



(30) 우선권주장

60/547,584	2004년02월26일	미국(US)
60/553,948	2004년03월18일	미국(US)
60/599,014	2004년08월06일	미국(US)
60/614,471	2004년10월01일	미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

단리된 인간 또는 인간화 항체 또는 그의 기능성 단편으로서, CD38 (서열 번호 22)의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함하며, 인간 PBMC(말초 혈액 단핵 세포)가 이펙터(effector) 세포로 이용될 때 동일하거나 실질적으로 동일한 조건 하에서 키메라 OKT10 (서열 번호 23 및 24)보다 5배 이상 더 우수한 효능으로 ADCC(항체-의존성 세포 독성)에 의한 CD38+ 표적 세포의 살해를 매개할 수 있고, 상기 CD38+ 표적 세포는 LP-1 (DSMZ: ACC41) 및 RPMI-8226 (ATCC: CCL-155)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 이펙터 세포 대 표적 세포의 비는 약 30:1 내지 약 50:1 사이인 것인 단리된 인간 또는 인간화 항체 또는 그의 기능성 단편.

### 청구항 2

제1항에 따른 항체 또는 그의 기능성 단편의 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 묘사된 H-CDR3 영역을 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 묘사된 H-CDR2 영역을 추가로 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 묘사된 H-CDR1 영역을 추가로 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 묘사된 가변성 중쇄를 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 7

제2항에 있어서, 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 묘사된 L-CDR3 영역을 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 묘사된 L-CDR1 영역을 추가로 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 묘사된 L-CDR2 영역을 추가로 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 묘사된 가변성 경쇄를 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 11

제2항에 있어서, (i) 서열 번호 5, 6, 7 또는 8의 서열; 및 (ii) CDR 영역에서 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 묘사된 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상인 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 12

제2항에 있어서, (i) 서열 번호 13, 14, 15 또는 16의 서열; 및 (ii) CDR 영역에서 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 묘사된 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상인 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 아미노산

서열을 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 13

제1항에 있어서, IgG인 단리된 항체.

### 청구항 14

제13항에 있어서, IgG1인 단리된 항체.

### 청구항 15

단리된 인간 또는 인간화 항체 또는 그의 기능성 단편으로서, CD38 (서열 번호 22)의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함하며, 동일하거나 실질적으로 동일한 조건 하에서 키메라 OKT10 (서열 번호 23 및 24)보다 2배 이상 더 우수한 효능으로 CDC에 의한 CD38-트랜스펙션된 CHO 세포의 살해를 매개할 수 있는, 단리된 인간 또는 인간화 항체 또는 그의 기능성 단편.

### 청구항 16

제15항에 따른 항체 또는 그의 기능성 단편의 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 17

제16항에 있어서, 서열 번호 5, 6 또는 7에 묘사된 H-CDR3 영역을 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 서열 번호 5, 6 또는 7에 묘사된 H-CDR2 영역을 추가로 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 19

제18항에 있어서, 서열 번호 5, 6 또는 7에 묘사된 H-CDR1 영역을 추가로 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 20

제19항에 있어서, 서열 번호 5, 6 또는 7에 묘사된 가변성 중쇄를 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 21

제16항에 있어서, 서열 번호 13, 14 또는 15에 묘사된 L-CDR3 영역을 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 22

제21항에 있어서, 서열 번호 13, 14 또는 15에 묘사된 L-CDR1 영역을 추가로 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 23

제22항에 있어서, 서열 번호 13, 14 또는 15에 묘사된 L-CDR2 영역을 추가로 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 24

제23항에 있어서, 서열 번호 13, 14 또는 15에 묘사된 가변성 경쇄를 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 25

제16항에 있어서, (i) 서열 번호 5, 6 또는 7의 서열; 및 (ii) CDR 영역에서 서열 번호 5, 6 또는 7에 묘사된 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상인 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

### 청구항 26

제16항에 있어서, (i) 서열 번호 13, 14 또는 15의 서열; 및 (ii) CDR 영역에서 서열 번호 13, 14 또는 15에 묘사된 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상인 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 아미노산 서열

을 포함하는 단리된 항원 결합 영역.

#### 청구항 27

제15항에 있어서, IgG인 단리된 항체.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, IgG1인 단리된 항체.

#### 청구항 29

단리된 인간 또는 인간화 항체 또는 그의 기능성 단편으로서, CD38의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함하고, 상기 에피토프는 CD38 (서열 번호 22)의 아미노산 잔기 1 내지 215 중 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 것인 단리된 인간 또는 인간화 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 에피토프가 CD38의 아미노산 스트레치(stretch) 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 및 192-206의 목록으로부터 취해지는 아미노산 스트레치 중 하나 이상의 아미노산 스트레치 내에 포함되는 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 31

제29항에 있어서, 상기 에피토프가 선형 에피토프인 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 32

제31항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 6에 묘사된 H-CDR3 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 33

제32항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 6에 묘사된 H-CDR2 영역을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 34

제33항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 6에 묘사된 H-CDR1 영역을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 35

제31항에 있어서, 서열 번호 6에 묘사된 가변성 중쇄를 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 36

제31항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 14에 묘사된 L-CDR3 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 37

제36항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 14에 묘사된 L-CDR1 영역을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 38

제37항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 14에 묘사된 L-CDR2 영역을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 39

제31항에 있어서, 서열 번호 14에 묘사된 가변성 경쇄를 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 40

제31항에 있어서, (i) 서열 번호 6의 서열; 및 (ii) CDR 영역에서 서열 번호 6에 묘사된 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상인 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 41

제31항에 있어서, (i) 서열 번호 14의 서열; 및 (ii) CDR 영역에서 서열 번호 14에 묘사된 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상인 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 42

제31항에 있어서, Fab 또는 scFv 항체 단편인 단리된 기능성 단편.

#### 청구항 43

제31항에 있어서, IgG인 단리된 항체.

#### 청구항 44

제43항에 있어서, IgG1인 단리된 항체.

#### 청구항 45

제29항에 있어서, 상기 에피토프가 배좌형(conformational) 에피토프인 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 46

제45항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 5, 7 또는 8에 묘사된 H-CDR3 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 47

제46항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 5, 7 또는 8에 묘사된 H-CDR2 영역을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 48

제47항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 5, 7 또는 8에 묘사된 H-CDR1 영역을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 49

제45항에 있어서, 서열 번호 5, 7 또는 8에 묘사된 가변성 중쇄를 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 50

제45항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 13, 15 또는 16에 묘사된 L-CDR3 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 51

제50항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 13, 15 또는 16에 묘사된 L-CDR1 영역을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 상기 항원 결합 영역이 서열 번호 13, 15 또는 16에 묘사된 L-CDR2 영역을 추가로 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 53

제45항에 있어서, 서열 번호 13, 15 또는 16에 묘사된 가변성 경쇄를 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 54

제45항에 있어서, (i) 서열 번호 5, 7 또는 8의 서열; 및 (ii) CDR 영역에서 서열 번호 5, 7 또는 8에 묘사된 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상인 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 55

제45항에 있어서, (i) 서열 번호 13, 15 또는 16의 서열; 및 (ii) CDR 영역에서 서열 번호 13, 15 또는 16에 묘사된 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상인 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

#### 청구항 56

제45항에 있어서, Fab 또는 scFv 항체 단편인 단리된 기능성 단편.

#### 청구항 57

제45항에 있어서, IgG인 단리된 항체.

#### 청구항 58

제57항에 있어서, IgG1인 단리된 항체.

#### 청구항 59

단리된 항체 또는 그의 기능성 단편의 가변성 중쇄로서, (i) 서열 번호 1, 2, 3 또는 4의 서열을 포함하는 핵산 서열, 또는 (ii) 높은 엄격도의 조건 하에서 서열 번호 1, 2, 3 또는 4의 서열의 상보성 가닥에 혼성화하는 핵산 서열에 의해 코딩되며, 상기 항체 또는 그의 기능성 단편은 CD38의 에피토프에 특이적인 것인, 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편의 가변성 중쇄.

#### 청구항 60

단리된 항체 또는 그의 기능성 단편의 가변성 경쇄로서, (i) 서열 번호 9, 10, 11 또는 12의 서열을 포함하는 핵산 서열, 또는 (ii) 높은 엄격도의 조건 하에서 서열 번호 9, 10, 11 또는 12의 서열의 상보성 가닥에 혼성화하는 핵산 서열에 의해 코딩되며, 상기 항체 또는 그의 기능성 단편은 CD38의 에피토프에 특이적인 것인, 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편의 가변성 경쇄.

#### 청구항 61

CD38의 에피토프에 특이적인 인간 항체 또는 그의 기능성 단편의 항원 결합 영역을 코딩하는 단리된 핵산 서열.

#### 청구항 62

단리된 항체 또는 그의 기능성 단편의 가변성 중쇄를 코딩하는 핵산 서열로서, (i) 서열 번호 1, 2, 3 및 4의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 또는 (ii) 높은 엄격도의 조건 하에서 서열 번호 1, 2, 3 또는 4의 서열의 상보성 가닥에 혼성화하는 핵산 서열을 포함하며, 상기 항체 또는 그의 기능성 단편은 CD38의 에피토프에 특이적인 것인, 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편의 가변성 중쇄를 코딩하는 핵산 서열.

#### 청구항 63

단리된 항체 또는 그의 기능성 단편의 가변성 경쇄를 코딩하는 핵산 서열로서, (i) 서열 번호 9, 10, 11 및 12

의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 또는 (ii) 높은 엄격도의 조건 하에서 서열 번호 9, 10, 11 또는 12의 서열의 상보성 가닥에 혼성화하는 핵산 서열을 포함하며, 상기 항체 또는 그의 기능성 단편은 CD38의 에피토프에 특이적인 것인, 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편의 가변성 경쇄를 코딩하는 핵산 서열.

#### 청구항 64

제61항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터.

#### 청구항 65

제64항에 따른 벡터를 포함하는 단리된 세포.

#### 청구항 66

제65항에 있어서, 박테리아 세포인 단리된 세포.

#### 청구항 67

제65항에 있어서, 포유류 세포인 단리된 세포.

#### 청구항 68

제1항, 제15항 또는 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 기능성 단편과, 그를 위한 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 함유하는 약학 조성물.

#### 청구항 69

원하지 않는 CD38+ 세포의 존재와 관련된 장애 또는 병의 치료 방법으로서, 치료를 필요로 하는 대상에게 제68항에 따른 유효량의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 70

제69항에 있어서, 상기 장애 또는 병이 혈액 질환인 방법.

#### 청구항 71

제70항에 있어서, 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 급성 림프구성 백혈병의 목록으로부터 취해지는 방법.

#### 청구항 72

제69항에 있어서, 상기 장애 또는 병이 염증성 질환인 방법.

#### 청구항 73

제72항에 있어서, 류머티스 관절염 및 전신성 홍반성 루푸스의 목록으로부터 취해지는 방법.

#### 청구항 74

대상 또는 세포 샘플에서 CD38+ 세포의 표적화 방법으로서, 상기 CD38+ 세포가 제1항, 제15항 또는 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 기능성 단편과 접촉되게 하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 75

인간 또는 인간화 항체 또는 그의 기능성 단편의 단리에 있어서의 CD38의 에피토프의 사용 방법으로서, 상기 항체 또는 그의 기능성 단편은 상기 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함하며, 상기 방법은

a) 상기 CD38의 에피토프를 항체 라이브러리와 접촉시키는 단계; 및

b) 상기 항체 또는 그의 기능성 단편을 단리하는 단계

를 포함하고,



상기 에피토프는 선형 에피토프인 방법.

#### 청구항 76

제75항에 있어서, 상기 선형 에피토프가 아미노산 잔기 192-206을 포함하는 방법.

#### 청구항 77

인간 또는 인간화 항체 또는 그의 기능성 단편의 단리에 있어서의 CD38의 에피토프의 사용 방법으로서, 상기 항체 또는 그의 기능성 단편은 상기 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함하며, 상기 방법은

a) 상기 CD38의 에피토프를 항체 라이브러리와 접촉시키는 단계; 및

b) 상기 항체 또는 그의 기능성 단편을 단리하는 단계

를 포함하고,

상기 에피토프는 배좌형 에피토프인 방법.

#### 청구항 78

제77항에 있어서, 상기 배좌형 에피토프가 CD38의 아미노산 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 및 202-224로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 79

본질적으로 CD38의 아미노산 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 192-206 및 202-224로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 CD38의 단리된 에피토프.

#### 청구항 80

CD38의 아미노산 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 192-206 및 202-224로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 CD38의 단리된 에피토프.

#### 청구항 81

44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 192-206 및 202-224의 목록으로부터 취해지는 하나 이상의 아미노산 스트레치를 포함하는 CD38의 단리된 에피토프와 항체 라이브러리와 사용 설명서를 포함하는 키트.

#### 청구항 82

제1항, 제15항 또는 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 인간 항체인 인간 항체.

#### 청구항 83

제11항, 제12항, 제25항 또는 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 서열 동일성이 80% 이상인 단리된 항원 결합 영역.

#### 청구항 84

제40항, 제41항, 제54항 또는 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 서열 동일성이 80% 이상인 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편.

### 명세서

### 배경 기술

[0001]

본 출원은 2004년 2월 6일자로 출원된 미국 가출원 제60/541,911호, 2004년 2월 26일자로 출원된 미국 가출원 제60/547,584호, 2004년 3월 18일자로 출원된 미국 가출원 제60/553,948호, 및 2004년 8월 6일자로 출원된 미국 가출원 제60/599,014호를 우선권으로 주장하는데, 상기 미국 가출원의 내용 전체는 본원에 포함된다.

- [0002] CD38은 ADP 리보실-시클라아제 및 cADP-히드롤라아제로서의 효소 활성으로 인하여 세포의 효소 (ectoenzyme) 패밀리에 속하며 제II형 막 당단백질이다. 개체 발생 동안, CD38은 CD34+ 수입 (committed) 줄기 세포와, 림프계 세포, 적혈구계 세포 및 골수 세포의 계열-수입 (lineage-committed) 선구체 상에서 나타난다. CD38의 발현은, 초기 단계의 T-세포 및 B-세포 발생을 통하여 림프 계열에서만 지속된다는 것이 이해된다.
- [0003] CD38의 상향 조절은 림프구 활성화, 특히 형질 세포양 (plasmacytoid) 경로를 따른 B-세포 분화의 마커 역할을 한다. CD38의 (공동)수용체 기능이 그의 리간드인 CD31을 통한 세포내 신호화 또는 세포간 통신에 이르는 것과, 다양한 신호화 캐스케이드 (cascade)에서 이차 메신저인 시클릭 ADPr의 세포내 조절자로서의 그의 역할이 자명하다. 그러나 그의 생리학적 중요성이 여전히 밝혀져야 하는데, 이는 인간에 있어서 무린 유사체 또는 항-CD38 자가-항체의 킥 아웃 (knock out)이 해로운 것으로 나타나지 않기 때문이다.
- [0004] 조혈 체계에 있어서의 그의 발현의 관찰 이외에도, 연구자들은 B- 또는 T-세포 급성 림프아구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia, ALL), 급성 골수성 백혈병 (acute myeloid leukemia, AML), 비호지킨 림프종 (Non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 및 다발성 골수종 (multiple myeloma, MM)을 포함하는, B-, T-, 및 골수성/단구성 종양으로부터 유래되는 다양한 세포주 상에서의 CD38의 상향 조절을 알게 되었다. 예를 들어, MM에 있어서 대부분의 모든 환자 샘플에서 강력한 CD38 발현이 목격되고 있다.
- [0005] 따라서, 악성 세포 상에서의 CD38의 과다 발현은 면역 치료법에 있어서 매력적인 치료 표적을 제공한다. 특별하게 매력적인 것으로는 조혈 체계의 가장 조생의 다능성 줄기 세포가 CD38-음성이며 ADCC 또는 CDC에 의한 세포 독성 효과 정도가 개개의 표적의 발현 수준과 충분히 상관 관계가 있다는 사실이다.
- [0006] 항-CD38 치료법의 최근의 접근법은 생체내 및 생체외(ex vivo) 접근법의 두 군으로 나눌 수 있다. 생체내 접근법에 있어서, 항-CD38 항체는 CD38-과다 발현 악성 세포의 항체 매개 고갈의 야기를 위하여 치료가 필요한 대상에게 투여된다. 고갈은 이펙터(effector) 세포에 의한 항체-매개 ADCC 및/또는 CDC에 의해, 또는 표적 세포로의 세포 독성 물질, 예를 들어 사포린의 수송을 위한 표적화 부분으로서 항-CD38 항체의 사용, 및 후속적인 내부화에 의해 성취될 수 있다. 생체외 접근법에 있어서, 세포 집단, 예를 들어 CD38 과다 발현 악성 세포를 포함하는 골수 세포는 치료가 필요한 개체로부터 제거되며 항-CD38 항체와 접촉된다. 표적 세포는 생체내 접근법에 대하여 기술한 바와 같이 세포 독성 물질, 예를 들어 사포린에 의해 파괴되거나, 세포 집단을 고정화 항-CD38 항체와 접촉시킴으로써 제거되며, 이에 따라 혼합물로부터 CD38 과다 발현 표적 세포가 제거된다. 그 후, 이 고갈 세포 집단은 환자 내로 재삽입된다.
- [0007] CD38에 특이적인 항체는 다양한 특성에 따라 상이한 군으로 나눌 수 있다. 몇몇 항체의 CD38 분자 (주로 아미노산 220-300)에의 결합은 표적 세포 내에서 활성, 예를 들어  $Ca^{2+}$  방출, 사이토카인 방출, 인산화 사건 및 개개의 항체를 기반으로 하는 성장 촉진 (Konopleva et al., 1998; Ausiello et al., 2000)을 일으킬 수 있지만, 다양한 공지 항체의 결합 부위와 그의 (비-)작동 특성 사이의 명백한 상관 관계는 전혀 알 수 없었다 (Funaro et al., 1990).
- [0008] 공개된 항-CD38 항체의 효능에 대해서는 상대적으로 거의 알려져 있지 않다. 공지되어 있는 것은 모든 공지된 항체가 CD38의 C-말단 부분에 위치하는 에피토프 (아미노산 잔기 220 내지 300)를 배타적으로 인식하는 것으로 보인다는 것이다. 지금까지 어떠한 항체도 일차 단백질 서열 내의 활성 부위로부터 떨어져 있는 CD38의 N-말단 부분 내의 에피토프에 특이적인 것으로 공지되어 있지 않다. 그러나, 본 발명자들은 임상 시험 중이었던 OKT10이 인간 Fc 부분을 포함하는 키메라 제작물로서 분석될 경우 상대적으로 낮은 친화도 및 효능을 갖는다는 것을 알아내었다. 또한, OKT10은 컷과 항체여서 인간 투여에는 적합하지 않게 된다. 인간 항-CD38 scFv 항체 단편이 최근에 개시되었다 (WO 02/06347). 그러나, 상기 항체는 선택적으로 발현되는 CD38 에피토프에 특이적이다.
- [0009] 이와 상응하게, 항-CD38 항체 치료법에 있어서의 큰 잠재력에 비추어 보면, ADCC 및/또는 CDC에 의해 CD38 과다 발현 악성 세포의 살해를 매개하는 데 있어서 높은 친화도 및 높은 효능을 갖는 인간 항-CD38 항체에 대한 높은 필요성이 존재한다.
- [0010] 본 발명은 완전 인간형의 고도로 효과적인 항-CD38 항체를 제공함으로써 이러한 필요성 및 기타 필요성을 충족시키는데, 이는 이하에 기술되어 있다.
- [0011] **발명의 개요**
- [0012] 본 발명의 목적은 CD38-과다 발현 세포의 살해를 효과적으로 매개할 수 있는 인간 및 인간화 항체를 제공하는 것이다.

- [0013] 본 발명의 다른 목적은 인간 투여에 안전한 항체를 제공하는 것이다.
- [0014] 또한 본 발명의 목적은 본 발명의 하나 이상의 항체의 사용에 의해 CD38 상향 조절과 관련된 질환 및/또는 병을 치료하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 이러한 목적 및 기타 목적은 본원에 더욱 충분하게 기술되어 있다.
- [0015] 일 태양에 있어서, 본 발명은 CD38의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 기능성 항체 단편을 제공하는데, 여기서, 본 항체 또는 그의 기능성 단편은, (동일하거나 실질적으로 동일한 조건 하에서) 인간 PBMC 세포가 이펙터 세포로서 이용되고, 이펙터 세포 대 표적 세포의 비가 약 30:1 내지 약 50:1 사이 일 때, 서열 번호 23 및 24의 서열을 갖는 키메라 OKT10 항체보다 적어도 2배 내지 5배 더 우수한 효능으로 항체-의존성 세포 독성 ("ADCC")에 의한 CD38+ 표적 세포 (LP-1 (DSMZ: ACC41) 및 RPMI-8226 (ATCC: CCL-155))의 살해를 매개할 수 있다. 그러한 항체 또는 그의 기능성 단편은 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 예시되어 있는 H-CDR3 영역을 포함하는 항원 결합 영역을 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 예시되어 있는 H-CDR2 영역을 추가로 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 예시되어 있는 H-CDR1 영역도 포함할 수 있다. 본 발명의 그러한 CD38-특이성 항체는 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 예시되어 있는 L-CDR3 영역을 포함하는 항원 결합 영역을 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 예시되어 있는 L-CDR1 영역을 추가로 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 예시되어 있는 L-CDR2 영역도 포함할 수 있다.
- [0016] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 CD38의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함하는 단리된 항체 또는 기능성 항체 단편을 제공하는데, 여기서, 본 항체 또는 그의 기능성 단편은 이전의 단락에서와 동일하거나 실질적으로 동일한 조건 하에서 키메라 OKT10 (서열 번호 23 및 24)보다 적어도 2배 더 우수한 효능으로 CDC에 의한 CD38-트랜스펙션된 CHO 세포의 살해를 매개할 수 있다. 이러한 기준을 충족시키는 항체는 서열 번호 5, 6, 또는 7에 예시되어 있는 H-CDR3 영역을 포함하는 항원 결합 영역을 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 5, 6, 또는 7에 예시되어 있는 H-CDR2 영역을 추가로 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 5, 6, 또는 7에 예시되어 있는 H-CDR1 영역도 포함할 수 있다. 본 발명의 그러한 CD38-특이성 항체는 서열 번호 13, 14, 또는 15에 예시되어 있는 L-CDR3 영역을 포함하는 항원 결합 영역을 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 13, 14, 또는 15에 예시되어 있는 L-CDR1 영역을 추가로 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 13, 14, 또는 15에 예시되어 있는 L-CDR2 영역도 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 항체 (및 그의 기능성 단편)는 CD38의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함할 수 있으며, 이 에피토프는 서열 번호 22에 예시되어 있는 바와 같이, CD38의 아미노산 잔기 43 내지 215 중 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함한다. 더 구체적으로는, 본 항원 결합 영역이 결합하는 에피토프는 아미노산 스트레치 (stretch) 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 및 192-206의 목록으로부터 취해지는 아미노산 스트레치 중 하나 이상의 아미노산 스트레치에서 발견되는 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정 항체에 있어서, 에피토프는 선형일 수 있으며, 반면, 다른 것의 경우에는 배좌형일 수 있다 (즉, 불연속성). 이러한 특성 중 하나 이상의 특성을 갖는 항체 또는 그의 기능성 단편은 서열 번호 5, 6, 7 또는 8의 서열에 예시되어 있는 H-CDR3 영역을 포함하는 항원 결합 영역을 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 예시되어 있는 H-CDR2 영역을 추가로 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 예시되어 있는 H-CDR1 영역도 포함할 수 있다. 본 발명의 그러한 CD38-특이성 항체는 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 예시되어 있는 L-CDR3 영역을 포함하는 항원 결합 영역을 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 예시되어 있는 L-CDR1 영역을 추가로 포함할 수 있으며; 이 항원 결합 영역은 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 예시되어 있는 L-CDR2 영역도 포함할 수 있다.
- [0018] 본원에 개시된 서열의 펩티드 변이체도 본 발명에 포함된다. 따라서, 본 발명은 CDR 영역에서 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 예시되어 있는 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상이고/이거나 CDR 영역에서 서열 번호 5, 6, 7 또는 8에 예시되어 있는 CDR 영역과의 서열 상동성이 80퍼센트 이상인 중쇄 아미노산 서열을 갖는 항-CD38 항체를 포함한다. 또한 포함되는 것은 CDR 영역에서 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 예시되어 있는 CDR 영역과의 서열 동일성이 60퍼센트 이상이고/이거나 CDR 영역에서 서열 번호 13, 14, 15 또는 16에 예시되어 있는 CDR 영역과의 서열 상동성이 80퍼센트 이상인 경쇄 아미노산 서열을 갖는 항-CD38 항체이다.
- [0019] 본 발명의 항체는 IgG (예를 들어, IgG<sub>1</sub>)일 수 있는 반면, 항체 단편은 예를 들어 Fab 또는 scFv일 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 단편은 본원에 기술되어 있는 바와 같이 하나 이상의 방식으로 거동하는 항원 결합 영역일 수 있거나 이 항원 결합 영역을 포함할 수 있다.

