag 300

gggacaaaag tcgaaatcaa g 321

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 51

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His 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 Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 52

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 52

gaaatcgtga tgacccagag ccccgcaaca ctgtctgtga gtccaggaga gagggcaact 60

ctgtcttgca aggccagtca ggacgtggga accgcagtcg cttggtacca gcagaaaccc 120

gggcagtctc ctcggctgct gatctattgg gcatccactc ggcacaccgg cattcccgcc 180

agattctcag gcagcgggtc cggaacagag tttaccctga caatcagctc cctgcagagc 240

gaagatttcg ctgtctactt ttgccagcag tattcatcct atccttggac cttcggacag 300

ggaacaaaag tggaaatcaa a 321

<210> 53

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 54

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 54

gctagcacaa aaggcccctc tgtcttccct ctggctccct gctcccgctc cacctccgag 60

tccactgccg ctctgggctg tctggtcaag gattacttcc ctgagccagt cactgtgagt 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggagtc cacacatttc ccgctgtgct gcagagctcc 180

ggcctgtact ccctgtctag tgtggtcacc gtgccttcaa gcaatttcgg gactcagacc 240

tatacatgca acgtggacca taagccatct aatactaagg tcgataaaac cgtggagcga 300

aaatgctgcg tggaatgccc accttgtcct gctccaccag ccgctgcacc aagcgtgttc 360

ctgtttcctc caaagcccaa agacacactg atgatcagca gaactcctga ggtcacctgc 420

gtggtcgtgg acgtgtccca cgaggatccc gaagtccagt ttaactggta cgtggatggg 480

gtcgaagtgc ataatgcaaa gactaaacct cgggaggaac agttcaactc taccttaga 540

gtcgtgagtg tgctgacagt cgtgcaccag gactggctga acggaaagga gtataagtgc 600

aaagtgtcta ataagggcct gcccgcccct atcgagaaaa caattagtaa gactaaaggc 660

cagccaaggg aaccccaggt gtacacactg ccccctagtc gcgaggaaat gacaaagaac 720

caggtctcac tgacttgtct ggtgaaaggg ttctatccat ccgacattgc cgtggagtgg 780

gaatctaatg gacagcccga aaacaattac aagaccacac cacccatgct ggacagcgat 840

ggatccttct ttctgtattc aaagctgacc gtggataaaa gccggtggca gcagggcaat 900

gtcttttcct gctctgtgat gcacgaagcc ctgcacaacc actacactca gaagtccctg 960

tccctgtctc ctggcaaatg a 981

<210> 55

<211> 325

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 55

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly

325

<210> 56

<211> 978

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 56

gctagcacaa aaggcccctc tgtcttccct ctggctccct gctcccgctc cacctccgag 60

tccactgccg ctctgggctg tctggtcaag gattacttcc ctgagccagt cactgtgagt 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggagtc cacacatttc ccgctgtgct gcagagctcc 180