- [0020] 또한, 본 발명은 단리된 핵산 서열에 관한 것인데, 이 핵산 서열 각각은 CD38의 에피토프에 특이적인 인간 항체 또는 그의 기능성 단편의 항원 결합 영역을 코딩할 수 있다. 그러한 핵산 서열은 항체의 가변성 중쇄를 코딩할 수 있으며 서열 번호 1, 2, 3 또는 4의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 또는 높은 엄격도의 조건 하에 서열 번호 1, 2, 3 또는 4의 서열의 상보성 가닥에 혼성화되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 핵산은 단리된 항체 또는 그의 기능성 단편의 가변성 경쇄를 코딩할 수 있으며, 서열 번호 9, 10, 11, 또는 12의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 또는 높은 엄격도의 조건 하에 서열 번호 9, 10, 11, 또는 12의 서열의 상보성 가닥에 혼성화되는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 핵산은 재조합체 생성에 적합하다. 이와 같이, 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명의 조성물은 치료 또는 예방 용도로 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 항체 (또는 기능성 항체 단편) 및 그를 위한 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 함유하는 약학 조성물을 포함한다. 관련 태양에 있어서, 본 발명은 CD38 또는 CD38 발현 세포의 원하지 않는 존재와 관련된 장애 또는 병의 치료 방법을 제공한다. 그러한 방법은 본원에 기술되어 있거나 본원에서 고려되는 본 발명의 항체를 함유하는 유효량의 약학 조성물을 그를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0023] 또한 본 발명은 선형 또는 배좌형 중 어느 하나의 CD38의 단리된 에피토프와, 항체 또는 그의 기능성 단편의 단리에 있어서의 그의 용도에 관한 것인데, 본 항체 또는 항체 단편은 상기 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함한다. 이와 관련하여, 선형 에피토프는 CD38의 아미노산 잔기 192-206을 포함할 수 있는 반면, 배좌형 에피토프는 CD38의 아미노산 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170 및 202-224로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. CD38의 에피토프는 예를 들어 항체 또는 그의 기능성 단편 (이 항체 또는 항체 단편 각각은 그러한 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함함)의 단리에 사용될 수 있으며, 상기 단리는 CD38의 상기 에피토프를 항체 라이브러리와 접촉시키는 단계 및 항체(들) 또는 그의 기능성 단편(들)을 단리하는 단계를 포함한다.
- [0024] 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명은 CD38의 아미노산 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 192-206 및 202-224로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 본질적으로 이루어진 CD38의 단리된 에피토프를 제공한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 그러한 에피토프는 바로 앞의 아미노산 서열들 중 하나 + 추가의 특징부로 "본질적으로 이루어지"되, 단, 추가의 특징부는 에피토프의 기본적인 특징 및 신규 특징에 크게 영향을 주지 않는다.
- [0025] 또다른 실시 형태에 있어서, 본 발명은 CD38의 아미노산 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 192-206 및 202-224로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 CD38의 단리된 에피토프를 제공한다.
- [0026] 또한 본 발명은 (i) 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 192-206 및 202-224의 목록으로부터 취해지는 하나 이상의 아미노산 스트레치를 포함하는 CD38의 단리된 에피토프; (ii) 항체 라이브러리; 및 (iii) 그러한 에피토프에 특이적으로 결합하는 그러한 라이브러리 중 하나 이상의 구성원을 단리하기 위한 항체 라이브러리의 사용에 대한 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1a는 다양한 신규 항체의 중쇄 가변 영역의 핵산 서열을 제공한다.
- 도 1b는 다양한 신규 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제공한다. CDR 영역인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 N-말단에서 C-말단으로 볼드체로 나타내어져 있다.
- 도 2a는 다양한 신규 항체의 경쇄 가변 영역의 핵산 서열을 제공한다.
- 도 2b는 다양한 신규 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제공한다. CDR 영역인 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 N-말단에서 C-말단으로 볼드체로 나타내어져 있다.
- 도 3은 다양한 콘센서스 (consensus)-기반의 HuCAL 항체 마스터 (master) 유전자 서열의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제공한다. CDR 영역인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 N-말단에서 C-말단으로 볼드체로 나타내어져 있다.
- 도 4는 다양한 콘센서스-기반의 HuCAL 항체 마스터 유전자 서열의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제공한다. CDR 영역인 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 N-말단에서 C-말단으로 볼드체로 나타내어져 있다.

도 5는 CD38의 아미노산 서열 (SWISS-PROT 일차 등록 번호: P28907)을 제공한다.

도 6은 키메라 OKT10의 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.

도 7은 본 발명의 대표적인 항체의 에피토프의 개략도를 제공한다.

도 8은 pMORPH(등록상표)\_h\_IgG1\_1 (bp 601-2100)의 DNA 서열 (서열 번호 32)을 제공한다: 이 벡터는 pcDNA3.1+ 벡터 (Invitrogen)를 기반으로 한다. VH-스터퍼 (stuffer) 서열의 아미노산 서열은 볼드체로 나타내어져 있으며, 반면, VH-리더 서열과 불변 영역 유전자의 최종 관독 프레임은 비(非)-볼드체로 인쇄되어 있다. 제한 효소 부위는 서열의 위에 나타내어져 있다. 서열 결정용 프라이머의 프라이밍 부위에는 밑줄이 그어져 있다.

도 9는 Ig 카파 경쇄 발현 벡터 pMORPH(등록상표)\_h\_Igκ\_1 (bp 601-1400)의 DNA 서열 (서열 번호 33)을 제공한다: 이 벡터는 pcDNA3.1+ 벡터 (Invitrogen)를 기반으로 한다. Vκ-스터퍼 서열의 아미노산 서열은 볼드체로 나타내어져 있으며, 반면, Vκ-리더 서열과 불변 영역 유전자의 최종 관독 프레임은 비-볼드체로 인쇄되어 있다. 제한 효소 부위는 서열의 위에 나타내어져 있다. 서열 결정용 프라이머의 프라이밍 부위에는 밑줄이 그어져 있다.

도 10은 HuCAL Ig 램다 경쇄 벡터 pMORPH(등록상표)\_h\_Igλ\_1 (bp 601-1400)의 DNA 서열 (서열 번호 34)을 제공한다: Vλ-스터퍼 서열의 아미노산 서열은 볼드체로 나타내어져 있으며, 반면, Vλ-리더 서열과 불변 영역 유전자의 최종 관독 프레임은 비-볼드체로 인쇄되어 있다. 제한 효소 부위는 서열의 위에 나타내어져 있다. 서열 결정용 프라이머의 프라이밍 부위에는 밑줄이 그어져 있다.

도 11은 증식 분석 결과를 제공한다: (개개의 점으로 나타난 바와 같이) 6명의 상이한 건강한 공여체 유래의 PBMC를 HuCAL(등록상표) 항체인 Mab#1 (=MOR03077), Mab#2 (=MOR03079), 및 Mab#3 (=MOR03080)과, 참고 항체인 chOKT10, 작동성 (ag.) 대조 IB4, 무관한 HuCAL(등록상표) 음성 대조 IgG1 (NC) 및 IB4에 대하여 매치되는 이소타입 대조로서 컷과 IgG2a (Iso)의 존재 하에 3일 동안 배양하였다. BrdU를 이용한 표준 표지법을 사용하여 증식 활성을 측정하고 그의 혼입량 (RLU (=relative light units)로서)을 화학 발광-기반 ELISA를 통하여 분석하였다.

도 12는 IL-6 방출 분석 결과를 제공한다: (개개의 점으로 나타난 바와 같이) 4-8명의 상이한 건강한 공여체 유래의 PBMC를 HuCAL(등록상표) 항체인 Mab#1 (=MOR03077), Mab#2 (=MOR03079), 및 Mab#3 (=MOR03080)와, 참고 항체인 chOKT10, 작동성 (ag.) 대조 IB4, 무관한 HuCAL(등록상표) 음성 대조 (NC) 및 단지 배지 (배지)의 존재 하에 24시간 동안 배양하였다. RLU의 단위의 IL-6 함량을 화학 발광 기반의 ELISA를 통하여 배양 상청액으로부터 분석하였다.

도 13은 CD34+/CD38+ 선구 세포에 대한 세포 독성에 관한 데이터를 제공한다: 자가 CD34+/CD38+ 선구 세포를 보유하는 건강한 공여체 유래의 PBMC를 각각 HuCAL(등록상표) Mab#1 (=MOR03077), Mab#2 (=MOR03079), 및 Mab#3 (=MOR03080)과, 양성 대조 (PC = chOKT10) 및 무관한 HuCAL(등록상표) 음성 대조와 함께 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포 현탁물을 메틸-셀룰로오스 조절 배지와 혼합시키고 2주 동안 배양하였다. 적혈구군 형성 단위 (erythroid burst forming units) (BFU-E; 패널 B)와 과립구/적혈구계/대식세포/거핵구 줄기 세포 (CFU-GEMM; 패널 B) 및 과립구/대식세포 줄기 세포 (CFU-GM; 패널 C)로부터 유래되는 콜로니 형성 단위 (colony forming units, CFU)를 카운팅하고 배지 대조 ("무" = 배지)에 대하여 정상화하였다. 패널 A는 모든 선구체에 있어서의 CFU의 총 수 (총 CFUc)를 나타낸다. 적어도 10명의 상이한 PBMC 공여체로부터의 평균 값이 주어져 있다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 14는 상이한 세포주를 이용한 ADCC에 관한 데이터를 제공한다:

a: 단일 측정치 (RPMI8226은 제외함: 4회의 개개의 분석으로부터의 평균); E:T의 비: 30:1

b: Namba et al., 1989

c: 항체의 농도에 사용되는 5 µg/ml (0.1 µg/ml이 이용되는 Raji는 제외함)

d: CD38-발현 특이성 살해율 [%] = [(exp. 살해 - 중간 정도의 살해) / (1 - 중간 정도의 살해)] \* 100의 측정을 위한 레틴산 첨가 분석

PC: 양성 대조 (=chOKT10)



MM: 다발성 골수종

CLL: 만성 B-세포 백혈병

ALL: 급성 림프아구성 백혈병

AML: 급성 골수성 백혈병

DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (독일 미생물 보존 센터)

ATCC: American type culture collection (미국 세포 배양 센터)

ECACC: European collection of cell cultures (유럽 세포 배양 센터)

MFI: 평균 형광 강도 (Mean fluorescence intensities).

도 15는 MM-샘플을 이용한 ADCC에 관한 데이터를 제공한다:

<sup>a</sup>: 2-4회의 개별적인 분석

도 16은 MOR03080을 이용한 인간 골수종 이종 이식편의 처리 후 평균 종양 부피에 대한 실험 결과를 제공한다: 1군: 비히클; 2군: hIgG1으로서 MOR03080 1mg/kg, 격일로 32-68일; 3군: hIgG1으로서 MOR03080 5 mg/kg, 격일로 32-68일; 4군: chIgG2a로서 MOR03080 5 mg/kg, 격일로 32-68일; 5군: hIgG1로서 MOR03080 1 mg/kg, 격일로 14-36일; 6군: 미처리

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명은 CD38에 특이적이거나 CD38에 대하여 친화도가 높은 신규한 항체의 발견을 기반으로 하며 이는 대상에게 치료 효과를 전달할 수 있다. 본 발명의 항체는 인간형이거나 인간화될 수 있으며, 본원에서 더욱 충분히 기술되어 있는 다수의 정황에서 사용될 수 있다.
- [0029] 본원에서 "인간" 항체 또는 기능성 인간 항체 단편은 키메라 항체가 아니며 (예를 들어 "인간화"된 것이 아님) 인간외 종으로부터 유래된 (전체 또는 부분) 것이 아닌 것으로 정의된다. 인간 항체 또는 기능성 항체 단편은 인간으로부터 유래될 수 있거나 합성 인간 항체일 수 있다. 본원에서 "합성 인간 항체"는 공지된 인간 항체 서열의 분석을 기반으로 하는 합성 서열로부터 전체적으로 또는 부분적으로 인 실리코 (in silico) 유래된 서열을 갖는 항체로 정의된다. 인간 항체 서열 또는 그의 단편의 인 실리코 고안은 예를 들어 인간 항체 또는 항체 단편 서열의 데이터베이스의 분석 및 그로부터 얻어지는 데이터를 이용한 폴리펩티드 서열의 고안에 의해 성취될 수 있다. 인간 항체 또는 기능성 항체 단편의 다른 예로는 인간 기원의 항체 서열의 라이브러리 (즉, 그러한 라이브러리는 인간 천연 공급원으로부터 취해지는 항체를 기반으로 함)로부터 단리된 핵산에 의해 코딩되는 것이 있다.
- [0030] 본원에서 "인간화 항체" 또는 기능성 인간화 항체 단편은 (i) 항체가 인간 생식 세포 서열을 기반으로 하는 인간의 공급원으로부터 유래되는 것 (예를 들어 이중성 면역계를 보유하는 트랜스제닉 마우스); 또는 (ii) 가변 도메인은 인간의 기원으로부터 유래되며 불변 도메인은 인간 기원으로부터 유래되는 것 또는 (iii) 가변 도메인의 CDR이 인간의 기원으로부터 유래되는 반면, 가변 도메인의 하나 이상의 골격은 인간 기원의 것이고 불변 도메인 (존재할 경우)은 인간 기원의 것인 것으로서 정의된다.
- [0031] 본원에 사용되는 바와 같이, 항체가 "특이적으로 결합하는"이라는 것은 그러한 항체가 항원과 하나 이상의 참고 항원(들)을 구별할 수 있을 경우 항원 (본원에서는 CD38)에 "특이적이거나" 항원을 "특이적으로 인식하는" 것이 되는데, 이는 결합 특이성이 절대적인 것이 아니라 상대적인 특성이기 때문이다. 가장 일반적인 형태에 있어서 (그리고 정의된 참고 사항이 언급되지 않을 때에) "특이적 결합"은 예를 들어 하기 방법 중 하나에 따라 측정되는 바와 같이, 목적 항원과 관계없는 항원을 구별하는 항체의 능력을 말한다. 그러한 방법은 웨스턴 블롯 (Western blot), ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-시험 및 펩티드 스캔을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 표준 ELISA 분석이 실시될 수 있다. 스코어링 (scoring)은 표준 발색에 의해 실시할 수 있다 (예를 들어 서양 고추냉이 퍼옥사이드를 포함하는 이차 항체 및 과산화수소를 포함하는 테트라메틸 벤지딘). 소정 웰에서의 반응은 예를 들어 450 nm에서의 광밀도로 스코어링된다. 전형적인 배경 (= 음성 반응)은 0.1 OD일 수 있으며, 전형적인 양성 반응은 1 OD일 수 있다. 이는 양성/음성의 차이가 10배보다 클 수 있음을 의미한다. 전형적으로, 결합 특이성의 측정은 단일 참고 항원 뿐만 아니라, 약 3종 내지 5종의 관계없는 항원 세트, 예를

들어 분유, BSA, 트랜스페린 등의 사용에 의해서도 수행된다.

[0032] 그러나, "특이적 결합"은 표적 항원과 하나 이상의 가까운 관련 항원(들)을 구별하는 항체의 능력을 또한 말할 수 있는데, 이는 예를 들어 CD38과 CD157 사이의 참고 지점으로 사용된다. 추가로, "특이적 결합"은 표적 항원의 상이한 부분, 예를 들어 CD38의 상이한 도메인 또는 영역, 예를 들어 CD38의 N-말단 또는 C-말단 영역 내의 에피토프, 또는 CD38의 하나 이상의 주요 아미노산 잔기 또는 아미노산 잔기 스트레치를 구별하는 항체의 능력과 관련될 수 있다.

[0033] 또한, 본원에 사용되는 바와 같이, 본원에서 "면역글로불린" (Ig)은 IgG, IgM, IgE, IgA, 또는 IgD류 (또는 그의 임의의 아류)에 속하는 단백질로 정의되며, 모든 통상적으로 공지된 항체 및 그의 기능성 단편을 포함한다. 본원에서 항체/면역글로불린의 "기능성 단편"은 항원 결합 영역을 계속 지니는 항체/면역글로불린의 단편 (예를 들어 IgG의 가변 영역)으로 정의된다. 전형적으로 항체의 "항원 결합 영역"은 항체의 하나 이상의 과변이 영역(들), 즉, CDR-1, CDR-2 및/또는 CDR-3 영역에서 발견되지만, 가변성 "골격" 영역은 CDR의 지지체의 제공에 의한 것과 같이, 항원 결합에 있어서 중요한 역할을 또한 할 수 있다. 바람직하게는, "항원 결합 영역"은 적어도 가변성 경쇄 (VL)의 아미노산 잔기 4 내지 103 및 가변성 중쇄 (VH)의 아미노산 잔기 5 내지 109, 더 바람직하게는 VL의 아미노산 잔기 3 내지 107 및 VH의 아미노산 잔기 4 내지 111을 포함하며, 특히 바람직한 것은 완전한 VL 및 VH 쇄 (VL의 아미노산 위치 1 내지 109 및 VH의 아미노산 위치 1 내지 113; WO 97/08320에 따라 번호를 매김)이다. 본 발명에서 사용하기에 바람직한 면역글로불린류는 IgG이다. 본 발명의 "기능성 단편"은 F(ab')<sub>2</sub> 단편의 도메인, Fab 단편 및 scFv를 포함한다. F(ab')<sub>2</sub> 또는 Fab는 C<sub>H1</sub>과 C<sub>L</sub> 도메인 사이에 일어나는 분자간 디설피드 상호 작용이 최소화되거나 완전히 제거되도록 엔지니어링될 수 있다.

[0034] 본 발명의 항체는 합성에 의해 생성되는 핵산에 의해 코딩되며 인 실리코로 고안된 아미노산 서열을 기반으로 하는 재조합 항체 라이브러리로부터 유래될 수 있다. 항체 서열의 인 실리코 고안은 예를 들어 인간 서열의 데이터베이스의 분석 및 그로부터 얻어지는 데이터를 이용한 폴리펩티드 서열의 고안에 의해 성취된다. 인 실리코-생성 서열을 고안하고 얻는 방법은 예를 들어 문헌[Knappik et al., J. Mol. Biol. (2000) 296: 57]; 문헌[Krebs et al., J. Immunol. Methods. (2001) 254: 67]; 및 Knappik 등에게 허여된 미국 특허 제6,300,064호에 기술되어 있는데, 상기 문헌 및 특허는 본원에 그의 전체 내용이 참고로 포함된다.

#### [0035] 본 발명의 항체

[0036] 본 문서 전반에 걸쳐, 하기의 본 발명의 대표적인 항체가 언급된다: "항체 번호" "LACS" 또는 "MOR" 3077, 3079, 3080 및 3100. LAC 3077은 서열 번호 1 (DNA)/서열 번호 5 (단백질)의 서열에 상응하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 9 (DNA)/서열 번호 13 (단백질)의 서열에 상응하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 나타낸다. LAC 3079는 서열 번호 2 (DNA)/서열 번호 6 (단백질)의 서열에 상응하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 10 (DNA)/서열 번호 14 (단백질)의 서열에 상응하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 나타낸다. LAC 3080은 서열 번호 3 (DNA)/서열 번호 7 (단백질)의 서열에 상응하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 11 (DNA)/서열 번호 15 (단백질)의 서열에 상응하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 나타낸다. LAC 3100은 서열 번호 4 (DNA)/서열 번호 8 (단백질)의 서열에 상응하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 12 (DNA)/서열 번호 16 (단백질)에 상응하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 나타낸다.

[0037] 일 태양에 있어서, 본 발명은 아미노산 서열이 서열 번호 22로 예시되는 CD38의 하나 이상의 영역에 특이적으로 결합할 수 있거나 그에 대하여 높은 친화도를 갖는 항원 결합 영역을 갖는 항체를 제공한다. 항체는 친화도 측정치가 100 nM 이상일 경우 항원에 대하여 "높은 친화도"를 갖는 것이라고 한다 (일가 Fab 단편 친화도). 본 발명의 항체 또는 항원 결합 영역은 바람직하게는 약 100 nM 미만, 더 바람직하게는 약 60 nM 미만, 더욱 더 바람직하게는 약 30 nM 미만의 친화도로 CD38에 결합할 수 있다. 또한 바람직한 것은 약 10 nM 미만, 더 바람직하게는 약 3 nM 미만의 친화도로 CD38에 결합하는 항체이다. 예를 들어 CD38에 대한 본 발명의 항체의 친화도는 약 10.0 nM 또는 2.4 nM일 수 있다 (일가 Fab 단편 친화도).

[0038] 표 1은 표면 플라스몬 공명 (Biacore) 및 FACS Scatchard 분석에 의해 측정되는 바와 같이, 본 발명의 대표적인 항체의 친화도에 대한 개요를 제공한다.

## 표 1

항체의 친화도

항체 (Fab 또는 IgG1)	BIACORE (Fab) $K_D$ [nM] <sup>a</sup>	FACS Scatchard (IgG1) <sup>b</sup> $K_D$ [nM] <sup>a</sup>
MOR03077	56.0	0.89
MOR03079	2.4	0.60
MOR03080	27.5	0.47
MOR03100	10.0	6.31
키메라 OKT10	측정되지 않음	8.28
a: 2개 이상의 상이한 친화도 측정치로부터의 평균		
b: FACS-Scatchard에 사용한 RPMI8226 MM 세포주		

[0039]

[0040]

표 1을 참고하면, LAC 3077, 3079, 3080 및 3100의 친화도는 고정화 재조합 CD38 상에서의 표면 플라스몬 공명 (Biacore) 및 CD38-발현 인간 RPMI8226 세포주를 이용한 유세포 분류 절차로 측정하였다. Biacore 연구는 직접적으로 고정화된 항원(CD38-Fc 융합 단백질) 상에서 수행하였다. LAC 3077, 3079, 3080 및 3100의 Fab 포맷은 고정화 CD38-Fc 융합 단백질 상에서 약 2.4 내지 56 nM 사이의 일가 친화도 범위를 나타내는데, LAC 3079가 가장 높은 친화도를 나타내며, 이어서 Fab 3100, 3080 및 3077이다.

[0041]

IgG1 포맷은 세포 기반의 친화도 측정에 사용하였다 (FACS Scatchard). 표 1의 우측 컬럼에는 이 포맷의 LACS의 결합 강도가 나타내어져 있다. LAC 3080이 가장 강한 결합성을 나타내었는데, 이는 LACS 3079 및 3077보다 약간 더 강하다.

[0042]

본 발명의 바람직한 항체의 다른 바람직한 특징은 CD38의 N-말단 영역 내의 지역에 대한 그의 특이성이다. 예를 들어 본 발명의 LAC 3077, 3079, 3080, 및 3100은 CD38의 N-말단 영역에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0043]

본 발명의 항체가 결합하는 에피토프의 유형은 선형 (즉, 아미노산의 하나의 연속 스트레치) 또는 배좌형 (즉, 아미노산의 다수의 스트레치)일 수 있다. 특정 항체의 에피토프가 선형인지 배좌형인지를 결정하기 위하여, 숙련된 연구자라면 CD38의 상이한 도메인을 커버하는 중복 펩티드 (예를 들어, 11개의 아미노산의 중복을 포함하는 13-mer 펩티드)에의 항체의 결합을 분석할 수 있다. 이러한 분석법을 사용하여, 본 발명자들은 LAC 3077, 3080, 및 3100이 CD38의 N-말단 영역 내의 불연속 에피토프를 인식하며, 반면, LAC 3079의 에피토프는 선형으로서 기술될 수 있다는 것을 밝혀내었다 (도 7 참조). 본원에 제공되어 있는 지식과 조합해 보면, 당업계의 숙련된 연구자라면 CD38의 에피토프에 대하여 특이적인 항원 결합 영역을 갖는 항체의 생성에 있어서 CD38의 하나 이상의 단리된 에피토프를 사용하는 방법을 알 것이다 (예를 들어 CD38의 에피토프의 합성 펩티드 또는 CD38의 에피토프를 발현하는 세포를 사용함).

[0044]

본 발명의 항체는 바람직하게는 인간 및 적어도 하나의 다른 종과 교차 반응성인 종인데, 상기 적어도 하나의 다른 종은 설치류 종 또는 인간의 영장류일 수 있다. 인간의 영장류는 붉은털 원숭이 (rhesus), 개코원숭이 (baboon) 및/또는 시노몰구스 (cynomolgus)일 수 있다. 설치류 종은 마우스, 래트 및/또는 햄스터일 수 있다. 예를 들어, 동일한 항체를 이용하여 다수의 종에서의 생체내 연구를 행할 목적에 있어서, 하나 이상의 설치류 종과 교차 반응성인 항체는 공지된 항-CD38 항체에 비하여 보다 큰 유연성 및 효과를 제공할 수 있다.

[0045]

바람직하게는, 본 발명의 항체는 CD38에 결합할 수 있을 뿐만 아니라 CD38을 발현하는 세포의 살해를 매개할 수도 있다. 더 구체적으로는, 본 발명의 항체는 항체-이펙터 기능을 통하여 CD38-양성 (예를 들어 악성) 세포를 고갈시킴으로써 그의 치료 효과를 매개할 수 있다. 이 기능은 항체 의존성 세포 독성 (ADCC) 및 보체-의존성 세포 독성 (complement-dependent cytotoxicity, CDC)을 포함한다.

[0046]

표 2는 ADCC 및 CDC 둘 모두에 있어서 본 발명의 대표적인 항체의 EC50의 측정치에 대한 개요를 제공한다.



표 2

항체의 EC50 값

항체 (IgG1)	ADCC EC50 [nM]		CDC EC50 [nM]
	LP-1	RPMI8226	CHO-트랜스펙션체
MOR03077	0.60 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.8 <sup>c</sup> ; 0.94 <sup>d</sup>
MOR03079	0.09 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.41 <sup>c</sup>
MOR03080	0.17 <sup>b</sup>	0.05 <sup>a</sup>	3.2 <sup>c</sup> ; 2.93 <sup>d</sup>
MOR03100	1.00 <sup>b</sup>	0.28 <sup>a</sup>	10.9 <sup>a</sup> ; 13.61 <sup>c</sup>
키메라 OKT10	5.23 <sup>a</sup>	4.10 <sup>a</sup>	9.30 <sup>c</sup>
a: 2개 이상의 EC50 측정치로부터의 평균			
b: 단일 측정치			
c: 2개의 EC50 측정치로부터의 평균			
d: 3개의 EC50 측정치로부터의 평균			
e: 4개의 EC50 측정치로부터의 평균			

[0047]

[0048]

그러나, CD-38 발현은 골수 (예를 들어 단구, 과립구) 및 림프 계열 (예를 들어 활성화 B 및 T-세포; 형질 세포) 내의 면역 세포 상에서 뿐만 아니라 개개의 전구 세포 상에서도 발견된다. 상기 세포는 악성 세포의 항체-매개 살해에 의해 영향을 받지 않는 것이 중요하기 때문에, 본 발명의 항체는 바람직하게는 전구 세포에 대하여 세포 독성을 갖지 않는다.

[0049]

시클릭 ADP-리보스 시클라아제 및 히드롤라아제로서의 촉매 활성 외에도, CD38은 생물학적으로 관련된 신호를 변환시키는 능력을 나타낸다 (Hoshino et al., 1997; Ausiello et al., 2000). 상기 기능은 예를 들어 수용체-리간드 상호작용 또는 작동성 항-CD38 항체와의 가교 결합에 의해 유발되어, 예를 들어 칼슘 이동, 림프구 증식 및 사이토카인의 방출에 이를 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 비-작동성 항체이다.

[0050]

#### 펩티드 변이체

[0051]

본 발명의 항체는 본원에 제공되어 있는 특정 펩티드 서열에 한정되지 않는다. 오히려, 본 발명은 이러한 폴리펩티드의 변이체를 또한 구현한다. 본 발명의 개시 내용 및 통상적으로 이용가능한 기술과 참고 문헌을 참고로 하면, 숙련된 연구자라면 본원에 개시된 항체의 기능성 변이체를 제조, 시험 및 이용할 수 있는 동시에, CD38+ 표적 세포의 살해를 매개하는 능력을 갖는 변이체가 본 발명의 범주 이내라는 것을 알 것이다. 이 상황에서 사용되는 바와 같이, "CD38+ 표적 세포의 살해를 매개하는 능력"은 본 발명의 항-CD38 항체에 속하는 것으로 생각되는 기능적 특징을 의미한다. 따라서, CD38+ 표적 세포의 살해를 매개하는 능력은 예를 들어 ADCC 및/또는 CDC에 의해, 또는 본 발명의 항체에 콘주게이션된 독소 제작용에 의해 CD38+ 표적 세포의 살해를 매개하는 능력을 포함한다.

[0052]

변이체는 예를 들어 본원에 개시된 펩티드 서열과 비교하여 하나 이상의 변경된 상보성 결정 영역 (complementarity determining region, CDR) (과변이) 및/또는 골격 (FR) (가변) 도메인/위치를 갖는 항체를 포함할 수 있다. 이 개념을 더 잘 설명하기 위하여, 항체 구조에 대한 간략한 설명이 이어진다.

[0053]

항체는 2개의 펩티드 사슬로 구성되며, 각각은 하나 (경쇄) 또는 3개 (중쇄)의 불변 도메인과 하나의 가변 영역 (VL, VH)을 포함하고, 각각의 경우 후자는 4개의 FR 영역 및 3개의 이격된 (interspaced) CDR로 이루어진다. 항원 결합 부위는 하나 이상의 CDR에 의해 형성되지만, FR 영역이 CDR에 있어서의 구조적 골격을 제공하며, 따라서 항원 결합에서 중요한 역할을 한다. CDR 또는 FR 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경시킴으로써, 숙련된 연구자라면 돌연변이되거나 다양화된 항체 서열을 일상적으로 생성할 수 있으며, 상기 서열은 항원에 대하여, 예를 들어 새롭거나 개선된 특성들에 대하여 스크리닝될 수 있다.

[0054]

표 3a (VH) 및 3b (VL)에는 본 발명의 소정 항체에 있어서의 CDR 및 FR 영역이 예시되어 있으며 주어진 위치의 아미노산이 서로와, 그리고 상응하는 콘센서스 또는 "마스터 유전자" 서열 (미국 특허 제6,300,064호에 개시되어 있는 바와 같음)과 비교되어 있다.



[0057] [표 3b]

VL 서열 CD83 결합자		CDR 1		CDR 2	
VL		CDR 1		CDR 2	
위치		CDR 1		CDR 2	
21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30
31	31	31	31	31	31
32	32	32	32	32	32
33	33	33	33	33	33
34	34	34	34	34	34
35	35	35	35	35	35
36	36	36	36	36	36
37	37	37	37	37	37
38	38	38	38	38	38
39	39	39	39	39	39
40	40	40	40	40	40
41	41	41	41	41	41
42	42	42	42	42	42
43	43	43	43	43	43
44	44	44	44	44	44
45	45	45	45	45	45
46	46	46	46	46	46
47	47	47	47	47	47
48	48	48	48	48	48
49	49	49	49	49	49
50	50	50	50	50	50
51	51	51	51	51	51
52	52	52	52	52	52
53	53	53	53	53	53
54	54	54	54	54	54
55	55	55	55	55	55
56	56	56	56	56	56
57	57	57	57	57	57
58	58	58	58	58	58
59	59	59	59	59	59
60	60	60	60	60	60
61	61	61	61	61	61
62	62	62	62	62	62
63	63	63	63	63	63
64	64	64	64	64	64
65	65	65	65	65	65
66	66	66	66	66	66
67	67	67	67	67	67
68	68	68	68	68	68
69	69	69	69	69	69
70	70	70	70	70	70
71	71	71	71	71	71
72	72	72	72	72	72
73	73	73	73	73	73
74	74	74	74	74	74
75	75	75	75	75	75
76	76	76	76	76	76
77	77	77	77	77	77
78	78	78	78	78	78
79	79	79	79	79	79
80	80	80	80	80	80
81	81	81	81	81	81
82	82	82	82	82	82
83	83	83	83	83	83
84	84	84	84	84	84
85	85	85	85	85	85
86	86	86	86	86	86
87	87	87	87	87	87
88	88	88	88	88	88
89	89	89	89	89	89
90	90	90	90	90	90
91	91	91	91	91	91
92	92	92	92	92	92
93	93	93	93	93	93
94	94	94	94	94	94
95	95	95	95	95	95
96	96	96	96	96	96
97	97	97	97	97	97
98	98	98	98	98	98
99	99	99	99	99	99
100	100	100	100	100	100

[0058]

[0059] 숙련된 연구자라면 본 발명의 범주 이내인 펩티드 변이체의 고안을 위하여 표 3a 및 3b의 데이터를 사용할 수 있다. 변이체는 하나 이상의 CDR 영역 내에서 아미노산을 변화시킴으로써 제작하는 것이 바람직하며, 변이체는 또한 하나 이상의 변경된 골격 영역을 가질 수 있다. 신규한 항체를 서로와 비교한 것을 참고로 하면, 변화될 수 있는 후보 잔기는 예를 들어 LAC 3080 및 3077의 가변성 경쇄의 잔기 4 또는 37과, 예를 들어 가변성 중쇄의 잔기 13 또는 43을 포함하는데, 그 이유는 이들이 서로와 비교하여 가변 위치이기 때문이다. 변경은 골격 영역에서 또한 행해질 수 있다. 예를 들어, 펩티드 FR 도메인이 변경될 수 있는데, 여기서, 생식 세포의 서열과 비교하여 잔기 내에 편차가 존재한다.

[0060] 신규한 항체를 상응하는 콘센서스 또는 "마스터 유전자" 서열과 비교한 것을 참고로 하면, 변화될 수 있는 후보 잔기는 VLλ3와 비교하여 예를 들어 LAC 3080의 가변성 경쇄의 잔기 27, 50 또는 90과, VH3와 비교하여 예를 들어 LAC 3080의 가변성 중쇄의 잔기 33, 52 및 97을 포함한다. 대안적으로는, 숙련된 연구자라면 예를 들어 문헌[Knappik et al., 2000] 및 Knappik 등에게 허여된 미국 특허 제6,300,064호에 기술되어 있는 절차를 사용하

여 본원에 개시되어 있는 아미노산 서열을 동일한 그러한 항체류의 공지된 서열과 비교함으로써 동일한 분석을 행할 수 있다.

[0061] 또한, 변이체는 LAC 내의 하나 이상의 아미노산, 바람직하게는 하나 이상의 CDR 내의 아미노산 잔기를 다양화함으로써 최적화에 있어서의 출발 지점으로서 하나의 LAC를 사용하는 단계, 및 생성된 항체 변이체 컬렉션(collection)을 개선된 특성을 갖는 변이체에 대하여 스크리닝하는 단계에 의해 수득할 수 있다. 특히 바람직한 것은 VL의 CDR-3, VH의 CDR-3, VL의 CDR-1 및/또는 VH의 CDR-2 내의 하나 이상의 아미노산 잔기의 다양화이다. 다양화는 트리뉴클레오타이드 돌연변이 유발(trinucleotide mutagenesis, TRIM) 기술을 사용하여 DNA 분자 컬렉션을 합성함으로써 행할 수 있다(Virnekas, B., Ge, L., Plukthun, A., Schneider, K.C., Wellnhofer, G., and Moroney S. E. (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucl. Acids Res. 22,5600.).

#### [0062] 보존성 아미노산 변이체

[0063] 본원에 기술된 항체 펩티드 서열의 전체 분자 구조가 보존된 폴리펩티드 변이체가 만들어질 수 있다. 개개의 아미노산의 특성이 주어진다면, 숙련된 연구자에 의해 몇몇 합리적인 치환이 인지될 것이다. 아미노산 치환, 즉, "보존성 치환"은 예를 들어 연루되는 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 친양쪽성 성질을 기초로 하여 행해질 수 있다.

[0064] 예를 들어 (a) 비극성(소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 포함하며; (b) 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함하며; (c) 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함하며; (d) 음으로 하전된(산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 치환은 전형적으로 (a)-(d) 군 내에서 행해질 수 있다. 또한, 글리신 및 프롤린은  $\alpha$ -나선을 붕괴시키는 능력에 기초하여 서로를 치환할 수 있다. 이와 유사하게, 알라닌, 시스테인, 류신, 메티오닌, 글루탐산, 글루타민, 히스티딘 및 리신과 같은 소정 아미노산은  $\alpha$ -나선에서 보다 일반적으로 발견되는 반면, 발린, 이소류신, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판 및 트레오닌은  $\beta$ -폴리펩티드(pleated) 시트에서 보다 일반적으로 발견된다. 글리신, 세린, 아스파르트산, 아스파라긴 및 프롤린은 턴(turn)에서 일반적으로 발견된다. 몇몇 바람직한 치환은 하기 군들 사이에서 행해질 수 있다: (i) S 및 T; (ii) P 및 G와; (iii) A, V, L 및 I. 공지된 유전자 암호화, 재조합 및 합성 DNA 기술이 주어진다면, 숙련된 과학자라면 보존성 아미노산 변이체를 코딩하는 DNA를 손쉽게 제작할 수 있다. 하나의 특정 예에 있어서, 서열 번호 5, 6, 7, 및/또는 8의 서열의 아미노산 위치 3은 Q에서 E로 변화될 수 있다.

[0065] 본원에 사용되는 바와 같이, 2개의 폴리펩티드 서열들 사이의 "서열 동일성"은 이 서열들 사이에서 동일한 아미노산의 백분율을 나타낸다. "서열 유사성"은 동일하거나 보존성 아미노산 치환을 나타내는 아미노산의 백분율을 나타낸다. 본 발명의 바람직한 폴리펩티드 서열은 CDR 영역에서 서열 동일성이 적어도 60%, 더 바람직하게는 적어도 70% 또는 80%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%이다. 또한 바람직한 항체는 CDR 영역에서 서열 유사성이 적어도 80%, 더 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95%이다.

#### [0066] 본 발명의 DNA 분자

[0067] 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA 분자에 관한 것이다. 이 서열은 도 1a 및 2a에 나타내어져 있는 DNA 분자를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다.

[0068] 본 발명의 DNA 분자는 본원에 개시되어 있는 서열로 한정되지 않을 뿐만 아니라, 그의 변이체도 포함한다. 본 발명 이내의 DNA 변이체는 혼성화에 있어서의 그의 물성을 참고로 하여 기술될 수 있다. 숙련된 연구자라면, DNA가 이중 가닥, 그의 등가체 또는 동족체이기 때문에 핵산 혼성화 기술을 사용하여 DNA를 사용하여 그의 상보체를 확인할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 또한, 혼성화는 100% 미만의 상보성에서 일어날 수 있다는 것을 인지할 것이다. 그러나, 조건을 적절하게 선택한다면, 혼성화 기술을 사용하여 특정 프로브에 대한 구조적 관련성을 기초로 하여 DNA 서열들을 구별할 수 있다. 그러한 조건에 관한 지침에 대해서는, 문헌[Sambrook et al., 1989 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA)] 및 문헌[Ausubel et al., 1995 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. eds. (1995). Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley and Sons)]을 참조한다.

[0069] 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열 사이의 구조적 유사성은 이 2개의 서열이 서로와 혼성화하는 조건의 "엄격도"의 함수로 표현될 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "엄격도"라는 용어는 조건이 혼성화에 호의를 보이지 않



는 정도를 말한다. 엄격한 조건은 혼성화에 강하게 호의를 보이지 않으며, 구조적으로 가장 연관된 분자만이 그러한 조건 하에서 서로에게 혼성화할 것이다. 반대로, 엄격하지 않은 조건은 보다 덜한 정도의 구조적 연관성을 나타내는 분자의 혼성화에 호의를 보인다. 따라서, 혼성화 엄격도는 2개의 핵산 서열의 구조적 유연 관계와 직접 상관 관계가 있다. 하기 관계식이 혼성화와 연관성의 상관 관계 입증에 있어서 유용하다 (여기서,  $T_m$ 은 핵산 이중 가닥의 융점임):

[0070] a.  $T_m = 69.3 + 0.41(G+C)\%$

[0071] b. 잘못 매치되는 염기쌍의 갯수가 매 1% 증가되면 이중 가닥 DNA의  $T_m$ 은 1°C 감소

[0072] c.  $(T_m)_{\mu 2} - (T_m)_{\mu 1} = 18.5 \log_{10} \mu 2 / \mu 1$  (여기서,  $\mu 1$  및  $\mu 2$ 는 두 용액의 이온 강도임).

[0073] 혼성화 엄격도는 전체 DNA 농도, 이온 강도, 온도, 프로브 크기 및 수소 결합을 붕괴시키는 제제의 존재를 포함하는 다수의 인자의 함수이다. 혼성화를 촉진하는 인자는 높은 DNA 농도, 높은 이온 강도, 낮은 온도, 보다 긴 프로브 크기 및 수소 결합을 붕괴시키는 제제의 부재를 포함한다. 혼성화는 전형적으로 하기의 2가지 단계로 수행된다: "결합" 단계 및 "세척" 단계.

[0074] 첫째, 결합 단계에 있어서, 프로브는 혼성화에 호의를 보이는 조건 하에서 표적에 결합된다. 엄격도는 일반적으로 온도의 변경에 의해 이 단계에서 제어된다. 높은 엄격도에 있어서, 짧은 (<20 nt) 올리고뉴클레오타이드 프로브가 사용되지 않는 한, 온도는 일반적으로 65°C 내지 70°C 사이이다. 대표적인 혼성화 용액은 6X SSC, 0.5% SDS, 5X 덴하르트 용액 (Denhardt's solution) 및 100  $\mu$ g의 비특이성 캐리어 DNA를 함유한다. 문헌[Ausubel et al., section 2.9, supplement 27 (1994)]을 참조한다. 물론, 다수의 상이하지만 기능적으로 등가인 완충제 조건이 공지되어 있다. 연관성 정도가 보다 낮은 경우, 보다 낮은 온도가 선택될 수 있다. 낮은 엄격도의 결합 온도는 약 25°C 내지 40°C 사이이다. 중간 정도의 엄격도는 적어도 약 40°C 내지 약 65°C 미만 사이이다. 높은 엄격도는 적어도 약 65°C이다.

[0075] 둘째, 여분의 프로브는 세척으로 제거한다. 이 단계에서 보다 엄격한 조건이 일반적으로 적용된다. 그러므로, 혼성화를 통한 연관성의 결정에서 가장 중요한 것은 이 "세척" 단계이다. 세척 용액은 전형적으로 보다 낮은 염 농도를 포함한다. 중간 정도의 엄격도의 용액의 일례는 2X SSC 및 0.1% SDS를 포함한다. 높은 엄격도의 세척 용액은 (이온 강도에 있어서) 약 0.2X SSC 미만의 등가물을 함유하는데, 바람직한 엄격한 용액은 약 0.1X SSC를 함유한다. 다양한 엄격도와 관련되는 온도는 "결합"에 대하여 상기에 논의되어 있는 것과 동일하다. 또한 세척 용액은 전형적으로 세척 동안 다수회 대체된다. 예를 들어, 전형적인 높은 엄격도의 세척 조건은 55°C에서 30분 동안 2회, 그리고 60°C에서 15분 동안 3회의 세척을 포함한다.

[0076] 따라서, 본 발명은 높은 엄격도의 결합 및 세척 조건 하에서 도 1a 및 2a에 나타내어져 있는 분자에 혼성화하는 핵산 분자를 포함하며, 여기서, 그러한 핵산 분자는 본원에 기술되어 있는 특성을 갖는 항체 또는 그의 기능성 단편을 코딩한다. 바람직한 분자 (mRNA 건지에서)는 본원에 기술되어 있는 DNA 분자들 중 하나와의 상동성 또는 서열 동일성이 적어도 75% 또는 80% (바람직하게는 적어도 85%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%)인 것이다. 본 발명의 변이체의 특정 일례에 있어서, 서열 번호 1, 2, 3 및/또는 4의 서열 중의 핵산 위치 7은 C에서 G로 치환될 수 있으며, 그럼으로써 코돈은 CAA에서 GAA로 변화된다.

#### [0077] 기능적 등가 변이체

[0078] 본 발명의 범주 이내의 또다른 DNA 변이체류가 그들이 코딩하는 생성물을 참고로 하여 기술될 수 있다 (도 1b 및 2b에 열거되어 있는 펩티드를 참조). 이러한 기능적 등가 유전자는 유전자 암호의 축퇴성으로 인하여 도 1b 및 2b에서 발견되는 동일한 펩티드 서열을 코딩한다는 사실을 그 특징으로 한다. 서열 번호 1 및 31의 서열은, 그의 핵산 서열이 상이하지만 동일한 폴리펩티드, 즉, 서열 번호 5의 서열을 코딩하기 때문에, 기능적 등가 변이체의 일례이다.

[0079] 본원에 제공되어 있는 DNA 분자의 변이체는 여러 상이한 방식으로 제작될 수 있음이 인지된다. 예를 들어 이들은 완전 합성 DNA로서 제작될 수 있다. 20 내지 약 150개의 뉴클레오타이드 범위의 올리고뉴클레오타이드를 효율적으로 합성하는 방법이 널리 이용가능하다. 문헌[Ausubel et al., section 2.11, Supplement 21 (1993)]을 참조한다. 중복 올리고뉴클레오타이드는 문헌[Khorana et al., J. Mol. Biol. 72: 209-217 (1971)]에 처음으로 보고되어 있는 양식으로 합성 및 어셈블링될 수 있는데, 문헌[Ausubel et al., supra, Section 8.2]을 또한 참조한다. 적절한 벡터 내로의 클로닝을 용이하게 하기 위하여 유전자의 5' 및 3' 말단에서 엔지니어링된 편리한

제한 효소 부위를 갖는 합성 DNA를 고안하는 것이 바람직하다.

[0080] 나타낸 바와 같이, 변이체를 생성하는 방법은 본원에 개시되어 있는 DNA들 중 하나를 이용하여 출발하고 이어서 특정 부위 돌연변이 유발 (site-directed mutagenesis)을 수행하는 것이다. 문헌[Ausubel et al., supra, chapter 8, Supplement 37 (1997)]을 참조한다. 전형적인 방법에 있어서, 표적 DNA는 단일 가닥 DNA 박테리오파지 비히클 내로 클로닝된다. 단일 가닥 DNA를 단리하고 원하는 뉴클레오티드 변경(들)을 포함하는 올리고뉴클레오티드와 혼성화시킨다. 상보성 가닥을 합성하고 이중 가닥 파지를 숙주 내로 도입한다. 생성된 자손 중 몇몇은 원하는 돌연변이체를 포함하는데, 이는 DNA 서열 결정법을 사용하여 확인할 수 있다. 또한, 자손 파지가 원하는 돌연변이체일 확률을 증가시키는 다양한 방법이 이용가능하다. 이러한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 그러한 돌연변이체의 생성을 위한 키트가 구매가능하다.

#### [0081] 재조합 DNA 제작물 및 발현

[0082] 본 발명은 본 발명의 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상의 서열을 포함하는 재조합 DNA 제작물을 또한 제공한다. 본 발명의 재조합 제작물은 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA 분자가 삽입된 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 벡터와 관련되어 사용된다.