ggcctgtact ccctgtctag tgtggtcacc gtgccttcaa gcaatttcgg gactcagacc 240

tatacatgca acgtggacca taagccatct aatactaagg tcgataaaac cgtggagcga 300

aaatgctgcg tggaatgccc accttgtcct gctccaccag ccgctgcacc aagcgtgttc 360

ctgtttcctc caaagcccaa agacacactg atgatcagca gaactcctga ggtcacctgc 420

gtggtcgtgg acgtgtccca cgaggatccc gaagtccagt ttaactggta cgtggatggg 480

gtcgaagtgc ataatgcaaa gactaaacct cgggaggaac agttcaactc tacctttaga 540

gtcgtgagtg tgctgacagt cgtgcaccag gactggctga acggaaagga gtataagtgc 600

aaagtgtcta ataagggcct gcccgcccct atcgagaaaa caattagtaa gactaaaggc 660

cagccaaggg aaccccaggt gtacacactg ccccctagtc gcgaggaaat gacaaagaac 720

caggtctcac tgacttgtct ggtgaaaggg ttctatccat ccgacattgc cgtggagtgg 780

gaatctaatg gacagcccga aaacaattac aagaccacac cacccatgct ggacagcgat 840

ggatccttct ttctgtattc aaagctgacc gtggataaaa gccggtggca gcagggcaat 900

gtcttttcct gctctgtgat gcacgaagcc ctgcacaacc actacactca gaagtccctg 960

tccctgtctc ctggctga 978

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 57

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 58

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 58

cgtacggtcg ccgccccctc cgtgtttatt tttcctccat ctgacgaaca gctgaagagt 60

gggaccgcct ccgtggtgtg cctgctgaac aatttctacc cccgggaggc caaggtgcag 120

tggaaagtcg acaacgctct gcagtctggc aatagtcagg agtcagtgac tgaacaggac 180

agcaaggatt ccacctattc tctgagctcc accctgacac tgagcaaagc agattacgaa 240

aagcacaaag tctatgcctg cgaagtgacc caccaggggc tgagcagtcc agtgaccaag 300

tcctttaaca ggggagagtg ttga 324

<210> 59

<211> 1323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 59

gaagtgcagc tggtcgaatc tgggggggggt ctggtgcagc caggcggatc cctgagactg 60

agctgcgccg cttctgggtt cacattttcc agctacggca tgtcctgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg gactggagct ggtgagtaca atcaactcaa atgggggtcg aacttactat 180