[0083] 코딩된 유전자는 문헌[Sambrook et al., 1989] 및 문헌[Ausubel et al., 1989]에 기술되어 있는 기술로 제조될 수 있다. 대안적으로는, DNA 서열은 예를 들어 합성기를 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어 문헌[OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (1984, Gait, ed., IRL Press, Oxford)]에 기술되어 있는 기술을 참조하는데, 상기 문헌은 본원에 그의 전체 내용이 참고로 포함된다. 본 발명의 재조합 제작물은 RNA 및/또는 코딩 DNA (들)의 단백질 생성물을 발현할 수 있는 발현 벡터를 함께 포함한다. 벡터는 개방 판독 프레임 (open reading frame, ORF)에 작동가능하게 결합된 프로모터를 포함하는 조절 서열을 또한 포함할 수 있다. 벡터는 선발가능한 마커 서열을 추가로 포함할 수 있다. 특정 개시 및 박테리아 분비 신호도 삽입된 표적 유전자 코딩 서열의 효율적인 번역에 필요할 수 있다.

[0084] 또한 본 발명은 본 발명의 DNA 중 하나 이상의 DNA를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 본 숙주 세포는 사실상 발현 벡터가 이용될 수 있는 임의의 세포일 수 있다. 예를 들어 숙주 세포는 고등 진핵 숙주 세포, 예를 들어 포유류 세포, 하등 진핵 숙주 세포, 예를 들어 효모 세포일 수 있지만, 바람직하게는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 세포이다. 재조합 제작물의 숙주 세포 내로의 도입은 인산칼슘 트랜스펙션, DEAE, 텍스트란 매개 트랜스펙션, 전기천공 또는 파지 감염에 의해 행해질 수 있다.

#### [0085] 박테리아 발현

[0086] 박테리아용으로 유용한 발현 벡터는 기능성 프로모터에서 작동가능한 판독 상태로 원하는 단백질을 코딩하는 구조 DNA 서열을 적합한 번역 개시 및 종결 신호와 함께 삽입함으로써 제작된다. 벡터는 하나 이상의 선발가능한 표현형 마커와 복제 원점을 포함하여 벡터의 유지를 보장하고, 바람직할 경우 숙주 내에서의 증식을 제공한다. 형질전환에 적합한 원핵 숙주는 이. 콜라이 (E. coli), 바실루스 서틸리스 (Bacillus subtilis), 살모넬라 티피무리움 (Salmonella typhimurium) 및 슈도모나스 (Pseudomonas), 스트렙토마이세스 (Streptomyces), 및 스타필로코커스 (Staphylococcus) 속에 속하는 다양한 종을 포함한다.

[0087] 박테리아 벡터는 예를 들어 박테리오파지-, 플라스미드- 또는 파지미드-기반의 벡터일 수 있다. 이러한 벡터는 전형적으로 잘 알려진 클로닝 벡터 pBR322 (ATCC 37017)의 요소를 포함하는 구매가능한 플라스미드로부터 유래되는 박테리아 복제 원점 및 선발가능한 마커를 포함할 수 있다. 적합한 숙주 주의 형질전환 및 숙주 주의 적절한 세포 밀도로의 배양 후, 선택된 프로모터를 적절한 수단 (예를 들어 온도 변경 또는 화학적 유도)으로 활성화/유도하고, 세포를 추가의 기간 동안 배양한다. 세포는 전형적으로 원심분리로 수확하고, 물리적 또는 화학적 수단으로 붕괴시키고, 생성된 조 추출물을 추가의 정제를 위하여 보유한다.

[0088] 박테리아 시스템에 있어서, 다수의 발현 벡터는 발현되는 단백질의 사용 의도에 따라 선택하는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어, 다량의 그러한 단백질을 항체의 생성을 위하여 또는 펩티드 라이브러리의 스크리닝을 위하여 생성하려고 할 때, 예를 들어 손쉽게 정제되는 고수준의 융합 단백질 생성물의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다.

#### [0089] 치료 방법

[0090] 치료 방법은 본 발명에 의해 고려되는 치료적 유효량의 항체를 치료가 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 "치료적 유효"량은 단독으로, 또는 다른 약제와 조합되어, 단일 용량으로서 또는 다수의 용량 섭

생법에 따라, 대상의 처리된 지역에서 CD38-양성 세포를 고갈시키기에 충분한 양의 항체의 양으로서 정의되는데, 이는 불리한 상태를 경감시키며, 이 양은 독물학적으로 견딜 수 있다. 대상은 인간 또는 인간의 동물 (예를 들어 토끼, 래트, 마우스, 원숭이 또는 기타 하등 목의 영장류)일 수 있다.

[0091] 본 발명의 항체는 공지된 의약과 공동 투여되거나 몇몇 경우 본 항체는 그 자체 변형될 수 있다. 예를 들어, 항체는 면역독소 또는 방사성 동위 원소에 콘주게이션되어 효능을 잠재적으로 추가로 증가시킬 수 있다.

[0092] 본 발명의 항체는 다양한 상황에서 치료 또는 진단 도구로 사용될 수 있는데, 여기서, CD38이 바람직하지 못하게 발현되거나 발견된다. 본 발명의 항체로 치료하기에 특히 적합한 장애 및 병으로는 다발성 골수종 (MM) 및 기타 혈액 질환, 예를 들어 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocytic leukemia, CLL), 만성 골수성 백혈병 (chronic myelogenous leukemia, CML), 급성 골수성 백혈병 (acute myelogenous leukemia, AML), 및 급성 림프구성 백혈병 (ALL)이 있다. 본 발명의 항체는 염증성 질환, 예를 들어 류머티스 관절염 (rheumatoid arthritis, RA) 또는 전신성 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus, SLE)의 치료에 또한 사용될 수 있다.

[0093] 임의의 전술한 장애의 치료를 위하여, 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학 조성물을 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 사용하여 통상적인 방식으로 제형화할 수 있다. 본 발명의 항체는 임의의 적합한 방법으로 투여될 수 있으며, 상기 방법은 치료되는 장애의 유형에 따라 달라질 수 있다. 가능한 투여 경로는 비경구 투여 (예를 들어 근육내 투여, 정맥내 투여, 동맥내 투여, 복강내 투여 또는 피하 투여), 폐내 투여 및 비강내 투여와, 국소 면역 억제 치료에 요망될 경우, 병변내 투여를 포함한다. 또한, 본 발명의 항체는 예를 들어 저하되는 용량의 항체를 이용한 펄스 주입으로 투여할 수 있다. 바람직하게는, 투약은 부분적으로 투여가 단 시간인지 장기간에 걸친 것인지에 따라 주사에 의해, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 주어진다. 투여될 양은 예를 들어 임상 증상, 개체의 체중, 다른 약물이 투여되는지와 같은 다양한 인자에 따라 달라진다. 당업계의 숙련자라면 투여 경로가 치료할 장애 또는 병에 따라 달라진다는 것을 인지할 것이다.

[0094] 본 발명에 따르면 신규 폴리펩티드의 치료적 유효량을 결정하는 것은 특정의 환자의 특징, 투여 경로, 및 치료되는 장애의 성질에 크게 의존적이다. 일반적인 지침은 예를 들어 the International Conference on Harmonisation의 간행물 및 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, chapters 27 and 28, pp. 484-528 (18th ed., Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990)]에서 발견할 수 있다. 더 구체적으로는, 치료적 유효량의 결정은 의약의 독성 및 효능과 같은 인자에 의존적이다. 독성은 당업계에 잘 알려져 있으며 전술한 참고 문헌에서 발견되는 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 효능은 동일한 지침을 하기의 실시예에 기술되어 있는 방법과 함께 이용하여 측정할 수 있다.

## [0095] 진단 방법

[0096] CD38은 몇몇 악성 종양에서 혈액 세포 상에서 고도로 발현되며, 따라서, 본 발명의 항-CD38 항체는 환자에 있어서 악성 세포의 가능한 추적 부위를 영상화하거나 가시화하기 위하여 이용될 수 있다. 이와 관련하여, 항체는 방사성 동위원소, 친화성 표지 (예를 들어 비오틴, 아비딘 등), 형광 표지, 상자성 원자 등의 사용을 통하여 검출가능하게 표지될 수 있다. 그러한 표지화의 달성 절차는 당업계에 잘 알려져 있다. 진단 영상화에 있어서의 항체의 임상 용도가 문헌[Grossman, H. B., Urol. Clin. North Amer. 13: 465-474 (1986)], Unger, E. C. et al., Invest. Radiol. 20: 693-700 (1985)], 및 문헌[Khaw, B. A. et al., Science 209: 295-297 (1980)]에 개관되어 있다.

[0097] 예를 들어, 검출가능하게 표지된 그러한 항체의 중심지 (focus)의 검출은 종양 발생 부위를 나타내는 것일 수 있다. 일 실시 형태에 있어서, 이러한 조사는 조직 또는 혈액 샘플을 옮기는 단계 및 그러한 샘플을 검출가능하게 표지된 항체의 존재 하에 인큐베이션하는 단계로 행해진다. 바람직한 실시 형태에 있어서, 이 기술은 자기 영상화, 형광도법 (fluorography) 등의 사용을 통하여 비-침습 방식으로 행해진다. 그러한 진단 시험은 질환 치료의 성공의 모니터링에 이용될 수 있으며, 여기서, CD38-양성 세포의 존재 또는 부재가 관련 지표이다. 세포의 세팅에서 진단에 대하여 본원에 기술되어 있는 바와 같이, 본 발명은 항-CD38 항체의 사용도 고려한다.

## [0098] 치료 및 진단용 조성물

[0099] 본 발명의 항체는 공지된 방법에 따라 제형화하여 약학적으로 유용한 조성물을 제조할 수 있는데, 여기서, 본 발명의 항체 (임의의 그의 기능성 단편을 포함함)는 약학적으로 허용가능한 담체 비히클과의 혼합물 형태로 조합된다. 적합한 비히클 및 그의 제형화는 예를 들어 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18th ed., Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990)]에 기술되어 있다. 효과적인 투여에 적합한 약학적으로 허용가능한 조성물의 형성을 위하여, 그러한 조성물은 유효량의 하나 이상의 본 발명의 항체를 적당량

의 담체 비히클과 함께 함유한다.

[0100] 제제는 적합하게는 활성 화합물의 방출이 제어되도록 제형화될 수 있다. 방출 제어형 제제는 항-CD38 항체의 복합체화 또는 흡수를 위하여 중합체의 사용을 통하여 성취될 수 있다. 전달 제어는 적절한 거대 분자 (예를 들어, 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리비닐, 피롤리돈, 에틸렌비닐-아세테이트, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 또는 프로타민, 술페이트) 및 거대 분자의 농도와, 방출 조절을 위한 혼입 방법을 선택함으로써 수행될 수 있다. 방출 제어형 제제에 의한 작용 지속 기간을 제어하기 위한 다른 가능한 방법은 중합체 물질, 예를 들어 폴리에스테르, 폴리아미노산, 히드로겔, 폴리(락트산) 또는 에틸렌 비닐아세테이트 공중합체의 입자 내로 항-CD38 항체를 혼입하는 것이다. 대안적으로는, 이러한 약제를 중합체성 입자 내로 혼입하는 대신, 예를 들어 코아세르베이션 (coacervation) 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 미세캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-미세캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 미세캡슐 내에, 또는 콜로이드성 약물 전달 시스템, 예를 들어 리포솜, 알부민 미소구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐 내에 또는 마크로에멀전 내에 상기 물질을 트랩핑 (entrap)하는 것이 가능하다. 그러한 기술은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)]에 개시되어 있다.

[0101] 화합물은 주사, 예를 들어 볼루스 (bolus) 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 방부제가 첨가된, 단위 투여 형태, 예를 들어 앰풀의 형태, 또는 다중 용량 용기의 형태로 제공될 수 있다. 본 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있으며, 제형화제, 예를 들어 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 대안적으로는, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어 무발열원 살균수를 이용한 구성을 위한 분말 형태로 존재할 수 있다.

[0102] 본 조성물은 원할 경우 팩 또는 디스펜서(dispenser) 장치로 제공될 수 있는데, 이는 활성 성분을 포함하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 포함할 수 있다. 블리스터 팩과 같이, 팩은 예를 들어 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치는 투여에 대한 설명서가 동반될 수 있다.

[0103] 또한 본 발명은 하기 실시예를 참고로 하여 알 수 있는데, 실시예는 예시하기 위한 것이며 따라서 본 발명을 한정하려는 것이 아니다.

[0104] [실시예]

[0105] **세포주**

[0106] 하기 세포주는 ECACC (유럽 세포 배양 센터), DSMZ (독일 미생물 보존 센터) 또는 ATCC (미국 세포 배양 센터)로부터 획득하였다: CD38 마우스 IgG1 단일클론 항체 OKT10 (ECACC, #87021903)을 생산하는 하이브리도마 세포주, Jurkat 세포 (DSMZ, ACC282), LP-1 (DSMZ, ACC41), RPMI8226 (ATCC, CCL-155), HEK293 (ATCC, CRL-1573), CHO-K1 (ATCC, CRL-61) 및 Raji (ATCC, CCL-86)

[0107] **세포 및 배양 조건**

[0108] 모든 세포는 표준 조건 하에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 가습 인큐베이터에서 배양하였다. 세포주 LP-1, RPMI8226, Jurkat 및 Raji는 10 % FCS (PAN biotech GmbH, #P30-3302), 50 U/ml의 페니실린, 50 µg/ml의 스트렙토마이신 (Gibco, #15140-122) 및 2 mM 글루타민 (Gibco, #25030-024)이 보충된 RPMI1640 (Pan biotech GmbH, #P04-16500)에서 배양하고, Jurkat- 및 Raji-세포의 경우, 추가로 10 mM Hepes (Pan biotech GmbH, #P05-01100) 및 1 mM의 피루브산나트륨 (Pan biotech GmbH, # P04-43100)을 첨가하여야 하였다.

[0109] CHO-K1 및 HEK293은 2 mM 글루타민 및 10% FCS가 보충된 DMEM (Gibco, #10938-025)에서 배양하였다. 안정한 CD38 CHO-K1 트랜스펙션체는 G418 (PAA GmbH, P11-012)의 존재 하에 유지하였으며, 반면, HEK293의 경우에는 1mM 피루브산나트륨의 첨가가 필수적이었다. HEK293의 일시적 트랜스펙션 후, 10% FCS를 초저함량 IgG FCS (Invitrogen, #16250-078)로 대체하였다. 세포주 OKT10은 2 mM 글루타민 및 20 % FCS가 보충된 IDMEM (Gibco, #31980-022)에서 배양하였다.

[0110] **말초 혈액으로부터의 단일 세포 현탁물의 제조**

[0111] 모든 혈액 샘플은 고지에 입각한 동의를 얻은 후에 채취하였다. 말초 혈액 단핵 세포 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 제조업자의 지시에 따라 건강한 공여체로부터 Histopaque(등록상표)-1077 (Sigma)로 분리하였다. 적혈구 세포는 실온에서 5분 동안 ACK 용해 완충제 (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 M EDTA) 중에서의 인큐베이션에 의해 상기 세포 현탁물로부터 고갈시키거나 시판 유도제 (Bioscience, #00-4333)였다.



세포는 PBS로 2회 세척하고 이어서 유세포 분류 또는 ADCC를 위하여 추가로 가공하였다 (하기 참조).

[0112] **유세포 분류 ("FACS")**

[0113] 모든 염색은 웰 당  $2 \times 10^5$  개의 세포를 포함하는 둥근 바닥 96웰 배양용 플레이트 (Nalge Nunc)에서 수행하였다. 세포를 4℃에서 40분 동안 50  $\mu$ l의 FACS 완충제 (PBS, 3% FCS, 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) 중의 지시된 농도의 Fab 또는 IgG 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 2회 세척하고, FACS 완충제 중에 1:200으로 희석시킨 R-피코에리트린 (PE) 콘주게이션된 염소-항-인간 또는 염소-항-마우스 IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub> (Jackson Immune Research)와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 다시 세척하고, 0.3 ml FACS 완충제에 재현탁시키고 이어서 FACSCalibur (Becton Dickinson, 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)에서 유세포 분류로 분석하였다.

[0114] FACS 기반의 Scatchard 분석에 있어서, RPMI8226 세포를 12.5  $\mu$ g/ml (IgG)의 최종 농도로 출발하여 12가지의 상이한 희석물 (1:2<sup>n</sup>)을 이용하여 염색하였다. 적어도 2개의 독립적인 측정치를 각각의 농도에 대하여 사용하고 K<sub>D</sub> 값은 문헌[Chamow et al. (1994)]에 따라 중앙 형광 강도로부터 외삽하였다.

[0115] **표면 플라스몬 공명**

[0116] 동력학적 상수 k<sub>on</sub> 및 k<sub>off</sub>는 Biacore 3000 기계 (Biacore, 스웨덴 우살라 소재)를 사용하여 공유 결합에 의해 고정화된 CD38-Fc 융합 단백질에 대한 연속 희석물의 개개의 Fab 결합력을 이용하여 측정하였다. 공유 결합 항원 고정화에 있어서 표준 EDC-NHS 아민 커플링의 화학적 특성을 사용하였다. CD38 Fc-융합 단백질의 직접적 커플링에 있어서, CM5 센서 칩 (Biacore)을 pH 4.5의 10 mM 아세트이트 완충제 중의 ~600-700 RU로 코팅하였다. 참고 유동 세포에 있어서, 개개의 양의 HSA (인간 혈청 알부민)를 사용하였다. 동력학적 측정은 1.5-500 nM 범위의 농도의 Fab를 사용하여 20  $\mu$ l/분의 유속으로 PBS (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4)에서 행하였다. 각각의 농도에 있어서의 주사 시간은 1분이었으며 이어서 2분간의 해리 시기가 있었다. 재생에 있어서는 5  $\mu$ l의 10 mM HCl을 사용하였다. 모든 센소그램은 BIA 평가 소프트웨어 3.1 (Biacore)을 사용하여 국지적으로 조정하였다.

[0117] **실시예 1: HuCAL 라이브러리로부터의 항체의 생성**

[0118] CD38에 대한 치료용 항체의 생성에 있어서, MorphoSys HuCAL GOLD 파지 디스플레이 라이브러리를 이용한 선발을 실시하였다. HuCAL GOLD(등록상표)는 HuCAL(등록상표) 개념을 기반으로 하는 Fab 라이브러리이며 (Knappik et al., 2000; Krebs et al., 2001), 여기서, 모든 6개의 CDR은 다양화되고 상기에서는 파지 표면에 Fab 단편을 결합시키는 데 있어서 CysDisplay(상표명) 기술이 이용된다(Loehning, 2001).

[0119] **A. 파지미드 구조 (rescue), 파지 증폭 및 정제**

[0120] HuCAL GOLD(등록상표) 파지미드 라이브러리는 34  $\mu$ g/ml의 클로람페니콜 및 1 % 글루코스를 함유하는 2 x TY 배지 (2 x TY-CG)에서 증폭시켰다. 0.5의 OD600 (진탕 없이 37℃에서 30분; 250 rpm에서 진탕시키면서 37℃에서 30분)에서의 헬퍼 파지 감염 (VCSM13) 후, 세포를 스핀 다운시키고 (spun down) (4120 g; 5분; 4℃), 2 x TY / 34  $\mu$ g/ml의 클로람페니콜 / 50  $\mu$ g/ml의 카나마이신에 재현탁시키고 22℃에서 하룻밤 배양하였다. 파지를 상청액으로부터 PEG-침전시키고, PBS/20% 글리세롤에 재현탁시키고 -80℃에서 보관하였다. 두 패닝 라운드 (panning round) 사이의 파지 증폭은 하기와 같이 행하였다: 중앙-로그 기 (mid-log phase)의 TG1 세포를 용출시킨 파지로 감염시키고 1%의 글루코스 및 34  $\mu$ g/ml의 클로람페니콜이 보충된 LB-한천 (LB-CG) 상으로 도말하였다. 30℃에서 하룻밤 배양한 후, 콜로니를 긁어내고, 0.5의 OD600으로 조정하고 상기한 바와 같이 헬퍼 파지를 첨가하였다.

[0121] **B. HuCAL GOLD(등록상표)를 이용한 패닝**

[0122] 선발에 있어서, HuCAL GOLD(등록상표) 항체-파지를 상이한 VH 마스터 유전자에 상응하는 3개의 풀로 나누었다 (풀 1: VH1/5  $\lambda$  K, 풀 2: VH3  $\lambda$  K, 풀 3: VH2/4/6  $\lambda$  K). 상기 풀은 CD38-발현 CHO-K1 세포 상에서의 3라운드의 전세포 패닝, 이어서 pH-용출과, 무관한 항체-파지의 고갈을 위한 CD38-음성 CHO-K1-세포 상에서의 사후-흡착 단계에 개별적으로 처하였다. 마지막으로, 남아있는 항체 파지를 사용하여 이. 콜라이 TG1 세포를 감염시켰다. 원심분리 후, 박테리아 펠렛을 2 x TY 배지에 재현탁시키고, 한천 플레이트 상에 도말하고 30℃에서 하룻밤 배양하였다. 이어서 선발된 클론을 플레이트로부터 긁어내고, 파지를 구조하고 증폭시켰다. 두번째 및 세번째

라운드의 선발은 처음의 것처럼 수행하였다.

[0123] 선발된 HuCAL GOLD(등록상표) 파지의 Fab 코딩 인서트를 발현 벡터인 pMORPH(등록상표)x9\_Fab\_FS (Rauchenberger et al., 2003) 내로 서브클로닝하여 용해성 Fab의 신속한 발현을 용이하게 하였다. 선발된 클론의 DNA를 XbaI 및 EcoRI으로 절단하고 그림으로써 Fab 코딩 인서트를 절단하여 내고 (ompA-VLCL 및 phoA-Fd), 이를 XbaI / EcoRI 절단 벡터 pMORPH(등록상표)x9\_Fab\_FS 내로 클로닝하였다. 이 벡터에서 발현되는 Fab는 검출 및 정제를 위한 2개의 C-말단 태그 (FLAG(상표명) 및 Strep-tag(등록상표) II)를 지닌다.

## [0124] 실시예 2: 생물학적 분석

[0125] 항체 의존성 세포 독성 (ADCC) 및 보체-의존성 세포 독성을 하기와 같이 유세포 분류 분석에 기초한 공개된 프로토콜에 따라 측정하였다 (Naundorf et al., 2002):

### [0126] ADCC:

[0127] ADCC 측정에 있어서, 표적 세포 (T)를  $2.0 \times 10^5$ 개의 세포/ml로 조정하고 RPMI1640 배지 (Pan biotech GmbH) 중 100 ng/ml의 칼세인 (Calcein) AM (Molecular Probes, C-3099)으로 실온에서 2분 동안 표지하였다. 잔류 칼세인을 RPMI1640 배지에서의 3회의 세척 단계로 제거하였다. 이와 동시에, PBMC를 (자연 살해) 이펙터 세포 (E)의 공급원으로서 제조하고,  $1.0 \times 10^7$ 개로 조정하고 분석 조건에 따라 표지된 표적 세포와 혼합하여 최종 E:T의 비가 50:1 이하가 되게 하였다. 세포를 1회 세척하고 세포-믹스를 상이한 희석물의 개개의 항체를 함유하는 200  $\mu$ l의 RPMI1640 배지에 재현탁시켰다. 플레이트를 가습 인큐베이터에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 표준 조건 하에 4시간 동안 인큐베이션하였다. FACS 분석 이전에 세포를 프로피듐-요오다이드 (PI)로 표지하고 유세포 분류 (Becton-Dickinson)로 분석하였다. 50,000 내지 150,000 사이의 이벤트 (event)를 각각의 분석에 있어서 카운팅하였다.

[0128] 하기 등식으로 살해 활성 [% 단위]을 생성하였다:

$$\frac{ED^A}{EL^A + ED^A} \times 100$$

[0130] 여기서, ED<sup>A</sup>는 사세포(dead cell) 이벤트 (칼세인 + PI 염색 세포)이며,

[0131] EL<sup>A</sup>는 생세포(living cell) 이벤트 (칼세인 염색 세포)

### [0132] CDC:

[0133] CDC 측정에 있어서,  $5.0 \times 10^4$ 개의 CD38 CHO-K1 트랜스펙션체를 1:4의 희석의 인간 혈청 (Sigma, #S-1764) 및 개개의 항체와 함께 마이크로타이터 웰 플레이트 (Nunc)에 첨가하였다. 모든 시약 및 세포는 10% FCS가 보충된 RPMI1640 배지 (Pan biotech GmbH) 중에 희석시켰다. 반응-믹스를 가습 인큐베이터에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 표준 조건 하에 2시간 동안 인큐베이션하였다. 음성 대조로서 그 역할을 하는 것은 가열 불활성화 보체 또는 항체를 포함하지 않는 CD-38 트랜스펙션체였다. 세포를 PI로 표지하고 FACS로 분석하였다.

[0134] 총 5000 이벤트를 카운팅하고 상이한 항체 농도에서의 사세포의 갯수를 EC50 값의 결정에 사용하였다. 하기 등식으로 살해 활성 [% 단위]을 생성하였다:

$$\frac{ED^C}{EL^C + ED^C} \times 100$$

[0136] 여기서, ED<sup>C</sup>는 사세포 이벤트 (PI 염색 세포)이며,

[0137] EL<sup>C</sup>는 생세포 이벤트 (미염색)이다.

[0138] 각각의 항체에 있어서 3중체의 총 12가지의 상이한 항체 희석물 (1:2<sup>n</sup>)로부터의 세포 독성 값을 ADCC에 사용하고 2중체의 것을 CDC에 사용하여 표준 분석 소프트웨어 (PRISM(등록상표), Graph Pad Software)를 이용하여 EC50 값을 얻었다.

[0139] 실시예 3: 안정한 CD38-트랜스펙션체 및 CD38 Fc-융합 단백질의 생성

[0140] 패닝 및 스크리닝을 위한 CD38 단백질의 생성을 위하여 2가지의 상이한 발현 시스템을 확립하여야 하였다. 첫번째 전략은 CD38-Fc-융합 단백질의 생성을 포함하는데, 이 단백질은 HEK293 세포의 일시적 트랜스펙션 후 상청액으로부터 정제하였다. 두번째 전략은 전세포 패닝을 통한 항체-과지 선발에 사용할 높은 CD38 표면 발현을 위한 안정한 CHO-K1-세포주의 생성을 포함하였다.

[0141] 처음 단계로서, Jurkat 세포 (DSMZ ACC282)를 cDNA (Invitrogen)의 생성에 사용하고 이어서 각각 CD38의 첫번째 7개 및 마지막 9개의 코돈에 상보성인 프라이머 (프라이머 MTE001 및 MTE002rev; 표 4)를 사용하여 전체 CD38-코딩 서열을 증폭시켰다. CD38-인서트의 서열 분석에 의해 문헌[Nata et al. (1997)]에 기술되어 있는 바와 같이 티로신 대신 글루타민을 나타내는 49 위치를 제외하고는 문헌[Jackson et al. (1990)]에 의해 공개된 아미노산 서열을 확인하였다. 제한 엔도뉴클레아제 부위의 도입 및 발현 벡터 pcDNA3.1 (Stratagene)의 상이한 유도체 내로의 클로닝에 있어서, 정제 PCR-산물은 전체 유전자 (프라이머 MTE006 및 MTE007rev, 표 4) 또는 그의 일부 (프라이머 MTE004 및 MTE009rev, 표 4)의 재증폭용 주형으로 그 역할을 하였다. 후자의 경우, 세포의 도메인을 코딩하는 단편 (아미노산 45 내지 300)을 증폭시키고 인간 V카파 리더 서열 및 인간 Fc-감마 1 서열 사이에 프레임에 맞게 (in frame) 클로닝하였다. 이 벡터는 용해성 CD38-Fc 융합 단백질의 생성을 위한 발현 벡터로 그 역할을 하였다. 리더 서열을 포함하지 않는 다른 pcDNA3.1-유도체를 CD38의 전장 유전자의 삽입에 사용하였다. 이 경우, Fc-코딩 영역 앞의 종결 코돈 및 빠진 (missing) 리더 서열에 의해 CD38-표면 발현이 일어난다. HEK293 세포를 용해성 CD38 Fc-융합 단백질의 생성을 위하여 Fc-융합 단백질 벡터로 일시적으로 트랜스펙션시키고, 전장 유도체의 경우, CHO-K1-세포를 안정한 CD38-발현 세포주의 생성을 위하여 트랜스펙션시켰다.

표 4

프라이머 #	서열 ((5'→3'))
MTE001	ATG GCC AAC TGC GAG TTC AGC (서열 번호 25)
MTE002rev	TCA GAT CTC AGA TGT GCA AGA TGA ATC (서열 번호 26)
MTE004	TT GGT ACC AGG TGG CGC CAG CAG TG (서열 번호 27)
MTE006	TT GGT ACC ATG GCC AAC TGC GAG (서열 번호 28)
MTE007rev	CCG ATA TCA* GAT CTC AGA TGT GCA AGA TG (서열 번호 29)
MTE009rev	CCG ATA TC GAT CTC AGA TGT GCA AGA TG (서열 번호 30)
* 센스 배향에서 종결 코돈 (TGA)으로 됨.	

[0142]

[0143] 실시예 4: HuCAL(등록상표) IgG1의 클로닝, 발현 및 정제:

[0144] 전장 IgG의 발현을 위하여, 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL)의 가변 도메인 단편을 Fab 발현 벡터로부터 적절한 pMORPH (등록상표)\_hIg 벡터 내로 서브클로닝하였다 (도 8 내지 도 10 참조). 제한 엔도뉴클레아제 쌍 BspI/MfeI (인서트 제조) 및 BspI/EcoRI (벡터 제조)를 VH 도메인 단편의 pMORPH(등록상표)\_hIgG1 내로의 서브클로닝에 사용하였다. 효소 쌍 EcoRV/HpaI (람다 인서트) 및 EcoRV/BsiWI (카파 인서트)을 VL 도메인 단편의 개개의 pMORPH(등록상표)\_hIgκ\_1 또는 pMORPH(등록상표)\_hIgλ\_1 벡터 내로의 서브클로닝에 사용하였다. 생성된 IgG 제작물은 표준 인산칼슘-DNA 공동침전 기술을 사용하여 일시적 트랜스펙션으로 HEK293 세포 (ATCC CRL-1573)에서 발현시켰다. IgG를 단백질 A 세파로스 컬럼을 통하여 친화성 크로마토그래피로 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 추가의 하류의 프로세싱은 겔 여과에 의한 완충제 교환 및 정제된 IgG의 살균 여과를 포함한다. 품질 제어에 의하면 SDS-PAGE의 환원에 의해서는 >90%의 순도, 그리고 분석용 크기 배제 크로마토그래피에 의해 결정되는 바와 같이 >90%의 단량체성 IgG의 순도를 나타내었다. 이 물질의 내독소 함량은 동력학적 LAL 기반의 분석으로 측정하였다 (Cambrex European Endotoxin Testing Service, Belgium).

[0145] 실시예 5: 키메라 OKT10 (chOKT10; 서열 번호 23 및 24)의 생성 및 생산

[0146] chOKT10의 제작에 있어서 마우스 VH 및 VL 영역을 쥐와 OKT10 하이브리도마 세포주 (ECACC #87021903)로부터 제조한 cDNA를 사용하여 PCR로 증폭시켰다. 공개된 프라이머 세트를 사용하였다 (Dattamajumdar et al., 1996; Zhou et al., 1994). PCR 산물을 Topo-클로닝 (Invitrogen; pCRII-벡터)에 사용하고, 단일 콜로니를 서열 분석 (M13 역 프라이머)하였더니 이는 2개의 상이한 카파 경쇄 서열 및 하나의 중쇄 서열을 나타내었다. 서열 정렬 (EMBL-뉴클레오타이드 서열 데이터베이스) 및 문헌 (Kreber et al, 1997)에 따르면, 카파 서열 중 하나는 종양 세포 융합 상대 X63Ag8.653의 내인성 레퍼토리에 속하며 따라서 OKT10 항체에 속하지 않는다. 따라서,

단지 새로운 카파 서열 및 단일 VH-단편을 추가의 클로닝에 사용하였다. 두 단편 모두 제한 엔도뉴클레아제 부위의 부가를 위하여 재증폭시키고, 이어서 개개의 pMORPH(등록상표) IgG1-발현 벡터 내로 클로닝하였다. 중쇄(서열 번호 23) 및 경쇄(서열 번호 24)의 서열이 도 6에 주어져 있다. HEK293 세포를 일시적으로 트랜스펙션시키고 상청액을 FACS에서 CD38 과다 발현 Raji 세포주(ATCC)에의 키메라 OKT10 항체 결합에 대하여 분석하였다.

## 실시예 6: 에피토프 지도화

### 1. 재료 및 방법:

#### 항체:

하기의 항-CD38 IgG를 에피토프 지도화하였다:

MOR#	로트 #	형식	농도[mg/ml]/부피[ $\mu$ l]
MOR03077	2CHE106_030602	인간 IgG1	0.44/1500
MOR03079	2AP031	인간 IgG1	0.38/500
MOR03080	030116_4CUE16	인간 IgG1	2.28/200
MOR03100	030612_6SBA6	인간 IgG1	0.39/500
키메라 OKT10*	030603_2CHE111	인간 IgG1	0.83/500
* 인간 Fc 및 마우스 가변 영역으로 이루어진 키메라 OKT10			

#### CD38-서열:

SWISS-PROT 일차 등록 번호 P28907하의 공개된 서열로부터 취해지는 아미노산(aa) 서열(위치 44 - 300)은 인간 CD38을 기반으로 한다. 49 위치에서 aa Q (T 대신)를 펩티드 고안에 사용하였다.

#### PepSpot-분석:

항원 펩티드를 계단식 방식으로 셀룰로오스 막 상에서 합성하여 정의된 배열체를 생성하고(펩티드 어레이(array)) 이를 셀룰로오스 막에 공유 결합에 의해 결합시킨다. 결합 분석은 펩티드 어레이 상에서 직접 수행하였다.

일반적으로 항원 펩티드 어레이는 차단 완충제와 함께 수시간 동안 인큐베이션하여 항체의 비특이적 결합을 감소시킨다. 차단 완충제 중 일차(항원 펩티드 결합) 항체와 함께 인큐베이션한 후 퍼옥시다제(POD)-표지된 이차 항체와 함께 인큐베이션하는데, 상기 이차 항체는 일차 항체에 선택적으로 결합한다. 이차 항체와 함께 항원 펩티드 어레이를 인큐베이션한 직후 단시간의 T(트윈)-PBS-완충제 세척, 이어서 첫번째 화학 발광 실험을 행하여 어느 항원 펩티드가 일차 항체에 결합하는지에 대한 첫번째 개관을 얻는다. 여러 완충제 세척 단계가 이어져(T-TBS- 및 TBS-완충제) 위양성 결합(false positive binding)(셀룰로오스 막 그자체에 대한 비특이적 항체 결합)을 감소시킨다. 이러한 세척 단계 후, 최종 화학 발광 분석을 수행한다. 데이터는 각각의 펩티드에 대한 단일 측정치로서 신호 강도를 보여주는 영상 시스템(Boehringer light units, BLU)을 이용하여 분석하였다. 이차 항체(항-인간 IgG)의 비특이적 결합의 평가를 위하여, 제1 단계로서 일차 항체의 부재 하에 상기 항체를 펩티드 어레이와 함께 인큐베이션하였다. 일차 항체가 펩티드에의 결합을 나타내지 않을 경우, 이것을 POD로 직접 표지할 수 있는데, 이는 이 시스템의 감응도를 증가시킨다(MOR03077에 대하여 수행한 바와 같음). 이 경우, 자유 아미노기를 통한 통상적인 커플링에 대한 화학적 방법이 수행된다.

항원은 13-mer 펩티드(11개의 아미노산이 중복)로 스캐닝하였다. 이것에 의해 123개의 펩티드의 어레이를 생성하였다. 결합 분석은 이 어레이 상에서 직접 수행하였다. 펩티드-결합된 항체 MOR03077, MOR03079, MOR03080, MOR03100 및 키메라 OKT10을 퍼옥시다제-표지된 이차 항체(퍼옥시다제 콘주게이트-염소 항-인간 IgG, 감마 쇄 특이성의 친화성 단리 항체; Sigma-Aldrich, A6029)를 사용하여 검출하였다. 지도화는 화학 발광 기질을 영상 시스템과 조합하여 이용하여 수행하였다. 추가로, 이 시스템의 감응도의 증가를 위하여 MOR03077의 직접적 POD-표지를 수행하였다.

### 2. 요약 및 결론:



[0159] 모든 5종의 항체는 PepSpot 분석에서 상이한 프로필을 나타내었다. 개략적인 요약이 도 7에 주어져 있는데, 도 7에는 인식되는 CD38의 상이한 aa 서열이 예시되어 있다. MOR03079 및 키메라 OKT10의 에피토프는 명확하게 선형인 것으로 간주될 수 있다. MOR03079의 에피토프는 CD38의 aa 192 - 206 (VSRRFAEACDVVHV) 내인 것으로 가정되며, 반면, 키메라 OKT10의 경우 aa 284 내지 298 사이의 서열 (FLQCVKNPEDSSCTS)이 주로 인식된다. 후자의 결과는 어버이 쥐와 OKT10에 대한 공개된 데이터를 확인하는 것인데 (Hoshino et al., 1997), 상기 문헌에서는 그의 에피토프가 aa 280-298 사이인 것으로 가정한다. 그러나, 보다 정확한 에피토프 한정 및 주요 아미노산의 결정 (주요 항원-항체 상호 작용 부위)을 위해서는, 펩티드 VSRRFAEACDVVHV 및 FLQCVKNPEDSSCTS의 단축과 이 둘 모두의 알라닌-스캔을 피하여야 한다.

[0160] MOR03080 및 MOR03100의 에피토프는 불연속성인 것으로 명확하게 간주될 수 있는데, 이는 이 단백질 부위의 상이한 부위를 커버하는 여러 펩티드가 인식되었기 때문이다. 상기 펩티드는 MOR03080의 경우 aa 82-94 및 aa 158-170, 그리고 MOR03100의 경우 aa 82-94, 142-154, 158-170, 188-200 및 280-296을 포함한다. 그러나, 이들 모두의 에피토프들 사이의 몇몇 중복이 가정될 수 있는데, 이는 aa 위치 82-94 (CQSVWDAFKGAFI; 펩티드 #20) 및 158-170 (TWCGEFNTSKINY; 펩티드 #58) 내에 존재하는 두 상이한 부위가 둘 모두의 항체에 의해 인식되기 때문이다.

[0161] MOR03077의 에피토프는 후자의 둘과는 명확하게 다른 것으로 간주될 수 있으며 다중 절편화 불연속 에피토프인 것으로 기술될 수 있다. 이 에피토프는 aa 44-66, 110-122, 148-164, 186-200 및 202-224를 포함한다.

## [0162] 실시예 7: IL-6-방출/증식 분석

### [0163] 1. 재료 및 방법

[0164] 하기와 같이 변형시켜 문헌[Ausiello et al. (2000)]에 따라 증식- 및 IL-6 방출 분석을 수행하였다: 상이한 긴강한 공여체 (고지에 입각한 동의를 얻은 후) 유래의 PBMC는 공급자 (Sigma)의 지시에 따라 Histopaque 세포 분리 시스템을 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해 정제하고 10% FCS 및 글루타민이 보충된 RPMI1640 ("완전 RPMI1640")에서 표준 조건 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 하에 배양하였다. 둘 모두의 분석에 있어서 하기 항체를 사용하였다: HuCAL(등록상표) 항-CD38 IgG1인 Mab MOR03077, MOR03079, 및 MOR03080, 작동성 쥐와 IgG2a 단일 클론 항체 (IB4; Malavasi et al., 1984), 무관한 HuCAL(등록상표) IgG1 항체, 매치되는 이소타입 대조 (쥐와 IgG2a: 항-트리니트로페놀, 합텐-특이성 항체; 카탈로그 번호: 555571, 클론 G155-178; Becton Dickinson) 또는 배지 대조. IL-6 방출 분석에 있어서, 0.5 ml의 완전 RPMI1640 배지 중 1.0 E+06개의 PBMC를 20 µg/ml의 항체의 존재 하에 15 ml 배양용 튜브 (Falcon)에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양 상청액을 수확하고 제조업자의 프로토콜에 따라 Quantikine 키트 (R&D systems)를 사용하여 IL-6 방출에 대하여 분석하였다. 증식 분석에 있어서는, 2.0E+05개의 PBMC를 20 µg/ml의 항체의 존재 하에 96웰의 평평한 바닥의 플레이트 (Nunc)에서 3일 동안 배양하였다. 각각의 분석은 2중체로 실시하였다. 4일 후 BrdU를 각각의 웰에 첨가하고 세포를 추가로 24시간 동안 37°C에서 배양한 후 공급자 (Roche)의 프로토콜에 따라 세포를 고정하고 DNA를 변성시켰다. BrdU의 혼입량은 화학 발광-기반의 세팅에서 항-BrdU 퍼옥시다제-커플링된 항체를 통하여 측정하였다.

### [0165] 2. 요약 및 결론:

[0166] 증식 분석:

[0167] 사이클릭 ADP-리보스 시클라아제 및 히드롤라아제로서의 촉매 활성 외에도, CD38은 생물학적으로 관련된 신호를 변환시키는 능력을 나타낸다 (Hoshino et al., 1997; Ausiello et al., 2000). 상기 기능은 예를 들어 수용체-리간드 상호작용 또는 작동성 항-CD38 항체와의 가교 결합에 의해 유발되어, 예를 들어 칼슘 이동, 림프구 증식 및 사이토카인의 방출에 이른다. 그러나, 이러한 신호화는 항원성 에피토프에 의존적일 뿐만 아니라, 공여체마다 또한 다를 수도 있다 (Ausiello et al., 2000). 면역 치료법을 고려하면, 비작동성 항체가 작동성 항체에 비하여 바람직하다. 따라서, HuCAL(등록상표) 항-CD38 항체 (Mab MOR03077; MOR03079, MOR03080)를 증식 시험 및 IL-6- (중요한 MM 성장 인자) 방출 분석에서 참고 항체 chOKT10 및 작동성 항-CD38 단일클론 항체 IB4와 비교하여 추가로 특성화하였다.

[0168] 도 11 및 도 12에서 입증되는 바와 같이, HuCAL 항-CD38 항체 Mab#1, 2 및 3과, 참고 항체 chOKT10 및 상응하는 음성 대조는 작동성 항체 IB4와 비교하여 증식의 유도는 전혀 나타내지 않거나 단지 약하게 나타내었으며 IL-6-방출은 전혀 나타내지 않았다.

### [0169] 실시예 8: 클론원성 (clonogenic) 분석

[0170] 1. 재료 및 방법:

[0171] PBMC 보유 자가 CD34+/CD38+ 전구 세포는 공급자 (Sigma)의 지시에 따라 Histopaque 세포 분리 시스템을 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해 (고지에 입각한 동의를 얻은 후) 건강한 개체로부터 단리하고 상이한 HuCAL(등록상표) IgG1 항-CD38 항체 (Mab인 MOR03077, MOR03079, 및 MOR03080)와 양성 대조 (PC) chOKT10 10  $\mu$ g/ml과 함께 인큐베이션하였다. 배지 및 무관한 HuCAL(등록상표) IgG1은 배경 대조로 그 역할을 하였다. 각각의 ADCC-분석물은 4.0E+05개의 PBMC로 이루어지는데, 이는 10% FCS가 보충된 RPMI1640 배지에서 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 클론원성 분석에 있어서, 2.50 ml의 "완전" 메틸셀룰로오스 (CellSystems)에 ADCC-분석물로부터의 2.5 E+05개의 세포를 접종하고 이를 제어된 환경 (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) 하에 적어도 14일 동안 콜로니-발달을 위하여 배양하였다. 콜로니는 2개의 독립적인 연산자로 분석하고 BFU-E (적혈구군 형성 단위) + CFU-GEMM (과립구/적혈구계/대식세포/거대핵세포 줄기 세포) 및 CFU-GM (과립구 대식세포 줄기 세포)으로 분류하였다.

[0172] 2. 요약 및 결론:

[0173] CD38-발현은 골수 (예를 들어 단구, 과립구) 및 림프 계열 (예를 들어 활성화 B 및 T 세포; 형질 세포) 내의 면역 세포에서 발견될 뿐만 아니라 개개의 전구 세포 (CD34+/CD38+)에서도 발견되기 때문에, 상기 세포는 항체 매개 살해에 의해 영향을 받지 않는 것이 중요하다. 따라서, CD34+/CD38+ 선구체에 대한 상기 영향의 분석을 위하여 클론원성 분석을 적용하였다.

[0174] 표준 ADCC 프로토콜에 따라 건강한 공여체 유래의 PBMC를 HuCAL(등록상표) 항-CD38 항체 (Mab#1, Mab#2 및 Mab#3) 또는 여러 대조 (무관한 HuCAL(등록상표) 항체, 배지 및 양성 대조로서 참고 항체 chOKT10)와 함께 인큐베이션하고 이어서 콜로니 발달을 위하여 조절된 메틸셀룰로오스에서 추가로 인큐베이션하였다. 도 13에 도시되어 있는 바와 같이, 무관한 항체 또는 참고 항체와 비교하여 모든 HuCAL(등록상표) 항-CD38 항체에 있어서 콜로니 형성 단위의 유의한 감소는 전혀 나타나지 않았다.

[0175] 실시예 9: 상이한 세포주 및 일차 다발성 골수종 세포를 이용한 ADCC 분석

[0176] 1. 재료 및 방법

[0177] MM-환자 샘플의 단리 및 ADCC: (고지에 입각한 동의를 얻은 후) 다발성 골수종 환자로부터 골수 흡인물을 수득하였다. 밀도 구배 원심분리 (Sigma) 후 항-CD138 자성 비드 (Milteny Biotec)를 사용하여 표준 프로토콜을 통하여 악성 세포를 정제하였다. 전술한 바와 같이 ADCC-분석을 수행하였다.

[0178] 2. 요약 및 결론

[0179] 상이한 악성 종양으로부터 유래되는 여러 세포주들을 ADCC에서 사용하여 CD38 발현 수준 및 상이한 기원을 포함하는 보다 광범한 스펙트럼의 세포주에 대한 HuCAL(등록상표) 항-CD38 항체의 세포 독성 효과를 밝혔다. 도 14에 도시되어 있는 바와 같이, 일정한 항체 농도 (5  $\mu$ g/ml) 및 30:1의 E:T의 비에서 모든 세포는 ADCC에서 살해되었다. ADCC를 통한 세포 독성도 환자 유래의 여러 다발성 골수종 샘플에 있어서 나타났다. 모든 HuCAL(등록상표) 항-CD38 항체는 MM-세포의 용량-의존성 살해를 수행할 수 있었으며 EC50-값은 0.006 내지 0.249 nM 사이에서 변화였다 (도 15).

[0180] 실시예 10: FACS 및 면역 조직 화학적 방법 (immunohisto-chemistry, IHC)에 의한 교차 반응성의 분석

[0181] 1. 재료 및 방법:

[0182] 편도선을 이용한 IHC: IHC에 있어서 HuCAL(등록상표) 항-CD38 Mab 및 무관한 음성 대조 항체를 이가 dHLX-포맷으로 변환시켰다 (Pluckthun & Pack, 1997). 시노몰구스 원숭이, 붉은털 원숭이 및 인간으로부터 유래되는 림프절로부터의 5  $\mu$ m의 동결 절편 (Institute of Pathology of the University of Graz/오스트리아의 보관소로부터 가져옴)을 Leica CM3050 저온 용기(cryostat)를 이용하여 절단하였다. 절편을 30분 내지 1시간 동안 공기 건조시키고 빙냉 메탄올에서 10분 동안 고정시키고 PBS로 세척하였다. dHLX-포맷의 검출에 있어서 마우스 항-His 항체 (Dianova)를 Envision 키트 (DAKO)와 조합하여 사용하였다. 항-CD38 마우스 항체 (예를 들어 참고용 마우스 단일클론 OKT10)의 검출에 있어서는 Envision 키트만을 사용하였다.