cccgactccg tgaagggcag gttcactatt tcccgggata acagcaaaaa taccctgtac 240

ctgcagatgg ggtccctgcg agctgaagac atggcagtgt actattgtgc ccgtgatcag 300

ggtttcgctt attgggggca gggtactctg gtcaccgtgt ctagtgcttc taccaaggga 360

ccatccgtgt tcccactggc accatgctcc cggagcacat ctgagagtac tgcagccctg 420

ggctgtctgg tgaaggacta tttccctgaa ccagtcacag tgagctggaa ctctggcgca 480

ctgacaagcg gagtccacac ttttcctgcc gtgctgcagt catccggcct gtactctctg 540

agctctgtgg tcactgtccc cagttcaaat ttcggaactc agacctatac atgcaacgtg 600

gaccataagc ctagcaatac caaggtcgat aaaacagtgg agcgtaaatg ctgcgtggaa 660

tgcccacctt gtccagcacc accagctgca gcccccttccg tgttcctgtt tcctccaaag 720

ccaaaagaca ccctgatgat ctctagaacc cccgaggtca catgcgtggt cgtggacgtg 780

agtcacgagg atcctgaagt ccagtttaac tggtacgtgg atggcgtcga agtgcataat 840

gccaagacaa aaccaagaga ggaacagttc aactcaacct ttcgcgtcgt gtccgtgctg 900

acagtcgtgc accaggattg gctgaacggc aaggagtata agtgcaaagt gtccaataag 960

ggactgcccg ctcctatcga gaaaactatt tccaagacca aaggacagcc tagggaacca 1020

caggtgtaca ctctgccccc ttcccgggag gaaatgacta agaaccaggt cagcctgacc 1080

tgtctggtga aagggttcta tcctagtgac attgccgtgg agtgggaatc aaatggtcag 1140

ccagagaaca attacaagac cacaccaccc atgctggaca gtgatggctc attctttctg 1200

tatagcaagc tgaccgtcga taaatctagg tggcagcagg gaaacgtgtt ctcctgctcc 1260

gtgatgcacg aagcactgca caaccattac acccagaaat ccctgagcct gtcccccggc 1320

tga 1323

<210> 60

<211> 1323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 60

gaggtgcagc tggtcgagtc cgggggggggt ctggtgcagc caggaggatc cctgaggctg 60

agctgcgccg cttctgggtt cacattttcc agctacggca tgtcctgggt ccggcaggca 120

ccaggcaagg gactggagct ggtggccaca atcaacagta atgggggtag aacttactat 180

cccgactcag tgaagggcag gttcactatt agtcgggata actcaaaaaa taccctgtac 240

ctgcagatgg ggtccctgaa ggctgaagac atggcagtgt actattgtgc ccgcgatcag 300

ggtttcgctt attgggggca gggtactctg gtcaccgtgt ctagtgcctc caccaaaggg 360

cccagcgtgt ttccactggc tccctgctcc cgaagcacat ctgagagtac tgcagccctg 420

ggctgtctgg tgaaggacta tttccctgaa ccagtcacag tgagctggaa ctctggcgct 480

ctgacatctg gagtccacac ttttcctgca gtgctgcagt catccggcct gtactccctg 540

agctctgtgg tcactgtccc cagttcaaat ttcggaactc agacctatac atgcaacgtg 600

gaccataaac ctagcaatac caaggtcgat aaaacagtgg agcggaagtg ctgtgtggaa 660

tgcccacctt gtccagctcc accagctgca gcccccttctg tgttcctgtt tcctccaaag 720

ccaaaagaca ccctgatgat cagcaggacc cccgaggtca catgtgtggt cgtggacgtg 780

tctcacgagg atcctgaagt ccagtttaac tggtacgtgg atggcgtcga agtgcataat 840

gcaaagacaa aaccaagaga ggaacagttc aactctacct ttcgcgtcgt gagtgtgctg 900

acagtcgtgc accaggattg gctgaacggc aaggagtata agtgcaaagt gtccaataag 960

ggactgcccg cccctatcga gaaaactatt agcaagacca aaggacagcc tcgagaacca 1020

caggtgtaca ctctgccccc tagtcgtgag gaaatgacta agaaccaggt ctccctgacc 1080

tgtctggtga aagggttcta tcctagcgac attgccgtgg agtgggaatc taatggtcag 1140

ccagagaaca attacaagac cacaccaccc atgctggaca gtgatggctc attctttctg 1200

tattcaaagc tgaccgtcga taaatccagg tggcagcagg gaaatgtgtt ttcatgctcc 1260

gtgatgcacg aagccctgca caaccattac acccagaaga gcctgtccct gagccccggc 1320

tga 1323

<210> 61

<211> 1323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 61

gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggggggg ctggtgcagc ctggcggatc cctgagactg 60

agctgcgccg cttctgggtt cacattttcc agctacggca tgtcctgggt ccgccaggca 120

ccaggcaagg gactggagct ggtgagtaca atcaactcaa atgggggtcg aacttactat 180

gctaactccg tgaagggcag gttcactatt tcccgggaca acagcaaaaa taccctgtac 240

ctgcagatgg ggtccctgcg agctgaagac atggcagtgt actattgtgc ccgtgatcag 300

ggtttcgctt attgggggca gggtactctg gtcaccgtgt ctagtgcttc taccaagggg 360

cccagtgtgt ttccactggc accctgctcc cggagcacat ctgagagtac tgcagccctg 420

ggctgtctgg tgaaggatta tttccctgaa ccagtcacag tgagctggaa ctctggcgca 480

ctgacaagcg gagtccacac ttttcctgcc gtgctgcagt catccggcct gtactctctg 540

agctctgtgg tcactgtccc cagttcaaat ttcggaactc agacctatac atgcaacgtg 600

gaccataagc ctagcaatac caaggtcgat aaaacagtgg agcgtaaatg ctgtgtggaa 660

tgcccacctt gtccagctcc accagctgca gccccttctg tgttcctgtt tcctccaaag 720

ccaaaagaca ccctgatgat ctctagaacc cccgaggtca catgtgtggt cgtggacgtc 780

agtcacgagg atccagaagt ccagtttaac tggtacgtgg atggcgtcga agtgcataat 840

gcaaagacaa aacccagaga ggaacagttc aactcaacct ttcgcgtcgt gtccgtgctg 900

acagtcgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtata agtgcaaagt gtccaataag 960

ggactgcccg cccctatcga gaaaactatt tccaagacca aaggacagcc tagggaacca 1020

caggtgtaca ctctgccccc ttcccgggag gaaatgacta agaaccaggt cagcctgacc 1080

tgtctggtga aagggttcta tcctagtgac attgccgtgg agtgggaatc aaatggtcag 1140

ccagagaaca attacaagac cacaccaccc atgctggaca gtgatggctc attctttctg 1200

tatagcaagc tgaccgtcga taaatctagg tggcagcagg gaaatgtgtt ttcatgctcc 1260

gtgatgcacg aagccctgca caaccactac acacagaaaa gcctgagcct gagccccggc 1320

tga 1323

<210> 62

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 62

gaaatcgtga tgactcagtc ccccgctaca ctgagcgtgt ctcccggaga gagagctact 60

ctgtcttgca aggcaagtca ggacgtggga actgcagtcg cctggtacca gcagaaacca 120

ggacaggcac cacgactgct gatctattgg gctagtacaa ggcacactgg cattcctgcc 180

cggttcagtg gctcaggatc cgggacagag tttaccctga caatctccag cctgcagtcc 240

gaagatttcg ctgtgtacta ttgccagcag tactctagtt atccttggac ctttggtcag 300

ggcacaaagg tcgagatcaa acgaaccgtg gccgctccaa gcgtcttcat ttttccccct 360

tctgacgaac agctgaagtc aggtacagcc tccgtggtct gtctgctgaa caatttctac 420

ccaagggagg caaaggtgca gtggaaagtc gataacgccc tgcagagcgg caattctcag 480

gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaggat tccacctata gcctgtcatc cactctgacc 540