[0183] 림프구의 FACS-분석: EDTA-처리 혈액 샘플을 건강한 인간 (고지에 입각한 동의를 얻은 후), 붉은털 원숭이 및 시노몰구스 원숭이로부터 수득하고 공급자 (Sigma)의 지시에 따라 Histopaque 세포 분리 시스템을 사용하여 밀도 구배 원심분리에 처하였다. FACS-분석에 있어서, 분열 간기로부터의 세포를 일차 항체 (HuCAL(등록상표) 항

-CD38 및 쥐과 IgG2a 또는 Fab-포맷으로서의 음성 대조 Mab, 양성 대조인 쥐과 항체 OKT10 및 매치되는 이소타입 대조)와 함께 인큐베이션하고, 이어서 항-M2 Flag (Sigma; 단지 Fab-포맷에 있어서) 및 피코에리트린 (PE)-표지된 항-마우스 콘쥬게이트 (Jackson Research)와 함께 인큐베이션하였다. FACS 분석을 게이트드(gated) 림프구 집단 상에서 수행하였다.

## 2. 요약 및 결론:

HuCAL(등록상표) 항-CD38을 중간 CD38 교차 반응성에 대하여 분석하였다. 모든 항-CD38 Mab는 FACS 및 IHC에서 림프구 상의 인간 CD38을 검출할 수 있었던 반면, 단지 MOR03080이 양성 대조 OKT10과 함께 시노물구스 및 붉은털 원숭이 CD38과의 추가의 반응성을 나타내었다 (표 5: 교차 반응성 분석 참조)

표 5

항체	림프구 (FACS) 및 림프절 (IHC)		
	인간 유래	시노물구스 원숭이 유래	붉은털 원숭이 유래
Mab#1	++	-	-
Mab#2	++	-	-
Mab#3	++	++	++
PC	++	++	++
NC	-	-	-

++: 강한 양성 염색; -: 염색 무; NC: 음성 대조;  
PC: 양성 대조 (= 참고용 cMAb)

실시예 11: 마우스 (RPMI8226 세포주 사용)에 있어서의 인간 골수종 이종 이식편의 MOR03080을 이용한 처리

## 1. 피하 마우스 모델의 확립:

암컷 C.B-17-SCID 마우스에 있어서 인간 골수종 유래의 종양 세포주 RPMI8226의 피하 마우스 모델을 하기와 같이 Aurigon Life Science GmbH (Tutzing, Germany)에 의해 확립하였다: -1일, 0일 및 1일에, SCID 마우스에서 이종반응성 (xenoreactive) NK-세포를 고갈시키는 항-아시알로 (asialo) GM1 다중클론 항체 (ASGM) (WAKO-Chemicals)를 정맥내 투여하여 C.B-17-SCID 마우스에서의 모든 잔류하는 특이적 면역 반응성을 불활성화하였다. 0일에, 50  $\mu$ l PBS 중  $5 \times 10^6$ 개 또는  $1 \times 10^7$ 개의 RPMI8226 종양 세포를 ASGM (상기에 기술되어 있음)으로 처리하거나 미처리 (각각의 군은 5마리의 마우스로 이루어짐)한 마우스의 우측 옆구리 내로 피하 접종하였다. 종양 발생은 모든 4개의 접종 군에서 유사하였으며 항-아시알로 GM1 항체를 이용하거나 이용하지 않은 처리 또는 상이한 세포 갯수의 접종에 의한 처리에 있어서 유의한 차이는 전혀 발견되지 않았다. 종양은 서서히 성장하는 것으로 나타났으며 며칠 동안 크기에 있어서 정체되거나 변동하는 경향이 있었다. 조사하는 전 기간 동안 2개의 종양의 크기가 변동하였으며, 심지어 하나의 종양은 최고 부피가 321 mm<sup>3</sup>인 것으로 여겨지다가 그로부터 전적으로 사라졌다. 이 종양 모델을 이용한 처리 연구는 군 당 많은 수의 종양 접종 동물을 포함하여야 한다.

## 2. MOR03080을 이용한 처리:

### 2.1 연구 목적

본 연구는 비히클 처리 (PBS)와 비교하여 복강내 투여 항체 (HuCAL(등록상표) 항-CD38)의 항-종양 효능을 비교하기 위하여 Aurigon Life Science GmbH (Tutzing, Germany)가 수행하였다. 인간 항체 hMOR03080 (IgG1 이소타입)을 상이한 양 및 처리 일정으로 시험하였다. 또한, 키메라 항체 chMOR03080 (IgG2a 이소타입: 키메라 OKT10에 대하여 실시예 5에서 기술한 것과 유사한 방식으로 제작된 쥐과 불변 영역 및 MOR03080의 가변 영역을 포함하는 키메라 항체 (쥐과 VH/VL 및 인간 불변 영역))을 시험하였다. RPMI8226 암 세포주를 모델로서 선택하였으며 이를 상기한 바와 같이 암컷 SCID 마우스에 피하 접종하였다. 이 연구의 최종 목적지는 체중 (body weight, b.w.), 종양 부피 및 임상 징후였다.

### 2.2 항체 및 비히클

항체는 2.13 mg/ml (MOR03080 hIgG1) 및 1.73 mg/ml (MOR03080 chIgG2a)의 농도로 Aurigond에 즉시 사용가능하게 제공하고, 투여할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 항체를 해동시키고 PBS로 개개의 최종 농도로 희석시켰다. 비히클 (PBS)을 Aurigond에게 즉시 사용가능하게 제공하고 투여할 때까지 4°C에서 보관하였다.

## 2.3 동물에 대한 명세 사항

종: 마우스

주: Fox chase C.B-17-scid (C.B-Igh-1b/IcrTac)

마리수 및 성별: 75마리의 암컷

공급자: Taconic M&B, Bomholtvej 10, DK-8680 Ry

건강 상태: SPF

주문한 중량: 대략 18 g

순응화: 9일

## 2.4 종양 세포주

종양 세포 (RPMI8226 세포주)를 배양하고 Aurigon Life Science GmbH로 수송하였는데, 여기에서 이 세포를 분할시키고 다른 사이클 동안 배양하였다. Aurigon은 접종일에 주사하기 위한 세포를 준비하였다. 세포 번식에 사용되는 배양 배지는 5% FCS, 2 mM L-글루타민 및 PenStrep이 보충된 RPMI 1640이었다. 세포는 예기되지 않은 성장 속도 또는 거동을 전혀 나타내지 않았다.

접종에 있어서, 종양 세포를 PBS에 현탁시키고 PBS 중에  $1 \times 10^7$  개의 세포  $50 \mu\text{l}$ 의 최종 농도로 조정하였다. 종양 세포 현탁물을 완전히 혼합한 후 주사하였다.

## 2.5 실험 절차

0일에,  $1 \times 10^7$  개의 RPMI8226 종양 세포를 75마리의 SCID 마우스의 우측 배면 (dorsal) 옆구리 내로 피하 접종하였다. 제1 군은 접종 직후 15마리의 랜덤하게 선택된 동물로 만들어졌다 (5 군). 이 군을 14일 내지 36일 사이에 격일로 1 mg/kg b.w.의 hIgG1-MOR03080으로 처리하였다. 31일 (약  $92 \text{ mm}^3$ 의 종양 부피)에 모든 다른 60마리의 동물로부터 4개의 군을 각각의 군에서 10마리의 동물로 만들었다. 1군 내지 4군은 비견할만한 종양 크기 평균 및 표준 편차로 만들었다. 5마리의 동물의 추가의 군 (6군)은 사전 처리한 5군 (마우스 3마리를 제외하고는 모두가  $10 \text{ mm}^3$  미만의 종양 부피를 나타내는데, 1마리는 종양 크기가 약  $22 \text{ mm}^3$ 이고, 1마리는 약  $44 \text{ mm}^3$ 이고 1마리는 약  $119 \text{ mm}^3$ 임)과의 비교를 위하여 상대적으로 작은 종양 부피 (약  $50 \text{ mm}^3$ 의 종양 부피)를 나타내는 것을 선택하였다. 1군 내지 4군을 32일 내지 68일까지 격일로 PBS (비히클; 1군), 1 mg/kg b.w.의 hIgG1-MOR03080 (2군) 또는 5 mg/kg b.w.의 hIgG1-MOR03080 (3군), 또는 5 mg/kg b.w.의 chIgG2a-MOR03080 (4군)으로 처리하였다. 6군은 처리하지 않았다 (표 6 참조). 종양 부피, 체중 및 임상 징후를 연구 마지막이 될 때까지 주 2회 측정하였다.

표 6

군	동물의 마리수	투여 유형	물질	일정	처리 용량 [mg/kg]	투여 부피 [ $\mu\text{l}/\text{kg}$ ]
1	10	복강내	비히클 (PBS)	32일 내지 68일 사이에 격일로	--	10
2	10	복강내	MOR03080 인간 IgG1	32일 내지 68일 사이에 격일로	1	10
3	10	복강내	MOR03080 인간 IgG1	32일 내지 68일 사이에 격일로	5	10
4	10	복강내	MOR03080 키메라 IgG2a	32일 내지 68일 사이에 격일로	5	10
5	15	복강내	MOR03080 인간 IgG1	14일 내지 36일 사이에 격일로	1	10
6	5	--	--	--	--	--

## 2.6 결과

임상 관찰 및 사망률



- [0211] 특정 종양 또는 물질이 관련된 임상적 발견 또는 사망률은 전혀 관찰되지 않았다. 3군에 있어서 (hIgG1 5 mg/kg) 4마리의 동물이 혈액 샘플링 동안 사망하였다 (1마리는 3일, 1마리는 34일; 2마리는 52일). 4군에 있어서 (muIgG2a 1 mg/kg) 1마리의 동물이 혈액 샘플링 동안 사망하였다 (34일). 연구 동안 사망한 모든 다른 동물은 종양 크기 때문에 안락사시켰다.
- [0212] 체중 증가
- [0213] 1군 (비히클)과 비교하여 체중 증가에 대한 약물 관련 간섭은 전혀 관찰되지 않았다. 체중은 3군 (hIgG1 5 mg/kg) 및 4군 (muIgG2a 5 mg/kg)에서 혈액 샘플링에 의해 크게 영향을 받았다. 그러한 방해에도 불구하고 모든 군의 평균 종양 증가는 지속적이었다.
- [0214] 종양 발생 (도 16 참조)
- [0215] 1군 (비히클)에 있어서 느리게 진행되는 예기된 속도의 종양 성장이 발견되었다. 이 세포주는 두드러진 표준 편차 값을 갖기 때문에 가장 큰 종양과 가장 작은 종양은 추가의 통계학적 분석에서 제외하였다. 1군의 동물의 종양 성장은, 이 군이 31일에 보다 낮은 평균 종양 부피로 출발하였지만, 6군 (미처리)에서의 종양 성장에 비견할 만하였다. 따라서 처리는 종양 성장 속도에 약간의 영향을 미칠 수 있다. 1군에서, 2마리의 마우스는 종양 크기 때문에 83일 전에 안락사시켜야 하였으며, 추가의 1마리는 87일 전에 안락사시켜야 하여서, 종양 부피의 평균 값은 80일 후에는 더이상 대표적인 것이 아니다. 6군에서는, 1마리의 마우스를 종양 크기 때문에 80일 전에 안락사시키고, 2마리의 마우스를 83일 전에 안락사시키고, 추가의 1마리는 87일 전에 안락사시켜야 하여서, 종양 부피의 평균 값은 76일 후에는 더이상 대표적인 것이 아니다.
- [0216] 1 mg/kg의 b.w.의 hIgG1으로 처리한 2군에서는, 1마리의 동물을 추가의 분석에서 제외하였는데, 이는 종양이 근육 조직 내로 성장해 들어가고 이는 일반적으로 종양 성장 속도를 증강시키기 때문이다. 대조인 1군 (비히클)과 비교하여, 평균 종양 크기는 45일에서 출발하여 연구 마지막까지 유의하게 달라지기 시작하였다. 종양 성장 증가는 마지막의 처리 (68일) 후에는 전혀 관찰되지 않았다.
- [0217] 3군의 동물 (5 mg/kg의 b.w.의 hIgG1)은 1군 (비히클)과 비교하여 종양 성장이 두드러지게 감소함을 나타내어서, 38일에서 83일 까지 통계학적으로 유의하게 되었다. 평균 종양 부피는 마지막의 처리 후에 약 2주 동안 강력하게 재성장하기 시작하였다. 10개의 종양 중 하나는 45일에 사라졌으며 마지막의 처리 후에 최대 19일까지 재성장하지 않았다.
- [0218] 92 mm<sup>3</sup>의 종양 부피로 시작하는 모든 처리 군의 최상의 성과는 4군 (5 mg/kg의 b.w.의 muIgG2a)에서 발견되었는데, 여기서, 평균 종양 부피는 명확한 퇴보를 나타내었으며 종양은 심지어 관찰 기간 마지막까지 4마리의 동물에서 사라졌다. 1군 (비히클)의 평균 종양 부피에 대한 차이는 38일부터 시작하여 연구 마지막까지 매우 주목할 만하였다.
- [0219] 14일 내지 36일 사이의 1 mg/kg의 b.w.의 hIgG1을 이용한 초기 처리 (5군)는 종양 발달에 대한 초기 효과 및 오래 지속되는 효과를 나타내었다. 1마리의 동물은 종양이 근육 조직 내로 성장하였기 때문에 추가의 분석에서 제외하였다. 31일에, 5마리의 동물만이 나머지 접종 동물과 비교하여 접종 부위에서 측정가능한 종양이 있었는데, 여기서, 60마리중 2마리만이 종양 접종에 응답하지 않았다. 종양 진행은 약 31일 지연되었다 (대조인 1군의 52일을 5군의 83일과 비교). 동물 중 약 50%는 연구 마지막에 접종 부위에서 종양을 나타내지 않았다.
- [0220] **2.7 결론**
- [0221] 특정의 종양 또는 물질과 관련된 임상적 발견 또는 사망률은 1군 (대조)과 비교하여 전혀 관찰되지 않았다.
- [0222] 종양 증가에 대한 약물 관련 간섭은 전혀 관찰되지 않았다.
- [0223] 처리 후의 RPMI8226 종양 세포의 세포 성장은 하기의 유효성의 순서로 감소하였다: hIgG1 1 mg/kg, 14-36일, 격일 (5군) > muIgG2a 5 mg/kg, 32-68일, 격일 (4군) > hIgG1 5 mg/kg, 32-68일, 격일 (3군) > hIgG1 1mg/kg, 32-68일, 격일 (2군). 2군 내지 4군에 있어서, 평균 종양 부피는 마지막의 처리 후에 다양한 정도로 다시 증가하였다.

[0224] 참고 문헌

Ausiello C.M., Urbani F., Lande R., la Sala A., Di Carlo B., Baj G., Surico N., Hilgers J., Deaglio S., Funaro A., Malavasi F. (2000) Functional topography of discrete domains of human CD38. *Tissue Antigens*. 2000 Dec;56(6):539-47.

Chamow, S.M., Zhang, D.Z., Tan, X.Y., Mathre, S.M., Marsters, S.A., Peers, D.H., Byrn, R.A., Ashknazi, A., Junghans, R.P (1994). humanized, bispecific immunoadhesin-antibody that retargets CD3+ effectors to kill HIV-1-infected cells. *J Immunol*. 1994 Nov 1;153(9):4268-80

Dattamajumdar, A.K., Jacobsen, D.P., Hood, L.E., Osman, G.E. (1996). Rapid cloning of rearranged mouse immunoglobulin variable genes. *Immunogenetics* 43, 141-151

Funaro, A., Spagnoli, G.C., Ausiello, C.M., Alessio, M., Roggero, S., Delia, D., Zaccolo, M., and Malavasi, F. (1990) Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J. Immunol*. 145, 2390-2396.

Hoshino S., Kukimoto I., Kontani K., Inoue S., Kanda Y., Malavasi F., Katada T. (1997) Mapping of the catalytic and epitopic sites of human CD38/NAD<sup>+</sup> glycohydrolase to a functional domain in the carboxyl terminus. *J Immunol*. 158(2):741-7.

Jackson D.G., Bell J.I. (1990) Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J Immunol*. 144(7):2811-5.

Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.

Konopleva M., Estrov Z., Zhao S., Andreeff M., Mehta K. (1998) Ligation of cell surface CD38 protein with agonistic monoclonal antibody induces a cell growth signal in myeloid leukemia cells. *J Immunol*. 161(9):4702-8.

Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bossard, H.R., Pluckthun, A. (1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Imm. Meth*. 201, 35-55.

Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X.Q., Schier, R., Sohlmann, P., Winter, J., Wolle, J., and Kretzschmar, T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.

Löhning, C. (2001). Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.

[0225]

Malavasi, F., Caligaris-Cappio, F., Milanese, C., Dellabona, P., Richiardi, P., Carbonara, A. O. (1984). Characterization of a murine monoclonal antibody specific for human early lymphohemopoietic cells. *Hum. Immunol.* 9: 9-20

Namba, M., Otsuki, T., Mori, M., Togawa, A., Wada, H., Sugihara, T., Yawata, Y., Kimoto, T. (1989). Establishment of five human myeloma cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25: 723.

Nata K., Takamura T., Karasawa T., Kumagai T., Hashioka W., Tohgo A., Yonekura H., Takasawa S., Nakamura S., Okamoto H. (1997). Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing. *Gene* 186(2):285-92.

Naundorf, S., Preithner, S., Mayer, P., Lippold, S., Wolf, A., Hanakam, F., Fichtner, I., Kufer, P., Raum, T., Riethmüller, G., Baeuerle, P.A., Dreier, T. (2002). *Int. J. Cancer* 100, 101-110.

Plückthun A, and Pack P. (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* 3(2):83-105.

Rauchenberger R., Borges E., Thomassen-Wolf E., Rom E., Adar R., Yaniv Y., Malka M., Chumakov I., Kotzer S., Resnitzky D., Knappik A., Reiffert S., Prassler J., Jury K., Waldherr D., Bauer S., Kretzschmar T., Yayon A., Rothe C. (2003). Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem.* 278(40):38194-205.

Zhou, H., Fisher, R.J., Papas, T.S. (1994). Optimization of primer sequences for mouse scFv repertoire display library construction. *Nucleic Acids Res.* 22: 888-889.

[0226]

## 도면

### 도면1aa

#### 가변성 중쇄 DNA

##### 3077\_VH1B (서열 번호 : 1):

```
(1)  CAGGTGCAAT TGGTTCAGAG CGGCGCGGAA GTGAAAAAAC CGGGCGCGAG
(51) CGTGAAAGTG AGCTGCAAAG CCTCCGGATA TACCTTTACT TCTTATTCTA
(101) TTAATTGGGT CCGCCAAGCC CCTGGGCAGG GTCTCGAGTG GATGGGCTAT
(151) ATCGATCCGA ATCGTGCGAA TACGAATTAC GCGCAGAAGT TTCAGGGCCG
(201) GGTGACCATG ACCCGTGATA CCAGCATTAG CACCGCGTAT ATGGAAGTGA
(251) GCAGCCTGCG TAGCGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTGAGTAT
(301) ATTTATTTTA TTCATGGTAT GCTTGATTTT TGGGGCCAAG GCACCCCTGGT
(351) GACGGTTAGC TCA
```

##### 3079\_VH3 (서열 번호 : 2):

```
(1)  CAGGTGCAAT TGGTGGAAG CGGCGGCGGC CTGGTGCAAC CGGGCGGCAG
(51) CCTGCGTCTG AGCTGCGCGG CCTCCGGATT TACCTTTTCT AATTATGGTA
(101) TGCATTGGGT GCGCCAAGCC CCTGGGAAGG GTCTCGAGTG GGTGAGCAAT
(151) ATCCGTTCTG ATGGTAGCTG GACCTATTAT GCGGATAGCG TGAAAGGCCG
(201) TTTTACCATT TCACGTGATA ATTCGAAAAA CACCCTGTAT CTGCAATGA
(251) ACAGCCTGCG TCGGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTCGTAT
(301) TGGTCTAAGT CTCATGCTTC TGTTACTGAT TATTGGGGCC AAGGCACCCT
(351) GGTGACGGTT AGCTCA
```

##### 3080\_VH3 (서열 번호 : 3):

```
(1)  CAGGTGCAAT TGGTGGAAG CGGCGGCGGC CTGGTGCAAC CGGGCGGCAG
(51) CCTGCGTCTG AGCTGCGCGG CCTCCGGATT TACCTTTTCT TCTATGGTA
(101) TGCATTGGGT GCGCCAAGCC CCTGGGAAGG GTCTCGAGTG GGTGAGCAAT
(151) ATCTATTCTG ATGGTAGCAA TACCTTTTAT GCGGATAGCG TGAAAGGCCG
(201) TTTTACCATT TCACGTGATA ATTCGAAAAA CACCCTGTAT CTGCAATGA
(251) ACAGCCTGCG TCGGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTAATATG
(301) TATCGTTGCG CTTTTCATTA TTTTGTGAT TATTGGGGCC AAGGCACCCT
(351) GGTGACGGTT AGCTCA
```

##### 3100\_VH3 (서열 번호 : 4):

```
(1)  CAGGTGCAAT TGGTGGAAG CGGCGGCGGC CTGGTGCAAC CGGGCGGCAG
(51) CCTGCGTCTG AGCTGCGCGG CCTCCGGATT TACCTTTTCT TCTAATGGTA
(101) TGTCTTGGGT GCGCCAAGCC CCTGGGAAGG GTCTCGAGTG GGTGAGCAAT
(151) ATCTATTCTG ATGGTAGCTC TACCTATTAT GCGGATAGCG TGAAAGGCCG
(201) TTTTACCATT TCACGTGATA ATTCGAAAAA CACCCTGTAT CTGCAATGA
(251) ACAGCCTGCG TCGGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTTTTTAT
(301) GGTTATTTTA ATTATGCTGA TGTTTGGGGC CAAGGCACCC TGGTGACGGT
(351) TAGCTCA
```

##### 3077\_1\_VH1B (서열 번호 : 31):

```
(1)  CAGGTGCAAT TAGTCCAAAG TGGTGCGGAA GTGAAAAAAC CGGGCGCGAG
(51) CGTGAAAGTG AGCTGCAAAG CCTCCGGATA TACCTTTACT TCTTATTCTA
```

### 도면1ab

```
(101) TTAATTGGGT CCGCCAAGCC CCTGGGCAGG GTCTCGAGTG GATGGGCTAT
(151) ATCGATCCGA ATCGTGCGAA TACGAATTAC GCGCAGAAGT TTCAGGGCCG
(201) GGTGACCATG ACCCGTGATA CCAGCATTAG CACCGCGTAT ATGGAAGTGA
(251) GCAGCCTGCG TAGCGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTGAGTAT
(301) ATTTATTTTA TTCATGGTAT GCTTGATTTT TGGGGCCAAG GCACCCCTGGT
(351) GACGGTTAGC TCA
```

도면1b

가변성 중쇄 펩티드  
(CDR 영역 : 볼드체 )

3077\_VH1B ( 서열 번호 : 5):

(1) QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS**GYTFT** **SYSINWVRQA** PGQGLEWMGY  
(51) IDPNRGNTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSSLRSED TAVYYC**AREY**  
(101) IYFIHGMLDF WGQGTTLVTVS S

3079\_VH3 ( 서열 번호 : 6):

(1) QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **NYGMHWVRQA** PGKGLEWVSN  
(51) IRSDGSWTTY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**CARRY**  
(101) WSKSHASVTD YWGQGTTLVTV SS

3080\_VH3 ( 서열 번호 : 7):

(1) QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **SYGMHWVRQA** PGKGLEWVSN  
(51) IYSDGSNTFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**CARNM**  
(101) YRWPFHYFFD YWGQGTTLVTV SS

3100\_VH 3 ( 서열 번호 : 8):

(1) QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **SNGMSWVRQA** PGKGLEWVSN  
(51) ISYLSSTTY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**CARFY**  
(101) GYFNYADVWG QGTTLVTVSS