ctgagcaaag ctgactacga aaagcataaa gtgtatgcat gtgaagtcac acaccagggt 600

ctgagttctc cagtcaccaa atcttttaat agaggcgagt gctga 645

<210> 63

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 63

gaaatcgtga tgacccagtc tcctgctaca ctgagcgtgt ctcccggaga gagagctact 60

ctgtcttgca aggcaagtca ggacgtggga actgcagtcg cctggtacca gcagaaacca 120

ggacaggcac cacgactgct gatctattgg gctagtacaa ggcacactgg cattcctgcc 180

cggttcagtg gctcaggatc cgggacagag tttaccctga caatctccag cctgcagtcc 240

gaagatttcg ctgtgtactt ttgccagcag tactctagtt atccttggac cttcggtcag 300

ggcacaaagg tcgagatcaa acgaaccgtg gccgctccaa gcgtcttcat ttttccccct 360

tctgacgaac agctgaagtc aggtacagcc tccgtggtct gtctgctgaa caatttttac 420

ccaagggagg caaaggtgca gtggaaagtc gataacgccc tgcagagcgg caattctcag 480

gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaggat tccacctata gcctgtcatc cactctgacc 540

ctgagcaaag ctgactacga aaagcataaa gtgtatgcat gtgaagtcac acaccagggt 600

ctgtccagtc cagtcaccaa atcctttaat cggggagagt gctga 645

<210> 64

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 64

gatattcaga tgacccagtc tccttccagc ctgtctgcaa gtgtgggaga cagggtcacc 60

atcacatgca aagcctccca ggatgtggga accgcagtcg cctggtacca gcagaagcca 120

gggaaaagcc ccaagctgct gatctactgg gcttctacca ggcacacagg cgtgccaagt 180

cggttctcag gctccggaag cgggaccgac tttactctga ccatctccag cctgcagcct 240

gaggatgtgg caacatactt ctgccagcag tactctagtt atccatggac ttttggtcag 300

ggcaccaaag tcgagatcaa gagaactgtg gccgctccct ccgtcttcat ttttccccct 360

agcgacgaac agctgaagag tggtacagcc tcagtggtct gtctgctgaa caatttctac 420

cctagggagg ctaaagtgca gtggaaggtc gataacgcac tgcagtctgg caatagtcag 480

gagtcagtga cagaacagga ctccaaagat agcacttatt ctctgtcatc cacactgact 540

ctgtctaagg ccgactacga aaagcataaa gtgtatgctt gtgaggtcac acaccagggt 600

ctgagcagtc cagtcaccaa gagctttaac cgaggagagt gctga 645

<210> 65

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 65

gaaatcgtga tgacccagtc tcctgctaca ctgagcgtgt ctcccggaga gagagctact 60

ctgtcttgca aggcaagtca ggacgtggga actgcagtcg cctggtacca gcagaaacca 120

gggcagagtc cccgcctgct gatctattgg gcctccacaa ggcacactgg cattcctgct 180

cggttcagtg gctcaggatc cgggacagag tttaccctga caatctccag cctgcagagc 240

gaagatttcg ccgtgtactt ttgccagcag tactctagtt atccttggac cttcggtcag 300

ggcacaaagg tcgagatcaa acgaaccgtg gccgctccaa gcgtcttcat ttttccccct 360

tctgacgaac agctgaagtc aggtacagct tccgtggtct gtctgctgaa caatttttac 420

ccaagggagg caaaggtgca gtggaaagtc gataacgccc tgcagagcgg caattctcag 480

gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaggat tccacctata gcctgtcatc cactctgacc 540

ctgtctaaag ctgactacga aaagcataaa gtgtatgcat gtgaagtcac ccaccagggg 600

ctgagtagtc cagtcaccaa gagttttaat cggggcgagt gttga 645