도면2a

# 가변성 경쇄 DNA

3077\_Vk 카파 2 (서열 번호:9):

```
(1) GATATCGTGA TGACCCAGAG CCCACTGAGC CTGCCAGTGA CTCCGGGGGA
(51) GCCTGCGAGC ATTAGCTGCA GAAGCAGCCA AAGCCTGCTT TTTATTGATG
(101) GCAATAATTA TCTGAATTGG TACCTTCAA AACCAGGTCA AAGCCCGCAG
(151) CTATTAAATTT ATCTTGGTTC TAATCGTGCC AGTGGGGTCC CGGATCGTTT
(201) TAGCGGCTCT GGATCCGGCA CCGATTTTAC CCTGAAAATT AGCCGTGTGG
(251) AAGCTGAAGA CGTGGCGGTG TATTATTGCC AGCAGTATTC TTCTAAGTCT
(301) GCTACCTTTG GCCAGGGTAC GAAAGTTGAA ATTAAACGTA CG
```

3079\_Vk 카파 1 (서열 번호:10):

```
(1) GATATCCAGA TGACCCAGAG CCCGTCTAGC CTGAGCGCGA GCGTGGGTGA
(51) TCGTGTGACC ATTACCTGCA GAGCGAGCCA GGATATTCTT GCTTTTCTGA
(101) ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGTAAAGCAC CGAACTATT AATTTATAAG
(151) GTTCTTAATT TGCAAAGCGG GGTCCCGTCC CGTTTTAGCG GCTCTGGATC
(201) CGGCACTGAT TTTACCTGA CCATTAGCAG CCTGCAACCT GAAGACTTTG
(251) CGACTTATTA TTGCCAGCAG GCTTATTCTG GTTCTATTAC CTTTGGCCAG
(301) GGTACGAAAG TTGAAATTAA ACGTACG
```

3080\_VI 람다 3 (서열 번호:11):

```
(1) GATATCGAAC TGACCCAGCC GCCTTCAGTG AGCGTTGCAC CAGGTCAGAC
(51) CGCGCGTATC TCGTGTAGCG GCGATAATAT TGGTAATAAG TATGTTCTT
(101) GGTACCAGCA GAAACCCGGG CAGGCGCCAG TTGTTGTGAT TTATGGTGAT
(151) AATAATCGTC CCTCAGGCAT CCCGGAACGC TTTAGCGGAT CCAACAGCGG
(201) CAACACCGCG ACCCTGACCA TTAGCGGCAC TCAGGCGGAA GACGAAGCGG
(251) ATTATTATTG CTCTTCTTAT GATTCTTCTT ATTTTGTGTT TGGCGGCGGC
(301) ACGAAGTTAA CCGTCTTGG CCAG
```

3100\_VI 람다 3 (서열 번호:12):

```
(1) GATATCGAAC TGACCCAGCC GCCTTCAGTG AGCGTTGCAC CAGGTCAGAC
(51) CGCGCGTATC TCGTGTAGCG GCGATAATAT TGGTCATTAT TATGCTTCTT
(101) GGTACCAGCA GAAACCCGGG CAGGCGCCAG TTCTTGTGAT TTATCGTGAT
(151) AATGATCGTC CCTCAGGCAT CCCGGAACGC TTTAGCGGAT CCAACAGCGG
(201) CAACACCGCG ACCCTGACCA TTAGCGGCAC TCAGGCGGAA GACGAAGCGG
(251) ATTATTATTG CCAGTCTTAT GATTATCTTC ATGATTTTGT GTTTGGCGGC
(301) GCCACGAAGT TAACCGTTCT TGGCCAG
```

도면2b

가변성 경쇄 펩티드  
(CDR 영역 : 볼드체)

3077\_Vk 카파 2 (서열 번호:13):

(1) DIVMTQSP~~LS~~ LPVTPGEPAS ISCRSSQ~~SL~~L **FIDGNNY**LNW YLQKPGQSPQ  
(51) LLI**Y**LGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEADVGV YYCQYSSKS  
(101) ATFGQGT~~KVE~~ IKRT

3079\_Vk 카파 1 (서열 번호:14):

(1) DIQMTQSP~~SS~~ LSASVGDRVT ITCRASQ~~DIS~~ **AFLN**WYQQKP GKAPKLLIYK  
(51) **VSNLQ**SGVPS RFGSGSGTD FTLTIS~~SLQ~~P EDFATYYC~~Q~~Q **AYSG**SITFGQ  
(101) GTKVEIKRT

3080\_Vl 람다 3 (서열 번호 :15):

(1) DIELTQPPSV SVAPGQTARI SC~~SGDNIGNK~~ **YVSWY**QQKPG QAPVVVIYGD  
(51) **NNRPS**GIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYC~~SS~~Y **DSSY**FVFGG  
(101) TKLTVLGQ

3100\_Vl 람다 3 (서열 번호 :16):

(1) DIELTQPPSV SVAPGQTARI SC~~SGDNIGHY~~ **YASWY**QQKPG QAPVLVIYRD  
(51) **NDRPS**GIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYC~~Q~~SY **DYLH**DFVFGG  
(101) GTKLTVLGQ

도면3

가변성 중쇄 컨센서스 서열  
(CDR 영역 : 볼드체)

VH1B 컨센서스 (서열 번호 :17):

(1) QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **SYMH**WVRQA PGQGLEWMGW  
(51) INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSSLRS~~ED~~ TAVYYCARWG  
(101) GDGFYAMDYW GQGT~~L~~VTVSS

VH3 컨센서스 (서열 번호 :18):

(1) QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGPTFS **SYAM**SWVRQA PGKGLEWVSA  
(51) ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARWG  
(101) GDGFYAMDYW GQGT~~L~~VTVS S

#### 도면4

##### 가변성 경쇄 콘센서스 서열

(CDR 영역 : 볼드체)

VL<sub>λ3</sub> 콘센서스 (서열 번호 : 19):

(1) SYELTQPPSV SVAPGQTARI **SCSGDALGDK YASWYQQKPG** QAPVLVIYDD  
 (51) **SDRPSGIPER** FSGNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYC**QQH YTPPVVFGG**  
 (101) TKLTVLG

VL<sub>k1</sub> 콘센서스 (서열 번호 : 20):

(1) DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRAS**QGIS SYLAWYQQKPG** GKAPKLLIYA  
 (51) **ASSLQSGVPS** RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QQ HYTPPPTFGQ**  
 (101) GTKVEIKR

VL<sub>k2</sub> 콘센서스 (서열 번호 : 21):

(1) DIVMTQSPPLS LPVTPGEPAS ISCRSS**QSLH HSNQYNYLDW** YLQKPGQSPQ  
 (51) **LLIYLGSNRA** SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**QQHYTP**  
 (101) PTFGQGTKVE IKR

#### 도면5

##### CD38의 펩티드 서열

(서열 번호 : 22):

1 mancefspvs gdkpccrlsr raqlclgvsil lylilvvvla vvvprwrqqw sgpgttkrfp  
 61 etvlarcvky teihpemrhv dcqsvwdafk gafiskhpcn iteedyqplm klgtqtvpcn  
 121 killwrikd lahqftqvqr dmftledtl1 gyladdltwc gefntskiny qscpdwrkdc  
 181 snnpvsvfwk tvsrrfaeaa cdvvhvm1ng srskifdkns tfigsvevhnl qpekvtlea  
 241 vwihggreds rdlcqdptik elesiiskrn iqfsckniyr pdkflqcvkn pedssctsei



도면6a

키메라 OKT10의 뉴클레오티드 서열

중쇄 (서열 번호 : 23):

cagggtggaat tgggtggaatc tggaggatcc ctgaaactct cctgtgcagc ctcaggattc  
gatttttagta gatcctggat gaattgggtc cggcaggctc caggaaaagg gctagaatgg  
attggagaaa ttaatccaga tagcagtacg ataaactata cgacatctct aaaggataaa  
ttcatcatct ccagagacaa cgccaaaaat acgctgtacc tgcaaatgac caaagtgaga  
tctgaggaca cagcccttta ttactgtgca agatatggta actggtttcc ttattggggc  
caagggactc tggctactgt cagctcagcc tccaccaagg gtccatcggc cttccccctg  
gcacctctct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac  
tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac  
accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg  
ccctccagca gcttggggc cagacctac atctgcaacg tgaatcaca gccacgaac  
accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg  
tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag  
gacacctca tgatctcccg gacctgag gtccatcgc tgggtggtga cgtgagccac  
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtag gtggacggcg tggagggtgca taatgccaa  
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc  
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc  
ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg  
tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg  
gtcaaaggct tctatcccg cgacatcgc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag  
aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc  
aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag caggggaaacg tcttctcatg ctccgtgatg  
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa

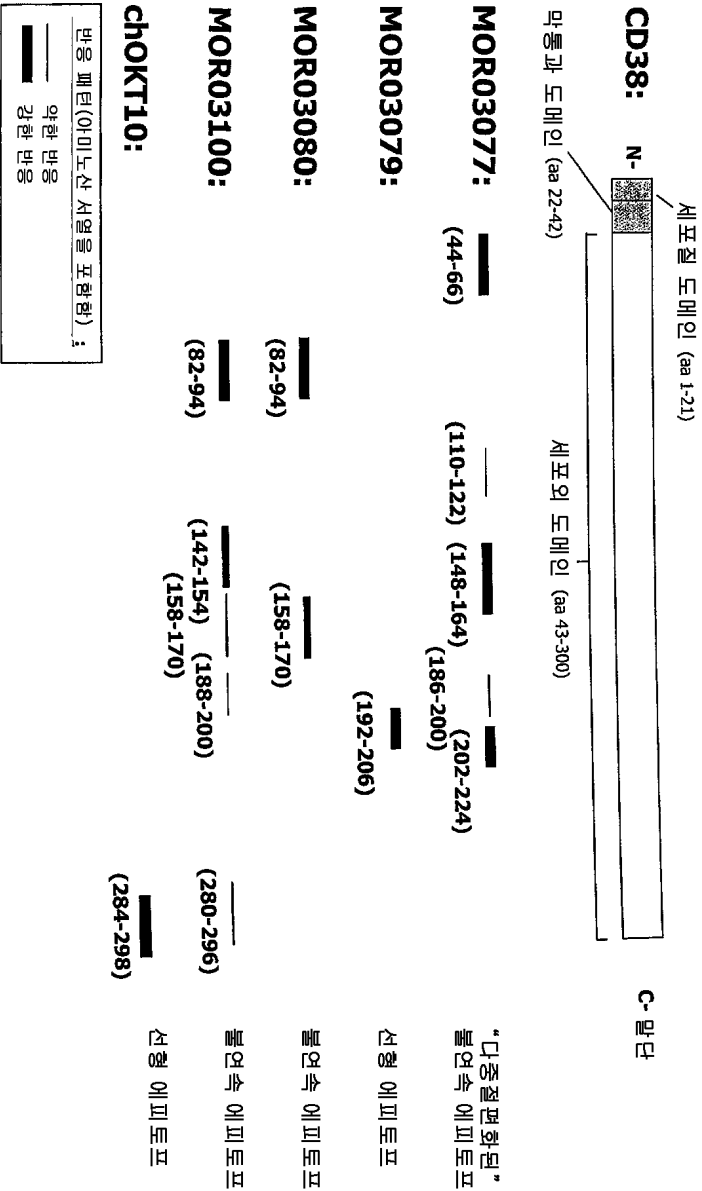
경쇄 (서열 번호 : 24):

gatatcctga tgaccagtc tcaaaaaatc atgccacat cagtgggaga cagggtcagc  
gtcacctgca aggcagtc aaatgtggat actaatgtag cctgggtatca acagaaacca

도면6b

ggacagtctc ctaaagcact gatttactcg gcatoctacc gatacagtgg agtccctgat  
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcacaa tgtgcagtct  
gaggacttgg cagagtattt ctgtcagca tatgacagct atcctctcac gttcgggtgct  
gggaccaagc tggacctgaa acgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca  
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat  
cccagagagg ccaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag  
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  
ctgagcaaa cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc  
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt

에피토포의 개략도



도면7

도면8a

pMOPRH<sup>®</sup>\_h\_IgG1\_1 의 DNA 서열

```

                StyI
                -----
601   TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
      AGCGATAATG GTACCACTAC GCCAAAACCG TCATGTAGTT ACCCGCACCT

                                   AatII
                                   -----
651   TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
      ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGGTTCA GAGGTGGGGT AACTGCAGTT

701   TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA
      ACCCTCAAAC AAAACCGTGG TTTTAGTTGC CCTGAAAGGT TTTACAGCAT

751   ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
      TGTGAGGCG GGGTAACTGC GTTACCCGC CATCCGCACA TGCCACCCTC

801   GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
      CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTTGGGT GACGAATGAC

                pMORPH®_Ig_FOR 100.0%
                -----
851   GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
      CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCG

      M K H L W F F L L L V A A P R

901   GCCACCATGA AACACCTGTG GTTCTTCCTC CTGCTGGTGG CAGCTCCAG
      CGGTGGTACT TTGTGGACAC CAAGAAGGAG GACGACCACC GTCGAGGGTC

StyI                               EcoRI                               BspI
                -----                               -----

      .                               A S T

      . W V L S Q V E F C R R L A Q
951   ATGGGTCTTG TCCCAGGTGG AATTCTGCAG GCGGTTAGCT CAGCCTCCAC
      TACCAGGAC AGGGTCCACC TTAAGACGTC CGCCAATCGA GTCGGAGGTG

      StyI                               BbsI
      -----                               -----

      . K G P S V F P L A P S S K S T S G

1001   CAAGGGTCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG
      GTTCCCAGGT AGCCAGAAGG GGGACCGTGG GAGGAGGTTT TCGTGGAGAC

      . G T A A L G C L V K D Y F P E P
1051   GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCAGACCG
      CCCCCTGTCTG CCGGACCCG ACGGACCAGT TCCTGATGAA GGGGCTTGGC

```

도면8b

```

      V T V S W N S G A L T S G V H T F
1101 GTGACGGTGT CGTGGAAC TC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT
      CACTGCCACA GCACCTTGAG TCCGCGGGAC TGGTCGCCGC ACGTGTGGAA
      . P A V L Q S S G L Y S L S S V V T
1151 CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCTCAGC AGCGTGGTGA
      GGGCCGACAG GATGTCAGGA GTCCTGAGAT GAGGGAGTCG TCGCACCCT
      . V P S S S L G T Q T Y I C N V N
1201 CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
      GGCACGGGAG GTCGTCGAAC CCGTGGGTCT GGATGTAGAC GTTGCACTTA
      StyI
      -----
      H K P S N T K V D K K V E P K S C
1251 CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG
      GTGTTCGGGT CGTTGTGGTT CCACCTGTC TTTCAACTCG GGTTTAGAAC
      . D K T H T C P P C P A P E L L G G
1301 TGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG
      ACTGTTTGA GTGTGTACGG GTGGCACGGG TCGTGGACTT GAGGACCCCC
      BbsI StyI
      -----
      . P S V F L F P P K P K D T L M I
1351 GACCGTCAGT CTTCCTCTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
      CTGCACTCA GAAGGAGAAG GGGGGTTTGG GGTTCCTGTG GGAGTACTAG
      BbsI
      -----
      S R T P E V T C V V V D V S H E D
1401 TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA
      AGGGCCTGGG GACTCCAGTG TACGCACCAC CACCTGCACT CGGTGCTTCT
      BbsI
      ~
      . P E V K F N W Y V D G V E V H N A
1451 CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG
      GGGACTCCAG TTCAAGTTGA CCATGCACCT GCCGCACCTC CACGTATTAC
      . K T K P R E E Q Y N S T Y R V V
1501 CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGGGTGGTC
      GGTTCGTGTT CGGCGCCCTC CTCGTCATGT TGTCGTGCAT GGCCACCAG
      S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
1551 AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA
      TCGCAGGAGT GGCAGGACGT GGTCTGACC GACTTACCGT TCCTCATGTT
      . C K V S N K A L P A P I E K T I S
1601 GTGCAAGGTC TCCAACAAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT
      CACGTTCCAG AGGTTGTTTC GGGAGGGTCG GGGGTAGCTC TTTTGGTAGA

```

도면8c

```

                                BsrGI
                                -----
1651  . K A K G Q P R E P Q V Y T L P P
      CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
      GGTTTCGGTT TCCCGTCGGG GCTCTTGGTG TCCACATGTG GGACGGGGGT

      S R D E L T K N Q V S L T C L V K

1701  TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA
      AGGGCCCTAC TCGACTGGTT CTGGTCCAG TCGGACTGGA CGGACCAGTT

      . G F Y P S D I A V E W E S N G Q P

1751  AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC
      TCCGAAGATA GGGTCGCTGT AGCGGCACCT CACCTCTCG TTACCCGTCG

      . E N N Y K T T P P V L D S D G S
1801  CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC
      GCCTCTTGT GATGTTCTGG TCGGAGGGC ACGACCTGAG GCTGCCGAGG

      F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G

1851  TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG
      AAGAAGAGA TGTCTGTCGA GTGGCACCTG TTCTCGTCCA CCGTCGTCCC

      BbsI                      NsiI
      -----
      . N V F S C S V M H E A L H N H Y T

1901  GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACA
      CTTGCAGAAG AGTACGAGGC ACTACGTACT CCGAGACGTG TTGGTGATGT

      SapI                      PmeI
      -----
      . Q K S L S L S P G K *
1951  CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGTA AATGAGGGCC CGTTTAAACC
      GCGTCTTCTC GGAGAGGGAC AGAGGCCCAT TTAATCCCGG GCAAATTTGG

2001  CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG
      GCGACTAGTC GGAGCTGACA CGGAAGATCA ACGGTCGGTA GACAACAAAC

2051  -----
      pMORPH+_Ig_REV 100.0%
      CCCCTCCCC GTGCCTTCCT TGACCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC
      GGGGAGGGGG CACGGAAGGA ACTGGGACCT TCCACGGTGA GGGTGACAGG

```



도면9a

# Ig 카파 경쇄 발현 벡터

## pMORPH®\_h\_Igk\_1 의 DNA 서열

```

                StyI
            ~~~~~
601  TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
    AGCGATAATG GTACCACTAC GCCAAAACCG TCATGTAGTT ACCCGCACCT

651  TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
    ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGGTTCA GAGGTGGGGT AACTGCAGTT

701  TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA
    ACCCTCAAAC AAAACCGTGG TTTTAGTTGC CCTGAAAGGT TTTACAGCAT

751  ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
    TGTTGAGGCG GGGTAACTGC GTTACCCGC CATCCGCACA TGCCACCCTC

801  GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
    CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTTGGGT GACGAATGAC

                pMORPH®_Ig_FOR 100%                NheI
            =====
851  GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
    CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCG

+1      M  V  L  Q  T  Q  V  F  I  S  L  L  L  W  I
        StyI
            ~~~~~
901  GCCACCATGG TGTTCAGAC CCAGGTCTTC ATTTCTCTGT TGCTCTGGAT
    CGGTGGTACC ACAACGCTCTG GGTCCAGAAG TAAAGAGACA ACGAGACCTA

                BbsI
            ~~~~~

+1      S  G  A  Y  G  D  I  V  M  I  K  R  T  V  A  A
                EcoRV                BsiWI
            ~~~~~
951  CTCTGGTGCC TACGGGGATA TCGTGATGAT TAAACGTACG GTGGCTGCAC
    GAGACCACGG ATGCCCTAT AGCACTACTA ATTTGCATGC CACCGACGTG

+1  P  S  V  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T
1001 CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAAC
    GTAGACAGAA GTAGAAGGCG GGTAGACTAC TCGTCAACTT TAGACCTTGA

                BbsI
            ~~~~~

```

도면9b

```

+1 A S V V C L L N N F Y P R E A K V
1051 GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAG AGGCCAAAGT
    CGGAGACAAC ACACGGACGA CTTATTGAAG ATAGGGTCTC TCCGGTTTCA

+1 Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
1101 ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC CAGGAGAGTG
    TGTACCTTC CACCTATTGC GGGAGGTAG CCCATTGAGG GTCTCTCAC

+1 V T E Q D S K D S T Y S L S S T L
1151 TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCTG
    AGTGTCTCGT CCTGTCTTC CTGTCGTGGA TGTGGAGTC GTCTGGAC

+1 T L S K A D Y E K H K V Y A C E V
    BlpI
-----
1201 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT
    TGCGACTCGT TCGTCTGAT GCTCTTTGTG TTTCAGATGC GGACGCTTCA

+1 T H Q G L S S P V T K S F N R G
1251 CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG
    GTGGGTAGTC CCGGACTCGA GCGGGCAGTG TTTCTCGAAG TTGTCCCTC

+1 E C *
          PmeI                      pMORPH®_Ig_REV 100%
          ~~~~~                      =====
1301 AGTGTTAGGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT
    TCACAATCCC CGGGCAAATT TGGGCGACTA GTCGGAGCTG ACACGGAAGA

=
1351 AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCCGTGCCTT CTTGACCCT
    TCAACGGTCG GTAGACAACA AACGGGGAGG GGGCACGGAA GGAAGTGGGA

```

도면10a

**HuCAL<sup>®</sup> Ig 램다 경쇄 벡터**  
**pMORPH<sup>®</sup>\_h\_Igλ\_1 의 DNA 서열**

```

styI
-----
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
    AGCGATAATG GTACCACTAC GCCAAAACCG TCATGTAGTT ACCCGCACCT

651 TAGCGGTTTG ACTCAGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
    ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGGTICA GAGGTGGGGT AACTGCAGTT

701 TGGGAGTTTG TTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA
    ACCCTCAAAC AAAACCGTGG TTTTAGTTGC CCTGAAAGGT TTTACAGCAT

751 ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
    TGTTGAGGCG GGGTAACTGC GTTTACCCGC CATCCGCACA TGCCACCCTC

801 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
    CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTTGGGT GACGAATGAC

                pM_Ig_FOR 100.0%                               NheI
                =====
851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
    CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCG

+1      M A W A L L L L T L L T Q G T
      styI
      -----
901 GCCACCATGG CTTGGGCTCT GCTGCTCCTC ACCCTCCTCA CTCAGGGCAC
    CGGTGGTACC GGACCCGAGA CGACGAGGAG TGGGAGGAGT GAGTCCCGTG

+2
+1      G S W A D I V M H E V      T V L G Q
      BamHI      EcoRV      HpaI      StyI
      -----
951 AGGATCCTGG GCTGATATCG TGATGCACGA AGTTAACCGT CCTAGGTCAG
    TCCTAGGACC CGACTATAGC ACTACGTGCT TCAATTGGCA GGATCCAGTC

+2      P K A A P S V T L F P P S S E E L
      styI
      -----
1001 CCCAAGGCTG CCCCTCGGT CACTCTGTTT CCGCCCTCCT CTGAGGAGCT
    GGGTTCCGAC GGGGGAGCCA GTGAGACAAG GCGGGGAGGA GACTCCTCGA

+2      Q A N K A T L V C L I S D F Y P
1051 TCAAGCCAAC AAGGCCACAC TGGTGTGTCT CATAAGTGAC TTCTACCCGG
    AGTTCGGTTG TTCCGGGTG ACCACACAGA GTATTCAGTG AAGATGGGCC

```

도면10b

```

+2 G A V T V A W K G D S S P V K A G
1101 GAGCCGTGAC AGTGGCCTGG AAGGGAGATA GCAGCCCCGT CAAGGCGGGA
      CTCGGCACTG TCACCGGACC TTCCCTCTAT CGTCGGGGCA GTTCCGCCCT

+2 V E T T T P S K Q S N N K Y A A S
1151 GTGGAGACCA CCACACCCTC CAAACAAAGC AACAACAAGT ACGCGGCCAG
      CACCTCTGGT GGTGTGGGAG GTTTGTTCG TTGTGTTC A TCGCCGGTC

+2 S Y L S L T P E Q W K S H R S Y
1201 CAGCTATCTG AGCCTGACGC CTGAGCAGTG GAAGTCCCAC AGAAGCTACA
      GTCGATAGAC TCGGACTGCG GACTCGTCAC CTTCAGGGTG TCTTCGATGT

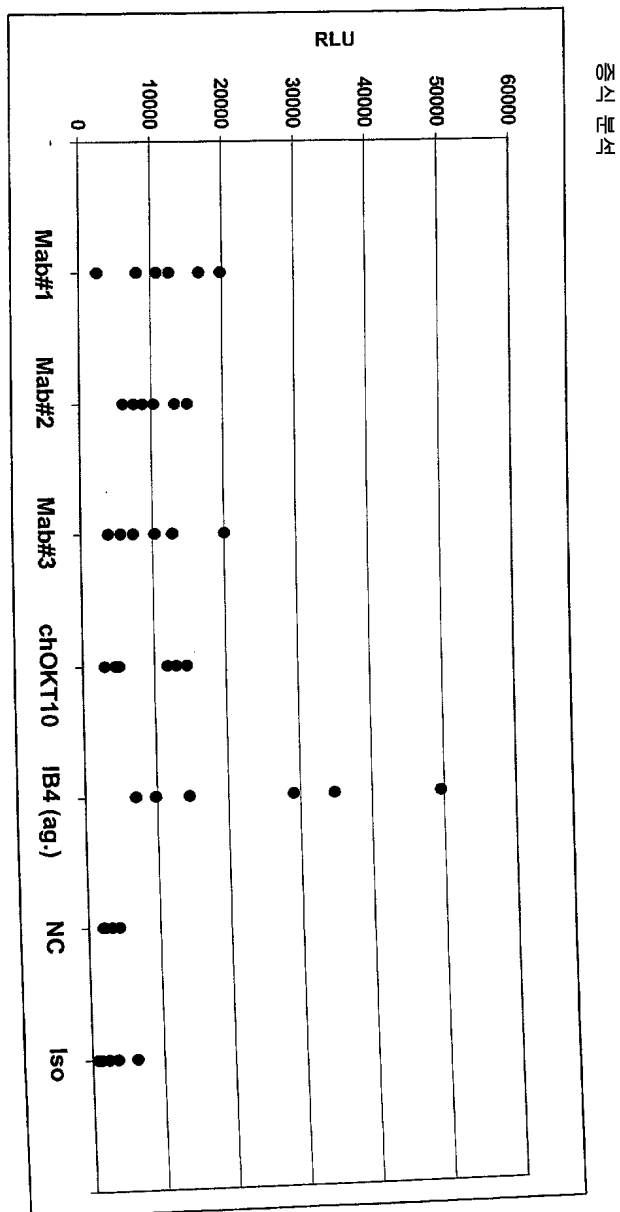
+2 S C Q V T H E G S T V E K T V A P
      BbsI
      ~~~~~
1251 GCTGCCAGGT CACGCATGAA GGGAGCACCG TGGAGAAGAC AGTGGCCCCCT
      CGACGGTCCA GTGCGTACTT CCCTCGTGGC ACCTCTTCTG TCACCGGGGA

+2 T E C S *
      PmeI
      ~~~~~
1301 ACAGAAATGTT CATAGGGGCC CGTTTAAACC CGCTGATCAG CCTCGACTGT
      TGTCTTACAA GTATCCCCGG GCAAATTGG GCGACTAGTC GGAGCTGACA
      pM_Ig_REV 100%
      =====

1351 GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCC GTGCCTTCCT
      CGGAAGATCA ACGGTCGGTA GACAACAAAC GGGGAGGGGG CACGGAAGGA
      pM_Ig_REV 100.0%
      =====

```

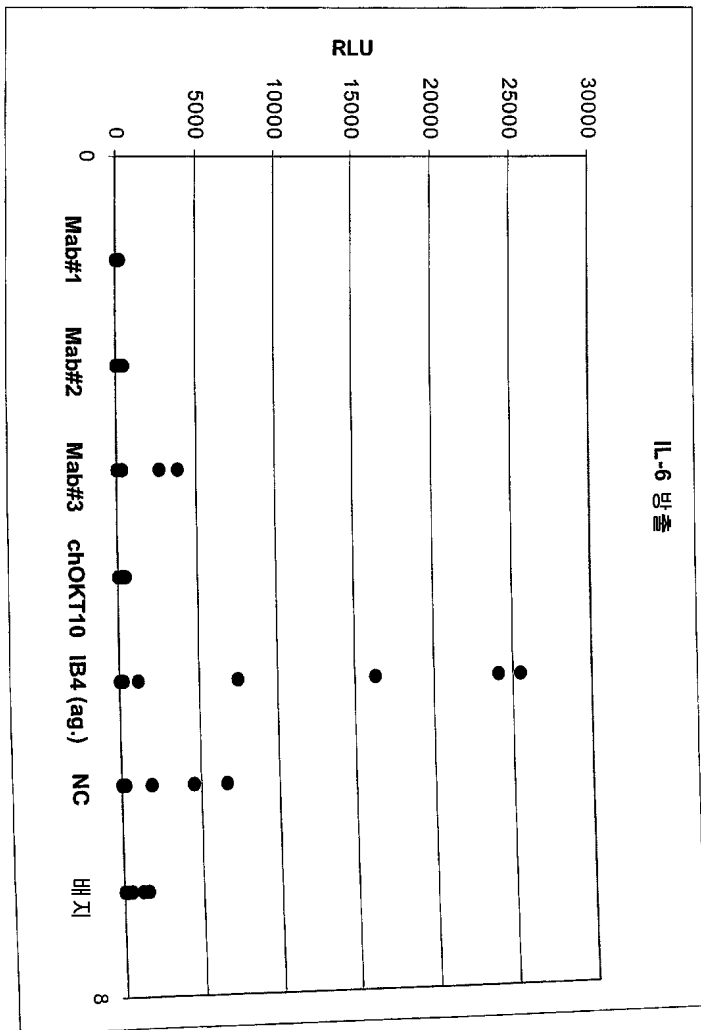
도면11





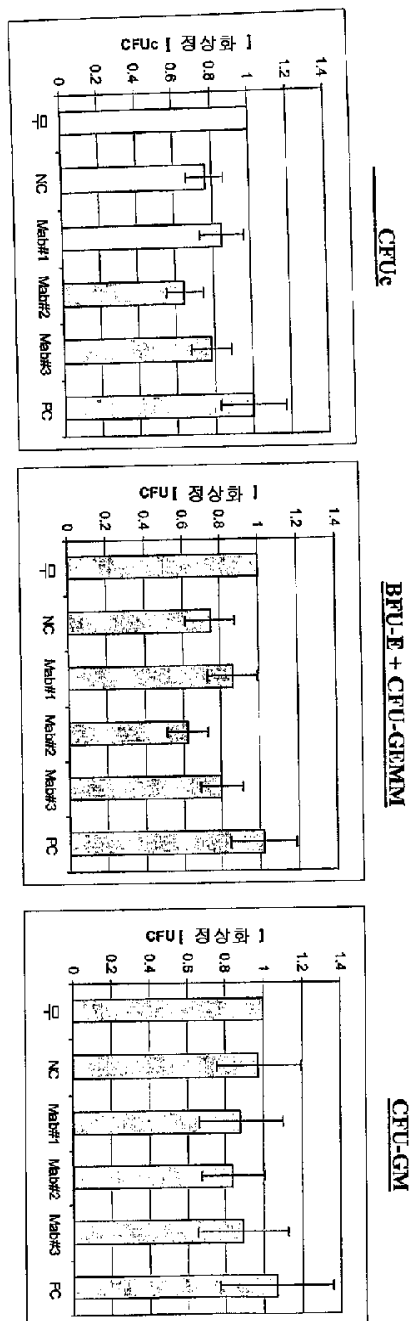
도면12

IL-6 방출 분석



도면13

CD34+/CD38+선구 세포에 대한 세포 독성



도면14

상이한 세포주를 이용한 ADCC

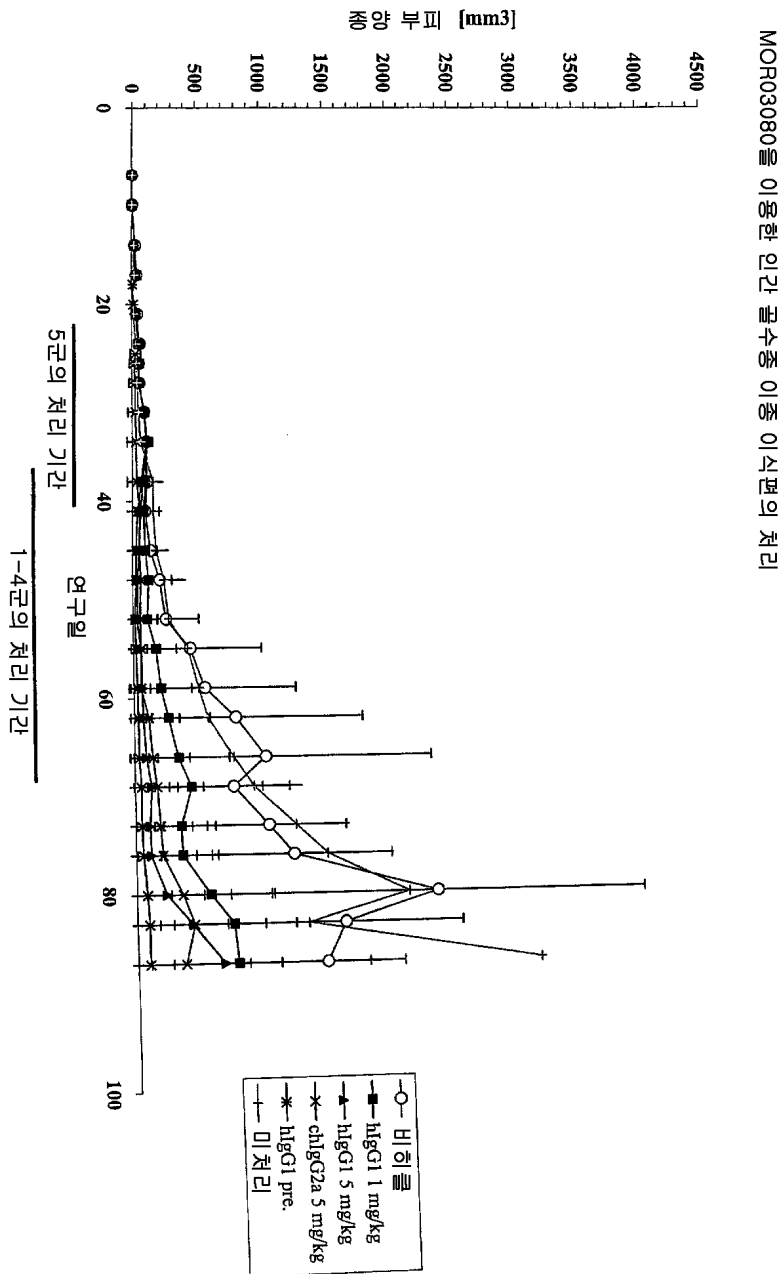
세포주	컬처 콜렉션	기원	발견 [MF]	ADCC <sup>a,c</sup> 에서의 최대 특이성 실효율 [%]			PC
				Mab#1	Mab#2	Mab#3	
RPMI 8226	ATCG CCL-155	MM	405.71	56	58	54	46
KMS-12-BM	DSMZ ACC551	MM	142.29	26	32	30	34
NCI-H929	ECACCG95050415	MM	45.01	68	73	38	54
OPM-2	DSMZ ACC50	MM	37.99	6	13	3	7
U-266	ECACCG85051003	MM	26.14	17	14	12	16
KMS-11	Namba et al., 1989 <sup>b</sup>	MM	26.81 <sup>b</sup>	22	30	26	28
JVM-13	DSMZACC19	CLL	463.93	11	20	12	15
JVM-2	DSMZACG12	CLL	140.84	22	28	10	24
CCRF-CEM	ECACCG85112105	ALL	301.46	24	29	20	22
Jurkat	DSMZ ACC282	ALL	202.99	7	8	13	12
AML-193	DSMZ ACC549	AML	62.69 <sup>d</sup>	33	26	39	33
OCI-AML5	DSMZ ACC247	AML	207.55 <sup>d</sup>	20	21	16	26
NB-4	DSMZ ACC207	AML	164.7 <sup>d</sup>	36	38	32	37
THP-1	DSMZ ACC16	AML	34.41	64	59	38	43
HL-60 <sup>d</sup>	DSMZ ACC3	AML	18.43 <sup>d</sup>	29	35	29	29
Raji	Burkitt's Lymph.	Burkitt's lymph.	n.d.	53	62	48	n.d.

도면15

MM-샘플을 이용한 ADCC

항체	Mab#1	Mab#2	Mab#3	PC
파라미터 :				
MM 샘플 : EC50 [nM] <sup>a</sup> :	0.116-0.202	0.006-0.185	0.027-0.249	0.282-0.356
MM 샘플 : 최대 특이성 실효율 [%]	13.1 - 61.6	16.2 - 57.9	13.6 - 36.0	15.5 - 49.5

도면16



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

- <110> MORPHOSYS AG
- <120> ANTI-CD38 HUMAN ANTIBODIES AND USES THEREFOR
- <130> 37629-0085W0
- <140> PCT/IB05/002476
- <141> 2005-02-07
- <150> 60/541,911
- <151> 2004-02-06



<150> 60/547,584

<151> 2004-02-26

<150> 60/553,943

<151> 2004-03-18

<150> 60/599,014

<151> 2004-08-06

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttattcta ttaattgggt cgcceaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggctat atcgatccga atcgtggcaa tacgaattac 180
gcgcagaagt ttcagggccg ggtgacatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgagtat 300
atttatTTTA tTcatggtat gcttgatttt tggggccaag gcaccctggt gacggtttagc 360
tca 363
```

<210> 2

<211> 366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
caggtgcaat tggTggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct aattatggta tgcattgggt gcgceaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atccgttctg atggtagctg gacctattat 180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtcgttat 300
tggTctaagt ctcatgcttc tgTtactgat tattggggcc aaggcaccct ggtgacggtt 360
agctca 366
```

<210> 3

<211> 366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

caggtgcaat tggatggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60  
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatggta tgcattgggt gcgccaagcc 120  
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atctattctg atggtagcaa taccttttat 180  
gcggatagcg tgaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtaatatg 300  
tatcgttggc cttttcatta tttttttgat tattggggcc aaggcacct ggtgacggtt 360

agctca 366

<210> 4

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

caggtgcaat tggatggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60  
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tctaattggta tgtcttgggt gcgccaagcc 120  
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atctcttate tttctagctc tacctattat 180  
gcggatagcg tgaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtttttat 300

ggttatttta attatgctga tggttggggc caaggcaccc tggtagcgt tagctca 357

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Asn Arg Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Ile Tyr Phe Ile His Gly Met Leu Asp Phe Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln 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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Tyr Trp Ser Lys Ser His Ala Ser Val Thr Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Met Tyr Arg Trp Pro Phe His Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln 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 Asn

20 25 30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 342

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gatatcgtga tgaccagag cccactgagc ctgccagtga ctccgggcga gcctgcgagc 60  
attagctgca gaagcagcca aagcctgctt tttattgatg gcaataatta tctgaattgg 120  
taccttcaaa aaccaggtca aagcccgag ctattaattt atcttggttc taatcgtgcc 180  
agtgggggcc cggatcgctt tagcggctct ggatccggca ccgattttac cctgaaaatt 240  
agccgtgtgg aagctgaaga cgtgggcgtg tattattgcc agcagtattc ttctaagtct 300

gtacaccttg gccagggtac gaaagttgaa attaaacgta cg 342

<210> 10

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gatatccaga tgaccagag cccgtctagc ctgagcgca gcgtgggtga tcgtgtgacc 60  
attacctgca gagcgagcca ggatatttct gcttttctga attggtacca gcagaaacca 120  
ggtaaagcac cgaaactatt aatttataag gtttctaatt tgcaaagcgg ggtcccgacc 180  
cgttttagcg gctctggatc cggcactgat ttaccctga ccattagcag cctgcaacct 240



gaagactttg cgacttatta ttgccagcag gcttattctg gttctattac ctttggccag 300

ggtacgaaag ttgaaattaa acgtacg 327

<210> 11

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gatatcgaac tgaccagacc gccttcagt agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60  
tcgtgtagcg gcgataatat tggtaataag tatgtttctt ggtaccagca gaaaccggg 120  
caggcgccag ttgttgtgat ttatggtgat aataatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180  
tttagcggt ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcgga 240  
gacgaagcgg attattattg ctcttcttat gattcttctt attttgtgtt tggcggcggc 300

acgaagttaa ccgttcttgg ccag 324

<210> 12

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gatatcgaac tgaccagacc gccttcagt agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60  
tcgtgtagcg gcgataatat tggtcattat tatgtttctt ggtaccagca gaaaccggg 120  
caggcgccag ttcttgtgat ttatcgtgat aatgatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180  
tttagcggt ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcgga 240  
gacgaagcgg attattattg ccagtcctat gattatcttc atgattttgt gtttggcggc 300

ggcacgaagt taaccgttct tggccag 327

<210> 13

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

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

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

Arg Thr

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Tyr Lys Val Ser Asn Leu Gln Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Gly Ser Ile  
 85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100 105

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asn Lys Tyr Val

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Asp Ser Ser Tyr Phe Val

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105

<210> 16

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

16

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly His Tyr Tyr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Arg Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105

<210> 17

 $\langle 211 \rangle$  120

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$ 

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

consensus sequence

&lt;400&gt; 17

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

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus sequence

<400> 18

Gln 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

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus sequence

<400> 19

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 consensus sequence

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 21

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
consensus sequence

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

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

Arg

<210> 22

<211> 300

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 22

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys

1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val

20 25 30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln

35 40 45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu

50 55 60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val

65 70 75 80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys

85 90 95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu

100 105 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile

115 120 125

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr

130 135 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys

145 150 155 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp

165 170 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val

180 185 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu

195 200 205

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

210 215 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala

225 230 235 240

Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp

245 250 255

Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln

260 265 270

Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val

275 280 285

Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile

290 295 300

<210> 23

<211> 1317

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

caggtggaat tgggtggaatc tggaggatcc ctgaaactct cctgtgcagc ctcaggattc 60  
gatttttagta gatcctggat gaattgggtc cggcaggctc caggaaaagg gctagaatgg 120  
attggagaaa ttaatccaga tagcagtacg ataaactata cgacatctct aaaggataaa 180  
ttcatcatct ccagagacaa cgccaaaaat acgctgtacc tgcaaatgac caaagtgaga 240  
tctgaggaca cagcccttta ttactgtgca agatatggta actggtttcc ttattggggc 300

caagggactc tggctactgt cagctcagcc tccaccaagg gtccatcggt cttecccttg 360  
gcacctctct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac 420  
tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac 480  
accttcccgg ctgtctaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg 540  
ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac 600  
accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg 660  
tgcccagcac ctgaactctt ggggggaccg tcagtcttcc ttttcccccc aaaaccaag 720

gacacctca tgatctcccg gaccttgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac 780  
gaagacctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 840  
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcacctc 900  
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc 960  
ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1020  
tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080

gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140

aacaactaca agaccacgcc tcccgctgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1200

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1260

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1317

<210> 24

<211> 642

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gatatcctga tgaccacgac tcaaaaaatc atgccacat cagtgggaga cagggtcagc 60

gtcacctgca aggccagtca aaatgtggat actaatgtag cctggtatca acagaaacca 120

ggacagtctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc gatacagtgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaccaa tgtgcagtct 240

gaggacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tatgacagct atcctctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggacctgaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 25

atggccaact gcgagttcag c 21

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer

<400> 26

tcagatctca gatgtgcaag atgaatc 27

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer

<400> 27

ttggtaccag gtggcgccag cagtg 25

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer

<400> 28

ttggtacat ggccaactgc gag 23

<210> 29

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer

<400> 29

ccgatatcag atctcagatg tgcaagatg 29

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 30

ccgatatcga tctcagatgt gcaagatg 28

<210> 31

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

caggtgcaat tagtccaaag tgggtcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttattcta ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggctat atcgatccga atcgtggcaa tacgaattac 180

gcgcagaagt ttcagggccg ggtgacatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgagtat 300

atttatttta ttcatggatg gcttgatttt tggggccaag gcaccctggt gacggtttagc 360

tca 363

<210> 32

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

nucleotide construct

<220>

<221> CDS

<222> (307)..(393)

<400> 32

tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 60

actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 120  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 180  
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 240  
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc 300

gccacc atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc 348

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro

1 5 10

aga tgg gtc ctg tcc cag gtg gaa ttc tgc agg cgg tta gct cag 393

Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Glu Phe Cys Arg Arg Leu Ala Gln

15 20 25

ctccaccaa gggctccatg gtcttccccc tggcacccctc ctccaagagc acctctgggg 453

gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt 513

ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag 573

gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct 633

acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca 693

aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac 753

cgtagtctt ccttctccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccctg 813

aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacct tgaggtaag ttcaactggt 873

acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 933

gcacgtaccg ggtggtcagc gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg aatggcaagg 993

agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 1053

aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gcccccatcc cgggatgagc 1113

tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg 1173

ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc 1233

tggactccga cggtccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 1293

agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc 1353

agaagagcct ctccctgtct cgggttaa at gagggccctg ttaaaccgc tgatecgcct 1413

cgactgtgcc ttctagtgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ctttcttga 1473

ccctggaagg tgccactccc actgtcc 1500

<210> 33

<211> 800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
nucleotide construct

<220>

<221> CDS

<222> (307)..(705)

<400> 33

tcgctattac catggtgatg cgggtttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 60  
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 120

aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 180  
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 240  
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc 300  
gccacc atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg 348

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp

1 5 10

atc tct ggt gcc tac ggg gat atc gtg atg att aaa cgt acg gtg gct 396  
Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Ile Lys Arg Thr Val Ala

15 20 25 30  
gca cca tct gtc ttc atc ttc cgc cca tct gat gag cag ttg aaa tct 444  
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

35 40 45  
gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag 492  
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

50 55 60  
gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc 540

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

65 70 75

cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc 588  
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

80 85 90



agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc 636  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 95 100 105 110

tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag 684  
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 115 120 125

agc ttc aac agg gga gag tgt taggggcccg tttaaacccg ctgatacagcc 735  
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 130

tcgactgtgc ctctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccgt gccttccttg 795  
 accct 800

<210> 34

<211> 800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 nucleotide construct

<220>

<221> CDS

<222> (307)..(384)

<220>

<221> CDS

<222> (386)..(712)

<400> 34

tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 60  
 actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 120  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggag 180  
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 240

ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc 300  
 gccacc atg gcc tgg gct ctg ctg ctc ctc acc ctc ctc act cag ggc 348  
 Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly

1	5	10	
aca gga tcc tgg gct gat atc gtg atg cac gaa gtt a acc gtc cta ggt			397
Thr Gly Ser Trp Ala Asp Ile Val Met His Glu Val Thr Val Leu Gly			
15	20	25	30
cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag			445
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu			
35	40	45	
gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac ttc			493
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe			
50	55	60	
tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gga gat agc agc ccc gtc			541
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val			
65	70	75	
aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac aag			589
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys			
80	85	90	
tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag tcc			637
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser			
95	100	105	110
cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag			685
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu			
115	120	125	
aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca taggggcccg tttaaaccg			732
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
130	135		
ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccct			792
gccttcct			800
<210> 35			
<211> 359			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

protein construct

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

50 55 60

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

100 105 110

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu

115 120 125

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

195 200 205

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

210 215 220

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 245 250 255

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 260 265 270  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 275 280 285  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 290 295 300  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 305 310 315 320

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 325 330 335  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 340 345 350  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 355

<210> 36

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

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

50				55				60							
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu
65				70				75				80			
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				85				90				95			
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala
100								105				110			
Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe
115				120								125			

Asn Arg Gly Glu Cys

130

<210> 37

<211> 135

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

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

protein construct

<400> 37

Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly  
1 5 10 15  
Ser Trp Ala Asp Ile Val Met His Glu Val Thr Val Leu Gly Gln Pro  
20 25 30

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu

35 40 45

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro  
50 55 60

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala  
65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg

100 105 110  
Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr  
115 120 125

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

130 135

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 38

Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val

1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 39

Phe Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser

1 5 10 15

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 40

Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile

1                      5                      10

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 41

Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr

1                      5                      10

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

35                      40                      45

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

50                      55                      60

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

65                      70                      75                      80

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

85                      90                      95

Ala Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100                      105                      110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115                      120



<210> 43

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg